ESTUDIO COMPARATIVO (*IN VITRO* E *IN VIVO*) DE TRES METODOLOGÍAS PARA LA CRIOCONSERVACIÓN DEL SEMEN DE MORUECO

[*]Manso A, [**]Anel E, [*]Anel L, [*]Carbajo M, [***]Boixo C, [****]Olmedo JA, [*]Domínguez JC y [*****]Álvarez M

[*]Dpto. Patología Animal: Sanidad (Resproducción y Obstetricia)
[*****]Dpto. Biología Celular y Anatomía. Universidad de León. Campus Vegazana. León.
[**]ANCHE [***]CENSYRA [****]Diputación de Valladolid

Este trabajo ha sido financiado en parte por : CICYT (GAN 90-0975), Diputación de Valladolid. Caja de Ahorros de Burgos, ANCHE y Junta de Castilla y León.

INTRODUCCIÓN

En la especie ovina, la inseminación artificial se realiza principalmente con semen fresco o refrigerado, pero se considera que al igual que en el ganado vacuno, es necesaria la utilización del semen congelado para el desarrollo y difusión de esta técnica de reproducción asistida. Los tres aspectos de mayor importancia para conseguir una buena calidad del semen descongelado son: la elección de los machos más adecuados, el desarrollo de los sistemas de dilución del semen y el estudio de los métodos de enfriamiento del semen.

En este trabajo hemos valorado, mediante pruebas de contrastación seminal y pruebas de fertilidad, dosis seminales procesadas por los métodos descritos por Vázquez (1988), Fiser y Fairfull (1989) y Anel et al. (1993), que permiten conservar el material seminal a largo plazo. Esta experiencia constituye el resultado final de un trabajo cuyas primeras aportaciones se comunicaron en las V Jornadas de Producción Animal celebradas en Zaragoza en 1993.

MATERIAL Y MÉTODOS

La recogida seminal se realizó en cuatro moruecos adultos de raza Churra durante el mes de Diciembre. Los eyaculados válidos (Anel et al., 1993) de cada macho se mezclaron, se dividieron en tres alícuotas y, cada una de ellas sufrió un tratamiento distinto para su congelación. El primer grupo (FI) se congeló siguiendo el método descrito por Fiser y Fairfull en 1989, para el segundo (IV) se utilizó el método desarrollado por Vázquez en 1988 (IV) y, para el tercero (UL), el método utilizado en la Universidad de León (Anel et al., 1993). Para cada grupo se realizaron cinco congelaciones de los cuatro machos que se emplearon en la prueba, congelándose al día un mínimo de 17 dosis de cada uno de los machos para cada grupo experimental. Con objeto de mantener unas condiciones uniformes para los tres métodos, se adaptó el descrito por Fiser y Fairfull (1989) para alcanzar similar concentración espermática final en los tres casos (100 x 10^6 espermatozoides/ml).

Para la valoración *in vitro* se descongelaron (Anel et al., 1993) 3 pajuelas de cada, mezclándose a continuación. Se ralizaron tres pruebas: estimación de la motilidad indívidual y progresiva utilizando un analizador automático de motilidad (Hamilton Thorn Research, HTM-C, versión 7.4G), endósmosis celular (Vázquez, 1980) y valoración de la integridad acrosómica (Pursel y Johnson, 1974). Dicha contrastación se realizó previamente a la congelación, a los cinco minutos de la descongelación y tras realizar el test de termorresistencia descrito por Fiser et al. (1981).

La inseminación artificial, mediante la técnica laparoscópica (Anel et al., 1992), se practicó en 451 hembras ovinas de raza Churra pertenecientes a un mismo rebaño, en idénticas condiciones de nutrición y manejo, sometidas previamente a un tratamiento de inducción y sincronización del estro (FGA + PMSG). El semen se aplicó a las 64 horas de la retirada de las esponjas en el caso de las ovejas y a las 72 horas en el caso de las corderas. Las dosis de los tres grupos experimentales se distribuyeron de forma aleatoria, inseminándose 151 hembras con el Grupo FI, 152 con el Grupo IV y 148 con el Grupo UL.

El diagnóstico de gestación se efectúo mediante ecografía a los 35 días de la inseminación y, se realizó un seguimiento hasta el momento del parto, considerándose animales con parto positivo los que paren entre los días 141 y 155 a partir de la fecha de inseminación artificial.

Los datos fueron analizados mediante técnicas mínimo cuadráticas utilizando los procedimientos GLM del SAS (SAS, 1988).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos *in vitro* y los de la prueba de campo, evaluada mediante la fertilidad (Tabla nº 1. Gráficas 1, 2, 3, 4 y 5), indican que el método UL para la diluyoconservación del semen ovino consigue una mejor supervivencia espermática tras los procesos de congelación y descongelación.

Al valorar la capacidad cinética de los espermatozoides observamos que con el método UL se obtienen, en la mayoría de las determinaciones, resultados significativamente mejores ($p < 0,05$),

En los análisis destinados a la valoración de la integridad de las membranas celulares se observa que este método proporciona resultados de endósmosis significativamente mejores ($p < 0,05$), no existiendo diferencias ($p > 0,05$) entre los tres métodos al estudiar la integridad acrosómica.

El diluyente UL presenta una concentración de yema de huevo superior (10%) frente a los diluyentes IV y FI (6%), lo que podría explicar los mejores resultados de motilidad de acuerdo con Abdelhakeam et al. (1991a) quienes señalan que al incrementar la proporción de yema de huevo en el diluyente aumentaría la capacidad cinética del semen.

Tabla nº 1. Resultados de las pruebas de contrastación seminal y de fertilidad.

	Mot. individual (%)			Mot. progresiva (%)			Endosmosis (%)		Acrosomas (%)		Fertilidad		
	Prec	5'	60'	Prec	5'	60'	5'	60'	5'	60'	nº IA	nºges	%
FI	84,31 ± 0,43 a	66,3 ± 1,42 b	64,61 ± 1,42 b	39,98 ± 0,90 b	34,17 ± 1,55 b	35,05 ± 1,43	50,88 ± 1,22 b	50,47 ± 1,34	37,30 ± 1,15	32,27 ± 1,04	151	76	50,70 ± 0,04 b
IV	87,60 ± 0,40 b	66,41 ± 1,44 b	68,40 ± 1,60 a	56,07 ± 0.83 a	35,98 ± 1,59 a,b	36,40 ± 1,50	48,73 ± 1,18 b	49,32 ± 1,30	35,89 ± 1,12	32,20 ± 1,10	152	90	59,25 ± 0,04 a,b
UL	89,10 ± 0,42 c	72,86 ± 1,47 a	69,69 ± 1,59 a	56,64 ± 0,87 a	38,18 ± 1,60 a	37,78 ± 1,47	53,99 ± 1,24 a	51,78 ± 1,36	34,92 ± 1,17	34,69 ± 1,06	148	96	64,84 ± 0,04 a

a,b,c. En la misma columna, índices distintos indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Uno de los inconvenientes que presentan los métodos que utilizan vapores de nitrógeno (IV) es la poca uniformidad que se consigue de unas muestras a otras en la velocidad de descenso de temperatura, ya que las curvas de congelación varían de una muestra a otra y entre distintas

congelaciones (Graham, 1978). Este inconveniente no se produce cuando se utilizan biocongeladores programables (FI, UL), en los cuales las curvas de congelación son mucho más uniformes (Pontbriand et al., 1989). Según Watson (1990), la congelación provoca lesiones en la estructura de las membranas celulares.

Gráf 1.- Motilidad individual (%).



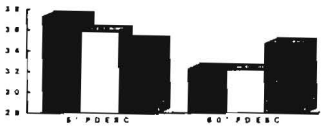
Gráf 2.- Motilidad progresiva (%).



Gráf 3.- Endósmosis (%).



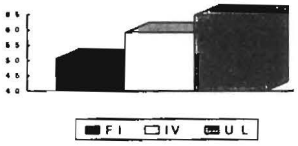
Gráfica 4.-Acrosomas (%).



La utilización de sistemas de descenso de la temperatura que posean un mayor control sobre dicho proceso, como es el caso de los biocongeladores programables, podría dar como resultado que las células sufrieran menores daños en su membrana. Por otra parte, existe una relación entre los diversos componentes del diluyente empleado, así como entre éstos y el sistema de congelación utilizado. Fiser y Fairfull (1986a) indican que el porcentaje idóneo de glicerol (4-6%) en el diluyente varía en dependencia de la velocidad de descenso de la temperatura (10-100°C/min).

Por último, el método UL presenta los mejores resultados de fertilidad, seguido por el método IV y por el FI, si bien las diferencias resultan estadísticamente significativas ($p<0,05$) sólo con relación al método FI.

Gráfica 5.- Fertilidad (%)



BIBLIOGRAFÍA

Abdelhakeam AA, Graham EF y Vázquez IA. (1991). *Cryobiology* 28 (1):36-42.

Anel E, Manso A, Anel L, Boixo JC, Álvarez M, Domínguez JC y Carbajo M. (1993). *V Jorn. sobre producción animal (AIDA),* Zaragoza, ITEA Vol extra nº 12 Tomo II:495-497.

Fiser PS, Ainsworth L y Langford GA. (1981). *Cryobiology* 18:399-403.

Fiser PS y Fairfull RW. (1986). *Theriogenology* 25 (3):473-484.

Fiser PS y Fairfull RW. (1989). *Cryobiology* 26:64-69.

Pursel V y Johnson LA. (1974). *Theriogenology* 1 (2):63-68.

Vázquez I. (1980). *Tesis doctoral.* Universidad de León.

Vázquez I. (1988). *In Proc. 11th Int. Cong. Anim. Repr. and AI.* Dublin. Ireland. Vol 3: 305.

Watson PF. (1990). En: *Marshall's physiology of reproduction: Reproduction in the male.* pp.:747-869.