

Efecto del centrifugado y la adición de yema de huevo al diluyente en el semen refrigerado de caprinos cruza Anglo Nubian x Boer

Effect of centrifuging and the addition of egg yolk to the diluent on the refrigerated semen of Anglo Nubian x Boer cross goats

Marcos Puente^{1*}, Ignacio Covelo¹, Mabel Tartaglione¹

RESUMEN

Muchos diluyentes para la crioconservación del semen caprino incluyen yema de huevo, que al interaccionar con la enzima fosfolipasa presente en el plasma seminal produce sustancias citotóxicas que dañan al espermatozoide. La eliminación del plasma seminal por centrifugado soluciona esta problemática, sin embargo, este procedimiento puede generar daños a la célula. El objetivo del trabajo de investigación fue refrigerar semen durante 48 h con 2% de yema de huevo sin centrifugación, 20% de yema de huevo con centrifugación y sin yema de huevo como control. Los resultados obtenidos demostraron que la calidad del semen luego de la refrigeración mejora con el agregado de yema de huevo, independientemente del porcentaje empleado. Según los porcentajes de yema de huevo, luego de 24 h los mejores resultados se obtuvieron con 20% centrifugado, mientras que luego de las 48 h, los mejores resultados fueron obtenidos con 2% sin centrifugar.

Palabras clave: caprino, centrifugado seminal, espermatozoides, lecitina

ABSTRACT

Many extenders for cryopreservation of goat semen include egg yolk, which, when interacting with the phospholipase enzyme present in seminal plasma, produces cytotoxic

¹ *Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Lomas de Zamora, Argentina*

* *Autor correspondiente: Marcos Puente; ingmarcospuente@gmail.com*

Recibido: 27 de noviembre de 2023

Aceptado para publicación: 20 de noviembre de 2024

Publicado: 28 de febrero de 2025

©Los autores. Este artículo es publicado por la Rev Inv Vet Perú de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original

substances that damage sperm. Removing seminal plasma by centrifugation solves this problem; however, this procedure can cause damage to the cell. The aim of this study was to keep chilled semen for 48 h with 2% egg yolk without centrifugation, 20% egg yolk with centrifugation and no egg yolk as a control. The results obtained showed that semen quality after refrigeration improves with the addition of egg yolk, regardless of the percentage used. According to the egg yolk percentages, after 24 h the best results were obtained with 20% centrifuged, while after 48 h, the best results were obtained with 2% without centrifugation.

Keywords: goat, seminal centrifuge, sperm, lecithin

INTRODUCCIÓN

Muchos diluyentes tradicionales para la criopreservación de los espermatozoides incluyen yema de huevo, cuyos componentes principales son lipoproteínas de baja densidad (LDL) y fosfolípidos. La lecitina, fosfolípido presente en la yema, disminuye los daños provocados por la baja temperatura sobre los espermatozoides (Moreno-Avalos *et al.*, 2021).

Se tienen muchas similitudes entre el semen caprino y el de otras especies domésticas, así como diluyentes y curvas de enfriamiento; sin embargo, el semen caprino requiere especial atención al momento de su crioconservación. En esta especie se presenta una interacción negativa entre la lecitina y una enzima presente en el plasma seminal, la fosfolipasa coagulante, la cual transforma la lecitina en lisolecitina, sustancia citotóxica para los espermatozoides (Ngoma *et al.*, 2016). Asimismo, diversos estudios debaten la conveniencia de centrifugar el semen para retirar el plasma seminal y de esa forma, eliminar el riesgo de toxicidad generado por la lisolecitina; sin embargo, centrifugar el semen puede ocasionar daños en los espermatozoides (Cabrera *et al.*, 2005; Miro *et al.*, 2009; Sariozkan *et al.*, 2010).

Teniendo en cuenta, por un lado, el efecto deletéreo de los derivados citotóxicos de la yema de huevo por interacción con la enzi-

ma presente en el plasma seminal, lo cual hace necesario la centrifugación del semen, y por otro lado, el efecto perjudicial que puede generar el proceso de centrifugado sobre la integridad del espermatozoide, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la calidad espermática luego de refrigerar el semen centrifugado y sin centrifugar y agregando dos proporciones de yema de huevo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se trabajó con tres machos cabríos cruce Anglo Nubian x Boer pertenecientes al Módulo Experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Loma de Zamora, ubicado en la Provincia de Buenos Aires, Argentina. Los animales fueron sometidos a un ritmo semanal de recogida seminal. Se recolectaron 24 eyaculados, de los cuales algunos fueron desechados por tener una motilidad masal inferior a 4. De esta manera, en el ensayo se utilizaron seis eyaculados por macho dando un total de 18 eyaculados. Para la recogida se utilizó una vagina artificial a una temperatura de 42-45 °C y una hembra en celo como señuelo para la monta. Las muestras fueron mantenidas a 37 °C durante un periodo no mayor a 15 minutos, tiempo suficiente para observar la motilidad masal y luego dividirlo en tres alícuotas para su dilución.

Los animales se mantuvieron en el módulo experimental durante todo el estudio. Estuvieron supervisados y controlados por el comité institucional asesor de ética, cuidado y utilización de animales para experimentación (Resolución N.º C.A.A./123 Expediente N.º A/22.839/2017).

Dilución y Tratamientos

Se determinó el volumen, la motilidad masal e individual de cada eyaculado para luego dividirlo en tres partes iguales, según tratamientos.

La dilución fue realizada con el diluyente TCF con la siguiente formulación por 100 ml: 2 g de Tris (Sigma), 2.5 g de D-Fructosa (Sigma), 0.90 g de Ácido Cítrico monohidrato granular (Baker) y 1 ml de antibiótico penicilina-estreptomicina (Sigma).

Los tratamientos quedaron conformados de la siguiente forma:

- Semen sin centrifugar diluido con el diluyente TCF (tris-ácido cítrico-fructosa y antibiótico), sin yema de huevo.
- Semen sin centrifugar diluido con el diluyente TCF con 2% de yema de huevo.
- Semen centrifugado a 1500 g durante 5 min para retirar el plasma seminal y luego diluir los espermatozoides con el diluyente TCF con 20% de yema de huevo.

Las muestras fueron refrigeradas a 5 °C durante 48 h. Se evaluó la calidad espermática a las 24 y 48 h. Los parámetros evaluados fueron la viabilidad utilizando la técnica de Eosina-Nigrosina al 5% y la integridad de membrana plasmática mediante el Test de HOS desarrollado por Van der Ven *et al.*, (1986).

Análisis Estadístico

Se trabajó con el software Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2020) para los análisis estadísticos. Se realizó un análisis de varianza simple (ANOVA) para un diseño en bloque completamente aleatorizado (DBCA) para un modelo de efectos fijos. Las variables de-

pendientes fueron el porcentaje de espermatozoides vivos y el porcentaje de espermatozoides con integridad de membrana. Las variables independientes fueron los tratamientos. Se verificó el supuesto de Normalidad con el Test de Shapiro-Wilks y el de Homogeneidad mediante el Test de Levene. Asimismo, se utilizó el Test DGC para la comparación de medias. En todos los casos se consideró un nivel de significancia de 5%.

RESULTADOS

Los resultados de refrigerar el semen durante 24 h muestran que ambos tratamientos con yema de huevo aumentan de manera significativa el porcentaje de espermatozoides vivos y con integridad de la membrana plasmática con respecto a los espermatozoides refrigerados sin yema de huevo. Por otro lado, no se evidenciaron diferencias estadísticas entre los dos tratamientos con yema de huevo (Cuadro 1). La evaluación a las 48 h mostró las mismas tendencias (Cuadro 1).

En el análisis de los datos por cada macho se encontró que uno tuvo resultados más bajos que los otros dos en los parámetros de calidad seminal, tanto a las 24 como a las 48 h de refrigerado el semen. Sin embargo, estas muestras, aun teniendo menor calidad, se comportaron de igual manera con el agregado de 2 y 20% de yema de huevo teniendo mejores resultados que las muestras refrigeradas sin yema de huevo.

DISCUSIÓN

Tradicionalmente, para preservar la calidad espermática durante la crioconservación, se incluye yema de huevo al diluyente debido a que esta protege al espermatozoide de los daños que se producen durante el enfriamiento al interactuar directamente con la membrana plasmática (Akçay *et al.*, 2012). Sin embargo, debido a la composición compleja

Cuadro 1. Porcentaje de espermatozoides vivos y con integridad de membrana luego de refrigerar por 24 y 48 h las muestras con 0% yema de huevo sin centrifugar (tratamiento 0 control), 2% yema de huevo sin centrifugar (tratamiento 2) y 20% yema de huevo centrifugado (tratamiento 20)

Tratamiento		Porcentaje de espermatozoides vivos	Porcentaje de espermatozoides con integridad de membrana
Horas de refrigeración	Yema de huevo (%)		
24 h	0	64.3 ± 11.0 ^a	55.7 ± 7.0 ^a
	2	73.7 ± 11.0 ^b	60.0 ± 7.0 ^b
	20	75.0 ± 10.5 ^b	63.2 ± 6.6 ^b
48 h	0	61.7 ± 12.1 ^a	51.9 ± 8.4 ^a
	2	68.9 ± 9.0 ^b	58.1 ± 5.7 ^b
	20	69.6 ± 11.2 ^b	58.5 ± 7.1 ^b

Los valores representan la media ± DE

^{a,b} Letras diferentes dentro de columnas y por horas de refrigeración indican diferencia significativa ($p > 0.05$)

de la yema de huevo, algunos autores plantean la dificultad de evaluar sus beneficios (Kulaksýz *et al.*, 2010).

Para evitar el efecto tóxico causado por las lisolecitinas presente en la yema de huevo, diversos investigadores sugieren que la eliminación del plasma seminal es beneficioso para la supervivencia espermática cuando se utiliza un diluyente con yema de huevo (Leboeuf *et al.*, 2000; Purdy, 2006; Ustuner *et al.*, 2009). Por otro lado, también se plantea las ventajas del centrifugado del semen, pero dependiendo del porcentaje de yema de huevo que se le agregue al diluyente (Cabrera *et al.*, 2005; Sariozkan *et al.*, 2010). En esta investigación se observaron mejores resultados de viabilidad espermática y de integridad de la membrana plasmática cuando el semen fue refrigerado con el agregado de yema de huevo con respecto al refrigerado sin yema de huevo. Sin embargo, no se encontró respuesta a la disyuntiva si conviene o no centrifugar el semen teniendo en cuenta el porcentaje de yema de huevo presente en el diluyente.

En semen congelado, Ferreira *et al.* (2014) encontraron mejores resultados con 10% de yema de huevo; asimismo, indican

que la presencia de plasma seminal proporciona una mayor viabilidad del semen criopreservado, datos que concuerdan con Viana *et al.* (2006). No obstante, el estudio de Ferreira *et al.* (2014), si bien esta realizado con semen congelado, se contrapone con los resultados observados en este trabajo donde a las 48 h de refrigerado se obtiene mejores resultados utilizando menor porcentaje de yema de huevo y plasma seminal.

A diferencia de los resultados del presente estudio, Azerêdo *et al.* (2001), Gil *et al.* (2002) y Viana *et al.* (2006) encontraron efectos perjudiciales en los espermatozoides después de la centrifugación para eliminar el plasma seminal por acción de la adición de la yema de huevo al diluyente. Por otro lado, Sariozkan *et al.* (2010) encontraron un efecto beneficioso de la centrifugación y la eliminación del plasma seminal en la calidad del semen caprino.

Cabrera *et al.* (2005) plantean que el efecto de la concentración de yema de huevo en el diluyente de congelación fue mucho más importante que el efecto del centrifugado. Una baja concentración de yema de huevo (1.5%) no protegía adecuadamente a los espermatozoides contra el daño causado por

la congelación y descongelación, ya que la supervivencia después de la criopreservación disminuye independientemente del lavado. La inclusión del 12% de yema de huevo eclipsó el efecto del lavado en el semen, lo que sugiere que una alta concentración de yema de huevo en el diluyente podría desactivar las enzimas del plasma seminal, haciendo que el lavado no sea importante.

El estudio de cómo afecta la yema de huevo y el centrifugado a la calidad de los espermatozoides no es actual. Ritar y Salomon (2012) demostraron que el centrifugado fue beneficioso para la supervivencia de espermatozoides frescos o después de la congelación y descongelación. Sin embargo, el efecto beneficioso dependía de la intensidad del procedimiento de lavado; es decir, la proporción de dilución del semen antes del lavado y el número de centrifugaciones, donde el lavado doble fue más efectivo que el lavado simple. En igual sentido, Hernández-Corredor *et al.*, (2013), recomiendan que el lavado del semen caprino se puede evitar en diluyentes con un contenido de yema de huevo menor a 1.5%, pero el lavado es una necesidad para la concentración de yema de huevo estándar de 10%.

Existen muchos trabajos de investigación donde se evalúa el efecto de la yema de huevo y la centrifugación en la calidad de los espermatozoides cuando se conservan de manera congelada; sin embargo, es escasa la información cuando la conservación es de manera refrigerada, lo que hace que los resultados de la presente investigación sean relevantes.

CONCLUSIÓN

Se puede concluir que para refrigerar espermatozoides caprinos durante 24 h el mejor resultado se obtuvo con 20% de yema de huevo y centrifugado (sin plasma seminal), y para la refrigeración por 48 h, el mejor resultado es con 2% sin centrifugar (con plasma seminal).

LITERATURA CITADA

1. **Akçay E, Kulaksýz R, Dapkin A, Cebi C, Tekin K. 2012.** The effect of different dilution rates on post-thaw quality of ram semen frozen in two different egg-yolk free extenders. *Slovenian Vet Res.* 49: 97-102. doi: 10.13140/RG.2.1.3368.2401
2. **Azerêdo G, Esper C., Resende K. 2001.** Evaluation of plasma membrane integrity of frozen thawed goat spermatozoa with or without seminal plasma. *Small Ruminant Res* 41: 257-263. doi: 0.1016/S0921-4488(01)00189-4
3. **Cabrera F, Gonzalez F, Batista M, Calero P, Medrano A, Gracia A. 2005.** The effect of removal of seminal plasma, egg yolk level and season on sperm freezability of canary buck (*Capra hircus*). *Reprod Domestic Anim* 40: 191-195. doi: 10.1111/j.1439-0531.2005.-00544.x
4. **Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. 2020.** InfoStat v 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar>
5. **Ferreira V, Mello M, Fonseca C, Dias A, Cardoso J, Silva R, Martins W. 2014.** Effect of seminal plasma and egg yolk concentration on freezability of goat semen. *Rev Bras Zootec* 43: 513-518.
6. **Gil J, Rodriguez-Irazaqui M, Soderquist L, Martinez H. 2002.** Influence of centrifugation or low extension rates pre freezing on the fertility of semen after cervical insemination. *Theriogenology* 57: 1781-1792. doi: 10.1016/s0093-691x(02)-00652-0
7. **Hernández-Corredor L, Nivia-Osuna A, Hernández-Villamizar D, Rubio-Parada J, Quintero-Moreno A. 2013.** Evaluación de la motilidad espermática a través del sistema C.A.S.A de semen caprino criopreservado bajo diferentes medios diluyentes. *Respuestas UFPS* 18: 16-27.

8. **Kulaksiz R, Çebi Ç, Akçay E, Dapkın A. 2010.** The protective effect of egg yolk from different avian species during the cryopreservation of Karayaka ram semen. *Small Ruminant Res.* 88: 12-15. doi: 10.1016/j.smallrumres.2009.11.014
9. **Leboeuf B, Restall B, Salomon S. 2000.** Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim Reprod Sci* 62: 113-141. doi: 10.1016/s0378-4320(00)00156-1
10. **Miro J, Taberner E, Rivera M, Peña A, Medrano A, Rigau T, Peñalba A. 2009.** Effects of dilution and centrifugation on the survival of spermatozoa and the structure of motile sperm cell subpopulations in refrigerated Catalanian donkey semen. *Theriogenology* 72: 1017-1022. doi: 10.1016/j.theriogenology.2009.06.012
11. **Moreno-Avalos S, Veliz-Deras F, Calderon-Leyva G, Contreras-Villareal V, Guillen-Muñoz J, Angel-García O. 2021.** Determinación de la calidad del semen criopreservado con lecitina de soya o yema de huevo, en machos cabríos. *Abanico Veterinario* 11(1): 1-12.
12. **Ngoma L, Kambulu L, Mwanza M. 2016.** Factors influencing goat's semen fertility and storage: a literature review. *J Human Ecology* 56: 114-125.
13. **Purdy P. 2006.** A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Res* 63: 215-225. doi: 10.1016/j.smallrumres.2005.02.015
14. **Ritar A, Salomon S. 1982.** Effects of seminal plasma and of its removal and of egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the Angora goat. *Austr J Biol Sci* 35: 305-212.
15. **Sariozkan S, Bucak M, Tuncer P, Tasdemi U, Kinet H, Ulutas A. 2010.** Effects of different extenders and centrifugation/ washing on postthaw microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of Angora buck sperm. *Theriogenology* 73: 316-323. doi: 10.1016/j.theriogenology.2009.09.015
16. **Ustuner B, Gunay U, Nur A. 2009.** Effect of seminal plasma, egg yolk, and season on the freezability of Saanen buck semen. *Bull Vet Inst Pulawy* 53: 369-374.
17. **Van der Ven HH, Jeyendran R, Al-Hasani S, Perez-Pelaez M, Didericj K, Zeneveld L. 1986.** Correlation between human sperm swelling in hypoosmotic medium (hypoosmotic swelling test) and «in vitro» fertilization. *J Androl* 7: 190-196. doi: 10.1002/j.1939-4640.1986.tb00909.x
18. **Viana A, Chalhoub M, Ribeiro Filho A, Almeida A, Portela A, Bittencourt R, Alves S, Bittencourt T, Quintela A. 2006.** Avaliação in vitro do sêmen caprino resfriado, com ou sem centrifugação do plasma seminal e diluído em leite desnatado-glicose e tris-gema de ovo. *Ciência Animal Brasileira* 7: 67-76.