EFECTO DE LA EDAD DEL DONANTE Y DE LA APLICACIÓN DE IMPLANTES DE MELATONINA EN LA CRIOCONSERVACIÓN ESPERMÁTICA OVINA

García, W., Tabarez, A., Marin, S., Osuagwuh, U. y Palomo M.J.[1].
Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra
mariajesus.palomo@uab.cat

INTRODUCCIÓN

En ovinos, la conducta sexual y la calidad del semen son los principales factores que limitan la eficiencia de la reproducción en el macho a lo largo de año. Los moruecos son reproductores estacionales en los que el fotoperiodo es la señal ambiental principal que controla la actividad reproductiva. Por ello, el uso de implantes de melatonina en el morueco durante la estación no reproductiva se ha asociado con mejoras en parámetros reproductivos como el diámetro escrotal, la producción y calidad espermática (Palacín *et al*., 2008). Del mismo modo, la estacionalidad puede condicionar los períodos de congelación del semen para su utilización posterior, ya que el semen de morueco congelado en primavera parece ser de peor calidad que el congelado durante el otoño (D' Alessandro y Martemucci, 2003), resultando en una reducción de la movilidad y viabilidad, lo cual disminuye la supervivencia y capacidad fecundante de las dosis conservadas para la inseminación artificial (Maxwell y Watson, 1996). Por último, es preciso recordar que la producción seminal, y por consiguiente, su potencial reproductivo evolucionan de acuerdo a la edad. De tal manera, los moruecos adultos presentan mejor calidad seminal y fertilidad que los jóvenes (Beltrán de Heredia, 2009), hecho que se le atribuye al desarrollo de la madurez sexual, lo que repercute en una mayor calidad seminal y fertilidad de los espermatozoides refrigerados y criopreservados de animales adultos (Rodríguez-Almeida *et al*., 2008). Así los objetivos del presente trabajo son valorar el posible efecto de la edad del donante de semen y la aplicación de los implantes de melatonina a lo largo de 2 primaveras consecutivas sobre la calidad espermática post-descongelación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Este experimento se llevó a cabo en la primavera de 2 años consecutivos. Para ello, en el primer año del estudio, 8 animales (4 de raza Aranesa y 4 de raza Xisqueta) de aproximadamente 16 meses de edad se dividieron en dos grupos homogéneos: el grupo A recibió 3 implantes subcutáneos de 18 mg melatonina (Melovine®, Ceva Salud Animal) por morueco y el grupo B no recibió implante. Al siguiente año, cuando los animales contaban con unos 28 meses de edad fueron también divididos al azar en 2 grupos; a 4 moruecos se les colocó 3 implantes subcutáneos de melatonina (grupo A) y los otros 4 no recibieron implante (grupo B). Pasados dos meses tras colocar los implantes, se les colectó semen con vagina artificial 1 ó 2 días/semana y 2 eyaculados/día en primavera, a la de edad de 18 meses y 30 meses respectivamente. Los eyaculados eran mezclados en un tubo de acuerdo a su grupo experimental, diluidos (1:5, v/v) en la solución TGC compuesta por 0,3 M Tris, 27,75 mM Glucosa, 94,7 mM ácido cítrico (345 mOsm/kg, pH 7.2) y centrifugados a 600g durante 10 minutos por dos veces. Tras descartar el sobrenadante, los sedimentos fueron resuspendidos (1:4) en la solución TGC con una concentración final de 5 % glicerol y 15 % (v/v) de yema de huevo en polvo, 1000 UI/ml de penicilina benzatinica y 1.0 mg/ml de sulfato de estreptomicina. Una vez homogenizada las suspensiones, los tubos se introdujeron en un recipiente con 10 mL de agua a 20 °C, se colocaron en una nevera portátil (Dometic-Waeco) a 5°C y fueron trasladados a una cámara de frío. Tras aproximadamente 3h y 30' de refrigeración se les agregó más diluyente hasta alcanzar una concentración final de 400 $x10^6$ de espermatozoides/mL. Las distintas alícuotas refrigeradas a 5ºC fueron envasadas en pajuelas de 0,25 mL (IMV, L'Aigle Cedex, France) y selladas con alcohol polivinílico. A continuación, una vez transcurridas 4 horas de refrigeración, las pajuelas fueron congeladas en vapores de nitrógeno líquido (LN^2), a 5 cm por encima del nivel de LN^2 durante 10 minutos, para finalmente ser sumergidas en él para su almacenamiento hasta su descongelación.

Tras la descongelación de las distintas pajuelas (a 37ºC durante 30''), se valoró la viabilidad espermática por medio de la tinción de eosina-nigrosina® (Hancok, 1957) y la motilidad espermática total y progresiva mediante el sistema ISAS® (Proiser R+D S.D., Valencia). Asimismo, se determinó la morfometría espermática a partir de frotis de las diferentes muestras descongeladas teñidas siguiendo el protocolo comercial Diff-Quik® mediante el módulo de morfometría de este mismo sistema CASA. Para ello, se empleó la opción de análisis global de la cabeza, midiendo la longitud (L, µm), anchura (W, µm), perímetro (P, µm) y área (A, μm^2) como parámetros referentes al tamaño, así como también analizando la elipticidad (L/W), rugosidad (4π A/P^2), elongación (L-W/L+W) y regularidad (π LW/4A) como parámetros referentes a la forma de la cabeza. Finalmente, los datos fueron analizados utilizando el procedimiento GLM (ANOVA) de SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.), en un diseño factorial, teniendo como factor la edad (1 año *vs* 2 años) e implantados/no implantados con melatonina (grupo A *vs* grupo B). Se realizó 6 repeticiones por unidad experimental. Cuando las diferencias fueron significativas ($p < 0,05$), se realizó el test de Bonferroni de comparación de medias a posteriori.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una vez analizados los distintos parámetros descritos anteriormente (Tabla 1), se observó que ninguno de ellos se vio afectado por la aplicación de implantes subcutáneos de melatonina en los sementales ovinos, en ninguna de las dos edades testadas. En cambio, si se observó un significativo incremento de la motilidad total espermática y de las dimensiones de la cabeza de los espermatozoides tras la descongelación a medida que aumentaba la edad de los donantes de semen ($P<0,001$). Respecto a la forma de la cabeza de los espermatozoides descongelados, no se apreciaron diferencias entre los grupos de animales (con o sin implante) ni entre las dos edades testadas, siendo los valores (media ± SEM) de elipticidad de 1,8 ± 0,0, de elongación de 0,3 ± 0,0, de rugosidad de 0,8 ± 0,0 y de regularidad de 0,9 ± 0,0. Así, la aplicación de los implantes de melatonina no parece mejorar la calidad del semen, una vez descongelado, de machos de 18 y 30 meses de edad. Resultados contradictorios al presente trabajo han sido presentados por Casao *et al.* (2007) y Kaya *et al*. (2000) en moruecos de diferentes razas, donde la aplicación de implantes de melatonina mejoró la motilidad e integridad acrosomal tras la descongelación, mientras que Romao *et al.* (2003) en moruecos de la razas Merina Preta y Campanica no observaron ninguna diferencia en los parámetros de calidad seminal post-descongelación, así como tampoco influyó en la tasa de fertilidad, cuando se comparó espermatozoides de animales tratados con no tratados. Probablemente estos resultados tan dispares se deban a que la mayoría de razas mediterráneas son poco estacionales (Pelletier *et al*., 2000; Azcona *et al*., 2001), por lo que la mayoría de tratamientos con implante de melatonina en fotoperiodo positivo no alteran significativamente la calidad del semen en estas localizaciones geográficas. Asimismo, estos resultados contradictorios que exhiben las células espermáticas de la misma especie ante los procesos de criopreservación podrían deberse a factores como la edad, el tipo de crioprotector y aditivos en los diluyentes (Martí *et al*., 2011). En cuanto a los resultados de morfometría espermática obtenidos tras el proceso de crioconservación, no se mostró ningún cambio significativo en la forma de la cabeza de los espermatozoides en ninguno de los tratamientos estudiados, ni por el efecto de la edad ni por la administración de implantes de melatonina. Sin embargo, teniendo en cuenta las dimensiones obtenidas en las diferentes edades de los donantes, podemos indicar que las modificaciones de los parámetros morfométricos referentes al tamaño de la cabeza tras la criopreservación dependen principalmente de la estabilización de la madurez sexual de los moruecos (Martí et al., 2011). En conclusión, el uso de implantes de melatonina no parece haber proporcionado ninguna ventaja a la hora de conservar espermatozoides fuera del fotoperiodo negativo, probablemente debido a que las razas autóctonas Aranesa y Xisqueta son poco estacionales en cuanto a producción y calidad espermática, siendo más determinante, en nuestro caso, la edad del donante de semen.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Azcona VA, González AM; Jurado JCM; García-Cervigón M; Pasamontes MDP; Ángulo VM (2001) Nº *XXVI-SEOC*, Sevilla, España. pp: 997-982. •Beltrán de Heredia,I (2009). Eds: Sañudo, C.; Cepero Briz, R. Prensas Universitarias de Zaragoza. Zaragoza, España. pp:

105-114. • Casao, A.; Vega, S.; Pérez-Pe, R.; Cebrián-Pérez, J.A.; Muiño-Blanco, T.; Abecia,, J.A.; Forcada, F.; Palacín, I. (2007) ITEA, Zaragoza, España. pp:6-8. • D'Alessandro, A.G.; Martemucci, G. (2003) *Animal Reproduction Science.,* 79: 93–102. • Hancock, J.L. (1957). *J. R. microsc. Soc*., 76: 84-97. • Kaya, A.; Baspinar, N.; Yildiz, C.; Kurtoglu, F.; Ataman, M.B.; Haliloglu, S. (2000) *Rev Med Vet.,* 151: 1143–1146. • Martí, J.I.; Aparicio, I.M.; García-Herreros, M. (2011) *Theriogenology*., 75: 473–481. • Maxwell, W.M.C.; Watson, P.F. (1996). *Anim Reprod Sci.,* 42: 55-65. • Palacin, I.; Abecia, J.A.; Forcada, F.; Casao, A.; Cebrián, J.A.; Muiño, T.; Palacios, C.; Pontes, J.M. (2008). *Italian Journal of Animal Science.*,7 (2): 199-206. • Pelletier, J.; Bodin, L.; Hanocq, E.; Malpaux, B.; Teyssier, J.; Thimonier, J.; Chemineau, P.(2000). *Biology of Reproductíon.,* 62:1096-1101• Rodríguez-Almeida, F.; Ávila, C.O.; Anchondo, A, Sánchez-Ramírez, B.; Jiménez, J.A. (2008) -. Agrociencia-Mexico. 42 (4): 399-406. • Romao, R.J.; Bettencourt, E.M.V.; Bettencourt, C.M.V.; Matos, C.A.P. (2003) Nº XXVIII-SEOC. Badajoz, España. pp: 204-209.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido 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 de la edad del donante y de la aplicación de implantes de melatonina sobre la viabilidad, motilidad y morfometría de la cabeza de espermatozoides ovinos descongelados*

Tratamiento	Viabilidad	Motilidad Total	Motilidad Progresiva	Longitud (µm)	Ancho (µm)	Área (μm^2)	Perímetro (µm)
18 m (A)	35.73±6.37	30.6±0.5^{a}	18.6±1.7	8.3±0.1^{a}	4.8±0.1^{a}	33.8±0.7^{a}	23.0±0.1^{a}
18 m (B)	40.96±6.14	28.0±2.9^{a}	18.5±3.2	8.4±0.0^{a}	4.8±0.0^{a}	33.4±0.2^{a}	23.1±0.1^{a}
30 m (A)	31.17±3.71	40.0±3.1^{b}	15.7±0.9	8.5±0.0^{b}	5.0±0.0^{b}	35.4±0.3^{b}	23.7±0.1^{b}
30m (B)	41.50±4.24	39.9±1.2^{b}	20.3±2.6	8.5±0.0^{b}	5.0±0.0^{b}	35.3±0.2^{b}	23.7±0.1^{b}

$^{a\ b}$ Diferentes letras en la misma columna representan diferencias significativas (P<0.001; media ± SEM, n=6) entre tratamientos (**18m (A)**: 18 meses de edad de los donantes con implantes de melatonina **18m (B)**: 18 meses de edad sin implante de melatonina, **30m (A)**: 30 meses de edad con implante, **30m(B)**: 30 meses de edad sin implante)

EFFECT OF DONOR AGE AND MELATONIN IMPLANT APPLICATION ON RAM SPERM CRYOPRESERVATION

ABSTRACT: The effect of age and melatonin implant on sperm cryosurvival of eight rams during two consecutive springs was studied. In the first spring, the rams (18 months old) were divided into two groups; group A with melatonin implants (*Melovine*®) inserted 60 days before semen collection, and group B without melatonin implants. Semen was collected via artificial vagina and according to the experimental design, fresh ejaculates were immediately mixed, centrifuged twice at 600g for 10min, re-suspended in a Tris-based extender containing 15% powdered egg yolk and 5% glycerol, and refrigerated for 4 hours at 5°C before freezing in liquid nitrogen vapour. The experiment was repeated with the same animals (30 months old) in the next spring. Sperm cryosurvival (mean±SEM, n=6) determined with eosin-nigrosin stain showed no significant difference after thawing between group A (35.73±6.37) and group B (40.96±6.14) in the first spring. When rams were 30 months old, post-thaw viability in group B (41.50±4.24) was higher than in group A (31.17±3.71), but not significantly (p>0.05). Total motility was significantly higher (P<0.001) in frozen sperm of older males irrespective of melatonin. Results from post-thawed sperm morphometry by computer-assisted system (ISAS®) showed no difference between the groups but varied significantly (P<0.001) with age.

Keywords*:* ram sperm cryopreservation melatonin