CALIDAD SEMINAL Y TESTAJE DE SEMENTALES MEDIANTE DISTRIBUCION EN CONTRACORRIENTE CON CENTRIFUGACION EN SISTEMAS ACUOSOS DE BIFASE

R. Pérez-Pé, M. Ollero, J.A. Cebrián-Pérez y T. Muiño-Blanco. Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular y Celular. Fac. Veterinaria. Universidad de Zaragoza.

INTRODUCCIÓN

Con la expansión del uso de la inseminación artificial en la producción animal resulta de gran interés disponer de nuevos métodos para predecir la capacidad de fertilización de las dosis seminales, tanto de semen fresco como congelado. La mayoría de los métodos convencionales usados son de poca fiabilidad en la predicción de la fertilidad, debido en parte al bajo número de espermatozoides analizados y por otro lado a la estimación subjetiva de ciertos parámetros. Así, los análisis clásicos para evaluar la calidad seminal se basan en observaciones al microscopio que proporcionan porcentajes de motilidad y de espermatozoides morfológicamente normales, estimaciones subjetivas y sin correlación con los índices de fertilidad. Así mismo, la fiabilidad de estos métodos ha sido bastante cuestionada, sobre todo en muestras previamente congeladas (1, 2, 3), ya que recientes estudios demuestran que algunos espermatozoides, aunque mótiles, muestran daño en su membrana plasmática, siendo, por tanto, no funcionales (4).

En este trabajo se ha intentado establecer una correlación entre el porcentaje de fertilidad *in vivo* en ovino y distintos parámetros obtenidos tras el estudio de las dosis seminales por distribucion en contracorriente con centrifugación (CCCD).

MATERIAL Y MÉTODOS

Como material biológico se empleó semen ovino procedente de moruecos de raza "Rasa Aragonesa" pertenecientes al Centro de Selección y Reproducción Animal de la Dirección General de Aragón (CENSYRA). Las extracciones se llevaron a cabo por personal técnico especializado de dicho centro mediante vagina artificial. El semen se mantuvo a 35°C en baño de agua hasta su llegada al laboratorio, momento en el que se determinó su motilidad, viabilidad y concentración como se describe previamente (5). El plasma seminal se eliminó por filtración en filtros Millipore de 5 μm de poro y las células se resuspendieron en medio de bifase. Sobre estas muestras se realizaron cromatografías de reparto en una unidad de distribución en contracorriente con centrifugación (CCCD). El sistema bifásico utilizado estaba compuesto por: Dextrano T-500 5,5% (p/p), PEG 6000 2% (p/p), Ficoll 400 10,5% (p/p), sacarosa 0,25 M, EGTA 0,1 mM, tampón fosfato sódico 4mM (pH 7,5), 10% (v/v) 10x tampón Hepes (glucosa 50 mM, Hepes 100 mM, KOH 20 mM; pH 7,5). Se realizaron 29 transferencias analizando dos muestras simultaneamente, y se cargaron aproximadamente 1,25 $x10^8$ células en las cámaras 0 y 30 de la unidad de CCCD.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para el estudio de los resultados, las muestras seminales se dividieron en tres categorías segun los datos de fertilidad *in vivo* : semen de fertilidad alta (mayor de 50%), de fertilidad media (50%) y de fertilidad baja (menor 50%). Tras la CCCD se efectuó el recuento de espermatozoides en cada cámara, se determinó la viabilidad en las fracciones indicadas y se representó el perfil de cada una de las muestras.

Es de resaltar la gran cantidad de variables que pueden afectar a la fertilidad como son: el manejo del semen y la posterior inseminación, los índices de fertilidad de las hembras inseminadas, la distancia al punto de inseminación, etcétera. Sin embargo, y a pesar de estas limitaciones y de que el número de ensayos realizados hasta el momento ha sido bajo (158 hembras inseminadas), de un total de 17 dosis seminales estudiadas, en

13 de ellas (76,5 %) se encontró correlación entre los datos de fertilidad *in vivo* y parámetros derivados del estudio del perfil obtenido tras CCCD, como son ***el área de viabilidad*** y ***la heterogeneidad*** del perfil.

Las muestras que obtuvieron un mayor porcentaje de fertilidad tras la inseminación artificial fueron aquellas que mostraron conjuntamente un gran área de viabilidad (> 45%) y una marcada heterogeneidad en su perfil de CCCD (Fig. 1).

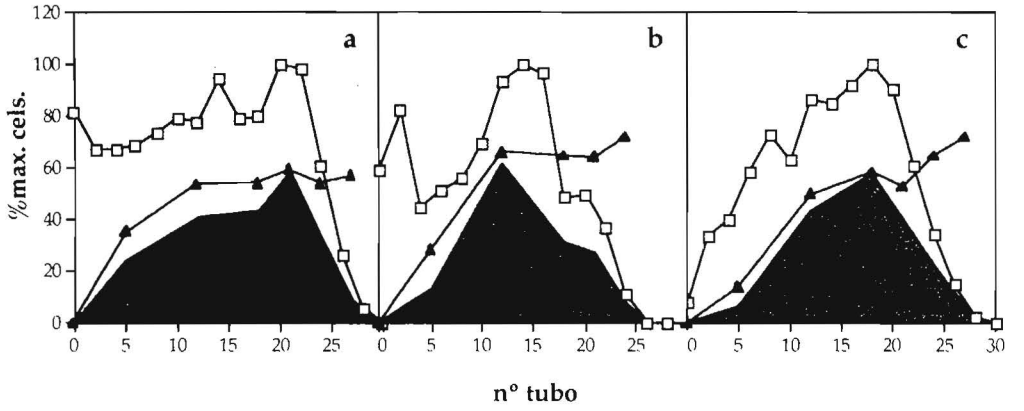


Fig. 1.- Perfiles de distribución en contracorriente con centrifugación de muestras de semen ovino fresco de alta fertilidad *in vivo*. (a) 70% , (b) 69,2% y (c) 62,5% (□) % de células en cada cámara respecto al máximo, (▲) % de células viables en cada cámara, ■ distribución de las células viables totales.

En la Fig. 2 se reflejan perfiles representativos de muestras de fertilidad media en los que se observa una disminución de la heterogeneidad celular y, especialmente, del área de viabilidad, que representa menos del 30% del área total.

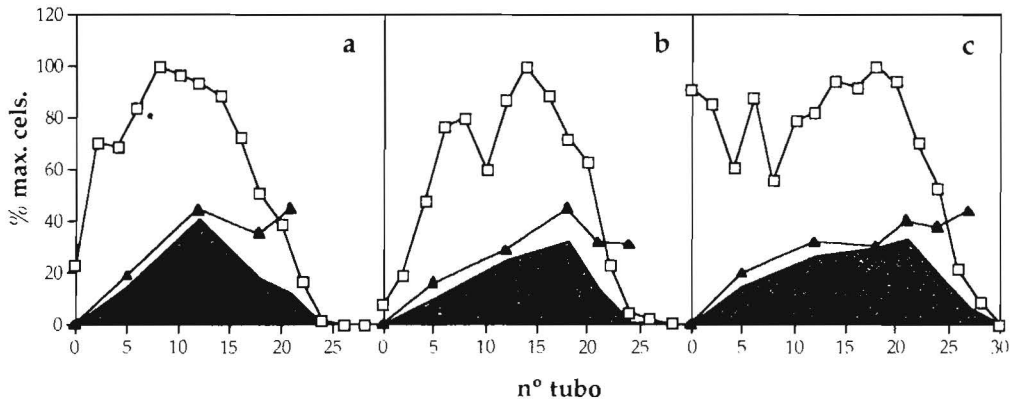


Fig. 2.- Perfiles de distribución en contracorriente con centrifugación de muestras de semen ovino fresco de fertilidad media *in vivo* (50%). (□) % de células en cada cámara respecto al máximo, (▲) % de células viables en cada cámara, ■ distribución de las células viables totales.

Muestras con índices de fertilidad bajos (menos del 50%) presentaban un área de viabilidad muy pequeña aunque sus perfiles fuesen heterogéneos (Fig. 3).

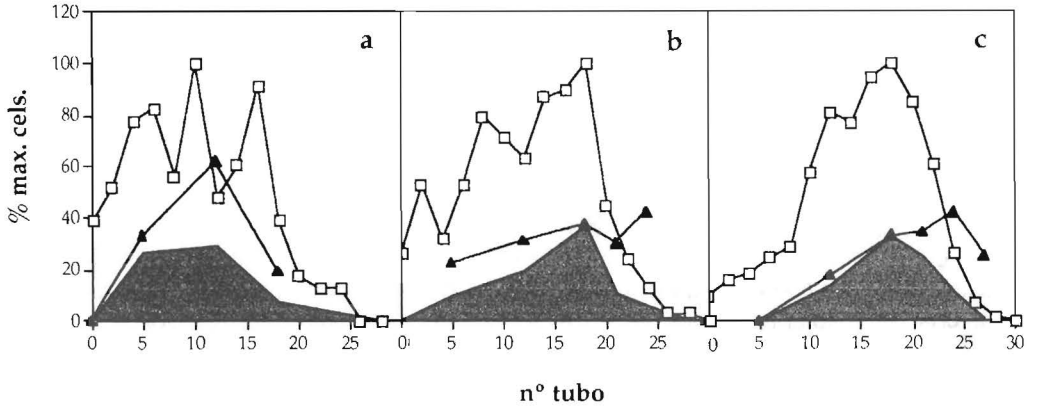


Fig. 3.-Perfiles de distribución en contracorriente con centrifugación de muestras de semen ovino fresco de fertilidad baja *in vivo*. (a) 45,45%, (b) 40% y (c) 38,9%. (□) % de células en cada cámara respecto al máximo, (▲) % de células viables en cada cámara, ■ distribución de las células viables totales.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que los perfiles de CCCD podrían usarse como elemento predictivo de la calidad espermática de sementales ovinos. El número total de células viables recuperadas y la heterogeneidad del perfil de distribución son los dos parámetros indicativos de la calidad seminal. La importancia de la heterogeneidad del perfil, indicativa de la existencia de varias poblaciones espermáticas, ha sido puesta de manifiesto recientemente por nuestro equipo de investigación (6) y concuerda con resultados de Amann según el cual una población espermática no homogenea tiene mayor potencial de fertilización que una homogenea en un intervalo dado, pero impredecible, tras la eyaculación (7). Desde el punto de vista estructural y funcional, no todos los espermatozoides que componen un eyaculado son iguales, al menos en aquellas especies de mamíferos en que existe una diferencia de tiempo variable entre la cópula y la ovulación, como por ejemplo la especie ovina. Esta diferenciación podría considerarse como una estrategia evolutiva seguida por estas especies cuya finalidad sería que cada grupo de espermatozoides alcance la capacitación en un momento diferente, maximizando la probabilidad de que ésta ocurra en las inmediaciones del ovocito y asegurando así el éxito de la fecundación.

BIBLIOGRAFIA

[1].-Zalewski, W. and Andersen Berg, K. (1983) *Zuchthyg.* **18**, 22-26.
[2].-Ras, A.V.N., Haranath, G.B., Sekharam, G.S. and Rao, R. (1986) *An.Reprod.Sci.* **12**, 123-129.
[3].-Kjaestad, H., Ropstad, E. and Berg, K.A. (1993) *Acta Vet.Scan.* **34**, 299-303.
[4].-Valcárcel, A., de lasHeras, M.A., Pérez, L., Moses, D.F. and Baldassarre, H. (1994) *Theriogenology* **41**, 483-489..
[5].-Pascual, M.L., Muiño-Blanco, T., Cebrián-Pérez, J.A. , López-Pérez, M.J. (1993) *J.Chrom. B* **617**, 51-57
[6].-Ollero, M., Muiño-Blanco, T., López-Pérez, M.J. and Cebrián-Pérez, J.A. (1996) *J. Chrom. B* **680**, 157-164.
[7].-Amann, R.P., Hammerstedt, R.H. and Veeramachaneni, D.N.R. (1993) *Reprod. Fert. Develop.* **5**, 361-381.

Este trabajo ha sido realizado gracias a la financiación del proyecto AGF 94-0614 (C.I.C.Y.T.)