

COMUNICACIÓN

Uso de Plasma Seminal en la Criopreservación de Espermatozoides Epididimarios de Equinos

USE OF SEMINAL PLASMA IN EQUINE EPIDIDYMAL SPERMATOOZA CRYOPRESERVATION

H. Mauricio Gonzales Molfino^{1,2,3}, Carolina Rodríguez¹, Anderson Oropeza¹, Yat Sen Wong¹, José Llanos¹, Hugo Gonzales Figueroa¹

RESUMEN

Se utilizó plasma seminal equino en un dilutor de lactosa-EDTA para la criopreservación de espermatozoides epididimarios de equinos. Se trabajó con 12 pares de testículos de caballos beneficiados. Se separaron los epidídimos y se utilizó la técnica de lavado retrógrado para obtener los espermatozoides, inyectando 10 ml del dilutor lactosa-EDTA por el conducto deferente. Se utilizaron las muestras con más de 30% de motilidad progresiva. Las muestras fueron diluidas 1:1 con el diluyente lactosa-EDTA-plasma seminal y se envasó en pajillas de 0.5 ml a una concentración 386.3×10^6 , y fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas por 10 días. Los valores obtenidos para las muestras frescas y descongeladas fueron: motilidad progresiva: 43.3 y 16.4% ($p < 0.05$), viabilidad: 48.3 y 40.5%, morfología normal: 67.1 y 56.5%, e integridad de la membrana plasmática (HOS): 48.3 y 45.5%.

Palabras clave: espermatozoides, criopreservación, plasma seminal, epidídimo, equinos

ABSTRACT

Equine seminal plasma was used in a lactose-EDTA extender for cryopreservation of equine epididymal sperm. Twelve pairs of testicles of slaughtered horses were used. Epididymides were separated and washed applying the retrograde technique to obtain

¹ Laboratorio de Biotecnología y Fisiología Animal, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Ricardo Palma, Lima, Perú

² Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Ricardo Palma, Lima, Perú

³ E-mail: mauricio.gonzalesm@urp.pe

Recibido: 26 de junio de 2014

Aceptado para publicación: 28 de noviembre de 2014

sperm by injecting 10 ml of lactose-EDTA extender through the vas deferens. Samples with more than 30% motility were used. Samples were diluted 1: 1 with the lactose-EDTA-extender seminal plasma and filled into 0.5 ml straws at a concentration of 386.3×10^6 , frozen in liquid nitrogen and stored for 10 days. The values for fresh and thawed samples were: motility: 43.3 and 16.4% ($p < 0.05$), viability: 48.3 and 40.5%, normal morphology: 67.1 and 56.5%, and integrity of the plasma membrane (HOS): 48.3 and 45.5%.

Key words: sperm, cryopreservation, plasma seminal, epididymis, equine

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la recuperación de espermatozoides y la preservación del epidídimo de un semental después de la castración, sea por decisión propia, lesión traumática, enfermedad grave o muerte inesperada, ha permitido la conservación genética gracias los avances en biotecnología reproductiva (James, 2004; Bruemmer, 2006). Se ha demostrado que espermatozoides recuperados de epidídimo son viables, incluso cuando se les mantiene a temperatura ambiente hasta por 24 horas, lo cual indica que incluso podrían ser utilizados en inseminación artificial (IA) (Papa *et al.*, 2008); no obstante, cuando los testículos se almacenan a 4 °C, el esperma tiende a tener una mayor viabilidad (James, 2004).

En el equino, el lavado retrógrado es una técnica rápida y eficaz para la recuperación de espermatozoides de la cola de epidídimo, y de calidad similar a la obtenida en eyaculados recogidos con vagina artificial (Papa *et al.*, 2008; Monteiro *et al.*, 2011); asimismo, estos espermatozoides congelados demuestran ser fértiles (Cary *et al.*, 2004). Otros estudios demuestran que espermatozoides de cola de epidídimo obtenidos dentro de las 24 horas de la orquiectomía tienen similar fertilidad a los del esperma eyaculado (Armas *et al.*, 2011; Monteiro *et al.*, 2011).

La criopreservación de espermatozoides es una parte esencial de los programas de mejoramiento genético y selección

de reproductores (Barbas *et al.*, 2009). El uso de nuevos dilutores es fundamental para la supervivencia de espermatozoides sometidos a procesos físicos como la criopreservación. Los espermatozoides de equinos son extremadamente sensibles a las alteraciones celulares generadas por la congelación, de allí que los dilutores disminuyen el punto de fusión de las soluciones, reduciendo la concentración intra y extra celular de solutos, evitando el daño celular (Palma, 2001).

En la composición de muchos dilutores se encuentra el EDTA (Martin *et al.*, 1979), el cual está compuesto a base de azúcares (lactosa), sales, albúmina y lípidos, garantizando la disminución del shock térmico y la formación de cristales de hielo intracelular, evitando la lisis celular poscongelación. Asimismo, el uso de carbohidratos, especialmente de lactosa, proporciona la energía necesaria para el metabolismo celular del espermatozoide. Bruemmer (2006) demostró un aumento de la motilidad espermática en el equino al utilizar como dilutor el medio Lactosa-EDTA.

La adición de plasma seminal equino es otro elemento que puede ayudar a aumentar la viabilidad de los espermatozoides epididimarios después del congelamiento (Troedson *et al.*, 2002). Por consiguiente, el presente estudio fue diseñado con la finalidad de evaluar el efecto del dilutor lactosa-EDTA-plasma seminal en la viabilidad de espermatozoides epididimarios de equino poscongelación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Biológico

Se utilizaron 12 pares de testículos de potros criollos adultos, con edades entre 10 a 16 años, beneficiados para consumo en el camal «Casa Blanca», en Pachacamac, Lima, Perú. Los testículos se colectaron inmediatamente después del beneficio, retirándose la túnica vaginal visceral y lavándose con suero fisiológico. Se colocaron en tubos cónicos de 50 ml de polietileno (Falcon®) conteniendo 10 ml de solución fisiológica salina al 0.9% con antibióticos (100 UI/ml penicilina y 100 mg/ml estreptomicina).

Los testículos fueron transportados en refrigeración (5 °C) al Laboratorio de Biotecnología y Fisiología Animal de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Ricardo Palma, Lima, en un lapso no mayor de dos horas. El estudio se realizó durante los meses de abril a julio de 2010.

Espermatozoides Epididimarios

Los testículos fueron lavados cinco veces con una solución buferada (PBS) a 37 °C, secándolos con papel absorbente. Se separaron los epidídimos y el conducto deferente mediante un corte con tijera recta.

Se hicieron varios cortes transversales en la cola epididimaria con la finalidad de facilitar la salida de los espermatozoides. El lavado retrogrado se hizo insertando una aguja de 18G en la entrada del conducto deferente (Cary *et al.*, 2004; Heise *et al.*, 2011) con 10 ml de diluyente lactosa-EDTA sin yema de huevo. Luego se introdujo 5 ml de aire en el conducto deferente para terminar de evacuar el contenido. Los espermatozoides recuperados fueron recepcionados en placas (Falcon® 35-3001) estériles.

Se colocó 1 ml de la muestra epididimaria en tubos Eppendorf® (2 ml), en baño María a 37 °C por 5 minutos para la evaluación microscópica.

Preparación del Dilutor

Se utilizó el dilutor descrito para la congelación de espermatozoides equinos (Devireddy *et al.*, 2002). La fracción A fue en base a lactosa (11 g), EDTA (0.1 g), citrato de sodio (0.089 g), bicarbonato de sodio (0.008 g) y yema de huevo (10 ml). La fracción B se preparó con 6 ml de glicerol completándose hasta 100 ml con agua bidestilada.

Preparación del Plasma Seminal Equino

El plasma seminal fue obtenido del eyaculado de dos sementales de la raza Caballo Peruano de Paso, de un haras en Mamacona, Lima. El semen colectado fue centrifugado a 900 g durante 9 min.

Volúmenes iguales de plasma seminal de los dos sementales se combinaron y el plasma seminal agrupado se centrifugó a 27 000 g (Allegra® X-30 Series) por 40 min, con la finalidad de eliminar cualquier resto de espermatozoides.

Fase Experimental

Las muestras con motilidad mayor de 30% fueron procesadas y criopreservadas utilizando una dilución de 1:1 con el dilutor, obteniendo una concentración final de 386.3×10^6 espermatozoides/ml. Se tuvo un periodo de equilibrio de 2 horas a 4 °C y luego el semen diluido fue colocado en pajillas de 0.5 ml (IVM Technologies, Francia) y selladas con alcohol de polivinil. Las pajillas fueron expuestas a vapores de nitrógeno líquido a 4 cm del nivel de nitrógeno por 10 min y luego fueron sumergidas en el nitrógeno líquido (-196 °C) por 10 días (Monteiro *et al.*, 2011).

Para la descongelación, la pajilla se sumergió en agua por 30 s a 37 °C (Cary *et al.*, 2004; Salazar *et al.*, 2011), evaluándose la motilidad progresiva, viabilidad, morfología e integridad funcional de la membrana (HOS). Para esto, se siguieron los siguientes procedimientos:

- Motilidad progresiva bajo un objetivo de 10X de un microscopio (CME Leyca®).
- Viabilidad, mediante coloración eosina-nigrosina
- Morfología, utilizando la batería de Diff-quick®, observándose con los objetivos de 40X y 100X.
- Integridad funcional de la membrana plasmática (HOS). A 10 µl de la muestra se le agregó 1 ml de solución hiposmótica (citrate de sodio 7.35 g/l; fructosa 13.51 g/l; a pH 7.2), e incubada a 37 °C por 30 min (Jeyendram *et al.*, 1984). En cada parámetro se contaron 100 espermatozoides (Vidament *et al.*, 2002; Sieme *et al.*, 2003; Heise *et al.*, 2011).
- La concentración espermática se hizo por recuento en una cámara de Neubauer (James, 2004).

Análisis Estadístico

Se evaluaron las características de los espermatozoides en fresco y posterior a la descongelación mediante la prueba de análisis de varianza y «t» Student con un grado de

significación de $p < 0.05$ (Álvarez, 2007). En el análisis estadístico se empleó el programa SPSS v. 21.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La motilidad progresiva de espermatozoides epididimarios fue de 43.3% (Cuadro 1), siendo menor del 57% reportado por James (2004). No obstante, Heise *et al.* (2011) obtienen un amplio rango (de 10 a 75%) en epidídimos de cuatro sementales poscastración. Por otro lado, la motilidad posdescongelación fue significativamente menor (16.3%, $p < 0.05$), en tanto que Heise *et al.* (2011) reportan entre 5 a 10% y James (2004) y Monteiro *et al.* (2011) obtienen 46 y 36.2%, respectivamente. En el presente estudio, los espermatozoides estuvieron expuestos al dilutor lactosa-EDTA-plasma seminal por 2 h, en tanto que James (2004) añade glicerol en fracciones de 0.125% del volumen total en 30 min, llegando al volumen apropiado en 2 h.

La motilidad progresiva posdescongelación en el equino debe ser superior al 30% para obtener resultados aceptables de concepción (Samper y Morris, 1998). El valor de 16.4% del presente estudio quedó por debajo de las motilidades obtenidas y recomendadas por Schulman *et al.* (2003) de 29 a 40% y de Hernández *et al.* (2012) de 26 a 53% para su uso en programas de IA.

Cuadro 1. Características del esperma obtenido de colas de epidídimos de equinos antes y después de la congelación, utilizando un dilutor a base de lactosa-EDTA y plasma seminal

Semen	Motilidad progresiva (%)	Viabilidad (%)	Morfología normal (%)	Concentración espermática ($\times 10^6/\text{ml}$)	HOS (%)
Fresco	43.3 \pm 11.5 ^a	48.3 \pm 9.5 ^a	67.1 \pm 9.5 ^a	368.3 \pm 245.9	48.3 \pm 8.3 ^a
Descongelado	16.4 \pm 10.8 ^b	40.5 \pm 7.5 ^a	56.5 \pm 11.4 ^b		45.5 \pm 10.8 ^a

^{a,b} Superíndices diferentes dentro de columnas indica diferencia significativa ($p < 0.05$)

El porcentaje de espermatozoides vivos fue 48.3%, valor inferior al 91% reportado por Heise *et al.* (2011) en muestras de epidídimo. La diferencia puede estar asociada a la edad de los animales, ya que las muestras corresponden a caballos con más de 10 años, mientras que en el otro estudio se utilizaron sementales de 4 a 5 años de edad, obtenidas después de la castración. No obstante, la viabilidad de los espermatozoides no se vio afectada por la congelación; posiblemente por el efecto benéfico de la yema de huevo, la cual aporta grasas saturadas, protegiendo a las células contra el shock osmótico (Crabo, 2001). Asimismo, el plasma seminal podría estar ejerciendo un efecto protector.

El porcentaje de espermatozoides normales fue de 67.1 y 56.5 en las muestras pre y poscongelación, respectivamente; valores superiores al 35.4 y 29.9% reportados por Heise *et al.* (2011). La frecuencia de anomalías encontradas en cabeza, cuello y cola fueron de 14.6, 5.8 y 12.6% en las muestras frescas, coincidiendo con los resultados de Heise *et al.* (2011).

CONCLUSIONES

- La técnica de lavado retrogrado, con el uso del diluyente lactosa-EDTA, permitió recuperar espermatozoides epididimarios viables en equinos.
- La criopreservación de espermatozoides epididimarios de equino, utilizando el dilutor lactosa-EDTA suplementada con plasma seminal equino, afectó negativamente la motilidad posdescongelación.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Programa de Bioemprendimiento y Biocluster Empresarial de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Ricardo Palma, por la conexión con el haras. Asimismo, a los integrantes del Laboratorio de Biotecnología y Fisiología Animal, por el apoyo en la realización del trabajo.

LITERATURA CITADA

1. **Álvarez R. 2007.** Estadística aplicada a las ciencias de la salud. España: Ed Díaz de Santos. 1030 p.
2. **Armas S, Fernández V, Vásquez M, Santiani A. 2011.** Determinación del tiempo máximo para recuperar y criopreservar espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo en caninos post orquiectomía. *Rev Inv Vet Perú* 22: 199-205.
3. **Barbas JP, Mascarenhas RD. 2009.** Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank* 10: 49-62. doi: 10.1007/s10561-008-9081-4
4. **Bruemmer JE. 2006.** Collection and freezing of epididymal stallion sperm. *Vet Clin North Am Equine Pract* 22: 677-682. doi: 10.1016/j.cveq.2006.08.007
5. **Cary JA, Madill S, Farnsworth K, Hayna JT, Duoos L, Fahning ML. 2004.** A comparison of electroejaculated and epididymal sperm collection techniques in stallions. *Can Vet J* 45: 35-41.
6. **Crabo BG 2001.** Physiological aspects of stallion semen cryopreservation. In: *Proc Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*. San Diego, California, USA: AAEP.
7. **Devireddy RV, Swanlund DJ, Olin T, Vincente W, Troedsson MH, Bischof JC, Roberts KP. 2002.** Cryopreservation of equine sperm: optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agents determined using differential scanning calorimetry. *Biol Reprod* 66: 222-231. doi: 10.1095/biolreprod66.1.222
8. **Heise A, Thompson PN, Gerber D. 2011.** Influence of seminal plasma on -fresh and post-thaw parameters of stallion epididymal spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 123: 192-201. doi: 10.1016/j.anireprosci.2010.11.017
9. **Hernández PJE, Fernández RF, Rodríguez SJ, Soto MY, Verona JE, García RA. 2012.** Post-thaw acrosomal viability and reaction in sperm obtained from equine epididymis tail. *Rev Salud Anim* 34: 84-88.

10. **James AN. 2004.** Preservation of sperm harvested from the rat, caprine, equine and bovine epididymis. PhD Thesis. USA: Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College, Baton Rouge. 229 p.
11. **Jeyendran RS, Van Der Ven H, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJ. 1984.** Development of an assay to assess the functional integrity of human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil* 70: 219-228. doi: 10.1530/jrf.0.0700219
12. **Martin JC, Klug E, Günzel AR. 1979.** Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. *J Reprod Fertil* 27: 47-51.
13. **Monteiro GA, Papa FO, Zahn FS, Dell'Aqua Jr JA, Melo CM, Maziero RR, Avanzi BR, et al. 2011.** Cryopreservation and fertility of ejaculated and epididymal stallion sperm. *Anim Reprod Sci* 127: 197-201. doi: 10.1016/j.anireprosci.2011.08.002
14. **Palma GA. 2001.** Biotecnología de la reproducción. Argentina: Ed Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. 704 p.
15. **Papa FO, Melo CM, Fioratti EG, Dell'Aqua Jr JA, Zahn FS, Alvarenga MA. 2008.** Freezing of stallion epididymal sperm. *Anim Reprod Sci* 107: 293-301. doi: 10.1016/j.anireprosci.2008.05.003
16. **Salazar Jr JL, Teague SR, Love CC, Brinsko SP, Blanchard TL, Varner DD. 2011.** Effect of cryopreservation protocol on post-thaw characteristics of stallion sperm. *Theriogenology* 76: 409-418. doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.02.016
17. **Samper JC, Morris CA. 1998.** Current methods for stallion semen cryopreservation: a survey. *Theriogenology* 49: 895-903. doi: 10.1016/S0093-691X(98)00039-9
18. **Schulman ML, Gerber D, Nurton J, Guthrie AJ, Joubert K, Volkmann DH. 2003.** Effects of halothane anaesthesia on the cryopreservation of epididymal spermatozoa in pony stallions. *Equine Vet J* 35: 93-95. doi: 10.2746/04251640-3775467333
19. **Sieme H, Martinsson G, Rauterberg H, Walter K, Aurich C, Petzoldt R., Klug E. 2003.** Application of techniques for sperm selection in fresh and frozen-thawed stallion semen. *Reprod Domest Anim* 38: 134-140. doi: 10.1046/j.1439-0531.2003.00416.x
20. **Troedsson MHT, Alghamdi AS, Mattisen J. 2002.** Equine seminal plasma protects the fertility of spermatozoa in an inflamed environment. *Theriogenology* 58: 453-456. doi: 10.1016/S0093-691X(02)00862-2
21. **Vidament M, Daire C, Yvon JM, Doligez P, Bruneau B, Magistrini M, Ecot P. 2002.** Motility and fertility of stallion semen frozen with glycerol and/or dimethyl formamide. *Theriogenology* 58: 249-251. doi: 10.1016/S0093-691X(02)00854-3