ITEA (2003), Vol. **Extra N.º 24.** Tomo I, 324-326

ESTUDIO PRELIMINAR SOBRE LA COMPARACIÓN ENTRE BIOCIPHOS-PLUS® Y TRILADYL® PARA LA CONGELACIÓN DE SEMEN DE TORO DE LIDIA

MARCO-JIMENEZ, F., MAZON, J., VICENTE, J.S.

Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción. Dep. Ciencia Animal, Universidad Politécnica de Valencia, 46071 Valencia, España.
e-mail: framarj1@etsia.upv.es

INTRODUCCIÓN

Desde el siglo XVIII la presencia de las ganaderías bravas, en nuestra geografía, se ha mantenido sin solución de continuidad, siempre unida al arraigo de las tradiciones festivo-culturales. En la Comunidad Valenciana ésto supone la base fundamental de las fiestas patronales de sus pueblos. Así, las tardes de vaquillas, encierros, concursos, toros embolados, etc., generan más de 3000 permisos solicitados en la Comunidad Valenciana cada temporada. Ese arraigo cultural se ha traducido en la existencia de ganaderías centenarias que sólo dedican sus animales a este tipo de festejos, realizando una especial selección de caracteres que, dentro del abanico de la bravura, son esencialmente diferentes a los caracteres deseables en el toro de lidia de plaza. Las ganaderías de lidia son en general de pequeño tamaño, disponiendo tan sólo de cuatro o cinco machos. La aplicación de un programa conservación de recursos genéticos, permitiría iniciar un proceso de mejora de las ganaderías y la protección ante las posibles epizootías.

Durante los últimos 50 años el glicerol y la yema de huevo (gracias a las lipoproteínas de baja densidad, Parks *et. al,* 1992) han sido el crioprotector más utilizado. Ante la aparición de la encefalopatía espongiforme bovina, la utilización de productos de origen animal, se ha reducido al máximo. Por ello la aparición de nuevos medios de congelación constituidos a base de lipoproteínas de semilla de soja (Biociphos® Plus, IMV) se presenta como una alternativa a considerar. El uso del Biociphos® Plus ha sido evaluado en varios estudios (Bousseau *et. al,* 1994: Van Wagtendonk-de Leeuw *et. al,* 2000: Thun *et. al,* 2002).

El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto sobre la congelación, de semen de toro bravo, al emplear TRILADYL® (minitüb) y Biociphos® Plus sobre la normalidad acrosómica y el patrón de movimiento de los espermatozoides mediante un programa CASA.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizaron 12 electroeyaculaciones, pertenecientes a 7 sementales de diferentes ganaderías. En el 91% de los intentos de electroeyaculación se logró recoger una muestra seminal y el 58,3% de las muestra obtenidas fueron consideradas aceptables para su congelación. La recuperación se llevó a cabo introduciendo a los sementales en la manga de manejo e inmovilizándolos, vaciando de heces la ampolla rectal e introduciendo la sonda. La sonda empleada fue multipolar (tres electrodos) de 6 cm de diámetro (Electrojac® IV). El protocolo empleado (estímulos de intensidad creciente) se aplicó bajo criterios de dosis efecto hasta obtener el eyaculado sobre un colector de vidrio.

Tras la recuperación del eyaculado, se determinó el volumen (tubo calibrado) y se tomó una alícuota, diluida y fijada con una solución al 2% de Glutaraldehido (dilución final 1:50) para determinar la concentración (espz/ml), mediante cámara Thoma, y la normalidad acrosómica (%NAR) y anormalidades (%ANOR), mediante

microscopía óptica de contraste de fases (400x). El resto del eyaculado fue transportado a 5°C hasta el laboratorio, donde se tomó una muestra diluida en PBS con un 1% BSA, y se analizaron los diferentes parámetros de motilidad mediante software S.C.A. versión 5.1 (microptic®, Barcelona) sobre platina termostatada. Los parámetros registrados fueron: porcentaje de espermatozoides móviles totales (%), velocidad curvilínea (VCL), velocidad rectilínea (VSL), velocidad de la trayectoria media (VAP), índice de linealidad (LIN), amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y frecuencia de batido (BCF). Se consideraron espermatozoides móviles aquellos que presentaban una velocidad superior a 20μm/segundo (Farrel *et. al,* 1998). El procedimiento de congelación consistió en una modificación del empleado por Curry (1995). El eyaculado fue separado en dos alícuotas y a cada una se incorporó el medio de congelación (Triladyl® y Biociphos® Plus), con una dilución 1:10. El semen fue refrigerado a 5°C durante 2 horas, envasado en pajuelas de 0,25 ml y congelado a –120°C en vapor de nitrógeno durante 10 minutos y finalmente llevados a nitrógeno líquido.

La descongelación se realizó en baño de agua a 50°C durante 12 segundos. De la muestra se tomaron de nuevo dos alícuota (dilución 1:40) para determinar la normalidad acrosómica y los parámetros de motilidad, de igual manera que para el semen fresco, para cada uno de los medios de congelación.

Los análisis estadísticos se realizaron mediante un GLM (General Linear Models, Statgraphics Plus 4.1)

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Los resultados cuantitativos (tabla 1) muestran una producción muy variable en cuanto al número de espermatozoides obtenidos. Esto responde al método empleado en la recuperación.

Tabla 1. Parámetros cuantitativos de la producción espermática de toros de lidia

	Media ± error estándar	Mínimo	Máximo
Volumen (ml)	4,41±1,17	3,1	6,2
Concentración (mill. spz/ml)	610,79±418,39	180	1253
Producción total (mill. spz)	2448±1474	1080	4700

Los eyaculados mostraron un porcentaje de formar anormales del 18,75±8,10%, una normalidad acrosómica del 64,8±13,5% y una motilidad (según CASA) del 39±20,1% (valores medios ± error estándar). Los parámetros cinéticos fueron: velocidad curvilínea de 103,8± 18,1 μm/s (VCL), velocidad rectilínea de 49,3±4,7 μm/s (VSL), velocidad de la trayectoria media 62,9±7,0 μm/s (VAP), índice de linealidad de 55,7±7,6 (LIN), amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza de 4,7±1,1 μm (ALH) y una frecuencia de batido de 10,3±3,9 Hz (BCF).

Los parámetros seminales observados fueron semejantes a los obtenidos mediante electroeyaculación por Pérez-Garnelo *et. al* (2003) para el *URO (Bos primignius,* próximo a algunas variedades primitivas del toro bravo español) y Anel *et. al,* (1999) en la raza Morucha (volumen: 6,3±3 ml, concentración: 705±4 mill. spz/ml y volumen: 6,5±0,8 ml, concentración: 527±58mill.spz/ml, respectivamente). La normalidad acrosómica fue semejantes a la mostrada para Morucha (75,7±2,7 %) e inferior para el *URO* (80,2±8,4%). La motilidad espermática fue bastante baja (39±20,1%, obtenido mediante S.C.A), pero la valoración de los parámetros seminales obtenidos, para los toros bravos son difíciles de comparar con otros

estudios, ya que son escasos, más aún si se trata de comparar los parámetros cinéticos evaluados mediante distintos programas CASA.

Tras la descongelación, la normalidad acrosómica no presento diferencia significativa alguna entre ambos medios (Triladyl®: 41,7±3,6% *vs* Biociphos® Plus: 40,2±3,6%, tabla 2), y tampoco se observaron diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides móviles, (Triladyl®: 39,38±8,53 *vs* Biociphos® Plus: 16,98±8,53), debido al bajo número de eyaculados analizados hasta el momento (7).

Tabla 2. Valores cinéticos obtenidos para toros de lidia (semen fresco y post-descongelación)

Medio congelación	Parámetros cinéticos					
	VCL(μm/s)	**VSL**(μm/s)	**VAP**(μm/s)	**LIN**	**ALH**(μm)	**BCF**(Hz)
Triladyl®	85,93±5,19	48,86±2,34	59,13±2,62	60,80±2,73[b]	3,32±0,42	10,81±1,42
Biociphos® Plus	77,78±5,19	56,70±2,34	60,79±2,62	73,19±2,73[a]	2,16±0,42	9,77±1,42

VCL: velocidad curvilínea. **VSL**: velocidad rectilínea. **VAP**: velocidad de la trayectoria media. **LIN**: índice de linealidad. **ALH**: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza. **BCF**: frecuencia de batido.
[a,b] Valores en la columna con diferente superíndice difieren estadísticamente (P<0,05)

El estudio de los parámetros cinéticos sólo mostró diferencias significativas en el índice de linealidad (aumentando con Biociphos® Plus), índice que ha sido definido matemáticamente en los sistemas C.A.S.A., como el parámetro que mejor describe el movimiento (Boyer. *et al.*, 1989). En varios estudios, se ha observado diferencias en la calidad seminal *in vitro* entre estos dos tipos de diluyentes, obteniéndose los mejores resultados en el semen congelado con Triladyl®, lo que no ha sido corroborados con pruebas in vivo (Thun *et. al,* 2002: Van Wagtendonk-de Leeuw *et. al,* 2000). No obstante existe una interacción entre el tipo de diluyente y la raza en la fertilidad *in vivo*.

Los resultados, derivados de este trabajo, ponen de manifiesto la posibilidad de congelar semen de electroeyaculación con cualquiera de los dos medios de congelación (Triladyl® y Biociphos® Plus). El efecto que sobre la capacidad fecundante pueda tener la menor motilidad observada para el Biociphos® Plus será evaluada inicialmente mediante fecundación *in vitro*, dado que la dificultad de manejo y reducida cabaña de animales no facilita la realización de un gran número de inseminaciones.

BIBLIOGRAFÍA

- Anel, L., Boixo, J.C., Anel, E., Alvarez, M., Kaabi, M., Martínez, F., De la Fuente, J. Molero, R. II congreso ibérico de Reproducción Animal, Lugo 1999. 332-334.
- Berndtson, WE. and Igboeli. G. 1989. Am. J. Vet. Res. 50:1193-1197.
- Bousseau S, Brillard JP. In:Proceedings of the 6th European AI Vets Meeting, Edinburgh, UK, 1994.
- Boyer, SP., RO Davis and DF Katz , Curr Probl Obstet Gynecol 12 (1989), pp. 167–200.
- Curry, MR., Millar, JD., Watson PF. Cryobiolgy. 32(2): 175-181, 1995.
- Farrell, P.B., G.A. Presicce, C.C. Brockett and R.H. Foote. Theriogenology 49: 871-879, 1998.
- Parks JE, Graham JK. Theriogenology 1992;38:209-222.
- Pérez-Garnelo Sonia S., Delclaux M., Talavera Covadonga, López M., De la Fuente,J..http://www.redvya.com/veterinarios/veterinarios/especialidades/Reproducción/En-peligro/especialistas/Articulo05.htm. (10/02/03).
- Thun Rico, Maria Hurtado, F. Janett, 2002.. Theriogenology 57: 1087-1094.
- Wagtendonk-de Leeuw, A.M., R.M. Haring, L.M.T.E. Theriogenology 54:57-67.