

COMUNICACIÓN

CRIOPRESERVACIÓN *POSTMORTEM* DE MATERIAL ESPERMÁTICO E INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN EL CIERVO IBÉRICO

CRYOPRESERVATION OF SPERM SAMPLES COLLECTED *POSTMORTEM* AND ARTIFICIAL INSEMINATION IN IBERIAN DEER

Garde, J.J, N. Ortiz, A.J. García, A. López y L. Gallego

Departamento de Ciencia y Tecnología Agroforestal. ETSIA. Universidad de Castilla-La Mancha. 02071. Albacete. España.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES

Cervus elaphus. Ciervo rojo. Epidídimo. Espermatozoides. Fertilidad.

ADDITIONAL KEYWORDS

Cervus elaphus. Epididymis. Fertility. Red deer. Spermatozoa.

RESUMEN

El presente trabajo se planteó con un doble objetivo. En primer lugar, para evaluar de forma comparativa el efecto crioprotector de tres diluyentes sobre las características a la postdescongelación de las muestras espermáticas de alta (ACI) y baja calidad (BCI) inicial obtenidas *postmortem* en el ciervo. Y en segundo lugar, para determinar las posibilidades fecundantes reales de las dosis espermáticas así congeladas mediante la realización de una prueba *in vivo* de inseminación artificial. Los tres diluyentes utilizados en el primer experimento fueron: Citrato sódico-fructosa, Tris-lactosa y Triladil®.

Las muestras espermáticas fueron recogidas del epidídimo después de la muerte de los venados. Para evaluar los efectos de estos tres diluyentes sobre las características espermáticas se determinaron el porcentaje de movilidad individual (MI), la tasa de acrosomas intactos (AI) y el porcentaje de espermatozoides con endósmosis positiva (E+). La evaluación de las muestras espermáticas reflejó diferencias esta-

dísticamente significativas ($p < 0,001$) en función del diluyente empleado y de la interacción diluyente-calidad inicial de las mismas. Así, para las dosis ACI los mayores valores ($p < 0,001$) de MI, AI y E+ a la descongelación se obtuvieron para el diluyente a partir de lactosa. Por el contrario, para las dosis BCI, fue el diluyente Triladil® el que mejores valores de calidad espermática postdescongelación reportó. En el segundo experimento, un grupo de 17 ciervas ibéricas fue inseminado con dosis congeladas con Triladil® debido a que eran muestras BCI. Para ello, inicialmente se sincronizó la ovulación mediante la aplicación intravaginal de 2 CIDRs (0,33 g de Progesterona cada uno), inyectándose 300 UI de eCG en el momento de la retirada de los dispositivos. Los animales se inseminaron dos veces (a las 44 y 66 h de la retirada de los CIDRs) por vía vaginal. Los resultados de fertilidad se determinaron sobre la base de los datos de los partos. De las 17 ciervas inseminadas, 4 (23,5 p.100) quedaron gestantes y parieron a los 235±4 días de la inseminación artificial.

Arch. Zootec. 47: 351-356. 1998.

SUMMARY

Our research had two aims. First, to assess and compare the cryopreserving effects of three extenders on the characteristics after thawing of sperm of high (HIQ) and low (LIQ) initial quality in samples obtained *postmortem* in red deer. The second aim was to assess the true fertilising capability of sperm doses thus frozen by means of an artificial insemination trial.

The three diluents used in the first test were: a Sodium citrate-fructose extender, the commercial extender Triladil[®], and a Tris-lactose diluent.

The sperm samples were obtained from the epididymis of the deer after their death. To assess the effects of these three extender on the sperm characteristics the following variables were evaluated: percentage of individual motility (IM), rate of intact acrosomes (IA) and the percentage of spermatozoa with positive endosmosis (E+). The analysis of sperm samples showed a significant effect ($p < 0.001$) of the different extenders and an interaction of extender-initial quality of the samples for all the variables mentioned.

Thus, for the HIQ doses the greatest values ($p < 0.001$) of IM, IA and E+ after thawing were obtained in samples using lactose as cryoprotective. In contrast, for the LIQ doses the diluent that produced the best sperm quality at thawing was Triladil[®].

In the second experiment, a group of 17 Iberian hinds were inseminated with sperm doses frozen with Triladil[®] as the samples had LIQ. To conduct the insemination, ovulation was synchronised applying 2 CIDRs simultaneously inside the vagina (each having 0.33 g of P₄), and 300 UI of eCG were injected at the time of CIDR removal.

The females were inseminated twice (at 44 and 66 h after CIDR removal) via vagina. The fertility results were assessed from the birth recorded. Conception was confirmed in 4 hinds by birth of 4 fawns (23.5 percent).

INTRODUCCION

Las técnicas de Reproducción Asistida presentan numerosas posibilidades para ser empleadas para la propagación y conservación de las distintas especies de cérvidos. En el caso del ciervo ibérico (*Cervus elaphus hispanicus*), el empleo de una de estas técnicas, como es la inseminación artificial con semen descongelado presenta un gran interés debido a las numerosas ventajas que dicha tecnología puede aportar para nuestra subespecie. Así, y debido a la utilización de los cercados para la ordenación cinegética de las fincas, se está provocando una profunda alteración del movimiento de las reses, originándose en muchos casos la fragmentación de las poblaciones. Esta fragmentación de las poblaciones ocasiona un alarmante aumento de la consanguinidad con los consiguientes riesgos que ello conlleva (Ralls *et al.*, 1979). Una de las posibles soluciones a este problema es la inseminación artificial de las ciervas con semen descongelado procedente de venados selectos abatidos durante el desarrollo de las distintas actividades cinegéticas. Sin embargo, para afrontar con ciertas garantías de éxito un programa de inseminación artificial de esta naturaleza, se hace necesario en primer lugar el desarrollo de una metodología de congelación de los espermatozoides obtenidos *postmortem* en el ciervo, que reporte unas buenas características espermáticas a la postdescongelación y que mantenga el poder fecundante *in vivo* de los espermatozoides así conservados.

Por todo ello, y debido al interés que presenta el desarrollo de un pro-

CONGELACIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE CIERVO

grama de inseminación artificial para la conservación de la diversidad genética en el ciervo ibérico se ha planteado el presente trabajo, el cual ha tenido dos objetivos. En primer lugar, la evaluación de forma comparativa del efecto crioprotector de tres diluyentes sobre las características espermáticas a la postdescongelación de muestras de distinta calidad inicial obtenidas *postmortem* en el ciervo. Y en segundo lugar, la determinación de las posibilidades fecundantes reales de las dosis espermáticas así congeladas mediante la realización de una prueba *in vivo* de inseminación artificial.

MATERIAL Y MÉTODOS

El trabajo experimental se planificó en dos fases, constituyendo cada una de ellas experimentos consecutivos en el tiempo.

EXPERIMENTO 1

Este trabajo se realizó a partir de muestras espermáticas obtenidas *postmortem* de los epidídimos de 75 venados adultos abatidos por cacería selectiva durante la época reproductiva. La recogida de los aparatos reproductores se llevó a cabo entre las 10 y las 20 horas después de la muerte de los animales, retirando los órganos genitales completos del cuerpo de los venados inmediatamente antes de su traslado al laboratorio en neveras portátiles a 5°C. Las gónadas llegaron siempre al laboratorio dentro de las dos horas siguientes a su separación del cuerpo de los animales. Posteriormente se procedió a la obtención y contrastación de los espermatozoides.

Una vez realizada dicha contrastación inicial, se clasificaron los mismos en muestras de alta (ACI) o de baja calidad (BCI) inicial. Los criterios mínimos establecidos para clasificar una muestra como de ACI fueron $MI > 50$ p.100 y $AI > 75$ p.100. Posteriormente, se mezclaron las muestras espermáticas de una misma categoría procedentes de tres machos distintos, dividiéndose el volumen final de cada mezcla en tres alcuotas con el fin de desarrollar con cada una de ellas, las tres técnicas de congelación evaluadas. Como diluyentes para la conservación del semen se utilizaron los tres siguientes:

A: Citrato sódico y fructosa (Krzywinski, 1981).

B: Triladil® (Haigh y Hudson, 1993).

C: Tris-lactosa (Diluyente experimental).

Los tres diluyentes incorporan en su constitución diferentes concentraciones de glicerol y yema de huevo. El procesado de las muestras para su congelación fue similar para los 3 medios empleados, diluyéndose inicialmente las muestras a temperatura ambiente con una primera fracción sin glicerol de cada menstuo. Posteriormente, el material seminal fue refrigerado a 5°C en 90 min, realizándose una segunda dilución a dicha temperatura con la segunda fracción de cada solución crioprotectora (las cuales incorporan glicerol, diluyente A y glicerol y lactosa, diluyente C). Las muestras permanecieron a 5°C durante 2 horas para su equilibración. Para el Triladil® la dilución se realizó en un único paso, añadiéndose el volumen total de diluyente a temperatura ambiente. Se envasaron las dosis en pajuelas de 0,25

ml, congelándose sobre vapores de nitrógeno líquido. La descongelación se realizó en un baño térmico a 37°C durante 1 minuto.

Las muestras espermáticas fueron evaluadas inmediatamente después de su obtención, a la pre congelación y después de la descongelación. Para ello, se determinaron el porcentaje de movilidad individual (MI), la tasa de acrosomas intactos (AI) y el porcentaje de espermatozoides con endósmosis positiva (E+). Los datos obtenidos para cada momento de evaluación, diluyente, tipo de muestra y parámetro seminal evaluado fueron comparados mediante el empleo de un análisis de varianza utilizando el paquete estadístico SAS (SAS Institute, Cary, NC). Las diferencias significativas entre grupos fueron detectadas por el test de significación mínima de Fisher. Se realizaron 5 replicas independientes, evaluándose para cada momento, tipo de muestra, diluyente, parámetro seminal evaluado y replica, 200 células espermáticas.

EXPERIMENTO 2

Este segundo experimento se realizó para evaluar *in vivo* la capacidad fecundante de los espermatozoides descongelados procedentes de ciervos abatidos. Para ello, se emplearon 17 hembras de ciervo ibérico a las que se indujo y sincronizó la ovulación mediante la aplicación intravaginal y simultánea de 2 CIDRs (0,33 g de Progesterona cada uno), inyectándose 300 UI de eCG en el momento de la retirada de los dispositivos. Los animales se inseminaron dos veces (a las 44 y 66 h de la retirada de los CIDRs) por vía vaginal, para ello las ciervas

Tabla I. Características celulares iniciales de los espermatozoides epididimarios de ciervo*. (Initial cellular characteristics of red deer epididymal spermatozoa).

	Tipo de Muestras	
	Calidad Alta (ACI)	Calidad Baja (BCI)
MI (p.100)	76,7±0,5 ^a	45,0±2,0 ^b
Calidad Mov. (0-5)	3,8±0,1 ^a	2,4±0,1 ^b
AI (p.100)	81,4±0,4 ^a	69,6±1,4 ^b

*Todos los valores están expresados como medias±SEM (n=75).
^{a,b}Grupos en la misma fila con distintos superíndices son estadísticamente diferentes (p<0,001).

fueron contenidas mecánicamente en un inmovilizador. Las inseminaciones se realizaron los días 19 y 20 de septiembre de 1996. Las dosis seminales empleadas fueron obtenidas entre las 10 y las 24 de la muerte de 3 machos abatidos durante la época de berrea de 1995. Las muestras espermáticas de cada individuo se procesaron de forma independiente mediante el empleo de Triladil®, ya que eran muestras BCI. La metodología utilizada en la congelación y descongelación de las dosis fue idéntica a la descrita en el experimento anterior para este mismo diluyente. Los resultados de fertilidad se determinaron por el número de hembras paridas con relación al de inseminadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos con relación a la calidad espermática inicial de

CONGELACIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE CIERVO

las muestras aparecen reflejados en la **tabla I**, observándose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) para todos los parámetros seminales analizados en función del tipo de muestra evaluada. Este hecho nos demuestra que, efectivamente, las muestras ACI y BCI son inicialmente diferentes.

Por otro lado, los efectos de los tres medios evaluados sobre las características espermáticas a la postdescongelación en los dos tipos de muestras analizadas aparecen representados en la **tabla II**. Como puede observarse, cuando las muestras son ACI los mayores valores ($p < 0,05$) de calidad espermática son aportados, para todos los parámetros analizados, por el diluyente experimental que incorpora lactosa en su composición; aparecien-

do los valores más bajos para el diluyente citrato-fructosa. Por el contrario, cuando las muestras son BCI, los mejores valores ($p < 0,05$) de calidad espermática a la descongelación, se obtienen para el Triladil[®], apareciendo los peores para la lactosa y el citrato-fructosa. Estos resultados nos demuestran la existencia de una interacción altamente significativa ($p < 0,001$) entre la calidad inicial de las muestras y el diluyente empleado para la conservación de las mismas sobre los parámetros evaluados a la descongelación. Por tanto, la capacidad crioprotectora del diluyente a partir de lactosa parece estar condicionada por la calidad inicial de las muestras. Así, para las muestras ACI este diluyente resulta ser el medio protector más eficaz, sin embargo no demostró esta

Tabla II. Efectos de tres medios crioprotectores sobre los parámetros celulares a la postdescongelación de las muestras espermáticas de diferente calidad inicial obtenidas postmortem en el ciervo*. (Effects of three cryoprotective extenders on post-thawing cellular parameters of different quality deer sperm samples obtained *postmortem*).

	Muestras de alta calidad inicial (ACI)		
	MI	AI	E+
Citrato-fructosa	35,0±0,9 ^c	37,3±0,9 ^c	37,5±0,7 ^c
Tris-Lactosa	58,6±0,9 ^a	58,0±0,8 ^a	52,7±1,1 ^a
Triladil [®]	49,2±0,7 ^b	45,3±0,8 ^b	44,1±0,8 ^b
	Muestras de baja calidad inicial (BCI)		
	MI	AI	E+
Citrato-fructosa	16,0±1,9 ^c	44,9±2,9 ^b	60,7±2,9 ^b
Tris-Lactosa	21,0±1,0 ^b	45,6±1,2 ^b	42,4±1,1 ^c
Triladil [®]	38,6±1,7 ^a	60,2±1,4 ^a	71,2±2,7 ^a

*Todos los valores son medias±SEM (n=25).

^{a,b,c}Grupos dentro de la misma columna con distintos superíndice difieren estadísticamente ($p < 0,05$).

misma eficacia crioprotectora cuando las muestras eran BCI. La presencia de lactosa en el medio provoca la aparición de un estado de hipertonidad que puede originar la deshidratación celular, evitando así la formación de cristales intracelulares y protegiendo de esta manera, mejor que el resto de diluyentes evaluados, de los efectos nocivos que la congelación tienen sobre las células espermáticas. Sin embargo, en las muestras BCI, los efectos beneficiosos de la lactosa no sólo no se observan, sino que además parece presentar un efecto perjudicial para los espermatozoides. Ello puede explicarse sobre la base de que los espermatozoides pertenecientes a estas muestras más sensibles, no soportan el estrés osmótico debido a la presencia de lactosa en el medio crioprotector,

provocando, por tanto, un mayor grado de lesión en las membranas plasmáticas de estas células durante los procesos de congelación-descongelación.

Por último, los resultados del segundo experimento nos indican que de las 17 ciervas inseminadas con dosis seminales procedentes de venados muertos, 4 (23,5 p.100) quedaron gestantes y parieron a los 235 ± 4 días de la inseminación. Estos resultados muestran por primera vez el nacimiento de nuevos individuos en ciervo rojo mediante el empleo de células espermáticas criopreservadas obtenidas de animales muertos, pudiendo tener estas observaciones implicaciones muy importantes de cara a la conservación de especies o subespecies de cérvidos en peligro de extinción.

BIBLIOGRAFÍA

Haigh, J.C. and R.J. Hudson. 1993. Reproductive Biology. In: Farming Wapiti and Red Deer. St. Louis: Mosby Publishing: 116-134.

Krzywinski, A. 1981. Freezing of postmortem collected semen from Moose and Red Deer.

Acta Theriologica, 26: 424-426.

Ralls, K., K. Brugger and J. Ballou. 1979. Inbreeding and juvenile mortality in small populations of ungulates. *Science*, 206: 1101-1103.