



“EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS CUALI-CUANTITATIVAS DEL SEMEN FRESCO Y DESCONGELADO DE CARNERO OBTENIDO POR ELECTROEYACULACIÓN CON Y SIN TRANQUILIZANTE PREVIO A SU COLECTA”

Ulloa Luis¹,
Condo Luis².

¹ Escuela Superior Politécnica de Chimborazo - Macas - Ecuador., Docente.

² Escuela Superior Politécnica de Chimborazo - Macas - Ecuador., Docente; Red Latinoamericana Lechera.

Para citar este artículo puede utilizar el siguiente formato:

Ulloa Luis y Condo Luis (2019): “Evaluación de las características cuali-cuantitativas del semen fresco y descongelado de carnero obtenido por electroeyaculación con y sin tranquilizante previo a su colecta”, Revista Caribeña de Ciencias Sociales (abril 2019). En línea

<https://www.eumed.net/rev/caribe/2019/04/caracteristicas-semen-fresco.html>

RESUMEN

En la granja Irquis de la Universidad de Cuenca ubicada en la parroquia Victoria del Portete, cantón Cuenca, provincia del Azuay, ubicado a una altitud de 2600 msnm, temperatura entre 10-14° C, se evaluó las características cuali-cuantitativas de semen fresco y descongelado de carnero obtenido por electro-eyaculación con (xilacina (2%) aplicada en una dosis de 0,05 mg/kg de peso vivo del carnero) y sin tranquilizante previo a su colecta para lo cual se dispusieron 4 carneros sexualmente maduros mayores de un año de edad de la raza Corriedale cuyo peso estuvo entre 60 – 90 kg, los cuales estuvieron libres de enfermedades reproductivas; los resultados experimentales fueron sometidos a las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk para determinar la normalidad y para comprobar la hipótesis el Análisis de Varianza (ADEVA). Se encontró diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) en el volumen ($0,92 \pm 0,027$), concentración ($901,2 \pm 18,67$), porcentaje de espermatozoides vivos ($63,7 \pm 1,25$) y en la motilidad post-descongelación ($50,0 \pm 2,24$), siendo mayor en el tratamiento con tranquilizante, por lo que concluimos que la administración de xilacina previa a la electro-eyaculación resultó eficaz en el análisis cuali-cuantitativo del semen fresco y descongelado.

Palabras Claves: semen, tranquilizante, descongelado, motilidad y ovino.

ABSTRACT

In the Irquis farm of the University of Cuenca located in the parish of Victoria of Portete, canton Cuenca, province of Azuay, located at an altitude of 2600 msnm, temperature between 10-14 ° C, the qualitative and quantitative characteristics of fresh semen were evaluated and defrosted sheep obtained by electro-ejaculation with (xylazine (2%) applied in a dose of 0.05 mg / kg live weight of the ram) and without tranquilizer prior to collection, for which 4 older sexually mature rams were placed one-year-old Corriedale breed whose weight was between 60 - 90 kg, which were free of reproductive diseases; the experimental results were subjected to the Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-Wilk tests to determine the normality and to verify the hypothesis the

Analysis of Variance (ADEVA). Statistically significant differences were found ($P < 0.05$) in the volume (0.92 ± 0.027), concentration (901.2 ± 18.67), percentage of live sperm (63.7 ± 1.25) and in the post-thaw motility (50.0 ± 2.24), being higher in the tranquilizer treatment, so we concluded that the administration of xylazine prior to electro-ejaculation was effective in the qualitative-quantitative analysis of fresh and thawed semen.

Key Word: semen, tranquilizer, thawed, motility and sheep.

INTRODUCCIÓN

La perpetuación de las especies se debe gracias a la actividad sexual de los individuos en el cual las hembras aportan con los óvulos y los machos con los espermatozoides y su material genético el mismo que ha sido manipulado por varias décadas, para lo cual se han utilizado diferentes metodologías de extracción y conservación, de la misma manera estos métodos han causado consecuencias en el bienestar del animal tanto hembras como machos, principalmente en las metodologías de la colecta del semen.

La colecta de semen en carneros se realiza con técnicas como la vagina artificial y electro eyaculador. Sin embargo la utilización del electro-eyaculador suele producir estrés en los animales por lo tanto atenta el bienestar de los machos que son utilizados para la conservación de su material genético; esta segunda técnica se ha utilizado comúnmente en machos que no han sido entrenados para trabajar con vagina artificial y que poseen problemas en las patas, columna o falta de libido (apetito sexual). La utilización del electroeyaculador no siempre termina en eyaculación, depende en gran medida del nivel de estimulación que reciba el carnero, y los eyaculados obtenidos por éste método son de menor calidad que los obtenidos por el método de la vagina artificial; demostrándose que durante la extracción con el Electroeyaculador las descargas eléctricas causadas por la electricidad induce cambios relevantes en la frecuencia cardíaca y niveles de cortisol en los carneros, por lo que se ha prohibido su uso en algunos países. Razón por lo que fue necesario utilizar una dosis de anestésico para reducir los efectos estresantes en el animal, (Orihuela (2014).

La conservación de semen de las especies animales, es una biotecnología reproductiva de gran importancia, que busca promover la conservación del germoplasma masculino por un tiempo indeterminado. Esta biotecnología es asociada a la Inseminación Artificial y representa un mecanismo eficiente para la promoción y difusión de material genético de excelente calidad, (Ribeiro-Peres *et al.*, 2014).

Según Palmer (2005) demuestra que la utilización del electroeyaculador todavía se considera un procedimiento aceptable por la mayoría de los comités de bienestar animal. Sin embargo, en ciertos países europeos el electroeyaculador sin anestesia en toros se ha prohibido, según Mosure *et al.*, (1998). Basados en estos principios se a plateado el siguiente objetivo general de evaluar la respuesta al estrés por el uso de electroeyaculador en carneros con y sin tranquilizante, evaluando calidad seminal y la congelabilidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo de investigación se realizó en la granja Irquis de la Universidad de Cuenca ubicada en la parroquia Victoria del Portete, cantón Cuenca, provincia del Azuay, en el callejón interandino a una altitud de 2600 msnm, temperatura entre 10-14° C, con las siguientes coordenadas: 79°04'35.09" Longitud 3°04'48.7" latitud:

La extracción de semen se realizó de 4 carneros dos veces por semana durante un mes dando un total de 32 muestras de semen analizadas las mismas que fueron extraídas con y sin Xilacina cuyos resultados experimentales fueron sometidos a la estadística de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk para determinar la normalidad y para comprobar la hipótesis el Análisis de Varianza cuyo modelo aditivo es:

$Y_{ij} = u + T_i + E_{ij}$. Donde:

Y_{ij} = Valor estimado de la variable

u : media general

T_i : Efecto de la xilacina.

E_{ij} : Efecto de la aleatorización de los tratamientos.

Una vez obtenidas las muestras de los carneros, éstas fueron transportadas inmediatamente al laboratorio para realizar los siguientes análisis:

- Volumen
- Concentración: se midió en el fotómetro, que es el resultado en millones de espermatozoides por ml.
- Motilidad masal (MM), medida en una escala de 1 a 5, se colocó una gota de semen puro sobre un portaobjetos temperado a 37°C, sobre una platina térmica de microscopio y se observó a 40X.
- Motilidad individual progresiva (MIP) se observó al microscopio con lente de 40X, se colocó 10 ul de semen puro sobre un portaobjetos precalentado en la placa térmica a 37°C. Se evaluó en porcentaje (0-100%). Para determinar la MIP, se consideró los siguientes movimientos:
 - Progresivo rectilíneo: espermatozoides con movimiento activo y energético, con desplazamiento en sentido de avance.
 - Ondulatorio: movimiento lento, con pequeño desplazamiento originado por golpes lentos y laterales de la cola.
 - Rotatorio: movimientos sobre sí mismo con un radio reducido y cierta velocidad.
 - Espermatozoides inmóviles.
- Vitalidad Espermática (VE) y Anormalidades mediante la tinción eosina-nigrosina. En un portaobjetos precalentado a 37°C, se mezcló una gota de 5 ul de semen con una gota del mismo volumen de la tinción de eosina-nigrosina. A continuación se hizo un frotis con un

cubreobjetos (37°C), se observó al microscopio y se contó 100 espermatozoides en distintos campos, finalmente para determinar la VE se sacó un porcentaje entre espermatozoides vivos (cabeza blanca) y muertos (cabeza roja), lo mismo se hizo para las anomalías, se calculó el porcentaje entre espermatozoides normales y anormales (sin cola, macrocabezas, microcabezas, gota citoplasmática, etc).

- En general, el porcentaje aceptable de anomalías de cabeza es de 15-20%, mientras que las anomalías de acrosoma y cola se puede aceptar hasta un 25%. Fuese cual fuese el sistema de clasificación, en cualquiera de los casos se debe esperar un mínimo de 70% de espermatozoides normales en el eyaculado. (Gómez & Migliorisi, 2017)

Procesamiento del semen y crioconservación

El semen extraído se diluyó con AndroMed® El diluyente se preparó a 37°C, sobre la placa térmica, se colocó 200ml de AndroMed® en 800 ml de agua bidestilada.

El cálculo para el número de dosis por eyaculado, se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\# \text{ pajuelas} = \frac{V \times [] \times MIP}{50 \times 10^6}$$

V: volumen

[]: concentración

MIP: motilidad individual progresiva

50 x 10⁶: concentración espermática por pajuela

Se agregó la cantidad de diluyente, según la siguiente fórmula:

$$DT = \# \text{ pajuelas} - V$$

DT: diluyente total

V: volumen

Una vez calculado los volúmenes de semen y de AndroMed® se procedió a empajuelear, se procesó 10 pajuelas por eyaculado. Se colocó las pajuelas en un vaso de precipitación con agua destilada dentro del refrigerador hasta que alcanzó una temperatura de 5°C, aproximadamente en una hora (tiempo de equilibrio). Posteriormente se colocó las pajuelas en una rampa de flotación (dentro del mismo refrigerador) a la misma temperatura durante dos horas. Luego se colocó la rampa de flotación con las pajuelas dentro de una caja de espuma flex a una altura de 4 cm del nivel de nitrógeno líquido durante 10 minutos, posteriormente se realizó la inmersión de las pajuelas en nitrógeno y finalmente se colocaron dentro del termo de nitrógeno líquido a -196°C hasta realizar su evaluación post-descongelación.

Evaluación del semen post-descongelado

Transcurridos 7 días se descongeló las pajuelas, se sumergió en Baño maría (37°C por 1 minuto) y se evaluó las características cuali-cuantitativas de los espermatozoides. Se realizó las siguientes pruebas: MIP, VE, anormalidades y Test HOST.

Por medio de la prueba hipoosmótica (hypoosmotic swelling test HOST) se evaluó la integridad funcional de la membrana plasmática de los espermatozoides. Su principio consiste en suspender a los espermatozoides en un medio hipoosmótico, aquellos que son bioquímicamente activos (HOST +) permitirán la entrada de agua y mostrarán diferentes grados de turgencia en un esfuerzo por mantener la dinámica de equilibrio entre los líquidos de su compartimento intracelular y los del medio extracelular, como consecuencia, el espermatozoide aumenta su volumen con notables cambios en la morfología de sus flagelos: dilatación o enrollamiento.

Para evaluar el efecto de la permeabilidad de la membrana espermática mediante HOST, basándonos en el principio de que los azúcares y los electrolitos mantienen la integridad funcional de la membrana espermática. Por lo tanto, HOST es la técnica ideal para evaluar la permeabilidad de la membrana del espermatozoide independientemente de la especie.

Ésta prueba se realizó a los espermatozoides procedentes de las pajuelas descongeladas, para ello se preparó una mezcla en una relación 10:1, se colocó en una tubo Eppendorf de 1,5 ml: 100 µl de la solución de fructosa – citrato de sodio – agua destilada y 10 µl de la muestra espermática. Luego se llevó los tubos a la estufa, dónde se mantuvieron durante una hora a 37°C, 98% de humedad y 5% de CO₂. Finalmente se observó al microscopio y se contó 100 células, siendo positivos los espermatozoides que presentaron doblez o hinchazón en sus piezas medias o enrollamiento de sus colas.

El porcentaje de espermatozoides positivos a HOST se calculó con el número de células que presentaron modificaciones en sus colas sobre el número total de espermatozoides contados en la misma placa (Urrego et al., 2008).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos para la variable de diámetro testicular cumplieron con el supuesto de Normalidad según la prueba de Kolmogorov-Smirnov, no sucedió lo mismo con los resultados de la condición corporal y peso. Se aplicó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney y se comprobó que para diámetro testicular no hubo diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los dos tratamientos, demostrando que las medidas de diámetro testicular entre los carneros fueron parecidas (Tabla 1). Para los resultados correspondientes a condición corporal y peso no se

encontró diferencias significativas entre tratamientos ($P>0,05$), lo que nos indica que la condición corporal y peso de los animales estudiados fueron homogéneos.

Tabla 1 Diámetro testicular, Condición corporal y Peso de carneros sometidos a xilacina.

Variable	Tratamiento		Significancia
	Con Xilacina	Sin Xilacina	
	X ± EE	X ± EE	
Diámetro testicular (cm)	32,5 ± 0,29	32,4 ± 0,32	0,897
Condición corporal (Escala NIRD)	2,9 ± 0,03	2,9 ± 0,03	1,000
Peso (kg)	42,4 ± 0,39	42,4 ± 0,39	1,000

X ± EE: media ± error estándar de la media.
^{NS} No hay diferencias estadísticamente significativas ($P>0,05$), según Mann-Whitney.

El volumen de las muestras seminales de los carneros, cumplieron con el supuesto de normalidad al aplicar el tratamiento xilacina, según la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Mediante la Prueba de Mann-Whitney se observó que el volumen seminal presentó diferencias significativas ($P<0,05$) entre los dos tratamientos, siendo mayor en el que se aplicó xilacina (Tabla 2).

En lo que respecta a la concentración espermática, los valores que cumplieron con las condiciones de normalidad de datos, fueron los correspondientes al tratamiento con xilacina, según se observan los resultados de las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y la de Shapiro-Wilk. Se encontraron además diferencias significativas ($P<0,05$) en la concentración espermática entre los dos tratamientos (Tabla 2) siendo mayor en el tratamiento que se aplicó el tranquilizante, para ello se utilizó la prueba de Mann-Whitney.

El volumen de semen obtenido con tranquilizante fue 0,27ml superior a la media del tratamiento sin tranquilizante. Si bien éstos volúmenes son bajos, fueron similares a los obtenidos según Marco-Jiménez *et al.*, (2008) cuya investigación se realizó en carneros de raza Guirra a los que se les inyectó xilacina previo a la introducción del electroeyaculador ($1,01 \pm 0,1$ ml). El volumen de semen obtenido en la presente investigación se contraponen a los reportados por Ledesma *et al.* (2014) puesto que registró un volumen promedio $3,99 \pm 0,386$ ml y con los resultados obtenidos por Pineda *et al.*, (1987), Pineda y Dooley., (1991) quienes obtuvieron grandes volúmenes seminales utilizando electroeyaculador como método de colecta.

Los resultados de la prueba de HOST para los dos tratamientos cumplieron con los supuestos de normalidad de datos según las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y la de Shapiro-Wilk. Mediante la prueba estadística de Mann-Whitney no se encontraron diferencias significativas ($P>0,05$) para esta variable.

En las pajuelas descongeladas con el tratamiento sin tranquilizante se obtuvo 1,25% siendo superior en vitalidad espermática del tratamiento con xilacina. Al respecto Álvarez *et al.*, (1992) y García-Álvarez *et al.*, (2009) reportan que el porcentaje de vivos post-descongelación

disminuye en gran medida en relación a las muestras en fresco (39,1% y 37% respectivamente).

La motilidad masal, motilidad individual progresiva, anormalidad en fresco, anormalidades pos descongelación y espermatozoides vivos después de la descongelación no cumplieron con las condiciones de normalidad de datos en ninguna de las pruebas (Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk). Sin embargo, al realizar la prueba de Mann-Whitney se observó significancia ($P < 0,05$) entre tratamientos para las variables de Vivos en fresco y de Motilidad Post-descongelación (Tabla 3), lo que nos indica que los porcentajes de espermatozoides vivos en fresco y la motilidad de éstos luego de descongelar las pajuelas fue mayor en el tratamiento que se aplicó xilacina previo a la extracción de semen en relación al tratamiento sin tranquilizante.

Tabla 2 Variables del Análisis Seminal que presentaron significación

Variable	Tratamiento		Significancia
	Con Xilacina	Sin Xilacina	
	X ± EE	X ± EE	
Volumen (ml)	0,92 ± 0,027 ^a	0,65 ± 0,013 ^b	0,000
Concentración (10 ⁶ esp/ml)	901,2 ± 18,67 ^a	807,4 ± 14,67 ^b	0,002
Vivos1 (%)	63,7 ± 1,25 ^a	56,9 ± 1,20 ^b	0,005
Motilidad Post-desc (%)	50,0 ± 2,24 ^a	43,7 ± 1,80 ^b	0,043

X ± EE: media ± error estándar de la media.
^{a,b} Superíndices distintos indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$), según Mann-Whitney

Tabla 3 Variables del Análisis seminal que no presentaron significación

Variable	Tratamiento		Significancia
	Con Xilacina	Sin Xilacina	
	X ± EE	X ± EE	
<i>Motilidad masal</i> (escala 1-5)	3,66 ± 0,075	3,72 ± 0,08	0,780
<i>Motilidad individual progresiva</i> (%)	58,13 ± 1,36	59,38 ± 1,11	0,590
<i>Anormalidades del semen fresco</i> (%)	11,88 ± 1,008	13,13 ± 1,11	0,445
<i>Vivos2</i> (%)	55,0 ± 1,60	56,25 ± 1,25	0,491
<i>Anormalidad semen descongelado</i> (%)	13,13 ± 1,20	13,13 ± 1,20	1,000
<i>HOST</i> (%)	29,81 ± 1,67	30,70 ± 1,71	0,838

X ± EE: media ± error estándar de la media.
^{NS} No hay diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$), según Mann-Whitney.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- Se obtuvo eyaculados con mayor volumen, concentración espermática y porcentaje de espermatozoides vivos, en el tratamiento con la aplicación xilacina al 2% previo a la técnica de electro eyaculación.
- El método de congelación de pajuelas fue eficaz, debido a que se obtuvo un porcentaje considerable de motilidad post-descongelación, ya que el número de espermatozoides que presentan anomalías aumentó ligeramente, siendo similar al obtenido en fresco.

Por lo que se recomienda

- Aplicar Xilacina al 2% anterior a la aplicación a la electroeyaculación para obtener mayor volumen, concentración espermática y porcentaje de espermatozoides vivos.
- Para un mejor efecto del tranquilizante, se debe evitar que el animal pase por estrés durante la etapa de inducción, ya que esta condición no permite una sedación óptima.

LITERATURA CITADA

- Gómez, M., & Migliorisi, A. (17 de 05 de 2017). *Sitio Argentino de Producción Animal*. Obtenido de Sitio Argentino de Producción Animal: http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/cria_toros/49-ProtocoloEvalSemen.pdf
- Mosure, W., Meyer, R., Gudmundson, J., & Barth, A. (1998). Evaluation of possible methods to reduce pain associated with electroejaculation in bulls. *Can Vet J*, 504-506.
- Orihuela, A. (2014). La conducta sexual del carnero. Revisión. *Rev Mex Cienc Pecu*, 49-89.
- Palmer, C. W. (2005). Investigating alternatives to electroejaculation of bulls. *Theriogenology*, 469-479.
- Pineda, M., & Dooley. (1991). Effect of method of seminal collection on the retrograde flow of spermatozoa into the urinary bladder of rams. *Am J Vet Res*, 307-13.
- Pineda, M., Dooley, M., Hembrough, & Hsu. (1987). Retrograde flow of spermatozoa into the urinary bladder of rams. *Am J Vet Res*, 562-8.
- Ribeiro-Peres, A., Munita-Barbosa, L., Yumi-Kanazawa, M., Mello-Martins, M., & Ferreira de Souza, F. (2014). Criopreservación de espermatozoides bovinos extraídos de la cola del epidídimo utilizando los métodos convencional y automatizado. *Med Vet* 46, 31-38.
- Urrego, R., Ríos, A., Olivera Ángel, M., & Camargo, O. (2008). Efecto de la centrifugación sobre la membrana plasmática y el ADN de espermatozoides bovinos. *Revista Colombiana Ciencias Pecuarias* 21, 19-26.