

Congelación de semen en ganado caprino

▼ B. PÉREZ LLANO Y E. MATEOS REX. AREA REPRODUCCION ANIMAL. CIT-INIA. MADRID

España ha asistido a un incremento de su censo caprino evaluado hoy en 2,9 millones de animales

En este trabajo se analizan las complejas técnicas para la congelación del semen de caprino

Existen 557 millones de cabras en el mundo. La mayor cantidad de estos animales se encuentra en Asia, seguido de África y América. Europa ocupa el 4º lugar en el censo caprino mundial con 15 millones de cabezas, siendo Grecia el país con mayor número de cabezas (6 millones), seguido de España con 3 millones e Italia con 1,3 millones. Francia, a pesar de ocupar el 4º lugar en Europa con 1,1 millones es el país que mejor aprovecha los productos obtenidos de la explotación del ganado caprino (MAPA, 1990, 1993).

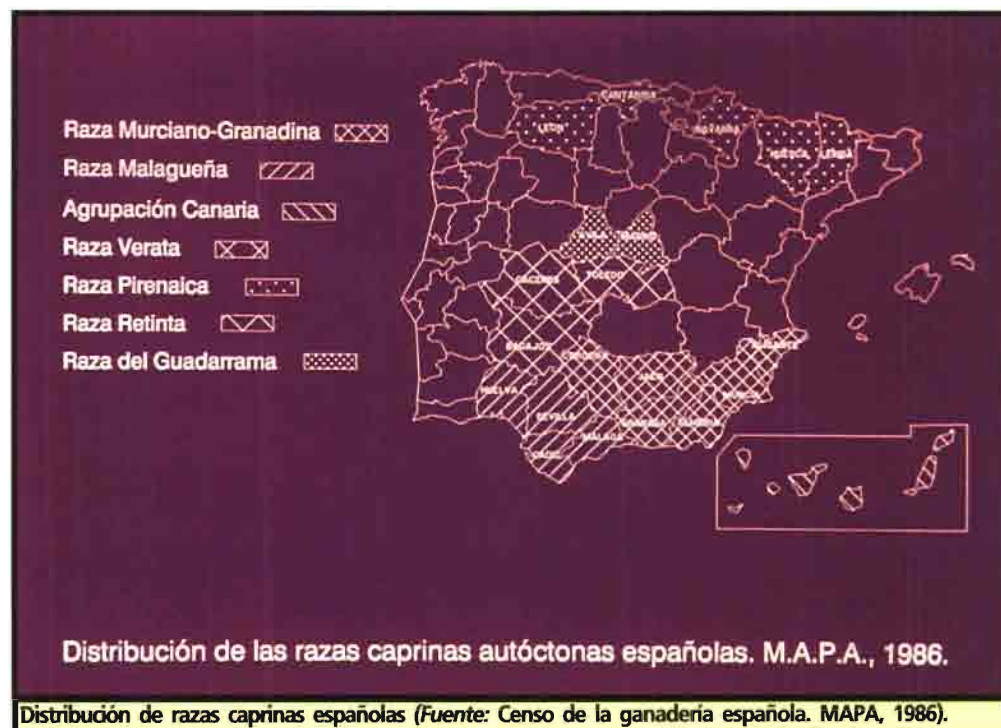
En España hemos asistido a un incremento del censo caprino desde el año 1965 con 2,2 millones de animales, pasando por el año 1990 con 3,6 millones y hasta llegar a los 2,9 millones del último censo realizado en diciembre de 1993 (MAPA, 1990, 1994). Este hecho se ha debido a varias causas como son el aumento del precio de los productos caprinos, el uso del ganado caprino como alternativa al paro, el aprovechamiento de espacios marginales no utilizados por otras especies ganaderas para su alimentación y su utilidad como agentes de primer orden en la lucha contra incendios forestales. Además, el ganado caprino es de fácil manejo, gran rusticidad y buena adaptación al medio. No debemos olvidar que una parte del aumento del censo se ha originado por las primas ofrecidas por la UE a los ganaderos de ésta y otras especies.

En nuestro país existen varias razas autóctonas que se pueden clasificar por su aptitud en lecheras, mixtas y de carne. Las razas lecheras por orden de importancia

son la Murciano-Granadina con 500.000 ejemplares ubicada en el Sureste peninsular, la Malagueña con 270.000 en el Sur y la Canaria con 160.000 en las Islas Canarias. Entre las razas mixtas destaca la Verata con 100.000 ejemplares localizada en Extremadura y la Pirenaica con 80.000 cabezas en Navarra y Cantabria y entre las razas de carne la Agrupación Serrana es la más numerosa con 880.000 cabezas y la más extendida. Quedan tres colectivos que poseen cada uno entre 20.000 y 40.000 ejemplares que son las Blancas Andaluza y Celtibérica, la Retinta y la del Guadarrama. Y por último, existe un alto número

de animales producto de cruces entre éstas u otras razas (680.000) (MAPA, 1986).

Hasta este momento el manejo reproductivo utilizado por el ganadero de caprino se ha reducido a la monta natural con agrupación de partos, para lo cual retiran los machos o los proveen de un mandil cuando no les interesa que se realicen cubriciones. De todas las razas aquí mencionadas, sólo algunas poseen libro genealógico: la Murciano-Granadina, la Malagueña, la Canaria. En dichos libros sólo están inscritos aproximadamente un 15% de los animales pertenecientes a cada raza.



Algunas agrupaciones ganaderas realizan controles lecheros y la inseminación artificial es necesaria para poder conseguir un progreso genético más importante. Aquí es donde el semen congelado es una herramienta útil debido a su conservación por largos períodos de tiempo, la posibilidad de usar semen de estación favorable durante la estación no reproductiva y la mayor difusión tanto nacional como internacional de genes de sementales mejorantes.

Congelación de semen en ganado caprino

La congelación de semen en ganado caprino presenta los problemas comunes de la congelación de semen y problemas específicos del semen de esta especie. Los problemas generales son la presentación del choque frío durante el enfriamiento y los daños durante la congelación debidos tanto a un aumento de la concentración de sales en el medio o efecto solución como a la formación de cristales intracelulares (Watson, 1992). Los crioprotectores externos e internos añadidos al diluyente son los encargados de paliar en la medida de lo posible estos efectos perjudiciales que son capaces de disminuir el porcentaje de motilidad del semen de un 80% recién recogido a un 40% después de la descongelación.

Otro de los problemas limitantes en la congelación es la estacionalidad observada en la capacidad de resistencia a la congelación del semen, la cual se ha visto que disminuye en primavera (Corteel y col., 1980) y a pesar de que algunas de nuestras razas no presentan unas variaciones estacionales de la calidad seminal tan marcadas como otras razas europeas (Pérez Llano, 1992), sí se han observado variaciones estacionales en la congelabilidad de su semen (Pintado y col., 1992).

Por si esto fuera poco, la especie caprina presenta ciertas particularidades en la composición de su plasma seminal. Una de ellas es la existencia de una enzima producida en las glándulas bulbouretrales, la fosfolipasa o lecitinasa, que hidroliza la lecitina de la yema de huevo, utilizada en los diluyentes, a ácidos grasos y lisolecitina (Roy, 1957). Esta última sustancia es tóxica para el espermatozoide, actuando principalmente sobre la membrana plasmática la cual destruye, ocasionando la muerte de los espermatozoides.

Además, en los últimos años se ha descubierto una fracción proteica del plasma seminal (BUIII) también procedente de las glándulas bulbouretrales que interacciona con la leche utilizada en los dilu-



Macho cabrio de raza Malagueña.

yentes produciendo inhibición de motilidad e inducción de la reacción acrosómica (Nunes y col., 1982, Pellicer y Combarrous, 1994).

Para evitar los efectos perjudiciales de estas sustancias, algunos investigadores decidieron «lavar» el semen, es decir separar y eliminar el plasma seminal mediante centrifugación antes de mezclar el semen con el diluyente con el que se va a congelar (Corteel, 1975, Mateos y Pérez, 1994). Otros autores han optado por utilizar porcentajes de yema de huevo más bajos de los utilizados en principio, 9% vs 20%, además de lavar el semen (Ritar y Salamon, 1983) o 1,5% sin lavar el semen (Ritar y Salamon, 1982).

En otros trabajos se ha utilizado un porcentaje alto de yema de huevo (20%) sin lavar el semen pero la tasa de dilución semen/diluyente elegida ha sido alta (1:20) con lo que el posible efecto tóxico del plasma seminal se atenúa (Chauhan y Anand, 1990). Por último también se han realizado estudios sobre la caseína de la leche en el diluyente de congelación como alternativa a la yema de huevo (Roca y

col., 1993) obteniendo resultados similares con ambas composiciones.

Técnica de congelación

Para mejorar los resultados obtenidos en la congelación de semen de cualquier especie es necesario en primer lugar elegir previamente los machos que se van a utilizar de acuerdo con la congelabilidad de su semen, sometiendo al semen descongelado a una temperatura de 37°C durante 5 minutos y descartando el que presente porcentajes de motilidad menores al 30% y calidad de movimiento menor de 3.

De los que superen esta prueba se deben descartar aquellos que a los 120 min. de incubación presenten una calidad de movimiento menor de 1,5. La congelabilidad del semen presenta una gran variación individual debido a diferencias en la composición fosfolipídica de la membrana plasmática.

En segundo lugar se elegirán los eyaculados a congelar que serán aquellos que presenten recién recogidos una motilidad mayor o igual al 75%, una calidad de

CUADRO I. FERTILIDAD OBTENIDA CON SEMEN CONGELADO POR IA CERVICAL EN GANADO CAPRINO POR DISTINTOS AUTORES

| Autor | Fertilidad (%) | Celo | Estación | Crioprotector externo |
|-----------------------|----------------|----------|-----------------|-----------------------|
| Corteel, 1980 | 53 | Natural | No reproductiva | Leche |
| Corteel, 1980 | 61 | Natural | Reproductiva | Leche |
| Ritar y Salamon, 1983 | 46 | Inducido | — | Yema |
| Lawrenz, 1987 | 60,8 | Natural | No reproductiva | Yema |
| Lawrenz, 1987 | 70,9 | Natural | Reproductiva | Yema |
| Chauhan y Anand, 1990 | 80,7 | Natural | Reproductiva | Yema |
| Singh y col., 1995 | 55,5 | Natural | Reproductiva | Yema |

movimiento mayor o igual a 4 (0-5) y una concentración espermática mayor de 2.000 millones spz/ml.

Los diluyentes utilizados para la congelación de semen constan de los siguientes componentes básicos:

- Un componente tampón: TES, TRIS, citrato sódico.
- Una fuente de energía: glucosa, fructosa.
- Un crioprotector externo: leche, yema de huevo.
- Un crioprotector interno: glicerol, lactosa.
- Antibiótico para prevenir el crecimiento bacteriano: penicilina, estreptomina.

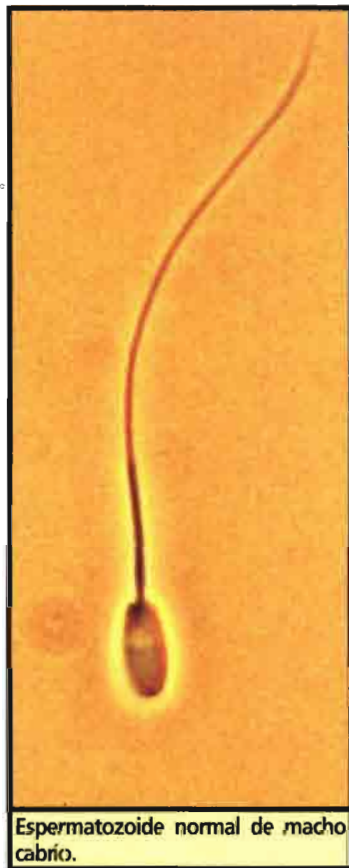
Con estos componentes caben muchas combinaciones y algunas de las utilizadas con semen de ganado caprino son:

- Glucosa, leche y glicerol (Corteel, 1975).
- Tris, glucosa, yema y glicerol (Ritar y Salamon, 1982)
- Tris, fructosa, yema y glicerol (Deka y Rao, 1986)
- Glucosa, yema, leche y glicerol (Chauhan y Anand, 1990)
- Glucosa, citrato, yema y glicerol (Chauhan y Anand, 1990)
- Tris, fructosa, ácido cítrico, yema, glicerol y lactosa (Singh y col., 1995).

Antes de diluir el semen algunas técnicas realizan el lavado del mismo, por motivos que ya hemos expuesto, por medio de 1 ó 2 centrifugaciones generalmente en una solución salina con eliminación posterior del plasma seminal. Posteriormente se añade el diluyente con o sin glicerol y se somete a refrigeración hasta llegar en 1 ó 2 h a 4 ó 5°C según las técnicas. Una vez refrigerada la mezcla la técnica que no añadió el glicerol previamente lo hace en este momento.

A esta temperatura, también según la técnica utilizada, se espera o no un tiempo llamado «de equilibración» necesario para que el espermatozoide se acostumbre al frío y los fosfolípidos de la membrana plasmática se acomoden (Watson, 1992). Este tiempo puede variar desde 1 a 5 h siendo el más utilizado el de 2 h (Salamon y Ritar, 1982, Deka y Rao, 1986, Pérez y Mateos, 1994).

El envasado se realiza en la mayoría de la técnicas en pajuelas de 0,25 ó 0,5



Espermatozoide normal de macho cabrío.

ml conteniendo generalmente 100 y 200 millones de espermatozoides respectivamente. Estas pajuelas se exponen durante 5 ó 10 min. a los vapores del nitrógeno líquido (N₂l) (-80 a 120°C) y posteriormente se sumergen en N₂l donde se van a conservar a -196°C.

La descongelación se realiza sumergiendo las pajuelas en agua a una temperatura de 37 °C. No deberían utilizarse para inseminación artificial los eyaculados descongelados que presenten a 37 °C menos del 30% de motilidad y una calidad de movimiento menor de 3 a los 5 min. y menor de 1,5 a los 120 min.

Debido a la complejidad del método de congelación y a las variaciones que en el mismo se pueden introducir (composición del diluyente, lavado o no, tasa de enfriamiento, tiempo de equilibración o no, momento de adición del glicerol, velocidad de congelación), los resultados de fertilidad con semen congelado obtenidos por los distintos autores son muy diferentes, como se aprecia en el **cuadro I**, teniendo en cuenta además que la hembra y el método de inseminación utilizado también influyen en estos resultados.

Investigación actual en congelación de semen en España

En el Area de Reproducción Animal

del INIA se han realizado pruebas de congelación *in vitro*. En la raza Verata se han estudiado varios aspectos como son las variaciones estacionales de la congelabilidad del semen, la cual presentó un empeoramiento en primavera, con una disminución significativa de la motilidad postdescongelación con respecto a las otras estaciones (32% en primavera vs 47% en verano, 50% en otoño y 52% en invierno) (Pintado y col., 1992).

También se estudió el efecto de dos diluyentes de diferente composición, uno con leche y otro con yema de huevo como crioprotectores externos, y se observó que la yema ejercía un efecto protector en la refrigeración mayor que la leche, aunque debido probablemente a la técnica de lavado la calidad postdescongelación fue mejor en el diluyente a base de leche ya que esta técnica utiliza una solución salina para el lavado mientras que la otra utiliza el mismo diluyente de yema pero sin el glicerol (Pintado y col., 1991).

Y por último, también en la raza Verata, se apreció que la duración de la conservación en el tiempo (1 día y 1, 3, 6 y 12 meses) no afectaba a la recuperación de motilidad postdescongelación aunque sí lo hizo en el caso del porcentaje de acrosomas normales. Sin embargo, éstos resultaron menos dañados en el tiempo si se conservaban en el diluyente a base de yema de huevo en vez del diluyente a base de leche (Pintado y Pérez, 1992).

Posteriormente se ha estudiado el efecto de distintos porcentajes de yema de huevo y de glicerol en los diluyentes (Pérez y Mateos, en prensa), el efecto de realizar o no lavado del semen (Mateos y Pérez, 1994) y el efecto de utilizar o no tiempo de equilibración durante la refrigeración (Pérez y Mateos, 1994). Para evaluar los resultados descongela-



Semen de macho cabrío empaquetado en pajuelas de 0,25 ml preparadas para su congelación.

mos dos pajuelas de cada tratamiento y sometemos al semen a una incubación a una temperatura de 37 °C durante 6 h, valorando el porcentaje de motilidad, la calidad de movimiento, el porcentaje de acrosomas dañados y la endósmosis positiva a las 0, 2, 4 y 6 h. Mediante esta prueba de resistencia a una temperatura próxima a la del tracto reproductor femenino, vemos qué tratamiento consigue conservar la viabilidad del



Tanque utilizado para la conservación de semen congelado en Nitrógeno líquido.

semen por más tiempo. Esta prueba nos da más información que la simple evaluación de la motilidad postdescongelación.

Los resultados mostraron claramente los efectos beneficiosos del lavado del semen (Mateos y Pérez, 1994) y de la aplicación del tiempo de equilibración (Pérez y Mateos, 1994). Asimismo se observó

una mejor recuperación postdescongelación cuando se utilizó el diluyente con un 9% de yema de huevo frente a los porcentajes del 3, 6 y 12%. El porcentaje de glicerol utilizado en el diluyente (4 u 8%) no influyó sobre la calidad de semen descongelado (Pérez y Mateos, en prensa).

Por otra parte, estudios realizados en Murcia con la raza caprina Murciano-Gra-

nadina intentaron encontrar una alternativa al uso de la yema de huevo utilizando caseína de leche, siendo los resultados *in vitro* postdescongelación similares con ambos componentes (Roca y col., 1993).

Aún queda mucho por investigar para encontrar un diluyente adecuado que preserve la capacidad fertilizante del semen de macho cabrío conservado mediante congelación, y una técnica de congelación que provoque el menor daño posible a las estructuras espermáticas.

Sería muy importante conocer otros aspectos como son las variaciones entre razas y entre individuos en la producción de factores perjudiciales como los ya mencionados (lecitinasa, BUIII) en las glándulas accesorias del macho cabrío. Y, por supuesto, se debe seguir avanzando en el estudio de nuevas pruebas para evaluar el semen tanto fresco como congelado que nos den una mayor información sobre su capacidad fertilizante. En cualquier caso, serán las pruebas de fertilidad *in vivo* las que dirán la última palabra en cuanto a la validez tanto del diluyente como del método de congelación. ■

PEQUEÑOS ANUNCIOS

Veterinario busca trabajo, toda España. ☎ (981) 13 00 00 (ext. 2711). Mañanas.

Granja porcina legalizada. 250 madres, buenas instalaciones, molino, silos, etc. Muy próxima a Madrid. Alquilo o vendo. ☎ (91) 841 53 10.

LUIS MIRO MOLINS

DISEÑOS Y PROMOCIONES

Diseño especial de naves ganaderas prácticas para la cría de novillos.

Avda. Pirineos, 3 • TORRES DE SEGRE
25170 LLEIDA (ESPAÑA)
☎ (973) 23 94 81 - 24 11 72

INTERNATIONAL ASSOCIATION OF AGRICULTURAL STUDENTS

ASOCIACION PARA LA COOPERACION ENTRE ESTUDIANTES DE AGRICULTURA

Intercambio estudiantes extranjeros

ACEA-IAAS es una Asociación Internacional de Estudiantes de Agricultura con sede en Bélgica. En España opera en las Escuelas Técnicas y Superiores de Córdoba, Lleida, Madrid y Sevilla.

Buscamos cualquier persona relacionada con el sector agrario/ganadero, que pueda acoger en su casa/explotación a estudiantes extranjeros.

- No se pide retribución alguna.
- Los estudiantes realizarán cualquier trabajo agrícola/ganadero a cambio de comida y alojamiento.
- El estudiante extranjero podrá ayudar a sus hijos a aprender o practicar idiomas con él/ella.

Para cualquier información llamen al teléfono (91) 336 56 17 o pueden enviarnos un fax al número (91) 543 48 79, atn. IAAS.