

RECONGELACIÓN DE ESPERMATOZOIDES BOVINOS COMO ALTERNATIVA PARA MEJORAR LA CALIDAD ESPERMÁTICA DEL SEMEN

**REFROZEN OF BOVINE SPERM AS AN ALTERNATIVE TO IMPROVE
THE SPERM QUALITY OF SEMEN**

Recibido: 13/08/2021- Aceptado: 13/06/2022

CARLOS ANDRÉS MANCHENO HERRERA

Docente de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo
Riobamba - Ecuador

Magíster en Reproducción Animal
Mención en Reproducción Bobina
Escuela Superior Politécnica de Chimborazo

andres.mancheno@esPOCH.edu.ec
<https://orcid.org/0000-0002-2682-0336>

PABLO RIGOBERTO ANDINO NÁJERA

Docente de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo
Riobamba - Ecuador

Magíster en Reproducción Animal
Escuela Superior Politécnica de Chimborazo

pablo.andino@esPOCH.edu.ec
<https://orcid.org/0000-0002-0515-5330>

Cómo citar este artículo:

Mancheno, A. & Andino, P. & Villafuerte, (Julio - diciembre de 2022).
Recongelación de espermatozoides bovinos como alternativa para
mejorar la calidad espermática del semen. *Sathiri* (17),2 103-117.
<https://doi.org/10.32645/13906925.1133>



Resumen

El objetivo fue evaluar el efecto de la recongelación de espermatozoides bovinos sobre la calidad espermática de semen descongelado. Para esto se realizó la descongelación del semen en agua a 56 °C durante 12 segundos para simular una agresión seminal máxima, el contenido de las pajillas se vertió en tubos de ensayo para mantenerlos atemperados a 37 °C e incubarlos con 5 ml del medio *Tyrode* durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo se realizó el análisis microscópico del semen, se realizaron dos centrifugaciones 300 rpm/5 minutos - 800 rpm/10 minutos y se determinó la concentración espermática con la ayuda de un contador digital de células para diluir el semen; la estabilización y acondicionamiento de los espermatozoides se la realizó a temperatura ambiente (14 – 20 °C) durante 45 minutos y bajo luz ultravioleta, posteriormente se procedió al envasado y sellado de las pajillas usando pajillas de 0.5 ml y alcohol polivinílico para sellarlas. Se realizaron las curvas de temperatura y finalmente la recongelación en vapores de nitrógeno. Para la comprobación de hipótesis se utilizaron las técnicas de análisis de ADEVA (Análisis de Varianza) y separación de medidas por el método del rango múltiple de Waller Duncan a un nivel de significancia $p < 0,01$. Se determinó así, que en los parámetros evaluados el semen recongelado mostró mejores resultados como en el daño de ADN en donde se determinó que el semen recongelado presentó un menor daño con un 1,07 % a diferencia del semen congelado el cual presentó un 8,74% de daño. Al analizar las diferentes variables de semen recongelado se determinó que el efecto de esta biotecnología es positivo en variables como el daño en el ADN y daño en la membrana espermática, teniendo valores inferiores a los reportados en semen congelado; lo que indica que al recongelar espermatozoides la calidad espermática mejora especialmente en las variables mencionadas. Se recomienda utilizar espermatozoides recongelados en biotecnologías reproductivas como la Fertilización In Vitro.

Palabras clave: recongelación, espermatozoides, bovinos, calidad seminal, semen.

Abstract

The objective was to evaluate the effect of re-freezing bovine sperm on the sperm quality of thawed semen. For this, the semen was thawed in water at 56 °C for 12 seconds to simulate a maximum seminal aggression, the contents of the straws were poured into test tubes to keep them tempered at 37 °C and incubated with 5 ml of Tyrode medium for 15 minutes. After this time, the microscopic analysis of the semen was carried out, two centrifugations were carried out 300 rpm / 5 minutes - 800 rpm / 10 minutes and the sperm concentration was determined with the help of a digital cell counter to dilute the semen; The stabilization and conditioning of the sperm was carried out at room temperature (14-20 °C) for 45 minutes and under ultraviolet light, then the straws were packed and sealed using 0.5 ml straws and polyvinyl alcohol to seal them. The temperature curves and finally the refreezing in nitrogen vapors were carried out. For hypothesis testing, the analysis techniques of ADEVA (Analysis of Variance) and separation of measurements by the Waller Duncan multiple range method were used at a significance level of $p < 0.01$. It was thus determined that in the parameters evaluated the re-frozen semen showed better results as in the DNA damage where it was determined that the re-frozen semen presented less damage with 1.07% in contrast to the frozen semen which presented 8, 74% damage. When analyzing the different variables of re-frozen semen, it was determined that the effect of this biotechnology is positive in variables such as DNA damage and sperm membrane damage, having values lower than those reported in frozen semen; which indicates that when sperm is re-frozen, sperm quality improves especially in the mentioned variables. It is recommended to use re-frozen sperm in reproductive biotechnologies such as In Vitro Fertilization.

Key words: refrozen, sperm, bovine, seminal quality, semen.

Cómo citar este artículo:

Manchano, A., Duchi, N., Andino, P. & Villafuerte, A. (Julio - diciembre de 2022). Recongelación de espermatozoides bovinos como alternativa para mejorar la calidad espermática del semen. *Sathiri* (17),2 103-117. <https://doi.org/10.32645/13906925.1133>

Introducción

Almela (2014) se convierte en la primera investigadora en reportar datos acerca de la recongelación de espermatozoides bovinos con la finalidad de conservar gametos masculinos de la raza Murciano Levantina, en peligro de extinción. En sus resultados reporta datos interesantes y menciona que en cuanto a la calidad seminal se presentan mejores valores en semen descongelado de una congelación normal que en el recongelado haciendo hincapié en que existieron diferencias muy marcadas entre los animales sujetos al estudio. Sin embargo, al realizar un estudio de fertilidad con el semen recongelado inseminando a 7 novillas frisonas reporta un 57,1% de fertilidad, lo que se traduce en que se puede usar esta técnica para la conservación *In vitro*.

Por otro lado, Carwel et al. (2010, págs. 140-141), en su trabajo realizado acerca de la recongelación de semen de cabras, mencionan que la recongelación brinda la oportunidad de volver a congelar semen que se ha descongelado por error. Otra especie en la que se ha trabajado en esta biotecnología es la equina con la finalidad de aprovechar el material genético en técnicas de reproducción animal asistida como la ICSI en donde el semen ha sido sometido hasta 8 recongelaciones y se ha demostrado que el ADN comienza a desnaturalizarse a partir de la quinta recongelación (Chelsey, Pinto, Cramer, Love, & Paccamonti, 2017, págs. 19-24).

Otro experimento realizado en semen bovino demostró que el semen descongelado presentó mejores características al ser enfriado en hielo seco a -79°C antes de ser recongelado en nitrógeno líquido a -196°C mejorando las tasas de motilidad en un 13 a 17% (Abdussamand, Gauly, & Holtz, 2015, págs. 278-284).

A estos trabajos se suman, además, investigaciones realizadas en semen humano con la finalidad de mediar las criolesiones de los espermatozoides sometidos a varios ciclos de congelación y recongelación, las muestras provinieron de hombres con cáncer testicular y hombres sanos en donde se demostró que los espermatozoides de hombres sanos resisten dos ciclos más que los espermatozoides de hombres con la patología mencionada (Verza, Feijo, & Esteves, 2009, págs. 581-590).

Ante esto se planteó la hipótesis de que la selección de los mejores espermatozoides y su recongelación ayudarán a mejorar sus propiedades en variables como la membrana plasmática y cromatina (paquete de ADN), incrementando así su capacidad fecundante al ser utilizados en biotecnologías como la fertilización *In vitro*.

Además, se vio la necesidad de investigar la influencia de esta biotecnología en la calidad seminal para solucionar problemas de desperdicio de material genético que es valioso e irre recuperable al brindar la oportunidad de utilizar una parte de éste y volver a crioconservarlo para futuros estudios y pruebas a nivel de laboratorio.

Materiales y métodos

El trabajo de campo de la presente investigación se realizó en la parroquia Nuevo Mundo perteneciente al cantón Riobamba, provincia de Chimborazo.

El trabajo de laboratorio se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo ubicado en la Panamericana sur Km 1 ½.

Los materiales utilizados para la investigación fueron los siguientes:

Material de campo:

- ▶ Registros de campo
- ▶ Overol
- ▶ Botas de caucho
- ▶ Sogas
- ▶ Vagina artificial marca Minitube
- ▶ Camisa de Vagina Artificial
- ▶ Cono de vagina artificial
- ▶ Tubos Falcon de 15 cc
- ▶ Papel aluminio
- ▶ Guantes de nitrilo
- ▶ Guantes de inseminación artificial
- ▶ Cinta métrica
- ▶ Tijeras
- ▶ Mascarilla
- ▶ Termo de 1 litro
- ▶ Termómetro de mercurio

Materiales de laboratorio:

- ▶ Microscopio óptico Marca Boeco con lentes objetivos de 4X, 10X, 40X y 100X
- ▶ Placas porta y cubre objetos
- ▶ Platina calefactora para microscopio
- ▶ Contador digital de células Marca Luna con opción de fluorescencia
- ▶ pH metro digital Marca PCE
- ▶ Micropipetas de 0.5 a 10 μ L, de 10 a 100 μ L y de 100 a 1000 μ L Marca Oxford
- ▶ Puntas de Micropipetas
- ▶ Tubos de Eppendorf
- ▶ Baño maría de 7 litros marca Mermmert
- ▶ Termo descongelador de semen automático Marca Cito Test
- ▶ Centrífuga Marca Boeco
- ▶ Diluyente de semen con Lecitina de Soya
- ▶ Agua bidestilada
- ▶ Colorante eosina - nigrosina
- ▶ Guantes de nitrilo
- ▶ Pinzas
- ▶ Tanque de nitrógeno líquido de 8 litros Marca IMV
- ▶ Cooler de espuma de 12 litros
- ▶ Rack para pajillas de 0.5 cc
- ▶ Balones volumétricos
- ▶ Vasos de precipitación
- ▶ Agitador magnético Marca Cryo
- ▶ Luces UV

Se utilizó el semen de un reproductor de raza Jersey de 3 años, al cual se realizaron 6 extracciones utilizando una vagina artificial y de cada extracción se procesaron pajillas de 0.5 cc con una concentración espermática de 50 millones de espermatozoides por dosis. Del total de pajillas congeladas se seleccionaron al azar 10 pajillas por extracción para realizar el proceso de recongelación.

Cómo citar este artículo:

Manchero, A., Duchi, N., Andino, P. & Villafuerte, A. (Julio - diciembre de 2022). Recongelación de espermatozoides bovinos como alternativa para mejorar la calidad espermática del semen. *Sathiri* (17),2 103-117. <https://doi.org/10.32645/13906925.1133>

Para el procesamiento y congelación de semen se utilizó el protocolo usado en el Laboratorio de Reproducción Animal de la ESPOCH.

Análisis macroscópico del semen: Este análisis consiste en evaluar características macroscópicas del semen como: Color, olor y pH. La medición de color y olor se la realiza con la subjetividad y experiencia del investigador, mientras que el pH se evaluó con un pH metro digital.

Análisis microscópico: Fue realizado en semen fresco, semen descongelado producto de la congelación y semen descongelado producto de la recongelación como se describe a continuación.

Evaluación de motilidad individual (%): Con una micropipeta se tomó una microgota (5 µL) de semen diluido en una solución isotónica de NaCl- al 0,9% misma que fue colocada sobre un portaobjetos atemperado a 37°C y cubriéndolo con un cubreobjetos; la observación se la realizó en un microscopio óptico con un aumento de 40X, para la estimación se evaluó si más de la mitad de los espermatozoides que hay en el campo poseen movimiento o no, se observaron los espermatozoides que se mueven en forma rectilínea, a los cuales se los considera normales, caso contrario, los que se mueven en círculo se consideraron anormales. El porcentaje se obtuvo de los espermatozoides con movimiento rectilíneo progresivo (normales) sobre el total de los espermatozoides observados en la placa, valores a ser comparados con la siguiente escala de 0 a 100% como se observa en la Tabla 1.

Tabla 1
Valoración de la Motilidad Individual Progresiva según la Sociedad Americana de Theriogenología.

Clasificación	Motilidad progresiva individual	Valor %
Pobre	Muy lento y errático	<50
Aceptable	Lineal lento y generalizado	60-70
Bueno	Lineal moderadamente rápido	70-80
Muy bueno	Lineal rápido	80-100

Realizado por: Mancheno Herrera, Carlos Andrés, 2021.

Evaluación de Viabilidad espermática (%): Para determinar la viabilidad espermática se usó la técnica con tinción de Eosina-Nigrosina, misma que consiste en agregar 10 µL del colorante sobre 10 µL de la muestra de semen en un portaobjetos atemperado a 37°C, después de homogenizarla se la dejó reposar un minuto y se realizó un frotis para finalmente se dejarla secar. La muestra se observó en un microscopio óptico a un aumento de 100X, contando un mínimo de 100 espermatozoides en diferentes campos del portaobjetos.

Los espermatozoides con cabeza roja o rosa oscuro son considerados muertos (membrana dañada), mientras espermatozoides con cabeza blanca o rosa claro son considerados vivos (membrana intacta).

El resultado se determinó de forma subjetiva y se calculó mediante la siguiente relación:

$$\text{Viabilidad espermática (\%)} = \frac{\text{Número de espermatozoides muertos}}{\text{Número de espermatozoides vivos}} * 100$$

Cómo citar este artículo:

Evaluación de Morfoanomalías espermáticas (%): Se utilizó la misma placa de análisis de viabilidad espermática en donde se observó la estructura de los espermatozoides con un aumento de 100X. Las células sin anomalías mismas que serán clasificadas como normales presentaron la cabeza y flagelo regulares, y las células anormales presentan alguna de las siguientes categorías de morfoanomalías: cabezas muy grandes, cabezas muy pequeñas, doble cabeza, flagelos doblados, flagelos enrollados, flagelos múltiples o sin flagelo, presencia de gota citoplasmática proximal o distal. Se contaron un total de 100 espermatozoides por campo y se utilizó la siguiente fórmula para transformarlo a porcentaje:

$$\text{Morfoanomalias (\%)} = \frac{\text{Número de espermatozoides anormales}}{\text{Número de espermatozoides normales}} * 100$$

Análisis del daño del paquete de ADN del espermatozoide (Cromatina) (%): Se evaluó mediante la integridad de la cromatina, para esto se preparó una muestra de 2 µL del fluorocromo Naranja de Acridina y 18 µL de semen descongelado; a continuación, se procedió a homogenizar la muestra para tomar con una micropipeta la cantidad de 10 µL y colocarlos en la placa del contador digital de células Luna Fl, el cual se encontraba calibrado y en modo de fluorescencia con naranja de acridina. Las cabezas de los espermatozoides con ADN en estado nativo (intacto) emiten fluorescencia verde, mientras que aquellos, cuyo ADN se encuentra desnaturalizado se observan de color rojizo. Los resultados de este análisis fueron emitidos en porcentaje por el equipo mencionado.

Evaluación de la integridad de la membrana celular (%): Para la valoración de esta variable se utilizó el test Hipoosmótico (HOST), el cual consiste en preparar una solución de fructosa al 2.7% (solución A) y una solución de Citrato de sodio 1.47% (solución B). El medio hipoosmótico se preparó en el momento de utilizarlo mezclando 0.5 ml de solución A con 0.5 ml de solución B, al que se agregó 0.1 ml de semen descongelado. Esta mezcla se incubó durante 20 minutos a 37 °C. Finalmente se colocó 10 µL de la mezcla incubada entre porta y cubreobjetos, y se observó en microscopio con un aumento de 100X, se contaron como mínimo 100 espermatozoides y se determinó el número de espermatozoides con membrana funcional (colas y/o segmento intercalar hinchados y enrollados), y el número de espermatozoides con membrana deteriorada (cola y/o segmento intercalar recto, delgado y sin enrollamiento). Los resultados se expresaron en porcentaje de reacción total de espermatozoides con membrana funcional utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Int. Membrana} = \frac{A}{A + B} * 100$$

En donde:

Int. Memb.= Integridad de membrana (por ciento).

A = Número de espermatozoides con endósmosis positiva.

B = Número de espermatozoides con endósmosis negativa.

A + B = N° total de espermatozoides contabilizados (100 espermatozoides).

Dilución, envasado y sellado de pajillas: Para la dilución del semen fresco y descongelado se utilizó el diluyente comercial *AndroMed*®, la concentración espermática se determinó con la ayuda del contador digital de células Luna Fl y se diluyó el semen bajo las especificaciones del fabricante. Las dosis a congelarse y recongelarse fueron envasadas en pajillas de 0.5 cc con una concentración de 60 millones de espermatozoides para la congelación y con 30 millones de espermatozoides para la recongelación. Finalmente se sellaron con alcohol polivinilo.

Cómo citar este artículo:

Manchero, A., Duchí, N., Andino, P. & Villafuerte, A. (Julio - diciembre de 2022). Recongelación de espermatozoides bovinos como alternativa para mejorar la calidad espermática del semen. *Sathiri* (17),2 103-117. <https://doi.org/10.32645/13906925.1133>

Estabilización y acondicionamiento de los espermatozoides: La estabilización y acondicionamiento de los espermatozoides consiste en darle a la célula el tiempo y condiciones necesarias para que ésta saque toda el agua intracelular y la reemplace por el diluyente, con la finalidad de que al momento de la congelación, recongelación y descongelación no se formen cristales de hielo los cuales perforarían la membrana celular dañando así al espermatozoide. Para esto se mantuvieron las pajillas a temperatura ambiente (14 – 20 °C) y bajo luz ultravioleta durante un tiempo de 45 minutos.

Curvas de temperatura: Tanto para la congelación como para la recongelación se utilizaron las mismas curvas, las cuales tuvieron como finalidad el descenso controlado y paulatino de la temperatura para que la célula espermática no sufra daño debido a cambios térmicos bruscos, dichas curvas iniciaron reduciendo la temperatura de 20 °C a 5 °C en 30 minutos (velocidad: -0.5 °C/min) mediante la adición de hielo en un cooler con agua. Una vez alcanzada esta temperatura se introdujeron las pajillas en una cámara de refrigeración por un lapso de 4 horas a una temperatura de 4 °C para el periodo de equilibramiento.

Congelación y Recongelación: La congelación y recongelación se realizó mediante vapores de nitrógeno colocando las pajillas en un rack con capacidad de 50 pajillas dentro de un cooler en el cual se colocaron 2 cm de nitrógeno líquido. El descenso de temperatura se realizó en relación con los siguientes valores y tiempos: primer descenso de 4 °C a -6 °C durante 10 minutos (velocidad -1 °C/min), esto se logró colocando el rack a 6 cm del nitrógeno líquido. Segundo descenso de -6 °C a -196 °C en 4 minutos (velocidad -47.50 °C/min), esto se logró colocando el rack a 2 cm del nitrógeno líquido. Realizado este descenso se sumergieron las pajillas en el nitrógeno líquido del cooler para terminar con su congelación y recongelación.

La metodología utilizada para la recongelación fue la siguiente:

Descongelación e incubación de semen: La descongelación se realizó en agua a 56 °C durante 12 segundos, proceso que simula una agresión seminal máxima. El contenido de cada una de las pajillas se vertió y mantuvo en tubos de ensayo atemperados en baño termostático a 37 °C y se incubaron durante 15 minutos, conteniendo cada uno de ellos 5 ml de medio *Tyrode* (Tabla 2).

Tabla 2: Composición del medio Tyrode.

Compuesto	Concentración (g/l)
NaCl	8.00
KCl	0.20
CaCl ₂	0.20
MgCl ₂	0.10
NaH ₂ PO ₄	0.05
NaHCO ₃	1.00
Glucosa	1.00

Fuente: Rigby et al (2001, págs. 171-180)

Realizado por: Mancheno Herrera, Carlos Andrés, 2021

Centrifugación: Con la finalidad de seleccionar a los espermatozoides viables se utilizó la técnica de selección por gradiente de concentración, la cual consistió en incubar las muestras descongeladas en medio *Tyrode* durante 15 minutos para realizar la primera centrifugación (300 rpm, durante 5 minutos) eliminándose el pellet y conservando el sobrenadante; a continuación, se realizó una segunda centrifugación (800 rpm, durante 10 minutos), rescatando el pellet y eliminando el sobrante en este caso. Con esto se logró que los espermatozoides viables precipiten y sean los seleccionados para la re congelación.

Una vez realizada la selección de espermatozoides viables, éstos fueron colocados en un tubo graduado para determinar su volumen y con la ayuda del contador digital de células Luna FI se contabilizó la concentración espermática. La dilución, envasado y sellado de pajillas, estabilización y acondicionamiento de espermatozoides y curvas de temperatura se manejaron igual tanto en la congelación como en la re congelación.

Comprobación de hipótesis: La comprobación de hipótesis se realizó en el software estadístico InfoStat versión 2020 en donde se utilizaron las técnicas de análisis de varianza (ADEVA) y separación de medidas por el método del rango múltiple de Waller Duncan a un nivel de significancia $p < 0,01$.

Resultados y discusión

Análisis comparativo de las características microscópicas de semen bovino en los procesos post congelación y post re congelación.

Al realizar el análisis estadístico mediante el Software Infostat versión 2020 y separación de medias por el método de Waller Duncan de las características microscópicas de semen se registraron diferencias altamente significativas ($P \geq 0,01$), para todas las variables en estudio como se observa en la Tabla 3.

Tabla 3

Resultados comparativos de las características microscópicas de semen bovino en los procesos pre congelación, post congelación y post re congelación.

Variables	E1	E2	E3	EE	Prob.
Ph	6,83 b	6,78 c	6,85 a	1,1171e-16	0,001
Motilida individual, %	80,0000 a	53,5000 b	46,1660 c	0,486374494	0,001
Viabilidad espermática, %	97,033 b	89,499 a	81,016 c	0,157632249	0,001
Morfología normal, %	95,085 b	95,031 b	97,00 a	0,134042973	0,001
Morfoanomalías, %	4,915 b	4,969 b	1,899 a	0,133436488	0,001
Normalidad en ADN, %	0 c	91,26 b	98,43 a	0,522102019	0,001
Daño en el ADN, %	0 c	8,74 b	1,072 a	0,513588537	0,001
Integridad de la membrana, %	0 c	90,868 b	98,15 a	0,238478278	0,001
Daño en la membrana, %	0 c	9,132 b	1,602 a	0,238472919	0,001

Cómo citar este artículo:

- E1:** Ensayo 1 – análisis microscópico de semen pre congelación.
E2: Ensayo 2 – análisis microscópico de semen post congelación.
E3: Ensayo 3 – análisis microscópico de semen post recongelación.
EE: Error experimental.
Prob: Probabilidad.

Letras diferentes muestran diferencias significativas para cada variable.

Realizado por: Mancheno Herrera, Carlos Andrés, 2021.

pH: El pH del eyaculado en los diferentes ensayos mostró diferencias estadísticas significativas ($P \geq 0,01$), con valores de 6,78; y 6,85 puntos de pH en el semen congelado y recongelado respectivamente (Tabla 3), valores que se encuentran dentro de los parámetros permitidos según (Huamantuco, 2005), quien menciona que el pH del epidídimo y conducto deferente fluctúa entre 6,72 a 6,90.

Motilidad individual (%): La motilidad individual presentó diferencias estadísticas significativas ($P \geq 0,01$), con valores de 53,50 % y 41,16 % para el semen congelado y recongelado respectivamente (Tabla 3). En relación con estos valores, Peres et al. (2014) indican que la reducción de la motilidad espermática puede estar asociada a la lesión mitocondrial, pues es necesaria energía tanto para la motilidad como para la fertilización. Por su parte, Ramón (2013), en su investigación reporta un valor de 35,98% en la variable de motilidad individual progresiva con un valor máximo del 55%; mientras que, Ribeiro- Peres et al. (2014, págs. 20-25), en relación con esta variable reporta un resultado de 29,5 % +/- 14,9 % en su estudio, realizando una congelación convencional. Estos resultados difieren de la presente investigación presumiblemente debido a la subjetividad del evaluador al momento del análisis y a los métodos de congelación y descongelación del material seminal.

La diferencia encontrada en los diferentes ensayos puede estar relacionada, además, al estrés que sufre la membrana y el espermatozoide en general por el cambio de temperatura, las lesiones producidas por el congelamiento de las membranas solo se invierten parcialmente con el descongelamiento. La motilidad post congelación se reduce a valores entre 40 a 50%.

Viabilidad espermática (%): Con relación a la viabilidad espermática en los ensayos se presentaron diferencias significativas ($P < 0,01$), de esta manera el mayor porcentaje de viabilidad fue identificado en el semen congelado con 89,49 % y el menor valor se registró en el semen recongelado con 81,01 % (Tabla 3) (Figura 1).

Al respecto, Cabrera y Pantoja (2012) encontraron una viabilidad del 86 % en semen descongelado, resultados que difieren a los reportados por Ribeiro Peres et.al. (2014, págs. 20-25), quienes mencionan un 53,9 % de viabilidad espermática en semen descongelado. Dichos resultados varían debido al criterio del evaluador, así como al método utilizado, se podría estandarizar el método al realizar un análisis mediante un sistema automatizado como es el caso del sistema CASA pero tanto en la presente investigación como en las mencionadas anteriormente el análisis se lo realizó de la forma convencional.

Almela (2014) menciona un 60,21% de viabilidad espermática en el descongelamiento de semen recongelado, lo que puede ser ocasionado por parámetros como la raza, edad del reproductor y principalmente el método de descongelación usado para su investigación; mientras que Mejía (2017) menciona un 59,1 % +/- 2,40 de vitalidad espermática en semen descongelado y Carpio (2015), reporta un 82,50 % de viabilidad espermática al realizar el análisis de semen descongelado, resultado muy similar al presente estudio.

Cómo citar este artículo:

Las diferencias encontradas entre los ensayos se pueden deber a lo indicado por Neira et al., (2007, págs. 93-105), quienes señalan que la centrifugación ejercida durante los procesos puede generar diversas alteraciones que pueden disminuir la movilidad de los espermatozoides e incluso su calidad en general, debido a las fuerzas mecánicas asociadas.

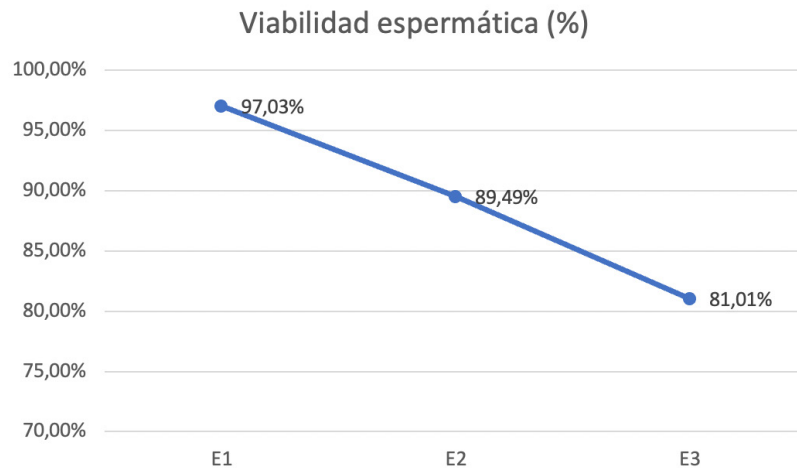


Figura 1: Diferencia en la viabilidad espermática de semen bovino pre congelado (E1), post congelado (E2) y post recongelado (E3).

Realizado por: Mancheno Herrera, Carlos Andrés, 2021.

Morfoanomalías (%): Las morfoanomalías observadas presentaron diferencias estadísticas significativas ($P \geq 0,01$) entre los ensayos, en donde el mayor valor se reportó en el semen congelado con 4,96 % de morfoanomalías mientras que el menor valor lo registró en el semen recongelado con 1,89 % de morfoanomalías (Tabla 3) (Figura 2). Los valores en la recongelación probablemente están atribuidos a lo señalado por Palma (2009), quien detalla que un menor daño en la célula espermática es consecuencia de haber tenido un menor sufrimiento durante el proceso de recongelación, aumentando consecuentemente la presencia de espermatozoides normales. Además, se puede mencionar que al momento de realizar la recongelación se realizó una selección de los mejores espermatozoides para usarlos en este proceso. En función los valores registrados, Vera (2003) menciona que es de gran importancia garantizar el mayor porcentaje de morfología normal dentro de los espermatozoides, ya que esto optimizará una buena fusión con el núcleo del ovocito para finalmente completar la dotación genética del nuevo ser.

González & Muñoz (2002), registran anomalías primarias en la raza Jersey de 15,2 % +/- 1,8; valores que son superiores a los obtenidos en la presente investigación, esto posiblemente se deba a la manera en la que fue descongelado el semen y sobre todo a la preparación de la muestra.

Mejía (2017), en su estudio realizado al evaluar el semen de ganado criollo utilizando vagina artificial y la técnica de microscopía óptica, reporta un promedio de anomalías totales de 15,0 +/- 0,96 lo que difiere del presente estudio probablemente por la subjetividad en el análisis, raza de los animales y condiciones de congelación y descongelación; mientras que Ramón (2013), en el análisis de semen post congelación reporta un 13,15 % de espermatozoides con morfoanomalías. Muchas veces dicho resultado varía por la forma en la preparación de la placa lo que puede confundir al evaluador en anomalías que se presenten principalmente a nivel de la parte distal de la célula espermática.

Cómo citar este artículo:

Mancheno, A., Duchi, N., Andino, P. & Villafuerte, A. (Julio - diciembre de 2022). Recongelación de espermatozoides bovinos como alternativa para mejorar la calidad espermática del semen. *Sathiri* (17),2 103-117. <https://doi.org/10.32645/13906925.1133>

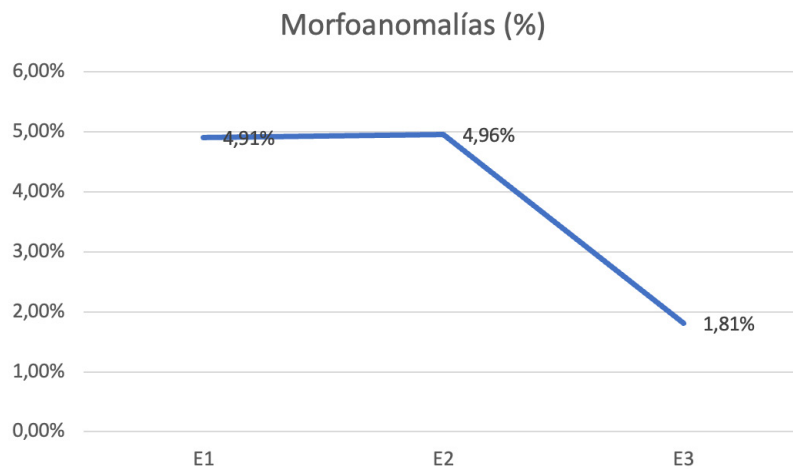


Figura 2: Diferencia en las morfoanomalías de semen bovino pre congelado, post congelado y post recongelado.
Realizado por: Mancheno Herrera, Carlos Andrés, 2021.

Daño del ADN (%): Al analizar el daño en el ADN mediante el proceso de fluorescencia con Naranja de Acridina los ensayos presentaron diferencias significativas ($P < 0,01$), de esta manera el mayor daño del ADN se observó en el semen congelado con un valor 8,74 %, y el menor daño lo reportó el semen recongelado con un valor de 1,07 % (Tabla 3) (Figura 3). Los valores reportados en la presente investigación son menores a los registrados por Almela (2014), en donde en el semen recongelado reportó el valor de 32,7 % en daño del ADN de semen recongelado.

Al respecto, Nava-Trujillo et al. (2016) reportan un 0,9 % +/- 1.29 de espermatozoides con cromatina dañada al evaluar semen post congelación, resultados muy similares a los presentados en el presente estudio. Por otra parte, Ribeiro Peres et al., (2014), encontraron un 93,1 +/- 6,1 % de ADN íntegro en semen descongelado, lo que representa a un 6,9 % de daño en la cromatina. Dichos resultados concuerdan con la presente investigación debido a las técnicas usadas y a que el análisis se realizó utilizando un equipo automatizado en todos los casos.

Peña y Linde (2000) al respecto, mencionan que el acrosoma tiene varias regiones que son expuestas durante el proceso de refrigeración, congelación y descongelamiento; esto determinará en gran medida la capacidad fecundante que tiene el espermatozoide debido al daño que puede sufrir específicamente la cromatina.

Los resultados del presente estudio son los primeros en sugerir un efecto favorable al usar la recongelación de espermatozoides reducir el daño del ADN espermático contenido en la cromatina.

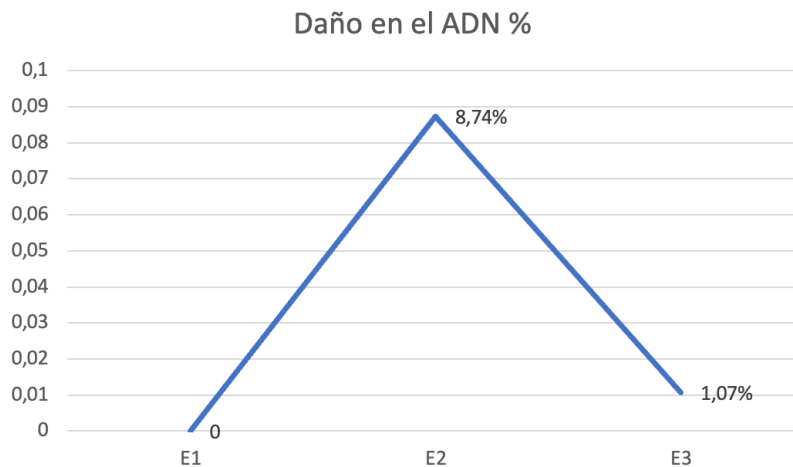


Figura 3: Diferencias en el daño del ADN de semen de bovino Jersey pre congelado, post congelado y post recongelado.
Realizado por: Mancheno Herrera, Carlos Andrés, 2021.

Daño en la membrana (%): En relación a la variable daño de la membrana se observaron diferencias altamente significativas ($P < 0,01$) entre los ensayos; el valor más alto se observó en el semen congelado con 9,13 % y el menor valor lo reportó el semen recongelado con 1,60 % de daño en la membrana (Tabla 3) (Figura 4).

Bedoya, Vásquez & Rivera (2003), en su estudio reportan un 53,4 % de espermatozoides que reaccionaron de forma positiva al test de HOST, lo que representa un 46,6 % de espermatozoides con daño en la membrana; mientras que Ribeiro Peres et al., (2014), mencionan un 63,1 % de espermatozoides con la membrana íntegra, es decir 36,9 % de espermatozoides con daño en la membrana. Estos resultados difieren del presente estudio y se puede asumir esta variación al método de análisis, así como a la subjetividad del evaluador al hacerla de una manera tradicional y no automatizada.

Mejía (2017), en relación con esta variable, reporta un 15,6 % de espermatozoides que reaccionaron con daño a la membrana espermática al ser analizados mediante el test de Host. Dichos resultados varían de los obtenidos al presente estudio, se puede asumir esta variación al método de incubación utilizado, así como a la preparación del medio de incubación usado en el test.

La membrana plasmática del espermatozoide es el principal sitio de lesión que ocurren durante la congelación y descongelación de semen (Hammerstedt, Graham, & Nolan, 1990, págs. 73-88). La membrana intacta y un funcionamiento activo es esencial para que el espermatozoide pueda mantener el metabolismo, someterse a la capacitación y reacción acrosómica y, además, para unir y penetrar en el ovocito a través de la zona pelúcida (Jeyendran, Van de Ven, Perez Pelaez, Crabo, & Zaneveld, 1984, págs. 219-228).

Al comparar los resultados obtenidos en este trabajo, con los de otros autores como (Muhammad, Rakha, & Akhter, 2010, págs. 197-203), los cual usaron L-cisteína y obtuvieron un 56,06 % de membranas intactas, los resultados en esta investigación son superiores en cuanto a membranas intactas, lo que posiblemente se deba a la diferencia en la composición de los diluyentes y a los diferentes protocolos de criopreservación en cuanto se refiere al tiempo en la etapa de enfriamiento, mismo que afecta directamente las características de funcionalidad celular del espermatozoide al permanecer mayor tiempo en contacto con los solutos del diluyente.

Ante estos resultados, se puede inferir que la recongelación de espermatozoides permite mantener la integridad de la membrana, por su parte González & Muñoz (2002), indican que la membrana plasmática del espermatozoide juega un papel crítico en el proceso de capacitación, reacción acrosómica y penetración de ovocitos, al regular las interacciones del medio interno con el externo.

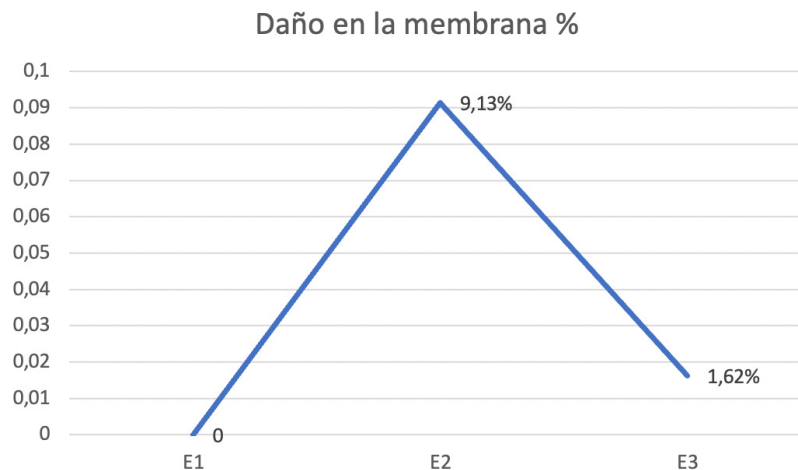


Figura 4: Diferencias en el daño de la membrana de semen de bovino Jersey pre congelado, post congelado y post recongelado. Realizado por: Mancheno Herrera, Carlos Andrés, 2021.

Conclusiones

- ▶ Al analizar las diferentes variables de semen recongelado se determinó que el efecto de esta biotecnología es positivo en variables como el daño en el ADN y daño en la membrana espermática, teniendo valores inferiores a los reportados en semen congelado; lo que indica que al recongelar espermatozoides la calidad espermática mejora especialmente en las variables mencionadas.
- ▶ El porcentaje de espermatozoides viables de semen congelado fue de 89.48 % mientras que esta variable para semen recongelado reportó un valor de 81.01 % aduciendo esta variación al estrés de temperatura que sufren los espermatozoides por el proceso de descongelación y recongelación. Sin embargo, los valores se encuentran dentro de los rangos recomendados para ser usados en biotecnologías como la inseminación artificial, transferencia de embriones y fertilización *in vitro*.
- ▶ Los resultados al evaluar el daño de la membrana plasmática de los espermatozoides reportaron valores de 9.13% en semen descongelado mientras que el semen recongelado reportó un valor de 1.62% lo que claramente refleja un incremento en la integridad de la membrana plasmática al recongelar los espermatozoides.
- ▶ El daño en el paquete de ADN de los espermatozoides se vió reducido al recongelarlos obteniendo un 1.07 % de daño en semen recongelado versus 8.74 % de daño en semen congelado. Estos datos hacen una primera inferencia en que la recongelación de espermatozoides seleccionará a las mejores células para tener una mejor eficiencia al momento de utilizarlas en biotecnologías reproductivas, haciendo una referencia especial a su uso en fertilización *in vitro* FIV.

Referencias bibliográficas

- Abdussamand, A., Gaulty, M., & Holtz, W. (2015). Temporary Storage of Bovine Semen Cryopreserved in Liquid Nitrogen on Dry Ice and Refreezing of Frozenthawed Semen. *Revista Cryoletters*, 278-284.
- Almela, L. (4 de Noviembre de 2014). Tesis Doctoral. *Aportaciones a la Crioconservación de Gametos Masculinos en la Raza Bovina Murciano Levantina: Recongelación de Espermatozoides*. Murcia, Murcia, España: Universidad de Murcia.
- Álvarez, M. (2018). Optimización de los protocolos de congelación de eyaculados de oso pardo (*Ursus arctus*). *Ambiociencias - Revista de divulgación científica*, 66-67.
- Bedoya, N., Vásquez, N., & Rivera, N. (2003). Evaluación de la integridad funcional de la membrana plasmática de espermatozoides bovinos mediante el test hipoosmótico (HOST). *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 6-7.
- Cabrera, P. P. (2012). Viabilidad espermática e integridad del acrosoma en semen congelado de toros nacionales. *Revista de investigación veterinaria Perú* 121-124
- Carpio, S. (2015). Tesis de grado. *Evaluación de dos diluyentes para la crioconservación de semen bovino: yema de huevo vs leche descremada*. Cuenca, Azuay, Ecuador Universidad Politécnica Salesiana - Sede Cuenca.
- Carwel, D., Scott, B., Gentry, G., Bondioli, K., & Godke, R. (2010). Refreezing post-thawed goat semen. *Revista Reproduction, fertility and development*, 70.
- Chelsey, A., Pinto, C., Cramer, E., Love, C., & Paccamonti, D. (2017). Effects of Repeated Partial Thaw and Refreeze on Post-Thaw Parameters of Stallion Semen Cryopreserved in Cryovials. *Revista Journal of Equine Veterinay Science*, 19-24.
- G, P. (2009). *Inseminación Artificial*. Recuperado de http://www.reprobiotec.com/i_artificial.swf
- González, G., & Muñoz, A. (2002). Tesis de pregrado. *Determinación de la calidad biológica del semen congelado de la unidad de ganado lechero y doble propósito en Zamorano, Honduras*. Honduras: Universidad Zamorano.
- Hammerstedt, R., Graham, J., & Nolan, J. (1990). Cryopreservation of Mammalian Sperm: What We Ask Them to Survive. *Revista Journal of Andrology*, 73-88.
- Jeyendran, R., Van de Ven, H., Perez Pelaez, M., Crabo, B., & Zaneveld, L. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Revista J Reprod Fertil*, 219-228.
- Mejía, J. (2017). Tesis de grado. *Evaluación pre y post congelación del semen obtenido con vagina artificial y electroeyaculador en el ganado criollo*. Cuenca, Ecuador: Universidad de Cuenca.
- Muhammad, A., Rakha, B., & Akhter, S. (2010). Effect of L-cysteine in extender on pos-thaw quality of Sahiwal bull semen. *Revista Animal Science Paper and Report*, 197-203.
- Nava Trujillo, H., Quintero Moreno, A., Hernández Fernández, A., & Osorio Melendez, O. (2016). Espermatozoides con cromatina dañada e inmadura en semen. *Revista Científica*, 20-25.
- Neira, J., Ramirez, G., León, S., & Moreno, D. (2007). Efecto de la asociación de la L-GlutaminaEtilenglicol en crioconservación de semen equino. *Revista Médica Veterinaria*, 93-105.

- Peña, A., & Linde, C. (2000). Effects of Equex, one- or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. *Revista Theriogenology*, 859 - 875.
- Ramónez, J. (2013). Tesis de Grado. *Evaluación de dos agentes crioprotectores no permeables y un diluyente comercial (Triladyl) en la congelación de semen bovino*. Cuenca, Azuay, Ecuador: Universidad de Cuenca.
- Ribeiro Peres , A., Munita Barbosa, L., Yumi Kanazawa, M., Mello Martins, M., & Ferreira De Souza , F. (2014). Criopreservación de espermatozoides bovinos extraídos de la cola del epidídimo utilizando los métodos convencional y automatizado. *Revista Archivos de Medicina Veterinaria*, 20-25.
- Vera, O. (2003). *Desarrollo sostenible de la ganadería doble propósito: Fisiología de los espermatozoides bovinos*. Maracaibo: Ediciones Astro Data S.A.
- Verza, S., Feijo, C., & Esteves, C. (2009). Resistance of human spermatozoa to cryoinjury in repeated cycles of thaw-refreezing. *Revista Internacional braz j urol*, 25-29.

Cómo citar este artículo: