

28. Salud Animal

Criopreservación de semen Equino: efecto de Trehalosa y Duodecil Sulfato de Sodio (SDS) adicionados a un diluyente base

Autor: Remezovski; Nadia^{1,2}; nadiareme@hotmail.com

Co-autor(es): Rearte, Ramiro¹; ramirorearte@hotmail.com

Orientadores: Stornelli, María Alejandra¹, astornel@fcv.unlp.edu.ar; Miragaya, Marcelo²

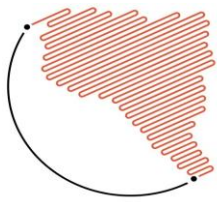
¹Cátedra de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP

²Instituto de Teriogenología, Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA.

Resumen

El objetivo del trabajo fue evaluar el efecto protector de Trehalosa (T) y la combinación de T y SDS, a diferentes concentraciones T0; T1,6 (0,156%); T3,3 (0,312%); T6,3 (0,624%) y T3,3 con SDS12 (0,125%); SDS20 (0,250%); SDS50 (0,500%), adicionadas a un diluyente (DIL) base EDTA-Lactosa con 20% de yema de huevo y 5% de dimetilformamida sobre el espermatozoide equino durante el proceso de congelación y descongelación. Los eyaculados de equinos raza Criolla Argentino (n=10, r=2), fueron filtrados y se evaluaron las características macroscópicas: Color, Aspecto, Volumen (ml) y microscópicas: Movilidad (M) (AndroVision®, Minitüb GmbH, Tiefenbach, Germany), Porcentaje de vivos (PV; tinción de Eosina-nigrosina); prueba de HOS (% de colas enrolladas post incubación en solución de lactosa 50mOsm) y Acrosomas intactos (AI; conjugado de FITC-PSA). El semen fue diluido 1:1 en un diluyente Kenney, dividido en alícuotas, centrifugado, resuspendido a 200×10^6 esp/mL en el diluyente base con diferentes concentraciones de T y las combinaciones de T y SDS. El semen fue empaquetado en pajuelas de 0,5 ml y congelado sobre vapores de nitrógeno líquido. Las pajuelas fueron descongeladas a 37° durante 1 minuto y sometidas a las mismas pruebas que el semen fresco. Las comparaciones entre tratamientos (DIL) se realizaron mediante el análisis de varianza utilizando el procedimiento GLIMIX de SAS® para mediciones repetidas entiendo. Se observó que el DIL conteniendo T3,3 fue más efectivo en proteger la membrana acrosomal cuando se comparó con las combinaciones de T3,3SDS12 y T3,3SDS20. A su vez, se observó un efecto deletéreo del SDS a altas concentraciones sobre la célula espermática del equino.

Palabras claves: Equino, Semen, Criopreservación



Introducción

Para que un espermatozoide pueda fertilizar el ovocito debe conservarse funcional y morfológicamente normal (Graham, 2011). La criopreservación ocasiona daños sobre la célula espermática y solo un porcentaje de espermatozoides sobrevive el proceso de congelamiento de semen (Alhaider, 2009).

La Trehalosa (T) es un disacárido que además de ejercer actividad osmótica en el diluyente de congelamiento actúa como estabilizante de membranas gracias a su interacción con las cabezas de los fosfolípidos (Bakas, 1991; Chen, 2000).

El Duodecil Sulfato de Sodio (SDS) es un detergente tensioactivo que disgrega las lipoproteínas de baja densidad de la yema de huevo, ejerciendo acción protectora sobre la célula espermática durante el shock de frío.

La combinación en el diluyente de crioprotectores que ejerzan su acción protectora a diferente nivel celular durante la criopreservación permitiría aumentar la calidad espermática posdescongelado.

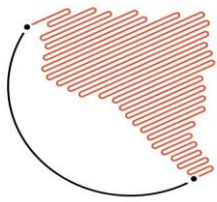
Objetivos

Evaluar la acción protectora de T y su combinación con SDS en un diluyente base sobre la célula espermática durante el congelamiento.

Materiales y Métodos

Dos eyaculados de cada uno de 10 padrillos se recolectaron usando una vagina artificial modelo Missouri. Previo al procesamiento de los eyaculados se evaluó la movilidad (M) sobre platina térmica a 37°C con microscopio óptico y mediante un sistema de análisis computarizado de semen (CASA; *Androvision- Minitube*). Se evaluó la concentración mediante hemocitometría, utilizando una cámara de Neubauer, la funcionalidad de membranas (prueba hipoosmótica, HOS; Neild, *et al.* 1999), la reacción acrosomal mediante lectinas marcadas con fluorescentes (FITC-PSA; Mendoza *et al.*, 1992), la integridad de membrana (PV) y morfoanomalías en preparados teñidos con eosina-nigrosina (Estrada, *et al.*, 2007).

Posterior a la evaluación del semen fresco, se realizó una primera dilución 1:1 en medio Kenney (Samper, 2009), se centrifugó a 275 G por 10 min. (Cochran, *et al.* 1984) y el pellet fue diluido en los diferentes diluyentes de congelamiento: Dil base EDTA Lactosa con 20% yema de huevo y 5 % DMF y las diferentes combinatorias de T y SDS: T1,6 (0,156%); T3,3 (0,312%); T6,3 (0,624%) y T3,3 con SDS12 (0,125%); SDS25 (0,250%); SDS50 (0,500%). Se utilizó una curva de congelamiento de semen sobre vapores de nitrógeno líquido (Cochran 1984) y las pajuelas fueron descongeladas a 37°C durante 1 min.



El semen descongelado fue sometido a las mismas pruebas de evaluación que el semen fresco.

Para el Análisis Estadístico se realizó la comparación entre tratamientos mediante un análisis de varianza utilizando el procedimiento GLIMIX de SAS para mediciones repetidas entiendo.

Resultados y Discusión

Se observaron diferencias significativas en todos los parámetros (MTc [motilidad total CASA], PV, HOS y AI) al comparar el semen fresco con el semen congelado-descongelado ($72,76 \pm 0,3$ vs $24,8 \pm 3,5$; $84,5 \pm 1$ vs $56,3 \pm 3$; $65,1 \pm 0,4$ vs $24,9 \pm 2,8$; $81 \pm 1,7$ vs $54,7 \pm 5,2$; [$P < 0.05$]). No se observaron diferencias en ninguno de los parámetros seminales al comparar T1,6 vs T3, 3 + T6,3 y T3,3 vs T6,3 al descongelado. Se observaron diferencias significativas en acrosomas normales cuando se compararon los diluyentes T3,3 vs T3,3 con SDS $0,125 + 0,250$ ($66,8 \pm 3,5$ vs $52,6 \pm 1,9$) [$P < 0.05$]. Se observó la acción deletérea al usar altos porcentajes de SDS. Al comparar T3,3 + T3,3SDS $0,125 + T3,3$ SDS $0,250$ vs T3,3SDS $0,500$ se observó un descenso de todos los parámetros seminales con este último ($20,9 \pm 0,5$ vs $10,8 \pm 4,4$; $57,5 \pm 1,7$ vs $38,6 \pm 4,5$; $25,9 \pm 4,4$ vs $9,13 \pm 4,6$; $52,6 \pm 1,9$ vs $25,6 \pm 5,3$ [$P < 0.05$]). Nuestros resultados muestran el efecto deletéreo de altas concentraciones de detergente sobre la célula espermática. Se observó un efecto

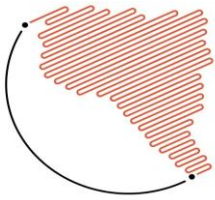
protector en la integridad acrosomal de T sin SDS en comparación con T combinado con bajas concentraciones SDS. Nuestros resultados muestran que no hubo efecto sinérgico de la T y el SDS cuando se combinan en el diluyente base.

Conclusiones

La combinación de T y SDS en un diluyente base no muestra efectos protectores sobre la célula espermática en el proceso de congelamiento.

Referencias Bibliográficas

- A.K. Alhaider, P. W. (2009). Cryopreservation of dog semen: The effects of Equex STM paste on plasma membrane fluidity and the control of intracellular free calcium. *Animal Reproduction Science*, 110, 147-161.
- Bakas LS, D. E. (1991). Effect of Ca^{2+} on the cryoprotective action of trehalose. *Cryobiology*, 28, 347-353.
- Chen T, F. A. (2000). Literature Review: Supplemented phase diagram of the trehalose–water binary mixture. *Cryobiology*, 40, 277-282.
- Cochran JD, A. R. (1984). Effects of centrifugation, glycerol level, cooling to $5^{\circ}C$, freezing rate and thawing rate on the post-thaw motility of equine sperm.. *Theriogenology*, 22(1), 25-38.
- Estrada, A., & Samper, J. (2007). Evaluation of Raw Semen. En J. Samper, J. Pycocock, & McKinnon, *Current*



Agradecimientos

Estancia la República, Luján.

M.V. Norma Benítez.

Financiamiento

Programa Nacional de Becas de Postgrado
en el exterior “Don Carlos Antonio López”.

Gobierno de la República del Paraguay.

Therapy in Equine Reproduction (págs. 253-257). Elsevier.

- Graham, J. K. (2011). Principles of cooled semen. En M. K. O., S. E. L., W. E. Vaala, & D. D. Varner, *Equine Reproduction*. Wiley Blackwell.
- Mendoza C, C. A. (1992). Distinction between true acrosomal reaction and degenerative acrosome loss by one-step staining method using Pisum sativum agglutinin. *J. Reprod. Fertil.*, 95, 755-763.
- Neild D, C. M. (1999). Hypoosmotic test in equine spermatozoa. *Theriogenology*, 51(4), 721-727.
- Samper, J. C. (2009). Artificial Insemination with fresh and cooled semen. En J. C. Samper, *Equine breeding management and artificial insemination Second Edition* (pág. 165). Elsevier.