

**EFFECTO DEL DILUYENTE Y TIEMPO DE EQUILIBRIO SOBRE LA MOTILIDAD E INTEGRIDAD DE MEMBRANA POST-DESCONGELACIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE CARNERO**

Effect of extender and equilibration time on the post-thaw motility and membrane integrity of ram sperm

Rommy Díaz<sup>1,2</sup>, Mariana A. Torres<sup>3</sup>, Silvana Painemil<sup>1,2</sup>, Simone M. M. K. Martins<sup>3,4</sup>, André F. C. De Andrade<sup>3</sup>, Silvana Bravo<sup>1,2</sup>, Néstor Sepúlveda<sup>1,2</sup>

<http://dx.doi.org/10.18548/aspe/0002.15>

<sup>1</sup> *Laboratorio de Producción Animal, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.*

<sup>2</sup> *Centro de Biotecnología en Reproducción (CEBIOR), Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.*

<sup>3</sup> *Laboratorio de Andrología y Tecnología de Embriones Suinos, Departamento de Reproducción Animal, Escuela de Medicina Veterinaria y Ciencia Animal, Universidad de São Paulo, Pirassununga, Brasil.*

<sup>4</sup> *Laboratorio de Investigación en Suinos, Departamento de Nutrición y Producción Animal, Escuela de Medicina Veterinaria y Ciencia Animal, Universidad de São Paulo, Pirassununga, Brasil. Teléfono: +56-45-2325458, Fax: +56-45-2325053.*

\*E-mail: [nestor.sepulveda@ufrontera.cl](mailto:nestor.sepulveda@ufrontera.cl)

**RESUMEN**

La gran sensibilidad de los espermatozoides de carnero a la criopreservación ha motivado estudios para mejorar este proceso. El objetivo de este trabajo fue estudiar los efectos del tiempo de equilibrio (0, 2, 4, 6 y 24 horas) con diferentes diluyentes de semen (a base de yema de huevo y lecitina de soya), en relación a la integridad de membrana plasmática y acrosomal, motilidad total y progresiva. No hay interacción ( $p>0,05$ ) entre los tratamientos. Los espermatozoides diluidos en yema de huevo obtuvieron mejores resultados ( $p<0,05$ ). No se observaron diferencias significativas entre 4, 6 y 24 horas en motilidad total y entre las 4 y 6 horas en integridad de membrana. En conclusión, la criopreservación tiene mejores resultados con diluyentes a base de yema de huevo, pero todavía no se tiene un resultado claro de cual es el mejor tiempo de equilibrio para la criopreservación del semen de carnero.

**Palabras clave:** *criopreservación, yema de huevo, lecitina de soya, viabilidad espermática*

**ABSTRACT**

The high sensitivity of ram sperm to the cryopreservation led to studies on the improvement of the process. This work aimed to study the effects of equilibration time (0, 2, 4, 6 and 24 hours) at different semen extenders (egg

yolk-based and soy lecithin-based), in regards to integrity plasma membrane and acrosome total and progressive motility. No interaction ( $p>0.05$ ) between treatments. Sperm extended in egg yolk had a better performance ( $p<0.05$ ). No significant difference between 4, 6 and 24 hours ( $p<0.05$ ) in total motility and between 4 and 6

hours ( $p < 0.05$ ) membrane integrity were observed. In conclusion, cryopreservation had better performance with egg yolk-based extender, but it does not have a clear result about how is the best equilibration time to cryopreservation ram semen.

**Keywords:** *cryopreservation, egg yolk, soybean lecithin, sperm viability*

## INTRODUCCION

El semen de carnero es más sensible al estrés de "shock por frío" que el semen de otras especies, como toro, conejo o humanos (Salamon y Maxwell, 2000). Es por ello que en la actualidad existe un gran interés por mejorar la eficiencia de los protocolos de criopreservación, ya que la preservación inadecuada sigue siendo un obstáculo para el amplio uso de semen congelado. Algunos estudios para aumentar el porcentaje de células viables post-descongelación han incluido el uso de varios diluyentes, tiempos de refrigeración, tasas de dilución, concentraciones de glicerol y tiempos de equilibrio (Patt y Nath, 1969; Forouzanfar *et al.*, 2010).

El tiempo de equilibrio corresponde al tiempo que los espermatozoides permanecen en contacto con el diluyente de congelación a una temperatura de 5°C antes de congelación, dando tiempo a que el crioprotector y otros componentes osmóticamente activos de los diluyentes penetren la célula hasta que se establezca un balance de concentraciones. Se ha planteado que el tiempo de equilibrio puede ayudar a la estabilización de la membrana del espermatozoide para tolerar el intercambio de agua que se produce a través de ella durante la congelación (Patt y Nath, 1969). Existen estudios que plantean diferentes beneficios y desventajas del tiempo de equilibrio, variando los efectos en los espermatozoides según el tipo de diluyente, las concentraciones de azúcar, de glicerol y velocidad enfriamiento de la muestra la muestra de semen, además de variar según la especie (Salamon y Maxwell, 2000). Existen escasos trabajos de investigación en ovino que fundamenten los cambios generados a nivel celular del espermatozoide durante el tiempo de equilibrio y existe una controversia acerca de cuál sería el tiempo de equilibrio recomendado. Recientemente se han evaluado tiempos de equilibrio prolongados, pero tiempos de 24 horas no mejoran la fertilidad del semen (Purdy *et al.*, 2010); al parecer, no ha sido reportado el valor de un intervalo de equilibrio intermedio o inferior para la criopreservación de espermatozoides de carnero. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del tiempo de equilibrio sobre la motilidad e integridad de membrana plasmática de espermatozoides de carnero congelados diluyentes a base de yema de huevo y lecitina de soya.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### *Recolección y evaluación de semen.*

Para la recolección del semen, tres carneros Criollos Araucanos fueron utilizados. Los machos eran sexualmente maduros, con un peso comprendido entre 60-80 kg y edades entre 3-5 años, pertenecientes al Núcleo Genético de ovinos Araucanos del Campo Experimental Maquehue de la Universidad de La Frontera, Temuco, Región de La Araucanía, Chile (38°44' Latitud Sur, 72°35' Longitud Oeste). La recolección se realizó en época reproductiva entre los meses de marzo y abril. Las muestras de semen fueron obtenidas por medio de vagina artificial dos veces por semana. Después de la recolección, alícuotas de los eyaculados fueron evaluadas para determinar movilidad en masa, concentración y morfología, para asegurar una calidad del semen adecuada. Sólo las muestras con movilidad en masa  $\geq 3$  (escala de 0 a 5), concentraciones  $\geq 2 \times 10^9$  espermatozoides/ml y morfología normal  $\geq 80\%$  fueron incluidas en el estudio (Santiani *et al.*, 2014).

### *Congelación de semen.*

Se utilizó como base un diluyente compuesto de 3.29 g de Tris, 1.85 g de fructosa, 1.36 g de ácido cítrico, 100 UI de penicilina y 1 mg de estreptomina, respectivamente. La osmolaridad y el pH se ajustaron a 335 mOsm y 7.0 respectivamente. Luego, se prepararon dos diluyentes, uno con lecitina de soya al 1% (peso/volumen) y otro diluyente con yema de huevo al 20%, utilizando una concentración de glicerol de 5% (volumen/volumen) (Forouzanfar *et al.*, 2010). Se utilizó una concentración final de  $100 \times 10^6$  espermatozoides/ml en pajuelas de 0,25 ml las que fueron sometidas durante 0, 2, 4, 6 y 24 horas de tiempo de equilibrio a 5°C. Posteriormente, las pajuelas fueron congeladas con nitrógeno líquido para su almacenamiento y posterior análisis. Cada tratamiento se repitió seis veces. Para la evaluación post-descongelación, las pajuelas fueron descongeladas en un baño maría a 37°C por 30 segundos.

### *Evaluación post-descongelación.*

Para la evaluación de motilidad se utilizó un sistema CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) (Integrated Sperm Analysis System V1.0, Proiser, Valencia, Spain). Los descriptores de motilidad fueron: motilidad total o masal (%) y motilidad progresiva (%). Se evaluaron un mínimo de cinco campos por muestra, contando un mínimo de 200 espermatozoides por campo. La integridad de la membrana plasmática y acrosomal fueron evaluadas por la asociación de sondas Syto 59, yoduro de propidio (PI) y lectina de *Arachis hypogaea* (peanut) conjugado con FITC (PNA-FITC). Brevemente, las muestras se diluyeron en medio Tyrode's albúmina lactato piruvato (TALP) a una concentración de  $5 \times 10^6$  espermatozoides/ml e incubados simultáneamente con 1  $\mu$ l de Syto 59 (750 nM), 3  $\mu$ l de PI (0,5 mg/ml) y 2

µl de FITC-PNA (37,5 µg/ml) a 37°C por 10 minutos. Luego de la incubación la muestra fue transferida a un tubo de citometría y diluida a una concentración de  $2,5 \times 10^6$  espermatozoides/ml. Las muestras fueron evaluadas en un citómetro de flujo BD FACSCanto II (Becton, Dickinson and Company, BD Biosciences, San Jose, CA, USA), controlado con el software FACSDiva 6.1.3 (Becton, Dickinson and Company). Un total de 10 000 eventos fueron analizados para cada test. Los restos celulares y las partículas fueron excluidos de la adquisición y análisis por ajuste de threshold y tinción con Syto 59.

*Análisis estadístico.*

El experimento fue diseñado en bloques al azar, en el que cada pool de semen se consideró un bloque, con los tratamientos en un arreglo factorial 2 x 5. El primer factor estudiado fue el efecto de los diluyentes en base de yema de huevo o lecitina de soja sobre las características espermáticas. El segundo factor estudiado fue el tiempo de equilibrio (0, 2, 4, 6 o 24 horas). Los datos fueron analizados utilizando MIXED (SAS, 2002). No se realizó interacción entre factores, por lo que cada uno de los cuales se estudiaron

individualmente. El factor de dilución se analizó mediante la prueba de Tukey-Kramer, mientras que el factor de tiempo de equilibrio fue analizado por un test t de Student (PDIFF) para detectar diferencias entre tratamientos, y regresión polinomial para encontrar el mejor tiempo de equilibrio a través de la ecuación:  $-b/2a$ . Las diferencias se consideraron significativas cuando  $p < 0,05$ . Los resultados se presentan como media  $\pm$  SEM (error estándar de la media).

**RESULTADOS**

No hubo interacción significativa ( $p > 0,05$ ) entre los factores diluyente y tiempo de equilibrio. Por lo tanto, cada uno de estos factores fue analizado por separado. Encontramos diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre el diluyente con yema de huevo y lecitina de soja en los parámetros de motilidad total (MT, %), motilidad progresiva (MP, %) e integridad de membranas acrosomal y plasmática (AIMI, %) (Figura 1). El efecto del tiempo de equilibrio sobre los parámetros espermáticos mencionados se observan en la Figura 2.

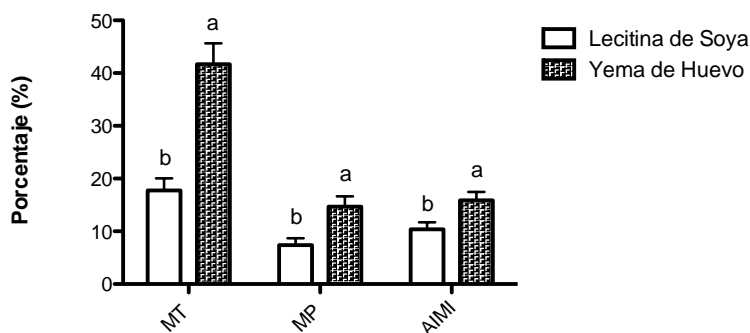


Figura 1. Efecto del diluyente sobre motilidad e integridad de membrana. Análisis de motilidad espermática asistida por computador (CASA): MT - motilidad total, MP - motilidad progresiva. Análisis de integridad de membrana plasmática y acrosomal por citometría de flujo: AIMI – acrosoma íntegro y membrana plasmática íntegra. Letras distintas representan diferencias estadísticas ( $p < 0,05$ ).

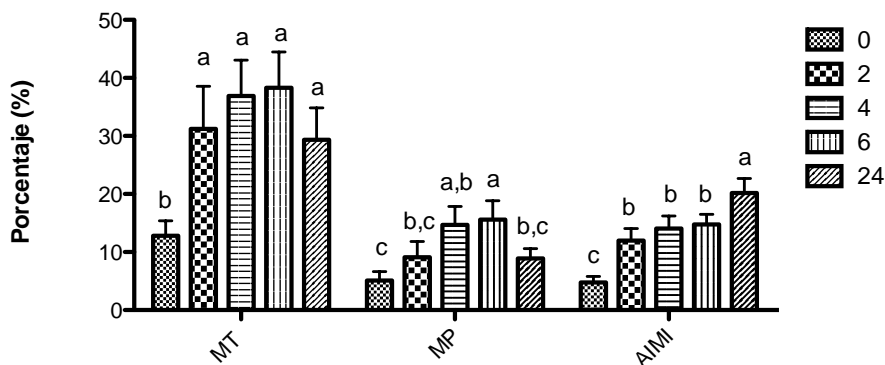


Figura 2. Efecto del tiempo de equilibrio (0, 2, 4, 6 y 24 horas) sobre la motilidad e integridad de membrana. Análisis de motilidad espermática asistida por computador (CASA): MT - motilidad total, MP - motilidad progresiva. Análisis de integridad de membrana plasmática y acrosomal por citometría de flujo: AIMI - acrosoma íntegro y membrana plasmática íntegra. Letras distintas representan diferencias estadísticas ( $p < 0,05$ ).

## DISCUSIONES

El proceso de congelación-descongelación, afecta principalmente la integridad de las células, por esta razón, se han utilizado diferentes diluyentes para prevenir el daño criogénico. La yema de huevo es el componente principal en diluyentes para el almacenamiento y criopreservación de semen de toro, carnero, macho cabrío, cerdo e incluso en humano. El principal componente activo de la yema de huevo es la fracción de lipoproteínas de baja densidad, que protege la integridad de la membrana (Moussa *et al.*, 2002). Sin embargo, la gran variabilidad en su composición y el aumento del riesgo de contaminación microbiana (Aires *et al.*, 2003), ha conducido a su sustitución con crioprotectores alternativos de origen vegetal, como la lecitina de soya la que de acuerdo a la evidencia práctica y de la literatura resulta ser un crioprotector económico y con resultados positivos post-descongelación (Forouzanfar *et al.*, 2010). Sin embargo, nuestros resultados muestran que el diluyente con yema de huevo permite la obtención de mayores porcentajes de espermatozoides móviles y con membrana íntegra que la lecitina de soya. Por lo tanto, la congelación semen de carnero en este diluyente ofrece un gran número de espermatozoides funcionales disponibles para procedimientos de reproducción asistida.

Por otra parte, el análisis de los resultados post-descongelación demuestra la importancia de la existencia de un tiempo de equilibrio previo a la congelación, ya que el tiempo 0 induce un daño severo por shock por frío a los espermatozoides, obteniéndose bajos porcentajes de espermatozoides móviles y móviles progresivos así como también con las membranas plasmática y acrosomal íntegras. A parte, no se observan diferencias significativas entre los otros tiempos evaluados (2, 4, 6 y 24 horas). Múltiples tiempos de equilibrio han sido examinados en una amplia variedad de especies. En general, se afirma que una duración de 2-4 horas es más adecuado para que el crioprotector pueda penetrar la célula, pero esto depende del tipo y concentración de crioprotector (Leite *et al.*, 2010). En un trabajo similar realizado con búfalo africano se encontró que un tiempo de equilibrio superior a 4 horas puede ser perjudicial para los espermatozoides (Herold *et al.*, 2006) Sin embargo, nuestros resultados no muestran diferencias significativas entre las 4, 6 y 24 horas en motilidad total y entre las 4 y 6 horas en la evaluación de la integridad de membrana. Incluso se observa una mayor proporción de espermatozoides con membrana plasmática y acrosomal íntegros a las 24 horas.

## CONCLUSIÓN

De nuestros resultados se puede inferir que para obtener una mejor calidad de semen criopreservado de carnero es necesario el uso de diluyentes a base de yema de huevo. Sin embargo, en relación al tiempo de equilibrio se puede concluir que para la criopreservación del semen de carnero, la existencia de un tiempo de equilibrio previo a la congelación ayuda a mantener aquellos parámetros espermáticos necesarios para llevar a cabo la fecundación, pero todavía no está claro cuál es el mejor tiempo.

## REFERENCIAS

- Aires V, Hinsch K, Mueller-Schloesser F, Bogner K, Mueller-Schloesser S, Hinsch E. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology* 2003; 60:269-79.
- Forouzanfar M, Sharafi M, Hosseini SM, Ostadhosseini S, Hajian M, Hosseini L, Abedi P, Nili N, Rahmani HR, Nasr-Esfahani MH. In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology* 2010; 73:480-487.
- Herold FC, de Haas K, Colenbrander B, Gerber D. Comparison of equilibration times when freezing epididymal sperm from African buffalo (*Syncerus caffer*) using Triladyl or AndroMed. *Theriogenology* 2006; 66:1123-1130.
- Leite TG, do Vale Filho VR, de Arruda RP, De Andrade AF, Emerick LL, Zaffalon FG, Martins JA, de Andrade VJ. Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen eval by CASA and flow cytometry. *Anim Reprod Sci* 2010; 120: 31-38.
- Moussa M, Matinet V, Trimeche A, Tainturier D, Anton M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* 2002; 57:1695-1706.
- Patt JA Jr, Nath J. Effects of diluents, equilibration time, and freezing rates on the storage of ram semen. *Cryobiology* 1969; 5(6):385-392.
- Purdy PH, Mocé E, Stobart R, Murdoch WJ, Moss GE, Larson B, Ramsey S, Graham JK, Blackburn HD. The fertility of ram sperm held for 24 h at 5 degrees C prior to cryopreservation. *Anim Reprod Sci* 2010; 118:231-235.
- Salamon S, Maxwell WM. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci* 2000; 62:77-111.
- Santiani A, Evangelista S, Sepúlveda N, Risopatrón J, Villegas J, Sánchez R. Addition of antioxidants Tempo and Tempol during cooling process prevents oxidative stress and improve frozen/thawed ram semen quality. *Theriogenology* 2014; 82(6):884-889.
- SAS, 2002. Statistical Analysis System: Software. Versión 9.0. SAS Institute, Cary