



**XXXVIII CONGRESO NACIONAL  
Y  
XIV INTERNACIONAL  
DE LA  
SOCIEDAD ESPAÑOLA DE  
OVINOTECNIA Y CAPRINOTECNIA**



PRODUCCIÓN  
OVINA Y CAPRINA

Nº XXXVIII SEOC

## **EFEECTO DEL PLASMA SEMINAL EN EL MEDIO DE CRIOPRESERVACION A BASE DE LECITINA DE SOJA EN ESPERMATOZOIDES DE CAPRINO DE LA RAZA BLANCA DE RASQUERA Y OVINO DE LAS RAZAS XISQUETA Y ARANESA**

TABAREZ, A.; GARCÍA, W. Y PALOMO, M.J.

Departamento de Medicina y Cirugía Animal. Facultad de Veterinaria.  
Universidad Autónoma de Barcelona. 08193 Bellaterra, Barcelona.  
España. mariajesus.palomo@uab.cat

### **RESUMEN**

El objetivo fue determinar si la lecitina de origen vegetal es una alternativa viable en la conservación de semen de pequeños rumiantes en presencia de plasma seminal. Para ello, se colectó semen (n=6) de 6 machos cabríos y 8 moruecos. Tras la recogida, los eyaculados se mezclaron y se dividieron en 2 tratamientos: 1) lavado, el semen fue centrifugado dos veces a 600xg por 10' y resuspendido en un medio a base de lecitina de soja y 2) sin lavar, el semen fue diluido directamente en el mismo medio. Ambas muestras fueron refrigeradas durante 4 horas a 5°C y posteriormente congeladas. La viabilidad espermática se determinó mediante la tinción eosina-nigrosina, sin encontrar diferencias entre tratamientos ni tras la refrigeración ni posdescongelación, así como tampoco se observó ningún efecto en los espermatozoides refrigerados tras el test hipoosmótico en ninguna especie. Simultáneamente, se analizó la motilidad total mediante el sistema CASA, siendo ésta mayor en los espermatozoides refrigerados y descongelados sin lavar que en los lavados, excepto en espermatozoides descongelados de ovino, donde no hubieron diferencias. A pesar de ser todavía resultados preliminares, éstos parecen sugerir que no es necesario eliminar previamente el plasma seminal para criopreservar semen de pequeños rumiantes en un medio a base de lecitina de soja.

Palabras clave: pequeños rumiantes, criopreservación, semen, lecitina de soja

## INTRODUCCIÓN

Para tener éxito en la criopreservación de las células espermáticas no sólo se requiere conocer qué diluyente es el apropiado, la tasa de dilución, la tasa de refrigeración y descongelación sino que también es esencial un conocimiento profundo sobre la fisiología del espermatozoide en las diferentes especies para maximizar la recuperación de los espermatozoides posdescongelación y en consecuencia la fertilidad (Purdy, 2006). En este sentido, el semen de caprino es un excelente ejemplo porque, a diferencia de otras especies, tiene la peculiaridad de contener lipasas procedentes de las secreciones de las glándulas bulbouretrales que interaccionan con componentes de los medios de conservación, produciendo sustancias tóxicas para el espermatozoide y reduciendo el éxito de la congelación (Coloma *et al.*, 2010). Para tratar de minimizar estos efectos, rutinariamente se realiza el lavado del semen para retirar el plasma seminal, sin embargo, se ha demostrado que esta práctica produce efectos deletéreos sobre la calidad espermática (Azeredo *et al.*, 2001). Además, en morueco se ha descrito la presencia de proteínas en el plasma seminal que pueden proteger del daño provocado por el choque térmico (Colas *et al.*, 2009) y que son importantes para la adecuada funcionalidad del espermatozoide (Cardozo *et al.*, 2006) por lo que su eliminación puede disminuir la exposición a estas proteínas protectoras y, por ende, a sus efectos beneficiosos. Dado que la interacción se produce entre las lipasas y las lecitinas de origen animal, una alternativa es el uso de lecitinas de origen vegetal como la soja. De hecho, en toro (Aires *et al.*, 2003), búfalo (Akhter *et al.*, 2012) y caballo (Papa *et al.*, 2010) ya se han utilizado observando que mejora la congelabilidad del semen y, en algunos casos, la fertilidad. Por tanto, el objetivo de este estudio es determinar si la lecitina de soja es una alternativa viable para su uso en los medios de congelación de semen de pequeños rumiantes en presencia de plasma seminal.

## MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se realizó entre el IRTA de Torre Marimon, donde están alojados los sementales y la UAB, donde se procesan y analizan las muestras seminales. Para ello, se utilizaron 14 machos jóvenes de 2 años de edad aproximadamente: 6 machos cabríos de la raza Blanca de Rasquera y 8 moruecos (4 de la raza Aranesa y 4 de la raza Xisqueta). Se

procedió a la recogida de 2 eyaculados/macho mediante vagina artificial a un ritmo de extracción de 2 días/semana. Con el fin de minimizar el efecto individual del donante, los eyaculados se mezclaron en cada una de las especies, posteriormente el semen fue dividido en dos tratamientos para su congelación. Cada tratamiento fue repetido 6 veces. En el tratamiento 1 (lavado), el semen fue diluido (1:5) en medio TGC (300 mM Tris, 28 mM glucosa, 95 mM ácido cítrico), centrifugado dos veces a 600xg durante 10 minutos y posteriormente resuspendido (1:4) en el medio de congelación en un solo paso. En el tratamiento 2 (sin lavar), el semen fue diluido (1:4) directamente en el medio de congelación en un solo paso. La composición del diluyente fue medio de TGC, más un 1% de lecitina de soja (Sigma 11145) y 5% (v/v) de glicerol, penicilina sódica 1000 UI y sulfato de estreptomicina 1 mg/ml. Una vez diluido, las alícuotas de la suspensión espermática se colocaron en un recipiente con agua a 20°C y se mantuvieron a 5°C durante 4 horas. Transcurrido este tiempo, las muestras fueron envasadas en pajuelas de 0,25 ml y congeladas en vapores de nitrógeno a 5 cm sobre la superficie del nitrógeno líquido durante 10 minutos antes de ser sumergidas en el nitrógeno. El análisis espermático se realizó a las 4 horas de refrigeración e inmediatamente después de la descongelación (37°C durante 60 s), el cual consistió en la determinación de la viabilidad espermática mediante la tinción de eosina-nigrosina y el análisis de la motilidad total mediante el sistema informatizado ISAS V.1.2® (PROISER, España). También se realizó la prueba de resistencia osmótica HOST (Forouzanfar *et al.*, 2010) únicamente para el semen refrigerado. Los resultados fueron analizados por medio del procedimiento GLM (SPSS 20).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El efecto del medio de congelación con o sin la remoción del plasma seminal sobre la viabilidad espermática se presenta en la tabla 1. No se observaron diferencias entre tratamientos (lavado y sin lavado) en la viabilidad del semen refrigerado y descongelado tanto en ovino como en caprino, aunque la viabilidad del semen sin lavar tiende a ser mayor que el semen lavado. Tampoco hubo diferencias en la prueba de HOST realizada para el semen refrigerado lavado y sin lavado de caprino ( $71.6 \pm 5.4$  vs  $68.5 \pm 4.5$ ) y ovino ( $57.5 \pm 6.1$  vs  $49.5 \pm 3.8$ ). Con respecto a la motilidad total sí hubo diferencias entre tratamientos ( $P < 0.05$ ), observándose mayor motilidad cuando no se retiró el plasma seminal en

el semen refrigerado de ambas especies. Tras la descongelación, en caprino se mantuvo esta tendencia, pero en ovino no se encontraron diferencias (tabla 1). Nuestros resultados en cierta manera coinciden con lo reportado con Roof *et al.* (2012) quienes observaron mayor porcentaje de motilidad total y progresiva antes y después de la congelación-descongelación en semen de caprino con plasma seminal y diluido en un medio a base de lecitina de soja. Si bien es cierto que, en nuestro caso, la viabilidad espermática no mejoró, la motilidad sí fue mayor en los espermatozoides no lavados que en los lavados, posiblemente debido a la presencia del plasma seminal en el medio o al haber evitado los efectos perjudiciales de la centrifugación. Fuera lo que fuere, es importante resaltar que en la criopreservación del semen de pequeños rumiantes en un medio a base de lecitina de soja no es necesario retirar el plasma seminal.

## **CONCLUSIÓN**

A pesar de ser todavía resultados preliminares, éstos parecen sugerir que no es necesario retirar previamente el plasma seminal en la criopreservación del semen de pequeños rumiantes en un medio a base de lecitina de soja, lo que permite eliminar los efectos adversos del lavado y del tiempo de manipulación, además de conseguir obtener un medio más estandarizado y con menores posibilidades de contaminación bacteriana.

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo fue financiado por el INIA (RZ2009-00008-00-00), la Generalitat de Catalunya (2009SGR0621 y CUR-DIUE), el Fondo social Europeo y la Fundación Carolina.

**Tabla 1. Viabilidad y motilidad total (media  $\pm$  error estándar) en semen de pequeños rumiantes criopreservados en un medio a base de lecitina de soja con o sin la remoción del plasma seminal.**

	Caprino				Ovino			
	Refrigerado		Descongelado		Refrigerado		Descongelado	
	Viabilidad	Motilidad total	Viabilidad	Motilidad total	Viabilidad	Motilidad total	Viabilidad	Motilidad total
Lavado	82.5 $\pm$ 4.4	49.1 $\pm$ 12.8 <sup>a</sup>	35.9 $\pm$ 3.1	8.3 $\pm$ 2.6 <sup>a</sup>	72.5 $\pm$ 3.5	58.9 $\pm$ 5.4 <sup>a</sup>	44.5 $\pm$ 2.5	42.7 $\pm$ 6.1
Sin lavado	87.1 $\pm$ 3.2	81.1 $\pm$ 6.3 <sup>b</sup>	45.1 $\pm$ 4.2	34.3 $\pm$ 4.8 <sup>b</sup>	85.0 $\pm$ 4.3	80.8 $\pm$ 3.4 <sup>b</sup>	46.2 $\pm$ 3.5	28.4 $\pm$ 3.5

Diferente letra en la columna indica diferencia estadística (P<0.05).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aires, V.A., Hinsch, K., Mueller-Schloesser, F., Bogner K., Mueller-Schloesser, S. y Hinsch, E. 2003. *Theriogenology*. 60: 269-279
- Akhter, S., Ansari, M.S., Andrabi, S.M.H., Rakha, B.A., Ullah, N. y Khalid, M. 2012. *Reprod. Dom. Anim.* 47: 815-819
- Azerêdo, G.A., Esper, C.R. y Resende, K.T. 2001. *Small Rumin Res.* 41:257-263
- Cardozo, J.A., Fernández-Juan, M., Forcada, F., Abecia, A., Muiño-Blanco, T. y Cebrián- Pérez, J.A. 2006. *Theriogenology*. 66: 841–850.
- Colás, C., Junquera, C., Pérez-Pé, R., Cebrián-Pérez, J.A. y Muiño-Blanco, T. 2009. *Microscopy Research and Technique*. 72: 566–572.
- Coloma, M.A., Toledano-Díaz, A., López-Sebastián, A. y Santiago-Moreno J. 2010. *Theriogenology*. 73:900-908
- Forouzanfar, M., Sharafi, M., Hosseini, S.M., Ostadhosseini, S., Hajian, M., Hosseini, L., Abedi, P., Nili, N., Rahmani, N.R. y Nasr-Esfahani, M.H. 2010. *Theriogenology*. 73: 480–487
- Papa, F.O., Felício, G.B., Melo, C.M., Alvarenga, M.A., De Vita, B., Avanzi, B.R. y Dell'Aqua Jr, J.A. 2010. *Anim. Reprod. Sci.* 121S: S171-S172
- Purdy, P.H. 2006. *Small Rumin Res.* 63:215-225
- Roof, D.J., Bowley, S., Price, L.L. y Matsas, D.J. 2012. *Theriogenology*. 77: 412-420

**EFFECT OF SEMINAL PLASMA IN THE  
CRYOPRESERVATION SOYBEAN LECITHIN BASED-MEDIA  
IN THE SPERM OF GOAT BLANCA DE RASQUERA AND RAM  
XISQUETA AND ARANESA BREEDS.**

**SUMMARY**

The aim was to determine whether soybean lecithin based-media is a viable alternative for the small ruminant semen preservation in the presence of seminal plasma. Therefore, semen was collected (n=6) on alternate days 6 goats or 8 rams. After collection, the ejaculates were pooled and split into two aliquots: 1) washed, the sperm was centrifuged twice at 600xg for 10' and re-suspended in a soybean lecithin-based media and 2) non-washed, sperm was diluted directly in the same media. Both samples were chilled for 4 hours at 5°C and subsequently frozen. The sperm viability was determined by eosin-nigrosin stain, not showing differences between treatments after cooling neither after post-thawing in any species. Likewise, no effect of treatment was found on ram or goat chilled sperm after HOS test. Simultaneously, total motility was analyzed by CASA system, being higher in non-washed sperm after cooling and thawing in both species, except in ram thawed sperm, where no differences were found. These preliminary results suggest that is not necessary to remove seminal plasma prior to cryopreservation sperm of small ruminants in soybean lecithin-based media.

Keywords: small ruminant, cryopreservation, sperm, soybean lecithin