










La suplementación con jalea real a los medios de congelación y vitrificación mejoran la criosupervivencia de espermatozoides de toro

Luis Galarza-Álvarez¹ , Jacqueline Guanga , Juan Lucero ,
Xavier Samaniego  , Diego A. Galarza  

Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Agropecuarias,
Universidad de Cuenca, Cuenca, Ecuador

Royal jelly supplementation to freezing and vitrification media improves cryosurvival of bull spermatozoa

Introducción

La Jalea Real (RJ) es un sustancioso nutriente producido por la hipofaringe y glándulas mandibulares de las abejas obreras de 4 a 11 día de edad, y su composición de basa principalmente en agua (60–70 %), proteína (27–41%) y carbohidratos (30%), lípidos (8–19%), vitaminas (A, B, C, E), sales y aminoácidos (Maghsoudlou et al., 2019). Debido a su composición, la JR ha sido usada exitosamente en la criopreservación de espermatozoides en concentraciones desde 0,2 al 1% (p/v) suplementado a diluyentes de base sintética (ej. TRIS o TALP). Su efecto ha sido evidenciado en el incremento de la motilidad, viabilidad, funcionalidad de la membrana plasmática y capacidad fecundante de espermatozoides fresco y criopreservado de carnero (Moradi et al., 2013; Amini et al., 2019), conejo (El-Sherbiny, 2013), toro y búfalo (Abd-Allah, 2010, 2012). En un reporte previo se determinó que la suplementación con 0,2% de JR a los diluyentes TCG-YH (tris, ácido cítrico, glucosa + 6% yema de huevo) y UHT (leche desnatada + 6% yema de

huevo) fue la más adecuada para mantener y mejorar la cinemática espermática de los espermatozoides bovinos refrigerados durante 96 horas (Guanga et al., 2022).

La congelación convencional requiere el uso de agentes crioprotectores penetrantes (ej. glicerol) para evitar los daños causados por la formación de cristales de hielo, sin embargo, la vitrificación requiere altas concentraciones (0,1 a 6 M) de crioprotectores no penetrantes (ej. sacarosa o trehalosa) y un enfriamiento veloz, pasando rápidamente a la transición vítrea sin formar cristales de hielo (Holt and Penfold, 2014). Para nuestro mejor conocimiento no se ha reportado trabajos sobre el efecto de la JR en la vitrificación de espermatozoides bovinos.

En este sentido, esta investigación evaluó el efecto de la JR (0,2%) suplementado a los medios de congelación (TCG-YH + 5% glicerol) y vitrificación (TCG-YH + 100 mM sacarosa) sobre criosupervivencia de espermatozoides de toro.

Palabras clave: criopreservación, cinemática espermática, jalea real, criosupervivencia

Materiales y Métodos

Quince eyaculados de semen de 3 toros reproductores adultos (2–4 años) recolectados mediante vagina artificial en 5 sesiones semanales fueron usados para conformar 5 agrupaciones (3 eyaculados / agrupación). De cada agrupación, se tomaron cuatro alícuotas y se diluyeron inicialmente con TCG-YH a una concentración inicial de

100×10⁶ espermatozoides/mL. La primera y segunda alícuotas fueron usadas para la congelación con y sin la adición de 0,2% de JR [CONG-JR y CONG-C₀], mientras que la tercera y cuarta alícuotas fueron usadas para la vitrificación con y sin la adición de 0,2% de JR: [VIT-JR y VIT-C₀].

¹ Autor para la correspondencia: E-mail: luis.galarza@ucuenca.edu.ec



La congelación fue realizada usando glicerol (5%) y un equilibramiento las muestras espermáticas durante 3 horas a 5°C. Las muestras fueron cargadas en pajuelas de 0,25 mL y expuestas a vapores de nitrógeno líquido (NL₂) estático a 5 cm del nivel del NL₂ durante 10 minutos, y luego fueron sumergidas. Las pajuelas fueron descongeladas a 37°C durante 30 segundos.

La vitrificación se realizó usando sacarosa (100 mM) y un equilibramiento las muestras espermáticas durante 30 minutos a 5°C. Se pipetearon las muestras y sumergieron en gotas de 30 µL directamente en NL₂ a una altura de 15 cm. Los pellets formados se almacenaron en un tubo cónico Falcon (15 mL) dentro de un tanque de nitrógeno líquido. Los pellets fueron calentados exponiéndolos en una platina térmica de un dispositivo de calentamiento (STC-3008, *dispositivo no patentado*) atemperadas 62 - 65 °C durante 3

segundos. Estas muestras fueron centrifugadas a 300 gravedades durante 5 minutos y el pellet fue resuspendido en 500 µL de diluyente TCG-YH.

Las muestras congeladas-descongeladas y vitrificadas-calentadas fueron analizadas su cinemática espermática e integridad de las membranas espermáticas mediante el uso del sistema CASA (SCA-Evolution 2018®) y la prueba de doble tinción fluorescente (PNA-FITC / PI), respectivamente.

Un ANOVA factorial de 2 × 2 que incluyó el método de criopreservación [*congelación y vitrificación*] y la adición de la JR [*JR y control*], junto con la prueba de Bonferroni fueron usados para evaluar el efecto de la JR en muestras ‘pareadas’ provenientes de la congelación y vitrificación. El nivel de significancia fue considerado cuando el valor de P < 0,05.

Resultados y Discusión

No hubo interacción (P>0,05) entre factores en ningún parámetro analizado. Las muestras congeladas produjeron porcentajes más altos (P<0,05) de motilidad total (MT) e integridad de la membrana plasmática (IMP, equivalente a la viabilidad) y acrosomal (IMA), independientemente

de la adición de JR. No se evidenció diferencias significativas (P>0,05) entre tratamientos de congelación y vitrificación con respecto a la motilidad progresiva (MP), los parámetros de relación de progresión (rectitud, linealidad y oscilación) y la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH).

Tabla 1. Parámetros cinemáticos y estado de las membranas de espermatozoides bovinos criopreservados con JR.

Parámetros	Tratamientos			
	CONG-JR (n=36 pajuelas)	CONG-Co (n=36 pajuelas)	VIT-JR (n=10 criotubos)	VIT-Co (n=10 criotubos)
MT (%)	31,4 ± 2,48 ^a	34,8 ± 2,60 ^a	13,4 ± 3,52 ^b	12,2 ± 1,80 ^b
MP (%)	16,0 ± 2,53	17,5 ± 2,65	8,2 ± 2,61	8,3 ± 1,49
VCL (µm/s)	84,1 ± 3,68 ^a	71,9 ± 4,44 ^b	59,5 ± 4,34 ^b	63,6 ± 6,44 ^b
VSL (µm/s)	35,8 ± 1,42 ^a	26,3 ± 1,51 ^b	21,1 ± 2,41 ^b	23,5 ± 2,33 ^b
STR (%)	64,4 ± 1,48	66,5 ± 1,01	64,8 ± 1,82	64,6 ± 0,75
LIN (%)	35,2 ± 1,17	37,8 ± 0,88	33,9 ± 1,85	36,6 ± 0,89
WOB (%)	52,9 ± 0,79	54,5 ± 0,71	51,1 ± 1,82	54,1 ± 1,1
ALH (µm)	3,3 ± 0,14	3,2 ± 0,17	2,8 ± 0,16	3,0 ± 0,27
BCF (HZ)	7,8 ± 0,35 ^a	7,7 ± 0,35 ^b	6,3 ± 0,61 ^{ab}	5,8 ± 0,61 ^c
IMP (% viabilidad)	35,3 ± 2,03 ^a	35,9 ± 1,64 ^a	20,0 ± 1,43 ^b	13,6 ± 1,46 ^c
IMA (%)	45,9 ± 2,15 ^a	45,8 ± 2,17 ^a	35,0 ± 3,88 ^{ab}	33,4 ± 1,39 ^b

MT, motilidad total; MP, motilidad progresiva; VCL, velocidad curvilínea; VSL, velocidad rectilínea; STR, rectitud; LIN, linealidad; WOB, oscilación, ALH, desplazamiento lateral de la cabeza; y BCF, frecuencia de batida del flagelo. IMP, integridad de la membrana plasmática; IMA, integridad de la membrana acrosomal. Diferentes superíndices en cada fila indica diferencias significativas entre tratamientos en cada parámetro cinemático (^{a-b-c} P<0,05; ^{a-c} P<0,01).



En la congelación, se evidenció el efecto positivo de la JR al incrementar ($P < 0,05$) las velocidad curvilínea (VCL) y rectilínea (VSL), y frecuencia de batida de flagelo (BCF) comparado con su control. En la vitrificación, la JR eficientemente incrementó ($P < 0,05$) los valores de BCF e IMP.

El mejoramiento de las velocidades y la BCF después de la congelación y vitrificación, probablemente se debe a la fuente enriquecida de carbohidratos de la JR (alrededor del 30%) (Sabatini *et al.*, 2009). La crioprotección de espermatozoides después de la vitrificación se debe, posiblemente, al alto contenido proteínas (27-41%) y lípidos (8-19%) (Maghsoudlou *et al.*, 2019) de la JR que se adhieren

a la membrana plasmática durante el descenso drástico de temperatura. En este sentido, Abd-Allah, (2010) demostró que la JR ayudó a mantener una mejor calidad y longevidad de los espermatozoides bovinos criopreservados. Ellos atribuyen a la composición rica en carbohidratos, vitamina C, vitamina E y arginina (Moutsatsou *et al.*, 2010). Se conoce que la vitamina E y C son poderosos antioxidantes que inhibe el daño inducido por los radicales libres en las membranas celulares de los espermatozoides bovinos (Sakhdary *et al.*, 2022). Los presentes hallazgos son consistentes con los reportes anteriormente mencionados.

Conclusiones

La jalea real mejoró la cinemática del espermatozoide bovino congelado y vitrificado. Además, la jalea real ejerció un efecto crioprotector durante la vitri-

ficación debido al incremento de la integridad de la membrana plasmática.

Literatura Citada

- Abd-Allah, S. M. 2010. Effect of royal jelly on bovine sperm characteristics during post-thaw incubation in vitro. *Rev Vet*, 21(2), 81-5. <https://core.ac.uk/download/pdf/230830986.pdf>
- Abd-Allah, S. M. 2012. Effect of royal jelly on the fertilizing ability of buffalo spermatozoa in vitro. *Journal of Buffalo Science*, 1(1), 1-4. <http://dx.doi.org/10.6000/1927-520X.2012.01.01.01>
- Amini, S., Masoumi, R., Rostami, B., Shahir, M. H., Taghilou, P., & Arslan, H. O. 2019. Effects of supplementation of Tris-egg yolk extender with royal jelly on chilled and frozen-thawed ram semen characteristics. *Cryobiology*, 88, 75-80. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.03.008>
- El-Sherbiny, A. 2013. Effect of royal jelly in honey-included egg yolk based extenders on motility, viability and fertilizing ability of frozen rabbit spermatozoa. *Egyptian Journal of Rabbit Science*, 23(2), 149-160. <https://doi.org/10.21608/ejrs.2013.54261>
- Guanga, J., Lucero, J., Samaniego, J.X., Segarra, E., Galarza-Álvarez, L., Galarza, D. A. 2022. La suplementación de jalea real a diluyente de base sintética y no sintética ayuda a mantener la motilidad y cinética de espermatozoos de toro refrigerado. *Proceedings del Primer Simposio Internacional de Reproducción Animal en Ecuador (IRAE)*. SPERMOVA, 12(1), 170-171. <https://doi.org/10.18548/aspe/0010.22>
- Holt, W. V., Penfold, L. M. 2014. *Animal Andrology: Theories and applications*, In: S. Chenoweth (Ed.), *Anim. Androl. Theor. Appl*, 2014, pp. 78–81. Boston, MA, USA.
- Maghsoudlou, A., Mahoonak, A. S., Mohebodini, H., & Toldra, F. 2019. Royal jelly: chemistry, storage and bioactivities. *Journal of Apicultural Science*, 63(1), 17-40. <https://doi.org/10.2478/jas-2019-0007>
- Moradi, A. R., Malekinejad, H., Farrokhi-Ardabili, F., & Bernousi, I. 2013. Royal Jelly improves the sperm parameters of ram semen during liquid storage and serves as an antioxidant source. *Small ruminant research*, 113(2-3), 346-352. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2013.03.003>
- Moutsatsou, P., Papoutsis, Z., Kassi, E., Heldring, N., Zhaohao, C., Tsiapara, A., ... Dahlman-Wright, K. 2010. Fatty acids derived from royal jelly are modulators of estrogen receptor functions. *Plos One*, 5, 15594. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015594>
- Sakhdary, H., Farshad, A., Rostamzadeh, J., Binabaj, F. B., & Sobhani, K. 2022. Effects of enzymatic and non-enzymatic antioxidants in diluents on cryopreserved bull epididymal sperm. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 11(1), 44. <https://doi.org/10.4103/2305-0500.335861>

