

DILUCIONES COMO MÉTODO DE CONSERVACIÓN DE SEMEN DEL GÉNERO *Crotalus*

DILUTIONS AS CONSERVATION METHOD FOR SEMEN GENRE *Crotalus*

Fuentes-Mascorro G.^{1*}, Álvarez A.², Bautista M.¹, Girón D.¹, Ramírez L.M.¹

¹Laboratorio de Investigación en Reproducción Animal, Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca. *lirauabjo@gmail.com

²Herpetario *Reptilium*.

Keywords: reptile, sperm, conservation, rattlesnake.

Palabras clave: Reptil, esperma, conservación, serpiente de Cascabel.

Abstract

Rattlesnakes are in danger of extinction, so for preservation and fabotherapics manufacturer, captivity specimens are important. In zoos collections some species, male and female are aloof. Used as conservation semen methods dilution and freezing. Was used an no invasive method for ejaculate, males of *C. atrox*, *C. basiliscus*, *C. culminatus*, *C. molossus nigrescens*, *C. molosus oaxacus*, *C. ravus* C., and *C. C.simus scutulatus*. They are captive in *Reptilium* herpetarium in controlled environment. Scale to 0 to 5 was used to evaluate gross ejaculate motility. The ejaculated was incubate to 28°C, cloacal temperature of this animals. Gross ejaculate motility was evaluated every 30 minutes. Modified diluent Tyrode maintains gross ejaculate motvility in 2 for 6 hours, in all genera. Tyrode diluent maintains gross ejaculate motility in 1 by 90 minutes, in all genera. Acromax was unable maintains any kind of motility. In *C. molossus nigrescens*, Magapor diluent maintain gross ejaculate motility in one for 90 minutes. In *C. atrox* MR-A diluent maintain gross ejaculate motility in 1 for 3 hours. In *C. atrox* Brackett diluent, maintain gross ejaculate motility in 2 for 90 minutes. Freezing was not possible because stop moving sperm with egg yolk. Rattlesnakes are able to ejaculate without everting hemipenes, after being stimulated manually. It is possible to transport the semen of these animals until to six hours in modified Tyrode.

Resumen

Las serpientes de cascabel están en peligro de extinción, por lo que para su preservación y la fabricación de faboterápicos los especímenes en cautiverio son importantes. En las colecciones de los zoológicos algunas especies tienen a las hembras y machos muy lejos uno de otro. El objetivo del trabajo fue emplear la dilución y la congelación como métodos de conservación del semen. Se empleó un método no invasivo para eyacular a los machos de *C. atrox*, *C. basiliscus*, *C. culminatus*, *C. molossus nigrescens*, *C. molosus oaxacus*, *C. ravus* y *C. simus*. Los ejemplares se encuentran en el herpetario *Reptilium* en un ambiente controlado. Se empleó una escala de 0 a 5 para evaluar la movilidad masal del eyaculado. Los eyaculados fueron incubados a 28°C, que es la temperatura cloacal de los ejemplares en este lugar. La movilidad masal fue evaluada cada 30 minutos. El diluyente Tyrode modificado mantuvo la movilidad masal de dos a seis horas, en todos los géneros. El diluyente Tyrode mantuvo la movilidad masal de los eyaculados de uno a 90 minutos, en todos los géneros. Aceromas fue incapaz de mantener algún tipo de movilidad. En *C. molossus nigrescens*, el diluyente Magapor mantuvo la movilidad masal en eyaculado de uno a 90 minutos. En *C. atrox*, el diluyente MR-A mantiene la movilidad masal de una a 3 horas. En *C. atrox*, el diluyente Brackett mantiene la movilidad masal del eyaculado de 2 a 90 minutos. La congelación no fue posible porque la yema de huevo detiene el movimiento de los espermatozoides. Las serpientes de cascabel son capaces de eyacular después de ser estimuladas manualmente sin evertir los hemipenes. Es posible transportar el semen de estos animales hasta por seis horas con diluyente Tyrode modificado.

Introducción

Las serpientes de cascabel, se han utilizado en México como recurso zoogenético desde la época prehispánica en la que fueron empleadas como objeto de culto y medicina tradicional. Actualmente se emplea la piel por la ornamentación que presenta, en la medicina tradicional se emplean todas las partes del animal para tratar un gran número de padecimientos (Mata & Zolla, 1994). En las interacciones con el hombre el ejemplar termina muerto la mayoría de las veces por el temor a su veneno, se capturan y mantienen en cautividad para producir

faboterápicos y el auge de su empleo como mascotas, ha llevado a este género a las listas de especie prioritaria. Actualmente los zoológicos resguardan los organismos de estos ejemplares que son decomisados del comercio ilícito por la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente, lo que ha propiciado que hembras y machos de la misma especie y subespecie, queden muy alejados. El objetivo del presente trabajo fue emplear la dilución y congelación, como métodos de conservación del semen, para transportar el germoplasma hasta el lugar en el que se encuentre la hembra.

Material y métodos

El trabajo se realizó en el herpetario *Reptilium*, ubicado en el zoológico de Zacango en el Estado de México. Los ejemplares se encuentran alojados en un ambiente controlado a 25°C. Se emplearon machos de las especies: *C. atrox*, *C. basiliscus*, *C. culminatus*, *C. molossus nigrescens*, *C. molossus oaxacus*, *C. ravus*, *C. simus* y *C. scutulatus*. Un macho de cada especie se manejó permitiéndole introducir el tercio anterior de su cuerpo en un tubo plástico transparente, se sujetó el ejemplar de la unión del tubo con su cuerpo, para evitar que siguiera desplazándose y se aplicó un masaje abdominal en dirección cráneo caudal, se lavó la cloaca con ayuda de una pipeta Pasteur de plástico y el diluyente correspondiente a 28°C, se secó la zona y se procedió a levantar por impronta en portaobjetos atemperados los eyaculados, de inmediato se observó al microscopio con el aumento 10X, para evaluar la movilidad masal (Bravo *et al.*, 2011). Se levantó el eyaculado con ayuda de 10µl, del diluyente atemperado y se depositó en un tubo eppendorf. Se incubó en baño seco a 28°C, que es la temperatura de la cloaca de los ejemplares, usando los diluyentes comerciales: Acromax®, Magapor®, MR-A®, Tyrode®, Tyrode modificado compuesto de Tyrode comercial más albúmina bovina 5mg/ml (Duchi *et al.*, 2009), se elaboró medio Brackett (Brackett & Oliphant, 1975). Cada 30 minutos se evaluó la movilidad masal (Bravo, *et al.*, 2011). Para congelar se empleó el diluyente Tris-yema de huevo (Maedina, *et al.*, 2007).

Resultados

Es posible obtener semen de machos del género *Crotalus* con una técnica no invasiva. No todos los ejemplares que se estimulan por esta técnica eyaculan. Todos los ejemplares, después del lavado, de los sacos de los hemipenes expulsan tapones blancos, que se forman cuando el ejemplar a pesar de estar aislado, eyacula y el semen se queda en los sacos de los hemipenes. Los ejemplares que después de expulsar los tapones, no eyacularon no fueron incluidos en el estudio (uno por ciento). El eyaculado de estos ejemplares es demasiado viscoso por lo que la colecta se realizó por impronta, para su conservación y manejo se debe diluir lo más rápido posible, de lo contrario se seca en el portaobjetos. Los machos emiten el semen de manera intermitente, sin necesidad de evertir los hemipenes, pero siempre después de haber sido estimulados manualmente y de haberse realizado el lavado de los sacos de los hemipenes.

Tabla I. Movilidad masal, en escala de 0 a 5, en la parte superior se indica el diluyente y el tiempo en horas. El número de la izquierda corresponde a la inicial y el de la derecha a la final (*Gross motility, scale 0 at 5, the top of the diluent and the time in hours. Left number correspond intial motility and righ to final motility*)

Especie de <i>Crotalus</i>	Tyrode modificado. 6h	Tyrode® 3h	Magapor® 1.5h	MRA® 3h	Brackett 1.5h
<i>atrox</i>	5 – 2	4 – 1	5 – 0	5 – 1	5 – 2
<i>basiliscus</i>	5 - 2	5 - 1	4 – 0	4 – 0	4 - 0
<i>culminatus</i>	4 – 2	4 – 1	4 – 0	5 – 0	5 – 0
<i>m. nigrescens</i>	5 – 2	5 – 1	5 – 1	5 – 0	5 – 1
<i>m. oaxacus</i>	4 – 2	4 – 1	4 – 0	4 – 0	4 – 0
<i>ravus</i>	4 – 2	5 – 1	4 – 0	4 – 0	5 – 0
<i>simus</i>	4 – 2	5 – 1	4 – 0	4 – 0	5 – 0
<i>scutulatus</i>	5 - 2	4 – 1	4 - 0	4 - 0	5 – 0
<i>m. molossus</i>					

De los ejemplares *C. ravus* y *C. scutulatus*, fue necesario realizar tres muestreos, para poder evaluar el efecto con los seis diluyentes, empleándose por cada sesión dos diluyentes. No se observó ninguna relación con el tiempo de descanso de los ejemplares, ni con la especie a la que pertenecen. En el diluyente Tyrode modificado se

mantuvo la movilidad espermática hasta dos en una escala de cero a cinco, después de seis horas, en las ocho especies de *Crotalus*, el diluyente Tyrode conservó la movilidad en uno hasta por tres horas en todas las muestras de los ejemplares. El diluyente Acromax® no mantuvo la movilidad en ninguna de ellas, a los treinta minutos no se observaron espermatozoides en movimiento. Con Magapor®, en *C molossus nigrescens* se conservó la movilidad de uno a los noventa minutos. El MR-A® mantuvo por tres horas la movilidad hasta uno solo para la especie *C. atrox*. El medio Brackett mantuvo su mejor movilidad en dos por noventa minutos en *C. atrox* (tabla I). Al emplear el diluyente Tris-yema de huevo para congelar, se observó que al momento de agregarlo a los espermatozoides, estos dejaban de moverse de inmediato, por lo que no se pudo realizar el protocolo de congelación en ninguna de las muestras.

Conclusiones

Es posible hacer eyacular a serpientes del género *Crotalus*, con un método no invasivo. Los ejemplares emiten el semen por goteo, sólo después de haber sido estimulados y sin evertir los hemipenes, el semen es muy viscoso y debe colectarse con improntas. Es posible transportar semen de estos animales hasta por seis horas en medio Tyrode modificado, con suficiente movilidad para inseminar hembras.

Bibliografía

- Bravo, J.A., Montanero, J., Calero, R. & Roy, T.J. (2011). Relación entre variables subjetivas e informatizadas del movimiento espermático del morueco. *Arch. Zootec.* 232, 1087-1094.
- Brackett, B.G. & Oliphant, G. (1975). Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol. Reprod.*, 12, 260-274.
- Duchi, D.N., Almela, V.L., Peinado, R.B. & Poto, R.A. (2009). Extracción y valoración de la calidad de semen del palomo deportivo Murciano (Columba livia). *Arch. Zootec.* 58(1):537-540
- Mata, P.S. & Zolla, C. (1994). Víbora de cascabel. En *Diccionario Enciclopédico de la Medicina Tradicional Mexicana*. Recuperado Febrero 8, 2014, de <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/introduccion.ph>
- Medina-Robles, V.M., Sánchez-Carvajal, E., Velasco-Santamaría, Y.M. & Cruz-Casallas, P.E. (2007). Crioconservación de semen bovino usando un congelador programable (CL-8800) y determinación de su calidad postdescongelación por medio de un sistema de análisis espermático asistido por computadora (CASA). *Oriniquia*, 11, 75-86.