

SEMEN OVINO CONSERVADO FRESCO EN DILUYENTE CON SUERO DE ALBÚMINA BOVINA¹

Raúl H. De León-García²; Henry Ortega³; Itzel Saldaña⁴; Kristel Flores⁴

RESUMEN

El desarrollo de nuevos diluyentes que garanticen incrementar el volumen del eyaculado y proteger los espermatozoides durante el enfriamiento es una meta para los especialistas e investigadores dedicados al estudio de esta temática. Es por ello, que con el objetivo de evaluar el diluyente Tris-glucosa-ácido cítrico-BSA (suero de albúmina bovina) en la conservación de semen fresco, se realizó este trabajo en la Unidad Ovina de la Estación Experimental de Gualaca. Para ello se evaluaron 16 eyaculados de sementales ovinos de diferentes grupos raciales a los que se le extrajo semen con una vagina artificial. Una vez obtenida la muestra, se procedió a su valoración considerando; volumen (VOL), turbidez (TUR), motilidad (MOT), vigor (VIG), concentración espermática total (CET), concentración espermática viable (CEV). Después de la valoración, se procedió a extenderlo utilizando tris-glucosa-ácido cítrico-BSA. Los valores iniciales fueron MOT 92,5% ($\pm 4,47$), CET 2594,7 ($\pm 1396,7$), CEV 994,0 ($\pm 755,8$), espermios vivos: 66,73 ($\pm 2,0$) y las patologías primarias y secundarias menos de 15% lo que determinó que eran aptos para la dilución. Una vez diluida la muestra, se prepararon alícuotas de 1,0 cc y se conservaron en refrigeración a 4° C. Las pruebas de viabilidad se realizaron a las 24, 48, 72 y 96 horas, antes de las cuales fueron incubadas en baño maría a 37,5° C y evaluadas a los 30 minutos y a las 2 h por cada período. Los resultados indican la posibilidad de mantener la viabilidad del semen fresco hasta por 96 h con capacidad de producir una gestación viable.

PALABRAS CLAVES: Tris-glucosa-ácido cítrico-BSA, tasa de dilución, concentración espermática viable, motilidad.

¹Recepción: 16 de marzo de 2017. Aceptación: 29 de noviembre de 2017. Trabajo financiado por el Proyecto Evaluación de Razas y Cruces para el Mejoramiento de la Eficiencia Bio-Económica de los Sistemas de Ovinos y Caprinos en Panamá.

²Ing. Agr. Zootecnista. IDIAP. Centro de Investigación Agropecuario Oriental (CIAOr). e-mail: raulherminio@gmail.com

³Agr. IDIAP. Centro de Investigación Agropecuaria Occidental (CIAOc).

⁴Estudiantes. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Panamá.

FRESH PRESERVED OVINE'S SEMEN IN DILUENT WITH BOVINE SERUM ALBUMIN

ABSTRACT

The development of new diluents that guarantee to increase the volume of the ejaculate and protect the sperm during cooling is a goal for specialists and researchers dedicated to the study of this subject. With the objective of evaluating the diluent Tris-glucose-citric acid-BSA (bovine serum albumin) in the conservation of fresh semen, the present work was performed in the ovine unit of the Experimental Station of Gualaca. For this, 16 ejaculates of ovine stallions from different racial groups were evaluated, the semen was extracted with an artificial vagina. Once the sample was obtained, we proceeded to its assessment considering; volume (VOL), turbidity (TUR), motility (MOT), vigor (VIG), total spermatic concentration (CET), viable spermatic concentration (CEV). After the evaluation, it was extended using tris-glucose-citric acid-bsa. The initial values were MOT 92,5% ($\pm 4,47$), CET 2594,7 ($\pm 1396,7$), CEV 994,0 ($\pm 755,8$), live sperm: 66,73 ($\pm 2,0$) and the primary and secondary pathologies less than 15%, which determined that they were suitable for dilution. Once aliquots of 1.0 cc were prepared and kept refrigerated at 4° C. Viability tests were conducted at 24, 48, 72 and 96 hours, before which they were incubated in a water bath at 37,5° C and evaluated within 30 minutes and 2 h for each period. The results indicate the possibility of maintaining the viability of fresh semen for up to 96 h with the capacity to produce a viable gestation.

KEY WORDS: Tris-glucose-citric acid-bsa, rate of dilution, viable sperm concentration, motility.

INTRODUCCIÓN

El uso de la inseminación artificial utilizando semen fresco en hembras ovinas y caprinas, es una técnica ampliamente difundida a debido a los elevados índices de fertilidad (Martínez *et al.* 2003). Sin embargo, los resultados obtenidos, cuando se usa semen congelado, son menos alentadores debido a los daños que ocurren en las células espermáticas durante el proceso

de crio-conservación, principalmente en la membrana del espermatozoide, donde se altera su función metabólica, reduciendo el número de células viables, ocasionando una capacitación espermática prematura (Maxwell y Watson 1996), por lo que los espermatozoides sólo son viables durante un corto período de tiempo en el tracto reproductivo de la hembra y tienen menor oportunidad de fecundar

los ovocitos (Gillan y Maxwell 1999) y a un trastorno sub-letal en la proporción de espermatozoides sobrevivientes (Watson 2000).

De acuerdo a Martínez *et al.* (2003), el plasma seminal es capaz de proporcionar una limitada protección al espermatozoide ante las bajas temperaturas, de allí la importancia de conservarlo mediante el uso de diluyo-conservadores (naturales o sintéticos) contra los daños que se presentan durante el proceso de crio-conservación.

Estos daños podrían ser prevenidos parcialmente controlando la velocidad de congelamiento, usando un diluyente adecuado y agregando agentes crio-protectores apropiados. Es por ello que es necesario añadir medios apropiados que prolonguen su viabilidad y garanticen la fertilización, por lo que el diluyo-conservador dependerá, en gran medida, del tiempo que se desee conservar una calidad seminal de forma que garantice la fecundación en la hembra.

La conservación del semen en forma líquida o congelada para prolongar su capacidad fecundante y la búsqueda constante de nuevas formulaciones que prolonguen cada vez más el tiempo de conservación del espermatozoide constituye una meta constante para los especialistas e

investigadores dedicados al estudio de esta temática (Martínez *et al.* 2003).

En ese sentido, en la crio-conservación de semen ovino, se han evaluado diferentes tipos de diluyentes y agentes crio-protectores (permeables y no permeables) obteniéndose resultados muy variables (Molinia *et al.* 1994a, 1994b, Gil *et al.* 2000, Salamon y Maxwell 2000) y en la actualidad existen numerosos diluyentes y crio-conservadores capaces de reducir las reacciones metabólicas que se producen en el eyaculado diluido durante la conservación, sin afectar la motilidad espermática, siendo uno de estos diluyentes el compuesto por tris-glucosa-ácido cítrico-bsa, el cual permite la viabilidad del semen fresco hasta por 96 horas. Es por ello, que con el propósito de generar información y conocimientos en la conservación de semen ovino fresco para ser usado en programas de inseminación artificial, se evaluó el comportamiento del diluyo-conservador tris-glucosa-ácido cítrico-bsa (suero de albúmina bovina), en la viabilidad espermática del semen ovino conservado fresco hasta 96 horas.

Colecta del semen

Las extracciones de semen se realizaron en la Unidad Ovina de la Estación Experimental Carlos M. Ortega y la evaluación de los eyaculados, en el Laboratorio de Biotecnología Animal del

Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá, localizado en el corregimiento de Gualaca, distrito de Gualaca, provincia de Chiriquí.

Se utilizaron cuatro machos ovinos tomados al azar, con edades promedios de 2,5 años, los cuales se mantenían en pastoreo y suplementados con una ración energético-proteica a razón de 250 g a 400 g diarios por animal dependiendo de la disponibilidad de la pastura y la cual aportaba entre 16% y 18% de proteína cruda y 2,8 Mcal.

Las colectas se realizaron utilizando una vagina artificial (VA), ya que ofrece condiciones de presión y temperatura, semejante a las del salto natural, además de que el eyaculado se aproxima al obtenido en condiciones cercanas a las fisiológicas, y para la excitación de los machos se utilizaron hembras en celo. La vagina tenía ≈ 15 cm de largo y ≈ 6 cm de ancho, revestida con un tubo interno de goma, al cual se le conectó un tubo colector de plástico. El tubo interno se llenó con agua a $40^{\circ}\text{C} (\pm 2^{\circ}\text{C})$ de temperatura y luego se insufló con aire para dar la presión ideal. Como colector se utilizó un tubo de ensayo de plástico de 15 cc graduado y para facilitar la colecta.

En total se analizaron 16 muestras seminales, cuatro por cada semental,

realizando los muestreos en horas de la mañana para evitar el estrés calórico de la tarde y siempre por la misma persona. Inmediatamente obtenida la muestra se procedió a realizar las evaluaciones macroscópicas (color, olor, volumen y densidad) y microscópicas (motilidad masal, motilidad individual, concentración espermática, viabilidad espermática y patologías espermáticas) del eyaculado.

El volumen (ml) se determinó mediante un recolector graduado, el porcentaje de motilidad (%) se valoró por observación al microscopio con un aumento de 40x, mientras que la concentración espermática ($10^6/\text{ml}$) a través de un fotómetro (Sperm Cue). Para la determinación de vivos y muertos se utilizó una tinción de eosina nigrosina y las patologías totales en el microscopio de contraste de fase por extensión fina sobre un portaobjeto de una gota de semen con solución de glutaldehído al 25%. Los eyaculados clasificados como aptos para ser procesados y se le añadió el diluyente en evaluación compuesto por tris-glucosa-ácido cítrico-bsa (Martínez *et al.* 2007).

Una vez determinados estos parámetros, se procedió a la concentración espermática viable (CEV) de la muestra de semen utilizando la siguiente fórmula propuesta por Montes (2007).

CEV= Vol. (cc) x Motil. (%) x Conc (x10⁶/cc) x % esper. Normales/100

Dónde:

CEV = es la concentración espermática viable.

Vol. (cc) = volumen eyaculado.

Motil. (%) = porcentaje de motilidad masal calculado.

Conc = concentración espermática expresada en 10⁶.

Esp. Normales = porcentaje de espermios normales en la muestra.

Una vez se determinó la CEV, la tasa de dilución de la muestra se calculó de la siguiente manera:

Volumen de diluyente = (CEV) (0,5)/150.

Siendo que para este estudio se prepararon pajuelas de 0,5 cc con una concentración de 150x10⁶ espermatozoides por pajueta, la formula se describe de la siguiente manera:

CEV= concentración espermática viable calculada anteriormente.

0,5= volumen de semen en la pajueta.

150= concentración de espermatozoides (expresada en 10⁶) en la pajueta.

Una vez calculada la dilución final del eyaculado, se procedió a diluir el semen y separar alícuotas de 1 cc y colocarlas en refrigeración a 4° C. Las lecturas de motilidad masal, motilidad individual, viabilidad espermática (vivos y

muerdos) se realizaron las 24, 48, 72 y 96 y para ello, las muestras fueron sacadas de refrigeración y colocadas en baño maría para su incubación, realizando una primera lectura a los 30 minutos y una segunda a las 2 h post incubación siguiendo la metodología propuesta por Martínez *et al.* 2007.

Los valores iniciales promedios para las 16 muestras colectadas fueron los siguientes: volumen inicial: 0,75 cc (\pm 0,10); motilidad individual: 92,5% (\pm 4,47); espermatozoides vivos: 66,3% (\pm 19,2) y concentración espermática: 2594,7 x10⁶/cc (\pm 1396,7), valores éstos que se encuentran dentro de los parámetros normales para la especie (Ferreira y Pérez 2001, López 1999, Hafez 2000). Las patologías espermáticas estuvieron por debajo del 15%.

Se muestra el efecto del diluyente tris-glucosa-ácido cítrico-bsa (suero de albúmina bovina) sobre la motilidad espermática (Figura 1), se observó una disminución en la motilidad progresiva (MP), con respecto al semen fresco diluido al tiempo 0 h. Los resultados indican que, hasta las 24 h, la motilidad estuvo por encima del 50% (57,63% \pm 25,44) promedios similares a los señalados por Peña-Durón (2007), quien reporto valores de 58,54%.

A partir de las 48 h hasta las 96 h, las medias para motilidad espermática fueron disminuyendo pero siempre manteniéndose superior a 35%, esto se explica ya que la motilidad se detiene totalmente a los 5° C provocando una reducción en la actividad metabólica y de motilidad, y se reestablece nuevamente, siempre y cuando no se hayan producido daños de tipo estructural causados por un choque térmico, al subir la temperatura a niveles normales (30° a 39° C) (período

de incubación de la muestra) (Vivianco 1998).

Los efectos del diluyente sobre la viabilidad espermática (vivos y muertos) a diferentes períodos de evaluación post incubación se presentan en la Figura 2, en la que se puede observar una disminución en el porcentaje de espermatozoides vivos de 60,5% ($\pm 9,19$) a las 24 h hasta alcanzar un promedio de 33,0% (± 1.41) a las 96 h.

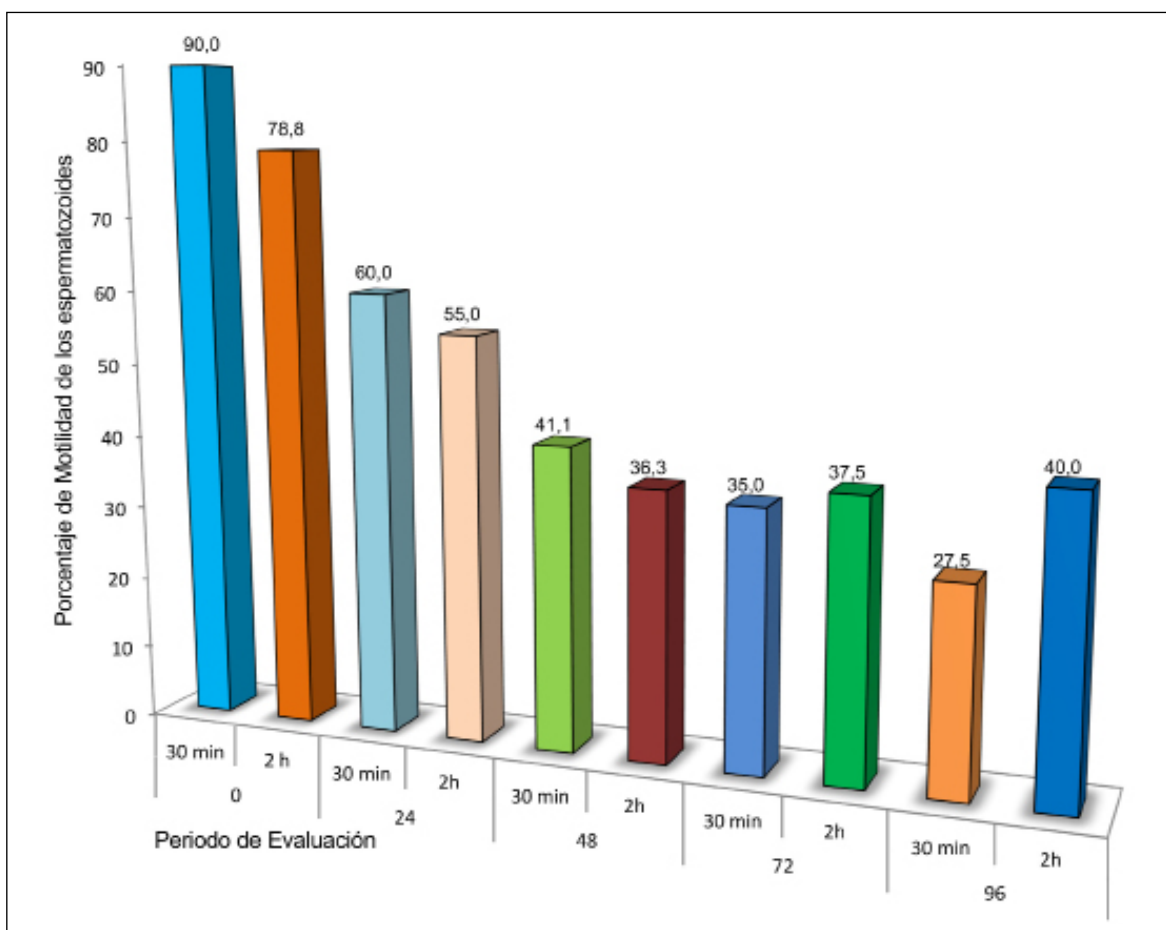


Figura 1. Efecto del diluyente tris-glucosa-ácido cítrico-bsa sobre la motilidad espermática.

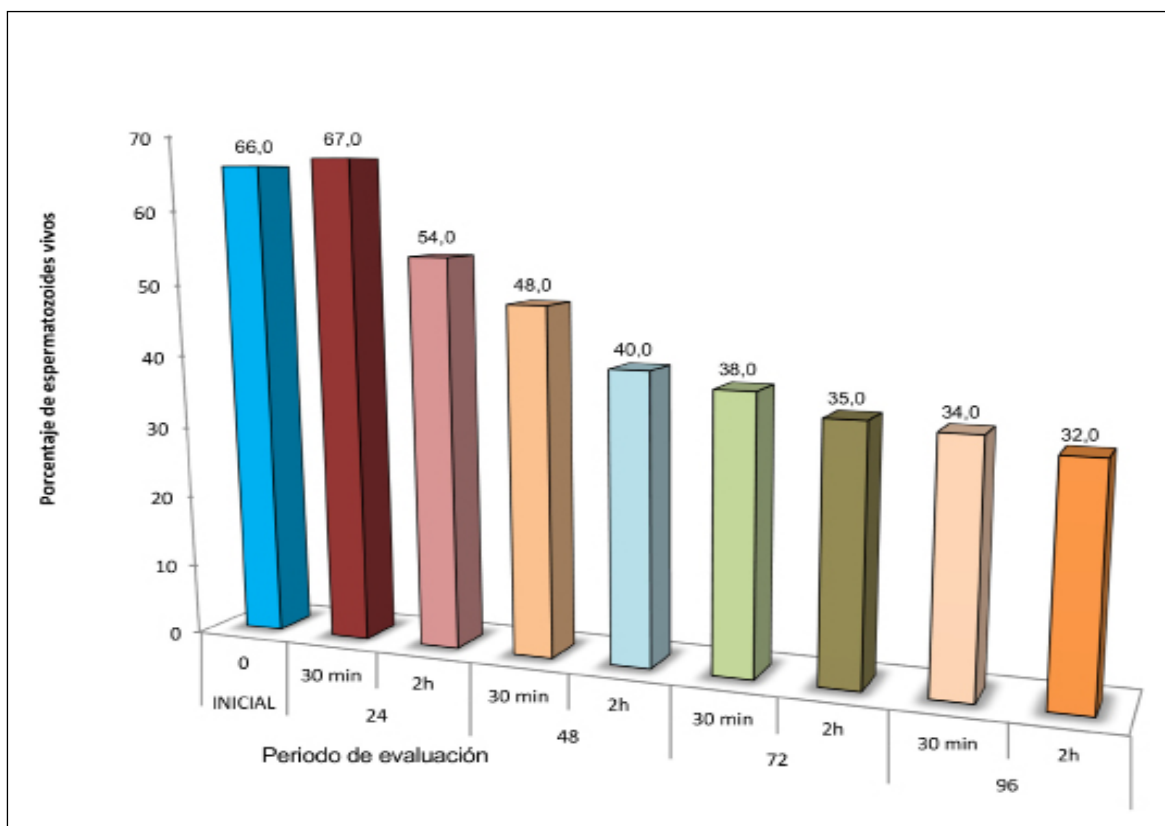


Figura 2. Efecto del diluyente tris-glucosa-ácido cítrico-bsa sobre la viabilidad espermática (vivos).

Estos resultados nos indican la posibilidad de conservar el semen ovino fresco hasta por 96 h cuando se utiliza tris-glucosa-ácido cítrico-bsa (suero de albúmina bovina) con capacidad fecundante, lo que contribuiría a implementar programas de inseminación artificial en ovinos utilizando semen fresco.

BIBLIOGRAFÍA

Ferreira, NJ; Pérez F, DR. 2001. Biotécnicas de la reproducción caprina y ovina. Editorial Fortaleza. Ceará, Brasil.

Gil, J; Söderquist, L; Rodriguez-Martínez, H. 2000. Influence of centrifugation and different extenders on post-thaw sperm quality of ram semen. *Theriogenology* 54:93-108. Abstract.

Gillan, L; Maxwell, W. 1999. The functional integrity and fate of cryopreserved ram spermatozoa in the female tract. *J. Reprod. Fertil.* 54 (Suppl. 1):271-283.

Hafez, ESE. 2000. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. 7a.Ed. McGraw-Hill. México, D.F.

- López, FP. 1999. Semen collection and evaluation in rams (en línea). Consultado 1 marzo 2017. Disponible en <http://www.dps.ufl.edu/hansen/asg3335/semencollram1.htm>.
- Martínez, J; Hernández, JL; Díaz, N; Molina, Y; Interian, L; González-Peña, D. 2007. Un nuevo diluyente para la conservación del semen caprino en estado fresco refrigerado. *Ciencia y Tecnología Ganadera* 1(3):127-132.
- Martínez, J; Peron, N; Lima, T. 2003. Resultados de fertilidad en cabras inseminadas con semen congelado en medios a base de tris (hidroximetil-aminometano) y leche descremada. *Rev. Cub. Reprod. Anim.* Vol. 29, No. 1 y 2.
- Maxwell, W; Watson, P. 1996. Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim Repro Sci* 42:55-65.
- Molinia, F; Evans; G, Maxwell, M. 1994a. Incorporation of penetrating cryoprotectants in diluents for pellet-freezing ram spermatozoa. *Theriogenology* 42:849-858. Abstract
- Molinia, F; Evans, G; Quintana, P; Maxwell, W. 1994b. Effect of mono-saccharides and disaccharides in Tris-based diluent on motility, acrosome integrity and fertility of pellet frozen ram spermatozoa. *Anim Repro Sci* 36:113-122.
- Montes, I. 2007. Manual de Semen. Centro de Investigación y Mejoramiento Animal de la Ganadería Tropical. La Habana, Cuba. Inédito.
- Peña-Duron, BC. 2007. Viabilidad del semen caprino conservado en dos temperaturas con diferentes diluyentes. Tesis profesional para obtener el título de Médico Veterinario Zootecnista. Universidad Autónoma de Nayarit, Compostela, MX. 50 p.
- Salamon, S; Maxwell, WMC. 2000. Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci. Review. Anim. Reprod. Sci.* 62:77-111.
- Vivianco, MW. 1998. Inseminación artificial en ovinos. *In* Memorias del Seminario Internacional Aplicaciones de Técnicas Biotecnológicas en la Reproducción de Ovinos y Caprinos. 26-27 de octubre. Chapingo, MX.
- Watson P. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Repro Sci* 60-61:481-492.