

EFFECTO DE LA CONSERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES OVINOS EN MEDIO SEMI-SÓLIDO (GEL) A 15° SOBRE SU CAPACIDAD DE PENETRACIÓN DE OOCITOS HOMÓLOGOS

J. Yániz¹, J.I. Martí², M.A. Silvestre¹, J. Folch², P. Santolaria¹, J.L. Alabart², F. López-Gatius³

¹Escuela Politécnica Superior de Huesca, Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Universidad de Zaragoza, Huesca.

²Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria, Departamento de Producción Animal, PO Box 727, Zaragoza;

³Departamento de Producción Animal, Universidad de Lleida, Lleida.

INTRODUCCIÓN

La inseminación artificial (IA) en ovino se ve limitada por la baja fertilidad obtenida tras la inseminación cervical convencional, especialmente cuando se utiliza semen congelado. La utilización de semen refrigerado ofrece ventajas prácticas y económicas: es barato, fácil de manejar y puede ser utilizado en inseminación cervical. Sin embargo, a pesar de los numerosos estudios designados para mejorar los diluyentes líquidos, la inadecuada conservación del semen es todavía un obstáculo para la utilización extensiva de semen fresco en programas de IA ovina.

En un trabajo previo realizado en conejos demostramos que la adición de 1,4 g/100 ml de gelatina al diluyente mantenía la capacidad fecundante de los espermatozoides durante 72 h. Por tanto, la utilización de diluyentes semi-sólidos puede ser una alternativa interesante a la conservación convencional del semen en medio líquido. El objetivo de este estudio fue investigar los beneficios del almacenamiento del semen en medio semi-sólido a 15°C sobre la tasa de penetración in vitro de oocitos ovinos maduros, tras 24 horas de almacenamiento del semen.

MATERIAL Y MÉTODOS

Todos los reactivos se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), salvo que se indique lo contrario, y los diluyentes se realizaron con agua Milli-Q (Millipore Ibérica S.A., Barcelona). El diluyente líquido estándar (CONTROL) era leche UHT desnatada (0,7% de grasa) mas antibióticos (2000 IU/ml penicilina y 0.4 mg/ml estreptomycin) (Evans y Maxwell, 1987). El diluyente GEL para almacenamiento sólido se preparó mediante la adición de 1.5 % (w/v) gelatina tipo A, 240° Bloom, al diluyente líquido estándar.

El semen se recogió mediante vagina artificial de 4 moruecos adultos de la raza Rasa Aragonesa alojados en las instalaciones del CITA-DGA, siguiendo un manejo nutricional uniforme. Para evitar diferencias individuales, en cada ensayo se utilizó una mezcla del

segundo eyaculado de los 4 moruecos. La concentración de la mezcla se calculó colocando 6 µl de en una cámara de Neubauer, y contando por duplicado a 100X. Las muestras de semen se diluyeron con los diluyentes mencionados hasta 400×10^6 de espermatozoides/ml, y se almacenaron en pajuelas de 0.25 ml a 15° C en un Equitainer®. La dilución se realizó a 30° C tanto en el diluyente Control como en el Gel.

El test de penetración in vitro de oocitos homólogos (hIVP) se realizó de la siguiente manera: tras recoger en un matadero ovarios de corderas de entre 80 y 90 días de edad, se transportaron al laboratorio en menos de 30 minutos en una solución salina a 37°C. Los complejos cúmulos-oocito (COCs) se recogieron de folículos entre 2-6 mm de diámetro mediante punción folicular. Los oocitos con al menos tres capas de células de la granulosa y citoplasma homogéneamente granulado se seleccionaron bajo un estereoscopio y se lavaron cuatro veces en Hepes-buffered Tissue Culture Medium 199 (H-TCM 199). Los COCs se maduraron en TCM 199 con un 10% de Suero Fetal de Ternero y una combinación de 10 IU/ml de gonadotropina coriónica humana (hCG) y 5 IU/ml de gonadotropina coriónica equina (eCG) (PG600, Intervet, Salamanca, España) en una atmósfera modificada de 5% de CO₂ en aire a 38,5°C .

Tras 24 horas de maduración, las células de la granulosa que rodeaban los oocitos se separaron completamente mediante una agitación cuidadosa en H-TCM-199 con 300 IU/ml de hialuronidasa. Los oocitos maduros se distribuyeron al azar en tres grupos y se transfirieron al medio de fecundación. Los espermatozoides móviles se obtuvieron mediante centrifugación del semen en un gradiente discontinuo de Percoll (Farmacia, Uppsala, Sweden). Los espermatozoides de cada grupo se diluyeron para obtener una concentración final de 2×10^6 /ml y se co-incubaron con 30-40 oocitos en 400 µl del medio de fecundación durante 18 h en una atmósfera modificada de 5% de CO₂ en aire a 38,5°C.

Al final del periodo de incubación, los oocitos se lavaron, se fijaron en etanol, y subsecuentemente se tiñeron durante 10 minutos con 1 µg/ml de Hoechst 33342 (bisbenzimidaz; Sigma). Los supuestos cigotos se montaron en portas con 100 % de glicerol y se evaluaron por medio de un microscopio de fluorescencia Leica para detectar signos de fecundación. Los oocitos se consideraron penetrados cuando se observó con claridad la presencia de uno o más pronúcleos.

Los datos de penetración espermática se compararon utilizando un test de Chi-cuadrado. El análisis estadístico se realizó con los procedimientos disponibles en el software SPSS 12.0 (Chicago, USA). Se consideraron diferencias significativas cuando $P < 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La tabla 1 muestra las tasas de penetración de espermatozoides de morueco tras 2 y 24 horas de almacenamiento en los diluyentes CONTROL y GEL. Tras 24 horas de

almacenamiento del semen en el diluyente CONTROL, las tasas de fecundación disminuyeron significativamente en comparación con las del diluyente GEL ($P < 0.05$).

Tabla 1. Efecto de la suplementación con gelatina y tiempo de almacenamiento en las tasas de penetración de semen de morueco para los diluyentes CONTROL (sin gelatina) y GEL (1.5 g gelatina en 100 mL diluyente).

	Oocitos (n)	Penetración (%)
Control 24 h	159	60 (37,26 %) ^a
Gel 24 h	164	85 (51,82%) ^b
Control 2 h	161	76 (47,80%) ^b

Las letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias significativas detectadas por el test de Chi-cuadrado (a-b: $P < 0.05$).

Que sepamos, este es el primer estudio que evalúa el efecto de la conservación del semen en medio semi-sólido sobre su capacidad de penetración de oocitos maduros. El almacenamiento en este diluyente puede tener dos efectos positivos: 1) se evita la sedimentación celular y, consecuentemente, se reducen los cambios en las características o composición del medio (Nagy y cols., 2002) y 2) se produce una inmovilización de los espermatozoides, disminuyendo su agotamiento metabólico y preservando su potencial fecundante (López Gatiús y cols., 2005).

BIBLIOGRAFÍA

Evans G, Maxwell WMC. Salomon's artificial insemination of sheep and goats. Sydney: Butterworth Scientific, 1987.

López-Gatiús F, Sances G, Sancho M, Yániz J, Santolaria P, Gutiérrez R, López C, Núñez M, Núñez J, Soler C. Effect of solid storage at 15°C on subsequent motility and fertility of rabbit semen. *Theriogenology*. In press.

Nagy Sz, Sinkovics Gy, Kovács A. Viability and acrosome integrity of rabbit spermatozoa processed in a gelatin-supplemented extender. *Anim Reprod Sci* 2002;70:283-6.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Matadero Municipal de Huesca por su ayuda proporcionando ovarios de cordera. Este estudio ha sido financiado por Oviaragón S.C.L. (OTRI 2004-0134), Ministerio de Industria, Turismo y Comercio (CDTI 2004-0611, PROFIT FIT-010000-2004-208), y Universidad de Zaragoza (UZ-2002-cien-07).