

Comparación de dos técnicas de recolección post-mortem de espermatozoides epididimales en *chinchilla lanigera*

Norma Stephany González García¹, Andrés Quezada Casasola¹,
Josefa Imelda Ramos Guevara¹, Mateo Fabián Itzá Ortiz¹
y José María Carrera Chávez*

Resumen. La chinchilla (*Chinchilla lanigera*) está en peligro de extinción en estado salvaje, por lo que es necesario mejorar las técnicas de reproducción para la preservación de la especie. El objetivo fue evaluar dos métodos de colección de semen epididimal de la chinchilla. Se utilizaron 12 pares de testículos, a seis pares se les realizaron cortes en todo el tejido (corte), y a los otros seis pares se les efectuó punciones con aguja calibre 23 G (punción), llevando a cabo la evaluación seminal mediante un análisis de semen asistido por computadora. Se realizó un ANOVA comparando las medias mediante la prueba de Tukey. Se obtuvo una mayor concentración espermática, viabilidad y motilidad en Corte (143.25 ± 10.97 , 94.37 ± 1.48 y 80.33 ± 7.77) sobre Punción (82.87 ± 17.77 , 90.00 ± 2.01 y 54.63 ± 10.89 , 10^6 espermatozoides/mL, respectivamente), pero en motilidad progresiva, motilidad lenta y motilidad rápida no hubo una diferencia significativa. En conclusión, Corte obtuvo una mayor concentración espermática sin afectar las variables de motilidad espermáticas.

Palabras clave: *Chinchilla lanigera*; Epidídimo; Muestra seminal.

Abstract. The chinchilla (*Chinchilla lanigera*) is an endangered species in the wild, so it is necessary to improve reproduction techniques for its preservation. The objective was to evaluate two methods of chinchilla epididymal semen collection. Twelve pairs of testicles were used, making cuts to six pairs throughout the tissue (Cut method) and punctures were made to the other six pairs with a 23 G gauge needle (Puncture method), performing the semen evaluation by means of a computer-assisted semen analysis. An ANOVA was performed comparing the means using Tukey's test. A

¹ Departamento de Ciencias Veterinarias, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, (UACJ) Ciudad Juárez, Chihuahua, México.

* Autor de correspondencia: jose.carrera@uacj.mx

higher sperm concentration, viability and motility was obtained in Cut (143.25 ± 10.97 , 94.37 ± 1.48 and 80.33 ± 7.77) over Puncture (82.87 ± 17.77 10⁶ sperm/mL, 90.00 ± 2.01 and $54.63 \pm 10.89\%$, respectively), but in progressive motility, slow motility, and fast motility there was no significant difference. In conclusion, Cut obtained a higher sperm concentration, without affecting sperm motility variables.

Keywords: *Chinchilla lanigera*; Epididymis; Seminal sample.

INTRODUCCIÓN

Las chinchillas (*Chinchilla lanigera*) son una especie de roedores de América del Sur, son herbívoros y han sido usados principalmente en la producción de piel (Busso *et al.*, 2012), aunque recientemente han sido empleados como mascotas; sin embargo, es una especie en peligro de extinción en estado salvaje debido a la caza excesiva y la invasión de su hábitat (Crossley *et al.*, 1998).

Las chinchillas tienen una piel muy valiosa por su longitud, suavidad y densidad, es utilizada en producciones peleteras. En ocasiones, tanto en cautiverio como en vida libre, los sementales mueren de manera inesperada, lo que resulta en una pérdida genética y económica para la producción peletera a nivel comercial y para la sobrevivencia de la especie en vida libre. No obstante, existen técnicas de recolección de semen post-mortem, permitiendo el rescate del material genético de los espermatozoides del epidídimo para su conservación mediante criopreservación o refrigeración, con lo que posteriormente se podría inseminar a hembras y así obtener descendencia. Las técnicas que más se utilizan para extraer los espermatozoides epididimarios de varias especies son: punción *in vitro* y la técnica de corte. Con la primera se obtiene una alta concentración de espermatozoides viables, pero con presencia de células sanguíneas y de tejido (Varesi *et al.*, 2013), mientras que la técnica de corte es una variante de la técnica de punción, usando una cuchilla de bisturí para realizar varios cortes a la sección de la cola del epidídimo sumergida en un diluyente, obteniendo más volumen de semen, pero mayor contaminación de células y tejido (Gloria *et al.*, 2011). El objetivo del presente trabajo fue evaluar la calidad espermática de semen epididimal de *Chinchilla lanigera* obtenido con dos métodos de colección post-mortem.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigación y Reproducción Animal del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. Los testículos fueron recolectados en un criadero ubicado en Ciudad Juárez, Chihuahua. Se utilizó una muestra de 12 pares de testículos de chinchillas machos adultos sacrificados acorde con la Norma Mexicana NOM-033-ZOO-1995, Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres. Los testículos se extrajeron una hora después del sacrificio, transportándolos al laboratorio en un envase con tapa de rosca con solución salina al 0.9% a una temperatura de 37°C en un lapso no mayor de 2 horas; se colocaron en una termoplatina sumergidos en la solución de cloruro de sodio al 0.9% a una temperatura de 37°C. En cajas de Petri de cuatro pocillos se añadieron 400 μ L de diluyente comercial (INRA 96, IMV, Francia), y se colocaron en la termoplatina para equilibrar la temperatura del diluyente con la de las muestras. Posteriormente, los testículos se lavaron con cloruro de sodio al 0.9% y se secaron con gasa estéril para después diseccionarlos extrayendo el epidídimo de los testículos. Se procedió a dividir el epidídimo en sus tres secciones (cabeza, cuerpo y cola) para usar sólo la cola del epidídimo e introducirlo en un pozo con el diluyente ya anteriormente añadido.

Para la técnica de recolección de espermatozoides mediante el método de corte, se tomaron seis pares de epidídimos ya seccionados y se procedió a realizarles varios cortes a cada cauda con el filo de una hoja de bisturí, y con unas pinzas se le realizó una presión para liberar la mayor cantidad de material espermático y que éste pudiera mezclarse adecuadamente con el diluyente. El procedimiento del corte y presión se realizó en las mismas cajas de Petri de cuatro pocillos con diluyente.

Para la técnica de recolección de espermatozoides mediante el método de punción, el procedimiento es similar al anterior, sólo se cambian los cortes por punciones con agujas del número 23 G para llevar al cabo el mismo objetivo de obtener material espermático.

Ambas técnicas se adaptaron al tamaño de la muestra de la chinchilla debido a que su conducto epididimario no tiene el mismo calibre que el de un animal de mayor tamaño (caninos, carneros, toros, etc.). En lugar de realizar cortes o punciones a lo largo del conducto epididimario, sólo se realizó en el tejido de la sección de la cauda del epidídimo de la chinchilla.

Una vez colectadas las muestras seminales, se colocaron 3 μ L de la muestra de semen en una cámara de recuento estándar de 20 μ m con cuatro áreas de conteo (Leja, Leja Products, Holanda); se realizó una evaluación de motilidad (%), motilidad progresiva (%), motilidad rápida (%), motilidad lenta (%), viabilidad (%) y concentración espermá-

tica (espermatozoides/mL) mediante un sistema de evaluación de semen, asistido por computadora (Androvision, Minitube, Tienferbach, Alemania).

Los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa SAS 9.0 (Inst. Cary, NC, USA). Los datos porcentuales se transformaron en arcoseno antes del análisis estadístico. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para las variables concentración espermática, motilidad, motilidad progresiva, motilidad rápida, motilidad lenta y viabilidad. Se realizó un modelo completamente al azar. La comparación de las medias entre los tratamientos se realizó mediante la prueba de Tukey. El nivel de significancia considerado para todas las evaluaciones fue $P > 0.05$.

RESULTADOS

Los resultados encontrados se presentan en el Cuadro 1, e indican una diferencia significativa en la variable concentración espermática ($P < 0.05$) entre la técnica de corte y la de punción *in vitro*, obteniendo mayor concentración espermática en la técnica de corte.

Por otro lado, en la variable de motilidad, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas, se encuentra una tendencia de diferencia entre las dos técnicas ($P = 0.06$), en la que el método de corte obtuvo un mayor porcentaje de motilidad en comparación con la técnica de punción *in vitro*. En las variables motilidad progresiva, motilidad rápida y motilidad lenta no se encontró una diferencia significativa ($P > 0.05$) entre ambas técnicas utilizadas en el manejo de colecta del semen.

Por último, aunque no se encontró una diferencia estadísticamente significativa, se encontró una tendencia ($P = 0.084$) en los resultados sobre la viabilidad de los espermatozoides entre las técnicas de corte y punción.

Cuadro 1. Evaluación de la calidad espermática usando la técnica de corte y punción para la recolección de espermatozoides epididimarios en especímenes de *Chinchilla lanigera*

Método	Concentración (millón/mL)	Motilidad (%)	Motilidad progresiva (%)	Motilidad rápida (%)	Motilidad lenta (%)	Viables (%)
CORTE	143.25±10.97 ^a	80.33±7.77 ^a	73.32±10.66 ^a	46.66±9.75 ^a	26.65±4.71 ^a	94.37±1.48 ^a
PUNCIÓN <i>IN VITRO</i>	82.87±17.77 ^b	54.63±10.89 ^a	56.22±8.70 ^a	27.83±8.64 ^a	20.95±6.16 ^a	90.00±2.01 ^a

^{a,b} Distintas literales indican diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$).

DISCUSIÓN

El incremento obtenido en la concentración espermática con la técnica de corte es contrario a lo reportado por Varesi (2013) en perros, quien afirma que la técnica de punción permite manejar toda la sección de la cauda del epidídimo, obteniendo una mayor cantidad de concentración de espermatozoides. Por lo anterior, se considera que esta discordancia quizá se deba a la diferencia en el tamaño de los testículos y epidídimos entre especies, en la que se aplica esta técnica de recolección y la adaptación de la técnica que se realizó en este trabajo.

Con relación a la motilidad, otros trabajos donde se compara el material eyaculado y el semen epididimario (obtenido por técnica de corte y punción *in vitro*), desde su recolección hasta la descongelación, como el trabajo de Martínez-Pastor *et al.* (2006) con ciervos rojos ibéricos, se reporta que la motilidad es similar para ambas muestras después de refrigerarlas a 5°C durante un tiempo de 20 horas, lo que indica que la calidad en motilidad de los espermatozoides epididimarios es alta y similar entre las dos técnicas de recolección; esto se puede presenciar en algunas especies como en carneros manchega negra (García-Álvarez *et al.*, 2009), ratones (Songsasen *et al.*, 1998 y Mohammadzadeh *et al.*, 2011), gamuzas cantábricas (Álvarez-Rodríguez *et al.*, 2018) y venados japoneses (Hishinuma *et al.*, 2003). El semen epididimario utilizado en el estudio de Saragusty *et al.* (2006), obtenido de gacelas (*Gazella acaciae*), se extrajo haciendo cortes en la cola del epidídimo, teniendo cuidado con la contaminación de sangre, ya que ésta afecta la motilidad después de la descongelación hasta en un 15%. La contaminación de la sangre inflige daño a los espermatozoides porque el proceso causa lisis en los glóbulos rojos, exponiendo los espermatozoides a la hemoglobina con lo que se causa un efecto negativo en ellos (Rijsselaere *et al.*, 2002). Sin embargo, en este estudio, aunque con la técnica de corte se tuvo ligeramente más contaminación con células sanguíneas y tejido, en comparación con la técnica de punción (al menos de forma aparente), esto no afectó la calidad espermática, ya que presentó tendencia a tener una mayor motilidad. La similitud en las variables motilidad progresiva, motilidad rápida y motilidad lenta, entre ambas técnicas de colecta del semen, puede estar relacionada con lo mencionado por Martínez-Pastor *et al.* (2006), donde los espermatozoides obtenidos por distintas técnicas (eyaculado, técnica de corte o punción) en ciervos rojos ibéricos, la motilidad se mostró similar en todas ellas.

Finalmente, la tendencia encontrada en la viabilidad de los espermatozoides entre las técnicas de corte y punción puede estar asociada a lo encontrado por Songsasen *et al.* (1998) en su estudio con ratones, en el cual cortó en pequeñas secciones la cauda del

epidídimo, observando que la viabilidad y la integridad del acrosoma de los espermatozoides epididimarios, recuperados en varios intervalos post-mortem hasta de 24 horas, fueron similares a los recolectados inmediatamente después de su sacrificio, así mismo la capacidad de fertilización de los espermatozoides epididimarios, que fueron obtenidos a las 12 horas de la muerte, tuvieron igual capacidad de fertilizar como los que fueron recolectados inmediatamente después de la muerte de los animales. Blash *et al.* (2000) mostró que la viabilidad fue mayor en los espermatozoides epididimarios que los espermatozoides eyaculados en cabras, concordando con los trabajos de García-Álvarez *et al.* (2009) que compararon las muestras de espermatozoides eyaculados y recolectados post-mortem en carneros manchega negra. Sin embargo, en otras especies, como el ciervo rojo, la viabilidad es mayor en muestras electroeyaculadas que las epididimarias post-mortem, ocasionando contradicciones en los estudios y reforzando la idea de que se necesitan más investigaciones al respecto para llegar a una conclusión (Martínez *et al.*, 2008).

CONCLUSIÓN

La técnica de corte provee una mayor concentración espermática en comparación con la técnica de punción *in vitro*, aunque en la viabilidad y la motilidad de los espermatozoides en las dos técnicas son similares. Por apreciación visual, para obtener semen más libre de sangre y tejido, la técnica de punción sería la adecuada. Se recomienda continuar las investigaciones y prácticas en el tema de la recolección de espermatozoides en esta especie para obtener resultados más concretos y actualizados.

BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez, Rodríguez, M., Álvarez, M., Anel, López, L., Guerra, C., Chamorro, C., Anel, L., De Paz, P., Martínez, Pastor, F. (2018). "Effect of length of time post-mortem on quality and freezing capacity of Cantabric chamois (*Rupicapra pyrenaica parva*) epididymal spermatozoa", *Animal Reproduction Science*, 198: 184-192.
- Blash, S., Melican, D., Gavin, W. (2000). "Cryopreservation of epididymal sperm obtained at necropsy from goats", *Theriogenology*, 54: 899-905.
- Busso, J., Ponzio, M., Fiol de Cuneo, M., Ruiz, R. (2012). "Reproduction in chinchilla (*Chinchilla lanigera*): Current status of environmental control of gonadal activity and advances in reproductive techniques", *Theriogenology*, 78: 1-11.

- Crossley, D., Jackson, A., Yates, J., Boydell, I. (1998). "Use of computed tomography to investigate cheek tooth abnormalities in chinchillas (*Chinchilla lanigera*)", *Journal Small Animal Practice*, 39: 385-389.
- García, Álvarez, O., Maroto, Morales, A., Martínez, Pastor, F., Garde, J., Ramón, M., Fernández, Santos, M., Esteso, M., Pérez, Guzmán, M., Soler, A. (2009). "Sperm characteristics and *in vitro* fertilization ability of thawed spermatozoa from Black Manchega ram: Electroejaculation and postmortem collection", *Theriogenology*, 72: 160-168.
- Gloria, A., Contri, A., De Amicis, I., Robbe, D., Carluccio, A. (2011). "Differences between epididymal and ejaculated sperm characteristics in donkey", *Animal Reproduction Science*, 128: 117-122.
- Hishinuma, M., Suzuki, K., Sekine, J. (2003). "Recovery and cryopreservation of sika deer (*Cervus nippon*) spermatozoa from epididymides stored at 4 °C", *Theriogenology*, 59: 813-820.
- Martínez, A., Martínez, Pastor, F., Alvarez, M., Fernández, Santos, M., Esteso, M., De Paz P., Garde, J., Anel, L. (2008). "Sperm parameters on Iberian red deer: electroejaculation and postmortem collection", *Theriogenology*, 70: 216-26.
- Martinez, Pastor, F., Garcia, Macias, V., Alvarez, M., Chamorro, C., Herraiez, P., De Paz P., Anel, L. (2006). "Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer", *Theriogenology*, 65: 471-485.
- Mohammadzadeh, S., Maksudov, G., Doronin, Y. (2011). "Survival of spermatozoa in the genital tract of mice post mortem", *Doklady Biological Sciences*, 436: 62-64.
- Rijsselaere, T., Van Soom, A., Maes, D., De Kruif A. (2002). "Effect of centrifugation on *in vitro* survival of fresh diluted canine spermatozoa", *Theriogenology*, 57: 1669-1681.
- Saragusty, J., Gacitua, H., King, R., Arav, A. (2006). "Post-mortem semen cryopreservation and characterization in two different endangered gazelle species (*Gazella gazella* and *Gazella dorcas*) and one subspecies (*Gazella gazelle acaciae*)", *Theriogenology*, 66: 775-784.
- Songsasen, N., Tong, J., Leibo, S. (1998). "Birth of live mice derived by *in vitro* fertilization with spermatozoa retrieved up to twenty-four hours after death", *The Journal of Experimental Zoology*, 280: 189-196.
- Varesi, S. (2013). *Canine epididymal spermatozoa: characteristics, collection and cryopreservation*, Tesis de Doctorado, University of Milan. Italia.

