

CONGELACIÓN Y CONSERVACIÓN DEL SEMEN EN LA ESPECIE CAPRINA MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE ULTRACONGELADORES DE -152 °C: TASA DE FERTILIDAD TRAS INSEMINACIÓN CON SEMEN CONGELADO POR DIFERENTES PROTOCOLOS DE CRIOCONSERVACIÓN

El análisis de los distintos parámetros evaluados para determinar la calidad seminal de siete machos cabríos de raza Majorera, demuestra que la congelación del semen mediante ultracongeladores de -152 °C es igual de efectiva que la congelación mediante nitrógeno líquido, técnica que se ha venido usando desde hace ya muchos años. Se observa cómo la calidad seminal *in vitro* tras la descongelación no varía en los diferentes períodos de congelación testados (1, 30 y 180 días), así mismo, el porcentaje de gestaciones obtenido a partir de la inseminación artificial en 40 hembras, es similar en ambos protocolos de congelación para muestras congeladas durante un período de un mes.

Tara Niño González

The analysis of the different evaluated parameters to determine the seminal quality of 7 Canary bucks shows that the freezing of semen through ultrafreezers at -152°C is as effective as the liquid nitrogen freezing technique, which has been used for many years now. It is noted how the seminal quality in vitro after defrosting does not vary across the different periods of freezing tested (1, 30 and 180 days). Likewise, the percentage of pregnancy derived from the artificial insemination in 40 does is similar in both protocols for the frozen samples during one-month period.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, las técnicas reproductivas en el ganado caprino han experimentado un notable desarrollo, lo que ha conducido a un aumento en el rendimiento productivo. Entre otras, la inseminación artificial (Leboeuf y cols., 2000) y la transferencia de embriones, hacen posible la mejora genética de la raza, así como su difusión en los mercados nacional e internacional.

Una de las líneas que se han venido investigando en los últimos años, son las distintas técnicas de inseminación artificial y de criopreservación de semen (Dorado y cols., 2007). Resulta ampliamente aceptado que la fertilidad obtenida mediante inseminación artificial con semen congelado es inferior a la obtenida con semen fresco. Para evaluar esta fertilidad se

requiere de largos períodos de tiempo y de gran número de animales incluidos en la investigación, ya que se trata de comparar el número de hembras gestantes mediante las distintas técnicas.

Numerosos estudios *in vitro*, determinan la calidad seminal post-congelación mediante la evaluación de distintos parámetros como son la motilidad, vitalidad, la integridad de la membrana plasmática, el estado del acrosoma y las morfoanomalías (Leboeuf y cols., 2000).

La técnica utilizada por excelencia para la congelación del semen durante largos períodos de tiempo es el nitrógeno líquido (NL). Estudios preliminares determinan que el uso de ultracongeladores de -152 °C (UF), se muestra como un método completamente válido para la crioconservación de semen caprino, obteniendo

resultados *in vitro* similares a los obtenidos en muestras congeladas en nitrógeno líquido (Medrano y cols., 2002). No obstante, en este estudio, solo se valoraron muestras congeladas durante 3 meses.

Por lo tanto, el objetivo de este estudio es comparar los distintos parámetros que determinan la calidad seminal en caprino tras su congelación tanto en nitrógeno líquido como en ultracongeladores de $-152\text{ }^{\circ}\text{C}$ en períodos de tiempo más prolongados (hasta un año). Así mismo, se pretende demostrar su eficacia *in vivo* mediante inseminación artificial.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Animales

Para este estudio se utilizaron 7 machos cabríos (edad: entre 18 meses y 5 años) y 40 cabras de la raza Majorera con edades comprendidas entre los 12 meses y los 5 años de edad. Los animales se encontraban alojados en las instalaciones de la granja de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria con una superficie de casi 9 m^2 por cabeza, con zonas de sombra y zonas de recreo al sol. La alimentación era a base de concentrado (millo, remolacha, cebada, avena y soja), así como alfalfa *ad libitum* elaborando la ración según lo descrito por Castro y cols. (2006). Estos animales eran sometidos a vacunaciones anuales, así como a desparasitaciones semestrales.

Los machos de la explotación se encontraban separados de las hembras en un corral aparte, existiendo entre ellos interacción visual, auditiva y olfativa.

2. Recogida, contrastación y congelación seminal

2.1. Recogida seminal

La recogida de las muestras seminales se realizó mediante vagina

artificial. Con una hembra amarrada a modo de montura natural, en el momento en el que el macho salta sobre ella, se introduce el pene en la vagina artificial, recogiendo de esta manera el semen directamente en un tubo de cristal graduado. Una vez extraída la muestra, con la mayor rapidez posible, se introduce la misma en un baño María a 37° centígrados.

2.2. Contrastación seminal

La contrastación seminal tenía por objeto determinar la calidad seminal y poder calcular cuánto ha de diluirse el semen para obtener dosis de 300 millones de espermatozoides por mililitro. Para esto, los parámetros valorados fueron el volumen, concentración, motilidad y porcentajes de vitalidad y morfoanomalías.

El volumen se determinó directamente en el tubo colector graduado. La concentración se calculó mediante el uso de un hemocitómetro, a una dilución 1:400 en solución salina formulada al 0,3%. Finalmente, la motilidad individual progresiva se determinó de forma subjetiva utilizando un microscopio de contraste de fase que poseía una placa calentadora a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y entre $\times 100$ y $\times 200$ aumentos; y también mediante un sistema computerizado de análisis espermático (sistema CASA).

Para determinar el porcentaje de vitalidad se valoró una extensión con eosina-nigrosina en un microscopio de contraste de fases a $\times 100$ aumentos; valorándose un mínimo de 200 células en cada preparación. Se contabilizaron los espermatozoides vivos (que poseían la membrana intacta y por lo tanto, aparecen no teñidos) y los muertos (membrana dañada y teñidos). La determinación del porcentaje de acrosomías y morfoanomalías en función de su localización (cabeza, acrosoma, pieza intermedia o cola del espermatozoide) se llevó a cabo mediante la tinción Spermac® (Minitüb)

síntomas de celo, repitiéndolas cada 12 horas mientras el animal siguiera mostrando síntomas de celo.

Las inseminaciones se realizaban de forma transvaginal mediante observación directa del fondo de la vagina. Una vez localizada la entrada del cuello del útero, mediante un catéter de inseminación, se intentó introducir el semen lo más profundamente posible. La dosis administrada en cada inseminación consistió en dos pajuelas de 300×10^6 espermatozoides cada una. Por otro lado, al azar, se fueron valorando algunas dosis seminales mediante microscopio para confirmar que el semen tenía una motilidad mínima de un 35% de los espermatozoides.

El diagnóstico de gestación se realizó mediante ecografía transabdominal usando un ecógrafo Aloka SSD-550 provisto con un transductor lineal de 3,5 a 5 MHz. El primer diagnóstico se realizó el día 35 post-inseminación, para luego reconfirmar la vitalidad fe-

tal a los días 60 y 90 post-inseminación.

5. Análisis estadístico

Los resultados se presentan como medias \pm DES. Los datos de motilidad, vitalidad y morfoanomalías fueron evaluados utilizando un análisis de varianza. El análisis estadístico se realizó mediante el uso de SPSS 10.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), de acuerdo con un modelo lineal que considera el efecto del individuo (7 ejemplares), dos protocolos de congelación (NL y UF), el tiempo (1, 30 y 180 días) y la interacción entre ellos. Los valores fueron considerados significativos cuando $P < 0.05$.

RESULTADOS

La tabla 1 muestra la calidad seminal del semen fresco de los machos donantes. Al valorarse el volumen y la concentración seminal entre machos, se observó que a excepción del macho 4, todos los animales mos-

MMacho	Eyaculados por macho	Volumen (mL)	Concentración ($\times 10^9$ cells)	Motilidad seminal (%)	Vitalidad seminal (%)	Morfoanomalías (%)
1	18	1.7 \pm 0.1	7.7 ^a \pm 0.9	76.9 ^b \pm 3.6	79.5 ^{ab} \pm 2.2	23.6 ^b \pm 5.6
2	10	1.4 \pm 0.2	5.1 ^a \pm 1.0	83.0 ^{ab} \pm 3.1	85.8 ^a \pm 3.3	18.3 ^{ab} \pm 14.5
3	18	1.2 \pm 0.1	5.5 ^a \pm 0.5	86.3 ^a \pm 1.9	82.0 ^{ab} \pm 2.4	12.7 ^a \pm 3.1
4	6	3.2 \pm 0.4	11.2 ^a \pm 4.3	80.8 ^{ab} \pm 5.4	61.5 ^b \pm 11.9	19.7 ^{ab} \pm 7.9
5	6	1.4 \pm 0.1	7.8 ^a \pm 0.9	78.3 ^{ab} \pm 2.7	76.8 ^{ab} \pm 4.4	19.3 ^{ab} \pm 4.1
6	25	1.2 \pm 0.1	6.1 ^a \pm 0.9	79.8 ^{ab} \pm 2.7	82.5 ^a \pm 2.4	15.7 ^{ab} \pm 2.7
7	19	1.2 \pm 0.1	4.9 ^b \pm 0.5	80.8 ^{ab} \pm 2.6	78.5 ^a \pm 3.3	13.7 ^{ab} \pm 4.0

Tabla 1. Media \pm DES del volumen, concentración, y porcentaje de motilidad, vitalidad y morfoanomalías en los eyaculados obtenidos de los machos donantes

^{ab}: Letras diferentes en una misma columna indican que se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$)

	Día 1 post-congelación		Día 30 post-congelación		Día 180 post-congelación	
	NL	UF	NL	UF	NL	UF
Macho 1	42.2 ^a \pm 3.4	34.2 ^{ab} \pm 3.7	40.2 ^a \pm 3.4	43.0 ^a \pm 3.4	32.9 ^a \pm 6.9	30.1 ^{ab} \pm 4.5
Macho 2	35.7 ^a \pm 6.8	37.1 ^{ab} \pm 5.6	5.2 ^b \pm 8.0	44.8 ^a \pm 7.8	28.3 ^{ab} \pm 7.4	38.3 ^a \pm 4.1
Macho 3	36.1 ^a \pm 7.7	41.6 ^a \pm 5.2	44.7 ^a \pm 7.6	40.7 ^a \pm 4.8	22.7 ^b \pm 14.9	24.5 ^{ab} \pm 9.4
Macho 4	33.3 ^a \pm 1.3	28.6 ^b \pm 4.2	6.3 ^b \pm 2.4	31.5 ^{ab} \pm 3.0	4.8 ^c \pm 2.0	35.2 ^a \pm 6.1
Macho 5	10.2 ^b \pm 3.8	28.6 ^b \pm 3.8	13.5 ^b \pm 10.5	25.0 ^b \pm 3.0		25.3 ^{ab} \pm 5.2
Macho 6	36.8 ^a \pm 4.7	30.3 ^{ab} \pm 3.0	38.8 ^a \pm 5.5	36.3 ^a \pm 3.0	43.3 ^a \pm 10.8	47.3 ^a \pm 3.6
Macho 7	36.5 ^a \pm 5.0	34.6 ^{ab} \pm 4.9	45.6 ^a \pm 4.4	38.8 ^a \pm 5.6	30	41.7 ^a \pm 14.7

Tabla 2. Motilidad espermática post-descongelación

^{abc}: Letras diferentes en una misma columna indican que se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$)

traron unos niveles medios muy similares entre sí; no obstante, el macho 4 presentaba un concentración espermática significativamente mayor con respecto a los machos 2 y 7 ($p < 0.05$). Los porcentajes de motilidad media se situaron entre un 76% y un 86%; mientras que el rango de vitalidad espermática fue mayor, entre un 61% y un 86%, encontrándose diferencias significativas individuales ($p < 0.05$). El porcentaje de morfoanomalías fue inferior al 25% en todos los machos, sólo el macho 1 presentaba un porcentaje significativamente superior ($p < 0.05$) que el macho 3.

Los porcentajes medios de motilidad espermática post-congelación (media \pm DES) obtenidos durante todo el periodo experimental se muestran en la tabla 2. Con el protocolo de congelación utilizando NL, la motilidad el día 1 post-congelación se situó alrededor del 30-45% a excepción del macho 5 (10%), observán-

dose diferencias significativas con respecto a otros ejemplares. Con respecto al día 30 post-congelación se encontraron grandes diferencias individuales, siendo el rango entre el 5% (macho 2) y el 45% (macho 7). Por su parte, los datos pertenecientes a los 6 meses tras la congelación, el rango se encontró entre 5% (macho 4) y un 43% (macho 6). Con la técnica de congelación en UF, se observó un porcentaje de motilidad similar (rango: 25-47%) entre machos, sin embargo, cuando se comparan los ejemplares entre sí, se detectan diferencias significativas ($p < 0,01$). Finalmente, sólo se apreciaron diferencias entre los dos protocolos de congelación dentro del mismo individuo en el caso del macho 2 (día 30 de crioconservación) y del macho 4 (días 30 y 180 de crioconservación).

La tabla 3 muestra los valores (medias \pm DES) de vitalidad observados en cada ejemplar durante el periodo experimental. Con el NL, los

	Día 1 post-congelación		Día 30 post-congelación		Día 180 post-congelación	
	NL	UF	NL	UF	NL	UF
Macho 1	40.6 ^a \pm 3.5	33.3 ^a \pm 4.0	42.8 ^a \pm 5.5	43.9 ^a \pm 4.0	41.3 \pm 4.3	28.7 \pm 6.5
Macho 2	33.5 ^a \pm 10.9	34.5 ^a \pm 9.6	56.0 ^a \pm 9.8	56.8 ^a \pm 11.4	38.5	45.0
Macho 3	46.1 ^a \pm 6.9	41.8 ^a \pm 9.8	38.7 ^a \pm 3.3	47.3 ^a \pm 8.7	41.0	35.8 \pm 13.7
Macho 4	17.0 ^b \pm 6.9	42.8 ^a \pm 11.7	10.4 ^b \pm 2.6	25.8 ^b \pm 6.9	10.7 \pm 4.1	37.3 \pm 9.4
Macho 5	28.7 ^{ab} \pm 3.8	23.2 ^b \pm 11.6	12.3 ^b \pm 8.9	25.2 ^b \pm 2.1		37.8
Macho 6	32.7 ^a \pm 5.1	29.4 ^b \pm 2.7	36.7 ^a \pm 6.6	37.8 ^a \pm 3.9	52.0	48.7 \pm 4.8
Macho 7	37.9 ^a \pm 5.6	32.9 ^{ab} \pm 4.8	41.9 ^a \pm 6.8	51.1 ^a \pm 7.0	40.0	62.5

Tabla 3. Vitalidad espermática post-descongelación

abc: Letras diferentes en una misma columna indican que se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$)

	Día 1 post-congelación		Día 30 post-congelación		Día 180 post-congelación	
	NL	UF	NL	UF	NL	UF
Macho 1	42.0 ^a \pm 5.6	38.2 ^a \pm 4.7	35.5 ^a \pm 5.2	34.4 ^a \pm 4.5	35.3 \pm 5.4	30.4 \pm 8.9
Macho 2	33.0 ^{ab} \pm 8.1	42.5 ^a \pm 13.8	19.0 ^b \pm 6.5	25.8 ^b \pm 6.9	29.5	23
Macho 3	34.4 ^{ab} \pm 4.3	34.8 ^a \pm 5.4	25.5 ^b \pm 6.7	28.5 ^{ab} \pm 4.3	22.0	17.0 \pm 6.7
Macho 4	26.5 ^b	21.4 ^b \pm 1.9	34.4 ^a \pm 5.3	37.3 ^a \pm 4.4	20.3 \pm 13.1	17.0 \pm 3.3
Macho 5	30.0 ^{ab} \pm 17.3	34.2 ^a \pm 6.9	37.7 ^{ab} \pm 16.5	35.0 ^a \pm 1.9		22.2 \pm 2.0
Macho 6	34.5 ^{ab} \pm 3.0	29.9 ^{ab} \pm 3.7	29.4 ^a \pm 4.2	27.1 ^b \pm 3.9	21	28.6 \pm 5.5
Macho 7	29.5 ^b \pm 3.8	21.0 ^b \pm 2.7	23.2 ^b \pm 2.7	22.8 ^b \pm 4.2	15	17

Tabla 4. Morfoanomalías espermática post-descongelación

abc: Letras diferentes en una misma columna indican que se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$)

valores medios individuales fueron inferiores al 52% en todos los machos, observándose grandes diferencias individuales. Del mismo modo, con el UF, la media de vitalidad variaba entre 23.2 y 56.8 %, también con evidentes diferencias entre los machos (ejemplares 5 y 6 con valores medios más bajos). Cuando se compararon ambos métodos de congelación, se volvieron a observar diferencias significativas en el macho 4, a lo largo de todo el periodo experimental, con valores siempre por debajo del 20% en nitrógeno líquido y con valores siempre superiores al 25% en las muestras crioconservadas con UF.

Finalmente, en la tabla 4 se detallan los porcentajes de morfoanomalías. Entre ambas técnicas (NL y UF) no se observaron diferencias significativas siendo los valores medios similares. Cuando se observan los datos, se puede observar como los índices de morfoanomalías en los días 30 y 180 de crioconservación tuvieron unos porcentajes ligeramente inferiores a los observados el día 1 post-congelación.

el grupo de cabras inseminadas con semen congelado en ultracongeladores, se pudo observar un caso en el que hubo un aborto prematuro, reduciendo a un 20% la fecundidad final.

Con respecto a la prolificidad, de los animales que han parido hasta el momento actual se ha observado una media de 2 cabritos por hembra y parto en ambos grupos.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En este estudio se pretendía comparar la calidad seminal tanto *in vitro* como *in vivo* tras su congelación y crioconservación mediante dos métodos distintos (nitrógeno líquido frente a ultracongelador de -152 °C). Los parámetros observados para evaluar la calidad seminal fueron, por un lado, la inseminación artificial e índice de gestación (*in vivo*) y por el otro, la motilidad y vitalidad seminal y el porcentaje de morfoanomalías como marcadores de la calidad *in vitro*. Todos estos parámetros *in vitro* fueron evaluados a lo largo del tiempo en tres períodos diferentes de crioconservación: 1, 30 y 180 días.

Con respecto a los datos de motilidad, únicamente se observaron diferencias significativas comparando los dos métodos de congelación en el macho 2 (día 30 de crioconservación) y en el macho 4 (días 30 y 180 de crioconservación) Sin embargo, si es de destacar, que se pudieron observar grandes diferencias entre los distintos individuos.

Los valores de vitalidad obtenidos para ambos métodos de crioconservación revelan que sólo en el caso del macho número 4, se pueden observar diferencias significativas, siendo en este caso las muestras crioconservadas mediante el uso de ultracongeladores, las que mostraban mejor calidad.

Por último, con respecto a los datos de morfoanomalías, no se observaron diferencias significativas entre

Método de congelación	n	DG 35 positivos	DG 90 positivos	Prolificidad
NL	20	25% (5/20)	25% (5/20)	2.0
UF	20	25% (5/20)	20% (4/20)	2.0

Tabla 5. Tasa de fertilidad y prolificidad tras inseminación con semen congelado

Por último, comparando los datos de los ejemplares, se pudieron observar nuevamente grandes diferencias individuales, observándose porcentajes de morfoanomalías sensiblemente mayores en el macho 1 frente al macho 7.

Con respecto a los resultados de inseminación artificial, hasta la fecha, sólo se poseen datos de la calidad seminal *in vivo* de muestras congeladas durante 1 mes. De esta forma, en la tabla número 5, se observa como el índice de fecundidad del semen congelado durante un mes es del 25%, tanto si ha sido congelado en nitrógeno líquido como si fue congelado en ultracongeladores. Sin embargo, en

la muestra, a la hora de precisar su utilización en otras localizaciones alejadas de nuestro laboratorio. Los resultados de esta experiencia preliminar parecen muy prometedores y futuras investigaciones deben centrarse en este sentido de cara a concretar todas las aplicaciones de este nuevo sistema de criopreservación.

BIBLIOGRAFÍA

Alamo D., Batista M., González F., Rodríguez N., Cruz G., Cabrera F., Gracia A. (2005). Cryopreservation of semen in the dog: use of ultra-freezers of -152°C as a viable alternative to liquid nitrogen. *Theriogenology*, 63: 72-82.

Castro N., Capote J., Martín D., Argüello A. (2006). The influence of dietary conjugated linoleic acid (CLA) on blood samples and calostrum immunoglobulin G concentration in female goats before and after partum. *J Anim Phys Anim Nutr*, 90:429-431.

Dorado J., Rodríguez I., Hidalgo M. (2007). Cryopreservation of goat spermatozoa: comparison of two freezing extenders based on post thaw sperm quality and fertility rates alter artificial insemination. *Theriogenology*, 68 (2): 168-177.

Leboeuf B., Restall B., Salomon S. (2000) Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci*, 62: 113-141.

Lopez-Sebastian A., González-Bulnes A., Carrizosa JA., Urrutia B., Diaz-Delfa C., Santiago-Moreno J., Gomez-Brunet A. (2007). New estrus synchronization and artificial insemination protocol for goats based on male exposure, progesterone and cloprostenol during the non-breeding season. *Theriogenology* 68 (8): 1081-1087.

Mara L., Dattena M., Pilichi S., Sanna D., Branca A., Cappai P. (2007). Effect of different diluents on goat semen fertility. *Anim. Reprod. Sci.* 102 (1-2): 152-157.

Medrano A., Cabrera F., González F., Batista M., Gracia A. (2002). Is sperm cryopreservation at -150 degree C a feasible alternative? *Cryoletters*, 23: 167-172.

Paulenz H., Soderquist L., Adnoy T., Soltun K., Saether PA., Fjellsoy KR., Berg KA. (2005). Effect of cervical and vaginal insemination with liquid semen stored at room temperature on fertility of goats. *Anim Reprod Sci*, 86 (1): 109-117.

Karatzas G., Karagiannidis A., Varsakeli S., Brikas P. (1997) Fertility of fresh and frozen-thawed goat semen during the nonbreeding season. *Theriogenology*, 48: 1049-1059.

BIOGRAFÍA

TARA NIÑO GONZÁLEZ

Tara Niño González es licenciada (2005) por la Facultad de Veterinaria de Las Palmas. En 2006, obtiene una beca de investigación del Excmo. Cabildo Insular de Gran Canaria, desarrollando su actividad investigadora en la Unidad de Reproducción Animal, especializándose en tecnología reproductiva en la especie caprina. Ha escrito varios artículos científicos nacionales e internacionales, participado en diferentes congresos internacionales y ha realizado distintas estancias de investigación, destacando una estancia en el Institut National de Recherche Agronomique de Tours (Francia) bajo la dirección del Dr. Lebouef, el mejor especialista europeo en criopreservación e inseminación artificial en pequeños rumiantes. Asimismo, ha defendido una tesina de licenciatura (diciembre 2007) obtiene la máxima calificación académica.

taratmb@hotmail.com

Patrocinador de esta investigación:

COMPAÑÍA CANARIA DE PIENSOS, S.A.