

## **Efecto de agentes crioprotectores no permeables y uno comercial sobre las características físicas de semen bovino postdescongelación**

*Effect of non-permeable cryoprotectants and commercial one on the physical characteristics of post-freeze bovine semen*

**J.C. Ramón, S.G. Landívar, J.L. Pesántez, D.F. Rodríguez**

Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Cuenca, Ecuador.

Autor correspondencia: [juan.ramonez@ucuenca.edu.ec](mailto:juan.ramonez@ucuenca.edu.ec)

### **1. INTRODUCCIÓN**

Durante el proceso de congelación y descongelación al que es sometido el semen bovino, ocurren diferentes formas de lesiones celulares, lo que ocasiona una disminución en la motilidad, viabilidad y la capacidad de fertilización del espermatozoide después de la inseminación (Chaveiro, Machado, Frijters, Engel, & Woelders, 2006). Uno de los principales factores que reduce la viabilidad del espermatozoide, es la formación de hielo intracelular, por tal razón la composición del diluyente y la naturaleza del crioprotector de semen podrían ayudar a reducir este daño. El crioprotector utilizado con más frecuencia es el glicerol, que debe ser usado a bajas concentraciones (menos del 4%) debido a su potencial de toxicidad (Bhur, Fiser, Bailey, & Curtis, 2001), por tal razón, en la actualidad se ha investigado la utilización de otros agentes crioprotectores menos dañinos, tales como los agentes no permeables dentro de estos azúcares como la rafinosa, trehalosa y sacarosa, estos favorecen la excreción de agua fuera de la célula, a fin de disminuir la formación de cristales de hielo intracelular.

La trehalosa es un disacárido no reductor, es producida por diversos organismos en respuesta a condiciones de estrés como: la deshidratación, temperaturas extremas y choque osmótico (Cerrutti, Segovia de Huergo, Galvagno, Schebor, & Buera, 2000). Además, es un estabilizador de biomoléculas, incluyendo proteínas. De Leeuw, De Leeuw, Den Daas, Colenbrander, & Verkleij (1993) investigaron el efecto de la adición de trehalosa y sacarosa a un medio de congelación de semen de toro y encontraron que la sacarosa puede tener un pequeño efecto positivo en la supervivencia del espermatozoide, en estudios hechos por Woelders, Matthijs, & Engel (1997) se encontró que la adición de sacarosa o trehalosa contribuye a la protección del espermatozoide dependiendo la osmolaridad del medio. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio es determinar el efecto de los agentes crioprotectores no permeables tales como trehalosa, sacarosa, rafinosa y lactosa, en combinación con glicerol, sobre las características físicas del semen de toro. Específicamente, se pretende comparar el efecto sobre las características físicas de los espermatozoides bovinos de un crioprotector de los agentes no permeables de trehalosa y sacarosa frente a un diluyente comercial.

### **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

El estudio se realizó en la parroquia Huambi del cantón Sucúa, donde se colectaron 6 eyaculados de un semental de raza Limusín, mediante el método de vagina artificial, (42-43°C) usando una hembra en celo para la monta. Inmediatamente después de la colecta, se realizaron las evaluaciones para determinar calidad seminal previa a la congelación. Los eyaculados que presentaron una motilidad progresiva > 80% y una concentración superior a  $1.0 \times 10^9$  espermatozoides  $\text{ml}^{-1}$ , fueron congelados. Cada eyaculado se dividió en tres partes y fueron utilizados en tres diluyentes: Trehalosa a una concentración de 25 mM con glicerol; Sacarosa a 20 mM con glicerol; y Triladyl, y se ajustó a una

dosis de  $100 \times 10^6$  de espermatozoides y luego fueron sometidos a un periodo de equilibrio durante 3 horas a 5°C. Posteriormente, el semen diluido se envasó en pajuelas de 0.5 ml y estas fueron colocadas sobre vapores de nitrógeno líquido durante 15 minutos, luego sumergidas y guardadas en nitrógeno líquido. Después del almacenamiento de 10 días, se descongelaron a baño María 10 pajuelas por eyaculado para la valoración de la calidad seminal [(motilidad progresiva espermática, porcentaje de espermatozoides vivos/muertos, porcentaje de espermatozoides normales/anormales (morfo-anomalías)]. Para el análisis de los datos se aplicó un Análisis de Varianza (ANOVA) y las diferencias estadísticas entre medias se identificaron mediante la prueba de Tukey en el paquete estadístico SPSS Statistics 19.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se muestran las características seminales antes de la congelación, las cuales no mostraron diferencias estadísticas entre diluyentes ( $P>0.05$ ); estos resultados se encuentran dentro de los valores normales para un eyaculado de semental (Medina-Robles, Sanchez-Carvajal, Velasco-Santamaria, & Cruz-Casallas, 2007). En el presente estudio, el uso de crioprotectores no permeables como la Trehalosa con glicerol y Sacarosa con glicerol, para la congelación de semen de toros de raza cárnica, no mejoraron las características seminales postdescongelación ( $P>0.05$ ). Similares resultados han sido reportados por Moura, Deschamps, & Moraes-Ferrugem (1995), quienes encontraron que las características seminales no mejoran con la inclusión de Trehalosa en un diluyente a base de glicerol. Sin embargo, la inclusión de Trehalosa en diluyentes sin glicerol puede mejorar la motilidad de los espermatozoides (Molinia, Evans, & Maxwell, 1994).

El-Sheshtawy, Sisy, & El-Nattat (2015) sugieren que la adición de Trehalosa y Sacarosa al  $50 \text{ mM l}^{-1}$  o Trehalosa y Sacarosa al  $100 \text{ mM l}^{-1}$  tienen un efecto benéfico en la congelación-descongelación de semen diluido de toro; nuestros resultados, contrarios al mencionado estudio, quizás se deban a la utilización de una concentración inferior de estos crioprotectores no permeables ( $25 \text{ mM}$  para Trehalosa y  $20 \text{ mM}$  para Sacarosa). Sin embargo, se puede observar que la motilidad progresiva luego de la descongelación mejoró con el uso de un diluyente comercial Triladyl ( $P<0.05$ ), aunque el porcentaje de espermatozoides vivos fue menor ( $P<0.05$ ) con respecto a los dilutores que usaron Trehalosa y Sacarosa. Similares datos fueron reportados por Villa (1996), quien comparó un protocolo tradicional tris-yema de huevo contra Triladyl y demostró que, bajo condiciones ambientales tropicales, la movilidad espermática post-descongelación mejora con la utilización del crioprotector comercial ( $P<0.05$ ), no obstante, el uso de estos tres diluyentes (Trehalosa, Sacarosa y Triladyl), no mostró diferencias al comparar el porcentaje espermatozoides normales ( $P>0.05$ ) post descongelación.

**Tabla 1.** Comparación de dos agentes crioprotectores no permeables frente a un diluyente comercial sobre las características físicas del semen bovino.

Variable	Semen sin congelar			Semen post-descongelamiento		
	<i>Trehalosa</i>	<i>Sacarosa</i>	<i>Triladyl</i>	<i>Trehalosa</i>	<i>Sacarosa</i>	<i>Triladyl</i>
MIP (%)	84.00 <sup>a</sup>	81.50 <sup>a</sup>	83.50 <sup>a</sup>	32.00 <sup>b</sup>	29.45 <sup>c</sup>	46.50 <sup>a</sup>
V (%)	83.5 <sup>a</sup>	84.5 <sup>a</sup>	86 <sup>a</sup>	33.85 <sup>b</sup>	31.85 <sup>b</sup>	51.80 <sup>a</sup>
A (%)	90.5 <sup>a</sup>	89.0 <sup>a</sup>	91.5 <sup>a</sup>	86.2 <sup>a</sup>	84.85 <sup>a</sup>	86.85 <sup>a</sup>

Letras diferente literal en la misma línea y para cada fase de evaluación, indican diferencia estadística <sup>a,b,c</sup>( $P<0.05$ ). MIP: motilidad individual progresiva; V: espermatozoides vivos/muertos; A: espermatozoides normales/anormales

#### 4. CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio indican que la utilización de crioprotectores no permeables como la Trehalosa con glicerol y Sacarosa con glicerol no ayudaron a mejorar las características físicas del semen bovino durante el proceso de congelado y descongelado. Además, es importante seguir desarrollando esta línea de investigación para evaluar si mayores concentraciones de estos crioprotectores en el dilutor mejoran las características seminales.

#### REFERENCIAS

- Bhur, M., Fiser, P., Bailey, J., Curtis, E. (2001). Cryopreservation in different concentrations of glycerol alters boar sperm and their membranes. *Journal of Andrology*, 22(6), 961-969.
- Cerrutti, P., Segovia de Huergo, M., Galvagno, M., Schebor, C., Buera, M.P. (2000). Commercial baker's yeast stability as affected by intracellular content of trehalose, dehydration procedure and the physical properties of external matrices. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 54(4), 575-580.
- Chaveiro, A., Machado, L., Frijters, A., Engel, B., Woelders, H. (2006). Improvement of parameters of freezing medium and freezing protocol for bull sperm using two osmotic supports. *Theriogenology*, 65, 1875-1890.
- De Leeuw, F. E., De Leeuw, A. M., Den Daas, J. H. G., Colenbrander, B., Verkleij, A. J. (1993). Effects of various cryoprotective agents and membrane stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*, 30(1), 32-44.
- El-Sheshtawy, R. I., Sisy, G. A., El-Nattat, W. S. (2015). Effects of different concentrations of sucrose or trehalose on the postthawing quality of cattle bull semen. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 4(1), 26-31.
- Medina-Robles, V. M., Sanchez-Carvajal, E., Velasco-Santamaria, Y. M., Cruz-Casallas, P. E. (2007). Crioconservación de semen bovino usando un congelador programable (CL-8800) y determinación de su calidad postdescongelación por medio un sistema de análisis espermático asistido por computador (CASA). *Orinoquia*, 11(1), 75-86.
- Molinia, F. C., Evans, G., Maxwell, W. M. (1994). Incorporation of penetrating cryoprotectants in diluents for pellet-freezing ram spermatozoa. *Theriogenology*, 42, 849-858.
- Moura, A., Deschamps, J. C., Moraes-Ferrugem, J. C. (1995). Effect of the concentration and addition temperature of trehalose in extenders on freezing ram semen in straws. *Ciencia Rural*, 25(1), 105-109.
- Villa, L. G. (1996). *Efecto de diferentes tratamientos en el procesamiento y en la movilidad pos descongelación de espermatozoides criopreservados de bovino*. Tesis. Veracruz, México Universidad Veracruzana.
- Woelders, H., Matthijs, A., Engel, B. (1997). Effects of trehalose and sucrose, osmolality of the freezing medium, and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing. *Cryobiology*, 35, 93-105.