EFECTO DEL HIDROXITOLUENO BUTILADO EN LA CRIOPRESERVACIÓN ESPERMÁTICA DE OVINOS Y CAPRINOS CON O SIN IMPLANTES DE MELATONINA

Tabarez, A., García, W. y Palomo, M.J.
Departamento de Medicina y Cirugía Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona. 08193 Bellaterra, Barcelona. España. mariajesus.palomo@uab.cat

INTRODUCCIÓN

Para contrarrestar los efectos negativos del fotoperiodo creciente es muy habitual el uso de implantes de melatonina. En el caso concreto del macho, la aplicación de este tipo de implantes incrementa el diámetro testicular (García Pastor *et al.,* 2004) y la capacidad fecundante (Palacín *et al.,* 2006), además de mejorar la congelabilidad del semen (Kaya *et al.,* 2001). De hecho, la melatonina ha sido utilizada recientemente como antioxidante en el medio de congelación de semen de búfalo, determinándose una mejora de la calidad espermática tras el proceso de congelación-descongelación (Li *et al.,* 2012). Como ya se ha descrito en numerosos trabajos, los procedimientos relacionados con la congelación producen *shock* por frío y ataque oxidativo reduciendo la calidad del semen posdescongelación (Bucak *et al.,* 2009). La membrana plasmática del espermatozoide de los mamíferos presenta altas concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados, lo que la hace muy susceptible a la formación de radicales libres induciendo daño peroxidativo, especialmente después de la criopreservación con la subsecuente pérdida de las funciones espermáticas (Lenzi *et al.,* 2002). La suplementación del medio de criopreservación con antioxidantes puede mejorar la calidad del semen frente al daño inducido por los radicales libres (Memon *et al.,* 2012). El hidroxitolueno butilado (BHT) es un análogo sintético de la vitamina E que ha sido utilizado en los últimos años en diferentes especies demostrando su capacidad para reducir el estrés oxidativo ocasionado por el proceso de criopreservación en los espermatozoides (Memon *et al.,* 2011). En este sentido, el presente estudio pretende valorar el efecto de la adición de BHT en los medios de congelación sobre la viabilidad espermática, dentro y fuera de la época reproductiva, junto a la aplicación o no de implantes subcutáneos de melatonina en ovinos y caprinos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Este estudio se realizó en tres épocas del año 2012: invierno (2 al 25 de enero), primavera (15 de mayo al 12 de junio) y otoño (4 al 20 de diciembre) entre el IRTA de Torre Marimon, donde están alojados los sementales y la UAB, donde se procesan y analizan las muestras seminales. Para ello, se utilizaron 14 machos jóvenes: 6 machos cabríos de la raza Blanca de Rasquera y 8 moruecos (4 de la raza Aranesa y 4 de la raza Xisqueta). En primavera, los animales se dividieron aleatoriamente en dos grupos en ambas especies. A los individuos de uno de los grupos se les colocaron implantes subcutáneos de melatonina 60 días antes de iniciar la recogida de semen, insertando 3 implantes en los moruecos y 2 en los machos cabríos siguiendo las instrucciones del fabricante (Melovine® CEVA Santé Animale, Francia). Al otro grupo de animales en ambas especies no se les aplicó ningún tratamiento específico. Posteriormente, se procedió a la recogida de 2 eyaculados/macho mediante vagina artificial a un ritmo de extracción de 2 días/semana. Con el fin de minimizar el efecto individual del donante, los eyaculados procedentes de cada grupo de animales se mezclaron en función del grupo experimental en ambas especies. A continuación, el semen fue diluido (1:5) en medio TGC (300 mM Tris, 28 mM glucosa, 95 mM ácido cítrico), lavado dos veces mediante centrifugación a 600 g durante 10 minutos y resuspendido (1:4) en el medio de congelación correspondiente (con o sin BHT) en un solo paso, dando lugar a 4 tratamientos. La composición de los diluyentes era la siguiente: Diluyente TGC y Diluyente TGC+5 mM BHT; ambos medios contenían una concentración final de 15% de yema de huevo en polvo y 5 % (v/v) de glicerol, penicilina sódica 1000 UI y sulfato de estreptomicina 1 mg/ml. Una vez diluido, las alícuotas de semen se colocaron en un recipiente con agua a 20ºC y se mantuvieron a 5ºC durante 4 horas.

Transcurrido este tiempo, las muestras fueron envasadas en pajuelas de 0,25 ml y congeladas en vapores de nitrógeno a 5 cm sobre la superficie del nitrógeno líquido durante 10 minutos antes de ser sumergidas en el nitrógeno. El análisis espermático se realizó a las 4 horas de refrigeración e inmediatamente después de la descongelación (37ºC durante 60 s), el cual consistió en la determinación de la viabilidad espermática mediante la tinción de eosina-nigrosina. Los resultados fueron analizados por medio del procedimiento GLM utilizando un diseño factorial y la comparación de medias se realizó mediante la prueba de Tukey (SPSS 20).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los efectos de la adición de BHT en el medio de congelación y de la aplicación de implantes de melatonina en los donantes ovinos y caprinos sobre la viabilidad espermática se presentan en la tabla 1. No se observaron diferencias entre tratamientos (con y sin la inclusión de BHT) para la viabilidad del semen de ovino y caprino, tanto refrigerado como descongelado, en ninguna época del año, así como tampoco en ninguno de los grupos de animales (implantados y no implantados) durante la primavera. Solamente se observó un efecto negativo de la aplicación del implante de melatonina en el caso del semen de caprino refrigerado en el medio con BHT sobre la viabilidad espermática ($P<0,01$), aunque este efecto perjudicial desapareció tras la descongelación. Estos resultados son bastante desconcertantes ya que no se pudo observar el efecto beneficioso de los implantes de melatonina reportado por autores como Kaya *et al.* (2001). Tampoco la inclusión de BHT parece tener un claro efecto, a pesar de observarse una cierta mejora en la viabilidad post-descongelación en otoño, ésta no fue estadísticamente significativa. Varios autores han descrito que la inclusión de BHT en el medio de congelación mejora la viabilidad de los espermatozoides conservados, tanto refrigerados como congelados-descongelados (Khalifa *et al.,* 2008; Memon *et al.,* 2011), aunque algunos sugieren la existencia de una cierta interacción entre la concentración de BHT y la proporción de yema de huevo utilizada en los medios de conservación, lo que podría explicar nuestros pobres resultados. Sin embargo, a pesar de no observarse un efecto de los tratamientos (con o sin la inclusión de BHT), al comparar los resultados obtenidos en tres épocas distintas del año, si se observaron diferencias ($P<0,0001$). Estas diferencias podrían deberse más a la edad de los machos que no a la época del año en sí, ya que son animales todavía jóvenes (14, 18 y 24 meses en invierno, primavera y otoño respectivamente). Lo mismo podría decirse en el caso del semen descongelado de caprino, aunque el efecto de la edad no sea tan marcado debido tal vez a una mayor precocidad para alcanzar su madurez reproductiva, junto con una menor sensibilidad al fotoperiodo o un posible efecto de la raza. No obstante, actualmente estamos analizando la motilidad espermática de estas dosis crioconservadas mediante el sistema informatizado ISAS V.1.2® (PROISER, España) para confirmar los resultados y poder determinar la utilidad o no tanto del BHT como de los implantes de melatonina en la crioconservación seminal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bucak M.N., Tuncer P.B., Sariözkan S., Ulutaş P.A., Çoyan K., Başpinar N. & Özkalp B. 2009. Res Vet Sci. 87: 468-472 • García Pastor, l., González, J.M., Figueras, l., Callejas, M., Cebrián, I.M. & Espada, M. 2004. SEOC 29, 149-151 • Kaya, A., Aksoy, M., Baspinar, N., Yildiz, C. & Ataman, M.B. 2001. Reprod. Domest. Anim. 36:211-215 • Khalifa, T.A.A., Lymberopoulos, A.G. & El-Saidy, B.E. 2008. Reprod. Dom. Anim. 43:525-530 • Lenzi, A., Gandini, L., Lombardo, F., Picardo, M., Maresca, V., Panfili, E., Tramer, F., Boitani, C. & Dondero F. 2002. Contraception. 65: 301-304 • Li, X.X., Yang, X.G., Lu, Y.Q., Lu, S.S., Zhang, M., Yao, H.L., Meng, L.J. & Lu, K.H. Reprod. Dom. Anim. 2012. 47:299-307 • Memon, A.A., Wahid, H., Rosnina, Y., Goh, Y.M., Ebrahimi, M. & Nadia, F.M. Reprod. Dom. Anim. 2012 • Memon, A.A., Wahid, H., Rosnina, Y., Goh, Y.M., Ebrahimi, M., Nadia, F.M. & Audrey G. Anim. Reprod. Sci. 2011. 129:44-49 •

Palacín, I., Abecia, J.A., Forcada, F., Casao, A., Cebrián-Pérez, J.A., Muiño-Blanco, T., Palacios, C., Pontes, J.M., García, M.F. & Pontes García J.M. 2006. SEOC 31, 355-357.

Agradecimientos: Este trabajo fue financiado por el INIA (RZ2009-00008-00-00), la Generalitat de Catalunya (2009SGR0621 y CUR-DIUE), el Fondo social Europeo y la Fundación Carolina.

Tabla 1. *Efecto del hidroxitolueno butilado (BHT) en el medio de congelación y la aplicación de implantes de melatonina en caprino y ovino sobre la viabilidad espermática.*

		CAPRINO				OVINO			
		Refrigerado		Descongelado		Refrigerado		Descongelado	
		SM	CM	SM	CM	SM	CM	SM	CM
A	Sin BHT	76,8±2,6^{a}	-	40,7±4,1^{a}	-	52,6±4,9^{a}	-	23,5±2,2^{a}	-
	Con BHT	81,1±2,8^{a}	-	40,8±2,8^{a}	-	53,1±4,0^{a}	-	24,8±1,5^{a}	-
B	Sin BHT	89,0±1,0^{bde}	82,4±1,5^{ef}	57,9±4,3^{b}	53,2±3,6	77,8±2,1^{b}	76,2±2,2	41,0±5,6^{b}	35,7±5,8
	Con BHT	90,1±1,7^{bd}	78,9±2,7^{f}	60,1±2,2^{b}	51,9±2,4	77,6±2,5^{b}	76,7±1,8	40,9±4,1^{b}	36,9±5,1
C	Sin BHT	-	-	45,5±4,7^{ab}	-	-	-	34,0±5,0^{b}	-
	Con BHT	-	-	55,1±4,7^{ab}	-	-	-	42,5±2,2^{b}	-

ab: Diferente letra en la columna indica diferencia estadística (P<0,0001)
def: Diferente letra en la columna y en la fila indica diferencia estadística (P<0,01)
A: Invierno, B: Primavera, C: Otoño; SM: Sin melatonina, CM: Con melatonina

EFFECT OF BUTYLATED HYDROXYTOLUENE IN CONSERVATION OF RAMS AND GOATS SEMEN WITH OR WITHOUT MELATONIN IMPLANTS

ABSTRACT: The aim of this study was to assess the effect of the inclusion of 5 mM of butylated hydroxytoluene (BHT) outside and inside of the breeding season and the application of melatonin implants on sperm quality in rams and goats. We used 6 Blanca de Rasquera bucks and 8 rams, 4 Aranesa and 4 Xisqueta breeds. The animals were divided into two groups with and without implants of melatonin inserted 60 days before semen collection by artificial vagina. Two ejaculates/day for 2 days/week were collected and mixed according to the experimental group, washed by centrifugation (twice for 10 min at 600g) and re-suspended in freezing medium with or without BHT (5 mM) supplemented with a final concentration of 15% powdered egg yolk and 5% glycerol in a Tris-based medium and refrigerated for 4 hours at 5 ºC before freezing. Sperm viability after refrigeration and thawing was determined by eosine-nigrosine stain, no showing differences between treatments in any of the species. Curiously, only on goat sperm chilled in BHT medium, the viability was higher (P<0.01) in animals without that with melatonin implant. However, the time of year had an effect in both species possibly due to the age of the males.

Keywords: small ruminant, sperm, BHT, melatonin implants.