

CONSERVACIÓN DE SEMEN CAPRINO EN LOS DILUTORES CITRATO-YEMA Y LECHE-DESCREMADA YEMA

Lily Palomino T.¹, José Camacho S.², Wilfredo Huanca L.³
y Néstor Falcón P.⁴

ABSTRACT

Preservation of goat semen using yolk-citrate and yolk skim milk extenders.

Two *in vitro* extenders for dilution of goat semen, Yolk-Citrate (A) and Yolk-skim milk (B), were evaluated. Semen was collected from four males using an artificial vagina and kept at 30°C prior to and during dilution at 1/6 semen/extender. The resulting solutions were stored at room temperature (20-26°C) and under refrigeration (4°C) for 96 hours. Sperm motility (0-5) and progressive motility (%) were determined at 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 and 96 hours. Semen with minimum motility values of 3 and 60% progressive motility were considered acceptable. At room temperature, sperm dilutions prepared with extender B were viable for up to 6 hours, while those prepared with A were viable at 48 hours. Under refrigeration, the solution prepared with extender A maintained good viability for 96 hours, while that prepared with B ceased to function after 48 hours. Yolk-Citrate (A) is clearly the more effective extender for dilution of goat semen, conserving spermatocytic viability for a longer period of time.

Key words: Goats, spermatozoa, extender.

RESUMEN

Se evaluó dos dilutores "*in vitro*"; Citrato-Yema (A) y Leche Descremada-Yema (B), como dilutores de semen caprino, conservando las diluciones a temperatura ambiente (20-26 °C) y temperatura de refrigeración (4°C), hasta las 96 hrs. post-dilución. Se seleccionaron 4 machos para la colección de semen, por el método de la vagina artificial. El semen se mantuvo a 30°C antes y durante la dilución. Se utilizó un factor de dilución de 1/6 de semen y dilutor respectivamente. Las diluciones fueron evaluadas considerando; motilidad masal (0-5) y motilidad progresiva (%), como parámetros para determinar la viabilidad espermática, a las 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 y 96 hrs. post-dilución. Semen con valores iguales o superiores a 3 de motilidad masal y 60 % de motilidad progresiva fueron considerados como muestras viables. La dilución con B a temperatura ambiente mostró viabilidad hasta las 6 hrs. post-dilución, a esta misma temperatura la dilución con A mantuvo su viabilidad hasta las 48 hrs. post-dilución. Conservando a temperatura de refrigeración la dilución con B conservó su viabilidad espermática hasta las 48 hrs., mientras que la dilución con A mantenida a esta misma temperatura, aún mostraba buena viabilidad espermática a las 96 hrs post- dilución. De los resultados obtenidos se determinó que la solución A es mejor dilutor, porque conservó la viabilidad espermática por más tiempo.

Palabras clave: Cabras, espermatozoides, dilutor, citrato-yema, leche descremada.

¹ Práctica privada

² Laboratorio de Producción Agropecuaria - FMV - UNMSM

³ Laboratorio de Reproducción - FMV-UNMSM

⁴ Laboratorio de Medicina Veterinaria Preventiva - FMV - UNMSM

La inseminación artificial (IA), una de las biotecnologías de gran relevancia que se viene desarrollando desde hace varios años y que permite un rápido avance genético, con el mejor aprovechamiento de los sementales de características productivas superiores. El éxito de la IA depende en gran medida del desarrollo de diluyentes satisfactorios para el semen, el cual debe incrementar el volumen de un eyaculado, proteger a los espermatozoides durante el enfriamiento y prolongar su vida con un mínimo efecto sobre la fertilidad.

La IA en caprinos es limitado en comparación con otras especies, debido entre otros factores a la dificultad para congelar y descongelar el semen, ya que algunos diluyentes pueden resultar tóxicos para los espermatozoides.

Actualmente en el mercado existe un número variable de diluyentes comerciales, como; el Illini variable temperature (IVT), Laiciphos, caprogen, entre otros, pero dentro de los más aplicables y efectivos, considerados así por diversos autores, tenemos a los dilutores citrato-yema y leche descremada-yema.

Los dilutores conteniendo yema de huevo son beneficiosos en la preservación de la fertilidad de espermatozoides, en la protección contra el shock por frío y variaciones de temperatura de conservación, por las lipoproteínas y lecitinas contenidas en la yema de huevo. La leche descremada usada como dilutor también protege del shock por frío a los espermatozoides manteniendo su fertilidad, debido a la caseína presente en la leche (Cole y Cupps, 1977).

Este trabajo tuvo por objetivo evaluar "*in vitro*" la eficiencia de la solución citrato-yema y leche descremada-yema, como dilutores de semen caprino, siendo sometidos a T° ambiente (20-26.4°C) o refrigeración (4°C). La eficiencia de los dilutores se

determinó a través de la evaluación de la motilidad masal y progresiva de las células espermáticas, hasta las 96 horas post-dilución.

La preparación de los dilutores y evaluación del semen diluido en las soluciones citrato-yema y leche descremada-yema se realizó en el laboratorio de Reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. La Granja Modelo PRO-CABRA, proporcionó los machos reproductores de los cuales se obtuvieron las muestras de semen.

Se seleccionaron cuatro machos de los cruces Anglo Nubia x criollos, con edades entre los 18 a 24 meses. La obtención del semen se realizó con vagina artificial dos veces por semana durante dos semanas, obteniéndose en total 16 eyaculados. La vagina artificial se mantuvo a una temperatura interna de 42°C – 45°C; el tubo colector graduado en mililitros y estéril se mantuvo a 37°C para evitar el shock por frío de los espermatozoides. Inmediatamente después de recogido el semen se procedió a la evaluación del volumen, densidad, color, pH, concentración espermática y motilidad masal, para luego ser diluidas con citrato-yema y leche descremada-yema, mantenidas en baño maría a 37°C, en una dilución de 1:6 de semen y dilutor respectivamente (Simon, 1981), equivalente a 0.1 ml (3 gotas) de semen y 0.6 ml de dilutor.

El color del semen se valoró en el mismo tubo de colección. El pH se midió con el papel tornasol, el cual varió de 6.6 a 6.8. El volumen se midió directamente en el tubo graduado de colección. La concentración espermática se determinó con una dilución de 1 en 300 en solución salina al 3% con formaldehído, para inmovilizar a los espermatozoides, y la lectura se realizó con la cámara de Neubauer. La motilidad masal del semen obtenido se estimó en base al vigor de la onda de movimiento.

Después de diluido el semen, se evaluó a las 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 y 96 hrs. la motilidad masal, el porcentaje de espermatozoides vivos y el porcentaje de motilidad progresiva. Para la evaluación del semen puro se utilizó la escala de 0 a 5 y para el caso del semen diluido la escala del 0 a 100% (Evans, 1990 y Salina *et al.*, 1988). El porcentaje de espermatozoides vivos, previa coloración con Eosina-Nigrosina (Tizol *et al.*, 1991), se determinó observando al microscopio a 40X, 10 campos al azar, evaluándose un total de 100 espermatozoides, y para la evaluación de la motilidad progresiva se colocó una gota de semen en una lámina porta objeto, limpio y mantenido a 37°, al microscopio se observó a un aumento de 40X, en 10 campos al azar. En cada campo se evaluó la motilidad de 10 espermatozoides.

La preparación del dilutor Citrato-yema descrito por Simon (1981) se realizó de la siguiente manera:

Citrato de Sodio	2.9 g
Agua bidestilada	100 cc
Penicilina	500,000 UI
Estreptomycin	2 g

De esta solución se tomó el 80% y se le adicionó 20% de yema de huevo. El pH del dilutor preparado varió de 6.6 a 6.8.

En la preparación del dilutor leche descremada-yema se utilizó leche descremada líquida comercial, el cual se colocó en baño maría sometiéndolo a una temperatura de 92- 95°C durante 10 minutos, después de enfriar a temperatura ambiente se procedió a filtrar para eliminar la espuma y las natas.

Leche descremada	25 ml
Penicilina (solución)	0.25 ml
Estreptomycin (solución)	0.125 ml

De esta solución se tomó el 80% y se le adicionó 20% de yema de huevo.

La dilución del semen se realizó individualmente de tal manera que en cuatro viales se depositó tres gotas de semen/vial de un eyaculado, en dos de estos se adicionaron 0.6 ml del dilutor citrato-yema/vial. Uno de estos viales se conservó a temperatura ambiente por un periodo de 96 horas y el otro se conservó a esta misma temperatura sólo por una hora y luego fue sometido a 4°C hasta las 96 horas. Los otros dos viales restantes con semen, fueron diluidos con leche descremada-yema en la misma proporción que la dilución anterior, y conservados de igual manera.

A través del análisis de tiempo a un evento (Curva de Kaplan Meier), se determinó en que tiempo la motilidad progresiva de las células espermáticas llegó al 60%, considerando el análisis de cada eyaculado en forma independiente. Utilizando las variables: dilutor, animal, día de muestra y temperatura para el análisis de regresión de Cox, se determinó las variables estadísticamente significativas, que intervienen sobre la viabilidad de los espermatozoides del semen caprino.

Resultados

De los dilutores evaluados se obtuvo mejores resultados con el dilutor citrato-yema, sometido a 4°C, a comparación de la leche descremada-yema, siendo el único dilutor que mantuvo un promedio del 60% de motilidad progresiva de los espermatozoides a las 96 horas post- dilución.

El análisis estadístico empleando las curvas de Kaplan Meier (Figuras 1, 2, 3 y 4) y la prueba de regresión de Cox determinaron que existía diferencias estadísticas significativas para el efecto del dilutor ($p=0.0000$) y temperatura ($p=0.0000$). Las variables día de muestreo ($p=0.7909$) y animal ($p=0.4904$) no ejercen ningún efecto en el modelo de regresión de Cox.

La comparación de ambos diluyentes a diferentes temperaturas, evidenció una clara superioridad del citrato-yema como dilutor de semen caprino a diferencia de la leche descremada-yema, pero sobre todo cuando el semen diluido con citrato-yema es conservado a 4°C. Estos resultados fueron muy influenciados por las variables: temperatura y dilutor.

El semen diluido y conservado a temperatura ambiente dio resultados poco favorables. La conservación de semen a esta temperatura con el dilutor de leche descremada-yema no superó las 6 horas post-dilución, mientras que con el dilutor citrato-yema la viabilidad espermática se mantuvo hasta un período de 48 horas post-dilución. En general la conservación del semen diluido a temperatura ambiente, siempre tendrá menor duración que a temperatura de refrigeración, debido a que la tasa metabólica tiende a ser proporcional a la temperatura absoluta, acumulándose con mayor rapidez los productos tóxicos.

La disminución de la temperatura ha sido el medio principal para reducir las reacciones químicas y prolongar la vida de las células espermáticas. El semen caprino diluido y conservado a una temperatura de 4°C dio mejores resultados, manifestado por una motilidad progresiva superior al 60% a las 96 horas post-dilución, debido a que se prolonga la capacidad de fertilización de los espermatozoides al reducir su movilidad y reacciones metabólicas, además de limitar la multiplicación de la flora microbiana de aparición secundaria mientras que con el dilutor leche descremada-yema la regular viabilidad espermática no superó las 48 horas post-dilución.

La dilución de semen caprino conteniendo citrato-yema proporcionó mejores resultados tanto a temperatura ambiente como en refrigeración a comparación de la leche descremada-yema, donde la viabilidad

espermática no superó las 48 horas en ningún caso. Similares resultados han obtenido diversos investigadores con el uso de leche descremada como dilutor de semen caprino, donde las dificultades fueron generadas por la interacción del plasma seminal con los fosfolípidos existentes en dicho dilutor: Nunes (1980 y 1993), Memon *et al.* (1985), Hellemann *et al.* (1992), Pellicer *et al.* (1997), Pellicer (1998) y Chemineau *et al.* (1999) han revelado que la lipasa bulbo uretral es la responsable del deterioro de los espermatozoides. Por otro lado Simon (1981), Salisbury *et al.* (1982), Bonadona (1986) y Evans (1990) manifiestan que el empleo de la leche de vaca descremada y esterilizada, como dilutor de semen, no da siempre resultados uniformes, debido a que presenta variabilidad en su composición. También algunos investigadores recomiendan el empleo de los diluyentes a base de leche cuando se practica la conservación por congelado a -79°C aún empleando la leche descremada comercial común (1.9 % de grasa), homogeneizada y esterilizada con el agregado de 15 a 20 % de yema de huevo (Bonadona, 1986).

Los mejores resultados obtenidos con el dilutor yema de huevo-citrato, debido a la composición de la yema, la que contiene fosfolípidos, lecitinas, lipoproteínas y cefalinas, sustancias a las cuales parece deberse la mayor acción protectora y su presencia en una proporción del 3 al 12 % aumenta de manera evidente la acción contra el choque de frío.

De los resultados obtenidos en este trabajo se concluye lo siguiente:

- La solución Citrato Yema, a comparación de la Leche descremada-Yema demostró ser mejor dilutor para la conservación "*in vitro*" del semen caprino.

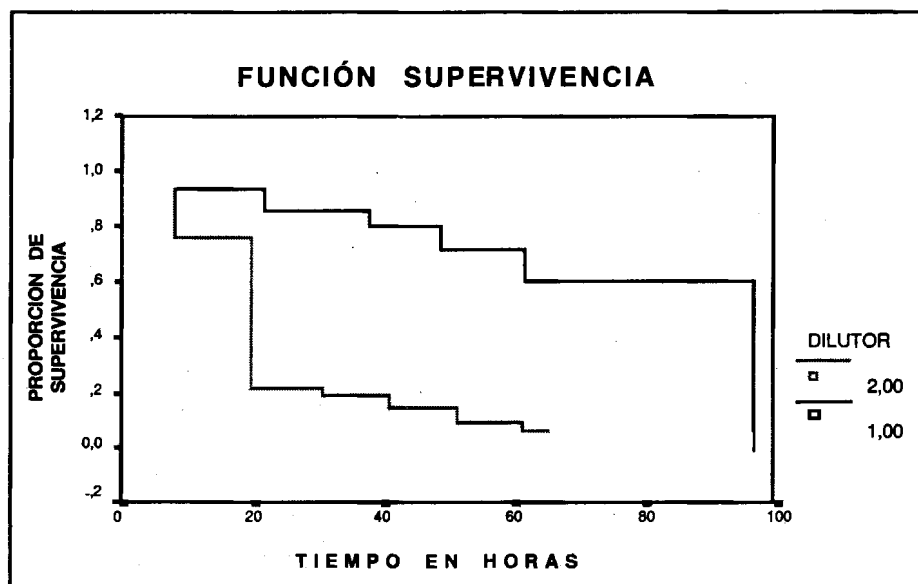


Fig. 1. Dilutor y su efecto sobre la sobrevivencia de los espermatozoides.

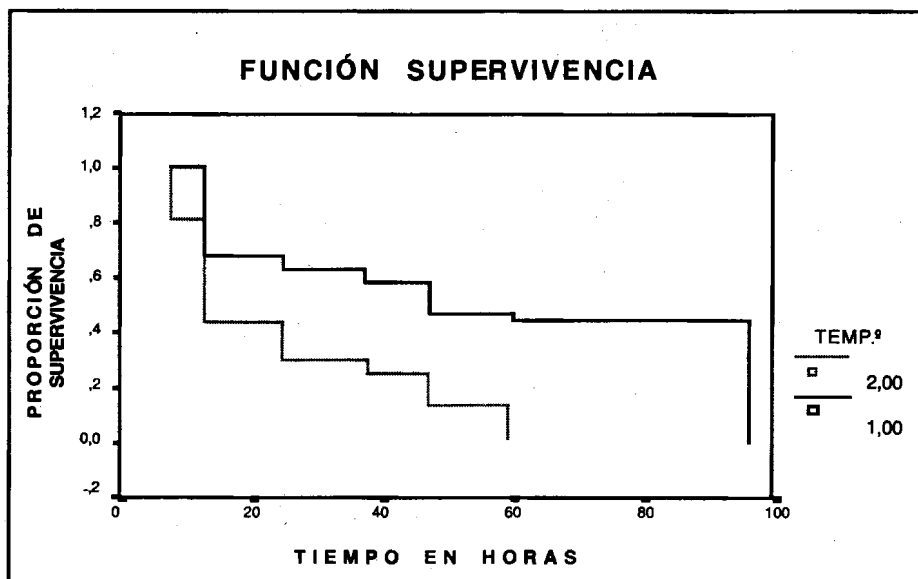


Fig. 2. Temperatura y su efecto sobre la sobrevivencia espermática (expresada en porcentaje de la muestra).

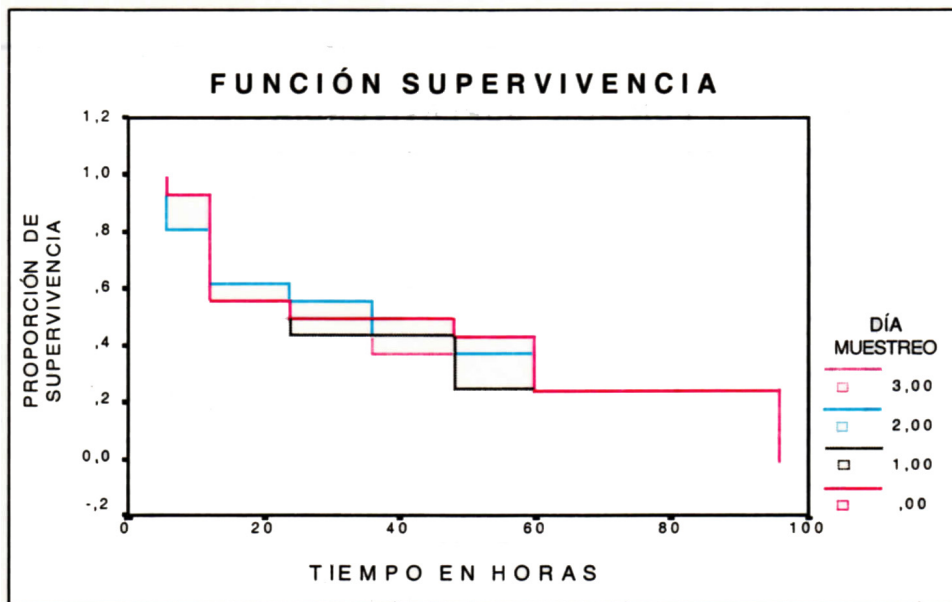


Fig. 3. El día de muestreo y su efecto sobre la sobrevivencia de los espermatozoides.

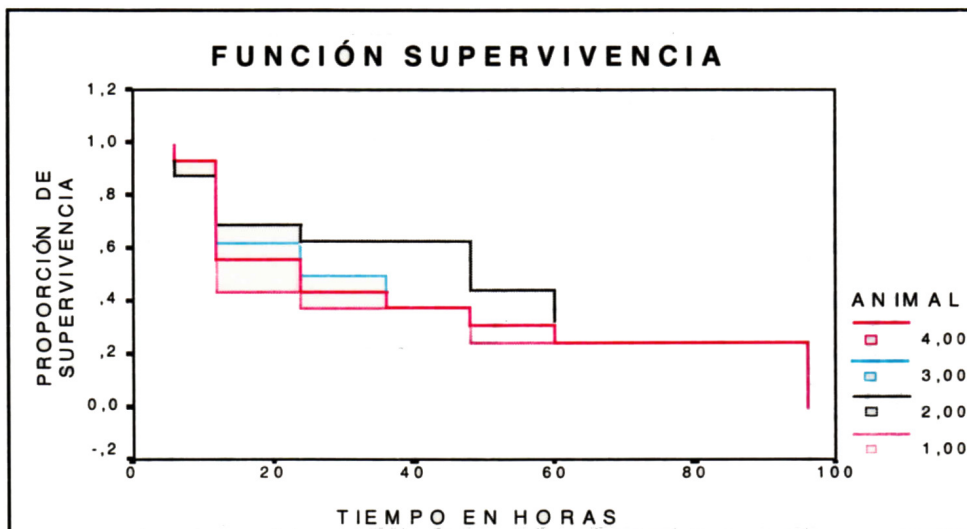


Fig. 4. Factor animal y sus efectos sobre la sobrevivencia de las células espermáticas.

- La conservación del semen caprino a 4°C arrojó resultados más constantes y favorables que a temperatura del medio ambiente.
- La dilución y conservación del semen con el dilutor Citrato-Yema, bajo condiciones de campo puede ser realizada de manera fácil, rápida y a un bajo costo, considerando que kg de citrato de sodio cuesta \$10 para preparar 100 ml. dilutor sólo se necesita 2.9g, lo cual equivale a unas 500 a 2000 dosis aprox. para realizar inseminaciones a nivel intra-cervical o intrauterino.

Se recomienda realizar posteriores evaluaciones *in vivo* sobre la eficiencia de las soluciones Citrato-Yema y Leche descremada-Yema como dilutores de semen caprino, para evaluar el porcentaje de fertilidad y correlacionar con los datos de la validación *in vitro*.

LITERATURA CITADA

1. **Bonadona, T. 1986.** Reproducción Animal e Inseminación Animal. 1a. Ed., p. 121-145, 181-192. Editorial. Hemisférico Sur. Argentina.
2. **Cole, H. H. y P. T. Cupps. 1977.** Reproduction in domestic animal. 3rd. ed., p. 495-496. Ed. ACADEMIC PRESS. California-USA.
3. **Chemineau, P., G. Baril, B. Leboeuf, M. C. Maurel, F. Roy, Pellicer-M. Rubio, B. Malpoux y Y. Cognie. 1999.** Implications of recent advances in reproductive physiology for reproductive management of goats. J Reprod. Fertil. Suppl., 54:129-42.
4. **Evans G. 1990.** Inseminación artificial de ovejas y cabras. 1a. ed. p. 25-177. Ed. ACRIBIA. S. A. España.
5. **Hellemann, C., M. Gonzalez y A. Guzman. 1992.** Efecto de yema de huevo en polvo un surfactante y centrifugación en la sobrevivencia de espermatozoides caprinos congelados. Arch. Med. Vet., XXIV(2):141-148.
6. **Memon, M. A., K. N. Bretzlaff y R. S. Ott. 1985.** Effect of washing on motility and acrosoma morphology of frozen-thawed goat spermatozoa. Am. J Vet. Res., 46(2):473-475.
7. **Nunes, J.F. 1980.** Etudes preliminaires de la recherche sur le role physiologique du plasma seminal de bouc. Paris VI Université Pierre et Marie Curie. (D.E.A.).
8. **Nunes. J. F. 1993.** El agua de coco como dilutor del semen caprino. Brasil. Rev. Cient., 1(3):269-271.
9. **Pellicer, M. T., T. Magallon y Y. Combaurnous. 1997.** Deterioration of goat sperm viability in milk extenders is due to a bulbourethral 60 – kilodalton glycoprotein with triglyceride lipase activity. Biol. Reprod., 57(5):1023-1031.
10. **Pellicer, M. T. 1998.** Deterioration of goat spermatozoa in skimmed milk - based extenders as a result of oleic acid released by the bulbourethral lipase BUS SP 60. J Reprod. Fertil., 112(1):95-105.
11. **Salina, G., J. Valencia, J. Becerril y G. Bustamante. 1988.** Reproducción de animales domésticos. 1a. ed., p. 180-185, 352-354. Ed. LIMUSA. México.
12. **Salisbury, G. W., N. L. Van Demarck y J. R. Lodge. 1982.** Fisiología de la Reproducción e inseminación artificial de los bovinos. 1a. ed., p.463-504., Ed. ACRIBIA. España.
13. **Simon, Y. 1981.** Fisiopatología de la reproducción e inseminación artificial. 1a. ed., p. 139-170. Perú.
14. **Tizol, G., D. Luque y A. Cárdenas. 1991.** Técnica de eosina-nigrosina para la determinación de reacciones acrosómicas en espermatozoides vivos. Rev. Cub. Cient. Vet., 22 (2):73-83.