

EL AGUA DE COCO COMO DILUTOR DEL SEMEN CAPRINO

COCONUT WATER AS A CAPRINE EXTENDER

José Ferreira Nunes

Universidade Estadual Do Ceará
Faculdade de Medicina Veterinária
Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos (CE) Brasil.

RESUMEN

Con el propósito de evaluar tanto "*in vitro*" como "*in vivo*" la eficiencia del agua de coco como dilutor del semen caprino, fueron colectados con vagina artificial cinco reproductores de la raza Saanen. La prueba "*in vitro*" consistió en la división del semen en dos alícuotas, una se diluyó en leche glucosada y otra en agua de coco, que se evaluaron por termorresistencia a 37°C. Después de 180 minutos de incubación el semen diluido en leche y en agua de coco presentaron 30% y 1.5 y 45% y 3.0 de espermios vivos y motilidad respectivamente. La evaluación "*in vivo*" fue realizada a través de la sincronización del ciclo estrual de 380 cabras, de las cuales 220 fueron inseminadas artificialmente con semen diluido en agua de coco estabilizada y esterilizada en ampollas, y 160 cabras fueron inseminadas con semen diluido en leche. Se observaron efectos (P<0.05) para la tasa de parición y prolificidad (60% y 1.1 Vs 68% y 1.8) para el semen diluido en leche y en agua de coco respectivamente. El Porcentaje de crías hembras nacidas de cabras inseminadas con semen diluido en agua de coco fue mayor al de las inseminadas con semen diluido en leche (72 Vs 43). El agua de coco como dilutor del semen caprino podría constituirse en una opción para el procesamiento del semen caprino en la inseminación artificial, a la vez que hace más accesible la técnica para los productores.

Palabras claves: agua de coco, dilutor de semen, semen caprino, relación del sexo.

ABSTRACT

The but of this work was to evaluate both "*in vivo*" and "*in vitro*" the efficiency of coconut water as a buck semen extender. Five Saanen bucks were collected by artificial vagina for semen evaluation. Two semen samples were taken from the same ejaculate; one was diluted in milk-glucose and the other, in coconut water. Both samples were kept at 37 °C for 180 minutes. Live sperm and motility were 30%, 1.5%; 45% and 3.0

respectively. "*In vivo*" evaluation was done after estrous synchronization of 380 does; 220 were artificially inseminated with semen diluted in coconut water sterilized and stabilized in ampoules and 160 were inseminated with semen diluted in milk extender. Kidding rate and prolificacy were significantly different (P<0.05) and their values were 60% and 1.1 vs 68% and 1.8 for milk and coconut water extenders respectively. Female newborn rate was greater in goats inseminated with semen extended in coconut water than with semen extended in milk (72 vs 43%). Coconut water as a semen extender could be considered as a good option for caprine semen use in artificial insemination.

Key words: coconut water, semen extender, buck semen, birth rate.

INTRODUCCIÓN

El plasma seminal de los caprinos disminuye la resistencia de los espermatozoides para soportar la congelación [2]. Durante el procesamiento del semen, las células espermáticas permanecen bajo la acción de los efectos negativos del plasma seminal bien sea a + 37°C ó bajo cero. Basado en este hecho, inicialmente se consideró la posibilidad del lavado de los espermatozoides, disminuyendo de esta forma el efecto negativo del plasma seminal, el cual contiene una enzima del tipo fosfolipasa "A", que actúa sobre los fosfolípidos de los dilutores normalmente utilizados liberando lisolecitinas y ácidos grasos que son particularmente tóxicos para los espermatozoides [14, 10].

La secreción de la enzima fosfolipasa "A", proviene de las glándulas de Cowper, y su acción dependerá de la presencia de sustancias fosfolípídicas en la leche utilizada como dilutor en el congelamiento del semen.

Fueron analizadas y estudiadas todas las formas para disminuir la interacción de la enzima con el substrato. Se intentó retirar el plasma seminal a través del lavado del semen así como la cowperectomía de los reproductores donadores de semen [3, 6]. La extracción de las glándulas de Cowper mejoró significativamente la calidad "*in vitro*" de los espermatozoides después de la congelación, inclusive los espermatozoides pre-

sentaron pocas anormalidades de membrana en comparación al semen proveniente de animales no cowperectomizados (6.5 vs 50%) [5].

La eliminación del plasma seminal, intentando minimizar los efectos negativos de la congelación sobre el semen pudiera también, traer consecuencias negativas para la capacitación "in vivo" de los espermatozoides, debido a que el plasma seminal contiene una serie de enzimas y sustancias importantes para la fertilidad del semen así como para la propia tasa de degradación de la motilidad espermática [11].

Es también conocido, que el plasma seminal ofrece toda la fructosa y el ácido cítrico que requiere el semen caprino, a través de las secreciones vesiculares [7, 8]. El plasma seminal interviene en la estabilización y condensación de la cromatina nuclear del espermatozoide, por intermedio de las secreciones prostáticas, específicamente a través del zinc [9]. Del plasma seminal humano se aisló un factor "P" que posee un efecto favorable "in vitro" sobre la motilidad de los espermatozoides de bovinos, ovinos y caprinos [4].

Conseguir un método alternativo que permitiera el procesamiento del semen caprino suprimiendo o disminuyendo los efectos negativos de la fosfolipasa "A" sobre el semen, se convirtió en prioridad de investigación en el área de tecnología del semen caprino. La identificación de un dilutor pobre en fosfolípidos, podría ser una opción siempre y cuando fuese posible su buen desempeño tanto "in vivo" como "in vitro", medido por la calidad del semen, tiempo de sobrevivencia primero a +37°C, luego a +4°C y finalmente a -196°C. Este comportamiento se correlaciona con la fertilidad de las hembras inseminadas con el semen procesado con la nueva tecnología. Dentro de las alternativas de los dilutores pobres en fosfolípidos, se ha demostrado a través de experimentos que el agua de coco "in vivo" e "in vitro" favorece el comportamiento del semen y de su fertilidad. La motilidad y el porcentaje de espermatozoides vivos a +4°C fueron significativamente superiores en el semen diluido con agua de coco al compararlo con el semen diluido en leche. El tiempo de sobrevivencia de los espermatozoides está alrededor de 60 horas en agua de coco vs 6 horas en leche [12]. La fertilidad de las cabras inseminadas con semen diluido en agua de coco es superior a las inseminadas con semen diluido en leche, además se obtiene un mayor número de crías hembras [12].

Las investigaciones en busca de dilutores para diversas especies, llevo inclusive, a algunos, a trabajar con la leche de coco [1, 10, 13] encontrando, que la leche de coco tiene en su constitución una cantidad razonable de fosfolípidos que dificulta su empleo con el semen caprino.

Luego de estos resultados preliminares favorables con el agua de coco bajo la forma "in natura", se hace necesario conocer el mecanismo de acción de los componentes del agua de coco sobre el metabolismo "in vitro" del semen caprino y su

posible acción sobre la fisiología de los cromosomas que determinan el sexo de las crías, lograr la estabilización del agua de coco en forma sintética para facilitar su uso, así como la difusión de la técnica para trabajar en la inseminación artificial de caprinos. Este trabajo tiene como objetivos evaluar "in vivo" e "in vitro", el comportamiento del semen caprino diluido en agua de coco "in natura" en forma de gel; medir la fertilidad al parto de las cabras inseminadas con el semen diluido en agua de coco "in natura" y en leche; estudiar el comportamiento del semen caprino a través de la motilidad progresiva y porcentaje de espermatozoides vivos a 37°C (TTR), diluidos, tanto en agua de coco "in natura" como en leche; promover medios y métodos para difundir la aplicación de la técnica de la inseminación artificial caprina en el Brasil, utilizando alternativas prácticas que faciliten la adopción de ésta, por parte del productor caprino. Después del estudio "in vitro" e "in vivo" de los dilutores bajo la forma de gel, aquel que presente la mayor eficiencia podrá ser utilizado industrialmente para lograr así su mayor difusión y aplicación económica en el país.

MATERIALES Y MÉTODOS

Durante dos años, 5 reproductores de la raza Saanen fueron colectados con vagina artificial obteniéndose en total 96 eyaculados. Después de determinado el volumen, la concentración y la motilidad masal, cada eyaculado fue dividido en dos alícuotas, una fue diluida en leche descremada glucosada y la otra en agua de coco con pH y osmolaridad corregida. Para la corrección de estos dos factores se utilizó una solución de citrato de sodio al 5% en una proporción de dos volúmenes de agua de coco para una de esa solución, elevándose el pH del agua de coco (fruto con seis meses de maduración) de 4.5 a aproximadamente 6.0. Para disminuir la osmolaridad de 500 a 300 milimoles, se adicionó agua destilada, en igual proporción de volumen como antes se ha mencionado.

Después de las respectivas diluciones, el semen fue incubado a 37°C para las pruebas de termorresistencia, donde se evaluó la motilidad progresiva individual y el porcentaje de espermatozoides móviles durante tres horas.

Para las pruebas de fertilidad "in vivo" con los dos dilutores, se sincronizaron con esponjas intravaginales conteniendo 50 mg de acetato de medroxi-progesterona (MAP), un total de 380 cabras pertenecientes a rebaños particulares y a la Empresa de Investigaciones Agropecuarias del Estado de Alagoas (EPEAL). Cada esponja se mantuvo por 10 días en la porción craneal de la vagina; al octavo día del tratamiento se administró por vía intramuscular 200 U.I. de gonadotropina sérica y 100 µg de cloprostenol, transcurridas 38 horas de retirada la esponja se inseminaron 220 cabras con semen diluido en agua de coco (estabilizada y esterilizada en ampollas) y 160 cabras con semen diluido en leche.

El comportamiento reproductivo de cada animal se controló mediante fichas individuales, en las cuales se registró pe-

CUADRO 1

TERMORRESISTENCIA DEL SEMEN CAPRINO DILUIDO EN AGUA DE COCO Y LECHE DURANTE 180 MINUTOS A 37°C

| Tiempo de Incubación (min) | Dilutores | | | |
|-------------------------------|------------------|--------------------|------------------|---------------|
| | Agua de Coco | | Leche | |
| | Spz. Móviles (%) | Spz. Motilidad (%) | Spz. Móviles (%) | Motilidad (%) |
| 5 | 50 | 3.5 | 75 | 3.5 |
| 30 | 50 | 3.5 | 60 | 3.0 |
| 60 | 50 | 3.5 | 50 | 3.0 |
| 90 | 50 | 3.0 | 45 | 2.5 |
| 120 | 45 | 3.0 | 35 | 2.5 |
| 150 | 45 | 3.0 | 30 | 2.0 |
| 180 | 45 | 3.0 | 30 | 1.5 |

CUADRO 2

EFICIENCIA REPRODUCTIVA DE CABRAS INSEMINADAS CON SEMEN DILUIDO EN AGUA DE COCO O EN LECHE

| Parámetros* | Agua de Coco | Leche |
|---------------------------|------------------|------------------|
| Fertilidad a los 60 d (%) | 88 (220) | 85 (160) |
| Tasa de Fertilidad (%) | 68 ^a | 60 ^b |
| Prolificidad | 1.8 ^c | 1.1 ^d |
| Proporción Sexual (%) | | |
| Hembras | 72 (194) | 43 (45) |
| Machos | 28 (72) | 57 (60) |

* Parámetros con letras distintas son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$).

(): Número de observaciones.

ríodo de gestación, tasa de parición, prolificidad y relación de sexo al nacimiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación "in vitro": del semen: Después de colectado el semen con la vagina artificial, se subdividió en dos porciones, una se diluyó en leche y la otra en agua de coco con pH y osmolaridad corregidas a través de la adición de la mitad del volumen total del dilutor con una solución de citrato de sodio al 5% e igual cantidad de agua destilada que elevó el pH de 4.5 a 6.0 y redujo la osmolaridad de 500 a 300 milimoles respectivamente.

Al iniciar la incubación, el semen diluido en leche presentó un mayor porcentaje de espermios móviles al compararlo con el semen diluido en agua de coco, pero hacia el final de la incubación los valores de motilidad y el porcentaje de espermios móviles fueron significativamente superiores en el semen diluido en el agua de coco (Cuadro 1). La mayor sobrevivencia de los espermatozoides en el agua de coco, parece estar aso-

ciada a algunas sustancias contenidas en la composición bioquímica del agua de coco; esa sustancia, es un factor físico-químico que parece favorecer la motilidad del semen. Podría ser el mismo que aniquilaría a los 5 minutos de incubación más del 25% de los espermatozoides diluidos en agua de coco; después de esa preselección a través del pH, la osmolaridad o la misma acción de una citoquinina presente en el agua de coco, podría tener preferencia por los espermatozoides portadores del cromosoma "Y", explicando en parte el mayor número de crías del sexo femenino cuando las cabras fueron inseminadas con semen diluido en agua de coco (Cuadro 2).

La técnica de la variación del pH vaginal en el momento de la inseminación, tornando el medio más ácido, impide el mayor metabolismo de los espermatozoides con el cromosoma "Y", ya es una técnica de rutina en bovinos en Francia, con la que se pretende incrementar los nacimientos de crías del sexo femenino. El agua de coco, que presenta un pH de 5.8, bastante ácido para el semen caprino aún después de la corrección con citrato de sodio para 5.8%, no llega a los valores nor-

males de 6.2 a 6.8 exigidos por el esperma caprino, pudiendo determinar la preselección de los espermatozoides con el cromosoma "X", favoreciendo o incrementando los nacimientos de hembras.

Evaluación "in vivo" del semen: Las mayores tasas de fertilidad, parición y de prolificidad obtenidas con el semen diluido en agua de coco, evidencian las condiciones favorables del metabolismo "in vivo" del semen tratado con agua de coco (Cuadro 2).

CONCLUSIONES

La mayor eficiencia reproductiva mostrada por las cabras inseminadas con el semen diluido en agua de coco hace viable el uso de este producto como dilutor del semen caprino. La mayor sobrevivencia de los espermatozoides diluidos en agua de coco orienta en forma favorable la tecnología de conservación del esperma caprino al igual que para otras especies como los peces, bovinos, ovinos y equinos, conforme a otras investigaciones preliminares ya realizadas, siempre y cuando la osmolaridad y el pH del semen sean respetados para las respectivas especies.

La casi inexistencia de fosfolípidos en el agua de coco cuando se compara con la leche, no permite que las enzimas fosfolipasas presentes en las secreciones de las glándulas bulbouretrales de caprinos deterioren durante el metabolismo grandes cantidades de espermios, lo que se traduce en mayores probabilidades de sobrevivencia espermática.

El agua de coco estabilizada en ampollas en forma de gel, se está convirtiendo en un medio de difusión práctico usado como alternativa en la preparación del semen caprino para la inseminación artificial, además, se está utilizando en otras especies tanto en Brasil como en otros países.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Balakrishnan, P.P.; Neelakanta, T. Preservation of Buck semen at room temperature in coconut milk- extender. J. Vet. Sci. 13 (2): 321-324. 1982.
- [2] Corteel, J.M. Viabilité des spermatozoides de Bouc conservés et congelés avec ou sans leur plasma seminal. Effet du glucose. Ann Biol. Bioch. Biophys. 14 (4b) 741-745. 1974.
- [3] Corteel, J.M. ; Baril, G. Production de sperme chez le bouc: variation saisonnières de la quantité et de la qualité du sperme recolté selon l'age des animaux. Journée de la Recherche Ovine et Caprine. París. 1975.
- [4] Gaur, R.D.; Viaya,S.R.; Talwar, G.P. Cross species action sur of human seminal plasma factor on motility and survival of spermatozoa. In: TALWAR, G.P. Recentes advances in reproduction and regulation of fertility. North J. Holland.Elsevier. 1979.
- [5] Haller, O.; Chemineau, P.; Corteel, J.M. "In Vitro" Survival and fertilizing ability of goats epididimal sperm. International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, Madrid. Proc. IX 316. 1980
- [6] Hernandez, A.E. Effect du lavage et du cowperectomie sur la conservation "In Vitro" des spermatozoides de bouc. París, Université Pierre et Marie Curie. (Memoire). 1976.
- [7] Iritani, A.; Nishikawa, Y., Fukuhara, R. Studiés on the egg-yolk coagulation factor in goat semen I Localization of the coagulating. Silver Jubile Lab. Anim. H. Kyoto. Proc. 8986. 1961
- [8] Iritani, A & Nishikawa, Y. Studies on the egg-yolk coagulating enzyme in goat semen. VI On the chemical properties of the eyaculated semen and the secretion of accessory sexual organs in the goat. Jap. J. Animal Reprod. 10: 44-51. 1963.
- [9] Kyist, V. Reversible inhibition of nuclear chromatin decondensation, on ability of human spermatozoa induced by prostatic fluid. Acta Physiol. Scand. 109, 73-78. 1980.
- [10] Norman, C. & Johnson, C. Liability of bovine spermatozoa at room temperature in coconut milk-citrate-calcium carbonate diluent. J. Dairy Sci; 41 733. 1959.
- [11] Nunes, J.F. Etudes preliminaires de la recherche sur le rôle physiologique du plasma seminal de bouc. Paris VI Université Pierre et Marie Curie. (D.E.A). 1980.
- [12] Nunes, J.F. Etude des effets du plasma seminal sur la survie "in vitro" des spermatozoides de bouc. Paris VI Université Pierre et Marie Curie. (These de Doctorat). 1982.
- [13] Nunes, J.F. A inseminacao Artificial como método alternativo para o melhoramento da caprinocultura leiteira. Simposio da Caprinocultura do Estado do Rio. Niteroi, 1986.
- [14] Pillai, V. B.; Neelakanta, J.C.; Mathai, E. Efficiency of coconut milk-extender as diluent for the preservation buck semen at room temperature. Kerala J. Vet. Sci. 9(2), 290 - 292. 1978.
- [15] Roy, A. Egg-yolk coagulating enzyme in the semen and cowper's gland of the goat Nature. 179, 318. 1957.