

Motilidad y fertilidad del semen de carnero descongelado a dos diferentes ritmos de temperatura

Rosa Bertha Angulo Mejorada*

Antonio Ortíz Hernández*

José Manuel Berruelos Villalobos**

Deborah Feldman Steel***

Javier Valencia Méndez***

Abstract

The aim of the study was to compare the effect of two temperatures and thawing rates on motility and fertility of frozen ram semen. A total of 208 ewes and 13 rams of different breeds were used. Semen was collected with an artificial vagina, and it was evaluated, diluted with a Tris -citric acid-fructose-glycerol-yolk extender and centrifugated at 200g/15 min. The sediment was then resuspended with the same extender. Diluted semen was frozen in 0.25 ml straws containing 300 millions of motile sperm. Post-thaw motility was evaluated in 212 straws which were thawed in a water bath at 36°C/8 sec (Group 1) or 70°C/4 sec (Group 2), and another 208 straws were used for intracervical insemination of ewes. Ewes lambed (%) per ewes inseminated with semen thawed at different rates was also evaluated. Post-thaw motility was 51.28 and 47.98% for Groups 1 and 2, respectively, and fertility was 30.7 and 29.2% for the same groups, respectively, without differences between groups (C^2 ; P>0.05). Thawing straws at 36°C/8 sec is a more practical and safer method.

KEY WORDS: ram, frozen semen, fertility, thawing

Resumen

El objetivo del presente trabajo fue comparar el efecto de dos temperaturas y tiempos de descongelación sobre la motilidad y fertilidad del semen del ovino. Se utilizó un total de 208 ovejas y 13 carneros de diferentes razas. El semen se obtuvo por medio de una vagina artificial. Se evaluó, se diluyó con Tris -ácido cítrico-fructosa-glicerol-yema de huevo y se centrifugó a 200 g/15 min; el paquete celular se resuspendió con el mismo diluyente. El semen diluido se congeló en pajillas francesas de 0.25 ml con 300 millones de espermatozoides móviles. Se determinó la motilidad al descongelamiento en 212 pajillas descongeladas en baño María a 36°C/8 seg (grupo 1) o a 70°C/4 seg (grupo 2) y otras 208 dosis se utilizaron en la inseminación artificial de las ovejas por vía intracervical. Se determinó el porcentaje de ovejas paridas/ovejas inseminadas con semen descongelado a diferentes ritmos. La motilidad al descongelar fue de 51.28% y 47.98% en el semen descongelado de los grupos 1 y 2, respectivamente, y la fertilidad de 30.7% y 29.2%, para los mismos grupos, respectivamente, sin que existiera diferencia significativa entre grupos (C^2 ; P>0.05). Se concluye que la descongelación de las pajillas a 36°C durante 8 segundos es un método más práctico e inocuo.

PALABRAS CLAVE: carnero, semen congelado, fertilidad, descongelamiento.

Recibido el 18 de diciembre de 1998 y aceptado el 10 de mayo de 1999.

*Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Ovina, Km 53.2, Carretera Federal México-Cuernavaca, Huitzilac, Morelos, México.

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

***Departamento de Reproducción, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F. e mail: jjvm@servidor.unam.mx

En los últimos años ha aumentado el interés en el uso de la inseminación artificial (IA) en los ovinos, con el fin de mejorar los sistemas de explotación, así como la calidad genética de la especie. Los métodos tradicionales de la IA con semen fresco en ovinos tienen la limitante de tener que utilizar un carnero que se encuentra en lugares apartados, lo que reduce el número de ovejas por inseminar.^{1,2} Además, el estrés que se produce con el transporte, tanto del macho como de las hembras, disminuye el porcentaje de fertilidad.²

Con la técnica del congelamiento del semen se incrementan las posibilidades de utilizar la IA y se facilita el desarrollo de programas tendientes a mejorar esta especie, además la calidad genética de los ovinos se vería acelerada y el costo de la adquisición de sementales sería inferior al necesario.² Esto es principalmente importante en las regiones tropicales.³

El semen de ovino presenta una aceptable supervivencia espermática al proceso de descongelado.⁴ Se ha encontrado que el índice de concepción con semen descongelado es, por lo menos, 20% inferior al logrado con semen fresco, encontrándose así una fertilidad del 42.20% en ovejas inseminadas con semen descongelado a 36°C durante 8 segundos.⁵

Entre las causas que afectan la viabilidad del semen congelado está la formación de hielo intracelular, tanto en la congelación como en la descongelación; los espermatozoides pueden sufrir la pérdida de la integridad de las membranas celulares, así como una inactivación de 20% de enzimas acrosomales y la pérdida de fosfolípidos.^{2,3,6,7,8} Los espermatozoides tienen mejor recuperación si un crioprotector está presente en el medio que los suspende al congelar y al descongelar.⁹

El daño celular de los espermatozoides congelados con glicerol es menor que el producido al utilizar otros crioprotectores como el DMSO.^{3,6,7,9,10} La concentración del glicerol, requerida para proteger a un máximo de espermatozoides, se determina mediante la velocidad del enfriamiento y del descongelamiento.⁶ El glicerol utilizado como crioprotector reduce la formación

del hielo intracelular y evita la muerte de los espermatozoides.^{2,3,5,6,7}

Estudios recientes han demostrado que la concentración de 5% de glicerol en el diluyente es la óptima para la protección de los espermatozoides del carnero.^{6,10} Otros puntos que deben tomarse en cuenta son la temperatura y el tiempo de descongelado.

Se ha encontrado que es mejor descongelar a temperatura de 65°C que a 40°C, ya que a medida que se incrementa la temperatura de descongelación, aumenta el porcentaje de motilidad espermática y disminuye el número de espermatozoides con daño acrosomal,^{1,10,11,12,13} sin embargo, no se sabe qué tanto afecta a la fertilidad.

Algunos investigadores mencionan que el descongelar las pajillas de 0.5 ml a temperaturas de 75°C durante 12 segundos, es mejor que descongelar a 35°C durante 30 segundos.^{11,13} Por otro lado, hay autores que recomiendan descongelar las pajillas a una temperatura semejante a la del aparato reproductor de la hembra, de 36°C a 38°C^{5,10} sin que exista un acuerdo sobre este punto.

Son muy pocas las investigaciones en las que se han comparado diferentes temperaturas y tiempos para la descongelación del semen del carnero, por lo que el presente trabajo tiene como finalidad, determinar entre dos tratamientos diferentes el efecto que muestran la temperatura y tiempo de la descongelación, sobre la motilidad y la fertilidad del semen.

El trabajo fue realizado durante plena época reproductiva en el Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEPIPSA), localizado en el km 29.5 de la Carretera Federal México-Cuernavaca. El CEPIPSA se encuentra ubicado a 19° latitud Norte y 99° longitud Oeste, a 2760 msnm, con una precipitación pluvial de 80 a 1 200 mm anuales y una temperatura promedio de 19°C.¹⁴

Se utilizaron 208 ovejas y 13 carneros de las razas Suffolk, Polled Dorset, Tabasco, Finnish Landrace y Hampshire. Se obtuvo un total de 43 eyaculados por medio de una vagina artificial. La evaluación de los

CUADRO 1

PORCENTAJES DE FERTILIDAD EN OVEJAS INSEMINADAS CON SEMEN DESCONGELADO A DOS DIFERENTES RITMOS

Tratamiento	Número de hembras inseminadas	Número de hembras paridas	Porcentaje de fertilidad
Semen descongelado a 36°C durante 8 segundos	143	44	30.8
Semen descongelado a 70°C durante 4 segundos	65	19	29.2
Total	208	63	30.3

eyaculados se realizó tomando en cuenta los siguientes puntos: volumen, motilidad (movimiento en masa y movimiento progresivo), concentración y morfología espermática.³

Esta evaluación se realizó con un microscopio óptico y condicionando una botella plana con agua a 38°C, a modo de termoplata. Sólo se utilizaron aquellos eyaculados con una concentración mayor a 2 000 millones de espermatozoides por mililitro, con un movimiento progresivo no menor a 60% y con menos del 20% de anomalías morfológicas.

Para el procesamiento del semen se usó una técnica descrita para el caprino que consiste en realizar un lavado del semen previo a la dilución final, con el objeto de eliminar el plasma seminal¹⁵. De manera que una vez evaluado el eyaculado fue diluido en una proporción de 1:9 utilizando el diluyente de Tris (Tris [Hidroximetil] amino metano, 36.05 g; ácido cítrico, 20.2 g; fructosa, 14.88 g; agua bidestilada, 100 ml), adicionando 20% de yema de huevo y 5% de glicerol.¹⁵ Posteriormente fue centrifugado a 200 g durante 15 minutos. Ya centrifugado, el sobrenadante se decantó dejando el paquete de los espermatozoides; y éste fue aforado al volumen final necesario para envasar 300 x 10⁶ espermatozoides móviles en pajillas francesas de 0.25 ml.

Las pajillas fueron sumergidas en un recipiente de poliuretano con agua a 22°C y se introdujeron al refrigerador (0°C) durante 2 horas, tiempo en el que paulatinamente el semen alcanzó la temperatura de 5°C sin sufrir choque térmico.⁴ Transcurrido este periodo de equilibrio, las pajillas se expusieron a vapores de nitrógeno líquido a una distancia de 4.5 cm sobre el nitrógeno, durante 10 minutos.⁴

Ya congeladas las pajillas se introdujeron directamente al nitrógeno líquido del termo (-196°C) y se almacenaron aproximadamente un mes, hasta el día en que se utilizaron.

Las pajillas se descongelaron en baño María a dos diferentes temperaturas: a 36°C durante 8 segundos o a 70°C durante 4 segundos.¹

De las 426 pajillas obtenidas de los eyaculados solamente se usaron 420. En 212 se evaluó la recuperación de los espermatozoides al descongelar a las dos diferentes temperaturas y tiempos, este procedimiento se hizo observando el movimiento progresivo de los espermatozoides al microscopio. De las dosis restantes, 208 fueron descongeladas también a las temperaturas y tiempos mencionados, y con ellas se inseminaron a las hembras que presentaron el celo. La detección de calores se realizó por la mañana (7:00) y por la tarde (15:00) con machos vasectomizados, provistos de un mandil. Las hembras que presentaron celo en la mañana se inseminaron en la tarde y las que lo presentaron en la tarde se inseminaron en la mañana del día siguiente.¹⁶

La IA se realizó utilizando un espéculo de pico de pato con iluminación propia; el semen se depositó lo más profundamente posible dentro del canal cervical.

Durante los 45 días que duró el empadre se inseminó un total de 208 hembras, 143 con semen descongelado a

36°C durante 8 segundos y 65 con semen descongelado a 70°C durante 4 segundos. La evaluación de la fertilidad se llevó a cabo tomando en cuenta el número de ovejas paridas. Para evaluar la recuperación espermática y la fertilidad después de la descongelación, se utilizó la Prueba de Ji-cuadrada.¹⁷

Se observó que el promedio de 106 muestras por tratamiento referente al movimiento progresivo en el semen descongelado a 36°C durante 8 segundos fue ligeramente mayor (51.2%) al presentado en el semen descongelado a 70°C durante 4 segundos (47.9%), sin que hubiera diferencia estadística significativa ($P>0.05$) entre los tratamientos.

Con respecto a la fertilidad en términos de porcentaje de ovejas paridas con relación al número de ovejas expuestas, no se encontró diferencia estadística significativa ($P>0.05$) al comparar los dos ritmos de descongelación utilizados (Cuadro 1).

No se encontró diferencia estadística entre dos ritmos de descongelación utilizados, aun cuando diferentes autores mencionan que a medida que se aumenta la temperatura de descongelación, aumenta el porcentaje de movilidad espermática y disminuye el número de espermatozoides con daño acrosomal.^{1,5,11,12,13}

Aamdal y Andersen (11) mencionan un menor porcentaje de espermatozoides muertos al descongelar a altas temperaturas (75°C) que al descongelar a bajas temperaturas (35°C), lo cual no pudo ser detectado en el presente trabajo. Tampoco fue posible encontrar diferencias indicadas por otros autores^{1,5,11,12,13} en favor del incremento de temperatura al descongelar sobre las características seminales.

Existen trabajos con resultados superiores con la descongelación rápida, pero con la observación de que deben considerarse las pequeñas variaciones en el tiempo de descongelación, que pueden provocar daños irreversibles en la supervivencia de los espermatozoides. Por ejemplo, se ha observado hasta 62.0% de motilidad en los espermatozoides descongelados a 65°C durante 6 segundos, y a 70°C durante 4 segundos.^{12,18}

También se ha encontrado que con semen de bovino, no hay diferencias significativas en la motilidad progresiva e integridad del acrosoma cuando descongelen a 35°C o a 75°C.⁶

Con respecto a la fertilidad, Colas⁵ menciona valores de 42.2% en ovejas inseminadas con semen descongelado a 36°C durante 8 segundos, lo que es superior a lo obtenido en este trabajo y a lo informado por Linge,¹⁹ quien obtuvo porcentajes menores (30%) al utilizar la misma temperatura y tiempo de descongelación.

López¹³ menciona que no hay diferencia significativa de fertilidad al inseminar con semen descongelado a 40°C o a 70°C, lo que coincidiría con los resultados del presente trabajo.

En relación con la fertilidad obtenida al inseminar intracervicalmente, los porcentajes de concepción obtenidos (30.7% y 29.2%) se encuentran en los rangos encontrados por diferentes autores.⁴ Se conoce que cuando el semen congelado se deposita

intracervicalmente, la fertilidad es considerablemente menor que con el semen diluido o refrigerado,²⁰ ya que no se establece una población suficientemente grande de espermatozoides viables en el cérvix, y a que el transporte de los espermatozoides a través del aparato genital está alterado.²¹ Este problema se ha solucionado depositando el semen congelado directamente al interior de los cuernos uterinos por medio de la laparoscopia.²²

Por lo anterior se concluye que al no haber diferencia significativa entre los dos ritmos de descongelación, es posible utilizar ambos. Sin embargo, es más recomendable la descongelación a 36°C durante 8 segundos por la facilidad que presenta tanto al obtener esta temperatura como para mantenerla y utilizarla, sobre todo a nivel de campo; además, se evita el riesgo de que por pequeños errores en el tiempo de descongelación, cuando se usan altas temperaturas, provoquen un descongelamiento insuficiente si el tiempo es corto o un daño irreversible a los espermatozoides, si el tiempo se pasa uno o dos segundos. Los resultados obtenidos son preliminares pero permiten definir los siguientes trabajos para comparar raza del semental, de la hembra, edad y otras variables.

Referencias

1. Lillo A. Lambing rates after single insemination of ewe with liquid or deep frozen semen. Proceedings of the 10th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination; 1984 June 10-14; Urbana-Champaign, Illinois. Urbana-Champaign, Illinois: University of Illinois, 1984:372-374.
2. Maxwell WMC. Current problems and future potential of artificial insemination programmes. In: Lindsay DR, Pearce DT, editors. Cambridge (UK): Cambridge University Press, 1984:291-298.
3. Bustamante CG, Valencia MJ. Acción del sulfóxido de dimetilo y glicerol como agentes crioprotectores del acrosoma del espermatozoide de carnero durante la congelación. *Vet Méx* 1981;12:211-216.
4. Salamon S, Maxwell WMC. Frozen storage of ram semen. I Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Anim Reprod Sci* 1995;185-249.
5. Colas G. Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep-frozen ram semen. *J Reprod Fertil* 1975;42:277-285.
6. Fiser PS, Fairfull RW. The effect of glycerol concentration and cooling velocity on cryosurvival of ram frozen in straws. *Ann Rech Centre Cryobiol* 1984;21:542-551.
7. Locksley EM. Differing actions of penetrating and nonpenetrating cryoprotective agents. *Ann Rech Centre Cryobiol* 1978;15:382-390.
8. Reza GG. Daño acrosomal del espermatozoide de bovino congelado en pajilla francesa y en pipeta (tesis de licenciatura). México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1985.
9. Robbins RK, Saacke RG, Chandler PT. Influence of freeze rate, thaw rate and glycerol level on acrosomal retention and survival of bovine spermatozoa frozen in French straws. *J Dairy Sci* 1976;42:145-154.
10. Colas G, Courot M. Production of spermatozoa, storage of semen and artificial insemination in sheep. *Proceedings of the Symposium of Management of Reproduction in Sheep and Goats*; 1977 June 10-14; Madison (WIS). Madison (WIS): University of Wisconsin, 1977:31-40.
11. Aamdal J, Andersen K. Freezing of ram semen in straws. *Proceedings of the 6th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination*; 1968 July 977-980; Paris, France. Paris, France: Committee of the International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, 1968:977-980.
12. De Abreu RM, Berndtson WE, Smith RL, Pickett BW. Effect of postthaw warming on viability of bovine spermatozoa thawed at different rates in French straws. *J Dairy Sci* 1979;62:1449-1454.
13. López PGA. Evaluación de diferentes técnicas para la congelación de semen de ovino. (tesis de maestría). Cuautitlán (Edo. de México) México: Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán (FES- Cuautitlán). UNAM, 1987.
14. García ME. Modificación al sistema de clasificación climática de Köppen. 3a ed. México (DF): Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autónoma de México, 1981.
15. Fougnier JA. Die intrauterine Besamung der Ziege mit tiefgefrorenem Sperma. Drei Jahre praktischer Einsatz. *Zuchthygiene* 1979;14:104-110.
16. Miller SJ. Artificial breeding in sheep. In: Morrow D, editor. *Current therapy in Theriogenology*. Philadelphia: WB Saunders, 1979:947-950.
17. Wayne WD. Bioestadística: base para el análisis de las ciencias de la salud. México (DF): Limusa, 1979.
18. Graham EF, Crabtree BG, Pace MM. Current status of semen preservation in the ram, boar and stallion. *J Anim Sci* 1978;47 (Suppl 2):80-119.
19. Linge F. Field trials with frozen semen. *Anim Breed Abstr* 1973;41:1679.
20. Maxwell WMC, Curnock RM, Logue DN, Reed HCB. Fertility of ewes following artificial insemination with semen frozen in pellets or straws, a preliminary report. *Theriogenology* 1980;14:83-89.
21. Salamon S. Fertility following deposition of equal numbers of frozen-thawed ram spermatozoa by single and double insemination. *Austr J Agric Res* 1977;28:477-479.
22. Killen ID, Caffery GJ. Uterine insemination of ewes with the aid of a laparoscope. *Austr Vet J* 1982;59:95.