

## CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN OVINO CON DILUYENTES CONVENCIONAL Y AGUA DE COCO - LECHE DESCREMADA\*

### Sheep semen cryopreservation with conventional and coconut water - skim milk diluents

Jesús Díaz<sup>1</sup>, Lisandro Urriola<sup>1</sup>, César Zambrano<sup>1</sup>, Julio Peraza<sup>1</sup> y Carlos Párraga<sup>1</sup>

#### RESUMEN

Se evaluaron diluyentes a base de tris convencional (TC) y agua de coco (AC)-leche descremada (LD) en la criopreservación de semen ovino. El diluyente base para AC-LD fue, 10% de AC: citrato de sodio (2,9 %), con 70% LD, y para TC, 80 % tris, ambos con 15 % de yema de huevo y 5 % de glicerol. Cada diluyente y muestra de semen se dividió en dos fracciones (A y B) y alícuotas, respectivamente. A cada alícuota de semen se adicionó la fracción A (TC; AC-LD), y en la B se adicionó 10% de glicerol (baño María, 37 °C); se procedió a enfriamiento lento hasta 5 °C (2 horas). A la fracción A + semen (5 °C) se le adicionó la fracción B, en cuatro porciones (10, 20, 30 y 40 %), con 15 min entre cada adición y con tres horas de estabilización, luego se llenaron las pajillas y sellaron con alcohol polivinílico, se estabilizaron por 10 minutos en agua a 4°C, se sometieron a vapores de nitrógeno durante 20 minutos, y se sumergieron al nitrógeno líquido (-196 °C). Se evaluó motilidad individual progresiva (MIP) y porcentaje de espermatozoides vivos (PEV) al finalizar el periodo de estabilización (FPE), a los tres minutos, 48 horas y 7 días post congelación (PC) en tres pajillas por tratamiento. No hubo interacción diluyente x tiempo sobre las variables evaluadas. La MIP y PEV en TC se mantuvo por encima de AC-LD en todos los períodos considerados. PEV mostró un descenso mayor en AC-LD desde FPE a 3 min PC (55%) y de 48 h a 7 días-PC (23,7%) con respecto a TC (31,5 y 9,8 %). Esto definió un bajo PEV en AC-LD a los 7 días-PC (22,5 %), lo cual limita el uso de semen congelado con diluyente a base de AC-LD para fines de inseminación artificial.

**Palabras clave:** congelamiento, semen ovino, motilidad individual progresiva, porcentaje de espermatozoides vivos.

#### ABSTRACT

Tris extenders conventional (TC) and coconut water (AC)-skim milk (LD) in cryopreservation of ram semen were evaluated. The diluent base AC-LD was 10% AC: sodium citrate (2.9%) with 70% LD, and TC, 80% tris, both with 15% egg yolk and 5% glycerol. Diluents and each sperm sample were divided into two fractions (A and B) and aliquots respectively. Each aliquot was added semen diluent "A" (TC, AC-LD), and in the diluent B was added 10% glycerol (water bath, 37 °C); proceeded slowly cooling to 5 °C in two hours. The diluent A + semen (5 °C) was added the fraction B, in four portions (10, 20, 30 and 40%) with 15 minutes between each addition and three hours from stabilization, then filled and sealed straws polyvinyl alcohol, were stabilized for 10 minutes in water at 4 °C, subjected to nitrogen vapor for 20 minutes, and immersed in liquid nitrogen (-196 °C). Individual progressive motility (MIP) was assessed and percentage of live spermatozoa (PEV) at the end of the stabilization period (FPE), and in three minutes, 48 hours and 7 days post freezing (PC) in three straws per treatment. The variables measured were not affected by diluents x time interaction. The MIP and PEV in TC remained above AC-LD in all periods. PEV showed a greater decrease in AC-LD from FPE to 3 min PC (55%) and from 48 hours to 7 days-PC (23.7%) compared to TC (31.5 and 9.8%). This defined a low PEV in AC-LD at 7

(\*) Recibido: 16-11-2013

Aceptado: 27-07-2014

<sup>1</sup> Programa Ciencias del Agro y del Mar. Universidad Ezequiel Zamora, UNELLEZ, Guanare 3350, Po. Venezuela. czambrano33@hotmail.com

days-PC (22.5%), which limits the use of the frozen semen with diluent AC-LD based for purposes of artificial insemination.

**Key words:** freezing, ram semen, individual progressive motility, percentage of live spermatozoa.

## INTRODUCCIÓN

Ante la necesidad de incrementar la oferta de alimentos de alto valor biológico en Venezuela para atender la demanda creciente de la población, la producción con ovinos se presenta como una excelente alternativa. Para mejorar los sistemas con ovinos en la región de los llanos es necesario incrementar la disponibilidad de material genético sobresaliente, y para tal fin la criopreservación de semen y la inseminación artificial son técnicas reproductivas disponibles para conseguir un rápido progreso genético.

Con la técnica de congelamiento del semen se incrementan las posibilidades de utilizar la inseminación artificial y se facilita el desarrollo de programas tendentes a mejorar esta especie, además la calidad genética de los ovinos aumenta y el costo de la adquisición de sementales disminuye.

El empleo de medios diluyoconservadores en el congelado del semen, permite prolongar la viabilidad de la célula espermática, rentabilizar los eyaculados obtenidos y conservar las dosis por un período amplio de tiempo. Diversas soluciones se han empleado como diluyentes para la congelación de semen de ovinos, los resultados de viabilidad han sido satisfactorios en la descongelación (Salamon y Maxwell 2000).

La leche es un líquido orgánico con propiedades biológicas para la conservación de los espermatozoides, pues posee capacidad amortiguadora, bactericida, viscosidad adecuada y abundancia de carbohidratos que son utilizados para proporcionar energía, además de lactosa que le confiere su propiedad crioprotectora (Balcázar y Porras 2009).

El plasma seminal de los pequeños rumiantes, contiene una enzima de tipo fosfolipasa "A" que actúa sobre los fosfolípidos de los diluyentes normalmente utilizados, esta reacción libera lisolecitinas y ácidos grasos que son tóxicos

para los espermatozoides (Nunes 1993).

La identificación de soluciones para conservación pobres en fosfolípidos es opción siempre y cuando generen buen desempeño tanto *in vivo* como *in vitro*, medido por la calidad del semen y tiempo de sobrevivencia. Dentro de las alternativas de diluyentes conservadores pobres en fosfolípidos se ha demostrado que el agua de coco favorece las características del semen *in vivo* e *in vitro* y de su fertilidad. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue evaluar diluyentes convencional (tris) y a base de agua de coco (*Cocos nucifera*) y leche descremada en la criopreservación de semen ovino.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el Laboratorio de Reproducción e Inseminación Artificial de la UNELLEZ, Mesa de Cavacas, Guanare, estado Portuguesa (9° 4' N; 69° 48' O). Las condiciones climáticas que caracterizan la zona son propias de un Bosque Seco Tropical. Se utilizó un semental ovino de la raza Santa Inés de 2 años de edad y 70 kg PV como fuente única de células espermáticas. El macho fue alojado en un corral individual y alimentado con una dieta de 500 g/día de alimento balanceado, heno de bermuda (*Cynodon dactylon*) *ad libitum*, además de agua y minerales a libre acceso.

Previo entrenamiento, acostumbramiento y adaptación del semental a la vagina artificial, se recolectó una muestra diaria de semen, con estímulo de una oveja sujeta a potro metálico y vagina artificial, hasta completar 10 eyaculados. Cada eyaculado fue dividido en dos alícuotas, una se preservó con diluyente a base de AC y LD (10:70) (Gutiérrez *et al.* 2006) y la otra en dilutor convencional Tris (Dalmazo 2008).

Una vez recolectado el semen se sometió a evaluación macroscópica, para determinar volumen, color, y consistencia; inmediatamente se

colocó en baño de María a 37 °C y se tomó una gota para evaluación microscópica. Para medir el pH se utilizó un potenciómetro portátil marca Termo Electron, modelo Orion.

Los valores mínimos requeridos para procesar la muestra fueron: 0,75 ml de volumen, 80% de motilidad individual progresiva (MIP), 85% de espermatozoides vivos (EV) y pH entre 6,5 y 7,5.

La evaluación microscópica consistió en determinar la motilidad masal (MM) e individual progresiva, de acuerdo con lo indicado por Evans y Maxwell (1990). Para determinar el porcentaje de espermatozoides vivos, se colocó en un portaobjetos, a la misma temperatura, una gota de semen y una gota de eosina-nigrosina, se homogenizó y utilizando otro portaobjeto se realizó el frotis, y de esta manera se contaron 100 células espermáticas en diversos campos de la laminilla por medio del microscopio (40 X), para precisar cuántos estaban teñidos en forma total o parcial.

Se utilizó una dilución fija de 1: 9 (semen: diluyente) para obtener una concentración aproximada de 120 millones de espermatozoides por 0,5 ml de muestra (Nunes y Fernández 2001). Cada diluyente se dividió en dos fracciones, A y B. Obtenido el semen, a cada alícuota se adicionó la fracción “A”, y en la fracción “B” se adicionó 10% de glicerol, ambos en baño María, y posteriormente se procedió a enfriarlos lentamente de 37 °C a 5 °C en una cámara de refrigeración, en tiempo de 2 horas, con la finalidad de evitar un choque térmico en los espermatozoides.

A cada fracción “A” (TC; ACLD) + semen (5 °C) se le adicionó la fracción “B” que contenía el glicerol, en cuatro porciones (10, 20, 30 y 40 %),

con 15 min entre cada adición y con 3 horas de estabilización. Transcurrido este período se procedió al empajillado, se llenó cada una de las pajillas y se sellaron con alcohol polivinílico, se colocaron por 10 minutos en agua a 4°C para lograr su estabilización.

Una vez transcurrido el tiempo, se secaron las pajillas con toallas desechables a la misma temperatura de refrigeración, fueron llevadas a los vapores de nitrógeno durante 20 minutos. Luego se sumergieron en nitrógeno líquido (-196 °C).

Se evaluó motilidad individual progresiva y porcentaje de espermatozoides vivos, con microscopio de luz con aumentos de 10x y 40x (Ax *et al.* 2002), al finalizar el periodo de estabilización y a los tres minutos, 48 h y una semana después de congelación, en tres pajillas por tratamiento, las cuales se descongelaron en baño de María (37°C; 30”), se retiraron, secaron y cortaron de su extremo para colocar una gota del semen en portaobjeto temperado para evaluar su viabilidad.

La matriz de datos de MIP y PEV se analizó con el programa Statistix 8.0; aplicando análisis de varianza combinado en el tiempo para modelo completamente aleatorizado.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Características del semen ovino fresco

En la Tabla 1 se presentan las características del semen fresco de ovino utilizado para criopreservación. Con respecto a las características macroscópicas, se observó que prevaleció el color blanco en todas las muestras evaluadas; de acuerdo con Hafez (1989) y Lopes (1999), el color normal del semen ovino puede ser blanco lechoso o blanco cremoso. Con respecto al aspecto fue de

Tabla 1. Características del semen fresco de ovino, utilizado para criopreservación.

Parámetro	Promedio	SD*	CV** (%)	Mínimo	Máximo	Frecuencia %
Consistencia (0 a 5)	4,10	0,31	7,71	4,00	5,00	
MM (0 a 5)	4,90	0,31	6,45	4,00	5,00	
MIP (%)	94,5	1,58	1,67	90,00	95,00	
EV (%)	93,50	2,41	2,58	90,00	95,00	
pH	7,00	0	0	7,00	7,00	
Volumen (ml)	0,75	0,17	23,70	0,50	1,00	
Aspecto	-	-	-	-	-	100 Limpio
Color	-	-	-	-	-	100 Blanco

\* Desviación estándar. \*\* Coeficiente de variación. MM: motilidad masal. MIP: motilidad individual progresiva. EV: espermatozoides vivos.

apreciación limpia, consistencia número 4, con una sola muestra de consistencia 5 (escala de 0 a 5; Evans y Maxwell 1990).

El volumen promedio del eyaculado del semen ovino obtenido en este ensayo (Tabla 1), fue 0,75 ml, con valores máximos y mínimos de 1,0 y 0,5 ml, respectivamente. Según Osorio y Gómez (2005), el volumen del semen ovino varía de 0,5 a 2 ml, cuando se extrae con vagina artificial el promedio de volumen es 1,0 ml, lo cual coincide con los resultados de este trabajo. Así mismo, los autores indican que el volumen del eyaculado depende de la edad, condición del animal, frecuencia de extracciones y destreza del ayudante.

La motilidad masal (escala de 0 a 5; Evans y Maxwell 1990), tuvo un promedio de 4,90, con un máximo y un mínimo de 5 y 4, respectivamente. Las muestras que presentan una clasificación de 4 o 5 pueden ser usadas para congelación e inseminación artificial (Maxwell *et al.* 1994). Igualmente, la calificación de motilidad individual progresiva y el porcentaje de espermatozoides vivos del semen fresco fue alta, de buena calidad, a los fines de criopreservación.

### Características del semen ovino congelado

En la Tabla 2 y Fig. 1 se aprecian los valores de MIP del semen de ovino congelado con agua de coco - leche descremada y dilutor convencional Tris en cuatro periodos de evaluación. En la Fig. se observa un comportamiento uniforme ( $P>0,05$ ) de las dos curvas trazadas, e indica que la MIP disminuyó en magnitud y dirección similar en los dos tratamientos conforme el proceso de congelamiento avanzaba. La curva del diluyente convencional (tris) estuvo por encima de AC-LD en todos los periodos considerados. Esta situación se explica en función de los cambios que ocurrieron en las células espermáticas por diferentes factores como la disminución o aumento

de temperatura durante el procesamiento (Salamon y Maxwell 2000). En el caso del diluyente con base en AC-LD, numéricamente se aprecia mayor disminución de MIP en el transcurso del tiempo de estabilización hasta los 3 min-PC, ya que hubo una reducción de 63,5% con respecto a 41% del diluyente convencional tris. De acuerdo con Rodríguez-Almeida *et al.* (2008), el semen congelado redujo drásticamente la MIP (53,7 %) comparado con el semen refrigerado (83,3 %). Además, al congelar el semen, sólo alrededor de 50% de los espermatozoides de carnero mantienen su viabilidad (Bailey y Buhr 1994), lo cual coincide con los valores de MIP del presente estudio.

Al considerar el porcentaje de espermatozoides vivos se aprecia tendencia similar en las dos curvas trazadas en la Fig. 2 (magnitud y dirección), indicativo de que no hubo efecto de la interacción tratamiento con período de congelamiento. Sin embargo la curva del diluyente convencional tris se mantuvo por encima del AC-LD en todos los tiempos.

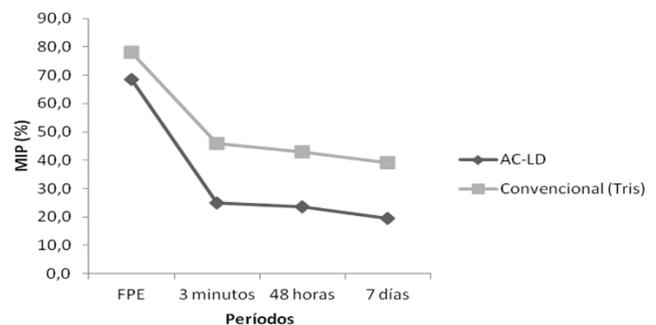


Figura 1. Motilidad individual progresiva de semen ovino congelado con agua de coco - leche descremada y dilutor convencional (Tris) en cuatro periodos de evaluación.

Vale resaltar que el PEV mostró un descenso porcentual mayor en AC-LD en los periodos de FPE hasta 3 min PC (55%) y de 48 h a 7 días-PC (23,7%) con respecto al diluyente convencional tris

Tabla 2. Porcentaje de motilidad individual progresiva de semen ovino congelado con agua de coco - leche descremada y dilutor convencional (Tris) en cuatro periodos de evaluación.

Tratamiento	Motilidad Individual Progresiva (%)			
	FPE*	3 min-PC <sup>1</sup>	48 h-PC	7 días-PC
AC-LD	68,5	25,0 (63,5)**	23,5 (6)	19,5 (17)
Convencional (Tris)	78,0	46,0 (41)	43,0 (6,5)	39,0 (9,3)

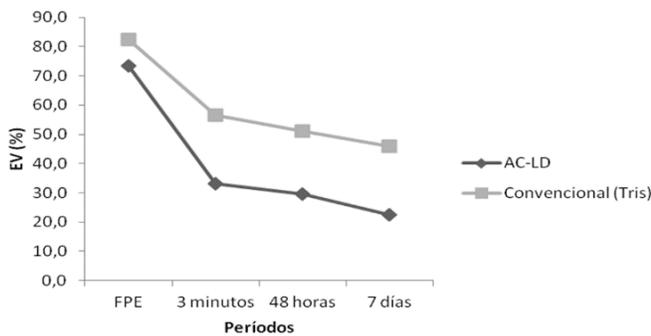
\*FPE: Final del período de estabilización. \*\* ( ): Porcentaje de disminución con respecto a la medición anterior

<sup>1</sup>PC: post-congelamiento. AC-LD: agua de coco-leche descremada.

**Tabla 3. Porcentaje de espermatozoides vivos de semen ovino congelado con agua de coco - leche descremada y diluyente convencional (Tris) en cuatro periodos de evaluación.**

Tratamiento	Espermatozoides vivos (%)			
	FPE*	3 min-PC	48 h-PC	7 d-PC
AC-LD	73,5	33,0 (55)*	29,5(10,6)	22,5(23,7)
Convencional (Tris)	82,5	56,5 (31,5)	51,0(9,7)	46,0(9,8)

(\*)Valores en paréntesis: % descenso del PEV con respecto al periodo anterior.



**Figura 2. Porcentaje de espermatozoides vivos (EV) de semen ovino congelado con agua de coco - leche descremada y diluyente convencional (Tris) en cuatro periodos de evaluación.**

(31,5 y 9,8 %) (Tabla 3). Esto definió un bajo PEV en AC-LD a los 7 d-PC (22,5 %), lo cual limita el uso de este semen a los fines de inseminación artificial (Salamon y Maxwell 2000).

### CONCLUSIONES

La motilidad individual progresiva del semen congelado disminuyó en magnitud y dirección similar en los dos tratamientos conforme avanzó el tiempo en el proceso de congelamiento.

El porcentaje de espermatozoides vivos fue similar entre los dos diluyentes para los diferentes períodos de congelamiento evaluados.

El bajo porcentaje de espermatozoides vivos en el dilutor agua de coco – leche descremada a los 7 días post congelamiento, limita el uso de este semen a los fines de inseminación artificial.

### REFERENCIAS

Ax, R., Daily, M., Didon, B., Lenz, R., Love, C., Varner, D., Hafez, B. y Bellin, M. 2002. Evaluación del semen. En: Hafez, E. y Hafez, B. Reproducción e Inseminación artificial en animales. Séptima edición. Mc-Graw-Hill. México, DF. 519 p.

Bailey, J. and Buhr, M. 1994. Cryopreservation alters the Ca<sup>2+</sup> flux of bovine spermatozoa. *Can. J. Anim. Sci.* 74: 45-51.

Balcázar, J. y Porras, A., 2009. Manual de prácticas en manejo reproductivo de ovinos y caprinos. [On line]. En:[http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/licenciatura/coepa/archivos/Manuales/51\\_Reproduccion\\_peque\\_rumiantes.pdf](http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/licenciatura/coepa/archivos/Manuales/51_Reproduccion_peque_rumiantes.pdf) [Consulta: noviembre, 2012].

Dalmazo, P. 2008. Comparación de dos métodos de congelación de semen ovino. Tesis de Grado. FCV, IRA, Universidad Austral de Chile. 44 p.

Evans, G. y Maxwell, W. 1990. Inseminación Artificial de ovejas y cabras. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 204 p.

Gutiérrez, A., Palacios, M. Jiménez, C. y Ramírez, G. 2006. Agua de coco, *Opuntia sp*, leche y sus combinaciones para criopreservar semen ovino. *Archivos de Zootecnia* 55 (209): 97 – 100.

Hafez, E. 1989. Reproducción e inseminación artificial en animales. Nueva editorial interamericana. México, DF. 694 p.

Lopes, F. 1999. Semen collection and evaluation in rams. [On line]. En

<http://www.dps.ufl.edu/hansen/asg33351/semencollram1.htm> [Consulta: junio, 2012].

- Maxwell, W., Landers, A. and Evans, G. 1994. Survival and fertility of ram spermatozoa frozen in pellets straws and minitubes. *Theriogenology*.43:1201-1210.
- Nunes, J. 1993. EL agua de coco como dilutor del semen caprino. *Revista Científica, FCV-LUZ* Vol. III (3): 269 – 272.
- Nunes, J. y Fernández, D. 2001. *Biotécnicas de la reproducción caprina y ovina*. Editorial Fortaleza. Ceará, Brasil. 105 p.
- Osorio, J. y Gómez, A. 2005. Protocolo de trabajo del laboratorio de procesamiento de semen. CEMEGO, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México. 12p. (mimeografiado).
- Rodríguez-Almeida, F., Ávila Cota, C., Anchondo Garay, A., Sánchez-Ramírez, B. y Jiménez Castro, J. 2008. Capacitación espermática inducida por la conservación de semen de carnero diluido, refrigerado o congelado. *Agrociencia*, 42 (4): 399-406.
- Salamon, S. and Maxwell, W. 2000. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science* 62: 77 - 111.