

USO DE DILUTORES HIPERTÓNICOS EN LA CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN OVINO

HYPERTONIC EXTENDERS IN THE CRYOPRESERVATION OF OVINE SEMEN

Hernán Guerrero V.¹, Wilfredo Huanca L.^{1,2}, Fernando Raymundo T.¹, Sandra Huerta O.¹ y Daphne Ramos D.³

RESUMEN

Se evaluó el efecto crioprotector de dos dilutores hipertónicos (Trealosa y Lactosa) sobre las características postdescongelamiento del semen ovino (n=4). La composición de los dilutores base incluyó Tris 27.1 g/l, ácido cítrico 14.0 g/l, fructosa 10.0 g/l, glicina 10.0 g/l, yema de huevo 10.0 % (v/v) y glicerol 6.5 % (v/v). El semen colectado con vagina artificial tuvo las siguientes características: volumen: 1.1 ± 0.1 ml, concentración espermática: $3.5 \pm 0.1 \times 10^9$ /ml, motilidad individual: $87.0 \pm 2.4\%$, motilidad masal (escala 0-5): 4.4 ± 0.2 , espermatozoides vivos: $90.2 \pm 3.8\%$ y anormales $1.8 \pm 0.7\%$. El semen fue congelado en pajillas de 0.5 ml y conservado en nitrógeno líquido. Las pajillas fueron descongeladas luego de 3 meses para su evaluación. Se obtuvo una motilidad individual de 40.3 ± 5.9 y $30.0 \pm 5.0\%$ y un número de espermatozoides vivos de 34.4 ± 6.6 y 24.4 ± 5.0 para los dilutores Trealosa y Lactosa, respectivamente. El mejor resultado se obtuvo al utilizar el dilutor hipertónico Trealosa por tener mejores características de motilidad individual y espermatozoides vivos postdescongelamiento.

Palabras clave: dilutor, crioprotector, semen, ovino

ABSTRACT

The cryoprotectant effect of two hypertonic extenders (trehalose and lactose) on the post-thawing characteristics of ram semen (n=4) was evaluated. The extender composition included Tris 27.1 g/l, Citric acid 14.0 g/l, Fructose 10.0 g/l, Glycine 10.0 g/l, egg yolk 10.0% (v/v) and Glycerol 6.5% (v/v). Semen was collected in an artificial vagina. Seminal characteristics were: volume: 1.1 ± 0.1 ml, sperm concentration: $3.50 \pm 0.1 \times 10^9$ /ml, individual motility: $87.0 \pm 2.4\%$, wave motility (scale 0-5): 4.4 ± 0.2 , live sperms: $90.2 \pm 3.8\%$, and abnormal sperms: $1.8 \pm 0.7\%$. Semen was frozen in 0.5 ml straws and stored in liquid nitrogen. Straws were thawed after 3 months. Results of post-thawing evaluation were: individual motility: 40.3 ± 5.9 and $30.0 \pm 5.0\%$, and live sperms: 34.4 ± 6.6 and $24.3 \pm 5.0\%$ for the Trehalose and Lactose extenders respectively. Results showed a better ram semen cryopreservation when the Trehalose extender was used.

Key words: extender, cryoprotectant, semen, ram

¹ Laboratorio de Reproducción Animal, ³ Laboratorio de Salud Pública y Salud Ambiental, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima

² E-mail: whuanca2002@yahoo.com

INTRODUCCIÓN

La finalidad de diluir el semen es aumentar el volumen del eyaculado y facilitar la preservación de la viabilidad del espermatozoide por un tiempo mayor. Un diluyente eficiente mantiene o mejora el medio que rodea al espermatozoide suministrándole energía y protección contra productos del metabolismo y variaciones de temperatura (Gordon, 1997). En tal sentido, la criopreservación del semen a través del empleo de dilutores con diferentes componentes hace realidad la perpetuación de las características deseables, aun posterior a la muerte o sacrificio de los reproductores seleccionados (Aisen *et al.*, 1995).

Con el fin de evitar el daño durante el proceso de congelamiento, se han desarrollado numerosos diluyentes en base a amortiguadores de pH (tris, ácido cítrico), azúcares de bajo peso molecular (fructuosa, glucosa) que pasan a través de la membrana celular sirviendo como fuente de energía para el espermatozoide, agentes protectores de membrana (yema de huevo, leche descremada) que contienen macromoléculas que proveen protección contra el shock por frío, y crioprotectores (glicerol y otros polialcoholes, aminoácidos) que reducen la formación intracelular de cristales de hielo durante el proceso de congelado-descongelado (Molinia *et al.*, 1994; Salamon y Maxwell, 1995). Adicionalmente, otros componentes tales como azúcares no difundibles (lactosa, sucrosa, dextrano, trealosa) han sido empleados porque proveen protección al enfriamiento mejorando la restauración postcongelamiento del espermatozoide (Chen *et al.*, 1993; De Leeuw *et al.*, 1993; Woelders *et al.*, 1997).

La criopreservación reduce la viabilidad y fertilidad de los espermatozoides, por lo que la inclusión de elementos para mejorar la supervivencia e integridad de los espermatozoides post-descongelamiento puede resultar en tasas de concepción adecua-

das con el uso de la inseminación artificial (Sánchez-Partida *et al.*, 1999). Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto crioprotector en la congelación de semen de carnero de dos dilutores con altas concentraciones de disacáridos (trehalosa y lactosa) sobre las características físicas del semen de ovinos Blackbelly.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de Estudio y Animales

Las muestras de semen se colectaron entre abril y julio de 2003 de cuatro ovinos Blackbelly, de 2 a 3.5 años de edad, del fundo «El Cortijo», situado en el km 75 de la Panamericana Sur. El procesamiento de las muestras se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima. Se hizo una evaluación previa de los animales con énfasis en la conformación testicular (firmeza y elasticidad) y comportamiento sexual. Se confinaron en corrales individuales bajo un sistema de crianza y alimentación similar. Los animales se entrenaron por tres semanas en el uso de la vagina artificial. Se emplearon borregas en celo para evaluar el comportamiento sexual de los carneros (cortejo, monta, erección y eyaculación) y colección de semen (Álvarez-Córdova *et al.*, 1999).

Colección y Evaluación de Semen

El semen se colectó con una frecuencia de dos veces por semana (Ollero *et al.*, 1996) y por un periodo de tres meses. El semen, inmediatamente después de su colección, se conservó a 37 °C para su evaluación. Se utilizaron los eyaculados que tuvieron un volumen ≥ 0.4 ml, una concentración espermática superior a $2,000 \times 10^6$ espermatozoides/ml, una motilidad masal ≥ 4 , una motilidad individual $\geq 70\%$ y $< 15\%$ de anomalías espermáticas (Aisen *et al.*, 1995).

Cuadro 1. Composición de dos dilutores para su utilización en la congelación de semen ovino

	Componente	Dilutor	
		Tris-Trealosa	Tris-Lactosa
Diluyente base	Tris	27.1 g/l	27.1 g/l
	Ácido cítrico	14.0 g/l	14.0 g/l
	Fructosa	10.0 g/l	10.0 g/l
	Glicina	10.0 g/l	10.0 g/l
	Yema de huvo	10.0% (v/v)	10.0% (v/v)
Diluyente hipertónico		Diluyente base + Trealosa 76.0 g/l + Glicerol 6.5% (v/v)	Diluyente base + Lactosa 76.0 g/l + Glicerol 6.5% (v/v)

La motilidad masal se clasificó en base a una escala del 0 al 5 (Herman *et al.*, 1994) y la motilidad progresiva (porcentaje de espermatozoides que se desplazan en varios campos al azar) se evaluó usando semen diluido (10 µl de semen en 2.5 ml del dilutor base) (Malmgrem, 1997).

La concentración de espermatozoides (número de espermatozoides por ml) fue determinada con la cámara de Neubauer (dilución 1:200). Se utilizó la coloración Nigrosina-Eosina (Doot y Foster, 1972) en frotices de semen para determinar el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos.

Dilutores

Para la preparación de 10 ml del diluyente base Tris-trealosa, se mezcló 0.271 g de Tris, 0.14 g de ácido cítrico, 0.10 g de fructuosa y 0.10 g de glicina. De este preparado, se tomó 9 ml y se mezcló con 1 ml de yema de huevo fresco (previa desinfección con alcohol de 70%).

Para el dilutor hipertónico trealosa, se utilizó 9.35 ml del diluyente base, 0.76 g de trealosa y 0.65 ml de glicerol para obtener 10

ml de solución. Para el dilutor Tris-lactosa se procedió de la misma forma, utilizando 0.76 g de lactosa. Se agregó 1000 µg de dihidro-estreptomina y 1000 UI de penicilina/ml para reducir el potencial de contaminación de microorganismos (Herman *et al.*, 1994). Los dilutores fueron preparados un día antes de la colección del semen y almacenados en refrigeración (Cuadro 1).

El tiempo entre la colección de semen y el inicio de la dilución no fue mayor de 40 minutos. Tanto el semen como el dilutor se mantuvieron en baño maría a 35 °C antes de su dilución. En el tubo con semen se adicionó la misma cantidad de diluyente base, vertiéndola por las paredes del tubo y mezclándolo suavemente. El semen diluido se sometió a un enfriamiento gradual, reduciendo la temperatura de 35 hasta 5 °C en un tiempo aproximado de 30 minutos. Se evaluó el semen diluido y se agregó el diluyente hipertónico (5 °C) por las paredes del tubo en tres fracciones a intervalos de 10 minutos, y se dejó equilibrar por 1.5 a 2 horas.

El semen diluido se envasó en pajillas de 0.5 ml, secándose con papel absorbente y sellándose con alcohol polivinílico.

Congelación y Descongelación del Semen

La congelación del semen se hizo en un tanque de nitrógeno líquido. Las varillas, goblets y canastillas se refrigeraron a 5 °C para evitar cambios de temperatura. El rango de enfriamiento para el semen fue de 50-60 °C/min (Woelders *et al.*, 1997). Se utilizó un termómetro criogénico digital (DIGIsense, Modelo N° 8528-20) para registrar la temperatura inicial y final de congelamiento.

Luego de aproximadamente tres meses, las pajillas fueron descongeladas en un recipiente con agua a 37 °C por 60 segundos. El semen se observó en el microscopio para evaluar la motilidad individual. Además, se realizaron las tinciones respectivas para determinar el porcentaje de espermatozoides vivos.

Análisis Estadístico

Se midió el porcentaje de motilidad y de espermatozoides vivos (postdescongelación). Los datos fueron analizados mediante análisis de varianza para evaluar el efecto de los dilutores sobre el porcentaje de motilidad, así como el porcentaje de espermatozoides vivos post- descongelación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las características seminales de ovinos Pelibuey y Blackbelly reportados en la literatura se muestran en el Cuadro 2, en tanto que los resultados del presente estudio se encuentran en el Cuadro 3. Las diferencias encontradas pueden atribuirse a la variación normal entre individuos, método de colección de semen, factores ambientales y factores subjetivos de los evaluadores.

Se encontró diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre los dos dilutores hipertónicos, encontrándose una mejor res-

puesta en el dilutor que contiene trealosa, en términos de motilidad y porcentaje de vivos postdescongelamiento (Cuadro 4). Aisen *et al.* (1995) trabajando con semen de ovino de la raza Pampita no encontró grandes diferencias entre motilidad inicial (76%) y postdescongelamiento (61%) para el dilutor a base de trealosa, a diferencia de lo encontrado en el presente estudio. Es posible que el deterioro en la motilidad se haya debido a la distancia entre el lugar de muestreo y el lugar de procesamiento de las muestras, así como el manejo de los eyaculados; sin embargo, en otro estudio, usando un crioprotector a base de Tris-Glucosa-Yema de huevo-Glicerol- Trealosa en semen de carnero de diferentes razas, se encontró una motilidad postdescongelamiento de 38.7%, partiendo de una motilidad inicial promedio de alrededor de 90% (Molinia *et al.*, 1994).

La ventaja de la trealosa con respecto a otros criopreservantes se sustenta en la base del efecto protector estabilizante de la membrana celular al interactuar con los fosfolípidos, lo cual se refleja en la integridad acrosomal. Además, tiene un efecto deshidratante por ser un medio hipertónico, resultando en una menor formación de cristales dentro del espermatozoide, permitiendo preservar áreas específicas de membrana, del citoesqueleto y del sistema motriz (Chen *et al.*, 1993; Aisen *et al.*, 1995; Woelders *et al.*, 1997).

CONCLUSIONES

Se concluye que el dilutor hipertónico trealosa muestra un mejor comportamiento en la criopreservación de semen ovino con respecto al dilutor lactosa, posiblemente por el efecto protector de membrana, mejorando las características de motilidad individual y porcentaje de espermatozoides vivos postdescongelamiento.

Cuadro 2. Características seminales reportadas en la literatura científica para ovinos de pelo

	Blackbelly ¹	Pelibuey ²	
Volumen (ml)	1.5 ± 0.1	1.1 ± 0.2	0.6 ± 0.3
Motilidad individual (%)	83.6 ± 1.4	75.3 ± 4.1	87.7 ± 4.6
Concentración espermática (x 10 ⁹ /ml)	3.7 ± 0.2	3.6 ± 1.0	4.2 ± 1.2
Motilidad masal	--	4.2 ± 0.2	--
Espermatozoides vivos (%)	--	89.2	85.4 ± 7.1
Espermatozoides anormales (%)	--	4.5 ± 0.6	13.6 ± 5.2

¹ Quispe *et al.*, 1998² Manco, 1999, y Carmenate y Hernández, 1982, respectivamente

Cuadro 3. Valores seminales de ovinos Blackbelly utilizados como reproductores en el valle de Lima

	Promedio	Máximo	Mínimo
Volumen (ml)	1.1 ± 0.1	1.4	0.8
Motilidad individual (%)	3.5 ± 0.1	3.3	3.8
Concentración espermática (x 10 ⁹ /ml)	87.0 ± 2.4	95	80
Motilidad masal	4.4 ± 0.2	5	4
Espermatozoides vivos (%)	90.2 ± 3.8	95	80
Espermatozoides anormales (%)	1.8 ± 0.7	5	0

Cuadro 4. Efecto de los dilutores Tris-Treosa y Tris-Lactosa en la motilidad individual y porcentaje de espermatozoides vivos post-descongelamiento de semen de ovino Blackbelly

Animal	Dilutor Tris-Treosa			Dilutor Tris-Lactosa		
	Eyaculados (n)	Motilidad (%)	Esperm. vivos (%)	Eyaculados (n)	Motilidad (%)	Esperm. vivos (%)
1	12	47.4 ± 11.0	38.3 ± 9.1	11	25.0 ± 7.6	17.1 ± 6.9
2	11	25.0 ± 7.7	18.5 ± 8.3	12	23.0 ± 8.0	22.8 ± 8.0
3	12	39.5 ± 12.0	33.1 ± 13.1	12	29.0 ± 9.6	25.6 ± 10.3
4	12	48.9 ± 11.5	46.4 ± 16.4	11	43.6 ± 10.9	31.8 ± 11.8
Total	47	40.3 ± 5.9 ^a	34.4 ± 6.6	46	30.0 ± 5.0 ^b	24.3 ± 5.0

^{ab} Superíndices con letras diferentes son significativamente diferentes (p<0.05)

LITERATURA CITADA

1. **Aisen E, Alvarez H, Venturino A, Larreguy D. 1995.** Efecto comparativo de diluyos conservadores de diferente composición y tonicidad sobre la criopreservación del semen de ovino. *Invest Agr Prod Sanid Anim* 10: 223-231.
2. **Álvarez-Córdova J, Patón D, Tovar J, Calero R. 1999.** Respuesta comparada al entrenamiento de moruecos de raza Merino y Merino Precoz para su uso en inseminación artificial. *Arch Zootec* 48: 273-284.
3. **Carmenate C, Hernández J. 1982.** Comportamiento de las características físicas y morfológicas del semen ovino durante las diferentes épocas del año. *Rev Cub Reprod Anim* 8: 45-51.
4. **Chen Y, Foote RH, Brockett CC. 1993.** Effect of sucrose, trehalose, hypotaurine, taurine, and blood serum on survival of frozen bull sperm. *Cryobiology* 30: 423-431.
5. **De Leeuw FE, De Leeuw AM, Den Daas JHG, Colenbrander B, Verkleij AJ. 1993.** Effects of various cryoprotective agents and membrane stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology* 30: 32-44.
6. **Dott HM, Foster GC. 1972.** A technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are eosinophilic in a differential «live/dead» stain. *J Reprod Fertil* 29: 443-445.
7. **Gordon I. 1997.** Controlled reproduction in farm animal's series. In: *Sheep and goats*. Vol 2. CAB International. p 30-133.
8. **Herman HA, Mitchell JR, Doak GA. 1994.** The artificial insemination and embryo transfer of dairy and beef cattle. Danville, Illinois: Interstate Publishers. 382 p.
9. **Malmgren L. 1997.** Assessing the quality of raw semen: A review. *Theriogenology* 48: 523-530.
10. **Manco Y. 1999.** Efecto de la temperatura escrotal sobre el comportamiento sexual y la calidad de semen de ovinos Pelibuey y Merino precoz alemán. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Facultad de Medicina Veterinaria, Univ. Nacional Mayor de San Marcos. 64 p.
11. **Molinia FC, Evans G, Casares PI, Maxwell WMC. 1994.** Effect of monosaccharides and disaccharides in Tris-based diluents on motility, acrosoma integrity and fertility of pellet frozen ram spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 36: 113-122.
12. **Ollero M, Muino-Blanco T, López-Pérez MJ, Cebrián-Pérez JA. 1996.** Viability of ram spermatozoa in relation to the abstinence period and successive ejaculations. *Int J Androl* 19: 287-292.
13. **Quispe F, Cárdenas H, Gutiérrez G, Flores E. 1998.** Algunas características físicas del semen en 4 razas de carneros. En: XII Reunión Científica Anual de la APPA. Puno: APPA. p 157-159.
14. **Salamon S, Maxwell WMC. 1995.** Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Anim Reprod Sci* 37: 185-249.
15. **Sánchez-Partida GL, Winsor DP, Eppleston J, Setchell BP, Chisholm WM. 1999.** Fertility and its relationship to motility characteristics of spermatozoa in ewes after cervical, transcervical, and intrauterine insemination with frozen-thawed ram semen. *J Androl* 20: 280-288.
16. **Woelders H, Matthijs A, Engel B. 1997.** Effects of trehalose and sucrose, osmolality of the freezing medium and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing. *Cryobiology* 35: 93-105.