

# Protocolo de procesamiento y crío preservación de semen de razas bovinas y caprinas tropicales en la República Dominicana

José Choque-López<sup>1</sup>, María López<sup>2</sup>, José Bueno<sup>1</sup> y Daniel Valerio<sup>3</sup>

Con el objetivo de estandarizar el protocolo de procesamiento y crío-preservación de semen de sementales bovinos y caprinos, se realizaron pruebas de manejo, congelamiento y conservación en nitrógeno líquido (NL2), del eyaculado, de ejemplares de las razas bovinas Gyr, Guzerat y Australian Friesian Sahiwal y caprinos Saanen, disponibles en el Centro de Producción Animal del Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IDIAF), en el marco de ejecución de actividades del Centro Especializado en Biotecnología Reproductiva, Cebire-Idiaf. El procedimiento validado consistió en la recepción de muestras, evaluación de muestras de semen (color, volumen, aspecto, motilidad masal, motilidad individual, concentración y morfología de los espermatozoides), dilución de las muestras (según concentración), estabilización a 4°C, llenado de pajuelas, congelación (en vapor de NL2 a -120°C) y crío-preservación (en NL2 a -196°C). Entre los resultados están la evaluación de la motilidad pos-descongelamiento de muestras de semen crío-preservadas en dos posiciones: inferior (sumergidas en NL2) y superior (por encima del nivel de NL2). La raza Sahiwal, presentó los valores de motilidad media más estables (coeficiente de variación igual a 7.4% y 8.3%, según la posición inferior y superior, respectivamente). No obstante, los mayores valores de motilidad se observaron en pajuelas descongeladas de toros Gyr (70 % en pajuelas suspendidas sobre el nivel de NL2). El semen de ovinos y caprinos debe crío-preservarse sumergido (posición inferior) en el NL2 para garantizar su viabilidad. La estandarización de la metodología de procesamiento y crío-preservación de semen se encuentra en su fase final, motivo por el cual el CPA dispone actualmente de pajuelas de semen de bovinos y caprinos de razas tropicales.

Palabras clave: Protocolo Procesamiento y crío-preservación, Semen, Espermatozoides, Gyr, Sahiwal, Guzerat, Saanen.

## INTRODUCCIÓN

La ganadería dominicana tiene el reto de incrementar la rentabilidad de las unidades productivas. Una alternativa es la mejora genética de los animales, a través de tecnologías reproductivas como la inseminación artificial. La mayoría de los ganaderos que utilizan esta técnica adquieren semen importado, de elevado costo y de razas no tropicales.

Por este motivo, el Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IDIAF), en colaboración con el Consejo Nacional de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (Coniaf), el Consejo Nacional para la Reglamentación y Fomento de la Industria Lechera (Conaleche) y el Fondo Especial para el Desarrollo Agropecuario (Fedea), aunaron esfuerzos para la

creación del Centro Especializado en Biotecnología Reproductiva (Cebire), que tiene como objetivo la colecta, procesamiento y crío preservación de semen, ovocitos y embriones de rumiantes, para su difusión a productores ganaderos con el propósito de contribuir al mejoramiento de la ganadería dominicana, Guerra *et al.* 2012.

El objetivo del estudio es presentar los avances del proceso de estandarización para el procesamiento y crío preservación de semen de sementales de las razas bovinas Gyr, Guzerat y Sahiwal y caprinos Saanen, disponibles en el Centro de Producción Animal del IDIAF.

<sup>1</sup> Investigadores del Centro de Producción Animal del IDIAF. E-mail: jchoque@idiaf.gov.do

<sup>2</sup> Técnico en biotecnología reproductiva

<sup>3</sup> Consultor de la FAO

## MATERIALES Y MÉTODOS

El proceso de estandarización se realizó en las instalaciones del Centro Especializado en Biotecnología Reproductiva (CEBIRE), del Centro de Producción Animal del IDIAF (CPA), ubicado en el kilómetro 24 de la autopista Duarte, Santo Domingo Oeste (18.547982 latitud norte y 70.077447 longitud oeste).

**Se describen a continuación los pasos de dicho proceso:**

### 1. Recepción de muestras.

La muestra de semen se conserva en baño maría a 37°C y se procede a su evaluación Figura 1.



Figura 1. Entrega de muestras de semen al operador del laboratorio

### 2. Evaluación de muestras de semen.

Para la evaluación de la muestra de semen se toman en cuenta varios criterios referentes a características macroscópicas (INTA 2004 y Souza 2013) y microscópicas de la muestra (Figura 2, 3 y 4), estos criterios se presentan en la Tabla 1.



Figura 2. Muestra de semen para ser evaluada en microscopio

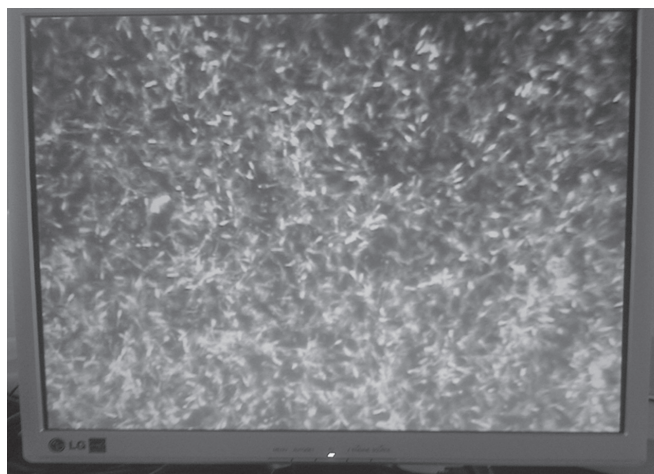


Figura 3. Observación de la muestra de semen en microscopio de contraste de fase

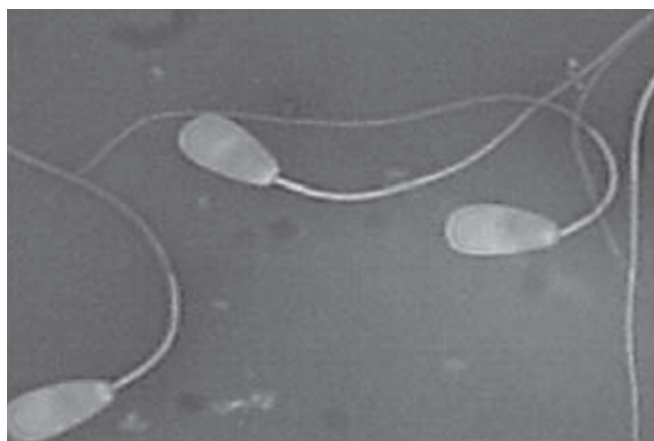


Figura 4. Espermatozoides teñidos con eosina-nigrosina

### 3. Dilución de las muestras.

La determinación de la concentración espermática, permite determinar la cantidad de espermatozoides contenidos en la muestra y a partir de esto, calcular la cantidad de diluyente que se debe agregar al semen y el número de pajuelas que se pueden procesar de la muestra colectada Figura 5.

### 4. Estabilización a 4°C.

Luego de la dilución, se procede a estabilizar el semen al menos por 2 horas antes del envasado en pajuelas y la congelación, para esto se utiliza un refrigerador con termostato.

### 5. Llenado de pajuelas.

Las pajuelas se llenan a 4°C de forma manual o automática (con máquinas llenadoras) como se muestra en la figura 6. El llenado se puede realizar también a temperatura del laboratorio 24°C antes de enfriar y estabilizar a 4°C. Una vez llenadas, las pajuelas se sellan con polivinilo y se congelan.

Tabla 1. Requerimientos para la evaluación de muestras de semen

Evaluación macroscópica	Evaluación microscópica
<p><b>Color</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Blanco lechosa o cremosa: buena calidad</li> <li>• Similar a leche aguada: baja calidad</li> </ul>	<p>Motilidad masal</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Semen muy bueno (+++).</li> <li>• Semen bueno: (++)</li> <li>• Semen regular: (+).</li> <li>• Semen malo: (0).</li> </ul>
<p><b>Volumen</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 a 8 ml en toros</li> <li>• 1 a 5 ml en caprinos.</li> </ul>	<p>Motilidad individual</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Semen muy bueno: igual o mayor de 70%</li> <li>• Semen bueno: 50-69% de motilidad</li> <li>• Semen regular: 30-49% de motilidad</li> <li>• Semen malo: menor de 29% de motilidad</li> </ul>
<p><b>Aspecto</b></p> <p>Grado de opacidad de la muestra</p>	<p>Concentración</p> <p>&gt;500million/ml en toros</p> <p>&gt;2000millon/ml en caprinos</p>
	<p>Morfología</p> <p>≥70% de espermatozoides normales en ambas especies</p>

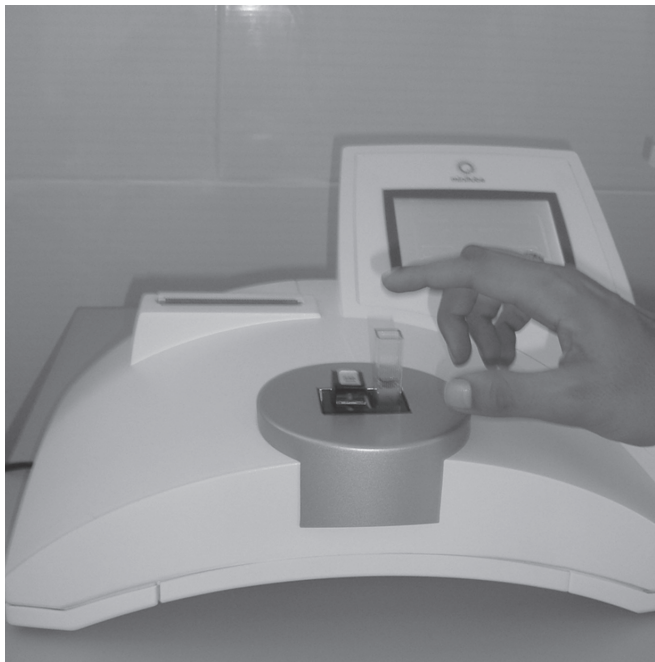


Figura 5. Conteo de células espermáticas en espectrofotómetro, para el cálculo de la concentración.

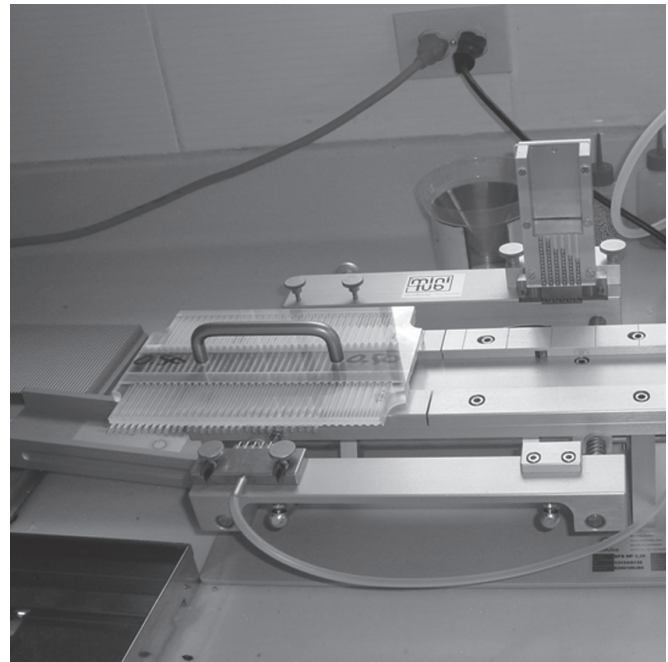


Figura 6. Llenador automático de pajuelas.

## 6. Congelación.

Mediante vapor de nitrógeno líquido (NL2) a una temperatura de congelación de  $-120^{\circ}\text{C}$  (Figura 7), las pajuelas se sumergen en el nitrógeno líquido para alcanzar una temperatura definitiva de  $-196^{\circ}\text{C}$ . Este proceso tarda entre 10 y 30 minutos.



Figura 7. Congelador de pajuelas

**7. Criopreservación.** En termos de NL2 a  $-196^{\circ}\text{C}$  por tiempo indefinido.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se presenta la evaluación de la motilidad pos-descongelamiento de muestras procesadas de toros y caprinos, Tabla 2, preservadas en termos de NL2 en dos posiciones diferentes: a) inferior, sumergidas en NL2 y b) superior, por encima del nivel de NL2.

La raza Sahiwal, presenta los valores de motilidad media más estables con coeficiente de variación de 7.4% y 8.3%, según la posición inferior y superior, respectivamente. No obstante, los mayores valores de motilidad se observaron en pajuelas descongeladas de toros Gyr (70 % en pajuelas suspendidas sobre el nivel de NL2). El semen de ovinos y caprinos debe ser criopreservado sumergido (posición inferior) en el NL2 para garantizar su viabilidad.

Tabla 2. Motilidad media pos-descongelamiento según la posición de criopreservación en NL2

RAZA	POSICION	MOTILIDAD MEDIA	CV
Gyr	I	57.5±17.67	30.7
Gyr	S	70±0.0	0
Guzerat	I	20.7±8.86	42.8
Guzerat	S	30	ND
Sahiwal	I	47.5±3.53	7.4
Sahiwal	S	42.5±3.53	8.3
Cap. Saanen	I	50±14.1	28.3

Ref.: I = posición inferior; S = posición superior; CV= coeficiente de variación

## CONCLUSIONES

La estandarización de la metodología de procesamiento y criopreservación de semen se encuentra en su fase final, motivo por el cual el CPA dispone actualmente de pajuelas de semen de bovinos y caprinos de razas tropicales.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la colaboración del doctor Enrique Domínguez, especialista en reproducción animal del Central Romana Corporation, Ltd, por su colaboración en la implementación de las actividades de colecta y procesamiento de semen bovino. Así mismo, expresamos agradecimiento a los representantes del Coniaf, Conaleche y Fedaf, por su aporte en la constitución del Cebire-Idiaf.

## LITERATURA CITADA

Guerra, R.; Solís, A.; Sandoya, G.; de Armas R. 2012. Evaluación de tres protocolos de criopreservación de embriones bovinos obtenidos *in vivo* e *in vitro*. REDVET - Revista electrónica de Veterinaria. 13 (10):16.

INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agroalimentaria, AR). 2004. Jornadas de inseminación artificial con semen fresco en ovinos. Comunicación Técnica Producción Animal 443. 14p.

Souza, A. 2013. Uso de semen sexado en explotaciones de ganado lechero y de carne. Dairy Advisor at University of California. CEVA SA – Brasil. Revisado el 20 de mayo 2014. Disponible en: <http://www.engormix.com/MA-ganaderia-carne/articulos/uso-semen-sexado-explotaciones-t5278/p0.htm>.