

## **ESTUDIO COMPARATIVO DE TRES DILUYENTES: ANDROMED®, BIOCIPHOS PLUS® Y BILADYL®. EVALUACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA Y LONGEVIDAD ESPERMÁTICAS POST-DESCONGELACIÓN DE ESPERMATOZOIDES BOVINOS**

Muiño<sup>1</sup> R., Peña<sup>1</sup> A.I.

<sup>1</sup> Unidad de Reproducción y Obstetricia, Facultad de Veterinaria de Lugo (USC), 27002, Lugo. España. [rodrigomuino@colvet.es](mailto:rodrigomuino@colvet.es)

### **INTRODUCCIÓN**

En este experimento se realizó un estudio comparativo de tres diluyentes comerciales previamente utilizados por otros autores para la crioconservación del semen bovino. Dos de los diluyentes comerciales utilizados en el experimento 1, Biociphos Plus® (IMV, L'Aigle, France), y Andromed® (Minitüb, Tiefembach, Germany), están elaborados a partir de extractos de soja. Los fosfolípidos vegetales extraídos de la soja actúan como sustancias protectoras de las membranas celulares frente al efecto de las bajas temperaturas. Difieren entre ellos en el tipo de azúcares, en la naturaleza de las sustancias que actúan como tampón, y en los antibióticos que contienen, pero dado que son diluyentes comerciales, su composición exacta es desconocida. Ambos diluyentes se compararon frente al uso de Biladyl® (Minitüb, Tiefembach, Germany), en el que los fosfolípidos y lipoproteínas de la yema de huevo actúan como principales protectores de las membranas espermáticas frente al shock por frío. Los tres diluyentes contienen glicerol como crioprotector.

El objetivo del trabajo fue comparar la supervivencia y longevidad espermática post-descongelación del semen bovino congelado con tres diluyentes distintos: Andromed® y Biociphos Plus®, que contienen fosfolípidos extraídos de la soja como principales sustancias protectoras de las membranas espermáticas frente al shock por frío, y Biladyl®, en el que la yema de huevo es la principal sustancia protectora frente al shock por frío.

### **MATERIAL Y MÉTODOS**

Se utilizaron 60 eyaculados procedentes de 10 toros Holstein (6 eyaculados por toro). Cada eyaculado fue dividido en 3 volúmenes iguales, que se depositaron en 3 tubos de centrifuga, y a los que posteriormente se añadió el volumen apropiado de los respectivos diluyentes para alcanzar una concentración final de  $80 \times 10^6$  esp/ml.

El Biladyl® fue añadido en 2 pasos: la solución A (libre de glicerol) se añadió en una primera fase, a temperatura ambiente, hasta alcanzar una concentración de  $160 \times 10^6$  esp/ml. Una vez diluido con la solución A, el semen se dejó equilibrar a 4°C durante 18 horas, y aproximadamente 1 hora antes de la congelación, se adicionó el mismo volumen de Biladyl® solución B (que contenía un 14% de glicerol) a 4°C en 3 etapas, a intervalos de 20 min, para obtener una concentración espermática final de  $80 \times 10^6$  esp/ml., mientras que el Biociphos Plus® y el Andromed® fueron adicionados en un solo paso, a temperatura ambiente. Las tres suspensiones espermáticas se mantuvieron a 4°C durante 18 h.

La descongelación del semen se realizó en un baño de agua a 37°C durante 20 segundos. De cada diluyente se descongelaron 3 pajuelas simultáneamente, su contenido se vació en un tubo falcon de 5 ml, y el semen se mantuvo en incubación postdescongelación a 37°C durante un periodo de 9 h. Al cabo de 0, 3, 6 y 9 h de incubación, una alícuota de 100 µl se utilizó para evaluar la viabilidad espermática mediante citometría de flujo, utilizando la triple tinción fluorescente descrita por Nagy y col (2003).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las muestras de semen procesadas con Biladyl® mostraron mayor supervivencia y longevidad espermática ( $P < 0,001$ ) que las procesadas con los diluyentes elaborados a base de extractos de soja. En las muestras procesadas con Biladyl®, el porcentaje de espermatozoides vivos con el acrosoma intacto fue de 47,9% a las 0 h post-descongelación, y de 30,3% tras 9 h de incubación. En cambio, las muestras procesadas con Andromed® mostraron valores de 38,5% y 17,3%, tras 0 y 9 h de incubación, respectivamente, y las procesadas con Biociphos Plus® mostraron una viabilidad espermática de 34,9% y 21,6%, tras 0 y 9 h de incubación, respectivamente (Gráfica 1).

La proporción de espermatozoides vivos con el acrosoma intacto, en muestras congeladas con Biladyl® o con Biociphos Plus®, no sufrió variaciones significativas durante 6 h de incubación post-descongelación. Las muestras de semen congeladas con Andromed®, en cambio, a las 6 h post-descongelación mostraron un descenso significativo de la viabilidad espermática. No obstante, el descenso más drástico de la viabilidad, con los 3 diluyentes, se registró al cabo de 9 h de incubación a 37°C.

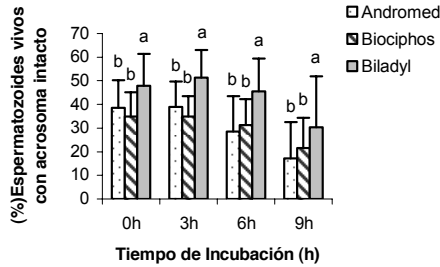
El toro tuvo un efecto significativo ( $P < 0,001$ ) sobre la integridad de las membranas plasmática y acrosomal, pero la interacción entre toro y diluyente no fue significativa. También el replicado tuvo un efecto significativo ( $P < 0,001$ ) sobre la integridad de las membranas plasmática y acrosomal, pero la interacción entre replicado y diluyente no fue significativa (Gráfica 2).

Varios estudios diseñados para evaluar el efecto de añadir el glicerol al semen bovino antes, durante, o al final de un periodo de refrigeración de entre 4 y 18 h a 5°C en uno o en varios pasos, llevaron a la conclusión de que el glicerol podía ser adicionado al semen en cualquier momento de este periodo sin que la calidad espermática o la fertilidad del semen se viesen afectadas (revisado por Pickett y Berndtson, 1978). Recientemente, se ha propuesto un nuevo mecanismo de crioprotección de las membranas espermáticas por parte de la fracción de lipoproteínas de baja densidad de la yema de huevo. Manjunath et al. (2002) demostraron que las lipoproteínas de la yema de huevo tienen una gran afinidad por las proteínas del plasma seminal bovino (BSP: proteínas del plasma seminal bovino); esta unión se produce de forma rápida, específica, saturable y estable, y se mantiene durante la congelación y la descongelación.

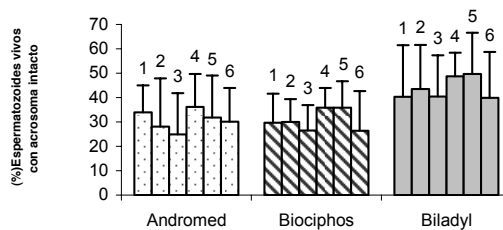
Las BSP se sabe que durante la eyaculación, se unen a la membrana plasmática de los espermatozoides recubriéndola superficialmente (Manjunath et al., 1994), e inducen la salida de fosfolípidos y colesterol de la membrana provocando su desestabilización (Thérien et al., 1998, 1999). La pérdida de fosfolípidos y de colesterol, inducida por la exposición a las proteínas del plasma seminal, hace que se desestabilice la membrana y se reduzca su resistencia a la congelación (Darin-Bennet y White, 1977). Las lipoproteínas de baja densidad de la yema de huevo, al unirse a las proteínas del plasma seminal presentes en el semen, neutralizarían su efecto perjudicial sobre las membranas espermáticas protegiéndolas durante el enfriamiento y la congelación (Manjunath et al., 2002).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Darin-Bennet A, White IG. 1977. *Cryobiology* 14 466-477.
- Manjunath P, Chandonnet L, Leblond E, Desnoyers L. 1994. *Biol. Reprod.* 50 977-987.
- Manjunath P, Nauc V, Bergeron A, Ménard M. 2002. *Biol. Reprod.* 67 1250-1258.
- Nagy S, Jansen J, Topper EK, Gadella BM. 2003. *Biol. Reprod.* 68 1828-1835.
- Pickett BW, Berndtson WE. 1978. In: Salisbury GW, VanDemark NL, Lodge JR (eds), pp 494-589.
- Thérien I, Moreau R, Manjunath P. 1998. *Biol. Reprod.* 59 768-776.
- Thérien I, Moreau R, Manjunath P. 1999. *Biol. Reprod.* 61 590-598.



**Gráfica 1.** Porcentajes medios ( $\pm$ desviaciones típicas) de espermatozoides vivos con acrosoma intacto. a, b indican diferencias significativas entre diluyentes a los distintos tiempos de evaluación.



**Gráfica 2.** Porcentajes medios de espermatozoides vivos con acrosoma intacto después de la descongelación (datos de todas las evaluaciones postdescongelación) para muestras de toros congeladas durante los 6 días

## COMPARASION STUDY OF THREE EXTENDERS: ANDROMED®, BIOCIPHOS PLUS® Y BILADYL®. EVALUATION POST-THAW SURVIVAL AND LONGEVITY OF BOVINE SPERMATOZOA

**ABSTRACT:** Six ejaculates from each of 10 Holstein bulls were collected using artificial vagina. Ejaculates were evaluated for volume, sperm concentration and motility, divided in 3 equal volumes, and diluted, respectively, with the 3 extenders specified above. Extended semen was equilibrated for 18 h at 4°C and frozen in 0.25-ml straws.

After thawing, 100  $\mu$ l-aliquots of semen were labelled with SYBR-14, PI and PE-PNA (Phycoerythrin-conjugated Peanut agglutinin) and analysed by flow cytometry at 0, 3, 6 and 9 h after incubation at 37° C. A General Lineal Model procedure for repeated measures was used to determine the effects of extender, bull, replicate and the interaction between them, on sperm viability and acrosomal integrity. Semen samples frozen with Biladyl® showed higher ( $P < 0.001$ ) sperm survival after 0h (47.9%) and 9h (30.3%) of incubation than those frozen with Andromed® (38.5% and 17.3%, after 0 and 9h, respectively) or Biociphos Plus® (34.9% and 21.6%, after 0 and 9h, respectively). The bull and replicate had significant effects ( $P < 0.001$ ) on both sperm viability and acrosomal integrity, but the interactions between bull and extender and between replicate and extender were not significant. It was concluded that, when holding the semen overnight before freezing, the use of Biladyl® results in higher sperm survival and longevity than the use of Andromed® or Biociphos Plus®.

**Keywords:** extenders, viability, acrosomal integrity