

# Evaluación de Diferentes Diluyentes Comerciales para la Criopreservación de Semen Bubalino

Área del Conocimiento: Ciencias Agropecuarias

Becario/a: BUZAGLO, Ana Laura.

Director/a: KONRAD, José Luis.

Facultad: Facultad de Ciencias Veterinaria - UNNE

E-mail: sprivadar@vet.unne.edu.ar

## Objetivos

La criopreservación de semen es una importante biotecnología reproductiva, que busca promover la conservación del germoplasma masculino por tiempo indeterminado. Esta biotecnología, cuando se asocia a la inseminación artificial (IA), representa un mecanismo eficiente para la promoción y difusión de material genético de excelente calidad. La aplicación de IA con semen congelado-descongelado se ha informado en una escala limitada en búfalos, debido a la baja congelabilidad y fertilidad de los espermatozoides de búfalo en comparación con los espermatozoides de vacunos. Después del descubrimiento de las propiedades crioprotectoras de la yema de huevo, se ha utilizado tradicionalmente en diluyentes de semen para la criopreservación de casi todas las especies de ganado, incluido el búfalo. La yema de huevo protege al espermatozoide de los daños inducidos por la criopreservación durante el enfriamiento, congelación y descongelación al interactuar directamente con la membrana plasmática de la célula. Tradicionalmente se ha usado la yema proveniente del huevo de la gallina, pero recientemente han investigado el uso de yema de gallina de guinea y de pato, concluyendo que esta última mejora la viabilidad post descongelación del semen de búfalo. Hoy día, también están disponibles comercialmente una amplia gama de diluyentes químicamente definidos y de origen no animal, que tienden a reemplazar la inclusión de la yema de huevo, de los cuales se necesita más datos para conocer su efecto sobre la criopreservación del semen de búfalo. Por esto el objetivo de este trabajo fue evaluar diferentes tipos de diluyentes comerciales, y su efecto sobre la calidad del semen bubalino post descongelado.

## Materiales y Métodos

El trabajo se realizó en el Centro Integral de Inseminación Artificial Bubalina (CIIAB), cabaña de búfalos Pedro Antonio Silva (h), ubicado en la Localidad de General Paz, provincia de Corrientes. La recolección de semen se hizo por el método de vagina artificial, colectándose en un tubo anexado al extremo de la misma. Se utilizó para obtener la muestra reproductor búfalo de 3 años de edad, raza Murrah, RP18, apto sanitaria y andrológicamente. Luego de realizarse los análisis sobre el semen fresco (examen macroscópico y microscópico) y determinando su aptitud, se procedió a su criopreservación. Se realizaron las distintas diluciones con los diluyentes a evaluar, los cuales fueron: Tratamiento 1 Triladyl® con yema de huevo de gallina, Tratamiento 2 Triladyl® con yema de huevo de pato, Tratamiento 3 Triladyl® con yema de huevo de codorniz, Tratamiento 4 Optidux® y Tratamiento 5 Andromed®. Luego se cargaron las pajuelas de 0,5ml correctamente identificadas y se procedió a su criopreservación. Para realizar este proceso se utilizó una congeladora de semen (NeoVet®, Brasil). El semen fue colocado en nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$  y almacenado en termos criogénicos.

Para el análisis del semen criopreservado, se procedió a descongelar 6 pajuelas de cada tratamiento. Realizándose las pruebas de termoresistencia, análisis de morfología espermática y concentración. Para el test de termoresistencia se mantuvo el semen a  $37^{\circ}\text{C}$  y se procedió a evaluar a las 0 horas, 1 hora y a las 2 horas, los siguientes parámetros: Motilidad en masa y Motilidad individual o vigor. Para la morfología se utilizó la técnica de tinción con eosina-nigrosina, se observó al microscopio contando alrededor de 100 células y clasificando en normales, y los diferentes defectos. En cuanto a la concentración, fue evaluada luego de la dilución del semen 1:200 en una solución salina formolada, utilizando la cámara de Neubauer para el conteo donde el valor obtenido fue dado en millones/mm<sup>3</sup>.

Con los datos obtenidos se realizó medidas de resumen, media y desvío estándar; el análisis comparativo de los tratamientos se realizó por medio de un análisis de varianza (ANOVA).

## Resultados y Discusión

La concentración promedio de las muestras analizadas fue de  $52,4 \pm 7,8$  millones de espermatozoides por dosis. En la evaluación de la morfología, la proporción de espermatozoides normales fue de  $85,2 \pm 4,2$ , y el porcentaje de defectos mayores fue de  $9 \pm 2,9\%$ , y de defectos menores fue de  $5,8 \pm 1,9\%$ . No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ( $p > 0,05$ ). Tanto los valores observados para concentración como de defectos están dentro de los rangos aceptables para las dosis de semen criopreservado.

En la prueba de termoresistencia, la motilidad a la hora 0 fue menor en los tratamientos 1 (37,5), 2 (37,5), y 3 (40), con respecto a los tratamientos 4 (70) y 5 (70), diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). El vigor a la hora 0 no arrojó diferencias significativas, observando valores de entre 3 y 4 en los diferentes tratamientos ( $p > 0,05$ ). La motilidad microscópica a la hora 2 fue significativamente menor en los tratamientos 1 (15), 2 (12,1), 3 (13,3), y 4 (8,3), con respecto al tratamiento 5 (35) ( $p < 0,05$ ); al igual que el vigor evaluado a la hora 2 con resultado por tratamientos de: 1 (1,8), 2 (1,7), 3 (1,8), y 4 (1), con respecto al tratamiento 5 (2,75) ( $p < 0,05$ ). Para que una muestra resulte apta para su uso post descongelado debe tener un mínimo de 20% de espermatozoides motiles con un vigor de 2, después de dos horas de incubación a  $37^{\circ}\text{C}$ , por lo que sólo las muestras del tratamiento 5 resultaron aptas para su uso en inseminación artificial. En el presente trabajo el diluyente comercial Optidux® resultó más eficiente para la criopreservación de semen bubalino, pero se requieren más pruebas, con mayor cantidad de reproductores para confirmar esta hipótesis.

