

Vitalidad y congelación del esperma del morueco de raza Manchega

Efecto de la presión osmótica y de la concentración de glicerol en el diluyente

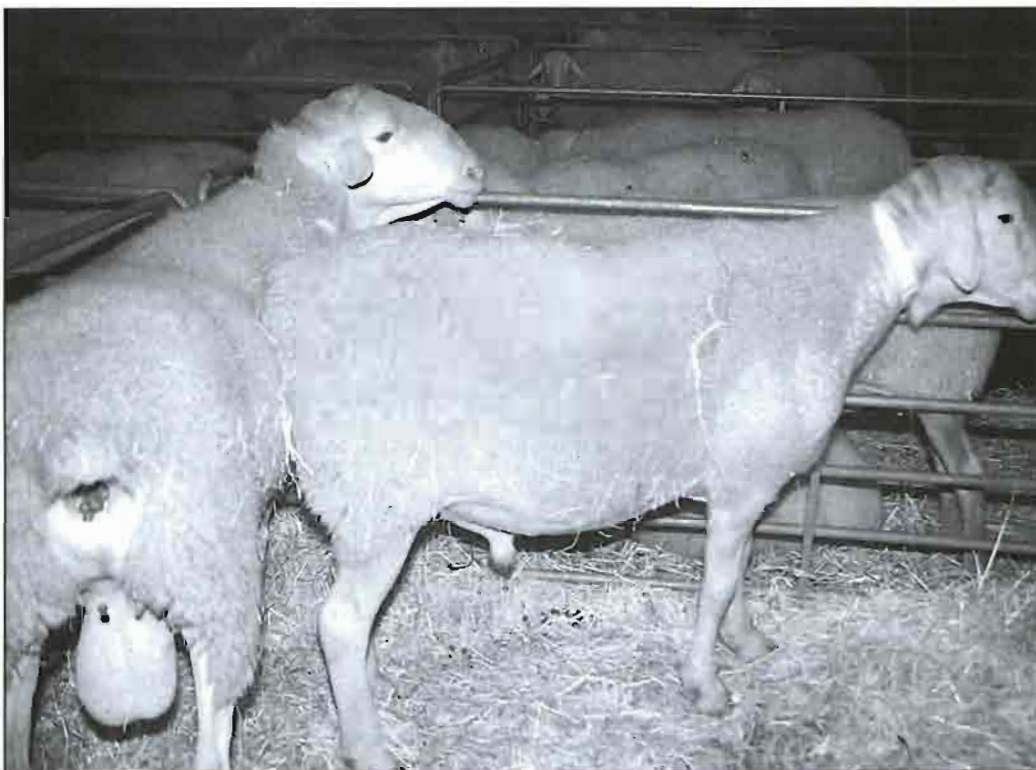
J. Pérez Fuentes (1) y M. Alcaide (2)

Se realizó un experimento multifactorial (9 x 3 x 6) para investigar los efectos de la presión osmótica y de la concentración de glicerol del diluyente de congelación sobre la vitalidad espermática del semen de morueco.

El semen procedente de cinco diferentes moruecos se mezcló para someterlo a congelación mediante la utilización de un diluyente tipo TesT ajustado a un pH y estudiándose nueve presiones osmóticas diferentes ajustadas entre 150 y 550 mOsm/kg y a tres concentraciones diferentes de glicerol (0, 1,5 y 3% respectivamente). Para la congelación se utilizó el método de dilución en frío (Abdelhakeam 1988, 1991a). Las muestras se descongelaron y se sometieron a las contrastaciones de motilidad, morfología, filtración y test de membrana.

Los resultados demostraron que la presión osmótica del diluyente de congelación es un factor importante sobre la vitalidad postcongelación. Con los diluyentes a presiones osmóticas de 350 mOsm/kg se consiguieron los mejores resultados de motilidad. El glicerol ejerce un extraordinario efecto crioprotector durante la congelación del semen de morueco, incluso a una concentración de tan sólo el 1,5%. Los porcentajes de morfoanomalías de cola y tracto intermedio se ven incrementados a medida que aumenta la concentración de glicerol en el diluyente; sin embargo los diluyentes que contienen glicerol muestran unos mayores porcentajes de motilidad, filtración y test de membrana.

Se concluye que es posible obtener



La conveniencia de la utilización de las técnicas de I.A. ovina ha sido discutida en numerosas ocasiones.

unos buenos porcentajes de vitalidad espermática pre y postcongelación utilizando diluyentes tipo TesT yema de huevo ajustados a un pH 7 y a una presión osmótica de 400 mOsm/kg,

conteniendo una concentración del 1,5% de glicerol.

I. A. OVINA

La conveniencia de la utilización de

Cuadro I		
Efecto de la presión osmótica sobre la motilidad del esperma de morueco		
Presión Osmótica del diluyente (mOsm/kg)	Motilidad Precongelación (%)	Motilidad Postcongelación (%)
150	6,11 i	1,39 i
200	18,13 f	3,78 h
250	31,39 d	12,00 e
300	43,33 b	27,22 b
350	46,94 a	33,72 a
400	35,56 c	25,28 c
450	27,78 e	19,17 d
500	12,78 g	10,78 f
550	7,06 h	5,61 g

Letras diferentes en la misma línea son significativamente diferentes (p < 0,01).

(1) Facultad de Veterinaria, Dep. de Fisiología (Biología), Universidad Complutense de Madrid.

(2) Tauste Ganadera, S.A.

Cuadro II

Efecto de la presión osmótica sobre los porcentajes de filtración y sobre los índices de la vitalidad de las membranas espermáticas

Presión Osmótica del diluyente (mOsm/kg)	Porcentajes de filtración en columnas Sephadex	Índice Geométrico de vitalidad	Índice Aritmético de vitalidad
150	4,83 h	20,24 e	24,24 g
200	4,44 i	20,36 e	24,31 f
250	5,64 g	19,90 f	23,89 h
300	10,24 f	19,90 f	23,73 i
350	15,53 d	20,92 d	25,02 b
400	17,89 b	21,13 bc	25,05 b
450	23,24 a	21,45 a	25,44 a
500	17,82 c	21,01 cd	24,45 e
550	12,71 e	21,26 b	24,91 d

Letras diferentes en la misma línea son significativamente diferentes ($p < 0,01$).

Cuadro III

Efecto de la presión osmótica sobre las morfoanomalías del espermatozoide de morueco

Presión Osmótica del diluyente (mOsm/kg)	% NAC	Morfoanomalías de cabeza %	Morfoanomalías de flagelo %
150	45,22 cd	3,44	20,61 a
200	46,88 bcd	2,55	14,66 b
250	50,05 abc	3,38	11,94 c
300	51,66 ab	2,11	8,33 d
350	54,06 a	2,77	8,88 d
400	51,05 abc	2,83	11,55 c
450	49,66 abc	2,27	11,88 c
500	47,16 bcd	2,66	11,55 c
550	42,88 d	3,27	15,05 b

% NAC: Porcentaje de acrosomas normales.

Letras diferentes en la misma línea son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Cuadro IV

Efecto de la concentración de glicerol sobre la motilidad espermática

Concentración de glicerol (%)	Motilidad Precongelación (%)	Motilidad Postcongelación (%)
0	23,02 c	10,67 c
1,5	26,00 b	16,57 b
3,0	27,41 a	19,07 a

Letras diferentes en la misma línea son significativamente diferentes ($p < 0,01$).

las técnicas de inseminación artificial ovina ha sido discutida en numerosas ocasiones ya que los resultados de fertilidad reseñados por muchos investigadores son bajos y ello es probablemente debido a un posible efecto anti-conceptivo del glicerol cuando se añade como crioprotector.

La importancia de la presión osmótica del diluyente ha sido reseñada por

algunos científicos (Mann, 1964). Este autor observó que los espermatozoides de diferentes mamíferos eran menos afectados por los diluyentes hiperosmóticos que por los hiposmóticos. Los diluyentes hiperosmóticos provocan una retirada parcial del agua intracelular del espermatozoide antes de su congelación, con lo que se reduce el potencial de formación de hielo intra-

celular durante la congelación (Fiser y col., 1981). Estos mismos científicos también observaron que la motilidad espermática aumenta a medida que se incrementa la osmolaridad del diluyente de congelación y que este efecto era independiente de la velocidad de descongelación empleada.

Abdelhakeam (1991b) observó unas tasas mayores de fertilidad cuando se congeló espermatozoide de morueco en diluyentes TesT-yema ajustados a presiones osmóticas entre 375 y 400 mOsm/kg.

Johnson y col. (1974) observaron que el uso de diluyentes de congelación a presiones osmóticas hipertónicas ejercían una mayor protección de los acrosomas espermáticos del morueco durante la congelación; sin embargo, el tracto intermedio de los espermatozoides de morueco sufre daños por plasmolisis cuando la presión osmótica es menor de 500 mOsm/kg (Yamane y col., 1962). Otros autores afirman que la congelación utilizando diluyentes hiperosmóticos resultan ser los mejores cuando se contrasta la motilidad y la fertilidad. (Colas, 1979); Fiser y col. 1981, 1982). También se han observado los mejores porcentajes de fertilidad cuando el semen se congela utilizando diluyentes hipertónicos (Hobbs and Harris, 1963a, b; Harris, 1968).

La presión osmótica del semen obtenido del epidídimo de toro es de 430 mOsm/kg mientras que la presión osmótica del eyaculado es de cerca de 300 mOsm/kg (Graham y col., 1972). Esto puede indicar que la supervivencia de las células espermáticas en condiciones de conservación requiere unos diluyentes ajustados a presiones osmóticas elevadas.

MATERIAL Y METODOS

Se realizó un experimento multifactorial para investigar los efectos de nueve presiones osmóticas (desde 150 hasta 550 mOsm/kg) y tres concentraciones de glicerol diferentes (0, 1, 5 y 3%) en el diluyente de congelación sobre la vitalidad del semen congelado de morueco.

Se utilizó un diluyente base (TesT-yema 20%) ajustado a un pH 7 para congelar el semen de cinco moruecos

OVINO-CAPRINO

diferentes, una vez que se había mezclado y diluido a una relación 1:24.

El semen se recolectó mediante vagina artificial y seguidamente fue sometido a refrigeración lenta hasta alcanzar los 5 °C durante un período de tres horas. Una vez refrigerado se diluyó a una proporción 1:24 con el correspondiente diluyente. Una hora después se procedió a la congelación en pajuelas francesas de 0,25 ml. a una altura de 5 cm sobre el nivel de nitrógeno líquido. Transcurridos 10 minutos, las pajuelas se sumergieron directamente en nitrógeno líquido donde se conservaron hasta su contrastación laboratorial. Cada experimento se repitió seis veces con el objetivo de poder obtener diferencias significativas mediante análisis estadístico.

Se llevaron a cabo cinco métodos de contrastación para investigar el grado de vitalidad de los espermatozoides congelados. Estos cinco métodos fueron los siguientes: motilidad precongelación, motilidad postcongelación, filtración en columnas de «Sephadex», test de membrana (índices geométrico y aritmético) mediante choque osmótico y morfoanomalías espermáticas.

La motilidad pre y postcongelación se contrastó utilizando un monitor de televisión conectado a una cámara y observando la motilidad progresiva a 200 aumentos (Abdelhakeam 1991a). La contrastación mediante el filtrado en columnas de Sephadex se realizó tal y como queda descrito en la bibliografía (Graham y col., 1976, 1978a, 1978b; Crabo y col. 1980).

La integridad de las membranas celulares se analizó mediante la utilización de un test de membrana, sometiendo para ello los espermatozoides descongelados a un choque osmótico en una solución de citrato sódico ajustada a una presión de 110 mOsm/kg y analizando posteriormente el tamaño celular mediante el analizador de partículas (Particle Data Analyzer). Este tipo de contrastación espermática permitió la obtención de los correspondientes índices geométricos y aritméticos del volumen de las células espermáticas (Alcaide, 1991).

Se analizaron las morfoanomalías espermáticas de cada una de las muestras descongeladas, utilizando para ello una solución de glutaraldehído y un microscopio de interferencia de fases

Cuadro V

Efecto de la concentración de glicerol sobre la vitalidad del espermatozoides congelado

Concentración de glicerol en el diluyente (%)	Porcentajes de filtración en columnas Sephadex	Índice Geométrico de vitalidad	Índice Aritmético de vitalidad
0	10,02 c	19,36 c	22,75 c
1,5	12,87 b	20,58 b	24,72 b
3,0	14,55 a	22,11 a	26,20 a

Letras diferentes en la misma línea son significativamente diferentes (p<0,01).

Cuadro VI

Efecto de la concentración de glicerol sobre las morfoanomalías del semen descongelado de morueco

Concentración de glicerol en el diluyente (%)	% NAC	Morfoanomalías de cabeza %	Morfoanomalías de flagelo %
0	46,40 b	2,37	10,81 c
1,5	51,24 a	3,07	14,51 a
3,0	48,77 ab	3,00	12,83 b

Letras diferentes en la misma línea son significativamente diferentes (p<0,01).

Cuadro VII

Efecto de la presión osmótica y de la concentración de glicerol sobre la vitalidad espermática

Presión Osmótica	% Glicerol	Motilidad Precongelación (%)	Motilidad Postcongelación (%)
150	0	2,67 x	0,17 x
200	0	15,00 q	1,17 w
250	0	28,33 l	4,83 t
300	0	36,67 g	12,50 l
350	0	38,33 e	23,67 g
400	0	37,50 f	20,00 i
450	0	31,67 j	17,50 k
500	0	10,83 r	10,83 n
550	0	6,17 v	5,33 q
150	1,5	10,33 s	1,83 v
200	1,5	21,67 m	5,17 r
250	1,5	37,50 f	12,00 m
300	1,5	43,33 d	33,33 d
350	1,5	49,17 c	36,67 b
400	1,5	33,33 i	25,00 f
450	1,5	20,83 n	19,17 j
500	1,5	10,83 r	10,83 n
550	1,5	7,00 u	5,70 r
150	3	5,33 w	2,17 u
200	3	18,33 o	5,00 s
250	3	28,33 l	19,17 j
300	3	50,00 b	35,83 c
350	3	53,33 a	40,83 a
400	3	35,83 h	30,83 e
450	3	30,83 k	20,83 h
500	3	16,67 p	10,67 o
550	3	8,00 t	6,33 p

Letras diferentes en la misma línea son significativamente diferentes (p<0,01).

OVINO-CAPRINO

(Alcaide, 1991). Se obtuvieron los correspondientes porcentajes de morfoanomalías acrosómicas (NAC), morfoanomalías de cabeza, tracto intermedio y cola efectuando para ello un recuento total de 200 espermatozoides analizados por cada muestra (Alcaide, 1991).

Los datos obtenidos se analizaron mediante análisis estadístico Anova (SAS 1985) obteniéndose las correspondientes diferencias estadísticas mediante el test de Duncan (Sall, 1979; Steel y Torrie, 1980).

RESULTADOS

Los resultados del cuadro I muestran cómo los diluyentes ajustados a presiones osmóticas de 350 mOsm/kg permiten obtener los mayores porcentajes de motilidad pre y postcongelación existiendo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Los mejores resultados de filtración y de resistencia de membrana se obtuvieron cuando se utilizaron diluyentes de congelación hiperosmóticos (450 mOsm/kg; cuadro II), sin embargo los mejores índices de acrosomas normales se obtuvieron con diluyentes ajustados a presiones osmóticas entre 300 y 450 mOsm/kg (cuadro III).

Los diluyentes de 300-350 mOsm/kg fueron los que mayores porcentajes de tracto intermedio y cola conservaron en perfectas condiciones, observándose diferencias significativas. Los diluyentes ajustados a 150 y 200 mOsm/kg produjeron una torsión de los flagelos celulares que indicaban el diferente grado de enroscamiento debido a la presión hipoosmótica del diluyente. Las presiones osmóticas entre 250 y 450 mOsm/kg parecen proteger los acrosomas del esperma de morueco sin existir diferencias estadísticamente significativas entre ellos (cuadro III).

En los diluyentes que contenían un 3% de glicerol se obtuvieron unos mayores porcentajes de motilidad, filtración y resistencia de la membrana ($p < 0,01$; cuadros IV y V). El diluyente que contenía un 3% de glicerol y ajustado a una presión osmótica de 350 mOsm/kg condujo a la consecución de los mayores índices de motilidad ($p < 0,01$; cuadro VII), sin embargo, en los diluyentes ajustados a

presiones osmóticas de 450 mOsm/kg se consiguió obtener los mejores índices de filtración ($P < 0,01$; cuadro VIII). Los diluyentes ajustados a presiones osmóticas de 150 y 200 mOsm/kg y al 3% de glicerol permitieron los mayores índices de vitalidad de membrana y en segundo lugar les siguieron los ajustados a 350-450 mOsm/kg al mismo porcentaje de glicerol (cuadro VIII).

Los porcentajes de acrosomas normales (NAC) más elevados fueron los obtenidos cuando se emplearon diluyentes con 3% de glicerol, obteniéndose diferencias altamente significativas al compararlos con los diluyentes sin glicerol (cuadro VI). Sin embargo, se observa como el glicerol ejerce un efecto negativo en el tracto intermedio y cola de espermatozoides (cuadro VI).

DISCUSION

La presión osmótica parece ser un

factor muy importante en la congelación del semen de morueco. El hecho de que los diluyentes ajustados a presiones osmóticas de 300-350 mOsm/kg resultaran ser los mayores porcentajes de motilidad no quiere decir que esa fuese la mejor presión osmótica para la congelación del semen de morueco, ya que, por ejemplo, en nuestros trabajos se obtuvieron los mayores índices de filtración y de integridad de la membrana con los diluyentes hiperosmóticos.

Los diluyentes hiperosmóticos puede ser que inactiven temporalmente el metabolismo y la motilidad espermática y nuestros resultados son totalmente diferentes a los obtenidos por Lighfoot y Salamon (1969), que observaron los mejores índices de motilidad con los diluyentes hiperosmóticos.

En nuestro trabajo queda claro que los mayores índices de motilidad se obtienen con los diluyentes isosmóti-

Cuadro VIII				
Efecto de la presión osmótica y de la concentración de glicerol sobre la vitalidad de los espermatozoides descongelados				
Presión Osmótica	Concentración de glicerol (%)	Porcentaje de filtración	Índice Geométrico de vitalidad	Índice Aritmético de vitalidad
150	0	5,28 w	18,13 m	20,93 z2
200	0	4,07 y	18,34 m	21,05 z1
250	0	4,30 x	18,24 m	21,35 y
300	0	6,97 s	18,69 l	22,08 x
350	0	12,02 n	19,31 k	23,10 v
400	0	14,15 j	19,79 j	22,96 w
450	0	18,87 e	20,81 h	25,22 l
500	0	13,52 l	20,22 i	23,67 u
550	0	11,03 q	20,73 h	24,43 p
150	1,5	3,73 z1	19,80 j	24,09 s
200	1,5	3,68 z2	20,07 i	24,51 o
250	1,5	5,55 u	19,67 j	24,23 r
300	1,5	11,93 o	19,65 j	23,67 t
350	1,5	16,72 i	21,21 ef	25,41 j
400	1,5	18,62 f	21,51 d	26,44 d
450	1,5	24,08 b	21,34 de	25,25 k
500	1,5	18,48 g	21,07 fg	24,54 n
550	1,5	13,07 m	20,93 gh	24,38 q
150	3	5,47 v	22,79 a	27,69 a
200	3	5,57 t	22,68 a	27,38 b
250	3	7,07 r	21,80 c	26,09 e
300	3	11,83 p	21,37 de	25,45 i
350	3	17,87 h	22,23 b	26,54 c
400	3	20,92 d	22,08 b	25,76 h
450	3	26,78 a	22,19 b	25,86 g
500	3	21,45 c	21,75 c	25,14 m
550	3	14,02 k	22,11 b	25,90 f

Letras diferentes en la misma línea son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

cos y que los hiperosmóticos inactivan temporalmente las células espermáticas.

Las morfoanomalías espermáticas más bajas se obtuvieron con los diluyentes a presiones osmóticas variables entre 250 y 450 mOsm/kg. Yamane y col. (1962) observaron morfoanomalías de los flagelos espermáticos cuando se congelaba esperma de morueco a presiones osmóticas menores de 500 mOsm/kg. Estos autores consideraban la presión osmótica ejercida por el glicerol como incrementación de la presión osmótica ejercida por el diluyente sobre las membranas celulares y quizás por ello los resultados apuntados eran tan dispares a los obtenidos en nuestro estudio.

Posiblemente las células espermáticas almacenadas en el epidídimo de los animales no presentan motilidad hasta que se activan por los fluidos de las glándulas accesorias. Yamane y col. (1962) observaron como con los diluyentes hiperosmóticos se obtenían los mayores índices de motilidad y que el

plasma seminal no es isosmótico con las células espermáticas. Graham y col. (1972) observaron como el plasma seminal de los toros y los pavos no es isosmótico con los correspondientes espermatozoides. Esta puede ser una de las razones por las cuales los espermatozoides de numerosas especies sobreviven durante un largo tiempo en el interior del tracto genital masculino incluso a elevadas temperaturas.

Es obvio que el glicerol protege a las células espermáticas durante la congelación; sin embargo, parece ejercer un cierto efecto tóxico sobre la estructura del tracto intermedio y cola. Existen estudios que afirman que además este efecto tóxico afecta a la fertilidad negativamente, pero el mecanismo por el cual se produce esta acción negativa aún no está determinado. Es posible que el glicerol reaccione químicamente con la secreción cervical del tracto genital de la hembra, por lo que los espermatozoides se encuentran some-

tidos a un cambio brusco de presión osmótica y entran en un proceso de hipósmosis que provocaría la ruptura de la membrana celular y con ello se reduce su potencial de fecundación.

Los diluyentes con un 1,5% de glicerol resultaron ser los que mayor cantidad de acrosomas normales conservaban después de la congelación. Estos mismos diluyentes ajustados a presiones osmóticas entre 400-450 mOsm/kg permitieron obtener los mayores porcentajes de filtración y de resistencia de membrana, lo que indica la conveniencia de utilizar una concentración de 1,5% de glicerol y unas presiones osmóticas ajustadas a 400-450 mOsm/kg para la congelación del esperma de morueco.

CONCLUSIONES

1. Los diluyentes hiperosmóticos protegen la estructura espermática durante su congelación. Estas presiones hiperosmóticas parecen inactivar temporalmente la motilidad espermática que vuelve a activarse una vez diluidos los espermatozoides en un medio isosmótico.

2. Los diluyentes ajustados a presiones osmóticas menores de 250 mOsm/kg provocan una hipósmosis celular, con lo que los espermatozoides incrementan su volumen y el flagelo tiende a torsionarse sobre sí mismo o sobre la cabeza espermática; este proceso es reversible durante un corto espacio de tiempo.

3. Aunque es incuestionable la acción crioprotectora del glicerol, éste ejerce un efecto negativo sobre las estructuras del tracto intermedio y cola de los espermatozoides de morueco, por lo que reduciendo su concentración al máximo posible se puede obtener un equilibrio entre acción crioprotectora y toxicidad que conlleve a la obtención de unos buenos índices de vitalidad espermática.

4. Es necesario realizar estudios de fertilidad para comprobar «in vivo» los resultados de laboratorio obtenidos al congelar esperma de morueco mediante el método de dilución en frío con diluyente hiperosmótico y a bajas concentraciones de glicerol.

BIBLIOGRAFIA

Existe una amplia bibliografía a disposición del lector interesado.

Cuadro IX				
Efecto de la presión osmótica y de la concentración de glicerol sobre las morfoanomalías espermáticas				
Presión Osmótica	Concentración de glicerol (%)	% NAC	Morfoanomalías de cabeza %	Morfoanomalías de flagelo %
150	0	41,83 de	3,0	17,16 bc
200	0	41,00 e	2,0	12,83 def
250	0	43,66 cde	2,0	9,16 ijk
300	0	49,60 abcde	1,8	5,83 l
350	0	55,00 abc	2,0	6,83 kl
400	0	46,83 bcde	2,8	11,33 ghij
450	0	52,50 abcd	2,3	8,00 jkl
500	0	44,66 cde	2,8	11,33 ghij
550	0	42,50 de	2,5	14,83 cdef
150	1,5	47,83 abcde	3,3	25,66 a
200	1,5	48,66 abcde	3,8	19,50 b
250	1,5	50,00 abcde	3,6	14,66 cdefg
300	1,5	56,33 ab	2,0	9,33 ijk
350	1,5	58,66 a	3,0	10,33 hij
400	1,5	57,00 ab	3,3	12,16 efghi
450	1,5	48,66 abcde	2,1	12,33 efghi
500	1,5	50,16 abcde	2,5	11,00 hij
550	1,5	43,83 cde	3,8	15,66 cd
150	3	46,00 bcde	4,0	19,00 b
200	3	51,00 abcde	1,8	11,66 fgghi
250	3	56,50 ab	4,5	12,00 fgghi
300	3	49,00 abcde	2,5	9,83 hijk
350	3	50,33 abcde	3,3	9,50 hijk
400	3	49,33 abcde	2,3	11,16 hij
450	3	47,83 abcde	2,3	15,33 cde
500	3	46,66 bcde	2,6	12,33 efghi
550	3	42,33 de	3,5	14,66 cdefg

Letras diferentes en la misma línea son significativamente diferentes (p < 0,05).