

CAPACIDAD FERTILIZANTE *IN VITRO* DEL SEMEN DE BURRO CRIOLLO (*Equus asinus*) CRIOPRESERVADO EN DOS DILUYENTES COMERCIALES

Toscano T.I.A.^{1*}, Olivo Z.I.B.¹, Núñez A.R.E.¹,
Cajero J.M.², Val A.D.², Conejo N.J.¹

¹Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

*daggetydandy@yahoo.com.mx.

²Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

RESUMEN

Los ensayos de unión heteróloga (espermatozoide-ovocito), son procedimientos eficaces para analizar la capacidad fertilizante de los espermatozoides de burro. Sin embargo, en México se conoce poco sobre estos estudios en la especie equina. En este trabajo se evaluó la capacidad fertilizante del semen de burro criollo posterior a su congelación-descongelación empleando dos diluyentes, el Equipro® y el Triladyl®. Se analizó el efecto del plasma seminal en la calidad espermática durante el proceso de congelación y se determinó la capacidad fertilizante mediante el ensayo de unión utilizando ovocitos de cerda. Se obtuvieron 15 eyaculados provenientes de 3 burros criollos en etapa reproductiva mediante vagina artificial. La fracción espermática se evaluó macro y microscópicamente. Cada eyaculado se dividió y congeló en los diluyentes con plasma seminal (CPS) y sin plasma seminal (SPS). Se determinaron los porcentajes de movilidad progresiva (MP) y viabilidad (V) postdescongelación (PC) y el número de espermatozoides unidos/ovocito se determinó por conteo directo. Se utilizó un ANOVA de bloques multivariados (calidad espermática) y de una vía con prueba *pos hoc* de Tukey (capacidad de unión). Resultados, Equipro: MP/PC 35.7±10.7 y 31.3±9.2; V/PC 67.7±9.1 y 65.0±11.6 SPS y CPS respectivamente. Triladyl: MP/PC 40.3±9.9 y 37.3±8.0; V/PC 66.6±10.6 y 66.5±8.9 SPS y CPS respectivamente. No se encontraron diferencias significativas ($P>0.05$) entre diluyentes, ni CPS y SPS. El número de espermatozoides unidos/ovocito: Equipro, SPS 5.2 y CPS 1.2. Triladyl, SPS 4.83 y CPS 2.98; se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P<0.05$) entre diluyentes en las condiciones CPS y SPS. Conclusión: Con ambos diluyentes los porcentajes de MP y V se considera aceptables y dichos valores no se ven afectados por la presencia de plasma seminal. Los resultados sugieren que el Triladyl facilita la capacidad fertilizante del espermatozoide de burro.

Palabras clave: Congelación; Diluyente; Espermatozoides; Ensayo de unión; Plasma seminal.

**IN VITRO FERTILIZER CAPACITY SPERM OF CREOLE DONKEY (*Equus asinus*)
CRYOPRESERVED IN TWO COMMERCIAL DILUENTS**

ABSTRACT

Heterologous binding assays (spermatozoa-oocytes), are effective procedures that analyze the fertilizing capacity of sperm donkey. However, in Mexico, there is little known about these techniques in the equine species. In this work, creole donkey semen was analyzed after freezing-thawing employed two extenders such as Triladyl and Equipro through to fertilizing capacity assay. The effect of seminal plasma on sperm quality was analyzed during the freezing procedure and the fertilizing capacity was determined by the binding assay using sow oocytes. 15 ejaculates from 3 creole donkey's reproductive stage by artificial vagina method were obtained. The sperm fraction was evaluated macroscopically and microscopically. Each ejaculate was divided and frozen using extenders described before, with removal of seminal plasma (RSP) or without removal of seminal plasma (PSP). Percentages of progressive motility (PM) and viability (V) post-thawing (PT) and the number of sperm bound to oocyte were determined by direct counting. ANOVA multivariate blocks (sperm quality) and analysis one way variance with pos hoc Tukey test (binding capacity) was performed. Results, Equipro: PM/PT 35.7±10.7 and 31.3±9.2; V/PT 67.7±9.1 and 65.0±11.6 RSP and PSP respectively. Triladyl: PM/PT 40.3±9.9 and 37.3±8.0; V/PT 66.6±10.6 and 66.5±8.9 RSP and PSP respectively. Non statistically significative values were obtained ($P>0.05$) compared Equipro vs Triladyl, neither RSP nor PSP. Number of sperm bound/oocyte: Equipro, RSP 5.2 and PSP 1.2. Triladyl, RSP 4.83 and PSP 2.98; significative values ($P<0.05$) between extensors were found in both RSP and PSP conditions. Conclusion: MP y V percentages was considered acceptable for two extenders, moreover, seminal plasma no affected these results. These data suggested that Triladyl improved donkey sperm fertilizing capacity.

Keywords: Cryopreservation; Extender; Spermatozoa; Binding assays; Seminal plasma.

INTRODUCCIÓN

En México, se ha observado un descenso dramático de la población asnal en las últimas cuatro décadas. En 1970 había 3.2 millones de cabezas (SIC. Dirección General de Estadística, 1975), mientras que en 1991 la población asnal descendió a 1.5 millones (INEGI, 1994) y en 2007 se registraron 581 mil cabezas (INEGI, 2007), lo que implica que en cuatro décadas disminuyó la población de burros en

80% aproximadamente. Se considera que uno de los principales motivos de este descenso es la implementación y extensión de la maquinaria agrícola y el desarrollo de los modernos medios de transporte (Villegas *et al.*, 2001). De seguir descendiendo el inventario nacional a la misma velocidad, el burro en México estaría en peligro de desaparecer a mediano plazo. Del poco más de medio millón de cabezas de burros la mayoría son animales criollos, que proceden de la cruce indiscriminada de las razas de burros españolas introducidas a la Nueva España durante la conquista. López-Alonso and de Aluja (2005) han comprobado que las poblaciones del burro criollo mexicano derivan en primer lugar de la raza Andaluza, seguido de las razas Zamorano-Leonesa y Majorera de las Islas Canarias. Durante más de 500 años los burros fueron criados por la población indígena y campesina de nuestro país, con alimentos baratos y de bajo valor nutritivo, lo que propició el desarrollo de individuos de talla pequeña (Aluja *et al.*, 2005), pero adaptados a las condiciones de la población pobre y a las diversas regiones ecológicas de México. Dicho animal actualmente es una especie con importancia económica en las zonas rurales del centro y sur de nuestro país ya que se utiliza como medio de transporte, como animales de tiro y como animales para el deporte y la recreación (Arriaga *et al.*, 2003). Los programas de conservación del burro incluyen la reproducción natural *in situ*, la inseminación artificial para la procreación de más individuos y la conservación del germoplasma que incluye la criopreservación de tejidos y semen. El uso del semen congelado, es una herramienta biotecnológica que se ha empleado principalmente para la conservación de las razas nativas de burros, sin embargo se han realizado pocos estudios en todo el mundo y no se han estandarizado protocolos de congelación para esta especie (Oliveira *et al.*, 2006). En España, Brasil y Francia, se han adaptado protocolos basados en los procedimientos empleados para la criopreservación del semen de caballos con resultados de movilidad espermática que alcanzan un máximo de 40%, más aún, en el momento de evaluar la fertilidad han mostrado que este porcentaje se reduce (Canisso *et al.*, 2008). La determinación de la capacidad fecundante del semen congelado mediante los ensayos de unión (espermatozoide-ovocito) heteróloga, son procedimientos eficaces para evaluar la viabilidad de los espermatozoides de burro. Sin embargo, en México no se reportan investigaciones dirigidas a esta especie. El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad fertilizante *in vitro* del semen de burro criollo (*Equus asinus*) criopreservado en dos diluyentes comerciales (Equipro® y Triladyl®) con y sin plasma seminal, mediante el ensayo de unión en ovocitos de cerda.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron 15 muestras seminales provenientes de 3 burros criollos en etapa reproductiva con características raciales Andaluz y Catalán. Se colectaron en julio-diciembre del 2013 mediante vagina artificial. Los animales eran provenientes de municipios conurbados de la ciudad de Morelia, Michoacán. Cada muestra seminal se diluyó en Equipro Apx2® en una proporción de 1:1, para su mantenimiento a temperatura ambiente, durante el transporte hasta el laboratorio. Las características macroscópicas del semen fueron: volumen, color y pH; y las microscópicas: movilidad masal, movilidad progresiva, viabilidad, morfología y concentración espermática (Taberner, 2010). La viabilidad se determinó mediante la tinción eosina-nigrosina. Los eyaculados colectados cumplieron con los estándares ideales establecidos para equinos. Estos estándares incluyen: movilidad progresiva y viabilidad mayor al 70%, y menos del 20% de anomalías espermáticas. Cada eyaculado se dividió en 4 fracciones y se sometió a los siguientes tratamientos: a) Congelación en Equipro Cryoguard® (Base lactosa; 20% de yema de huevo y glicerol), con plasma seminal (CPS) y sin plasma seminal (SPS). b) Congelación en Triladyl® (Base Tris; 20% yema de huevo y glicerol) CPS y SPS. Para retirar el plasma seminal, se centrifugó el semen a 600 rpm durante 10 minutos. Posteriormente se determinaron los porcentajes de movilidad progresiva (MP) y viabilidad (V) postdescongelación (descongelación a 37°C durante 30 segundos). Para el ensayo de unión, se incubaron un total de 100 ovocitos de cerda libres de células de la granulosa, con los espermatozoides de burro descongelados (2000 espermatozoides por ovocito) en medio de fertilización *in vitro* (Solución Tirodes suplementada con 25mM bicarbonato de sodio, 22mM Na-lactato, 1mM Na piruvato, 6mg/ml de BSA libre de ácidos grasos) por tratamiento durante 4 horas a 38.5°C en 5% de CO₂. Transcurrido el tiempo los ovocitos con los espermatozoides fueron lavados en medio PBS suplementado con 0.3% de BSA y fueron mezclados vigorosamente por 5 segundos a efecto de eliminar las uniones débiles de los espermatozoides a la zona pelúcida (ZP). Posteriormente los ovocitos se tiñeron con el fluorocromo Hoechst 33248 durante 3 min, para ser evaluados al microscopio de contraste de fases (Carl Zeiss) y determinar el porcentaje de espermatozoides que se unieron a la zona pelúcida o que penetraron la membrana del ovocito. Para la evaluación de los parámetros de calidad espermática, se utilizó un análisis de varianza de bloques multivariados. Para analizar la capacidad de unión espermatozoide-ovocito se realizó un análisis de varianza de una vía y una prueba *pos hoc* de Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

No se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre diluyentes, tampoco comparando semen CPS y SPS, postdescongelado. Los porcentajes de MP se mantuvieron $>$ al 30% postdescongelación y la V $>$ al 60%, siendo muy similares en cada uno de sus tratamientos (tabla I). En la capacidad fertilizante *in vitro* se encontró un efecto significativo ($p \leq 0.05$) de la ausencia del plasma seminal en la capacidad de unión de los espermatozoides de burro criollo a los ovocitos de cerda, tanto dentro del diluyente como entre diluyentes. Cuando el semen SPS se congeló en Equipro, el número de espermatozoides/ovocito fue de 5.2, mientras que CPS fue de 1.2.

Tabla I. Movilidad progresiva (MP) y viabilidad (V) del espermatozoide de burro criollo congelado en Equipro vs Triladyl sin plasma seminal (SPS) y con plasma seminal (CPS) ($n=15$) [*Progressive motility (PM) and viability (V) of creole donkey sperm frozen in Equipro vs Triladyl with removal of seminal plasma (RSP) or without removal of seminal plasma (PSP) (n=15)*]

| | Tratamiento | | | |
|----|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|
| | Equipro | | Triladyl | |
| | SPS | CPS | SPS | CPS |
| MP | 35.7± 10.7 ^a | 31.3± 9.2 ^a | 40.3± 9.9 ^a | 37.3± 8.0 ^a |
| V | 67.7± 9.1 ^a | 65.0± 11.6 ^a | 66.6± 10.6 ^a | 66.5± 8.9 ^a |

Literales diferentes por fila indican diferencias significativas en $P < 0.05$.

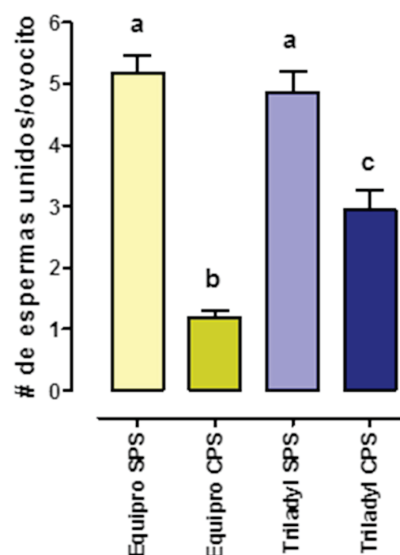


Figura 1. Ensayo de unión heteróloga *in vitro* para determinar la interacción de espermatozoides de burro con ovocitos de cerda. (*Heterologous binding assay in vitro to evaluate the interaction of sperm donkey with sow oocytes*). *Las letras diferentes indican que los datos son estadísticamente significativos $P \leq 0.05$.

El semen congelado en Triladyl SPS resultó en 4.83 espermatozoides/ovocito y CPS fue de 2.98 (figura 1). En este trabajo, el análisis de los parámetros del semen, evaluados posterior al proceso de congelación, resultaron buenos, obteniéndose porcentajes de movilidad progresiva y viabilidad arriba del 30% y más del 60%, respectivamente, estos datos concuerdan con lo reportado en la literatura, donde se reportan movilidades que van del 37% (Canisso *et al.*, 2011) al 56.6% (Trimeche *et al.*, 1998) en semen de burro postdescongelación. Los porcentajes de movilidad progresiva y viabilidad del semen congelado en Triladyl y Equipro, son similares también a lo reportado por Qeusada *et al.*, (2012) quienes utilizaron un diluyente comercial llamado Gent® (36% de MP y 63% de V). Estos diluyentes utilizados para la congelación de semen de burro están basados en componentes lácteos, al igual que el Equipro, sin embargo este no se había utilizado en la especie asnal. Los parámetros de movilidad progresiva y viabilidad postdescongelación (>30% y 60% respectivamente) obtenidos en este trabajo en Equipro y Triladyl, nos indican que ambos diluyentes son eficaces para la congelación de semen de burro y pueden utilizarse indistintamente sin que afecte la presencia del plasma seminal los parámetros de calidad seminal. Sin embargo, sería necesario probar su uso en la inseminación artificial tanto en yeguas como en burras para garantizar su efectividad. Se ha documentado que la remoción del plasma seminal, favorece principalmente el estrés oxidativo del semen equino, durante el proceso de criopreservación. Esto es debido a la peroxidación de los lípidos por el alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados de los espermatozoides equinos (Raphael 2007). Sin embargo, hay datos contradictorios en la literatura con respecto al rol del plasma seminal en el semen de burro. Miró *et al* (2009), obtuvieron una movilidad progresiva y viabilidad del 72.40% y 66.30% respectivamente, al comparar el efecto del plasma seminal en burros Catalán, encontrando que los mejores porcentajes de movilidad progresiva y viabilidad fueron con el semen diluido sin plasma seminal. Rota *et al* (2008) indicaron que la remoción del plasma seminal en burros Amiata, durante la criopreservación no parece ofrecer ninguna ventaja sobre el uso del semen diluido. Nuestros hallazgos indican que la presencia del plasma seminal no es un factor que afecte los parámetros de calidad seminal, tales como la movilidad progresiva, la viabilidad y el estado funcional de la membrana plasmática del espermatozoide. Sin embargo, la presencia del plasma seminal si afectó la capacidad fertilizante de los espermatozoides de acuerdo con los resultados de los ensayos de unión heteróloga (ensayos de interacción gamética burro-cerdo). Esto puede deberse a que los componentes del plasma seminal afecten la interacción del espermatozoide con el ovocito retardando los procesos de reacción acrosomal y la unión o penetración de este en el ovocito, por lo que si se recomendaría la centrifugación,

al menos antes del uso del semen en los procesos de fertilización *in vitro* o inseminación artificial. Los ensayos de unión heteróloga *in vitro* espermatozoide-ovocito utilizando ovocitos de cerda, fue muy similar a los realizados por Mosqueira (2012) en cuanto al número de espermatozoides unidos/ovocito (5-10), sin embargo, difiere en el uso de ovocitos de bovino y determinar la capacidad fertilizante en equinos. Estos datos sugieren que podrían utilizarse de manera indistinta ovocitos de cerda o bovino para la realización de dichos ensayos tanto en burros como en caballos. Un dato interesante es el que se obtuvo en los ensayos de unión heteróloga, en los que determinamos que las condiciones de congelación, remoción de plasma seminal y Triladyl son las que mantuvieron la capacidad fertilizante más alta. Estos resultados sugieren que el proceso de congelación-descongelación de los espermatozoides de burro, podría estar induciendo la capacitación espermática, de acuerdo a lo que han reportado en otras especies (Chenoveth, 2000; Maxwell y Watson, 1996). Respecto a la presencia del plasma seminal, los datos sugieren que es en detrimento de la interacción ovocito-espermatozoide. Por otra parte, el semen de burro congelado en Triladyl, logró la unión de más espermatozoides a los ovocitos de cerda en presencia del plasma seminal que el Equipro. Estos datos sugieren la existencia de componentes en el Triladyl que reviertan o disminuyan el efecto del plasma seminal en los espermatozoides de burro y faciliten la interacción gamética *in vitro*.

CONCLUSIONES

El Equipro y el Triladyl mantuvieron los mismos valores en movilidad progresiva y viabilidad postdescongelación, sin que afectara la presencia o ausencia del plasma seminal estos parámetros. Sin embargo, la presencia del plasma seminal en el semen congelado de burro, afectó la capacidad de unión de los espermatozoides a los ovocitos de cerda, principalmente en el diluyente Equipro, disminuyendo significativamente. El Triladyl fue el diluyente que mejoró la capacidad de unión de los espermatozoides de burro congelados en presencia del plasma seminal.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la colaboración del Rancho “La Carreta” de Gobierno del Estado de Michoacán de Ocampo, y al MVZ Luis Jesús Ávila del Municipio de Lagunillas, Michoacán por las facilidades otorgadas para la obtención de muestras de semen de burros criollos. Agradecemos también el financiamiento parcial otorgado por la Coordinación de la Investigación Científica a través del convenio CIC-UMSNH 2012-2014.

BIBLIOGRAFÍA

- Aluja, A.S. de; Pérez G.T. and López F.; (2005). Live weight estimation of donkeys in central Mexico from measurement of thoracic circumference. *Tropical Animal Health and Production*. 37:159-171.
- Arriaga, J. C., Velázquez B. L., Felipe P. Y., Zamora R. V., Keyserling, A. V. and Ann P. R. (2003). Los équidos de trabajo en comunidad campesina mazahua de ladera en el altiplano mexicano. En: *Investigación en Animales de Trabajo para el Desarrollo Rural*. Compilado por: Arriaga J.C. et al., 221-268. Centro de Investigación en Ciencias Agropecuarias, UAEM. Toluca, Estado de México.
- Canisso I.F., Andrade S.F., Ortigoza E.J.M., Ribeiro G., Davies M.M.C., Capistrano E., Domingos G.J., Linhares L.A. (2008). Freezing of donkey semen (*Equus asinus*). *Revista Investigación Veterinaria*. 19 (2):113-125.
- Canisso I.F., Carvalho G.R., Morel M.D., Ker P.G., Rodriguez A.L., Silva E.C., Da Silva M.A.C. (2011). Seminal parameters and field fertility of cryopreserved donkey Jack semen after insemination of horse mares. *Equine Veterinary Journal*. 43 (2): 179-183.
- Chenoveth P.J. (2000). Evaluación del semen congelado: Métodos tradicionales y de actualidad. Topics in Bull Fertility. International Veterinary Information Service, Ithaca, New, Cork, U.S.A.
- INEGI (1994). México. Resultados definitivos. VII Censo Agrícola-Ganadero 1991
- INEGI (2007). Existencias de animales de otras especies por entidad y municipio. *Censo Agrícola, Ganadero y Forestal 2007*. En Línea. Fecha de consulta 25 marzo 2014. <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/tabuladosbasicos/default.aspx?c=17177&s=est>
- López L, C., Alonso, R. and de Aluja, A.S., (2005). Study of the genetic origin of the Mexican Creole donkey (*Equus asinus*) by means of the analysis of the D-Loop region of mitochondrial DNA. *Tropical Animal Health and Production*, 37(Suppl. 1), 173-188.
- Maxwell W.M.C. y Watson P.F. (1996). Recent progress in the preservation of ram semen. *Animal Reproduction Science*. (42): 55-65.
- Miró J., Taberner E., Rivera M., Peña A., Medrano A., Rigau T., Peñalba A. (2009). Effects of dilution and centrifugation on the survival of spermatozoa and the structure of motile sperm cell subpopulations in refrigerated Catalanian donkey semen. *Theriogenology* (72): 1017-1022.
- Mosqueira P.T.J. (2012). Evaluación de los efectos de diluyentes de congelación de semen sobre la capacidad de unión de espermatozoides equinos a zona pelúcida de ovocitos bovinos. Tesis de Licenciatura. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias. Instituto de Ciencia Animal. Valdivia, Chile. 6-17.
- Oliveira J.V., Alvarenga M.A., Melo C.M., Macedo L.M., Dell'Aqua J.A., Papa F.O. (2006). Effect of cryoprotectant on donkey semen freezability and fertility. *Animal Reproduction Science* (94): 82-84.
- Qeusada F., Dorado J., Acha D., Ortíz I., Urbano M., Ramírez L., Galvez M.J., Alcaraz L., Portero J.M., González C., Demyda-Peuras S., Hidalgo M. (2012). 14 freezing of donkey semen after 24 hours of cool storage: preliminary results. *Reproduction Fertility and Development*. 25 (1) 154.
- Raphael C.F. (2007). Efeitos da centrifugação nas características de movimento, integridade e peroxidação lipídica das membranas do espermatozóide equino refrigerado. Dissertação de Mestrado. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. 111.
- Rota A., Magelli C., Panzani D., Camillo F. (2008). Effect of extender, centrifugation and removal of seminal plasma on cooled-preserved Amiat donkey spermatozoa. *Theriogenology*. (69) 176-185.

- Secretaría de Industria y Comercio (SIC). Dirección General de Estadística (1975). V Censo Agrícola, Ganadero y Ejidal. México.
- Taberner B.E. (2010). Tecnologías reproductivas aplicables a la conservación del burro Catalán. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Trimeche A., Renard P., Tainturier D. (1998). A procedure for Poitou jackass sperm cryopreservation. *Theriogenology*. (50): 793-806.
- Villegas D.G., Bolaños M.A., Olguín P.L. (2001). La Ganadería en México. Capítulo IX: Équidos. Textos selectos de geografía de México. Ed. Plaza y Valdés. México, D.F.158.