

EFFECTO DEL DILUYENTE, DEL TIEMPO Y DE LA ALTURA DE CONGELACIÓN SOBRE LA CALIDAD DEL SEMEN CRIOCONSERVADO DE MACHOS CABRÍOS

Tomás, C., Blanch, E. y Mocé, E.

CITA-IVIA. Apdo. 187. 12400-Segorbe (Castellón). España.

E-mail: moce_eva@gva.es

INTRODUCCIÓN

Para la crioconservación del semen de los machos cabríos se han descrito varios diluyentes y protocolos de congelación (revisado por Leboeuf et al., 2000; Purdy, 2006). Los diluyentes más utilizados son aquellos compuestos por leche descremada (SM) y/o yema de huevo (EY), y que incluyen glicerol como crioprotector permeable. Por otra parte, y debido a las características que presenta el plasma seminal (PS) en esta especie, los protocolos pueden requerir la eliminación del PS (al utilizar diluyentes con SM o con niveles elevados de EY) o no (si se utilizan diluyentes con 1,5-2 % de EY; Ritar y Salamon, 1982). Además, la concentración óptima de glicerol se encuentra entre 4 y 7 % (Leboeuf et al., 2000), y la altura y el tiempo de congelación óptimos cuando se utilizan cajas de poliestireno expandido varía entre 3 y 5 cm sobre la superficie del nitrógeno líquido durante 4-5 minutos a 7-8 minutos (revisado por Leboeuf et al., 2000; Purdy, 2006).

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del tipo de diluyente, tiempo de congelación y altura de congelación sobre la superficie del nitrógeno líquido en la calidad del semen congelado-descongelado de machos cabríos de la raza Murciano-Granadina.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los reactivos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (Madrid, España), excepto el yoduro de propidio (PI) y el SYBR-14, que fueron adquiridos en Invitrogen (Barcelona, España). El diluyente base utilizado fue el Tris- cítrico- glucosa (TCG; Mocé y Graham, 2006). Para la evaluación de las muestras se utilizó el diluyente TCG suplementado con albúmina sérica bovina (BSA 0,6%; p/v). Para la congelación se utilizaron tres diluyentes (concentraciones finales): TCG-20 % yema de huevo (EY)- 4% glicerol (G), TCG- 20% EY- 7% G y TCG- 2% EY- 4% G. Cada uno de los diluyentes tenía dos partes: una sin glicerol para diluir el semen a 22 °C (medio I- MI) y otra con glicerol (con el doble de concentración; medio II- MII) que fue añadida al semen a 5 °C.

Los machos (n=7) pertenecían a la raza Murciano Granadina. El semen fue extraído con una vagina artificial según el protocolo descrito por Silvestre et al. (2004). En cada eyaculado se midió el volumen. La concentración se midió mediante un espectrofotómetro calibrado para caprino en una alícuota diluida (1/400; v/v) con una solución 0,9 % de cloruro sódico (p/v), y la motilidad se evaluó de forma subjetiva a 400 aumentos y 37 °C.

Cuando se utilizaron los diluyentes con 20% EY, el PS fue eliminado previamente a la dilución con MI. Este paso se omitió para el diluyente con 2% EY. Para eliminar el PS, los eyaculados fueron diluidos con TCG (hasta 10 mL), y centrifugados a 22 °C, 500xg, 15 minutos (min). El sobrenadante fue eliminado, el pellet fue resuspendido en 10 mL de TCG y centrifugado en las mismas condiciones. Después el pellet fue resuspendido y se calculó la concentración. Ésta fue ajustada a 200×10^5 espermatozoides/mL con MI, y los tubos se colocaron en un vaso de precipitados con 80 mL de agua a 22 °C, siendo enfriados en una cámara a 5 °C durante 2 horas. Cada muestra fue después diluida (1:1; v/v) con su correspondiente MII atemperado a 5 °C, se equilibraron durante 15 min, y se envasaron en pajuelas de 0,5 mL que se sellaron con PVA. Las pajuelas se congelaron en una caja de poliestireno expandido, sobre el nivel del nitrógeno líquido (altura diferente según el experimento) durante 5 o 10 min, y posteriormente éstas fueron almacenadas en nitrógeno líquido (LN). La descongelación se realizó en baño de agua a 38 °C durante 30 segundos.

En el semen congelado-descongelado, se determinó la integridad de la membrana plasmática mediante tinción dual SYBR14-PI, con un citómetro de flujo Coulter Epics XL-MCL (Beckman Coulter Inc., Miami, FL, EEUU) con un láser argón de 488 nm, según el protocolo descrito por Purdy y Graham (2004). Por otra parte, la motilidad individual se evaluó en una alícuota diluida a una concentración de 15×10^5 espermatozoides/mL con TCG-BSA, mediante un sistema CASA (Computer Assisted Sperm Analysis system; ISAS versión 1.0.17, Proiser, Valencia, España). Para cada análisis se depositaron 5 µL de la

muestra sobre una cámara Makler atemperada a 39 °C y se analizaron un mínimo de 200 espermatozoides.

En el primer experimento, se evaluó el efecto del diluyente (TCG- 20% EY y 4 ó 7% G o TCG- 2% EY- 4% G) y del tiempo de congelación (5 ó 10 min) sobre la superficie del LN (4,5 cm) en la calidad del semen criopreservado. Se utilizaron un total de 6 eyaculados.

En el experimento 2, partimos del protocolo con el que se obtuvieron mejores resultados en el experimento previo (TCG- 20% EY- 4% glicerol, 10 min de congelación), y para cada eyaculado (n=6) se utilizaron distintas alturas de congelación (desde 3 a 8 cm).

Los datos fueron analizados con el programa SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, EEUU) usando un modelo mixto en el que se incluyó el macho como efecto aleatorio. El ajuste Tukey-Kramer se utilizó para evaluar las diferencias entre medias ($P < 0,05$). Para el análisis de espermatozoides móviles totales, móviles progresivos y vivos (membrana plasmática intacta), el diluyente y el tiempo de congelación fueron incluidos como efectos fijos en el experimento 1, ya que su interacción no fue significativa, mientras que en el experimento 2 la altura de congelación fue incluida como efecto fijo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los eyaculados utilizados presentaron un volumen medio de 1,2 mL, una concentración media de 3187×10^6 espermatozoides/mL y 89% de espermatozoides móviles.

Los mejores resultados tras la descongelación se obtuvieron con el diluyente TCG- 20% EY- 4% G (Tabla 1), lo que corrobora resultados previos (Kozdrowski et al., 2007). El mecanismo protector de la yema de huevo reside en sus fosfolípidos y componentes lipoproteicos de baja densidad (Medeiros et al., 2002), y es posible que a bajos niveles de yema este mecanismo protector no actúe adecuadamente. No obstante, los efectos negativos del PS no pueden ser descartados aún cuando se usan bajos niveles de yema, ya que la composición del PS puede variar a lo largo del año y esto puede provocar cambios en la congelabilidad dependiendo de la estación (Cabrera et al., 2005). Es posible que el PS contenga otros factores perjudiciales, aparte de las enzimas que hidrolizan los componentes de la EY y la SM, que también serían eliminados mediante el lavado (Cabrera et al., 2005). Por otra parte, el nivel de glicerol también es importante, ya que de los dos diluyentes con 20% EY, los mejores resultados se observaron cuando éste se utilizó al 4%. Estos resultados corroboran los obtenidos por Ritar y Salamon (1982) con niveles más bajos de EY, quienes observaron mejores resultados al utilizar 4% de glicerol que 2,5 ó 5,5%.

Por otra parte, observamos mejores resultados post-descongelación cuando las pajuelas de 0,5 mL fueron congeladas durante 10 min que durante 5 min, independientemente del diluyente (Tabla 1). Estos resultados fueron inesperados, ya que se han utilizado 5 min en protocolos de congelación para esta especie (Leboeuf et al., 2000). Es posible que 5 min no sean suficientes para las pajuelas de 0,5 mL, aunque sí sea un tiempo adecuado para las pajuelas de 0,25 mL. No obstante, nuestros resultados contrastan con los de otros autores, que obtuvieron buenos resultados post-descongelación (31-54% de espermatozoides móviles) con pajuelas de 0,5 mL congeladas durante 4,5 min a 4 cm del nitrógeno líquido (Gravance et al., 1997). Quizás estas diferencias entre trabajos sean debidas a las razas utilizadas. Con respecto a la altura de congelación, ésta no tiene gran influencia sobre los resultados obtenidos, cuando las pajuelas son congeladas durante 10 min (Tabla 2). Es probable que la altura a la que las pajuelas son congeladas tenga mayor importancia para menores tiempos de congelación, aunque esta hipótesis debería ser estudiada en futuros trabajos.

En conclusión, la calidad *in vitro* del semen congelado de los machos cabríos de la raza Murciano-Granadina es más elevada cuando se utiliza un diluyente TCG- 20% EY- 4% glicerol que cuando se utiliza un 7% de glicerol o un 2% EY. Además, la calidad del semen mejoró cuando las pajuelas de 0,5 mL fueron congeladas durante 10 min, mientras que a este tiempo la altura de congelación no tuvo ningún efecto sobre los parámetros de calidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Cabrera, F., González, F., Batista, M., Calero, P., Medrano, A., Gracia, A. 2005. *Reprod Dom Anim* 40: 191-195. • Gravance C.G., White, C., Robertson, K.R., Champion, Z.J., Casey, P.J. 1997. *Anim Reprod Sci* 49: 37-43. • Kozdrowski, R., Dubiel, A., Bielas, W., Dzięcioł, M. 2007. *Acta Vet Brno* 76: 601-604. • Leboeuf, B., Restall, B., Salamon, S. 2000.

Anim Reprod Sci 62: 113-141. • Medeiros, C.M.O., Forell, F., Oliveira, A.T.D., Rodrigues, J.L. 2002. *Theriogenology* 57: 327-344. • Mocé, E., Graham, J.K. 2006. *J Anim Sci* 84: 826-833. • Purdy, P.H. 2006. *Small Rumin Res* 63: 215-225. • Purdy, P.H., Graham, J.K. 2004. *Cryobiology* 48: 36-45. • Ritar, A.J., Salamon, S. 1982. *Aust J Biol Sci* 35: 305-312. • Silvestre, M.A., Salvador, I., Sanchez, J.P., Gómez, E.A. 2004. *J Anim Sci* 82: 1641-1645.

Agradecimientos: a J. Bernacer por la extracción del semen y a AMURVAL por los animales. Agradecemos la financiación del MICINN (C. Tomás, FPI Ref. BES-2007-17063; Madrid), CAPA (E. Blanch, CAPA, DOGV5324; Valencia) e INIA-CCAA cofinanciado por el Fondo Social Europeo (E. Mocé). E. Mocé está en la actualidad contratada mediante fondos del Subprograma Ramón y Cajal del MICINN (ref. RYC-2010-06162; Madrid).

Tabla 1. Calidad del semen congelado de machos cabríos congelados con distintos diluyentes y durante 5 ó 10 min a 4,5 cm de la superficie del nitrógeno líquido (n=6)

	Móviles totales (%)		Móviles progresivos (%)		Vivos (%)	
	l.s.m.	e.e.	l.s.m.	e.e.	l.s.m.	e.e.
Diluyente						
20 % yema, 4 % gli	15,7 ^a	2,0	9,9 ^a	1,3	15,2 ^a	2,2
20 % yema, 7 % gli	8,3 ^b	2,0	4,8 ^b	1,3	9,7 ^b	2,2
2 % yema, 4 % gli	6,8 ^b	2,0	3,3 ^b	1,3	8,4 ^b	2,2
Tiempo						
5 min	3,1 ^b	1,8	1,7 ^b	1,2	2,6 ^b	2,1
10 min	17,4 ^a	1,8	10,3 ^a	1,2	19,7 ^a	2,1

gli: glicerol; l.s.m.: medias por mínimos cuadrados; e.e.: error estándar; ^{a, b}: dentro de la misma columna y para cada efecto, indican diferencias (P < 0,05).

Tabla 2. Calidad del semen congelado de machos cabríos congelados a distintas alturas de la superficie del nitrógeno líquido durante 10 minutos (n=6)

Altura de congelación (cm)	Móviles totales (%)		Móviles progresivos (%)		Vivos (%)	
	l.s.m.	e.e.	l.s.m.	e.e.	l.s.m.	e.e.
3	58,7	9,6	44,7	8,9	44,0	8,1
4,5	50,2	9,6	37,7	8,9	45,1	8,1
5	55,9	9,6	41,4	8,9	43,4	8,1
6	45,7	9,6	32,9	8,9	43,5	8,1
8	47,2	9,6	31,4	8,9	42,1	8,1

l.s.m.: medias por mínimos cuadrados; e.e.: error estándar.

EFFECT OF FREEZING EXTENDER, FREEZING TIME AND HEIGHT ABOVE THE LIQUID NITROGEN LEVEL ON THE QUALITY OF CRYOPRESERVED BUCK SEMEN

ABSTRACT: Several freezing extenders and protocols have been described for buck semen. The objective of this study was to determine the effect of freezing extender, freezing time and height above the liquid nitrogen (LN) level for buck sperm cryopreservation. In the first experiment, three freezing extenders were compared (two with 20% egg-yolk (EY) and 4 or 7% glycerol, and one with 2% EY and 4% glycerol), and two freezing times (5 or 10 min, 4.5 cm above LN) for 0.5 mL straws. The best results were obtained for the freezing extender containing 20% EY and 4% glycerol, and the best freezing time was 10 min, irrespective of the freezing extender used. In the second experiment, the effect of the height above LN level (from 3 to 8 cm) of 0.5 mL straws frozen for 10 min with an extender containing 20% EY and 4% glycerol on buck sperm quality after thawing was studied. The height did not affect buck sperm quality (total motile sperm varied from 47.2 to 58.7% and live sperm from 42.1 to 44.7 % for the heights studied). In conclusion, the samples frozen with an extender containing 20% EY and 4% glycerol exhibited the highest quality after thawing, and 0.5 mL straws should be frozen during 10 min to achieve optimal results, while for this freezing time the height above the liquid nitrogen level (from 3 to 8 cm) slightly affected the results obtained.

Keywords: goat, freezing extender, freezing protocol.