

EVALUACIÓN DE UN DILUTOR ELABORADO CON JUGO DE *Opuntia* sp., EN LA CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN DE BOVINO

EVALUATION OF A DILUTOR ELABORATED WITH *Opuntia* sp. JUICE IN THE CRYOPRESERVATION OF BOVINE SEMEN

Vergara-Soto, S.¹; Germán-Alarcón, C.G.¹; Sosa-Pérez, G.²; Cortez-Romero, C.³; Gallegos-Sánchez, J.²; Ruiz-Vera, V.M.³; Cadena-Villegas, S.^{1*}

¹Departamento de Zootecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Carretera México-Texcoco. Texcoco Estado de México. Km 38.5. C.P. 56230. ²Colegio de Postgraduados, Programa de Recursos Genéticos y Productividad-Ganadería, Campus Montecillo, carretera México-Texcoco Km. 36.5, Montecillo, Texcoco, 56230, Estado de México. ³Colegio de Postgraduados, Campus San Luis Potosí, Agustín de Iturbide No. 73, Salinas de Hidalgo, 78622, S.L.P. Tel. y Fax: + (496) 96 302 40.

*Autor de correspondencia: scadena@colpos.mx

RESUMEN

Se elaboró un dilutor con jugo de tuna (*Opuntia* sp.) para diluir y criopreservar semen de bovino, y para su evaluación se comparó con dos dilutores comerciales: Triladyl® y BoviPRO®. Se utilizaron tres toros adultos de raza Holstein, a los cuales se les recolectó semen con vagina artificial. Los eyaculados se mezclaron para formar un "pool", donde se evaluó movilidad masal, concentración espermática, morfología y porcentaje de espermatozoides vivos del semen fresco. Posteriormente, se dividió en tres fracciones, las cuales se diluyeron con los diferentes extensores para su congelación en vapores de nitrógeno. Las variables evaluadas fueron porcentaje de espermatozoides vivos e integridad de membrana, las cuales se analizaron por el procedimiento GLM. Se encontró diferencia ($p < 0.05$) en la variable de espermatozoides vivos para el tratamiento jugo de tuna ($19.6 \pm 1.18\%$), respecto a los tratamientos Triladyl® ($46.4 \pm 1.08\%$) y BoviPRO® ($46.6 \pm 1.18\%$). Para la variable integridad de membrana, se obtuvo diferencia del jugo de tuna ($17.26 \pm 0.98\%$) respecto a BoviPRO® ($46.68 \pm 1.15\%$) y Triladyl® ($38.28 \pm 1.34\%$). Se concluye que el extensor de jugo de tuna es buena opción para la criopreservación de semen de bovino, sin embargo, es necesario seguir investigando sus cualidades para mejorar las características del semen criopreservado.

Palabras clave: Preservación, movilidad espermática, integridad de membrana, acrosoma.

ABSTRACT

A dilutor was elaborated with prickly pear (*Opuntia* sp.) juice to dilute and cryopreserve bovine semen, and to evaluate it, was compared with two commercial dilutors: Triladyl® and BoviPRO®. Three Holstein adult bulls were used, from which semen was collected with an artificial vagina. The ejaculates were mixed to form a "pool", where bulk mobility, sperm concentration, morphology and percentage of live spermatozoa were evaluated from fresh semen. Later, it was divided into three fractions, which were diluted with the different extensors for their freezing in nitrogen vapors. The variables evaluated were percentage of live spermatozoa and integrity of the membrane, which were analyzed through the GLM procedure. A difference was found ($p < 0.05$) in the variable of live spermatozoa for the treatment with prickly pear juice ($19.6 \pm 1.18\%$), compared to the treatments with Triladyl® ($46.4 \pm 1.08\%$) and BoviPRO® ($46.6 \pm 1.18\%$). For the variable membrane integrity, a difference was obtained from the prickly pear juice ($17.26 \pm 0.98\%$) with regards to BoviPRO® ($46.68 \pm 1.15\%$) and Triladyl® ($38.28 \pm 1.34\%$). It is concluded that the prickly pear juice extensor is a good option

Agroproductividad: Vol. 10, Núm. 2, febrero, 2017. pp: 82-86.

Recibido: octubre, 2016. **Aceptado:** diciembre, 2016.

for the cryopreservation of bovine semen; however, it is necessary to continue studying its qualities to improve the characteristics of the cryopreserved semen.

Keywords: preservation, sperm mobility, membrane integrity, acrosome.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el laboratorio de fisiología de la reproducción en la granja experimental del Departamento de Enseñanza, Investigación y Servicio en Zootecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, en Texcoco, México (19° 29' 34" N y 98° 52' 10" O). El clima es templado, con lluvias en verano, poca oscilación de la temperatura y presenta una precipitación anual de 618.5 mm y temperatura media anual de 16.4 °C que corresponde a la fórmula climática C (w0) (w) b (i') g (García, 2004). Se utilizaron tres sementales bovinos de la raza Holstein, los cuales se alimentaron con una ración de ensilado de maíz (60%), alfalfa verde (30%), mezclados con alimento balanceado (10%) con el 16% de PC, ofreciendo 32 kg animal día⁻¹. Los animales se desparasitaron con Ivermectina, con una dosis subcutánea de 0.200 mg⁻¹ kg de PV⁻¹, por única vez.

El semen fue recolectado mediante vagina artificial, posteriormente los tubos recolectores se pusieron en baño maría a 37 °C, evaluando movilidad y volumen del semen obtenido. Después, se mezclaron cuatro mL de semen de cada animal en un solo tubo recolector de semen, obteniendo un pool de 12 mL y se colocó en baño María. Al pool, se le evaluó la movilidad, morfología, porcentaje de espermatozoides vivos y concentración espermática. En seguida, el pool fue dividido en tres fracciones iguales para ser diluido con Triladyl[®], jugo de tuna y BoviPRO[®], de acuerdo a las proporciones siguientes: Triladyl (20% producto comercial —triladyl[®]—, 20% yema de huevo y 60% agua destilada; BoviPRO (20% producto comercial —BoviPRO[®]—, 20% yema de huevo y 60% agua destilada, adi-

INTRODUCCIÓN

La conservación de semen es un procedimiento que permite mantener vivo el material genético valioso por periodos prolongados, hasta su uso por medio de la inseminación artificial (IA). Los primeros intentos involucraron periodos cortos entre la recolección y su deposición en el tracto reproductor de la hembra, ya que los espermatozoides solo tenían una sobrevivencia limitada fuera del tracto reproductivo a temperaturas ambiente (Salomon y Maxwell, 1995). Con base en lo anterior, los trabajos para conservar semen consideran que, los espermatozoides son muy susceptibles a bajas temperaturas, las cuales provocan cambios en la estructura y función celular relacionada con el choque térmico, incluyendo cambios en el acrosoma, mitocondrias y membrana celular; funciones importantes para las sobrevivencia y funcionalidad, después de la descongelación (Ollero *et al.*, 1998). Con el tiempo, se han desarrollado gran variedad de dilutores, diluyentes o extensores para semen que utilizan yema de huevo, leche y lecitina de soya (*Glycine max*), con la finalidad de evitar los daños causados durante el proceso de congelación (Moradi *et al.*, 2013). De igual forma, existen comercialmente diversos dilutores, los cuales han probado su eficiencia en la conservación de semen, sin embargo, la gran mayoría de estos productos son importados, lo cual hace que su precio sea elevado. Actualmente, se han desarrollado diversos dilutores alternativos, los cuales usan frutas o jaleas naturales como aporte de los elementos necesarios para el mantenimiento de los espermatozoides en el proceso de conservación. Se han reportado en diferentes especies, el uso de dilutores no convencionales para conservar semen, como en el caso de la sábila (*Aloe vera*), como Rodríguez *et al.* (1988), quienes reportaron el uso de gel en la conservación de semen de carnero. Posteriormente, Ferreira (1993) utilizó el agua de coco (*Coccus nucifera*) en la conservación de semen de caprinos. Recientemente, Moradi *et al.* (2013) reportaron el uso de jalea real en la conservación de semen de carnero. Sin embargo, en la especie bovina, no se ha reportado el uso de este tipo de extensores para la conservación de semen, utilizando generalmente productos comerciales. Para la elaboración de dilutores no convencionales, se utilizan frutas o jaleas que contengan un alto contenido de azúcares que permitan el aporte de nutrientes para el espermatozoide. En este sentido, la tuna (*Opuntia ficus indica*) en su composición química presenta altos contenidos de azúcares de bajo peso molecular, tales como glucosa y fructosa, que conforman 53% de sus carbohidratos, además, presenta niveles elevados de vitamina C que favorece una función antioxidante (Sumaya *et al.*, 2010) y un pH cercano a 6 hasta su madurez (Sáenz, 2006). Por lo anterior y, considerando las propiedades químicas de la tuna, el objetivo del presente estudio fue evaluar el uso de un extensor con jugo de tuna para la dilución y crioconservación de semen de bovino.

cionalmente, la combinación de antibióticos propios del producto y, Jugo de Tuna (76.5% de jugo de tuna, 3.5% de glicerol, 10% de solución de citrato de sodio al 2% y 10% de yema de huevo). Posteriormente, el semen fue diluido en los extensores preparados y envasados manualmente en pajillas de 0.25 mL (IMV® Technologies), se utilizó alcohol poli-vinílico en el sellado. Inmediatamente, las pajillas fueron congeladas por la técnica de vapores de nitrógeno, las pajillas congeladas se pasaron a gobelets y bastones previamente identificados, de acuerdo a cada tratamiento y se conservaron en un termo criogénico (MVE®).

Descongelamiento y evaluación del semen

Las pajillas se descongelaron en un termo descongelador atemperado a 37 °C durante 45 segundos. Para cada pajilla, se evaluó el porcentaje de espermatozoides vivos e integridad de membrana. En el caso del porcentaje de espermatozoides vivos, se obtuvo realizando una tinción supravital con eosina-nigrosina, donde los espermatozoides muertos se tiñeron de rojo y los vivos no presentaron tinción (Hafez, 2002). Se realizó un frotis mezclando 20 µL de semen con 80 µL del colorante, se extendió en el portaobjetos y se fijó al fuego. Posteriormente, se observó al microscopio a 100x (LEICA DM 1000). Se contaron 100 células y el resultado se expresó en porcentaje. La integridad de membrana se determinó por medio de la prueba hiposmótica de acuerdo con lo descrito por Nunes (2001). Se utilizó una solución hiposmótica (100 mOsm) de citrato de sodio al 1%, la cual se mezcló en tubos Eppendorf® con capacidad de 2 mL, en una proporción de 10 µL de semen puro con 100 µL de la solución, se dejó reposar por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se mezcló con una solución de formol al 2% (BL-1), en una proporción de 1:10, en donde se adicionaron 10 µL de la mezcla de semen con solución endosmótica con 100 µL de BL-1, se fijó como frotis en

un porta objetos y se observó con el objetivo de 40x en un microscopio óptico de contraste de fases. Se contaron 100 espermatozoides, de los cuales, se registraron aquellos que mostraron algún tipo de reacción. Los datos se analizaron mediante el procedimiento GLM con el paquete estadístico SAS (9.1). Se utilizó la prueba de Tukey para la comparación de medias. El diseño experimental fue un completamente al azar, donde la variable independiente fue tratamiento, para este caso, los dilutores Triladyl®, BoviPRO® y jugo de tuna. Las variables respuesta fueron porcentaje de espermatozoides con

integridad de membrana o prueba hiposmótica, y porcentaje de espermatozoides vivos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos de las variables movilidad, concentra-

ción espermática, morfología y porcentaje de espermatozoides vivos de los pool de semen en fresco, se muestran en el Cuadro 1.

En la evaluación post-descongelación del semen, se encontró diferencia significativa entre los dilutores. Para la variable porcentaje de espermatozoides vivos, el dilutor con jugo de tuna fue el más bajo (p<0.05) con respecto a Triladyl® y Bovi PRO®, no encontrando diferencias entre estos últimos (Cuadro 2). Estos resultados fueron inferiores a los obtenidos por

Ramónez (2013), quién empleando Triladyl® como dilutor para congelar semen de bovino, reportó 51.8% de espermatozoides vivos. En otro estudio, utilizando Tryladil®, Galarza (2013) reportó una cifra similar con 51.73% de espermatozoides vivos poste-

rior al descongelamiento. Otros autores que evaluaron movilidad de semen de bovino post-descongelamiento con Triladyl®, reportaron valores más bajos que los autores citados antes con 31.9% (Carballo, 2005), 35.5±3.7% (Peralta, 2006), 41.8±4.1% (Stradaoli et. al., 2007) y 37% (Cruz, 2014).

Cuadro 1. Características del semen fresco que conformo los pools utilizados en el experimento.

Características de semen utilizado para congelar			
Variable	Pool 1	Pool 2	Promedio
Movilidad masal (%)	95.00	95.00	95.00
Concentración (millones/mL)	576×10 ⁶	700×10 ⁶	638×10 ⁶
Espermatozoides normales (%)	91.00	95.00	93.00
Espermatozoides Vivos (%)	89.00	97.00	93.00

Cuadro 2. Porcentaje de espermatozoides vivos e integridad de membrana de semen congelado con tres extensores diferentes: Triladyl®, jugo de tuna y BoviPRO®.

Variable	N	Espermatozoides vivos (%)	Integridad de membrana (%)
Triladyl ®	100	46.40±1.08 ^a	38.28±1.34 ^a
Jugo de tuna	100	19.60±0.84 ^b	17.28±0.98 ^b
BoviPRO®	100	46.68±1.18 ^a	46.68±1.15 ^a

*Medias con diferente literal entre columnas son diferentes (p<0.05).

Durante el proceso de congelación-descongelación ocurre pérdida de espermatozoides viables, de entre 50% y 60% de los iniciales, aun en los mejores sistemas de congelación (Evans y Maxwell, 1990; Galina y Valencia, 2008; Chacur *et al.*, 2012). Para el caso del dilutor de jugo de tuna, que obtuvo el más bajo porcentaje de vivos, indica que el daño en los espermatozoides es alto, por lo que es necesario mejorar las cualidades del extensor para tener una mayor sobrevivencia de espermatozoides post-descongelación. En el proceso de crio preservación, la formación de cristales de hielo pudo afectar los resultados obtenidos con jugo de tuna, aún después de adicionar 3.5% de glicerol como crio protector, que cumple la función de reducir la cantidad de agua intracelular necesaria para mantener el volumen celular, la interacción con iones y macromoléculas, y disminuir el punto de congelación del agua (Medeiros *et al.*, 2002). De acuerdo a lo revisado por Salamon y Maxwell (1995), algunos autores señalan que la concentración de glicerol va desde 2% a 10%, sin embargo, la cantidad de glicerol depende de los constituyentes del diluyente, velocidad de congelación y descongelación, y forma de envasado, pero el factor determinante es la especie a congelar el semen (Salamon y Maxwell, 1995; Holt, 2000; Watson, 2000). Por lo tanto, es importante hacer pruebas con diferentes concentraciones de glicerol para tratar de mejorar la sobrevivencia espermática en semen de bovino, utilizando jugo de tuna. Probablemente, la concentración de glicerol utilizada en el tratamiento con jugo de tuna fue baja, lo cual favoreció una inadecuada deshidratación celular con

la velocidad de congelación aplicada en el presente estudio, permitiendo la formación de cristales de hielo y, en consecuencia, los daños en la integridad de membrana y viabilidad (Medeiros *et al.*, 2002). Celeghini (2005) y Carpio (2015), señalan que se debe establecer un equilibrio entre la velocidad de congelamiento adecuada que permita la deshidratación celular que evite la formación de cristales de hielo intracelular, y la máxima cantidad que no presente efectos tóxicos para las mismas.

En el caso de la integridad de membrana o prueba hiposmótica, se obtuvo un valor bajo ($p < 0.05$) para el jugo de tuna, respecto a Triladyl® y BoviPRO® (Cuadro 2). Otros investigadores, como Rubio *et al.* (2009) encontraron $50.82 \pm 3.90\%$ de integridad de membrana en semen de bovino congelado con Tryladil®. Para esta prueba en semen de bovino post-descongelado, se han reportado resultados que van desde 43% hasta 56% de integridad de membrana (Rubio y Quintero, 2008). De igual manera, Grossmann y Santaló (1991) señalan que la membrana plasmática es la estructura que sufre mayor daño en los procesos de criopreservación, debido a la pérdida de fluidez de sus componentes lipídicos, ya que en la membrana plasmática, ocurre una transición de los fosfolípidos de una fase líquida a una fase de gel, en donde se distribuyen aleatoriamente produciendo una estructura rígida, lo cual, vuelve a la membrana débil y susceptible a rupturas, fusiones y permeable a los iones (Holt, 2000; Medeiros *et al.*, 2002). El resultado poco favorable en el tratamiento con jugo de tuna, pudo deberse a que el dilutor no proporcionó una adecuada crio protección de la

membrana. Tal vez, la baja concentración de glicerol, pudo permitir la formación intracelular de cristales de hielo, al no deshidratar de forma adecuada la célula, lo cual ocasionó los daños observados en integridad de membrana.

CONCLUSIONES

El dilutor elaborado con jugo de tuna presentó los valores más bajos para las variables porcentaje de espermatozoides vivos e integridad de membrana, comparado con los dilutores comerciales (Tryladil® y BoviPRO®), lo que indica daño en los espermatozoides crio preservados. Por lo tanto, es necesario seguir trabajando en el dilutor con jugo de tuna, ya que las variables evaluadas en el semen descongelado, presentaron valores inferiores a los obtenidos con dilutores comerciales.

LITERATURA CITADA

- Carballo, G.D.M. 2005. Comparación de dos diluyentes para criopreservar semen de bovino bajo condiciones de campo húmedo. Tesis Profesional. Facultad de medicina y veterinaria, Universidad Veracruzana. Veracruz, México. 42 p.
- Carpio C.S. 2015. Evaluación de dos diluyentes para la criopreservación de semen bovino: yema de huevo vs leche descremada. Tesis Profesional. Universidad Politécnica Salesiana. Cuenca, Ecuador. 83 p.
- Celeghini E.C. 2005. Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membrana plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes. Tesis de Doctorado. Facultad de Medicina Veterinaria e Zootecnia, Universidad de Sao Paulo. Brasil. 178 p.
- Chacur M.M.G., Sanches D.H.; Ozaman P.F., Alves L. B., Mlicarelli C.M., Papa P. 2012. Efeito de meios diluentes na viabilidade de sêmen congelado bovino. Veterinária e Zootecnia, 19: 346-355.

- Cruz S.D. 2014. Estudio comparativo de 3 diluyentes (TRIS, Citrato de sodio y Triladyl) en el procesamiento de semen bovino. Tesis profesional. Division de Ciencia Animal, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Coahuila, México. 67 p.
- Evans G., Maxwell W.M. 1990. Salamon's artificial insemination of sheep and goats. Butterworths. Wisconsin-Madison. U.S.A. 192 p.
- Ferreira N.J. 1993. El agua de coco como dilutor del semen caprino. Revista científica FCV-LUZ 3(3):269-272.
- Galarza D.A. 2013. Eficacia de dos diluyentes:TRIS+Lecitina de soya (AndroMed) y Tris+yema de huevo (Triladyl), en la crioconservacion de seme de toro de la raza jersey en Cuenca, Ecuador. Tesis Profesional. Universidad de Cuenca, Facultad de ciencias Agropecuarias. Cuenca, Ecuador. 93 p.
- Galina C., Valencia J. 2008. Reproducción de animales domésticos (3ª ed). Editorial Limusa. México, D.F. 569 p.
- García E. 2004. Modificaciones al sistema de clasificacion climatica de Köppen. ISBN-UNAM. México, D.F. 90 p.
- Grossmann M., Santalo J. 1991. Aspectes teorics de la congelacio de gametes i d'embrions. Treballs de la Societat Catalana de Biologia, 42: 87-108.
- Hafez E. 2002. Reproduccion e inseminacion Artificial en animales (7ª ed.). (G. Féher de la Torre, y E. Olvera Martínez, Tráds.) . Editorial McGraw-Hill Interamericana. México, D.F. P 287-297.
- Holt W. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. Animal Reproduction Science, 62: 3-22.
- Medeiros C.M.; Forell F., Oliveira A.T., Rodrigues J.L. 2002. Curret status of sperm cryopreservaton: Why isn't it better? Theriogenology. 57: 327-344.
- Moradi A.R., Malekinejad H., Farrokhi-Ardabili F., Bernousi I. 2013. Royal Jelly improves the sperm parameters of ram semen during liquid storage and serves as an antioxidant source. Small Ruminant Research 113:346-352.
- Ferreira N.J. 2001. Procesamiento de semen. En memorias del curso de biotecnologías de la reproducción ovina; inseminación artificial. Pachuca, Hidalgo.
- Ollero M., Perez-Pe R., Muiño-Blanco T., Cebrian-Perez J.A.1998. Improvement of ram sperm cryopreservation protocols assessed by sperm quality parameters and heterogeneity analysis. Cryobiology 37: 1-12.
- Peralta T.J.A. 2006. Efecto de la velocidad del descenso de la temperatura sobre movilidad postdescongelado del semen bovino. Tesis Profesional. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Veracruzana. Veracruz, México. 32 p.
- Ramónez,C.J. 2013. Evaluacion de dos agentes crioprotectores no permeables y un diluyente comercial (Triladyl) en congelacion de semen bovino. Tesis Profesional. Universidad de Cuenca. Cuenca, Ecuador. 89 p.
- Rodríguez H., Baldassarre J., Simonetti F., Aste F., Ruttle J.L. 1988. Cervical versus intrauterine insemination of ewe using fresh or frozen semen dilates with *Aloe Vera* gel. Theriogenology 30(5):843-54.
- Rubio G.J., Quintero A.M. 2008. Uso de las pruebas de resistencia osmótica para valorar la funcionalidad espermática en toros. En: C. González Stangnaro, N. Madrid Bury, y E. Soto Belloso, Desarrollo sostenible de la ganadería doble propósito (pág. 617). Editorial Astro Data S.A. Zulia, Venezuela.
- Rubio G., Quintero J.M.A.A., González, V.D. M. 2009. Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides de toros. Revista Científica, 19: 382-389.
- Sáenz C. 2006. Utilización Agroindustrial del nopal. Boletín 162 de servicios agrícolas de la FAO. Roma. 97 p.
- Salamon S., Maxwell W.M. 1995. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. Animal Reproduction Science. 37: 185-249.
- Stradaoli G., Noro T., Sylla L., M. Monaci. 2007. Decrease in glutation (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: comparison between two extenders. Theriogenology. 67: 1249-1255.
- Sumaya M.M., Suárez D.T., Cruz C.N., Aláís G.E., Sampedro J. 2010. Innovación de productos de alto valor agregado a partir de la tuna mexicana. Revista Mexicana de Agronegocios, 27: 435-441.
- Watson P.F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Animal Reproduction Science. 60-61: 481-492.