

Motilidad y daño acrosomal del semen caprino congelado en pajillas de 0.25 ml y 0.5 ml y descongelado a dos diferentes ritmos de temperatura

Javier Valencia Méndez*
Guillermo González Herrera*
Manuel E. González García*
Arturo Trejo González**

Resumen

Se colectaron 16 eyaculaciones de 4 sementales caprinos por medio de la vagina artificial y se evaluaron las siguientes características: volumen, concentración espermática, motilidad progresiva y morfología acrosomal. Cada eyaculado se dividió en dos partes y se diluyó con Tris-Yema de huevo. El semen diluido se envasó en pajillas de 0.25 y 0.5 ml, cada una conteniendo 100 millones de espermatozoides móviles. Las pajillas se congelaron en vapores de nitrógeno líquido y se descongelaron a 37°C/15 seg. o a 55°C/8 seg. En las muestras descongeladas se determinó la motilidad progresiva, la recuperación de espermatozoides móviles y el daño acrosomal. La motilidad progresiva al descongelar las pajillas de 0.5 ml fue de 62.8% (37°C/15 seg) y 58.7% (55°C/8 seg) y en la pajilla de 0.25 ml de 59% (37°C/15 seg) y 60% (55°C/8 seg) ($P > 0.05$). El daño acrosomal fue mayor (12.3%) en las pajillas de 0.5 ml descongeladas a 55°C/8 seg que en los demás tratamientos ($P < 0.05$). La descongelación del semen caprino a 37°C/15 seg es una técnica más sencilla a nivel de campo e implica menor riesgo. La motilidad progresiva y el porcentaje de daño acrosomal del semen caprino obtenidos en este trabajo, se encuentran dentro de los criterios establecidos para su aplicación en la inseminación artificial.

Introducción

La inseminación artificial es una de las biotecnologías de mayor relevancia en los últimos años, pues permite un rápido avance genético, especialmente en los animales productores de leche, mediante la realización de las pruebas de progenie y el mejor aprovechamiento de los sementales con características productivas superiores.⁴

Recibido para su publicación el 14 de abril de 1993

*Departamento de Reproducción. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. 04510, México, D.F.

**Departamento de Ciencias Pecuarias. Facultad de Estudios Superiores, Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México. Km 3 de la Carretera Cuautitlán-Teoloyucan. 54700, Edo. de México.

Sin embargo, en caprinos su uso ha sido limitado en comparación con otras especies, debido, entre otros factores, a la dificultad para congelar y descongelar el semen, ya que algunos diluyentes pueden resultar tóxicos para los espermatozoides y, tanto al congelar como al descongelar, se disminuye la motilidad progresiva y se incrementa la cantidad de acrosomas dañados.^{9, 17}

Los diluyentes basados en sustancias amortiguadoras, como el hidroximetilaminometano (Tris) y la yema de huevo, parecen ser apropiados para la congelación del semen en esta especie.^{5, 8, 9} Recientemente se utilizó una fórmula nueva de un diluyente Tris-Yema de huevo en el congelamiento del semen caprino, con buenos resultados, utilizando como envase el minitubo,²⁴ presentación que no existe en México, siendo más común en el país el uso de pajillas francesas de 0.25 ml y 0.5 ml.

Por otra parte, las temperaturas y velocidades de congelamiento y descongelado son críticas para la fertilidad del semen. Se menciona como norma general que mientras más rápido se congele y se descongele el semen se obtendrá la mejor recuperación espermática.^{9, 13} En el semen caprino existe información sobre los tiempos y temperaturas adecuados para la descongelación lenta,^{6, 7, 9} pero no en cuanto a la descongelación rápida que se ha usado en otras especies.^{9, 13}

Por lo anterior, se diseñó el presente trabajo para determinar la motilidad y porcentaje de daño acrosomal del semen caprino diluido en un medio a base de Tris-Yema de huevo, congelado en pajillas francesas de 0.25 y 0.5 mililitros. Además se probaron dos diferentes ritmos de descongelación para los dos tipos de pajilla.

Material y métodos

El presente estudio se realizó en el Departamento de Reproducción e Inseminación Artificial y en el Centro Nacional para la Educación, Investigación y Extensión de la Zootecnia de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, situado en Tepozotlán, Estado de México. Se seleccionaron cuatro sementales caprinos de las siguientes razas: 2 Anglo-Nubia, 1 Alpino y 1 Saanen. La obtención del semen se realizó con vagina artificial dos veces por semana durante dos semanas, obteniéndose

en total 16 eyaculados. La vagina artificial se mantuvo a una temperatura interna de 42-45°C; el tubo colector estéril estaba graduado en mililitros con marcas mínimas de 0.1 ml y tenía una temperatura de 30-37°C al momento de recibir el eyaculado.^{3, 9, 10, 16}

Después de colectar el semen se igualó su temperatura con la del diluyente, manteniéndolos en el mismo baño María a 37°C. Se tomó una gota de semen para ser analizada e inmediatamente después se hizo una dilución 1:1 (semen: diluyente), para evitar la deshidratación del eyaculado y protegerlo contra el choque por frío.^{9, 10}

En los eyaculados se evaluaron las siguientes características: volumen, motilidad progresiva, concentración espermática y morfología acrosomal.

El volumen de eyaculado se midió directamente en el tubo colector graduado.

La motilidad progresiva se evaluó poniendo una gota de semen sobre un portaobjetos con su respectivo cubreobjetos, mantenidos a 37°C y observando al microscopio con el objetivo seco fuerte 40X. Se discriminaron los espermatozoides con movimiento rectilíneo de aquellos inmóviles o con movimiento circular; el resultado se estimó en porcentaje en escala de 0-100%. Se eliminaron aquellas muestras con menos del 60% de motilidad progresiva.^{7, 12}

La concentración espermática se determinó con el hematocitómetro de Spencer, utilizando una dilución 1:200 (semen: solución) en solución salina al 3% con formaldehído, para inmovilizar a los espermatozoides.¹⁴

El daño acrosomal se evaluó siguiendo la técnica descrita por Hancock.¹² Se tomó 0.01 ml de semen que se diluyó en 3.0 ml de solución de Hancock; se colocó una gota de esta dilución en un portaobjetos con su respectivo cubreobjeto y se observó al microscopio en objetivo de inmersión 100X. Se diferenciaron los espermatozoides con borde acrosomal normal de aquellos con alguna alteración; se contó un total de 100 espermatozoides y el resultado se expresó en porcentaje.^{2, 25}

Una vez estimado el volumen, el porcentaje de motilidad progresiva y la concentración espermática, se dividió el eyaculado en dos partes, cada una de las cuales se diluyó, de manera que al envasarlo en las pajillas de 0.25 ml y 0.5 ml, cada una contuviera 100 millones de espermatozoides móviles.^{9, 15, 21}

El diluyente utilizado fue el descrito por Velasco,²⁴ que se preparó de la siguiente manera:

Solución madre:

TRIS (Hidroximetilaminometano)	18.020 g
D-Glucosa	9.978 g
Acido cítrico	7.440 g
Agua bidestilada	500.000 ml

De la solución madre se tomaron 35 ml a los que se les añadieron 10 ml de yema de huevo, 3.5 ml de glicerol, 1.5 ml de agua bidestilada y 0.03 ml de pasta Orvus.*

Una vez llenas las pajillas se sellaron con alcohol polivinílico, teniendo la precaución de dejar una burbuja de aire, para evitar su estallamiento al congelar o descongelar.

Inmediatamente después, las pajillas se enfriaron en un refrigerador en posición horizontal, envueltas en una toalla de papel y se mantuvieron en un periodo de equilibrio de 2 horas a 5°C.^{5, 6} Transcurrido este tiempo se vació nitrógeno líquido en una caja de poliestireno y se procedió a congelar las pajillas colocándolas en una rampa, en posición horizontal, a 5 cm arriba del nitrógeno líquido durante 10 minutos.²⁵ Después se sumergieron en el nitrógeno líquido a -196°C y se almacenaron por 30 días.

El número total de pajillas descongeladas fue de 288, de las cuales 72 se asignaron a cada uno de los siguientes tratamientos: en el primero (pajilla de 0.5 ml) y tercer grupos (pajilla de 0.25 ml) se descongelaron a 37°C durante 15 segundos y en el segundo (pajilla de 0.5 ml) y cuarto grupos (pajilla de 0.25 ml) a 55°C durante 8 segundos. En las muestras descongeladas se evaluó la motilidad progresiva de manera similar al semen fresco y se estimó la recuperación de motilidad progresiva. Además, se evaluó el porcentaje de daño acrosomal del mismo modo que en el semen fresco.

Se estimó la variable de recuperación de la motilidad progresiva asignando el valor de 100% a la motilidad del semen fresco y la motilidad al descongelado como la proporción resultante.

Los datos se analizaron estadísticamente mediante análisis de varianza, utilizando la motilidad del semen fresco o el daño acrosomal del semen fresco como varianza y transformando los valores expresados en porcentaje al arco seno,²² utilizando el siguiente modelo:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + (BMI_{ij} - MI_{ij}) + E_{ij}$$

Donde

Y_{ij} = Variable de respuesta (motilidad progresiva, recuperación de la motilidad progresiva y daño acrosomal para el i -ésimo tratamiento de descongelado con la j -ésima motilidad progresiva inicial

μ = Media poblacional constante

T_i = Efecto del i -ésimo tratamiento de descongelado ($i = 1, 2$)

$(BMI_{ij} - MI_{ij})$ = Efecto de la motilidad inicial o del daño acrosomal inicial utilizados como covarianza

E_{ij} = Error aleatorio asociado a cada observación \sim NID $(0, \sigma^2)$

Resultados

Después de descongelar, la motilidad progresiva tuvo un rango de 58.7 a 62.7%, sin diferencias significativas ni para el tipo de pajilla utilizado ni para la velocidad de descongelamiento ($P > 0.05$) (Cuadro 1).

Lo mismo ocurrió para la recuperación de la motilidad progresiva, que presentó un rango de 73.6 a 78.5% ($P > 0.01$) (Cuadro 1).

En cuanto al daño acrosomal, en las pajillas de 0.25 ml no hubo diferencia entre el descongelado a 37°C durante 15 segundos y 55°C durante 8 segundos con 10.4% y 10% respectivamente ($P > 0.05$); empero, en las pajillas de 0.5 ml el descongelado a 37°C durante 15 segundos tuvo menor daño acrosomal (9.2%), que el descongelado a 55°C durante 8 segundos (12.3%) ($P > 0.05$) (Cuadro 1).

*Pasta Orvus. Proctec and Gamble, Ohio, Cleveland

El grado de dilución del semen fue de 1:3.4 para la pajilla de 0.25 ml y de 1:7.8 para la de 0.5 ml.

No se observó ningún efecto tóxico del diluyente al mezclarlo con el semen. Tampoco ocurrió el estallamiento de ninguna pajilla al congelar o descongelar.

En este trabajo la motilidad progresiva es ligeramente inferior al 66% publicada por Ritar y Salomon¹⁷ y al 68.4% obtenido por Deka y Rao⁸ para semen descongelado, los cuales usaron un diluyente a base de Tris; sin embargo, coinciden con el 60% informado por Deka y Rao en otro trabajo.⁷

Cuadro 1
MOTILIDAD PROGRESIVA Y DAÑO ACROSOMAL DEL SEMEN CAPRINO CONGELADO EN PAJILLAS DE 0.25 ml Y 0.5 ml Y DESCONGELADO A DOS DIFERENTES RITMOS DE TEMPERATURA

Tratamiento	Pajilla de 0.5 ml descongelada a 37°C durante 15 segundos	Pajilla de 0.5 ml descongelada a 55°C durante 8 segundos	Pajilla de 0.25 ml descongelada a 37°C durante 15 segundos	Pajilla de 0.25 ml descongelada a 55°C durante 8 segundos
Número de eyaculados	8	8	8	8
Número de pajillas descongeladas	72	72	72	72
Motilidad progresiva descongelado	62.7%	58.7%	59.0%	59.9%
Recuperación de la motilidad progresiva descongelado	78.5%	73.6%	73.9%	73.6%
Daño acrosomal descongelado	9.2% a	12.3% b	10.4% ab	10.0% a

Letras diferentes en las columnas representan significancia estadística ($P < 0.05$)

Discusión

Cuando el semen es sometido a un proceso de congelación se presenta un abatimiento de la calidad espermática, que se manifiesta principalmente en una disminución de la motilidad. Este fenómeno se atribuye, en mayor grado, a una alteración de los componentes celulares aunado a un trastorno en el intercambio iónico, involucrando al potasio y quizá a los fosfatos presentes en los diluyentes.¹

Aunque no existe un solo parámetro que considerado aisladamente permita evaluar la capacidad fertilizante del semen,²⁰ la motilidad progresiva de los espermatozoides y el daño acrosomal son considerados como los mejores indicadores.^{9, 24}

La congelación de semen en diferentes presentaciones, como son las pajillas de 0.25 ml y 0.5 ml, implica cambios en el volumen y superficie de la pajilla, en la concentración espermática/volumen, en el grado de dilución, y por lo mismo en el ritmo de congelación. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la motilidad progresiva al descongelar en ningún tratamiento.

En cuanto a la recuperación de la motilidad progresiva, Grajales¹¹ obtuvo 59% con pajillas de 0.5 ml y un diluyente Tris-Yema de huevo, resultados inferiores a los de este trabajo, donde la recuperación tuvo un rango de 73.6 a 78.6% (Cuadro 1).

Junto con la motilidad progresiva, las pruebas de rutina para el semen fresco deben incluir el examen de la morfología de la membrana acrosomal, que se puede hinchar o romper,²⁵ disminuyendo la capacidad fecundante de los espermatozoides. Es importante destacar que el daño acrosomal suele ser independiente de la motilidad progresiva, por lo que espermatozoides con buen movimiento pueden ser incapaces de fecundar, debido a posibles alteraciones del acrosoma que libera antes de tiempo las enzimas necesarias para penetrar al ovocito.²⁵

El daño acrosomal encontrado en los diferentes tratamientos (Cuadro 1) es inferior a lo informado por otros investigadores, de 12.3%,⁷ 13.8%⁶ y 34%.¹⁷

Debido a que las dosis de semen en el caprino deben contener un elevado número de espermatozoides en un reducido volumen, la proporción semen/diluyente o grado de dilución puede afectar la sobrevivencia de

los espermatozoides.²¹ Se menciona que si la relación es baja, de 1:1 o 1:2, la motilidad al descongelar es menor que a diluciones de 1:10.²³ De acuerdo con los resultados, no se encontró diferencia significativa en la motilidad progresiva de los espermatozoides congelados en la pajilla de 0.25 ml, en las que el grado de dilución promedio fue de 1:3.4, en comparación con las de 0.5 ml de 1:7.8. Al parecer las diluciones usadas proporcionan suficiente diluyentes, como para proteger de manera adecuada a los espermatozoides durante el proceso de congelación.

Algunos autores observaron efectos tóxicos en el semen caprino ocasionados por la yema del huevo del diluyente.^{5,7,11} La enzima fosfatidasa, producida por las glándulas bulbouretrales, cataliza la hidrólisis de las lecitinas de la yema del huevo a ácidos grasos y lisolecitinas, siendo estas últimas las responsables de la toxicidad.^{1,18} Para evitar este efecto tóxico se recomienda que el contenido de yema de huevo en el diluyente no rebase el 2%, o extraer el plasma seminal por centrifugación.⁹ Al diluir los eyaculados no se observó ningún caso de toxicidad, incluso cuando la proporción de la yema de huevo en el diluyente era de 20%.

Si bien algunos investigadores han obtenido buenos resultados con la descongelación rápida,^{5,6,13,21} en este estudio no se encontraron diferencias en cuanto a la motilidad progresiva al descongelar rápida o lentamente; incluso el menor daño acrosomal se encontró en las pajillas de 0.5 ml con descongelación lenta. La descongelación rápida tiene la desventaja de que a nivel de campo es difícil mantener el agua a temperaturas altas, además de que se corre el riesgo de dañar al semen si se expone a altas temperaturas por mayor tiempo. Por lo mismo, la descongelación lenta a 37°C es más adecuada. Otros autores han conseguido una buena recuperación espermática al descongelar a 37-40°C durante 15 a 60 seg.¹⁹

La congelación del semen caprino en los vapores de nitrógeno utilizando una caja de poliestireno es una técnica de campo, sencilla y barata, que proporciona buenos resultados.

Los parámetros de motilidad progresiva y daño acrosomal obtenidos con los métodos y condiciones del presente trabajo, se encuentran dentro de los criterios considerados^{8,20} para su aplicación en la inseminación artificial de la cabra.

Abstract

Sixteen ejaculates from 4 bucks were collected with an artificial vagina in order to evaluate volume, sperm concentration, progressive motility and acrosomal morphology. Split ejaculates were diluted and packaged in 0.25 and 0.5 ml straws, each containing 100 million motile sperms. Straws were frozen in liquid nitrogen vapour and thawed at 37°C/15 sec or 55°C/8 sec. Progressive motility, percentage of motility recovered and acrosomal damage was determined in thawed samples. Progressive motility after thawing was 62.8% in the 0.5 ml straws (37°C/15 sec) and 58.7% (55°C/8

sec); 59% in 0.25 ml straws (37°C/15 sec) and 60% (55°C/8 sec); ($P > 0.05$). Acrosomal damage was higher (12.3%) in 0.5 ml straws thawed at 55°C/8 sec, than in the other groups ($P < 0.05$). Thawing at 37°C/12 sec is simpler and implies less risk. Progressive motility and acrosomal damage of the thawed semen found in this study proved to be similar to the standards established for artificial insemination in this species.

Literatura citada

1. Aamdal, J., Lyngset, O. and Fossum, K.: Toxic effect of lysolecithin on sperm. *Nord. vet. Med.*, 17: 633-639 (1965).
2. Bustamante, C.G. y Valencia, J.: Acción del sulfóxido de dimetilo y glicerol como agentes crioprotectores del acrosoma del espermatozoide de carnero durante la congelación. *Vet. Méx.*, 12: 211-216 (1981).
3. Corteel, J.M.: Collection, processing and artificial insemination of goat semen. In: Goat Production. Edited by: Gall, C., 171-191. Academic Press, London, 1981.
4. Dalton, D.C.: An Introduction to Practical Animal Breeding. Granada, London, 1980.
5. Deka, B.C. and Rao, A.R.: Effect of glycerol level in TRIS based extender and equilibration period on quality of frozen goat semen. *Indian vet. J.*, 54: 223-238 (1984).
6. Deka, B.C. and Rao, A.R.: Effect of extenders of freezability of buck semen. *Indian J. Anim. Sci.*, 55: 1035-1040 (1985).
7. Deka, B.C. and Rao, A.R.: Effect of extenders on sperm motility and acrosomal integrity of frozen buck semen. *Indian vet. J.*, 62: 414-417 (1985).
8. Deka, B.C. and Rao, A.R.: Effect of storage at -196°C on quality of frozen goat semen with and without seminal plasma in Tris-based extenders. *Cheiron*, 16: 65-69 (1987).
9. Evans, G. and Maxwell, W.M.C.: Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats. Butterworths, Canberra, Australia, 1987.
10. Foote, R.H.: Inseminación artificial. En: Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. 4a ed. Editado por: Hafez, E.S.E., 497-520. Interamericana, México, D.F., 1986.
11. Grajales, L.H.A.: Comparación de la fertilidad entre diluyentes para semen y hormonas para controlar la ovulación en cabras inseminadas artificialmente con semen fresco y congelado. Tesis de maestría. *Fac. de Est. Sup. Cuautitlán*. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuautitlán, Estado de México, México, 1990.
12. Hancock, J.L.: The spermatozoa of sterile bulls. *J. exp. Biol.*, 30: 50-56 (1953).
13. Jondet, R.: The rapid freezing of bull semen conditioned in straws. Vth International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination. Trento, Italy, 1968. *Animal Reproduction and Artificial Insemination Association*. Trento, Italy (1968).
14. Moss, J.A., Melrose, D.R., Reed, H.C.B. and Vandeplasche, M.: Spermatozoa, semen and artificial insemination. In: Fertility and Infertility in Domestic Animals. 3rd ed. Edited by: Laing, J.A., 59-91. Baillere Tindall, London, 1979.
15. Mushtaq, A., Katherine, N.B. and Ott, R.S.: Effect of washing on motility and acrosome morphology of frozen-thawed goat spermatozoa. *Am. J. vet. Res.*, 46: 473-475 (1985).
16. Noriega, N.L.F.: La inseminación artificial en caprinos. *Ganadero*, 9(5): 70-76 (1984).
17. Ritar, A.J. and Salamon, S.: Fertility of fresh and frozen thawed semen of the Angora goat. *Aust. J. Biol. Sci.*, 36: 49-59 (1983).
18. Roy, A.: Egg yolk coagulating enzymes in the semen and Cooper's gland of the goat. *Nature*, 179: 318-319 (1957).
19. Sahni, K.L. and Tiwari, S.B.: Caprine semen evaluation, processing and artificial insemination in India. Proceedings of the Vth International Conference on Goats. Mathura, India. 1992. 94-107. R.R. Lokeshwar. New Delhi (1992).

20. Salamon, S.: Assessment of frozen-thawed semen. In: Artificial Breeding of Sheep with Frozen Semen. Workshop. Edited by: Maxwell, W.M.C., 5-11. *Department of Agriculture*, Glen Osmond, South Australia, 1987.
21. Salamon, S. and Ritar, A.J.: Deep freezing of Angora goat semen: Effects of diluent composition and method and rate of dilution on survival of spermatozoa. *Aust. J. Biol. Sci.*, 35: 295-303 (1982).
22. Steel, R.G.D. and Torrie, J.H.: Principles and Procedures of Statistics. A Biometrical Approach. 2nd ed. *McGrawHill*, London, 1980.
23. Tiwari, S.B., Sharma, R.P. and Roy, A.: Effects of dilution on the preservation of ram and goat spermatozoa viability. *Indian J. vet. Sci.*, 38: 567-573 (1968).
24. Velasco, P.J.: Die Bedeutung verschiedener Samenvorbehandlungen für die Tiefgefrierkonservierung von Ziegenbocksperma. Tierärztliche Dissertation. *Tierärztliche Hochschule Hannover*. Hannover, Germany, 1985.
25. Watson, P.F. and Martin, I.C.A.: A comparison of changes in the acrosomes of deep-frozen ram and bull spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, 28: 99-101 (1972).