

ESTUDIO DE LA CALIDAD ESPERMÁTICA DE LA RAZA BOVINA RUBIA GALLEGA DE CARA A LA EXPORTACION

La investigación y la mejora tecnológica en el sector de la reproducción animal han permitido la aparición de nuevas técnicas y equipos que permiten analizar con mayor precisión la calidad de las dosis seminales. Parámetros como viabilidad espermática, motilidad, termorresistencia o fragmentación de la cromatina entre otros, debido a su relación con la fertilidad, son parámetros cada vez más valorados, tanto en los centros de inseminación artificial que producen dichas dosis, como en las explotaciones ganaderas y empresas intermediarias que las reciben. A continuación se describen de manera sencilla los materiales y métodos, los resultados, y las conclusiones de una serie de experimentos llevados a cabo con el fin de estudiar la calidad del semen de la raza bovina Rubia Gallega y su aptitud en el marco de la exportación.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se realizó en el Centro de Selección y Reproducción Animal Xenética Fontao, situado en la provincia de Lugo (Galicia-España), donde las condiciones de alimentación y estabulación eran las mismas para cada uno de los animales, y todos ellos cumplían con los planes sanitarios exigidos por las autoridades. Para ello se utilizaron las técnicas laborales que se describen brevemente a continuación:

- Viabilidad espermática:

Esta técnica, mediante la ayuda de los fluorocromos SYBR-14 y IP (Sperm Viability Kit, L-7011, Molecular Probes), determina el porcentaje de espermatozoides viables en la muestra. Ambos fluorocromos tiñen el ADN de los espermatozoides pero solamente el SYBR-14 es permeable a las membranas plasmáticas, mientras que el IP tiñe solamente a los espermatozoides con discontinuidades o roturas en sus membranas (inviabiles). Con el uso del citómetro de flujo (Facs Calibur, Becton Dickinson) y debido a que los espermatozoides marcados con SYBR-14 emiten

diferente fluorescencia a aquellos marcados con IP, se determina el porcentaje de espermatozoides viables (Gráfico 1).

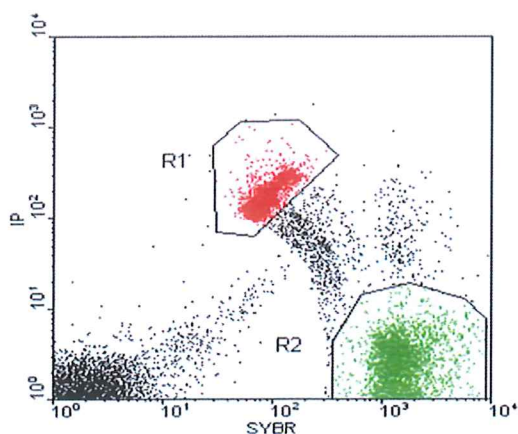


Gráfico 1. Citograma de análisis de viabilidad.

- Termorresistencia

Estudia la viabilidad espermática a lo largo del tiempo cuando se someten las muestras a un tratamiento térmico prolongado.

- Fragmentación de la cromatina

También conocido por las siglas SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay). Esta técnica mide la susceptibilidad del ADN de los espermatozoides a su desnaturalización "*in situ*" tras la exposición durante treinta segundos a un pH de 1,2 (solución HCl). Esta susceptibilidad está relacionada con la presencia de roturas de ADN. El ADN de espermatozoides con una cromatina normal no se desnaturaliza, mientras que si está dañado y contiene roturas en sus cadenas se pueden alcanzar diferentes grados de desnaturalización. Para determinar el grado de desnaturalización del ADN espermático tras un tratamiento ácido, se tiñen las células con naranja de acridina (Acridine Orange A3568, Molecular Probes). Dado que la naranja de acridina es un fluorocromo metacromático, éste emite en verde cuando se intercala en cadenas de ADN doble (ADN intacto), y en rojo si son de cadena sencilla (ADN fragmentado). El grado de desnaturalización de ADN, la intensidad de la fluorescencia verde y/o roja en los espermatozoides, se mide de forma cuantitativa por citometría de flujo (Facs Calibur, Becton

Dickinson) y se expresa como DFI (DNA fragmentation index) o variable *alpha_t*. (Gráfico 2)

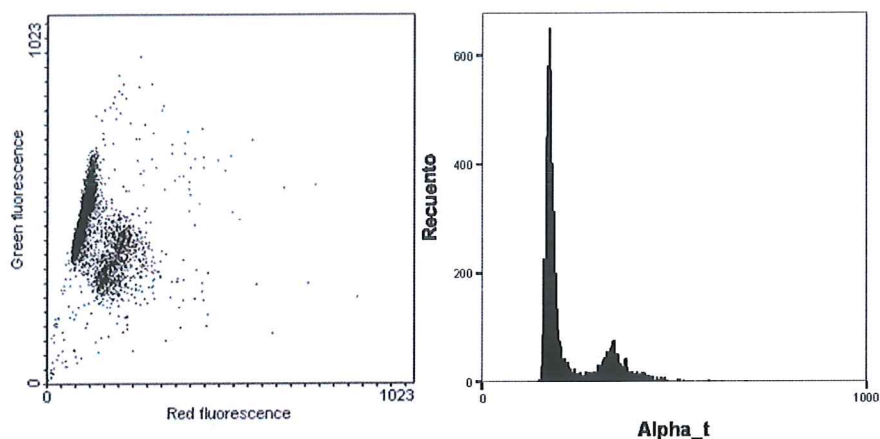
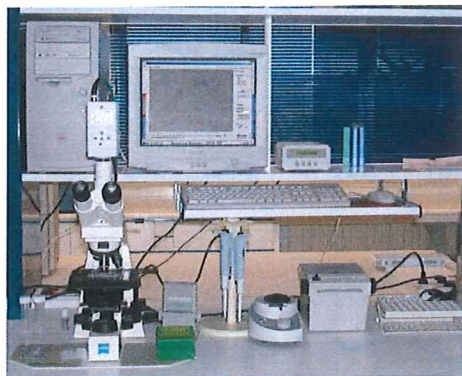


Gráfico 2. Citograma e histograma de SCSA

- Motilidad espermática

Esta técnica, con la ayuda de un sistema CASA (Computer assisted sperm analyzer, Fotografía 1), que consta de un microscopio (Nikon E600), una cámara digital (ISAS 782M), un software específico (ISAS v 1.2) y portas de recuento (Leja 20µm), estudia los parámetros relacionados con la motilidad de los espermatozoides.



Fotografía 1. Sistema CASA

Expermineto 1. Efecto de diferentes diluyentes comerciales en la criopreservación.

Para que la criopreservación espermática pueda tener lugar es imprescindible el uso de los diluyentes. Estos aportan azúcares, sustancias para regular el equilibrio ácido-base, antibióticos y crioprotectores que aseguran que los espermatozoides resistan los enormes contrastes de temperatura existentes tanto en la congelación con vapores de nitrógeno, como en la descongelación previa a la inseminación artificial. Existen en el mercado diluyentes comerciales elaborados por empresas del sector, con un uso muy extendido en los diferentes centros de inseminación artificial, pero sin una información clara sobre su capacidad crioprotectora.

En esta parte del estudio se evaluó el empleo de cuatro diluyentes comerciales (Biladyl, Optidyl, Steridyl y Optixcell) y su relación con la viabilidad espermática en toros de raza Rubia Gallega según los protocolos del centro de reproducción animal Xenética Fontao. Para ello se analizó la viabilidad del semen de 348 muestras de 26 sementales a lo largo de 14 meses, antes y después del proceso de congelación; estableciendo así una nueva variable (%MORT) que representa el porcentaje de mortalidad espermática durante la criopreservación. Mediante el estudio de esta nueva variable se obtuvo información de la calidad seminal en función del diluyente utilizado.

Experimento 2. Viabilidad y Motilidad espermática.

Este experimento se llevó a cabo para comprobar la relación existente entre la viabilidad y la motilidad espermática en semen de raza de Rubia Gallega. Como cabría esperar, existe una estrecha relación entre estos dos parámetros, pues solamente aquellos espermatozoides que sean viables pueden tener una motilidad normal, pero este movimiento puede no ser progresivo, y esto puede afectar a la fertilidad.

Para evaluar la relación entre estos parámetros, se tomaron muestras de semen de 12 toros de raza Rubia Gallega tras su colecta mediante método de vagina artificial. Estas muestras se diluyeron a una concentración de 25 millones

de espermatozoides por mililitro y se analizaron por triplicado para obtener datos de porcentaje de espermatozoides viables, porcentaje de espermatozoides móviles y porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva (aquellos con un 70% de su STR o índice de rectitud).

Experimento 3. Termorresistencia y fragmentación de la cromatina.

Para evaluar la capacidad de termorresistencia del semen de raza Rubia Gallega, se seleccionaron muestras de semen congelado de 12 sementales y se analizó su viabilidad después de la descongelación, así como su viabilidad tras 60 y 120 minutos en un baño seco a 37°C, comprobando así su resistencia a un tratamiento térmico prolongado. Con estos datos se elaboraron dos nuevas variables, porcentaje de mortalidad a los 60 minutos (%MORT-60) y porcentaje de mortalidad a los 120 minutos (%MORT-120). Además estas mismas muestras se analizaron mediante la técnica SCSA para comprobar el grado de desnaturalización de ADN de las mismas (variable COMPat) y su posible relación con la viabilidad espermática posterior a la descongelación (VIAB)

RESULTADOS

Experimento 1. Efecto de diferentes diluyentes comerciales en la criopreservación.

Se observó que el porcentaje de mortalidad espermática medio se situó en un 20%, cifra considerada normal según la bibliografía existente. El valor máximo de mortalidad fue de un 47,71%, mientras que el más bajo fue de tan solo 3.37% (Tabla 1). Además como se puede observar en los gráficos, la mortalidad fue menor en los diluyentes Biladyl y Optidyl que en los diluyentes Steridyl y Optixcell (Gráfico 3). De esta manera, se puede concluir que es aconsejable utilizar los diluyentes Steridyl y Optixcell solamente en aquellas muestras de semen que previamente a la congelación muestren porcentajes muy altos de viabilidad.

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
%MORT	348	3,37	47,71	20,3776	7,72964

Tabla 1. Estadísticos descriptivos variable %MORT

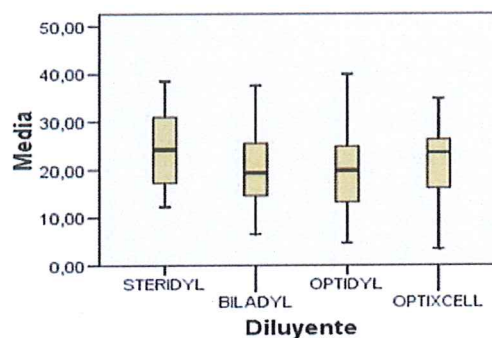
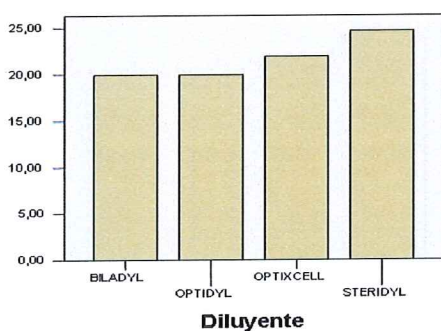


Gráfico 3. Histograma y diagrama de caja de la variable %MORT según el diluyente utilizado

Experimento 2. Viabilidad y motilidad espermática

Al analizar los resultados se observó que existe una estrecha relación entre espermatozoides móviles y viables. El porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva también mostró relación con las otras dos variables aunque sus valores siempre se mantuvieron por debajo en todos los sementales analizados (Gráfico 4).

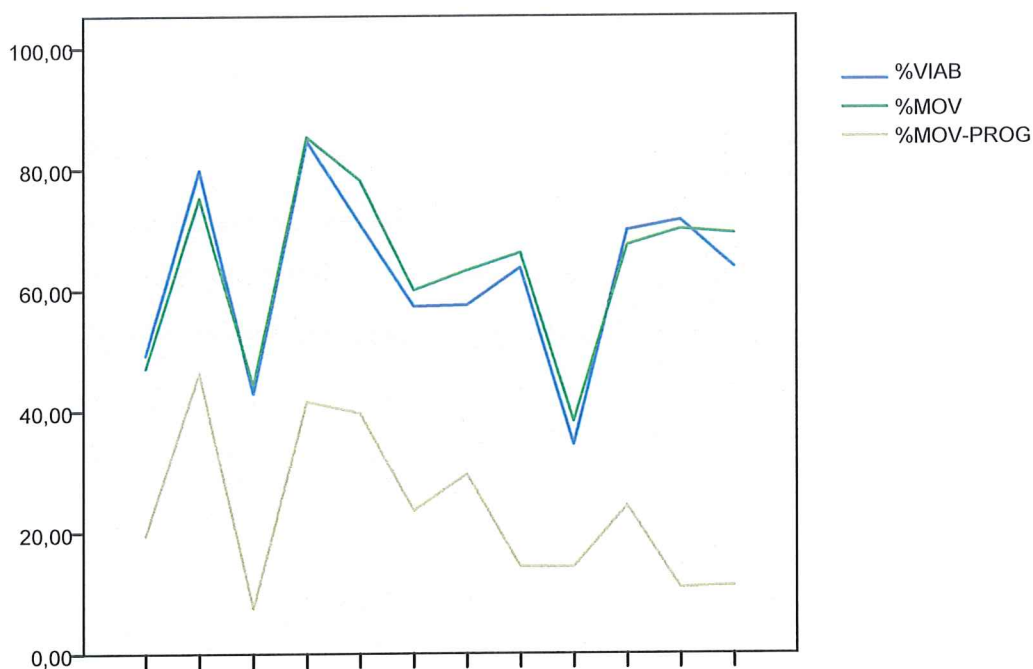


Gráfico 4. Porcentajes medios de viabilidad, motilidad y motilidad progresiva

Al representar los valores en gráficos de dispersión también se puede observar cómo la asociación entre viabilidad y motilidad es más estrecha que la asociación entre viabilidad y motilidad progresiva (Gráfico 5).

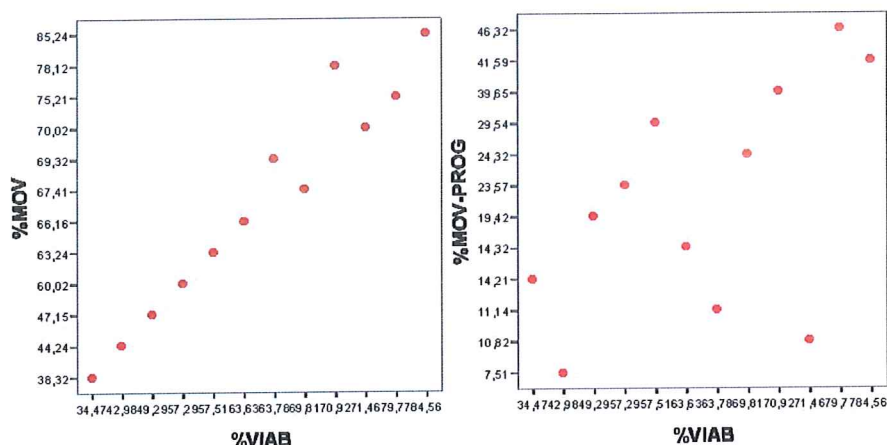


Gráfico 5. Gráfico de dispersión entre variables %MOV-%VIAB y %VIAB-%MOV-PROG

Para analizar estadísticamente la relación entre dichas variables, y cumpliéndose los supuestos de normalidad en ellas, se empleó el coeficiente de correlación de Pearson. Se observó relación significativa entre las tres variables, siendo está mayor entre el porcentaje de espermatozoides viables y el porcentaje de espermatozoides móviles, que entre el porcentaje de espermatozoides viables y el porcentaje de espermatozoides móviles progresivos (Tabla 2).

		%VIAB	%MOV	%MOV-PROG
%VIAB	Correlación de Pearson	1	,968(**)	,653(*)
	Sig. (bilateral)		,000	,021
	N	12	12	12
%MOV	Correlación de Pearson	,968(**)	1	,648(*)
	Sig. (bilateral)	,000		,023
	N	12	12	12
%MOV-PROG	Correlación de Pearson	,653(*)	,648(*)	1
	Sig. (bilateral)	,021	,023	
	N	12	12	12

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

Tabla 2. Coeficientes de correlación de Pearson entre variables %VIAB, %MOV y %MOV-PROG.

Experimento 3. Termorresistencia y fragmentación de la cromatina

Al analizar los valores medios de las variables estudiadas para cada uno de los doce animales, se comprobó que %MORT-60 no fue demasiado alto en comparación a la viabilidad post-descongelación, pero %MORT-120 si que aumentó de manera más significativa (Gráfico 6).

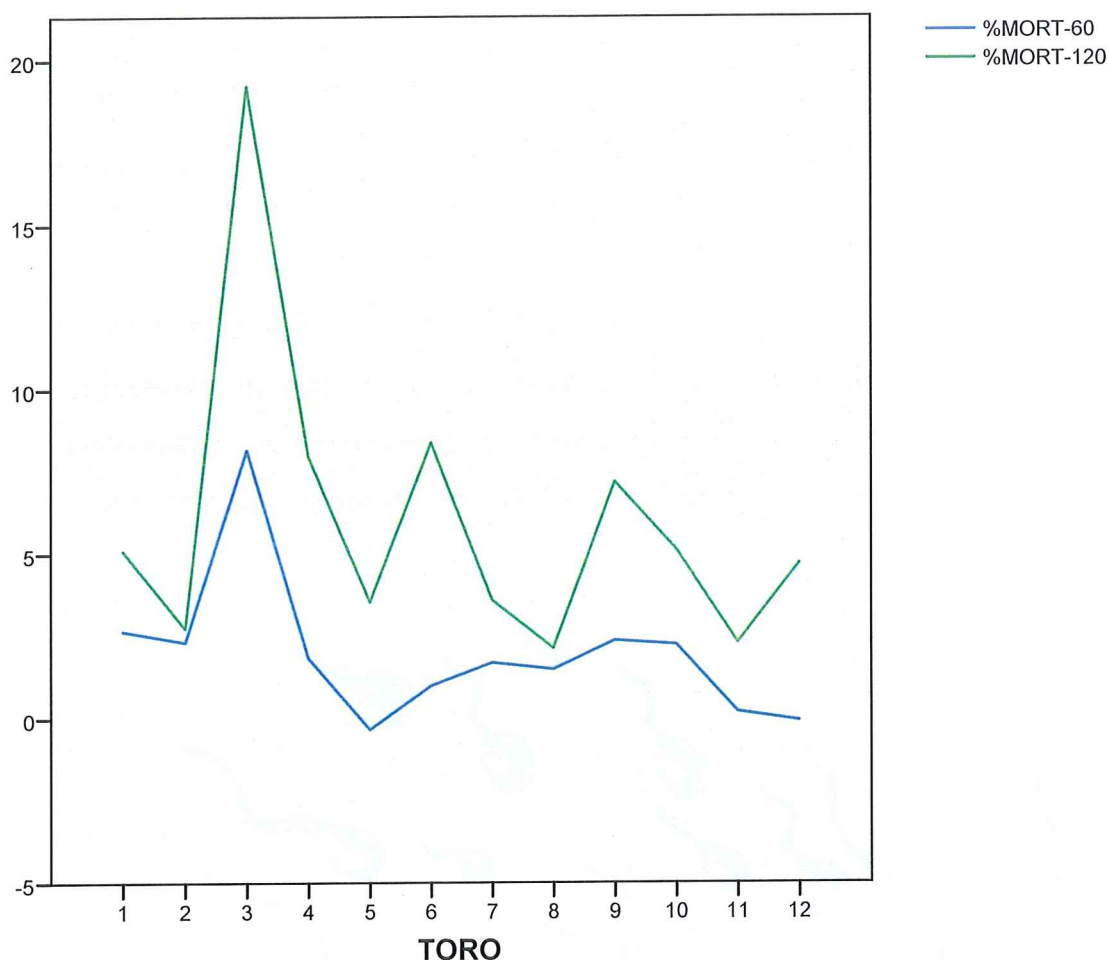


Gráfico 6. Porcentaje de mortalidad a los 60 y 120 minutos en baño seco 37°C

Con respecto al estudio de las variables VIAB y COMPat y a su posible relación estadística, al representar gráficamente los valores medios de las mismas, no se observó una posible dependencia (Gráfico 7).

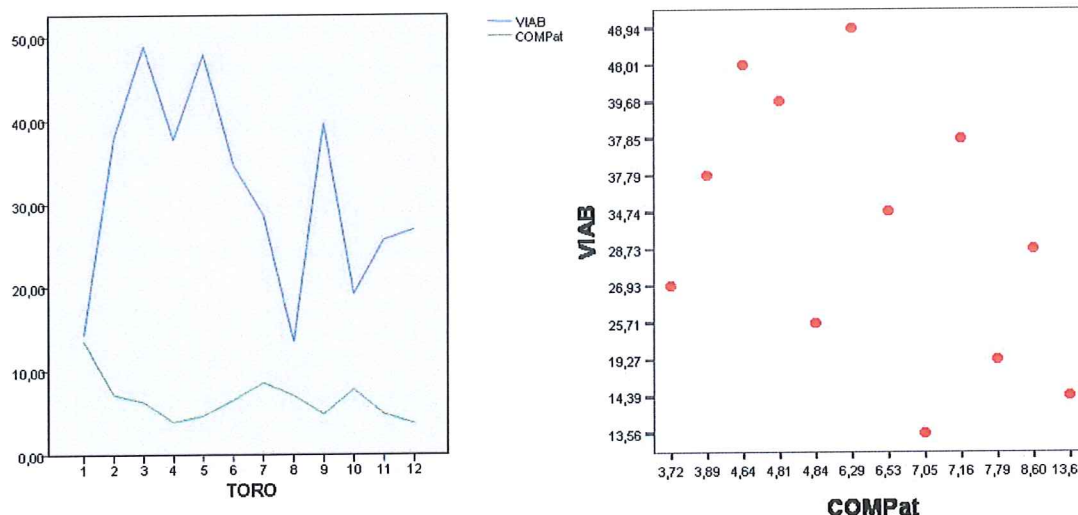


Gráfico 7. Representación gráfica y diagrama de dispersión de variables VIAB y COMPat

Para estudiar la posible relación entre ambas variables desde el punto de vista estadístico, y debido a que no se pudo demostrar la normalidad de la variable COMPat, se aplicó el coeficiente de correlación de Spearman. De esta manera, no se pudo demostrar que la relación entre ambas no fuera debida al azar ($p > 0.05$). Por lo tanto, en el presente experimento no existió una relación significativa entre las mismas.

CONCLUSIONES

- En el proceso de criopreservación del semen de toros de raza Rubia Gallega, la viabilidad post-descongelación depende del diluyente utilizado. Los mejores resultados se observaron con el empleo de los diluyentes Biladyl y Optidyl. De esta manera, solo se aconseja el empleo de los

- diluyentes Steridyl y Optixcell en aquellos sementales que muestren porcentajes de viabilidad previa a la congelación muy elevados.
- Existe relación significativa entre la viabilidad y la motilidad espermática, pero esta relación es menos estrecha cuando se considera solamente el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva.
 - La viabilidad espermática de la raza Rubia Gallega se reduce poco al someter las muestras seminales a un tratamiento térmico de 37°C durante 60 minutos. Esta reducción es mucho más evidente cuando se prolonga hasta 120 minutos.
 - Será fruto de futuras investigaciones estudiar la relación entre viabilidad y motilidad espermática en estos tratamientos térmicos prolongados.
 - No se observó una relación entre la viabilidad y la fragmentación de la cromatina en los espermatozoides de toros de raza Rubia Gallega.