EFECTO DEL TIPO DE YEMA DE HUEVO, ELIMINACIÓN DEL PLASMA SEMINAL Y EDAD DEL DONANTE EN LA CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN OVINO DE LAS RAZAS XISQUETA, ARANESA Y CAPRINO DE LA RAZA BLANCA DE RASQUERA

Garcia[1], W., Tabarez[1], A., Terre[2], M., Ferrando[3], A., Jordana[3], J. y Palomo[1], M.J.
[1] Dpto. Medicina y Cirugía animal. Universidad Autónoma de Barcelona
[2] Unidad de Rumiantes. Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentaria, (IRTA)
[3] Dpto. Ciencia Animal y de los Alimentos. Universidad Autónoma de Barcelona, España
Wilberg24@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

Las razas de ovino Xisqueta y Aranesa y de caprino Blanca de Rasquera son razas en peligro de extinción, por lo que la congelación del semen sería de gran ayuda para su conservación. Sin embargo, el proceso de congelación y descongelación induce efectos perjudiciales, resultando en una reducción de la viabilidad, motilidad y capacidad fecundante de las dosis crioconservadas (Salomon y Maxwell, 2000). Durante años la yema de huevo fresca ha sido utilizada en los diluyentes para congelar semen (Salomon y Maxwell, 2000). De hecho, la inclusión de la fracción rica en lipoproteínas de baja densidad (LDL) de la yema de huevo obtenida mediante su centrifugación a alta velocidad ("Yema Clarificada") parece presentar prometedoras cualidades para la crioconservación espermática en rumiantes (Moussa *et al*., 2002; Tonieto *et al*., 2010). Sin embargo, la heterogeneidad de la composición entre lotes de huevos y el riesgo de contaminación microbiológica hacen que la posibilidad de utilizar un sustituto a la yema de huevo siga siendo deseable. La yema de huevo en polvo podría ser una alternativa, ya que este producto es pasteurizado (Thibier y Guerin, 2000) y los lotes tienen una composición más homogénea. El presente trabajo pretende valorar el efecto de diferentes tipos de yema de huevo (fresca, en polvo y clarificada) sobre la viabilidad de los espermatozoides tras la crioconservación, así como la eliminación del plasma seminal y la edad del donante.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 8 moruecos y 6 machos cabríos, a los que se les recogió semen con vagina artificial 2 días/ semana y 2 eyaculados/día en otoño durante dos años consecutivos, a la de edad de uno y dos años. Los eyaculados de cada especie se mezclaron en un solo tubo (*pool*) y se dividió en dos alícuotas. Una de ellas se diluyó (1:5) con una solución compuesta por 0,3 M Tris, 27,75 mM Glucosa, 94,7 mM Acido Cítrico (TCG) y se centrifugó a 600xg durante 10 min' por dos veces, mientras que el semen de la otra alicuota no fue lavado. Las alicuotas del semen lavado y no lavado en cada especie se diluyeron con el mismo medio anterior (TGC) más glicerol a una concentración final del 5% y antibióticos (1000 UI/ml de penicilina benzatinica y 1,0 mg/ml de sulfato de estreptomicina) (Salomon y Maxwell, 2000) y un suplemento de uno de los 3 tipos de yema de huevo. En los espermatozoides ovinos lavados y no lavados, al diluyente se le agregó a una concentración final del 15 % (v/v) de yema de huevo fresco (YHF), yema de huevo en polvo (YHP) o yema de huevo clarificada (YHC), fracción sobrenadante de la yema de huevo fresco tras una doble centrifugación a 12000xg durante 45 min a 5ºC.En los espermatozoides caprinos lavados, se les agregó cada uno de los 3 tipos de yema de huevo al 15% (v/v), mientras a los espermatozoides no lavados se les añadió la yema de huevo en un 2% (v/v). Una vez diluido, las alícuotas de semen se colocaron en un recipiente con agua a 20 ℃ y se mantuvieron a 5℃ durante 4 hs. Las muestras fueron envasadas en pajuelas de 0,25 ml a una concentración de $400x10^6$ espermatozoides/ml y congeladas en vapores de nitrógeno antes de ser sumergidas en el nitrógeno. El análisis espermático de viabilidad se realizó después de la descongelación (37℃ durante 60 s), mediante la tinción de eosina-nigrosina. Los datos fueron analizados en un diseño factorial (2x2x3) en el programa SAS ver. 9.1 (2008) con GLM, comparación de medias test Duncan.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al evaluar el efecto de la capacidad crioprotectora de cada tipo de yema de huevo en el diluyente, sobre la viabilidad del semen procedente de animales de 1 y 2 años de edad se

observó que en el caso de los espermatozoides ovinos, este factor (tipo de yema) y sus interacciones con los otros factores como la edad y/o el hecho de lavar no fueron significativos, mientras la edad ($p < 0,0001$), el lavado ($p < 0,0001$) y la interacción de ambos factores edad*lavado ($p < 0,01$) sí lo fueron. Tal y como se muestra en la tabla 1, la eliminación del plasma seminal mediante el lavado en animales de 1 año no produjo un efecto significativo, aunque se aprecia cierta tendencia, mientras que en espermatozoides procedentes de estos mismos animales a los 2 años de edad el efecto fue más evidente ($p < 0,001$), a pesar de que el tipo de yema de huevo siguió sin afectar la supervivencia en el caso de los espermatozoides lavados. Así mismo al comparar el efecto edad, se observa una mayor viabilidad espermática en animales de 2 años cuando los espermatozoides son lavados y conservados en cualquiera de los 3 tipos de yema de huevo o incluso en el caso de no ser lavados pero crioconservados con yema de huevo en polvo respecto a los mismos tratamientos con espermatozoides de animales de un año. En los machos cabríos al analizar los factores como la edad ($p < 0,005$) y el tratamiento ($p < 0,001$) ambos fueron significativos, aunque no hubo interacción entre ellos. No obstante, el efecto de la edad sólo se observó cuando no se eliminó el plasma seminal, independientemente del tipo de yema de huevo utilizada, siendo mayor la viabilidad post-descongelación en animales de 2 años de edad (Tabla 2). De hecho, respecto al efecto del tratamiento, los mejores resultados se obtuvieron cuando el plasma seminal era eliminado y los espermatozoides fueron conservados con un 15% de yema de huevo, independientemente del tipo y en ambas edades. El análisis de los datos obtenidos en ambas especies sugiere que la yema de huevo en polvo al 15% proporciona porcentajes de viabilidad similares a los proporcionados por la yema de huevo fresco o clarificado, resultados que parecen coincidir con los de Marco-Jiménez *et al*. (2004), lo que sugiere que la yema de huevo en polvo puede substituir la yema de huevo fresca en los diluyentes para la congelación espermática en pequeños rumiantes. Por otra parte, también se ha hecho muy evidente el beneficio de eliminar el plasma seminal en la conservación espermática, tanto en ovino como especialmente en caprino, independientemente de la edad. De hecho, la eliminación o no del plasma sigue siendo un tema controvertido, ya que si bien el plasma seminal tiene efectos positivos sobre la motilidad, viabilidad y fertilidad de los espermatozoides (Watson 1981; Moore *et al*., 2005), también parece tener efectos perjudiciales según la cantidad y naturaleza química del mismo, la cual está influenciada por las condiciones fisiológicas, patológicas y/o externas, pudiendo afectar a su vez la calidad espermática tras la congelación-descongelación (Maxwell et al., 2007; Muiño-Blanco *et al*., 2008).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Marco-Jiménez, F., Puchades, S., Moce, E., Viudes-de-Castro, M.P., Vicente,J.S. & Rodriguez M. 2004. Reprod Domest Anim 39:438–41. ● Moussa. M., Matinet. V., Trimeche. A., Tainturier. D. & Anton, M. 2002. Theriogenology 57:1695–706.● Maxwell, W.M.C., El-Hajj Ghaoui, R. & Evans, G., 2007. 7th International Symposium on Reproduction in Domestic Ruminants 64:13–37. ● Moore, A.I., Squires, E.L.y Graham, J.K., 2005.Theriogenology 63:2372–2381.● Muiño-Blanco, T., Perez-Pe, R. y Cebrian-Perez, J.A., 2008. Reprod Domest Anim 43:18–31.● Salamon, S., Maxwell, W. 2000. Anim Reprod Sci 62: 77–111.● Tonieto, R., Goularte, K., Gastal, G., Schiavon, R. y Deschamps, J. 2010. Small RumRes 93: 206–209.● Thibier, M. y Guerin, B., 2000. Anim Reprod Sci 62: 233–251. ●Watson, P.F., 1981. Academic Press, London, pp. 189–218.

Agradecimientos: Este trabajo está financiado por el INIA (RZ2009-00008-00-00 y la Generalitat de Catalunya (2009SGR0621 y CUR-DIUE).

Tabla 1. *Efecto de la edad del morueco, la eliminación o no del plasma seminal y tipo de yema de huevo como crioprotector en la viabilidad espermática durante la conservación*

Tratamiento	n	1 año (media ±SEM)	n	2 años (media ±SEM)	Valor de p
YHFL	6	36,16 ± 3,5	6	54,47 ± 7,1 [ab]	0,05
YHPL	6	35,27 ± 5,7	6	59,94 ± 1,2 [a]	0,0017
YHCL	6	34,45 ± 4,3	6	59,04 ± 2,6 [a]	0,0007
YHFS	6	27,53 ± 4,3	6	38,35 ± 3,7 [dc]	0,08
YHPS	6	26,41 ± 2,5	6	45,25 ± 2,9 [bc]	0,0007
YHCS	6	29,72 ± 3,8	6	32,18 ± 3,9 [d]	0,66

[a-d] Letras diferentes dentro de la misma columna muestran diferencia significativa ($p < 0,001$) YHFL: espermatozoides (spz) lavados y conservados en yema de huevo (YH) fresco, YHPL: spz lavados y en YH en polvo, YHCL: spz lavados y en YH clarificado, YHFS: spz sin lavar y en YH fresco , YHPS: spz sin lavar y en YH en polvo, YHCS: spz sin lavar y en YH clarificado.

Tabla 2. *Efecto de la edad del macho cabrío, la eliminación o no del plasma seminal y tipo de yema de huevo como crioprotector en la viabilidad espermática durante la conservación*.

Tratamiento	n	1 año (media ±SEM)	n	2 años (media ±SEM)	Valor de p
YHF15%	6	48,05 ± 5,8 [a]	6	52,07 ± 3,8 [a]	0,57
YHC15%	6	45,67 ± 6,3 [a]	6	54,80 ± 4,8 [a]	0,28
YHP15%	6	42,27 ± 2,8 [a]	6	48,00 ± 6,4 [a]	0,43
YHF2%	6	5,98 ± 1,2 [b]	6	16,85 ± 1,6 [b]	0,0003
YHC2%	6	4,40 ± 1,8 [b]	6	16,92 ± 2,9 [b]	0,0045
YHP2%	6	3,02 ± 1,1 [b]	6	10,13 ± 3,3 [b]	0,0005

[a-b] Letras diferentes dentro de la misma columna muestran diferencia significativa ($p < 0,001$) YHF15%: espermatozoides (spz) lavados y conservados en yema de huevo (YH) fresco al 15%, YHC15%: spz lavados y en YH clarificado al 15%: YHP15% spz lavados y en YH en polvo al 15%, YHF2%: spz sin lavar en YH fresco al 2%, YHC2%: spz sin lavar en YH clarificado al 2%; YHP2%: spz sin lavar en YH en polvo al 2%.

EFFECT OF TYPE OF EGG YOLK, PRESENCE OF SEMINAL PLASMA AND DONOR AGE ON SPERM CRYOPRESERVATION FROM XISQUETA, ARANESA OVINE AND BLANCA DE RASQUERA CAPRINE BREEDS

ABSTRACT: The objective was to assess the effect of type of egg yolk (EY), presence or not of seminal plasma (sperm washing) and donor age on sperm viability post-thawing. Semen was collected from 8 rams and 6 bucks for two consecutive years, at the age of 1 and 2 years, respectively. Ejaculates of each species was mixed and divided into two aliquots, one was diluted in a Tris-based medium and centrifuged twice at 600xg for 10 minutes, while the other aliquot was not washed. Washed and unwashed ram as washed goat sperm was diluted in a freezing media supplemented with a final concentration of 15% of EY (fresh, powdered or clarified) and 5% of glycerol, meanwhile unwashed goat sperm was diluted in the same media but with 2% of EY. The results showed that in ram sperm, factors such as donor age ($p<0.001$), sperm washing ($p<0.001$) and the interaction of both factors ($p<0.01$) were significant, while the type of EY factor and its interactions of age and washing were not. In goats, factors as the donor age ($p<0.05$) and sperm treatment (washed sperm+15% EY *versus* unwashed sperm+2%EY) ($p<0.001$) were significant, whereas there was no interaction between treatment and age.

Keywords: type of egg yolk, cryopreservation, ram, buck, sperm.