

## EFFECTO DEL SISTEMA TAMPON SOBRE LA CONSERVACIÓN DEL SEMEN DE MORUECO EN REFRIGERACIÓN

Mateos, J.A.<sup>1</sup>, Santolaria, P.<sup>1</sup> y Yániz, J.L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Universidad de Zaragoza. Campus de Huesca. España.  
E-mail: jamateos@unizar.es

### INTRODUCCIÓN

Los componentes básicos de los diluyentes semi-sintéticos para el almacenamiento de semen ovino han cambiado poco desde que fueron elaborados en la primera parte del siglo XX (Maxwell y Salomon, 1993; Yániz et al., 2005, 2010, 2011). En este sentido, un estudio sistemático del efecto de cada componente del diluyente sobre la conservación del semen puede ayudar a desarrollar un diluyente sintético de manera más racional. El sistema tampón es un componente básico de diluyentes sintéticos, ya que permite mantener el pH en un rango tolerable para los espermatozoides. Sin embargo, muy pocos trabajos han estudiado diferentes alternativas para su inclusión en los diluyentes utilizados para la conservación de semen ovino en refrigeración. El Tris y el citrato son los tampones más frecuentemente utilizados en la composición de los diluyentes sintéticos (Maxwell y Salomon, 1993; Salomon y Maxwell, 2000; Yániz et al, 2011), y existe poca información sobre el uso de otros sistemas tampón en diluyentes para la conservación de semen. El objetivo general de este trabajo fue evaluar *in vitro* el efecto de diversos sistemas tampón incluidos en la composición de diluyentes sintéticos, sobre parámetros de calidad seminal durante la conservación del semen ovino de la raza Rasa Aragonesa en refrigeración.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se evaluaron seis diluyentes en este estudio, diluyentes que se diferencian por el sistema tampón; Tes Hepes y Mops son tampones que pertenecen al grupo Zwitterion: diluyente basado en citrato (80,6 mM de citrato de sodio ajustando el pH a 7,0 con una solución de ácido cítrico 1M, 55,6 mM de glucosa, 0,8% de BSA y 0,1% PVA) (CITRATO); diluyente basado en Tris (250 mM TRIS ajustando el pH a 7,0 con una solución de ácido cítrico 1M, 55,6 mM de glucosa, 0,8% de BSA y 0,1% PVA) (TRIS), diluyente basado en Tes (80 mM TES ajustando el pH a 7,0 con una disolución de NaOH 1M, 55,6 mM de glucosa, 0,8 % de BSA y 0,1% PVA) (TES), diluyente basado en Hepes (125 mM HEPES ajustando el pH a 7,0 con una solución de NaOH 1M, 55,6 mM de glucosa, 0,8% de BSA y 0,1% PVA) (HEPES); diluyente basado en MOPS (125 mM MOPS ajustando el pH a 7,0 con una solución de NaOH 1M, 55,6 mM de glucosa, 0,8% de BSA y 0,1% PVA) (MOPS); diluyente basado en fosfato (80 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ajustando el pH a 7,0 con una solución de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (¿falta mM?), 55,6 mM de glucosa, 0,8% de BSA y 0,1% PVA) (FOSFATO). Los antibióticos (2000 UI/ml de penicilina y 0,4 mg/ml de estreptomycin) se incluyeron en todos los diluyentes. La osmolaridad se ajustó cuando fue necesario añadiendo cloruro sódico hasta los 290 mM.

Las muestras de semen procedentes de segundos eyaculados se recogieron mediante una vagina artificial de machos de la raza Rasa Aragonesa. Se evaluó la movilidad del semen diluido en un microscopio de contraste de fases negativa y la concentración espermática se calculó utilizando un equipo de análisis espermático computerizado (ISAS, Versión 1.0, PROISER, Valencia, España). El semen de cada eyaculado se diluyó en medios a base de citrato, HEPES, MOPS, fosfato, TES y TRIS en una proporción de uno a dos y se conservó en tubos de vidrio almacenados en un frigorífico a 15 °C. A las 0, 24 y 48 horas se evaluaron la movilidad y la integridad de la membrana plasmática. El protocolo seguido a la hora de evaluar la integridad de la membrana y la movilidad mediante CASA fue el descrito por Yániz et al. (2008). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico SPSS, versión 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EEUU). La normalidad de la distribución y la homogeneidad de la varianza se verificaron mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y los test de Levene, respectivamente. Como todos los datos se distribuyeron normalmente, se utilizaron pruebas paramétricas. Las diferencias entre la integridad de membrana y la movilidad del semen entre los diferentes diluyentes se evaluó utilizando el análisis de varianza (ANOVA) utilizando modelos lineales generalizados. Si el valor de P era

significativo, se utilizó el test de Tukey para comparaciones múltiples entre diluyentes *a posteriori*. El nivel de significación estadística se estableció en  $P < 0,05$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los efectos del diluyente y el tiempo de almacenamiento sobre ciertos parámetros de movilidad determinados por CASA, y sobre la viabilidad espermática se representan en la Tabla 1. Las muestras conservadas en diluyentes basados en los sistemas tampón del grupo zwitterion (MOPS, TES y HEPES) mostraron una mayor proporción de espermatozoides con movilidad progresiva (PS) a las 0 horas y un mayor porcentaje de movilidad (MS) y de PS a las 24 y 48h que las muestras que se diluyeron con los diluyentes TRIS, CITRATO o FOSFATO. Los espermatozoides diluidos en el diluyente TRIS mostraron un marcado incremento en el porcentaje de trayectorias circulares y una disminución de la velocidad media, mientras que la reducción en el vigor de los espermatozoides fue menos pronunciada que en los otros grupos. Al mismo tiempo, se redujo la velocidad progresiva (VSL, micras/s) pues los espermatozoides nadaban en círculos, y la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza aumentó drásticamente. El CITRATO mostró resultados intermedios entre el TRIS y los otros grupos en las variables relacionadas con la calidad del movimiento linealidad (LIN), rectitud (STR), zigzag (WOB) y desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) a 0 h de almacenamiento, pero experimentó una clara mejoría a las 24 y 48 horas, por lo que las diferencias con los tampones del grupo zwitterion se atenuaron o desaparecieron. En cuanto a la viabilidad, los diluyentes que peores resultados ofrecieron fueron el TRIS y el FOSFATO.

Un aspecto crucial para la preservación del semen es el mantenimiento del pH del medio. El pH del semen de morueco recién eyaculado ronda los valores de 6,7 a 6,8. Durante el almacenamiento, los espermatozoides y la contaminación bacteriana producen metabolitos que pueden reducir el pH del medio. La adición de agentes tamponantes a la dilución ayuda a controlar el pH, pero hay una importante variación en el rango y la capacidad tamponante de estas moléculas, y muchas especies tamponantes tienen un impacto en los sistemas biológicos, actividad de las enzimas, los sustratos, o cofactores. Este estudio muestra que los buffers del grupo Zwitterion (Tes, Mops y Hepes) pueden ser una buena alternativa para ser incluidos en la composición de diluyentes para el almacenamiento de semen de morueco en refrigeración. Por el contrario el TRIS provoca drásticas modificaciones en ciertos parámetros cinéticos durante el almacenamiento a 15 °C, aunque queda por verificar la incidencia del sistema tampón sobre la fertilidad tras la IA.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Maxwell, W.M.C., Salomon, S., 1993. Liquid storage of ram semen-a review. *Reprod Fertil Dev* 5: 613-638. • Salomon, S., Maxwell, W.M.C., 2000. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci* 62: 77-111. • Yániz, J.L., Martí, J.I., Silvestre, M.A., Folch, J., Santolaria, P., Alabart, J.L., López-Gatius, F. 2005. Effects of solid storage of sheep spermatozoa at 15 degrees C on their survival and penetrating capacity. *Theriogenology* 64: 1844-1851. • Yániz, J.L., Santolaria, P., Marco-Aguado, M.A., López-Gatius, F. 2008. Use of image analysis to assess the plasma membrane integrity of ram spermatozoa in different diluents. *Theriogenology* 70 192-198. • Yániz, J.L., Marco-Aguado, M.A., Mateos, J.A., Santolaria, P. 2010. Bacterial contamination of ram semen, antibiotic sensitivities, and effects on sperm quality during storage at 15 °C. *Anim Reprod Sci* 122: 142-149. • Yániz, J.L., Mateos, J.A., Santolaria, P. 2011. Zwitterionic buffers preserve ram semen quality more efficiently than TRIS during storage at 15 °C. *Small Rum Res* 95: 54-60.

**Agradecimientos:** Los autores agradecen al CITA (DGA) por su ayuda en la obtención de las muestras de semen. Este trabajo ha sido financiado por el proyecto INNPACTO (IPT-010000-2010-33), la Fundación ARAID (OTRI 2010-0464), y Oviaragón S.C.L. (OTRI 2010-0465)

**Tabla 1.** Efecto de los diferentes sistemas tampón sobre los parámetros cinéticos del semen y su viabilidad durante el almacenamiento a 15 °C

	Tiempo de almacenamiento (h)	Diluyente					
		MOPS	TRIS	CITRATO	TES	HEPES	FOSFATO
Movilidad espermática (%)	0	67,9 <sup>a</sup>	67,4 <sup>a</sup>	70,3 <sup>b</sup>	68,2 <sup>a</sup>	69,8 <sup>b</sup>	61,0 <sup>c</sup>
	24	68,4 <sup>a</sup>	63,3 <sup>b</sup>	64,6 <sup>c</sup>	68,3 <sup>a</sup>	70,3 <sup>d</sup>	20,8 <sup>e</sup>
	48	62,7 <sup>a</sup>	56,0 <sup>b</sup>	56,7 <sup>b</sup>	64,9 <sup>c</sup>	63,3 <sup>a</sup>	17,6 <sup>d</sup>
Movilidad progresiva (%)	0	49,8 <sup>a</sup>	34,7 <sup>b</sup>	39,5 <sup>c</sup>	48,3 <sup>d</sup>	50,1 <sup>a</sup>	45,0 <sup>e</sup>
	24	50,6 <sup>a</sup>	28,5 <sup>b</sup>	42,7 <sup>c</sup>	48,5 <sup>d</sup>	50,3 <sup>a</sup>	12,5 <sup>e</sup>
	48	46,3 <sup>a</sup>	27,8 <sup>b</sup>	40,4 <sup>c</sup>	46,0 <sup>a</sup>	46,2 <sup>a</sup>	11,7 <sup>d</sup>
VCL	0	151,7 <sup>a</sup>	141,8 <sup>b</sup>	143,5 <sup>c</sup>	149,2 <sup>d</sup>	150,8 <sup>a</sup>	140,5 <sup>e</sup>
	24	127,7 <sup>a</sup>	129,3 <sup>b</sup>	128,1 <sup>a</sup>	125,7 <sup>c</sup>	128,2 <sup>a</sup>	102,5 <sup>d</sup>
	48	119,1 <sup>a</sup>	121,4 <sup>b</sup>	114,1 <sup>c</sup>	119,3 <sup>a</sup>	116,7 <sup>d</sup>	98,7 <sup>e</sup>
VSL	0	120,6 <sup>a</sup>	87,8 <sup>b</sup>	99,2 <sup>c</sup>	116,7 <sup>d</sup>	118,7 <sup>e</sup>	113,1 <sup>f</sup>
	24	101,4 <sup>a</sup>	64,7 <sup>b</sup>	95,6 <sup>c</sup>	96,3 <sup>c</sup>	98,4 <sup>d</sup>	75,1 <sup>e</sup>
	48	92,5 <sup>a</sup>	62,5 <sup>b</sup>	89,6 <sup>ac</sup>	90,3 <sup>c</sup>	88,5 <sup>bd</sup>	77,0 <sup>e</sup>
LIN	0	77,6 <sup>a</sup>	61,7 <sup>b</sup>	68,3 <sup>c</sup>	76,1 <sup>d</sup>	76,7 <sup>d</sup>	78,0 <sup>a</sup>
	24	77,3 <sup>a</sup>	50,3 <sup>b</sup>	73,2 <sup>c</sup>	74,9 <sup>d</sup>	75,2 <sup>d</sup>	68,6 <sup>e</sup>
	48	75,9 <sup>a</sup>	52,2 <sup>b</sup>	76,3 <sup>a</sup>	74,0 <sup>c</sup>	74,1 <sup>c</sup>	73,4 <sup>c</sup>
ALH	0	2,9 <sup>a</sup>	3,8 <sup>b</sup>	3,2 <sup>c</sup>	2,9 <sup>a</sup>	2,8 <sup>a</sup>	2,6 <sup>d</sup>
	24	2,6 <sup>a</sup>	4,4 <sup>b</sup>	2,9 <sup>c</sup>	2,7 <sup>d</sup>	2,7 <sup>d</sup>	2,6 <sup>a</sup>
	48	2,7 <sup>a</sup>	4,1 <sup>b</sup>	2,5 <sup>c</sup>	2,8 <sup>d</sup>	2,8 <sup>e</sup>	2,3 <sup>f</sup>
Viabilidad (%)	0	65,2 <sup>a</sup>	58,7 <sup>b</sup>	64,3 <sup>a</sup>	58,9 <sup>b</sup>	60,7 <sup>ab</sup>	63,0 <sup>ab</sup>
	24	62,1 <sup>a</sup>	53,8 <sup>b</sup>	62,4 <sup>a</sup>	60,2 <sup>a</sup>	59,4 <sup>a</sup>	46,2 <sup>c</sup>
	48	57,6 <sup>ab</sup>	48,3 <sup>c</sup>	62,1 <sup>a</sup>	55,0 <sup>b</sup>	57,9 <sup>ab</sup>	7,5 <sup>d</sup>

a-f: Diferencias dentro de cada línea,  $P < 0,05$ ; VCL (Velocidad Curvilínea, micras/s), VSL (velocidad progresiva, micras/s), LIN (índice de linealidad, VSL/VCL) y ALH (desplazamiento lateral de la cabeza, micras).

## EFFECT OF THE BUFFER SYSTEM ON THE RAM SEMEN PRESERVATION DURING COOLED STORAGE

**ABSTRACT:** This study was designed to evaluate the effect of various buffers on the storage of ram semen at 15 °C. Second ejaculates from six adult males were collected using an artificial vagina and diluted in either MOPS, TRIS, TES, HEPES, citrate, or phosphate-based extenders. Semen samples were stored at 15°C and the sperm motility and viability (membrane integrity) variables assessed after 0, 24 and 48 h intervals. Significantly higher progressive sperm motility rates were recorded at 0 h of storage, and higher motile and progressive sperm motility at 24 and 48 h, when zwitterionic-based extenders (MOPS, TES and HEPES) were used, compared to citrate, TRIS, and phosphate-based extenders—with the last group showing a drastic reduction in sperm motility during storage. It was concluded that zwitterion-based buffers may be an acceptable alternative for inclusion in the composition of diluents for chilled ram semen storage. On the other hand, TRIS may be seen as having caused drastic modifications of certain sperm kinematic parameters during storage at 15 °C.

**Keywords:** buffers, ram semen, sperm quality, cooled storage.