
Calidad Espermática Postcongelación de Semen del Macho Cabrío Saanen en Dos Épocas del Año



Post-Thaw Semen Quality of Saanen Bucks in Two Seasons

Miguel Angel Nieto-Escorcía^{1*}, Fernando Ruiz-Zarate², Ramiro López-Trujillo³,
Roberto García-Elizondo²

¹Maestría en Ciencias en Zootecnia, ²Departamento de Producción Animal, ³Departamento de Nutrición y Alimentos.
Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Calzada Antonio Narro, 1923, Col. Buenavista, 25315,
Saltillo, Coah., México. Correo-e: nietodeer@hotmail.com (*Autor responsable).

RESUMEN

La criopreservación de semen es importante en la reproducción caprina debido a que con este método, los espermatozoides del macho cabrío se pueden utilizar después de un largo período de almacenamiento. Esta técnica permite, además, extender la vida reproductiva del semental después de que este muere. Se colectaron eyaculados de cinco machos de raza Saanen por medio de vagina artificial, y se evaluó la calidad espermática en estado fresco y postcongelación en dos épocas del año: abril (días crecientes) y diciembre (días decrecientes). Las variables evaluadas fueron: volumen, concentración, viabilidad, motilidad masal y progresiva. Se utilizó un diluyente a base de Tris-yema de huevo, y el semen se diluyó en una proporción de 1:4 y se envasó en pajillas de 0.5 mL a una concentración promedio de 200 millones de espermatozoides móviles. Las pajillas se congelaron en vapores de nitrógeno líquido y se descongelaron a 37 °C durante 15 seg. Los resultados mostraron mayor calidad seminal en las muestras en estado fresco ($p < 0.05$) colectadas en diciembre. Por otra parte, no se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$) entre épocas en la calidad espermática postcongelación.

Palabras clave: Caprinos, criopreservación, motilidad espermática, características del semen, periodo de congelación.

INTRODUCCIÓN

La criopreservación de semen de mamíferos es un proceso complejo, en el que intervienen muchos factores. La posibilidad de preservar espermatozoides congelados de las especies domésticas es

ABSTRACT

Cryopreservation of semen is important in goat reproduction because with this method, the goat sperm can be used after a long storage period. This technique also allows to extend the reproductive life of the stallion after it dies. Ejaculates from five Saanen bucks were collected through artificial vagina, and fresh and post-thaw sperm quality was evaluated in two seasons: April (growing days) and December (decreasing days). The evaluated variables were: volume, concentration, viability, mass and progressive motility. A Tris base egg yolk diluent was used and the semen was diluted in a ratio of 1:4 and packaged into 0.5 mL straws to an average concentration of 200 million motile sperm. The straws were frozen in liquid nitrogen vapor and thawed at 37 °C for 15 sec. The results showed higher seminal quality in fresh samples ($p < 0.05$) collected in December. On the other hand, there was not any significant difference ($p > 0.05$) between seasons, in the post-thaw sperm quality.

Key words: Caprine, cryopreservation, sperm motility, semen characteristics, freezing period.

todo un reto, debido a que las células deben soportar condiciones de estrés físico relacionadas con los procesos de crioconservación, los espermatozoides de las diferentes especies son muy diferentes en tamaño, forma y composición de lípidos, y todos ellos tienen efecto sobre la supervivencia del semen. La preservación de espermatozoides congelados para la reproducción

Recibido: Junio, 2010.
Aceptado: Mayo, 2012.

animal, tiene gran relevancia ya que permite mejorar la sanidad, optimizar el uso de los machos, acelerar el programa de mejora genética, homogeneidad en las producciones y la disponibilidad de los registros genealógicos (Hafez, 1996).

La criopreservación de semen caprino es importante por varias razones: las células de esperma criopreservadas se pueden almacenar y utilizar después de un largo período de tiempo (Martínez *et al.*, 2007). La criopreservación de espermatozoides caprinos también permite extender la vida reproductiva del macho cabrío después de que este muere (Rahman *et al.*, 2008).

El semen de los caprinos puede ser conservado en fresco hasta 72 h con 60.1 % de motilidad y un porcentaje de espermatozoides vivos de 71.1 %, en refrigeración puede durar hasta seis días con buenas características para la fecundación (Evans y Maxwell, 1987), pero la técnica más utilizada es el congelamiento con resultados aceptables (Valencia *et al.*, 1994).

El problema en la criopreservación es el daño que ocurre durante el congelamiento, al pasar la célula espermática por una zona de temperatura crítica entre -15 °C y -60 °C durante la cual se producen fenómenos como son la formación de cristales intracelularmente y extracelularmente, deshidratación y distorsión de la membrana (Dunner y Vázquez, 1991).

En los caprinos la criopreservaciones de uso limitado en comparación con otras especies, debido, entre otros factores al porcentaje de pérdida del 10 % al 50 % en la motilidad progresiva y el número de espermatozoides vivos postcongelación (Valencia *et al.*, 1994).

El objetivo de esta investigación fue evaluar la calidad seminal en machos cabríos de la raza Saanen, en esperma en estado fresco y postcongelación, en dos épocas del año.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización

La investigación se desarrolló en el municipio de Apaseo el Grande (100° 41' 07''O y 20° 32' 37''

N) en el estado de Guanajuato, con altitud de 1,767 m. El clima es templado, con temperatura máxima de 37.1 °C y mínima de 0.9 °C. La precipitación anual es de 606.1 mm (INEGI, 2000).

Manejo de los sementales

Se utilizaron cinco machos de raza Saanen de 3.5 a 4.5 años de edad en condición corporal de 3.5 a 4 (escala 1 a 5). Los animales fueron desparasitados internamente y confinados en corrales individuales de 3x3 m² provisto de sombras, comedero, bebedero. La alimentación fue a base de heno de alfalfa y ensilaje de maíz. Además, se les proporcionaron minerales comerciales a libre acceso.

Recolección y evaluación del semen

La recolección de semen se hizo con vagina artificial (IMV, Francia), previo estímulo por hembras en celo. Se realizó una revisión del pene y testículos en busca de alguna posible patología (Chemineu *et al.*, 1991) y una limpieza del área prepucial de material contaminante y de pelos circundantes, una vez que el macho eyaculó en la vagina artificial, la muestra de semen se recibió en un tubo cónico y se agregó una tercera parte de diluyente (Evans y Maxwell, 1987). La recolección se realizó en verano cuando existe mayor exposición de horas luz y en invierno cuando existe menor exposición de horas luz, para determinar si existe una mejor época de criopreservación del semen.

En el laboratorio se colocaron las muestras en baño María a 36.5 °C, y se evaluó: volumen espermático (mL), motilidad masal (%), motilidad progresiva (%) y espermatozoides vivos (%) (Gracia *et al.*, 1998).

El volumen del eyaculado se evaluó directamente en el tubo cónico colector. La concentración del semen (número de espermatozoides por mililitro utilizando una dilución de 1:10) se realizó con un contador de células espermáticas automático (Spermacue™). La motilidad masal (%) se evaluó colocando una gota de semen sobre un portaobjetos

templado (37 °C) y se observó con un objetivo de 10X; la estimación de la motilidad espermática se hizo observando la potencia de onda de acuerdo a la presencia de dicho movimiento, en base a la clasificación de 0 a 5 puntos del Cuadro 1 (Hafez, 1996).

La motilidad progresiva individual (%) se determinó microscópicamente en una gota de semen con citrato de sodio al 2.8 %. Se utilizó un aumento de 200X y el portaobjetos se calentó a 37-38 °C. La apreciación visual se realizó en 150 espermatozoides en movimiento, tomando en cuenta el desplazamiento lineal constante.

La viabilidad espermática (%) se estimó vía morfológica con tinción de eosina-nigrosina, compuesta por: 1.67 g de eosina (soluble en agua), 10 g de nigrosina (soluble en agua), 2.9 g de citrato sódico y 100 mL de agua destilada (Evans y Maxwell, 1987).

Se colocaron 1-2 gotas de colorante y una gota de semen, sobre el extremo del portaobjetos. Se mezclaron y por medio de barrido se extendió; se observaron y contaron 150 espermatozoides de diferentes campos tomando en cuenta la cabeza del espermatozoide (Evans y Maxwell, 1987).

Dilución y congelación del semen

El diluyente que se utilizó fue tris (hidroximetil) aminometano (Fermont) en una proporción (1:4) una parte de semen por cuatro del diluyente. El contenido del diluyente fue 3.786 g de Tris, 0.625 g de glucosa (Fermont), 2.172 g de ácido cítrico monohidratado (Fermont), 12 mL de yema de huevo, 5 mL de glicerol (Fermont), 0.125 g de penicilina y 0.1 g de estreptomycin (Evans y Maxwell, 1987).

La inactivación de la yema del huevo se realizó una vez disueltos los componentes en el vaso precipitado; se colocaron en el baño María a 56 °C durante 30 min para posteriormente mantenerlo a 37 °C para diluir el semen.

Para obtener el número de dosis de semen por eyaculado se siguió el procedimiento de:

$$N = (C \times V \times M) / DR$$

Donde N = número de pajillas totales; C = cantidad de espermatozoides por mililitro; V = volumen total recolectado; M = porcentaje total de espermatozoides con movilidad masal y DR = dosis requerida por pajilla (Hafez, 1996).

Preparación de pajillas de semen

El llenado de las pajillas se realizó de manera manual por medio de succión en pajillas de 0.5 mL, con un promedio de 200 millones de espermatozoides cada una. Las pajillas se colocaron en un vaso de precipitado con agua a 37 °C, posteriormente se llevaron a refrigeración, y la temperatura disminuyó a 5 °C en el transcurso de 2.5 h, como periodo de equilibrio (Valencia *et al.*, 1994).

Congelación

Para el proceso de congelación, se vació el nitrógeno líquido en una caja de poliestireno hasta obtener un nivel de 15 cm, después, las pajillas identificadas se expusieron a vapores de nitrógeno (-75 °C) y se colocaron en posición horizontal a 5 cm sobre el nivel del mismo durante 15 min. Posteriormente se sumergieron en el nitrógeno líquido para su congelación a -196 °C y se conservaron en ese estado durante una semana (Valencia *et al.*, 1994).

Descongelación del semen

Para la evaluación postcongelación de las dosis, la descongelación del semen se realizó en Baño María a 37 °C durante 15 seg y se evaluaron la motilidad masal (%), la motilidad progresiva (%) y el porcentaje de espermatozoides vivos (Holt, 2000).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Características del semen en estado fresco

Volumen. El mayor volumen de eyaculado fue de 2 mL y se colectó en diciembre; mientras que en abril solo se colectó 1.2 mL. El rango normal de

volumen de un eyaculado es de 0.1 a 1.5 mL según lo referido por Hafez (1996). Evans y Maxwell (1987) mencionan que el rango normal del volumen de un eyaculado está entre 0.8 y 2 mL; a diferencia de Gibbons *et al.* (1992) que obtuvieron 0.77 mL en machos de raza Angora durante la primavera.

Concentración. La mayor concentración espermática fue de $322.53 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ y se obtuvo en diciembre; la menor fue de $216.8 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ en los eyaculados de abril. Se considera que estos valores son normales de acuerdo a la época de recolección. Hafez (1996) menciona que en un eyaculado, normalmente puede haber de 200 a 600×10^7 espermatozoides por mililitro. Por otra parte, Silvestre *et al.* (2004) obtuvieron resultados semejantes con rangos entre 223×10^7 y $282 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ en verano; mientras que Gibbons *et al.* (1992) obtuvieron, en abril, un promedio $439 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ en machos de raza Angora, pero a una latitud de 41° S , en una época reproductiva natural.

Viabilidad espermática. La viabilidad espermática con un promedio del 85 % fue mayor en diciembre; en abril fue del 80 %. Farshad *et al.* (2009) obtuvieron un promedio 88.56 % en invierno, en machos de dos a cuatro años de edad. Silvestre *et al.* (2004), obtuvieron 75 % en

verano, en machos de raza Murciana-Granadina de tres años de edad.

Motilidad masal. La motilidad masal fue mayor en diciembre, con el 85 %; en abril fue de 80 %. Farshad *et al.* (2009) obtuvieron 86.13 %, en invierno, en machos de dos a cuatro años. En otro estudio, Vázquez *et al.* (1998) obtuvieron rangos entre 76 % y 82 % en razas autóctonas españolas.

Motilidad Progresiva. La motilidad progresiva fue mayor en diciembre con el 80%; en abril fue del 78 %. Silvestre *et al.* (2004) obtuvieron el 69.8 % en verano. Los valores de este estudio son cercanos al 80.35 % en machos de dos a cuatro años de edad, que reportaron Farshad *et al.* (2009).

Los resultados del Cuadro 1 muestran una diferencia ($p < 0.05$) en la calidad espermática: volumen, concentración, viabilidad espermática, motilidad masal y progresiva en cada época de colecta; indican que la mejor calidad espermática se obtuvo en diciembre, mientras que en abril, la calidad fue menor.

La diferencia entre los resultados de otros investigadores y los de este trabajo se deben a las distintas razas, la edad y la época de evaluación; pero todos tienen en común el tipo de recolección del semen a través de vagina artificial, además de ser estimulados por la misma hembra.

Cuadro 1. Características seminales de eyaculados, en estado fresco, de machos de raza Saanen de 3.5 a 4.5 años de edad, en el municipio de Apaseo el Grande, Gto., México.

Características Espermáticas	Abril			Diciembre		
	Media %	Min-Max %		Media %	Min-Max %	
Volumen (mL)	1.15 b	0.06	(0.70-1.60)	2.01 a	0.05	(1.7-2.4)
CE (10^7 mL^{-1})	216.80 b	3.52	(198-248)	322.53 a	3.79	(289-344)
Viabilidad (10^7 mL^{-1})	80.00 b	0.93	(78-90)	85.00 a	1.14	(80-95)
MM (10^7 mL^{-1})	80.00 b	1.28	(78-90)	85.00 a	0.96	(80-90)
MP (10^7 mL^{-1})	78.00 b	1.56	(70-90)	80.00 a	1.28	(75-90)

CE: Concentración espermática; MM= Motilidad masal; MP: Motilidad progresiva.

Características del semen en postcongelación

Viabilidad espermática. La viabilidad espermática en abril fue de 22 %; en diciembre del 27.3 % pero

no mostró diferencia significativa ($p < 0.05$). En comparación, Vera *et al.* (2007) obtuvieron 35 % en machos Saanen y 40.7 % en machos criollos; Gracia *et al.* (1998) reportan una viabilidad

espermática del 30.3 % en abril y 31.55 % en diciembre, por otra parte, Gibbons *et al.* (1992) obtuvieron un 60 % en machos de raza Angora.

Motilidad masal. La motilidad masal observada en abril fue similar a la de diciembre: 25 % y 29 % respectivamente, no mostró diferencias significativas ($p < 0.05$). Estos resultados son similares a los de Gracia *et al.* (1998) que obtuvo un promedio de 24.75 % en abril y 23.97 % en diciembre.

Motilidad progresiva. La motilidad progresiva en abril (20 %) y diciembre (22 %) no mostraron diferencia ($p < 0.05$). Vera *et al.* (2007) obtuvo el 39.6 % de motilidad progresiva en machos Saanen en

otoño, en comparación con Grajales (1990) que reporta resultados superiores al 59 %; Ritar y Salomón (1991) obtuvieron el 66 %, mientras que Valencia *et al.* (1994) mencionan un rango de 73 % a 78.6 %. Gibbons *et al.* (1992) obtuvieron el 74 % en marzo, en machos de raza Angora.

Los resultados en el Cuadro 2, muestran que la evaluación postcongelación en ambos periodos no muestra diferencia significativa ($p > 0.05$); Se obtuvo una calidad espermática similar en: viabilidad, motilidad masal y progresiva. Sin embargo, el mismo cuadro muestra diferencia significativa entre las características del semen en estado fresco y postcongelado. Los parámetros que se determinaron en este estudio son menores a los que reportan otros autores.

Cuadro 2. Características del semen, fresco y postcongelado, de machos de raza Saanen de 3.5 a 4.5 años de edad, en el municipio de Apaseo el Grande, Gto., México.

Características Espermáticas	Fresco Media %	Postcongelado Media %
Viabilidad Espermática	83.3 a	25.7 b
Motilidad Masal	84.4 a	27.7 b
Motilidad Progresiva	80.7 a	22.0 b

Estado postcongelación; Viabilidad espermática

El Cuadro 3 presenta la comparación postcongelación promedio de las características seminales por época del año.

Cuadro 3. Características seminales post congelación, de eyaculados de machos de raza Saanen de 3.5 a 4.5 años de edad, en el municipio de Apaseo el Grande, Gto., México, en dos épocas.

Características Espermáticas	Media %	Semen Postcongelado Pajilla (400 X10 ⁶ mL ⁻¹)			
		Abril	Min-Max %	Diciembre	Min-Max %
CE (10 ⁶ mL ⁻¹)					
Viabilidad (10 ⁶ mL ⁻¹)	22 a	1.63	(15-34)	27 a	1.19 (20.3-35.3)
MM (10 ⁶ mL ⁻¹)	25 a	1.61	(17-35)	29 a	1.69 (20-40)
MP (10 ⁶ mL ⁻¹)	20 a	0.63	(18-25)	22 a	0.86 (18-30)

CE: Concentración espermática; MM= Motilidad masal; MP: Motilidad progresiva.

CONCLUSIONES

Existe variabilidad en la calidad espermática en fresco con respecto a la época del año en la que se realice la colecta de semen. El proceso completo de congelación-descongelación para llevar a cabo la fertilización del óvulo, se puede realizar con parámetros aceptables, independientemente de la época. El volumen colectado en abril es menor en el momento de la dilución y preparación de las pajillas; la cantidad total que se pudieran elaborar, es menor que la de diciembre, pero con la misma calidad.

LITERATURA CITADA

- Chemineu, P., Y., Cagnie, P., Orgeur, J.C. Vallet. 1991. Training manual on artificial insemination in sheep and goats. FAO, Animal Production and Health Paper. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, Italy. 222 p.
- Dunner, S., I. Vázquez. 1991. Efectos del medio de conservación a base de sustancias amino-orgánicas sobre la calidad del semen de macho cabrío medida "in vitro" después de conservación a +5 °C o +15 °C. Arch. Zootec. 40 (149): 391-401.
- Evans, G., W.M. Maxwell. 1987. Salamon's artificial insemination of sheep and goats. Ed. Acribia, S.A. 194 p.
- Farshad, A., B., Khalili, P. Fazeli. 2009. The effect of different concentrations of glycerol and domosoon viability of Markhoz goat spermatozoa during different freezing temperatures steps. Pakistan J. Biol. Sci. 12(3): 239-245.
- Gibbons, A., M., Cueto, P. Willems. 1992. Inseminación artificial con semen congelado en cabras de raza Angora, sobre los celos concentrados post incorporación del efecto macho. Rev. Med. Vet. 73(3): 122-128.
- Gracia, A., F., Cabrera, F., González, M., Batista, J., Forga, P. Calero. 1998. Efecto de la proporción de yema sobre la conservación de semen congelado en la agrupación caprina canaria (Variedad Majorera). Producción Ovina y caprina. XXIII: 517-520.
- Grajales, L.H.A. 1990. Comparación de la fertilidad entre diluyentes para semen y hormonas para controlar la ovulación en cabras inseminadas artificialmente con semen fresco y congelado. Tesis de Maestría. Fac. de Est. Sup. Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuautitlán, Edo. Mex., México.
- Hafez, E.S.E. 1996. Reproducción e inseminación artificial en animales, Ed. Interamericana, Mc. Graw Hill. México, D.F. 542 p.
- Holt, W.V. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. Anim. Reprod. Sci. 62: 3-22.
- INEGI, 2000. XII Censo General de Población y Vivienda.
- Martinez, R.R.D., J., Hernandez, L., Reyna, R., Santos. 2007. Intrauterine insemination with frozen-thawed semen in Creole goats, synchronized in oestrous during the non-breeding season. Res. J. Anim. Sci. 1(3): 76-80.
- Rahman A.N.M.A., R.B., Abdullah, W.E.W., Khadijah, 2008. A review of reproductive biotechnologies and their application in goat. Biotechnol. 7(2): 371-384.
- Ritar, A.J., S., Salamon. 1991. Effects of month of collection, method of processing, concentration of egg yolk and duration of frozen storage on viability of Angora goat spermatozoa. Sm. Rumin. Res. 4: 1, 29-37.
- Silvestre, M.A., I., Salvador, J.P., Sanchez, E.A. Gomez. 2004. Effect of changing female stimulus on intensive semen collection in young Murciano-Granadina male goats. J. Anim. Sci. 82: 1641-1645.
- Valencia, J., G., Gonzalez, M., Gonzalez, A., Trejo. 1994. Motilidad y daño acrosomal del semen caprino congelado en pajillas de 0.25 ml y 0.5 ml y descongelado de 2 diferentes ritmos de temperatura. Vet. Mex. 25 (2): 127-131
- Vázquez, I., S., Cortes, C., Borque. 1998. Conservación del semen de macho cabrío. Producción caprina y ovina 1998. XXIII: Ponencia 2, 31-36.
- Vera, T., R., Alberio, F., Hozbor, E., Sanchez, D., Aguilar, J. Aller. 2007. Viabilidad posdescongelación de espermatozoides caprinos congelados con diferentes diluyentes. Rev. Arg. Prod. Anim. 27 (1): 275-276.

