

EFFECTO DE DOS DILUTORES SOBRE LA MOTILIDAD E INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA ESPERMÁTICA EN SEMEN CONGELADO DE OVINOS

EFFECTS OF TWO SEMEN EXTENDERS ON MOTILITY AND INTEGRITY OF SPERM MEMBRANE IN OVINE FROZEN SEMEN

Próspero Cabrera V.^{1,2}, Javier Orellana Ch.¹, César Pantoja A.³

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de dos dilutores, Tris-Fructosa-Yema de huevo (Tris) y Citrato-Glucosa-Yema de huevo (citrato), sobre la motilidad espermática e integridad de la membrana espermática (HOST) en semen congelado de ovinos bajo la forma de pellets. La investigación se llevó a cabo en el Banco de Semen de la Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, empleándose 4 carneros (2 Blackbelly y 2 Assaf) de 3.5 a 4 años de edad. Se empleó el análisis de covariancia para analizar Motilidad Individual Progresiva (MIP), y bloques completamente randomizados para medir el efecto de los dilutores sobre la integridad de la membrana espermática. Para el congelamiento del semen se utilizó hielo seco y el descongelamiento se realizó a 38 °C en tubos de ensayo. En ovinos Assaf, la MIP del semen descongelado fue de 63.77 y 61.11% utilizando Tris y citrato, respectivamente, encontrándose diferencias significativas ($p < 0.05$) entre dilutores, mientras que en ovinos Blackbelly, la MIP fue de 62.33 y 61.33% con Tris y citrato, respectivamente, sin diferencia estadística. En ovinos Assaf, los valores de HOST del semen descongelado fueron de 43.56 y 40.38% con Tris y citrato, y en Blackbelly fueron de 40.19 y 38.16% con Tris y Citrato, respectivamente, sin diferencias significativas. Se concluye que el dilutor Tris evidenció mejores niveles en la conservación de la motilidad individual espermática pero ambos tuvieron similar efecto en la integridad funcional de la membrana espermática.

Palabras clave: semen congelado, motilidad individual, integridad de membrana

ABSTRACT

The objective of the study was to evaluate the effects of two semen extenders: Tris-Fructose-egg yolk (Tris) and Citrate-Glucose-egg yolk (citrate) on motility and sperm membrane integrity (HOST) in ovine frozen semen in pellets. The study was carried out at the Semen Bank of the Agrarian University La Molina, in Lima, Peru, using 4 rams (2 Assaf and 2 Blackbelly) of 3.5 to 4 years old. A covariance analysis was used to evaluate

¹ Departamento de Producción Animal, Facultad de Zootecnia, Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), Lima

² E-mail: procecavi@lamolina.edu.pe

³ Escuela de Zootecnia, Universidad Nacional Daniel Alcides Carrión, Cerro de Pasco

the effect of the treatment and breed on Individual Progressive Motility (IPM), and randomized block design to evaluate the effect of extenders on sperm membrane integrity. Semen was frozen of dry ice and thawing was done in test tubes at 38 °C. In the Assaf breed, IPM of thawed semen was 63.77 and 61.11% when using Tris and citrate respectively, showing statistical difference ($p < 0.05$). In the Blackbelly breed the IPM was 62.33 and 61.33%, when used Tris and citrate respectively, and without significant difference. In the Assaf the HOST values of thawed semen were 43.56 and 40.38%, while in Blackbelly were 40.19 and 38.16% respectively, both without significant differences. It is concluded that Tris showed better effect on individual motility but both of them had similar effect on sperm membrane integrity.

Key words: frozen semen, individual motility, membrane integrity

INTRODUCCIÓN

La población ovina nacional es de aproximadamente 15 486 000 (Ministerio de Agricultura, 2002), de los cuales el 66% son criollos y el 34% restante lo componen otras razas, entre ellas, Corriedale, Junín, Blackbelly y Assaf. La crianza de ovinos de raza permite obtener reproductores para el cruzamiento con el ganado criollo a fin de lograr animales de buena adaptabilidad al medio y mejorar sus niveles productivos, lo cual permitiría elevar la calidad de vida de las familias campesinas dedicadas a su crianza.

La precaria situación económica de los criadores de ovinos altoandinos imposibilita la adquisición de reproductores, pudiendo quedar la inseminación artificial con semen congelado como una alternativa de solución. No obstante, se tiene que considerar que los resultados de fertilidad del semen criopreservado, dependen de las características originales del semen fresco, de los dilutores, de la técnica de criopreservación y de la eficiencia en el proceso de inseminación artificial. En general, los resultados del semen congelado son inferiores a los del semen fresco. Factores como el shock de frío, velocidad de enfriamiento, composición de los diluyentes y estrés osmótico, que ocurren durante el proceso de congelación, son responsables de la disminución de la fertilidad con el uso de semen congelado (Stornelli *et al.*,

2005). Estos factores y el efecto raza en las condiciones del Perú, aun no han sido estandarizados.

En un estudio realizado por Paulenz *et al.* (2002) en Noruega, usando Tris con 20% de yema de huevo como dilutor, se obtuvo una mejor motilidad progresiva y un menor daño a la membrana plasmática durante la conservación del semen a 20 °C, en comparación al uso de un dilutor en base a leche con 5% de yema de huevo. Estas diferencias implican el estudio de los diluyentes en la conservación de los espermatozoides y la evaluación de protocolos de congelamiento que permitan una adecuada conservación del semen por periodos prolongados de tiempo para su posterior uso en la inseminación artificial.

El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto de los dilutores Tris-Frucciosa-Yema de huevo y Citrato-Glucosa-Yema de huevo, sobre la motilidad individual e integridad de membrana espermática en semen congelado de carneros.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar y Animales

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en las instalaciones del Banco Nacional de Semen de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), ubica-

Cuadro 1. Composición química de dilutores empleados para la criopreservación de semen ovino

Tris-Fructuosa-Yema de huevo		Citrato-Glucosa-Yema de huevo	
Tris (g)	3.63	Citrato de sodio (g)	2.37
Fructuosa (g)	0.50	Glucosa (g)	0.8
Ácido cítrico (g)	1.95		
Yema de huevo (ml)	15	Yema de huevo (ml)	15
Penicilina (UI)	100000	Penicilina (UI)	100000
Estreptomicina (mg)	100	Estreptomicina (mg)	100
Agua destilada (ml)	80	Agua destilada (ml)	80
Glicerol (ml)	5	Glicerol (ml)	5
Total (ml)	100	Total (ml)	100

do en el distrito de la Molina, Lima. Se utilizaron 4 carneros donadores de semen, dos Blackbelly y dos Assaf, con edades entre 3.5 a 4.0 años, pertenecientes al Rigoranch-UNALM.

Colección y Evaluación de Semen

El semen fue colectado dos veces por semana, con vagina artificial, a todos los carneros. Se determinó y evaluó el volumen, color, ph, motilidad, porcentaje de espermatozoides vivos e integridad de membrana espermática, en 18 eyaculados de carneros Assaf y en 12 de machos Blackbelly.

Dilutores

Se utilizaron los dilutores Tris – yema de huevo de codorniz (*Coturnix coturnix japonica*) (T1) y Citrato – yema de huevo de codorniz (T2), según Evans y Maxwell (1990). Se destinó la mitad de cada eyaculado para la evaluación de los dilutores. En el Cuadro, 1 se muestra la composición química de los dilutores.

Dilución y Congelación

Luego de la evaluación del eyaculado, se agregó el diluyente respectivo en una cantidad que permitiese obtener una concentración final de 50×10^6 espermatozoides por pellet. El tubo de ensayo conteniendo el semen se colocó en una cubeta con agua y se colocó en la refrigeradora, para llevar la temperatura de 34 a 5 °C en un lapso de dos horas. Quince minutos antes de cumplidas las dos horas, y en caso no estuviese a 5 °C, se agregó cubos de hielo al baño de agua que acompañaba al semen, hasta lograr la temperatura esperada en la parte final de la curva de enfriamiento y equilibrio.

Se acondicionó un bloque de hielo seco de superficie lisa (dióxido de carbono sólido a -79 °C). Para esto, se hicieron celdas con un molde hecho a base de madera y clavos cubiertos con papel de parafina, evitando en todo momento la contaminación con agentes extraños al medio. Con una micropipeta se colocó, en forma rápida y sucesiva, volúmenes de 0.2 ml por celda, de manera que el tiempo transcurrido entre la primera gota y



Figura 1. Proceso de congelación de semen de ovino en pellets utilizando hielo seco en una fase inicial

la última no supere el minuto. Se dejó por un minuto hasta que la superficie de los pellets se puso opaca, y luego se sumergieron en nitrógeno líquido en un tanque criogénico (Fig. 1).

Se tuvo especial cuidado en el mantenimiento del semen a 5 °C durante todo el proceso del vaciado al hielo seco. En el tanque de nitrógeno líquido, cada goblet fue cubierto

con algodón para mantener los pellets en sus respectivos lugares.

Descongelación y Evaluación del Semen

El semen se mantuvo en congelación por espacio de una semana. El descongelamiento de los pellets se realizó en tubos de vidrio, mantenidos a 38 °C en baño de agua, por es-

pacio de 25 a 30 segundos, durante los cuales, el tubo se agitó lentamente para lograr una descongelación uniforme.

En el semen descongelado se evaluó la motilidad individual progresiva y la integridad funcional de la membrana espermática. En el primer caso, se tomó 10 μ l de semen sobre una lámina porta objetos temperada a 37 °C y se cubrió con una lámina cubre objetos. Se observó al microscopio a 20X y 40X, y el resultado se expresó en porcentaje, considerando mótils a todos los espermatozoides con movimiento progresivo.

La integridad funcional de la membrana espermática se evaluó a través de la prueba hipoosmótica (HOST), siguiendo el protocolo descrito por Correa y Zavos (1994).

Análisis Estadístico

Los valores porcentuales de motilidad individual progresiva y endósmosis, previo al análisis estadístico, fueron transformados angularmente mediante Arco Seno (Snedecor y Cochrane, 1989). Para la determinación del efecto de los dilutores sobre la motilidad espermática luego del descongelado, se realizó un análisis de covarianza, considerándose como covariable la motilidad espermática luego del refrigerado.

En la determinación del efecto de los dilutores sobre la integridad de la membrana espermática, se realizó un análisis de bloques completamente randomizados. Asimismo, para determinar las asociaciones entre la motilidad y la respuesta de endósmosis se realizaron análisis de regresión lineal y determinación de correlaciones de Pearson. En el análisis estadístico se utilizó el programa SAS (Statistical Analysis System) v. 8.0 y Minitab v. 14.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los eyaculados fueron de color blanco cremoso y con pH de 7.0, características adecuadas para esta especie (Evans y

Maxwell, 1990). El volumen del eyaculado en los carneros Assaf (n=18) fue de 2.27 ± 0.5 ml y en el caso de los Blackbelly fue de 1.16 ± 0.38 ml. Estos volúmenes se encuentran dentro de los rangos normales en ovinos (Hafez, 1996). Volúmenes promedio reportados en estudios locales en la raza Blackbelly han sido de 1.46 ml (Quispe, 1998) y 0.97 ml (Guillén, 2001).

Los valores obtenidos en la evaluación microscópica del semen se presentan en el Cuadro 2. La motilidad masal de los eyaculados para la raza Assaf es indicativo de una alta motilidad, evaluada en una escala subjetiva de 0 y 5 (Gibbons *et al.*, 2004). La concentración espermática promedio por mililitro de eyaculado para la raza Assaf evidenció diferencias significativas entre los promedios ($p < 0.05$). Estos valores se encuentran dentro del rango reportado por Epstein (1985), quien obtuvo en carneros valores entre 1780 a 3990 x 10⁶ espermatozoides/ml.

Los porcentajes de espermatozoides vivos y anormales de los carneros de ambas razas son aceptables y sin diferencias estadísticas entre razas. El alto porcentaje de espermatozoides vivos guarda relación con alto movimiento progresivo de los espermatozoides (Hafez, 1996).

En el Cuadro 3 se muestran los resultados de las características evaluadas en el semen diluido y refrigerado, según el diluyente empleado. La motilidad individual progresiva (MIP) del semen refrigerado fue mayor con el uso de Tris que con el citrato. Dentro de razas, el uso del Tris como diluyente solo fue estadísticamente mejor en términos de MIP en la raza Blackbelly ($p < 0.05$).

La motilidad individual progresiva luego del descongelamiento fue mejor con el dilutor Tris que con el citrato, especialmente en la raza Assaf, donde esta diferencia fue significativa ($p < 0.05$) (Cuadro 4). Por otro lado, los valores promedio de HOST con el uso de los dos dilutores no evidenciaron diferencias estadísticas después del descongelamiento del

Cuadro 2. Características microscópicas de eyaculados de 2 carneros Assaf y 2 carneros Black belly¹

Variable	Assaf Promedio ± d.e.	Black belly Promedio ± d.e.
Motilidad masal (0-5)	4.50 ± 0.51 ^a	4.08 ± 0.28 ^b
Concentración (x 10 ⁶)	2892.2 ± 580.8 ^a	2108.3 ± 661.4 ^b
Espermatozoides vivos (%)	83.4 ± 5.6 ^a	79.5 ± 5.6 ^a
Espermatozoides anormales (%)	6.95 ± 1.69 ^a	6.67 ± 1.61 ^a

^{a,b} Superíndices desiguales entre razas indican diferencias significativas (p<0.05)

¹ 18 eyaculados por carnero Assaf y 12 eyaculados por carnero Blackbelly

Cuadro 3. Integridad de membrana (HOST) y motilidad espermática por tipo de diluyente en semen de 2 carneros Assaf y 2 carneros Blackbelly

Variable	Assaf Promedio ± d.e.	Black belly Promedio ± d.e.
HOST (semen fresco)	83.27 ± 5.89	81.37 ± 3.22
MIP-Tris (semen refrigerado)	84.55 ± 3.01 ^a	83.75 ± 3.27 ^a
MIP-Citrato (semen refrigerado)	83.33 ± 3.14 ^a	80.00 ± 3.95 ^b

^{a,b} Superíndices desiguales entre razas indican diferencias significativas (p<0.05)

¹ 18 eyaculados por carnero Assaf y 12 eyaculados por carnero Blackbelly

Cuadro 4. Motilidad Individual Progresiva (MIP) y porcentaje de integridad de membrana espermática del semen descongelado por tipo de diluyente en 2 carneros Assaf y 2 carneros Blackbelly

Variable		Assaf Promedio ± d.e.	Black belly Promedio ± d.e.
MIP	Tris	63.77 ± 2.24 ^a	62.33 ± 2.31 ^a
	Citrato	61.11 ± 1.99 ^b	61.33 ± 2.35 ^a
HOST	Tris	43.56 ± 7.10 ^a	40.19 ± 5.10 ^a
	Citrato	40.38 ± 3.65 ^a	38.16 ± 4.99 ^a

^{a,b} Superíndices desiguales entre dilutores y dentro de raza indican diferencias significativas (p<0.05)

¹ 18 eyaculados por carnero Assaf y 12 eyaculados por carnero Blackbelly

semen, posiblemente debido a la composición de los dilutores y la homogeneidad en el proceso de congelación del semen.

Las regresiones lineales entre HOST fresco con HOST y MIP para cada dilutor en el semen refrigerado, y entre MIP en semen refrigerado y congelado de cada dilutor, no tuvieron significancia estadística en ninguna de las razas. Asimismo, las correlaciones de Pearson (r) entre estas variables tampoco mostraron significancia estadística. Esto indica que cada evaluación es independiente y la omisión de una de ellas podría llevar a errores en el procesamiento del semen.

CONCLUSIONES

- ? El uso del dilutor Tris evidenció niveles adecuados en la conservación de la motilidad individual espermática del semen antes y después del congelamiento.
- ? Fue factible la congelación de semen de ovinos en pellets de 0.3 ml.
- ? El factor raza del carnero no fue influyente ni determinante en relación a las características seminales durante la congelación.

LITERATURA CITADA

1. **Correa JR, Zavos PM. 1994.** The hypoosmotic swelling test: Its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional test and fertility of bulls in an artificial insemination program. *Theriogenology* 48: 721-731.
2. **Epstein H. 1985.** The Awasi sheep with special reference to the improved dairy type. *FAO Animal Production and Health Paper N° 57.* 84 p. [Internet]. Disponible en <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/aj003e/aj003e.pdf>
3. **Evans G, Maxwell WMC. 1990.** Inseminación artificial de ovejas y cabras. Zaragoza: Acribia. 194 p.
4. **Gibbons A, Cueto M, Wolff M, Arrigo J, García J. 2002.** Obtención, procesamiento y conservación del semen de ovino. Comunicación técnica PA.
5. **Guillen H. 2001.** Evaluación de las características seminales en carneros Blackbelly. Tesis de Ing. Zootecnista. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina. 68 p.
6. **Hafez ESE. 1996.** Reproducción e inseminación artificial en animales. 6° ed. México: Interamericana. 496 p.
7. **[MAG] Ministerio de Agricultura. 2002.** Boletín anual de información estadística. Lima: Dirección General de Información Agraria, MAG. 63 p.
8. **Paulenz H, Soderquist L, Perez-Pe R, Andersen K. 2002.** Effect of different extenders and storage temperatura on sperm viability of liquid ram semen. *Theriogenology* 57: 823-836.
9. **Quispe PE. 1998.** Natalidad y prolificidad en ovejas Assaf y Assaf x Blackbelly sincronizadas e inseminadas con semen fresco y congelado. Tesis de Maestría. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina. 98 p.
10. **Snedecor GW, Cochran WG. 1989.** *Statistical methods.* 8th ed. USA: Iowa State University Press. 378 p.
11. **Stornelli MC, Tittarelli CM, Savignone CA, Stornelli MA. 2005.** Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. *Analecta Vet* 25(2): 28-35.