ITEA (2003), Vol. **Extra N.º 24.** Tomo I, 309-311

PARÁMETROS DE CALIDAD Y CAPACIDAD FECUNDANTE DE DOSIS ESPERMÁTICAS SELECCIONADAS MEDIANTE DISTINTOS PROCESOS DE SWIM-UP

J.I. Martí, J.A. Cebrián-Pérez y T. Muiño-Blanco

Dpto de Bioquímica y Biología Molecular y Celular. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza

INTRODUCCIÓN

Las principales ventajas de la IA son aquellas derivadas de la no presencia de los machos en la fecundación de las hembras y de la posibilidad de fragmentar cada eyaculado en más de una dosis seminal (Barrilet y Elsen, 1979; Maxwell, 1984). Pero los resultados de fertilidad en ganado ovino no son tan buenos como en el bovino, ya que las características anatómicas del aparato genital de la oveja y especialmente del cervix (Dun, 1955; Bunch y Ellsworth, 1981; Moré, 1984; Ali, 1987; Halbert y cols., 1990), hacen prácticamente imposible el paso del mismo por los instrumentos utilizados para la IA. A esto se une la disminución del transporte espermático provocado por el tratamiento de sincronización (Quinlivan y Robinson, 1969; Hawk, 1983) y el envejecimiento de los espermatozoides en el tracto genital de la hembra (Maxwell y Salamon, 1993).

Los espermatozoides que componen un eyaculado presentan una gran heterogeneidad funcional y estructural que se manifiesta, en una muestra seminal, por la existencia de varias subpoblaciones espermáticas, y gracias a la cual se incrementa la posibilidad de fecundar al ovocito. Aunque se han diseñado diversos métodos que permiten separar espermatozoides de alta calidad, no se ha comprobado su utilidad *in vivo*, es decir, en inseminación artificial en campo. Por ello se planteó la posibilidad de realizar inseminación artificial cervical en condiciones de campo con muestras enriquecidas en espermatozoides de alta calidad *in vitro*.

MATERIAL Y MÉTODOS

En el presente trabajo se ha empleado semen ovino obtenido a partir de 6 moruecos de entre 2 y 4 años de edad, pertenecientes a la Asociación Nacional de Ganaderos de la raza *Rasa Aragonesa* (ANGRA), mantenidos en el SAEA de la Universidad de Zaragoza, con un régimen de tres extracciones semanales, dos eyaculados por morueco, y se utilizó la mezcla del primer y segundo eyaculado de cada macho para determinar los parámetros de fertilidad y prolificidad individual, de acuerdo al esquema de selección de la raza Rasa Aragonesa seguido en ANGRA. Se han utilizado tres métodos de selección de espermatozoides mediante el proceso de *swim-up*.

Swim-up Standard

Es el proceso puesto a punto en nuestro laboratorio por García-López y cols. (1996), basado en el descrito por Álvarez para espermatozoides humanos (Álvarez y cols., 1993). En este trabajo se utilizó el medio MS ya descrito (García-López, 1996) desprovisto de $CaCl_2$ y el $NaHCO_3$ para evitar la capacitación de los espermatozoides y aumentar así su supervivencia.

El proceso de *swim-up* se realizó partiendo de 500 µl de semen, retirando los cuatro sobrenadantes a intervalos de 15 min, desechando el primer sobrenadante, ya que aún contiene restos de componentes del plasma seminal, y se trabajó posteriormente con la mezcla de los tres restantes.

Swim-up Mejorado

Se decidió variar el protocolo, con el fin de incrementar la concentración de espermatozoides obtenidos, aumentando el volumen de semen utilizado, 750 µl en lugar de 500 µl, y el tiempo de incubación (20 min) para la obtención del primer sobrenadante siendo el medio utilizado y el resto del proceso igual al descrito para el *swim-up* Standard.

Swim-up en medio Leche-Yema

A partir de los resultados obtenidos en un trabajo de supervivencia en diferentes medios (Martí y cols., 2003) se determinó que el medio Leche-Yema era más idóneo que el MS para la conservación de la calidad de los espermatozoides en el tiempo a 15ºC, y se puso a punto el proceso de *swim-up* en dicho medio, que se trata de la fracción 1 de un medio usado para la congelación de semen ovino (Söderquist y cols., 1997). La única modificación respecto al procedimiento de *swim-up* Mejorado fue la reducción del tiempo de incubación para la obtención del primer sobrenadante a 10 min.

La motilidad individual progresiva se evaluó en microscopio de contraste de fases con una platina de 37ºC. La viabilidad espermática se determinó mediante la tinción con diacetato de carboxifluoresceina y ioduro de propidio (Harrison y Vickers, 1990).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En primer lugar se compararon los parámetros de calidad espermática del semen completo y de las muestras obtenidas mediante *swim-up* (se denominarán como **inicial** y ***swim-up***, respectivamente) para comprobar si existían diferencias entre las muestras obtenidas por los distintos procesos de *swim-up*. Además, se realizó un estudio de la viabilidad de las dosis espermáticas en el mismo momento de realizar la inseminación artificial. Para ello, tras la inseminación de las ovejas, a partir de una pajuela que había estado en las mismas condiciones que las que habían sido aplicadas a las hembras, se tomaba una alicuota que se mezclaba con los dos colorantes de la tinción de viabilidad, valorándose a la llegada al laboratorio.

No se encontraron diferencias importantes en los parámetros de calidad analizados en los tres tipos de muestra. Los valores de motlidad y viabilidad de las muestras antes y después de los distintos procesos de *swim-up* no presentaron diferencias significativas entre sí, destacando únicamente un menor porcentaje de motilidad individual progresiva inicial en los empleados para la muestra de *swim-up* Standard (38,8%), si bien esta diferencia no fue significativa por el elevado valor de la desviación standard (Tabla 1). Tampoco difirieron significativamente los valores de viabilidad en el momento de la inseminación entre los tres tipos de muestras (Tabla 1).

Sin embargo, las diferencias entre los valores de la concentración obtenida tras la selección sí fueron altamente significativas ($P<0,0001$), con cerca de 2×10^8 espermatozoides/ml en el *swim-up* Standard, aproximadamente el doble, 4×10^8 espermatozoides/ml, en el *swim-up* Mejorado, y llegando casi a 8×10^8 espermatozoides/ml en el *swim-up* del MLY (Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros de calidad seminal de las muestras obtenidas mediante los distintos procesos de *swim-up*. Valores expresados como porcentaje medio ± DS. a-b, a-c, b-c: $P<0,0001$ (número de muestras).

Muestra	**Standard** (48)	**Mejorado** (15)	**MLY** (40)
[Esperm/ml] Inicial	$3,14 \times 10^9 \pm 1,38$	$3,28 \times 10^9 \pm 0,64$	$3,71 \times 10^9 \pm 0,73$
Mot. Inicial	38,80 ± 20,72	58 ± 14	60,66 ± 6,87
Viab. Inicial	75,16 ± 8,02	62,55 ± 9,26	59,94 ± 4,99
[Esperm/ml] Sw-up	$2,14 \times 10^8 \pm 0,93^a$	$4,11 \times 10^8 \pm 0,74^b$	$7,61 \times 10^8 \pm 1,44^c$
Mot. Sw-up	61,76 ± 17,93	69 ± 13	82,64 ± 4,86
Viab. Sw-up	73,54 ± 8,64	71,6 ± 7,3	77,25 ± 4,69
Viab. I.A.	73,05 ± 10,04	61 ± 9	69,19 ± 7,19

Los datos de fertilidad que se presentan (facilitados por ANGRA) proceden de la inseminación artificial de un número total de 369 ovejas. El análisis de los parámetros reproductivos reveló importantes diferencias, siendo las muestras obtenidas mediante el

proceso de *swim-up* MLY las que presentaron los mejores valores de fertilidad, con un 25,91%, frente al 21,78% con las del *swim-up* Mejorado, y el 17,92% con el *swim-up* Standard (Tabla 2), lo que indica que el proceso de *swim-up* MLY permite obtener muestras que tienen mayor capacidad fecundante que las del Mejorado y Standard.

El análisis de los resultados obtenidos con los tres tipos de *swim-up* agrupados por sementales mostraron que, a pesar de no apreciar variación importante en los parámetros de calidad seminal, los resultados reproductivos fueron muy diferentes. Con las muestras obtenidas por el proceso de *swim-up* Standard, los valores de fertilidad oscilaron aproximadamente entre un 9 y un 32%, variando del 0% al 50% en el proceso de *swim-up* Mejorado y entre el 12,5% y el 40% en el proceso de *swim-up* MLY.

Tabla 2. Índices reproductivos obtenidos con las dosis seleccionadas mediante los distintos procesos *swim-up* en las inseminaciones con un intervalo parto-inseminación igual o inferior a 100 días.

Muestra	Standard	Mejorado	MLY
Nº Hembras	131	71	167
Nº Partos	25	17	46
Nº Crías	34	25	76
Fertilidad	19,08%	23,94%	27,54%
Prolificidad	1,36	1,47	1,65
Fecundidad	25,95%	35,21%	45,51%

Los resultados desglosados por semental indican que las mejoras observadas en los resultados globales por tipo de *swim-up*, que se obtenían con el *swim-up* Mejorado respecto al Standard y del *swim-up* con MLY respecto al Mejorado, no son debidas a mejoras puntuales en un individuo sino a un aumento de los distintos parámetros reproductivos en la mayoría de los sementales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ali, S. (1987). *Acta Agric Silv Ser Zoot* **26,** 29-37.

Álvarez, J., Lasso, J., Blasco, L., Núñez, R., Heyner, S., Caballero, P. y Storey, B. (1993). *Human Reprod* **8,** 1087-1092.

Barillet, F. y Elsen, J. (1979). *Proc 5ème Journées de la Recherche Ovine et Caprine.*

Bunch, T. y Ellsworth, H. (1981). *Int Goat and Sheep Res* **1,** 282-285.

Dun, R. (1955). *Aust Vet J* **31,** 101-103.

García-López, N., Ollero, M., Muiño-Blanco, T. y Cebrián-Pérez, J. (1996). *Theriogenology* **46,** 141-151.

Halbert, G., Dobson, H., Walton, J. y Buckrell, B. (1990). *Theriogenology* **33,** 977-992.

Harrison,R. y Vickers, S. (1990). *J Reprod Fert* **88,** 343-352.

Hawk, H. (1983). *J Dairy Sci* **66,** 2645-2660.

Martí, J.I., Martí, E., Cebrián-Pérez, J. y Muiño-Blanco, T. (2003). *Theriogenology* (En prensa).

Maxwell, W. (1984). Reproduction in Sheep (Lindsay, D. y Pearce, D.) Academy of Science and Australian Wool Corporation:, Camberra. Australia.

Maxwell, W. y Salamon, S. (1993). *Reprod Fert Dev* **5,** 613-638.

Moré, J. (1984). *Acta Anat* **120,** 156-159.

Quinlivan, T. y Robinson, T. (1969). *J Reprod Fert* **19,** 73-86.

Söderquist, L., Madrid-Bury, N. y Rodriguez-Martinez, H. (1997). *Theriogenology* **48,** 1115-1125.

Este trabajo ha sido financiado gracias a los proyectos CICYT AGL 2000-1221 y CICYT-FEDER AGL 2002-00097