VIABILIDAD ESPERMÁTICA DE SEMEN OVINO DURANTE 48 HORAS.

Cortés S.; Montero N.; Tomé A.; Vázquez I.
Área de Reproducción Animal. CIT/INIA.
Ctra. de la Coruña Km. 5,900. 28040 Madrid.

La Inseminación Artificial en ganado ovino (IAO) es una herramienta imprescindible en la mejora genética, principalmente en razas de leche. Actualmente la IAO en España se basa en la utilización de semen refrigerado de moruecos, con un tiempo de conservación inferior a 4 horas y con escasas alternativas frente a tiempos mas largos y temperaturas de conservación.

La controversia existente entre distintos autores sobre el mejor diluyente a emplear en refrigeración así como la temperatura más adecuada, ha llevado a nuestro grupo al estudio "in vitro" de la viabilidad del semen refrigerado de moruecos de las razas Manchega y Merina, planteando tres objetivos:(1) comparación de tres diluyentes: TesT, Leche descremada y BesT; (2) estudio de la temperatura adecuada de refrigeración: 5°C y 15°C;(3) tiempo máximo de conservación de los eyaculados sin pérdida de la calidad seminal entre recogida e inseminación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de este trabajo se ha empleado el semen eyaculado de 9 moruecos adultos, 4 de raza Manchega y 5 de raza Merina, de edades comprendidas entre 5 y 7 años, mantenidos en régimen de semiestabulación, pertenecientes al Área de Reproducción Animal del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (CIT/INIA) de Madrid.

El semen fue recogido por el método de vagina artificial (VA), procediendose a la contrastación seminal de los eyaculados, valorando: volumen, motilidad masal e individual y concentración espermática. Aquellos eyaculados que no cumplieran con valores iguales o superiores a: Volumen 0,4 ml; concentración espermática 3.000 x 10^6 spz/ml; motilidad masal 4 y motilidad individual 60%, fueron eliminados del estudio.

Tabla 1.- Especificaciones de los productos empleados y combinación de los mismos.

	ACIDO		BASE	COMBINACIÓN		
	BES	TES	TRIS		BES	TES
grs	72,5	73	40	TRIS	30,0 ml 13,2 ml	20,0 ml 6,1 ml
pH	4,1	3,87	9,98	pH	6,86	6,97
P.O.	320	323	324	P.O.	333	314
Refer.	Sigma B-9879	Sigma 1357	Sigma 7-9			

BES: N,N bis (2 hidroxietil)-2-etanosulfónico.
TES: N-Tris (hidroximetil)-2-aminoetanosulfónico.
TRIS: Tris-(hidroximetil)-aminometano.

Transcurridos 10 minutos de la recogida procedemos a diluir 0,2 ml de cada eyaculado en 1 ml de diluyente: TesT y BesT (Dunner y Vázquez, 1991) y leche descremada (Colas, 1975), anulando el factor individual y de raza. Los diluyentes TesT y BesT son del tipo amino-orgánicos (Tabla 1), frente a la leche descremada que es de tipo proteico. A continuación realizamos una dilución 1:4, resultando una dilución final 1:5 con una concentración aproximada de 1.250 x 10^6 spz/ml. La

viabilidad seminal se determina mediante la valoración de porcentaje de vivos (%V); calidad de movimiento (C.M.); normalidad acrosómica (NAR) y prueba de endósmosis (E+) a +5°C y +15°C en los diluyentes TesT, Leche descremada y BesT a los tiempos: 0h, 2h, 24h y 48h.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente estudio se resumen en las tablas 2 a 5. La leche descremada se comporta como el mejor diluyente de refrigeración a +5° C, observándose diferencias significativas ($p < 0,01$) en el %V. (Tabla 2) a las 2 y 24h. También se observan diferecias significativas en la C.M. (Tabla 3) frente al Test ($p < 0,01$) y al BesT ($p < 0,05$). La refrigeración del semen a +15°C muestra unas mejores propiedades crioprotectoras a largo plazo del TesT y BesT frente a la leche descremada para los parámetros %V. y C.M., haciendose esta diferencia significativa a las 48h.

Tabla 2.- Porcentaje de espermatozoides móviles en los diluyentes TesT, Leche descremada y BesT, durante 48h. a 5° y 15°C.

	0h	2h		24h		48h	
		5°C	15°C	5°C	15°C	5°C	15°C
TesT	73,3	53,0^{b}	67,6	37,7^{b}	48,7	32,8	42,1^{b}
Lech.Des	68,7	59,3	63,1	46,2^{b}	48,3	34,1	2,5^{bd}
BesT	66,8	61,4^{b}	67,5	41,2	54,2	35,8	53,5^{d}

* Letras diferentes indican diferencias significativas: a:$p < 0,1$ b:$p < 0,01$ c:$p < 0,05$ d:$p < 0,001$

Tabla 3.- Calidad de movimiento (0-5) en los diluyentes TesT, Leche descremada y BesT durante 48h. a 5° y 15°C.

	0h	2h		24h		48h	
		5°C	15°C	5°C	15°C	5°C	15°C
TesT	4,4	3,7^{b}	4,0^{a}	2,3^{c}	3,0	2,0	2,8^{d}
Lech.Des	4,5	4,4^{bc}	4,5^{ad*}	3,1^{c}	3,0	2,4	0,3^{dd*}
BesT	4,3	3,7^{c}	4,0^{a*}	2,7	3,4	2,1	3,0^{d*}

* Letras diferentes indican diferencias significativas: a:$p < 0,1$ b:$p < 0,01$ c:$p < 0,05$ d:$p < 0,001$

Tabla 4.- Porcentaje de espermatozoides con acrosomas normales en los diluyentes TesT, Leche descremada y BesT.

	0h	2h		24h		48h	
		5°C	15°C	5°C	15°C	5°C	15°C
TesT	76,8^{a}	65,0	61,7^{a}	36,8^{b}	39,0^{ab}	20,0^{b}	37.8
Lech.Des	67,1^{a*}	57,8	71,5^{a}	48,2^{b}	51.8^{a}	28,6	33.0
BesT	77,2^{a*}	64,1	64,2	42,8	61,6^{b}	30,0^{b}	41.6

* Letras diferentes indican diferencias significativas: a:$p < 0,1$ b:$p < 0,01$ c:$p < 0,05$ d:$p < 0,001$

Los valores más altos de NAR (Tabla 4) a +5°C los encontramos en el TesT y el BesT inicialmente. Durante el período de refrigeración es el BesT el diluyente que proteje los acrosomas de manera mas efectiva, asi como un descenso de la E+ (Tabla 5) menos pronunciado (Tabla 5); mientras que el Test va a mostrar valores NAR significativos ($p < 0,01$) respecto a los otros dos diluyentes. A +15°C observamos valores NAR superiores tanto con el BesT como con la leche

descremada frente al TesT ($p < 0,1$) no observando diferencias entre los tres diluyentes a las 48 horas de la refrigeración. La pérdida de E+ que sufren los espermatzoides refrigerados a +15°C es menor utilizando los diluyentes TesT y BesT ($p < 0,01$) al obtenido con la leche descremada.

Tabla 5.- Porcentaje de espermatozoides que sufren endósmosis positiva en los diluyentes TesT, Leche descremada y BesT.

	0h	2h		24h		48h	
		5°C	15°C	5°C	15°C	5°C	15°C
TesT	67,6	$41,0^{bb*}$	51,1	42,8	$53,5^{c}$	$24,0^{cd}$	$51,8^{b}$
Lech.Des	66,3	$55,2^{b}$	54,0	$57,8^{c}$	$50,3^{c}$	$41,8^{c}$	$29,6^{bb*}$
BesT	70,7	$54,8^{b*}$	59,1	$44,5^{c}$	60,5	$44,1^{d}$	$52,6^{b*}$

* Letras diferentes indican diferencias significativas: a:$p < 0,1$ b:$p < 0,01$ c:$p < 0,05$ d:$p < 0,001$

Vázquez et al. (1990) obtienen porcentajes altos de motilidad utilizando leche descremada como diluyente de refrigeración a +15°C durante un período de 24h. Resultados similares han sido encontrados por Pintado et al. (1991) en semen de macho cabrío, acortando el tiempo de refrigeración con leche descremada a 2h y una temperatura de +5°C. Dunner et al. en 1991 observan en espermatozoides de macho cabrío diluidos en TesT y BesT porcentajes similares de motilidad, NAR y endósmosis durante 24h a +5°C y +15°C. Nuestros mejores resultados los encontramos a una temperatura de refrigeración de +15°C, es interesante resaltar que TesT y BesT no incorporaban proteínas consideradas crioprotectoras, por lo que el estudio deberá ampliarse en caso de distintas concentraciones de yema de huevo incorporadas al diluyente base. La temperatura de +5°C, teóricamente reduce el metabolismo espermático, prolongando la viabilidad de las dosis. En nuestro estudio, los mejores resultados se obtienen a +15°C, dado que esta temperatura no implica la adición de proteínas que en ningún momento se incorporaron a los diluyentes amino-orgánicos. Las diferencias encontradas entre ambas temperaturas, para todos los parámetros observados, son menores en el caso de la leche descremada y se acentúan para el TesT y BesT.

CONCLUSIÓN

Del estudio de los diluyentes TesT, leche descremada y BesT para la refrigeración de semen de morueco a 5 y 15°C durante 48 horas podemos llegar a concluir que la leche descremada se comporta como el diluyente que mantiene mejor la viabilidad espermática durante las primeras 24h, si bien los diluyentes TesT y BesT sirven como medios de refrigeración alternativos y mejorantes de la viabilidad espermática para períodos mas largos de tiempo.

BIBLIOGRAFÍA

Azawi O.I., AL-Dahash S.Y.A. and Juma F.T. (1993) "Effect of different diluents on Shami goat semen". Small Rumiant Research, 9: 347-352.

Dunner S. y Vázquez I. (1991) "Effets de miliensc de conservation a base de substances amino-organiques sur la qualite de la semence de bouc mesuree "in vitro" apres conservation a +5°C y +15°C". Arch. Zootc. 40: 391-401.

Colas G. (1975) "Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep-frozen ram semen". J. Reprod. Fertil., 42: 277-285.

Pintado B., Pérez B. y Gil L (1991) "Efecto de 5 diluyentes en la conservación in vitro de semen de macho cabrío verato". IV Jornadas sobre Producción Animal. ITEA. Vol. Extra, N°II, Tomo I, 31-34.

Vázquez I., García C.,Garde J., García Botey C. y del Real M. (1990) "Influencia de la dilución en la motilidad, morfoanomalías y estado del acrosoma a 4 y 24 horas en esperma refrigerado de morueco a 15°C y 5°C". 5ª Jornadas Internacionales de Reproducción Animal e Inseminación Artificial. Zaragoza, 14 al 17 de Junio, 189-195.