

Efecto de dos dilutores comerciales en la calidad de semen congelado de *Bos taurus*

Effect of two comercial diluter in the quality of frozen semen from bos taurus

César Maravi Carmen¹, Ilse Cayo Colca²

RESUMEN

La investigación se realizó con el objetivo de evaluar el efecto de dos dilutores comerciales en la calidad de semen congelado de *Bos taurus*. El trabajo se condujo en la Estación Experimental de Chachapoyas y en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza. Los bovinos colectados fueron de la raza Simmental, Aberdeen Angus, Jersey y Brangus. El semen colectado se diluyó con Andromed® y Triladyl® por separado; de acuerdo a las especificaciones del fabricante. El semen se colectó cada 15 días durante 5 meses por el método de la vagina artificial; y se procesó y almacenó siguiendo el protocolo del Banco de Semen de la UNTRM. La evaluación de la calidad espermática se realizó mediante el sistema CASA. Los resultados se sometieron a un ANVA y DBCA. La diferencia entre tratamientos se determinó mediante la prueba Tukey ($p < 0.05$). Se encontró que existe variabilidad de las características seminales entre razas, siendo la raza Angus superior a los de la raza Simmental, Jersey y Brangus. Finalmente, se observó que el dilutor no afecta la concentración espermática final ni la calidad de espermatozoides en semen fresco y congelado.

Palabras clave: Dilutor, microscópicas, espermatozoide

ABSTRACT

In cattle production systems fertility is the most important factor from the economic point of view, the reproductive potential of the male is of unquestionable importance. The present study was carried out in the experimental stations and in the laboratory of reproductive biotechnology of the National University Toribio Rodríguez de Mendoza; Using Andromed and triladyl according to the manufacturer's specifications. The collection of semen was performed every 15 days for 5 months by the artificial vagina method, in the laboratory the packaging, refrigeration and freezing of the straws were made, for its subsequent storage and post-freezing evaluation by CASA system. The data analysis was performed by analysis of variance and the tukey test ($p < 0.05$). The results indicated that there was no significant difference to the dilutor in sperm concentration, however, there were differences in the amount of straws produced and projected. The Angus breed are capable of producing from 200 to 350 straws, being superior to Simmental, Jersey and Brangus. Differences were found regarding the characteristics of fresh semen with respect to the breed. It is important to take into account the production system of the stallion so that it contributes semen with good characteristics and is conserved with any type of diluters that were used in the present study.

Keywords: Dilutor, microscopic, sperm

¹Investigador del Instituto de Investigación en Ganadería y Biotecnología y docente de la Facultad de Ingeniería Zootecnista Agronegocios y Biotecnología de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza. Correo electrónico: cesar.maravi@untrm.edu.pe

²Profesor Asociado de la Facultad de Ingeniería Zootecnista Agronegocios y Biotecnología de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza. Correo electrónico: icayo.fizab@untrm.edu.pe

I. INTRODUCCIÓN

La criopreservación de semen bovino es una rama de la biotecnología reproductiva que busca promover la conservación del germoplasma masculino por tiempo indeterminado. Esta biotecnología; cuando se asocia a la inseminación artificial, representa un mecanismo eficiente para la conservación y difusión de material genético de excelente calidad (Castelo *et al.*, 2008).

La eficiencia productiva de la ganadería se fundamenta en el progreso genético de la especie; aunado a ello, el uso de las biotecnologías la acelera. Debido a ello, la selección de un potencial reproductor, así como su uso eficiente influye en el logro de los objetivos de cualquier sistema de explotación ganadera (Morillo *et al.*, 2012).

En estos sistemas de explotación ganadera, la fertilidad es otro de los factores importantes desde el punto de vista económico. Si la fertilidad está por debajo de los índices recomendables, la explotación ganadera se ve afectada, y entre los factores que afectan los índices está la producción de pajillas de semen (Cisneros, 2011).

La producción de pajillas de semen influye sobre la capacidad fecundante del espermatozoide la cual está relacionada con la concentración de espermatozoide y la motilidad de las mismas. Esta característica es debida a que los espermatozoides son células frágiles y de vida corta. Previos a ser expelidos, requieren un proceso de maduración para adquirir la capacidad de fecundar y que se lleva a cabo en el epidídimo. Los espermatozoides no sobreviven tiempos mayores a las 72 horas fuera del tracto reproductivo del macho (Cuaran *et al.*, 2014).

Actualmente la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (UNTRM) viene realizando el proceso de colecta, producción y criopreservación de semen de reproductores importados de la República de Colombia. Sin embargo, existe la necesidad de probar dilutores comerciales durante el proceso de congelación para lograr la uniformidad en calidad del semen post descongelamiento. Por tal motivo, este estudio evaluó el efecto de dos dilutores comerciales en la calidad de semen congelado de *Bos Taurus* de las razas Simmental, Aberdeen Angus, Jersey y Brangus.

II. MATERIAL Y MÉTODO

De los animales

El trabajo de investigación se realizó con reproductores machos de las razas Simmental, Aberdeen Angus, Jersey y Brangus, sometidos a las mismas condiciones de manejo y alimentación.

Período de estudio

Se hicieron 10 colectas durante los meses comprendidos entre abril a agosto del 2015. Las muestras de semen se colectaron cada 15 días.

Lugar de estudio

Las colectas de semen se realizaron en la estación experimental Pomacochas, la evaluación de los espermatozoides se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la UNTRM.

De los dilutores

Se evaluó el efecto de dos dilutores comerciales, cuyas especificaciones se detallan a continuación:

AndroMed®; que contiene fosfolípidos, TRIS, ácido cítrico, azúcares, antioxidantes, tampones, glicerina, agua de altísima pureza y antibióticos (Tilosina, Gentamicina, Espectinomicina, Lincomicina).

Triladyl®; que contiene TRIS, ácido cítrico, azúcar, tampones, glicerina, agua purísima y antibióticos (Tilosina, Gentamicina, Espectinomicina, Lincomicina).

Colecta de semen

La colecta de semen se realizó cada 15 días durante los cinco meses de ejecución del trabajo usando el protocolo de colecta de la UNTRM. En breve una descripción; antes de la colecta seminal para la crio preservación, se realizó la limpieza del prepucio, externa e internamente. Se cortó el pelo del orificio prepucial, dejando 1cm de largo. Luego se lavó con jabón neutro y agua, teniendo el cuidado de secar bien con papel absorbente. El lavado interno del prepucio fue realizado con solución fisiológica, usando una pipeta adaptada a una jeringa (50ml). Seguidamente, se llevó al reproductor al brete de colecta y se le estimuló por tres veces con la ayuda de un toro "chantador". La colecta de semen se realizó por el método de la vagina artificial.

Procesamiento del semen

Se prepararon los dilutores en estudio; Andromed® y Triladyl®, de acuerdo a las especificaciones del fabricante. El semen colectado fue diluido con cada uno de los dilutores por separado en una proporción de 1:5. Las muestras diluidas se colocaron en una caja de tecnopor y se disminuyó la temperatura del ambiente a 0.5 °C por minuto hasta llegar a 5 °C. En el laboratorio se realizó la evaluación pre congelación mediante el sistema Computer Assisted Semen Analysis (CASA). Luego se envasó, refrigeró y seguidamente la congelación de las pajuelas usando los protocolos del Laboratorio de Semen de la UNTRM, para su posterior almacenamiento y evaluación post congelación mediante el sistema CASA.

Análisis de datos

Para la determinación del efecto de los dilutores y la raza sobre la viabilidad espermática, se realizó un

análisis de varianza con nivel de confianza del 95%, utilizando un diseño en bloques completamente al azar. La diferencia entre tratamientos se determinó por la prueba Tukey ($p < 0.05$). Para el análisis estadístico se utilizó el programa Statistix ver 8.

III. RESULTADOS

Características del semen en fresco

Se observó similar número de saltos por raza de toro

Tabla 1. Características de semen en fresco de cuatro razas de bovinos

Características	Simmental	Jersey	Brangus	Angus
Salto	1.62 ^a	1.50 ^a	2.00 ^a	1.42 ^a
Volumen de semen colectado	5.88 ^b	6.00 ^b	6.17 ^b	8.27 ^a
Volumen de semen diluido 1:1	60.69 ^b	50.50 ^{bc}	45.70 ^c	76.17 ^a
Nº espermatozoides (millones/mL)	242.75 ^b	202.00 ^{bc}	182.80 ^c	304.76 ^a
Cantidad de pajillas proyectadas	121.38 ^b	101.00 ^{bc}	91.40 ^c	152.33 ^a
Volumen total de semen y dilutor	11.75 ^c	12.00 ^b	12.35 ^b	16.54 ^a
Volumen final de dilutor	109.63 ^b	89.00 ^{bc}	79.05 ^c	135.79 ^a
Cantidad de pajillas producidas	217.19 ^b	180.00 ^{bc}	163.00 ^c	279.17 ^a

a,b,c: letras diferentes en la misma columna muestran diferencia significativa ($p < 0,05$)

Características del semen pos descongelamiento

Luego de descongelar las pajillas de semen, no se encontró diferencias significativas ($p > 0.05$) cuando se clasificó a los espermatozoides en progresivos rápidos, progresivos lentos, no progresivos, inmóviles con respecto a raza ni dilutor (Tabla 2).

Tabla 2. Concentración en el eyaculado total, de acuerdo a la clasificación, con interacción de dilutor (1 Dilutor AndroMed®, 2 dilutor Triladyl®) x raza

Dilutor	Raza	Tipo a ¹ cc	Tipo b ² cc	Tipo c ³ cc	Tipo d ⁴ cc
A	Simmental	1861.7 ^a	3386.0 ^a	2740.6 ^a	477.2 ^a
A	Jersey	2126.5 ^a	3529.0 ^a	2294.4 ^a	454.9 ^a
A	Brangus	1541.0 ^a	2392.0 ^a	3243.2 ^a	1013.5 ^a
A	Angus	1899.8 ^a	3130.0 ^a	3245.0 ^a	832.6 ^a
B	Simmental	4108.0 ^a	10584.0 ^a	3099.0 ^a	708.5 ^a
B	Jersey	2735.0 ^a	7008.0 ^a	2774.6 ^a	143.3 ^a
B	Brangus	1735.4 ^a	3675.0 ^a	3070.8 ^a	379.4 ^a
B	Angus	1820.5 ^a	6219.0 ^a	3784.8 ^a	540.6 ^a

¹Progresivos rápidos, ²progresivos lentos, ³no progresivos, ⁴inmóviles

a,b: letras iguales en la misma columna no muestran diferencia significativa

No se encontraron diferencias significativas entre espermatozoides tipo a, tipo b, tipo c pos descongelamiento al usar los dilutores comerciales Triladyl® y AndroMed® (Tabla 3). Sin embargo, se observó superioridad en cantidad en la raza Simmental comparado a las otras razas (Tabla 4).

Tabla 3. Motilidad individual de espermatozoides post descongelamiento

Clasificación	AndroMed®	Triladyl®
Tipo a ¹ cc	1857.3 ^a	2599.7 ^a
Tipo b ² cc	3109.1 ^a	6871.3 ^a
Tipo c ³ cc	2880.8 ^a	3182.3 ^a
Tipo d ⁴ cc	694.5 ^a	442.9 ^a

¹Progresivos rápidos, ²progresivos lentos, ³no progresivos, ⁴inmóviles

A: AndroMed®; B: Triladyl®

Tabla 4. Concentración espermática por raza y dilutor post descongelamiento

Dilutor	Raza	Tipo a ¹	Tipo b ²	Tipo c ³	Tipo d ⁴
A	Simmental	18.6 ^a	33.9 ^a	27.4 ^a	4.8 ^a
A	Jersey	21.3 ^a	35.3 ^a	23.0 ^a	4.6 ^a
A	Brangus	15.4 ^a	23.9 ^a	32.4 ^a	10.1 ^a
A	Angus	19.0 ^a	31.3 ^a	32.5 ^a	8.3 ^a
B	Simmental	41.1 ^a	105.9 ^a	31.0 ^a	7.1 ^a
B	Jersey	27.4 ^a	70.1 ^a	27.8 ^a	1.4 ^a
B	Brangus	17.3 ^a	36.8 ^a	31.0 ^a	3.8 ^a
B	Angus	18.2 ^a	62.2 ^a	37.9 ^a	5.4 ^a

¹Progresivos rápidos, ²progresivos lentos, ³no progresivos, ⁴inmóviles

A: AndroMed®; B: Triladyl®

Concentración en millones/mL

IV. DISCUSIÓN

Con respecto a las características del semen en fresco (Tabla 1), similares resultados reportaron en la raza Negra Andaluza, posiblemente debido al método de colecta (Sánchez García *et al.*, 1993; Vallecillo *et al.*, 2011). Por otro lado, este valor fue inferior a lo reportado por Aguirre *et al.* (2012); probablemente debido a la edad del semental, frecuencia de colectas y las condiciones ambientales (Rey y Aramburo, 1990). Por ende, en este experimento la raza Angus mostró superioridad con respecto a las otras características evaluadas en semen fresco. Estos resultados son inferiores en todas las razas evaluadas respecto a lo reportado por otros investigadores; probablemente debido a diversos factores como el tiempo que transcurre desde el reflejo Flehemen, salto, edad, raza, frecuencias de colecta, tipo de alimentación (Aguirre *et al.*, 2012; Pacheco *et al.*, 2007; Rey y Aramburo, 1990).

Es importante tener sementales que produzcan mayor número de pajillas para la eficiencia del hato, en las cuatro razas de toros evaluadas presentaron diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) en la cantidad de pajillas producidas, pajillas proyectadas, volumen total de semen y dilutor y volumen final de dilutor. Los toros de la raza Angus son capaces de producir desde 200 a 350 pajillas, siendo superiores a los Simmental, Jersey y Brangus. Esta cantidad puede variar debido a diversos factores al momento de la colecta del semen como piso resbaladizo, ruidos y distracciones, además, es recomendable que la colecta se haga en una monta falsa porque aumenta la calidad del semen con respecto al volumen, concentración espermática (Rangel, 2007; Morillo *et al.*, 2012).

En relación a las características del semen pos descongelamiento, los resultados encontrados en la tabla 2, fueron superiores a los hallados por Veloz (2017), quien reportó 1036.8, 816.2 y 572.4 cc para

Jersey, Holstein y Brown Swiss; respectivamente. También fue superior a los resultados de Moncayo (2016), quien reportó 699.3 cc en Holstein. Al respecto, Vera (2008) y Brogliatti y Bó, (2013) indican que la observación de la motilidad individual, total y la estimación del porcentaje de espermatozoides con diferentes tipos de movimientos progresivos están relacionados con la integridad de la membrana y la integridad morfológica de las células, lo que demuestra que el protocolo congelación y descongelamiento empleado en el Banco de Semen cumple con los estándares de calidad. Así mismo, Murphy *et al.* (2018a), indican que las características del semen pos descongelamiento varía por el rango de temperatura de almacenamiento, logrando encontrar diferencias de motilidad en semen almacenado a 15 °C respecto al semen que fue almacenado a 5°C.

Contrario a los resultados encontrados en la presente investigación (Tabla 3 y Tabla 4), otros autores reportan que la raza influye en la concentración espermática, señalando a la raza Angus inferior a la raza Simmental (Berry *et al.*, 2019), las razas puras superior a las mestizas (Kumar *et al.*, 2015). Estas diferencias halladas por otros autores comparada a esta investigación pueden ser debidas al método de colecta empleado (Mejía, 2017), a los dilutores usados (Cabrera *et al.*, 2009; Berg *et al.*, 2018; Gangwar *et al.*, 2018; Murphy *et al.*, 2018b).

V. CONCLUSIONES

Es importante tener sementales que produzcan mayor número de pajillas para la eficiencia del hato, en las cuatro razas de toros evaluadas presentaron diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) en la cantidad de pajillas producidas, asimismo en cantidad de pajillas proyectadas, volumen total de semen y dilutor y volumen final de dilutor. Los toros de la raza Angus son capaces de producir desde 200 a 350 pajillas, siendo superiores a los Simmental,

Jersey y Brangus.

Se encontró diferencias en cuanto a las características del semen fresco respecto a la raza del toro, pero una vez que se conserva usando dilutores como AndroMed® y Trilady® no difieren significativamente en las características del semen pos descongelamiento. Por lo que es importante tener en cuenta la crianza en general del semental para que aporte un semen fresco con buenas características y se conserve con cualquier tipo de estos dilutores que se usaron en el presente estudio

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguirre, L., Uchuari, M., Briceño P. 2012. *Evaluación fenotípica y seminal con fines de conservación del bovino "encerado" presente en la Región Ato andina del Ecuador*. AICA2:185-189.
- Berry, D. P., Eivers, B., Dunne, G., & McParland, S. (2019). *Genetics of bull semen characteristics in a multi-breed cattle population*. *Theriogenology*, 123, 202-208.
- Berg, H. F., Kommisrud, E., Bai, G., Gaustad, E. R., Klinkenberg, G., Standerholen, F. B., & Alm-Kristiansen, A. H. (2018). *Comparison of sperm adenosine triphosphate content, motility and fertility of immobilized and conventionally cryopreserved Norwegian Red bull semen*. *Theriogenology*, 121, 181-187.
- Brogliatti, G., & Bó, G. (2013). *Introducción a la Calidad Seminal*. Aulas virtuales. <http://www.fca.proed.unc.edu.ar/mod/book/tool/print/index.php?id=5335&chapterid=893>
- Castelo TS, TR Frota, AR Silva. 2008. *Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos*. *Acta Vet Bras* 2, 67-75
- Cabrera, V., Yoong, K., & Gamarra, L. (2009). *Evaluación de la fertilidad in vitro del semen de toros jóvenes nacionales en ovocitos provenientes de ovarios de animales beneficiados*. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 20(1), 28-32.
- Cisneros Prado, J. L. 2011. *Desarrollo de un método para la determinación rápida de la concentración espermática en eyaculados de bovino, ovino y cerdo* (Doctoral dissertation)
- Cuaran Calva, E. V., Coral, B., & Levi, J. 2014. *Evaluación en la criopreservación de semen colectado directamente de epididimos en bovinos por dos métodos (laundry-epididymis, slicing-testicles) en el laboratorio de biotecnología en reproducción de la carrera de medicina veterinaria* (Bachelor's thesis, LATACUNGA/UTC/2014).
- Gangwar, C., Saxena, A., Patel, A., Singh, S. P., Yadav, S., Kumar, R., & Singh, V. (2018). *Effect of reduced glutathione supplementation on cryopreservation induced sperm cryoinjuries in Murrah bull semen*. *Animal reproduction science*, 192, 171-178.
- Kumar, U., Gawande, A., Sahatpure, S., Patil, M., K., L. C., Bonde, S. W., Borkar, P. L., Poharkar, A., Ramteke, B. (2015). *Assessment of semen quality in pure and crossbred Jersey bulls*. *Veterinary World*. 8(10), 1266–1272.
- Mejía, E. J. (2017). *Evaluación pre y post congelación del semen obtenido con vagina artificial y electroeyaculador en el ganado criollo* (Tesis de maestría, Universidad de Cuenca, Ecuador), 54 p.
- Morillo, M., Salazar, S., & Castillo, E. 2012. *Evaluación del potencial reproductivo del macho bovino*. *Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas*, 30-44.
- Moncayo Picerno, S. A. 2016. *Evaluación de la calidad seminal de reproductores bovinos antes y después del proceso de crioprese* (Tesis de bachiller, Universidad Politecnica Salesiana sede Quito), 81 p.
- Murphy, E. M., O'Meara, C., Eivers, B., Lonergan, P., & Fair, S. (2018a). *Comparison of plant-and egg yolk-based semen diluents on in vitro sperm kinematics and in vivo fertility of frozen-thawed bull semen*. *Animal reproduction science*, 191, 70-75.
- Murphy, E. M., Eivers, B., O'Meara, C. M., Lonergan, P., & Fair, S. (2018b). *Effect of storage temperature, nitrogen gassing and sperm concentration on the in vitro semen quality and in vivo fertility of liquid bull semen stored in INRA96*. *Theriogenology*, 108, 223-228.

- Pacheco A; C.R. Quirino; J.F. Silva; I.C. Cunha y C.H. Bucher. 2007. *Efeito da idade e de fazenda sobre as 219 características seminais e perimetro escrotal em touros da raza Guzera criados no norte e noroeste do 220 Rio de Janeiro, Brasil. Archivos Latinoamericanos de Producción Animal. Vol. 15. Num.4. 165-173 p.*
- Rangel P.L.E. 2007. *Evaluación de la salud de sementales bovinos. Reproducción bovina, FMVZ-UNAM.*
- Rey, M. R., & Aramburo, L. E. T. (1990). *Evaluación de algunas características del eyaculado en toros Holstein. Revista Facultad Nacional de Agronomía, 43(1 y 2), 3-27.*
- Sánchez García, L., M. Fernández Rodríguez y M. Vallejo Vicente. 1993. *Formación de un banco de germoplasma (semen y embriones congelados) en el programa de preservación de las razas bovinas morenas gallegas., Archivos de Zootecnia. Vol. 41 Núm. 154 (extra).*
- Vallecillo A; Miro M. y Camacho E. 2011. *Caracterización seminal: una herramienta útil en la conservación de la raza Negra Andaluza. Memorias XI Simposio Iberoamericano sobre conservación y utilización de recursos zoogenéticos. Joao Pessoa, Brasil. 440-442 p.*
- Veloz, D. M. 2017. *Evaluación de la calidad espermática de reproductores bovinos mediante el uso de sistemas de evaluación seminal convencional y sistema CASA (análisis seminal asistido por computadora) y su respuesta con la fertilidad por inseminación artificial (Tesis de maestro, Universidad de Cuenca). 75 p.*
- Vera Muñoz, O. 2008. *Evaluación seminal comparativa pre y postcongelación en machos bovinos. Reproducción bovina. 251-262*