ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD FERTILIZANTE DE DOSIS SEMINALES DE MORUECOS DE *RASA ARAGONESA* MEDIANTE INSEMINACIÓN INTRAUTERINA

R. Pérez-Pé, J. I. Martí, O. Báguena, P. Grasa, *J. M. Lozano, *J. A. Abecia, *F. Forcada, J.A. Cebrián-Pérez y T. Muiño-Blanco.
Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular y Celular. *Dpto. de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza.

INTRODUCCIÓN

El empleo de nuevos métodos para predecir la capacidad de fertilización de las dosis seminales resulta de gran interés dada la expansión que está teniendo la inseminación artificial. La fiabilidad de los métodos de evaluación seminal *in vitro* ha sido bastante cuestionada, sobre todo en muestras previamente congeladas (1, 2, 3) ya que los análisis clásicos para evaluar la calidad seminal se basan en estimaciones a veces subjetivas y sin correlación con los índices de fertilidad.

En este trabajo se ha estudiado la capacidad fecundante de tres tipos de muestras de semen ovino, analizando las posibles correlaciones entre el porcentaje de fertilidad y distintos parámetros de calidad seminal. Así mismo, las dosis se han estudiado por cromatografía de reparto mediante distribución en contracorriente con centrifugación (CCCD) en un sistema acuoso de bifase.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se emplearon moruecos y ovejas pertenecientes a la Asociación Nacional de Criadores de Ganado selecto de la raza Rasa aragonesa (ANGRA), estabulados en las dependencias del SAIUZ. Las extracciones de semen se llevaron a cabo por personal técnico especializado de dicho servico 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, concentración y viabilidad como se describe previamente (4). La respuesta al HOS-test (5) y la funcionalidad mitocondrial (6) se valoraron como se describe previamente.

Se utilizó una muestra de semen no sometida a ningún tipo de selección llamada muestra"control" a partir de la cual se obtuvieron dos muestras seleccionadas y libres de plasma seminal mediante un método de "swim-up"/dextrano (7) . Las muestras "mHTF+" contienen $CaCl_2$ y HCO_3Na mientras que en las "mHTF-" se suprimieron ambos compuestos con objeto de retrasar la capacitación de los espermatozoides. Para la preparación de las muestras control, el semen se diluyó en PBS ajustando la concentración para igualarla a la de las muestras seleccionadas. La eliminación del medio para los experimentos de CCCD mediante filtración y el sistema bifásico utilizado se describe anteriormente (8). Se realizaron 29 transferencias analizando dos muestras simultaneamente, y se cargaron 1 $x10^8$ células en las cámaras 0 y 30 de la unidad de CCCD.

El tratamiento hormonal de las hembras se realizó con Ovagen (hormona folículo estimulante de extracto de pituitaria ovina) de Inmuno-chem. Prod. Ltd. y Chronogest (acetato de fluorogestona) de Intervet. La sincronización del celo y la recuperación de embriones y ovocitos se realizó como se describe (9). El intervalo entre la retirada de las esponjas y la inseminación fue de 52 horas, recomendado para inseminación intrauterina de ovejas en superovulación (9) y también otro

de 64 horas que permitiese unas posibilidades de sincronía diferentes y que es el recomendado para la inseminación intrauterina sin superovulación (9) .

RESULTADOS Y DISCUSION

Las dosis de semen seleccionadas mediante swim-up presentaron mayor calidad "in vitro" en cuanto a porcéntaje de células mótiles, viables y con funcionalidad mitocondrial. Los valores medios obtenidos para cada tipo de dosis seminal (Tabla 1) indican que las diferencias de motilidad entre el semen de partida (fresco o control) y las muestras obtenidas por swim-up fueron muy altamente significativas. La viabilidad aumenta significativamente en un 21,4% en el swim-up(+) y en un 23,9% en el swim-up(-). Así mismo, las diferencias entre la funcionalidad mitocondrial de la muestra control y las dos muestras de swim-up son muy significativas (P<0,01).

Tabla 1.- Media ± E. S. de los parámetros de calidad espermática determinados en las dosis control, swim-up+ y swim-up- (n= 18). Diferentes superíndices en columnas indican diferencias significativas (a,b: P<0,0001; c,d: P<0,05; e,f: P<0,01).

	Mótiles	HOS-test positivo	Viables	Mitocondria funcional
Control	48,6 ± 8,8^{a}	54,8 ± 12,5	71,9 ± 4,7^{c}	54,7 ± 7,9^{e}
Swim-up(+)	76,4 ± 3,1^{b}	63,1 ± 40,2	78,9 ± 4,9^{d}	65,7 ± 7,6^{f}
Swim-up(-)	74,6 ± 3,4^{b}	62,6 ± 47,1	79,9 ± 4,6^{d}	67,5 ± 7,9^{f}

Se realizaron 57 inseminaciones con los 3 tipos de muetras, de las que 21 fueron con dosis de semen control, 18 de semen swim-up(+) y 18 de semen swim-up(-). Los resultados reflejados en la Tabla 2 se corresponden con el número de cuerpos lúteos observados en el ovario y el número de embriones y de ovocitos recuperados en los cuernos uterinos a los 6 días de la inseminación. El número de cuerpos lúteos observados indica el número de ovulaciones producidas en los ovarios de cada hembra, mientras que los embriones y los ovocitos recuperados se corresponden con los éxitos y los fracasos de fecundación de los ovocitos liberados en la ovulación.

Tabla 2.- Resultados de las inseminaciones realizadas con cada protocolo y el total absoluto. CL= núm. cuerpos lúteos; Ovo = núm. ovocitos recuperados ; H = núm. de embriones.

	Control			Swim-up+			Swim-up-		
	CL	E	Ovo	CL	E	Ovo	CL	E	Ovo
Total	246	78	68	177	56	43	209	121	19
Protocolo 52 horas	67	1	38	55	7	22	68	46	6
Protocolo 64 horas	179	77	30	122	49	21	141	75	13

El semen de las muestras swim-up(-) mostró buena capacidad fertilizante con los dos protocolos, recuperándose un alto número de embriones con un promedio de 7,7 por inseminación para el protocolo de 52 horas y 6,2 para el de 64 horas. Los porcentajes de embriones por cuerpo lúteo fueron también altos: 67,7% en el de 52 horas y 53,2% en el de 64 horas.

Las diferencias observadas en el semen fresco y en el semen swim-up(+) entre los dos protocolos indicarían la asincronía del primero de ellos (52 horas), en el que la inseminación se encontraría adelantada al momento idóneo (como indicarían los resultados obtenidos al incrementar el intervalo en 12 horas más).

Además, y lo que es más importante, indicaría la baja resistencia temporal de ambos tipos de semen y por lo tanto su poca adecuación a protocolos de sincronización que no se encuentren perfectamente ajustados. Por contra, el semen swim-up(-) obtiene resultados buenos con ambos protocolos, lo que indicaría una mayor capacidad de resistencia en el tiempo; esto le confiere una mayor adecuación para su uso práctico, a nivel de campo, donde estas condiciones no son controladas de forma tan exhaustiva como en la investigación.

El análisis mediante CCCD indica importantes diferencias superficiales entre las muestras utilizadas. En las no filtradas, se encontró una alta correlación entre los valores de fertilidad y el área de viabilidad (nº total de células viables) de las cámaras 10-29 tanto en valor absoluto como respecto al nº total de células de esa fracción. Cuando el plasma seminal se eliminó por filtración, aumentó la heterogeneidad del perfil, que se desplazó a la izquierda, y disminuyó el área de viabilidad. Se encontró correlación significativa entre la fertilidad y el área total del perfil, así como con el área total de las cámaras 0-9. Estos resultados indican

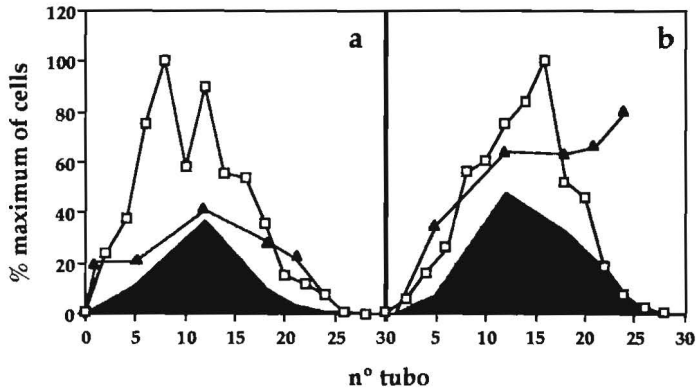


Fig. 1.- Perfil de CCCD de una muestra de semen seleccionada pro swim-up(-) filtrada (a) y no filtrada (b). (□) % de células en cada cámara respecto al máximo, (▲) % de células viables en cada cámara, ■ distribución de las células viables totales.

que los perfiles de CCCD podrían usarse como elemento predictivo de la calidad espermática de sementales ovinos. La eliminación del plasma seminal no parece ser un requisito necesario para el uso de la CCCD como parámetro predictivo de la fertilidad.

AGRADECIMIENTOS: este trabajo ha sido financiado por la DGA a través del Proyecto 03/96 y DGICYT a través de los Proyectos AGF-97-0919 y 95-0032-0P

BIBLIOGRAFIA

1.- W. Zalewski and K. Andersen Berg, Zuchthyg., (1983), 18, 22.
2.- A. V. N. Ras, G. B. Haranath, G. S. Sekharam and R. Rao, An. Reprod. Sci., (1986), 12, 123.
3.- H. Kjaestad, E. Ropstad and K. A. Berg, Acta Vet. Scan., (1993), 34, 299.
4.- M. L. Pascual, T. Muiño-Blanco, J. A. Cebrián-Pérez and M.López-Pérez, J. Chrom., (1993), 617, 51.
5.- C. García Artiga, 7th International Meeting on Animal Reproduction, (1994), 77.
6.- D. P. Windsor and I. G. White, Mol. Reprod. Dev., (1993), 36, 354.
7.-N. García L., M. Ollero, T. Muiño-Blanco and J. A. Cebrián-Pérez, Theriogenology, (1996), 46, 141.
8.- M. Ollero, J. A. Cebrián-Pérez and T. Muiño-Blanco, Reprod. Fertil. Dev., (1997), 9, 381.
9.- FAO, Roma, (1995).