

**EFFECTO DE LA TEMPERATURA DE  
DESCONGELACIÓN SOBRE LA VIABILIDAD IN  
VITRO DEL SEMEN CONGELADO DE MORUECO**

**(THAW TEMPERATURE EFFECT ABOUT IN VITRO  
VIABILITY OF FREEZED SEMEN RAM)**

*M. Carbajo Rueda\**

*A. Ocoz Cuñado\**

*L. Anel Rodríguez\**

*C. García Díez\*\**

*J. C. Domínguez Fdez.-Tejerina\**

Palabras claves: Morueco. Semen descongelado. Contrastación seminal.

Key words: Ram. Thawed semen. Seminal valuation.

**SUMMARY**

The purpose of the present work was study the effect of different thaw temperatures (5°C during 2 min, 40°C during 10 sec y 65°C during 6 sec ) about the thawed semen ram survival assayed by determination of individual motility, acrosomic integrity and hipoosmotic swelling test.

The thaw of semen at 5°C, front to 40°C y 65°C, has unfavorable effect for the noted parameters.

**RESUMEN**

En el presente trabajo de investigación, se estudia la influencia del uso de distintas temperaturas de descongelación (5°C durante un periodo de tiempo de 2 min, 40°C durante 10 seg y 65°C durante 6 seg), sobre la viabilidad del semen descongelado de morueco, cuantificada mediante la determinación de la motilidad, la integridad acrosómica y el test de endósmosis celular.

---

\* Dpto. Patología Animal. Sanidad. Facultad de Veterinaria. Universidad de León.

\*\* Dpto. Biología celular y Anatomía.

An. Fac. Vet. 1992-1994, 38, 19-24

La utilización de la temperatura de descongelación de 5°C, comparada con 40°C y 65°C, tiene un efecto depresivo en los tres parámetros estudiados.

## INTRODUCCIÓN

Tradicionalmente la inseminación artificial ovina se ha venido realizando con semen diluido, fresco o refrigerado, pero se considera, que al igual que sucedió con el ganado vacuno, esta técnica de reproducción asistida no podrá alcanzar un grado de difusión importante sin la utilización del semen descongelado.

La congelación del semen de morueco conlleva dificultades técnicas que repercuten en la fertilidad obtenida, ya que generalmente ésta es más baja con semen descongelado que con semen fresco<sup>1</sup>.

La célula almacenada y congelada tiene que calentarse hasta llegar a temperaturas fisiológicas para poder *volver a vivir*. La velocidad de descongelación es un hecho al que no se le concede toda la atención que se debiera, y mucho menos que a la de congelación, probablemente por ser poco manifiestos los daños en el resultado final<sup>16</sup>. Sin embargo, la recuperación y supervivencia espermática dependen en gran manera del proceso de descongelación, sobre todo, si éste no se lleva a cabo de la forma apropiada<sup>5</sup>.

Nuestro objetivo en este trabajo, es estudiar las mejores condiciones para la utilización del semen de morueco, con el propósito de obtener unas tasas de fertilidad aceptables. Así, se pretenden analizar tres temperaturas de descongelación (5°C, 40°C y 65°C), comprobando mediante una serie de pruebas *in vitro* (motilidad individual, endósmosis celular y acrosomía) el estado de la población espermática descongelada.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha utilizado semen procedente de cinco moruecos de raza Churra, de edades comprendidas entre dos y tres años y mantenidos en régimen de estabulación con una alimentación mixta, a base de concentrado comercial y heno de hierba, y agua *ad libitum*.

La recogida seminal se realizó con vagina artificial termorregulada a 40°C, sometiendo a los animales a un régimen sexual de dos recogidas semanales con doble salto (espaciados 15 a 20 minutos) en cada una de ellas.

Aquellos eyaculados con unas características mínimas de calidad (Volumen  $\geq 0,5$  ml, motilidad masal  $\geq 4$  -en una escala de valoración de 1 a 5- y concentración  $\geq 3 \times 10^9$  espermatozoides/ml -mediante espectrofotometría-) se procesaron para su posterior congelación siguiendo la técnica descrita por Anel et al.<sup>2</sup>.

De acuerdo con la metodología de descongelación se establecieron tres grupos experimentales con 30 pajuelas (de 0,25 ml) cada uno: **Grupo 1** en un baño termos-

tático de agua a 65°C durante 6 segundos; **Grupo 2** en un baño de agua a una temperatura de 40 °C durante 10 segundos; **Grupo 3** las pajuelas se introducen en agua con hielo picado a 5°C durante 2 minutos.

Una vez descongeladas las muestras se realizaron las siguientes pruebas de contrastación seminal: **Test de integridad acrosómica**<sup>9</sup>, **Test de endósmosis celular**<sup>17</sup>, **Motilidad individual**<sup>5</sup>.

El estudio estadístico de los resultados se llevó a cabo por medio de un análisis de varianza y covarianza con el programa estadístico BMDP Statistical Software (BMDP, 1983).

## RESULTADOS

De acuerdo con los resultados obtenidos (Tabla nº1 y Gráfica 1), se observa que la descongelación de las dosis seminales a 5°C (2 min) frente a las temperaturas de 65°C (6 seg) y 40°C (10 seg) produce una disminución de la supervivencia espermática cuantificada con la motilidad individual ( $p < 0,05$ ), acrosomas normales ( $p < 0,05$ ) y positividad al test de endósmosis celular.

**Tabla nº1.-** Valores obtenidos para los diferentes parámetros de contrastación seminal analizados, teniendo en cuenta la temperatura de descongelación.

	Acrosomía (%)	Endósmosis (%)	Motilidad individual (%)
5°C	25,7 $\pm$ 10,3 a	49,7 $\pm$ 11,4	15,9 $\pm$ 10,6 a
40°C	36,4 $\pm$ 15,02 b	53,4 $\pm$ 11,5	31,8 $\pm$ 21,9 b
65°C	40,9 $\pm$ 16,2 b	53,4 $\pm$ 11,6	31,8 $\pm$ 20,6 b

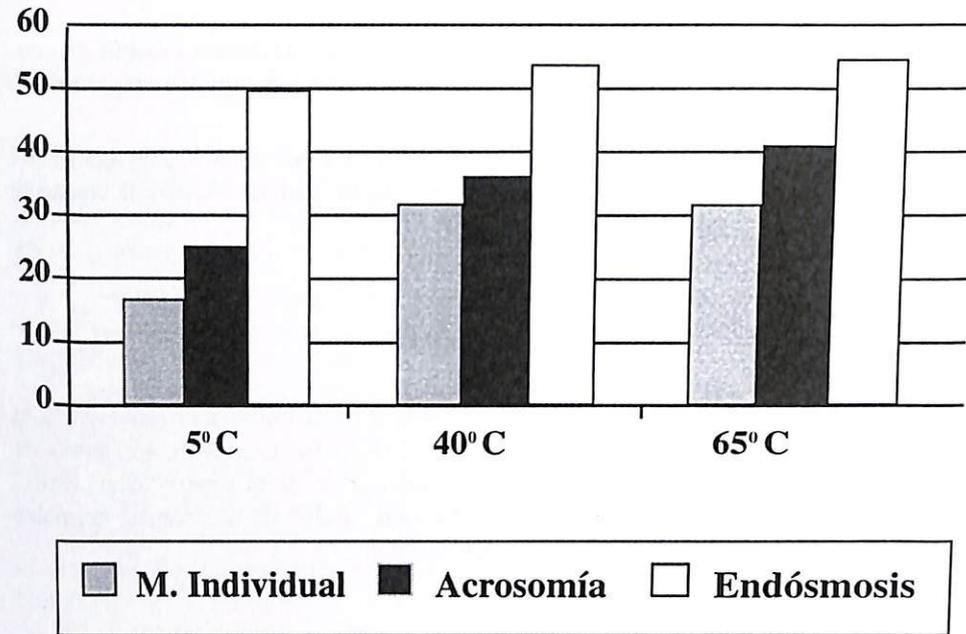
a,b. En la misma columna, valores con distinto índice difieren significativamente, ( $p < 0,05$ ).

## DISCUSIÓN

La mayoría de los métodos que se han utilizado para la descongelación del semen de morueco han utilizado 38-42°C de temperatura<sup>15</sup>. Sin embargo, otros autores obtuvieron una clara ventaja con temperaturas de 75°C frente a 35 y 4°C con una mejor viabilidad del semen descongelado, y otros<sup>10,11</sup> con descongelaciones a 70°C.

Otros investigadores<sup>6,7</sup> también prefieren temperaturas altas (60°C) de descongelación aunque, al igual que señala Pontbriand y col.<sup>14</sup> una descongelación a 36-40°C frente a temperaturas de 50-70°C no parece tener efecto en la motilidad e integridad

**Gráfica 1. Parámetros de contrastación seminal**



rosómica postdescongelación. En la misma línea se encuentra el trabajo de Angulo<sup>3</sup>, quien al descongelar a 36°C (8 seg) y 70°C (4 seg) no halló diferencias significativas entre los dos grupos de pajuelas, al obtener unas tasas de fertilidad similares.

En general, todos los autores consultados coinciden en que las descongelaciones rápidas tienen un efecto más beneficioso que las lentas, coincidiendo con los datos aportados en este trabajo. En las pruebas de contrastación seminal realizadas, hemos obtenido significativamente ( $p < 0,05$ ) mejores resultados de viabilidad espermática postdescongelación cuando utilizamos una descongelación rápida, con temperaturas altas, (40 ó 65°C) que cuando empleamos una descongelación lenta (4°C), sin que existan diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) cuando se utilizan 40 ó 65 °C.

Las descongelaciones lentas tienen un efecto desfavorable sobre las células espermáticas. Esto está relacionado probablemente con las alteraciones sufridas por las células, debido a los cambios intracelulares<sup>1</sup>. Durante el enfriamiento se forman cristales de hielo intracelular, que únicamente se vuelven letales cuando crecen o se aglomeran por un calentamiento posterior suficientemente lento. Sin embargo si la descongelación es lo bastante rápida para que los cristales de hielo no tengan tiempo de crecer, antes de que se alcance el punto de fusión, no existirán problemas. La correlación entre muerte celular y recrystalización es evidente en una descongelación

lenta, pero esto sólo es así para unas pocas células, aquellas enfriadas en condiciones supraóptimas (cuya supervivencia mejora claramente cuando la velocidad de descongelación aumenta), no obstante, la supervivencia es relativamente grande y bastante menos influenciada por la velocidad de descongelación, cuando las células han sido congeladas con velocidades por debajo del óptimo<sup>2</sup>. Por lo tanto la recrystalización está influida por la descongelación aunque depende de cómo se realice la congelación.

Este acontecimiento de la formación de hielo intracelular, con cristales de mayor o menor tamaño, explica porqué las células congeladas rápidamente son sensibles a una descongelación lenta.

Ahora bien si se enfría el espermatozoide de los mamíferos de una manera lo suficientemente lenta como para imposibilitar la formación de hielo, la descongelación rápida puede aportar la misma o una mayor supervivencia que la lenta.

De todo lo expuesto se deduce que este paso debe ser lo suficientemente rápido para reducir la oportunidad de que crezcan los cristales de hielo<sup>8</sup> y permitir una mayor viabilidad. Parece, por consiguiente, de gran importancia para el semen de morueco, que el espermatozoide pase por este rango de temperaturas de descongelación tan rápido como sea posible.

La metodología<sup>2</sup> empleada en este trabajo para alcanzar la temperatura de refrigeración de 5°C y de congelación de -100°C, podría explicar la necesidad de utilizar una temperatura alta de descongelación para obtener unas tasas óptimas de recuperación espermática.

Además, Miler y Mazur<sup>13</sup> afirman que si el daño celular, a velocidades de congelación por debajo del óptimo, resulta de la exposición al efecto solución, se obtendría una mejor supervivencia celular cuando la descongelación se realice rápidamente, ya que esto significa una exposición más corta al efecto solución.

## BIBLIOGRAFÍA

- ANDERSEN, K. and AAMDAL, J. (1972). Artificial insemination with frozen semen in sheep in Norway. *World Rev. Anim. Prod.*, 8:77-79.
- ANEL, E., MANSO, A., ANEL, L., BOIXO, J.C., ÁLVAREZ, M., DOMÍNGUEZ, J.C. and CABAJO, M. (1993). Ensayo de tres metodologías para la congelación del semen de morueco. *V Jorn. sobre Produc. Anim.*
- ANGULO, R.B. (1988). Determinación de la temperatura y tiempo óptimos para la descongelación del semen ovino. *Vet. Mex.* 19 (4).
- COLAS, G. (1979). Fertility in the ewe after artificial insemination with semen fresh and frozen semen at the induced oestrus, and influence of the photoperiod on the semen quality of the ram. *Livest. Prod. Sci.*, 6:153-168.
- EVANS, G. and MAXWEL, W.M.C. (1990). In: Inseminación artificial de ovejas y cabras. Edit. Acribia, s.a.. Zaragoza. España.

6. FISER, P.S., AINSWORTH, L. and FAIRFULL, R.W. (1987). Evaluation of a new diluent and different processing procedures for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*, 28:599-607.
7. FISER, P.S. and FAIRFULL, R.W. (1989). The effect of glycerol-related osmotic changes on post-thaw motility and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiology*, 26:64-69.
8. FOOTE, R.H. (1988). Preservation and fertility prediction of spermatozoa. In *11th In. Congr. Anim. Reprod. and A.I.*. Vol 5:27.
9. GRAHAM, E.F. (1978). The integrity of frozen spermatozoa. *National Academy of Sciences*. Washington, D.C. :4-44.
10. GROTTÉ, O., GRAFFER, T. and OLESEN, Y. (1992). Artificial insemination with frozen ram semen in Norway. In *Proc. 12th Int. Congr. Anim. Reprod. and A.I.*. The Hague. Vol. 3:1557-1559.
11. LILLO, A. (1984). Lambing rates after single inseminations of ewes with liquid or depfrozen semen. In *Proc. 10th Congr. Anim. Reprod. and A.I.*, Illinois. Vol. 3:373.
12. MAZUR, P. (1977). The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology*, 14:251-272.
13. MILLER, R.H. and MAZUR, R. (1976). Survival of frozen-thawed human red cells as a function of cooling and warming velocities. *Cryobiology*, 13:404-414.
14. PONTBRIAND, D., HOWARD, J.G., SCHIEWE, M.C., STUART, L.D. and WILAT, D.E. (1989). Effect of cryoprotective diluent and method of freeze-thawing on survival and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiology*, 26:341-354.
15. SALAMON, S. and MAWELL, W.M.C. (1995). Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination (Review). *Anim. Reprod. Sci.* 37:185-249.
16. VÁZQUEZ, I. (1986). Criobiología espermática. *Simposium Internacional sobre avances en Reproducción humana*. Bilbao. España.
17. VÁZQUEZ, I., CALDERÓN, F., CASTILLO, M., SÁNCHEZ, J., BOTEY, C. and DEL PALACIO, M. (1989). Influencia de la presión osmótica de los diluyentes en la conservación del esperma refrigerado de morueco. In *4as Jorn. Int. Reprod. Anim. e I. A.* León. pp.: 283-288.

**INFRAPOBLACIONES PARASITARIAS  
INTESTINALES EN EL RATÓN DE CAMPO,  
*Apodemus sylvaticus* (L.,1758), Y SU INFLUENCIA  
EN ALGUNOS PARÁMETROS SOMÁTICOS.**

**(INTESTINAL PARASITIC INFRAPOPULATIONS  
WITHIN THE WOOD MOUSE, *Apodemus sylvaticus*  
(L.,1758), AND THEIR INFLUENCE IN SOME  
SOMATIC PARAMETERS)**

L. Castañón-Ordóñez\*  
A. Reguera Feo\*  
R. de Garnica-Cortezo\*\*

Palabras clave: *Apodemus sylvaticus*, parámetros somáticos, infrapoblaciones parasitarias.

Key words: *Apodemus sylvaticus*, somatic parameters, parasitic infrapopulations

**SUMMARY**

Forty-nine intestinal infracommunities of woodmouse (*Apodemus sylvaticus*) were studied. They were related to the habitat and rodent somatic parameters: weight, length and the index length/weight.

The data obtained show that the nine infrapopulations found have different effects on the host. *Hymenolepis diminuta* restricts its length and some digenea and particularly a nematode, *Trichuris muris*, origin important pathogenic effects that decrease the weight and increase the index length/weight considerably.

**RESUMEN**

Se estudiaron 49 infracomunidades intestinales de ratón de campo (*Apodemus sylvaticus*) relacionándolas con el hábitat de procedencia y con parámetros somáticos del roedor: peso, longitud y el índice longitud/peso.

\* Dpto. de Patología Animal, Sanidad Animal.

\*\* Dpto. de Biología Animal. Universidad de León.

*An. Fac. Vet.* 1992-1994, 38, 25-31