EFECTO DEL TIPO DE DILUYENTE DE CONGELACION SOBRE LAS CARACTERISTICAS SEMINALES OVINAS

Quintín, F.J.; Sevilla, E.; Vijil, E.; Pastor, F.
Centro de Selección y Reproducción Animal (CENSYRA)-Movera
Diputación General de Aragón

INTRODUCCION

Los Programas de Selección Genética por prolificidad llevados a cabo en la Comunidad Autónoma de Aragón desarrollan planes de Inseminación Artificial Ovina (IAO) mediante la utilización de semen refrigerado diluído en leche descremada (Colas et al., 1.973) o medio TRIS-TES con un 6% de yema de huevo (Vázquez et al., 1.988). Sin embargo, la disponibilidad de machos mejorantes y el interés de intensificar su actuación, implica la necesidad de almacenar su semen durante períodos indefinidos de tiempo manteniendo sin variaciones su poder fecundante. Dicha posibilidad se ve dificultada por la necesidad de conjugar una serie de factores tales como el diluyente utilizado, el grado de dilución a realizar, el porcentaje de crioprotector, la presión osmótica, la curva de congelación y descongelación y el control de calidad seminal (Guerin, 1.990). En este sentido, el objetivo de esta comunicación consiste en estudiar la influencia del diluyente descrito por Fiser et al. (1.987) y el diluyente desarrollado por Vázquez et al. (1.988) sobre las características del semen ovino congelado, con el fin de establecer el más adecuado para su uso en las condiciones específicas en que se desarrollan los Programas de Mejora de la raza Rasa Aragonesa.

MATERIAL Y METODOS

Se han utilizado 8 moruecos de raza Rasa Aragonesa de 3,5 años de edad, a los que se les extrajo en fotoperiodo decreciente 4 eyaculados mediante vagina artificial. Dichos eyaculados se dividían en dos alícuotas y se congelaban respectivamente mediante la técnica desarrollada por Fiser et al. (1.987) y la descrita por Vázquez et al. (1.988). El resultado de dichas técnicas se estudió mediante la contrastación seminal valorando la motilidad individual, por observación subjetiva en microscopio óptico, y determinando la viabilidad espermática y el estado del acrosoma, a través del método de Ioduro de propidio-diacetato de carboxifluoresceína en microscopio de fluorescencia. La calidad espermática se analizó tanto en semen puro como en el semen refrigerado a 5ºC durante 4 horas así como en el semen descongelado a 35ºC durante 21 segundos a las 0 y a las 2 horas post-descongelación.

Los resultados se han estudiado estadísticamente mediante un Análisis de Varianza de dos factores del programa Micrososoft Excel 5.0 para Microsoft Windows 3.1

RESULTADOS

El porcentaje de motilidad individual utilizando tanto el diluyente de Fiser et al. (1.987) como el de Vázquez et al. (1.988) para la congelación de semen ovino es muy similar ($p < 0.05$) tanto en el semen refrigerado a 5ºC durante 4 horas (72,4±1,12 *vs* 70,4±1,49) como en el descongelado (27,6±2,74 *vs* 25,6±2,43) y tras un periodo de incubación de 2 horas a 37ºC (15,2±1,76 *vs* 17,2±1,85), no existiendo diferencia, así mismo, entre moruecos.

Respecto al porcentaje de viabilidad, obtenemos siempre resultados significativamente mejores ($p < 0.05$) aplicando la técnica de Fiser et al. (1.987) tanto en el semen refrigerado (58,92±2,69 *vs* 42,32±2,81) como tras la descongelación (19,92±1,83 *vs* 10,56±1,2), manteniendo también una mejor viabilidad tras el período de incubación (15,95±1,81 *vs* 9,88±1,03). Al igual que en motilidad individual, los resultados de viabilidad no se ven afectados por el semental.

En cuanto al porcentaje de acrosomas normales, si bien no hay estadísticamente una diferencia significativa entre diluyentes (74,68±2,17 *vs* 66±3,29) ($p < 0.05$), el proceso de congelación afecta de forma definitiva la membrana acrosómica evidenciando diferencias significativas ($p < 0.05$) tras la descongelación (45,48±3,31 *vs* 29,88±2,97) así como tras el mantenimiento en incubación durante 2 horas (34,2±3 *vs* 21,88±2,42), no influyendo en estos resultados, como en los parámetros anteriores, el reproductor.

CUADRO 1.- Resultados de contrastación seminal ovina utilizando distintos diluyentes para la crio-conservación (media ± error típico)

Semen	% Motilidad Individual		% Viabilidad		% Acrosomas normales	
	Fiser et al.	Vazquez et al.	Fiser et al.	Vazquez et al.	Fiser et al.	Vazquez et al.
Refrigerado	72,4 ± 1,12	70,4 ± 1,49	58,92 ± 2,69	42,32 ± 2,81	74,68 ± 2,17	66 ± 3,29
0 horas	27,6 ± 2,74	25,6 ± 2,43	19,92 ± 1,83	10,56 ± 1,2	45,48 ± 3,31	29,88 ± 2,97
2 horas	15,2 ± 1,76	17,2 ± 1,85	15,95 ± 1,81	9,88 ± 1,03	34,2 ± 3	21,88 ± 2,42

DISCUSION

El resultado de motilidad individual que hemos obtenido con el diluyente de Fiser et al. (1.987), en semen contrastado inmediatamente tras la descongelación, es similar al calculado por Ollero et al. (1.998): 27,6±2,74 y 20±7,0, respectivamente; en cuanto a la técnica desarrollada por Vázquez et al. (1.988) observamos el 25,6±2,43, muy superior al 5±0 descrito por Ollero et al. (1.998). No obstante, nuestros resultados son así mismo inferiores al 50% calculado por García Artiga et al. (1.993). En cuanto a la pérdida del 45% de motilidad observada entre el semen refrigerado y el semen analizado inmediatamente tras la descongelación nuestros resultados concuerdan con las conclusiones de Arthur et al. (1.991) que sitúan la pérdida en ganado vacuno en el 50% y las de Anzar et al. (1.995) que observan disminuciones diferentes durante la congelación de semen bovino según que el eyaculado haya sido previamente filtrado o no en una columna de intercambio iónico Sephadex (34% y 59,54%, respectivamente). La pérdida de motilidad de

aproximadamente el 8-12% tras el período de incubación es similar a los resultados que obtienen Fernández Abella et al. (1.992) en su estudio sobre tipos de diluyentes y métodos de congelación.

El 10,56±1,2% de viabilidad que se alcanza en nuestro estudio utilizando el diluyente de Vázquez et al. (1.988) es similar al 12±1,6% descrito por Ollero et al. (1.998) aunque estos autores, cuando aplican la metodología de Fiser et al. (1.987) determinan una viabilidad de 28±3,7%, superior al 19,92±1,83% obtenido en nuestro trabajo.

En cuanto al porcentaje de acrosomas normales, los resultados son semejantes a los de viabilidad en el sentido que utilizando el diluyente de Vázquez et al. (1.988) obtenemos niveles similares a los de Ollero et al. (1.998) (29,88±2,97 y 29±5,0, respectivamente) e inferior al 49,35±1,42 indicado por García Artiga et al. (1.993). Tras la aplicación de la técnica de Fiser et al. (1.987) el porcentaje de acrosomas normales (45,48±3,31) difiere del determinado por Ollero et al. (1.998) (56±9,5).

CONCLUSIONES

En nuestras condiciones específicas de trabajo, el diluyente de Fiser et al. (1.987) determina mejores resultados en la contrastación laboratorial post-descongelación del semen ovino.

BIBLIOGRAFIA

- Anzar, M.; Graham, E.F. (1.995) "Effect of filtration on post-thaw quality of bull semen" Theriogenology 43: 439-449
- Arthur, G.H.; Noake, D.E.; Pearson H. (1.991) "Reproducción y Obstetricia en Veterinaria" 6ª Ed. Mcgraw-Hill Interamer.
- Colas, G.; Thimonier, J.; Courot, M.; Ortavant, R. (1.973) "Fertilité, prolifilité et fecondité pendant la saison sexuelle des brebis inseminées artificiellement aprés traitement a l'acetate de fluorogestone" Ann. Zootech 22: 441-451
- Fernández Abella, D.; Pizzarrosa, O.; Villegas, N. (1.992) "Efecto del tipo de diluyente y método de congelación sobre la fertilidad del semen ovino" ITEA 88A nº 3: 191-196
- Fiser, P.S.; Ainsworth, L.; Fairfull, R.V. (1.987) "Evaluation of a new diluent and different processing procedures for cryopreservation of ram semen" Theriogenology 28: 599-607
- García Artiga, C.; Vázquez, I.; Garde, J. (1.993) "Estudio "in vitro" de la viabilidad del semen congelado de morueco" Invest. Agr.: Prod. Sanid. Anim. Vol 8(1):33-43
- Guerin, Y. (1.990) "Méthodes de conservation de la semence ovine" El. & Ins. 236: 3-14
- Ollero, M.; Pérez-Pe, R.; Muiño-Blanco, T.; Cebrian-Pérez, J.A. (1.998) "Improvement of ram sperm cryopreservation protocols assessed by sperm quality parameters and heterogeneity analysis" Cryobiology 37: 1-12
- Vázquez, I.; Graham, E.F.; Martinez, F.; Alcaide, M.; Soriano, I. (1.988) "Fertility with frozen ram semen in Manchego sheep" 11th Inter. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem. Dublín 3:305