

Artículo original:

EFFECTO DE LA MOTILIDAD INICIAL Y DIFERENTES CONCENTRACIONES DE GLICEROL EN LA CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMARIOS DE ALPACA

Effect of the initial motility and different concentrations of glycerol on the cryopreservation of epididymal alpaca sperm

Choez K., Evangelista S., Castillo R., Santiani A. INTRODUCCIÓN

Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Email: kathyvet3@hotmail.com

Palabras Clave:

Alpaca, criopreservación, espermatozoide, glicerol

En alpacas, la motilidad del espermatozoide luego del proceso de criopreservación es considerablemente menor al semen fresco. Se han reportado motilidades iniciales de 30 a 98 % en espermatozoides eyaculados y recuperados del epidídimo. Luego del congelamiento, las motilidades varían entre 0 a 25 % (Valdivia *et al.*, 1999; Santiani *et al.*, 2005; Morton *et al.*, 2010; Banda *et al.*, 2010; Terreros *et al.*, 2012). Se observa que existe una gran variabilidad tanto en los valores de motilidad de semen fresco y congelado, siendo probable que la motilidad post descongelamiento obtenida dependa de la motilidad inicial. Por otro lado, poco éxito se ha logrado empleando diversos crioprotectores en la congelación de semen de alpacas, siendo el más común el glicerol; el cual ha sido usado en concentraciones de 2-4% (0.27-0.55 M) (Morton *et al.*, 2010) y 7 % (0.96 M) (Santiani *et al.*, 2005; Terreros *et al.*, 2012), sin embargo hasta la fecha no se ha establecido una concentración adecuada. Por lo tanto, el objetivo fue evaluar el efecto de la motilidad inicial y diferentes concentraciones de glicerol sobre las características funcionales de espermatozoides epididimarios de alpaca luego del proceso de criopreservación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 10 testículos, los que fueron recolectados del Camal Municipal de Huancavelica y transportados en cloruro de sodio al 0.9% a 5°C hasta su procesamiento en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM, Lima. Para la recuperación de los espermatozoides se diseccionó la cola del epidídimo con 1.5 ml de dilutor leche descremada-yema de huevo-fructosa (Santiani *et al.*, 2005) a 35°C. Luego se completó con 3 ml del mismo dilutor. Muestras de 0.5 ml de los espermatozoides epididimarios diluidos fueron distribuidos en 8 tubos. Posteriormente se realizó el enfriamiento de 35°C hasta 5°C a una tasa aproximada de 1°C/5min (150 minutos aproximadamente). Una vez a 5 °C, a cada tubo se le añadió lentamente glicerol en distintas concentraciones formando los siguientes tratamientos: T0 (Glicerol 0 M), T1 (Glicerol 0.25M), T2 (Glicerol 0.50 M), T3 (Glicerol 0.75 M), T4 (Glicerol 1 M), T5 (Glicerol 1.25 M), T6 (1.50 M) y T7 (Glicerol 1.75 M). Se dejó estabilizar por 30 minutos y se procedió a envasar en pajillas de 0.25ml. Las pajillas fueron expuestas a vapores de nitrógeno por 20 minutos y luego almacenadas en nitrógeno líquido hasta su evaluación. Los espermatozoides epididimarios fueron evaluados al inicio y después de la criopreservación mediante la observación de la motilidad, integridad funcional de membrana plasmática a través de la prueba hipoosmótica (HOS) y la viabilidad e integridad acrosomal a través de la técnica de doble tinción azul tripán 2% y giemsa 20%.

Los resultados obtenidos fueron divididos en 2 grupos, dependiendo de la motilidad inicial de cada caso: Grupo I, con motilidad inicial mayor ó igual a 60%; y Grupo II, con motilidad inicial menor a 60%. Para evaluar si existieron diferencias entre la motilidad inicial y las concentraciones de glicerol sobre los porcentajes motilidad, integridad funcional de membrana y la viabilidad e integridad acrosomal se utilizó un análisis de varianza de 2 vías y el post test de Bonferroni.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los 10 testículos evaluados, 5 presentaron motilidad iniciales menores a 60% (entre 40 a 50%), mientras que los otros presentaron motilidades mayores o iguales a 60% (entre 60 a 80%). La motilidad inicial afectó significativamente ($p < 0.05$) los porcentajes de motilidad post descongelamiento. En ese sentido, en el grupo I se obtuvo un 25% de motilidad luego del proceso de criopreservación, en comparación con el grupo II, donde se obtuvo apenas un 7.4%. (Tabla 1). Al evaluar el efecto de las concentraciones de glicerol, se observa que todos los tratamientos del Grupo I son aparentemente mayores al Grupo II, aunque sólo se presentan diferencias significativas ($p < 0.05$) cuando se comparan concentraciones de glicerol de 1.0 M y 1.25 M (Tabla 1).



Tabla 1. Efecto de la motilidad inicial y diferentes concentraciones de glicerol sobre el porcentaje de motilidad después de la criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca.

Concentración de glicerol	Motilidad (%)	
	Mayor de 60 %	Menor de 60 %
T0 (0 M)	10.00 ± 0.00	2.60 ± 3.21
T1 (0.25)	22.00 ± 13.04	5.60 ± 4.83
T2 (0.50)	23.00 ± 13.96	7.00 ± 4.47
T3 (0.75)	26.00 ± 15.17	9.00 ± 4.18
T4 (1.0 M)	34.00 ± 15.17 ^a	12.00 ± 7.58 ^b
T5 (1.25 M)	36.00 ± 15.17 ^a	9.00 ± 7.42 ^b
T6 (1.50 M)	26.00 ± 13.87	8.60 ± 4.72
T7 (1.75 M)	22.00 ± 13.04	5.40 ± 1.67
Promedio (T0- T7)	24.90 ± 14.56 ^a	7.40 ± 5.37 ^b

Valores son promedios ± D.S.

^{a,b} Letras diferentes dentro de una fila indican diferencias significativas

Resultados similares de motilidades después de la criopreservación son reportados por Morton *et al.* (2007, 2010), quienes obtuvieron motilidades después del descongelamiento alrededor del 20%, a partir de motilidades iniciales superiores a 50%. Banda *et al.* (2010), encontraron motilidades post descongelamiento de 16%, partiendo con una motilidad inicial superior al 30%. Esto se podría explicar porque Banda *et al.* (2010) recuperaron los espermatozoides epididimarios inmediatamente después de la castración, mientras que nosotros esperamos un promedio de 20 horas, debido al transporte de las muestras. Por otro lado, Terreros *et al.* (2012) reportan un 30% de motilidad luego del proceso de criopreservación cuando utilizaron muestras con motilidad inicial superior al 60 %.

Tabla 2. Efecto de la motilidad inicial de espermatozoides epididimarios de alpaca sobre los parámetros evaluados luego del proceso de criopreservación.

Concentración de glicerol	Integridad funcional de membrana (%)		Viabilidad/integridad acrosomal (%)	
	Grupo I		Grupo II	
	Mayor de 60 %	Menor de 60 %	Mayor de 60 %	Menor de 60 %
T0 (0 M)	10.00 ± 5.95	2.60 ± 10.74	10.00 ± 1.67	2.60 ± 6.47
T1 (0.25)	22.00 ± 8.58	5.60 ± 11.72	22.00 ± 4.10	5.60 ± 7.66
T2 (0.50)	23.00 ± 5.66	7.00 ± 15.36	23.00 ± 6.10	7.00 ± 10.06
T3 (0.75)	26.00 ± 11.07	9.00 ± 18.13	26.00 ± 9.18	9.00 ± 7.12
T4 (1.0 M)	34.00 ± 14.41	12.00 ± 15.19	34.00 ± 4.95	12.00 ± 8.76
T5 (1.25 M)	36.00 ± 11.70	9.00 ± 20.49	36.00 ± 7.40	9.00 ± 12.40
T6 (1.50 M)	26.00 ± 14.26	8.60 ± 14.59	26.00 ± 5.26	8.60 ± 8.66
T7 (1.75 M)	22.00 ± 11.11	5.40 ± 14.48	22.00 ± 5.77	5.40 ± 5.37
Promedio (T0- T7)	33.01 ± 10.86 ^a	22.75 ± 14.13 ^b	19.90 ± 6.16 ^a	15.95 ± 8.09 ^b

Valores son promedios ± D.S.

^{a,b} Letras diferentes en Filas indican diferencias significativas

Al evaluar los porcentajes de integridad funcional de membrana y vitalidad e integridad acrosomal también se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre el Grupo I y el Grupo II. En ambos casos, los parámetros seminales fueron mayores en el Grupo I (Tabla 2). Al comparar el efecto de las diferentes concentraciones de glicerol sobre los porcentajes de integridad funcional de membrana y vitalidad e integridad acrosomal no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$).

CONCLUSIONES

Estos datos indican que las muestras que tienen una motilidad inicial mayor a 60 %, logran mejores porcentajes de motilidad después del descongelamiento en comparación con las muestras que inician con motilidades menores a 60 %.

BIBLIOGRAFIA

- Banda J, Evangelista S, Ruiz L, Sandoval R, Rodríguez C, Valdivia M, Santiani A. 2010. *Rev Investig Vet Perú* 21:145-153.
- Morton K, Bathgate R, Evans G, Maxwell W. 2007. *Reprod FertilDev.* 19:792-796.
- Morton K, Evans G, Maxwell W. 2010. *Theriogenology* 74:311-316.
- Santiani A, Huanca W, Sapana R, Huanca T, Sepúlveda N, Sánchez R. 2005. *Asian J Androl* 7:303-309.
- Terreros M, Arriaga I, Huanca W. 2012. Resúmenes y Trabajos VI Congreso Mundial de Camélidos Sudamericanos. Pg 71.
- Valdivia M, Ruíz M, Bermúdez L, Quinteros S, Gonzáles A, Manosalva I, Ponce C, Olazábal J, Dávalos R. 1999. Resúmenes y Trabajos II Congreso Mundial sobre Camélidos. Cusco, Perú.



Figura 1. Recuperación de espermatozoides epididimarios



Figura 2. Pajillas de semen expuestas a vapores de nitrógeno líquido

