

**Efecto de la disminución parcial del plasma
seminal sobre la calidad biológica del semen
bovino poscongelado**

**Ángel Hernán Eveline Padilla
Mario Raúl Vaquero Castaneda**

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2006

ZAMORANO
Carrera de Ciencia y Producción
Agropecuaria

**Efecto de la disminución parcial del plasma seminal sobre la
calidad biológica de semen bovino poscongelado**

Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingenieros Agrónomos en el Grado
Académico de Licenciatura

Presentado por

Ángel Hernán Eveline Padilla

Mario Raúl Vaquero Castaneda

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2006

Los autores conceden a Zamorano permiso
para reproducir y distribuir copias de este
trabajo para fines educativos. Para otras personas
físicas o jurídicas se reservan los derechos de autor.

Ángel Hernán Eveline Padilla

Mario Raúl Vaquero Castaneda

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2006

Efecto de la disminución parcial del plasma seminal sobre la calidad biológica del semen bovino poscongelado

Presentado por

Ángel Hernán Eveline Padilla
Mario Raúl Vaquero Castaneda

Aprobada:

John Jairo Hincapié, Ph.D.
Asesor Principal

John Jairo Hincapié, Ph.D.
Coordinador Área Zootecnia

Isidro Matamoros, Ph.D.
Asesor

Abelino Pitty, Ph.D.
Director Interino Carrera
Ciencia y Producción Agropecuaria

Rogel Castillo, M.Sc.
Asesor

George Pilz, Ph.D.
Decano Académico

Martha Sofía Ortega, Ing. Agr.
Asesor

Kenneth L. Hoadley, D.B.A.
Rector

DEDICATORIA A.H.E.P

A Dios.

A mis padres José Hernán y Norma Soledad.

A mis abuelos Pablo, Mercedes, Hernán y Gilda.

A mis hermanos Norman José y Luís Fernando.

A mi hija Hilda Patricia.

A mis amigos por estar siempre conmigo.

A todas aquellas personas que apoyan la ganadería de nuestros países latinoamericanos.

DEDICATORIA M.R.V.C

A Dios.

A mis padres Raúl Armando y Ana Margarita.

A mis hermanas Ana Esther y Rosa Margarita.

A mis familiares y amigos.

AGRADECIMIENTOS A.H.E.P

A Dios, por nunca dejarme solo en la vida, por ser mi luz y mi camino.

A mis padres por todo el amor, dedicación y apoyo incondicional que me han brindado en la vida. Por la confianza que me han dado en cada una de las etapas de mi vida.

A mi abuelo Pablo (QEPD), por inculcarme el amor al campo, la dedicación y el trabajo.

A mi abuelo Hernán (QEPD) y mis abuelas Gilda y Mercedes por su amor y apoyo

.
A mis hermanos por su comprensión, amor y respeto.

A Kathleen, por su amor, paciencia y confianza.

A mis familiares por estar siempre pendiente de mí, por su apoyo y por los anhelos que han puesto en mí.

A todos mis maestros de la vida. Principalmente a todos aquellos que contribuyeron a mi aprendizaje. Especialmente a John Jairo Hincapié, Ph.D. por su voluntad, paciencia y amistad brindada durante el desarrollo de esta investigación. A Isidro Matamoros, Ph. D. por su amistad, consejos y enseñanzas.

A la Ing. Sofía Ortega por su amistad, ayuda, dedicación y colaboración durante la elaboración de este proyecto.

A Rogel Castillo M.Sc, por su dedicación y contribución en a elaboración de este proyecto.

A mis amigos y compañeros: Héctor, Mauricio y Olban, por su amistad y por todos los momentos vividos.

A mi compañero de tesis, Raúl Vaquero, por su amistad, paciencia y tiempo dedicado a este proyecto. Por todas las vivencias que compartimos y por su respaldo en todo momento.

A la clase ELITE 06, por ser la familia más grande que tengo, por cada uno de los momentos inolvidables que vivimos juntos.

AGRADECIMIENTOS M.R.V.C

A Dios por guiarme y por darme la oportunidad de terminar mi carrera.

A mis padres Raúl Armando y Ana Margarita por ser un ejemplo a seguir en todo momento, por los consejos, el apoyo, el amor y la amistad que me han dado, y por su esfuerzo para permitirme ser un profesional.

A mis hermanas Ana Esther y Rosa Margarita por ser amigas, consejeras y un ejemplo a seguir, y por estar con migo apoyándome en cada momento.

A mis familiares por estar siempre pendiente de mi y dispuestos a ayudarme en cada momento que lo necesite.

A John Jairo Hincapié, Ph. D. por sus enseñanzas, y su voluntad de ayudarme en cada momento del desarrollo de este proyecto y por la amistad y los consejos durante el desarrollo de mi carrera.

A Isidro Matamoros, Ph.D. y a Rogel Castillo, M. Sc. Por su amistad, apoyo y contribución al desarrollo de este proyecto.

A la Ing. Sofía Ortega por la ayuda, dedicación y colaboración para el desarrollo de este trabajo y por la amistad y buenos momentos que pasamos.

A mi compañero de tesis Ángel Eveline, por el apoyo, la amistad y los buenos momentos durante la elaboración de este proyecto y de mi carrera.

A mis amigos Mario Raudes, Claudia Montoya, Oscar Perla, Henry Rivas por la amistad y los buenos momentos que me brindaron durante estos cuatro años.

Al Ing. Heber Guardado por su amistad y apoyo brindado durante estos cuatro años de mi carrera.

A todos mis colegas de la Clase ELITE 06, por su amistad y todas las vivencias durante estos años de carrera.

AGRADECIMIENTOS A PATROCINADORES M.R.V.C

A mis padres y hermanas por el apoyo financiero durante toda mi carrera.

Al Instituto Salvadoreño de Formación Profesional (INSAFORP) por la ayuda financiera durante los primeros tres años.

A Mario Vaquero, D.M.V. por la ayuda financiera durante mi último año.

RESUMEN

Eveline, Ángel; Vaquero, Mario. 2006. Efecto de la disminución parcial del plasma seminal sobre la calidad biológica del semen bovino poscongelado. Proyecto Especial del Programa de Ingeniero Agrónomo, Zamorano, Honduras. 32 p.

El plasma seminal contiene muchas sustancias benéficas para los espermatozoides, sin embargo, no es un medio ideal para el congelamiento. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de la Disminución Parcial de Plasma Seminal (DPPS) sobre la calidad biológica de semen bovino poscongelado. El estudio se realizó entre mayo y agosto de 2006 en el Fondo Ganadero de Honduras, Comayagua. Se utilizaron 10 toros de las razas: Brahman, Romagnola, Pardo Suizo, Holstein y Angus, todos adultos con edades comprendidas entre 15 y 42 meses, de los cuales, en forma aleatoria se obtuvo un total de 20 eyaculados. Los eyaculados fueron divididos en dos fracciones y asignados a dos tratamientos. Grupo control, 20 eyaculados diluidos, procesados y congelados de acuerdo a la metodología convencional. Grupo con DPPS, 20 eyaculados fueron sometidos a disminución del 50% del plasma seminal luego de la centrifugación a 3000 rpm por 5 minutos y posteriormente fueron diluidos, procesados y congelados de acuerdo a la metodología convencional. Las variables analizadas para el semen fresco fueron: Motilidad en Masa (MM), Individual Progresiva (MI), Anormalidades (AN), Concentración Espermática (CE) del semen entero y con DPPS. Para el semen poscongelado fueron: MM, MI, Calidad Biológica (CB), Índice de Recuperación (IR), AN, Porcentaje de Muestras Aptas y no Aptas para la Inseminación Artificial (MAIA) con semen entero y con DPPS. Se utilizó un diseño de Bloques Completamente al Azar (BCA), con un Modelo Lineal General (GLM) y ANDEVA. Para el porcentaje de MAIA se utilizó la prueba de Chi-cuadrado. No se encontró diferencias ($P > 0.05$) para MM, MI, mientras que la CE y las AN fueron diferentes ($P < 0.05$) en semen fresco; en el semen poscongelado, no hubo diferencia ($P > 0.05$) para MM, MI, CB, IR, sin embargo, la AN fue diferente ($P < 0.05$). Para el semen fresco con baja concentración, no se encontró diferencia ($P > 0.05$) en MM, MI, AN, pero si hubo diferencias ($P > 0.05$) para CE. En el semen fresco de alta CE sólo existió diferencia ($P > 0.05$) en AN. En el semen poscongelado de baja y alta CE sólo se encontró diferencia ($P > 0.05$) en AN.

Palabras clave: Concentración espermática, eyaculados, motilidad.

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Autoría.....	ii
Página de firmas.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	vi
Agradecimiento a Patrocinadores.....	viii
Resumen.....	ix
Contenido.....	x
Índice de Cuadros.....	xii
Índice de Figuras.....	xiv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
2.1. LOCALIZACIÓN.....	3
2.2. ANIMALES.....	3
2.3. CRITERIOS DE INCLUSIÓN PARA LOS EYACULADOS.....	3
2.4. TRATAMIENTOS.....	3
2.5. METODOLOGÍA.....	4
2.6. VARIABLES ANALIZADAS.....	8
2.7. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	8
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	9
3.1. MOTILIDAD EN MASA Y PROGRESIVA INDIVIDUAL DEL SEMEN FRESCO.....	9
3.2. MOTILIDAD EN MASA Y PROGRESIVA INDIVIDUAL DEL SEMEN POSCONGELADO.....	9
3.3. CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA.....	11
3.4. ANORMALIDADES.....	11
3.5. CALIDAD BIOLÓGICA.....	12
3.6. ÍNDICE DE RECUPERACIÓN.....	12
3.7. MUESTRAS APTAS Y NO APTAS PARA LA I.A.....	13
4. CONCLUSIONES.....	15

5. RECOMENDACIONES.....	16
6. LITERATURA CITADA.....	17

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadros

1. Clasificación de la motilidad masal en eyaculados bovinos.....	4
2. Escala numérica y descriptiva para determinar la motilidad espermática individual del toro.....	5
3. Cuadro para leer la densidad de eyaculado de toro ($10^6/\text{mL}$).....	6
4. Número de espermias viables por dosis de semen al descongelado.....	8
5. Comparación de medias entre tratamientos para las variables: Motilidad en Masa (MM) y Motilidad Individual (MI), del semen fresco.....	9
6. Comparación de medias entre tratamientos para las variables: Motilidad en Masa (MM) y Motilidad Individual (MI), para semen poscongelado...	10
7. Comparación de medias entre tratamientos para las variables: Motilidad en Masa (MM), Motilidad Individual (MI), Calidad Biológica (CB), Índice de Recuperación (IR) y Anormalidades (AN) para semen poscongelado con alta y baja concentración espermática.....	10
8. Comparación de medias entre tratamientos para la variable Concentración Espermática (CE) del semen fresco.....	11
9. Comparación de medias entre tratamientos para la variable Anormalidades (AN) para semen fresco y poscongelado.....	11
10. Comparación de medias entre tratamientos para la variable Anormalidades (AN) en semen fresco y poscongelado con alta y baja Concentración Espermática (CE).....	12
11. Comparación de medias entre tratamientos para las variables Calidad Biológica (CB) e Índice de Recuperación (IR) del semen poscongelado.....	13

12. Comparación de medias para las variables Calidad Biológica (CB) e Índice de Recuperación (IR) en semen poscongelado de baja y alta Concentración Espermática (CE).....	13
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura

1. Porcentaje de muestras aptas para la I.A para semen poscongelado del total de muestras y muestras con alta y baja concentración espermática..... 14

1. INTRODUCCIÓN

El congelamiento, almacenamiento y transporte de semen bovino para el uso en inseminación artificial ha tenido mucho auge en las últimas décadas, esto debido a las múltiples ventajas que la técnica ofrece. El rápido mejoramiento genético que brinda la inseminación artificial utilizando semen congelado y la facilidad de su transporte ha permitido tener una mejora productiva en las distintas explotaciones ganaderas de nuestros países, a tal punto que la práctica de congelación y almacenamiento de semen se está volviendo muy importante en la ganadería. La técnica del congelamiento y almacenamiento del semen implica varios procesos como son: la obtención, análisis, dilución y congelamiento del semen.

Para la obtención del semen se han desarrollado básicamente dos métodos los cuales son: la vagina artificial y la electroeyaculación. Con el método de vagina artificial se obtienen los mejores y más representativos eyaculados (Sorensen 1982), sin embargo, no es siempre posible utilizarlo debido a que no todos los animales responden adecuadamente o no están entrenados (Aké-López y Sánchez 1997). Este método consiste en simular una vagina natural, para esto la vagina artificial debe tener las mismas condiciones naturales de la vagina de la vaca a fin de despertar la cometida y el reflejo de la eyaculación. Los requerimientos importantes que deben considerarse son: temperatura propia, presión y lubricación (Zemjanis 1981).

El método de electroeyaculación no es el mejor para obtener el semen de toros, pero representa la mejor opción y tal vez la única al no poder utilizar vagina artificial (Zemjanis 1981). Este método se basa en la estimulación eléctrica sobre los centros erector y eyaculador. De este modo pueden obtenerse erección y eyaculación de animales renuentes al contacto sexual o de toros incapaces de seguir los diferentes pasos del apareamiento que conducen finalmente a la cometida y eyaculación (Huertas 1991). Sin embargo, frecuentemente al utilizar este método, el eyaculado se obtiene en forma diluida, es decir, gran volumen y baja concentración espermática/mL (Foster 1970, Fields *et al.* 1979). Además, cuando no hay protrusión peneal el semen resbala por el prepucio contaminándose con secreciones y microorganismos presentes en el medio (Huertas 1991). El volumen del eyaculado obtenido por estimulación eléctrica, no refleja la capacidad del toro, si no que, por el contrario, está en función de la duración del estímulo y la cantidad colectada en cada frasco (Zemjanis 1981).

El semen está compuesto de células espermáticas y de plasma seminal. El plasma seminal contiene concentraciones grandes de ácido cítrico, ergotioneína, glicerilfosforilcolina, y sorbitol. También están presentes cantidades apreciables de ácido ascórbico, aminoácidos, péptidos, proteínas, lípidos, ácidos grasos y numerosas enzimas (White

1980), además de constituyentes antimicrobianos como plasmina seminal (Shivaji *et al.* 1984) e inmunoglobulinas (Ablin 1974). También se han detectado una variedad de sustancias hormonales incluyendo andrógenos, estrógenos, prostaglandinas, FHS y LH (Mann y Lutwak 1981). La importancia funcional del plasma seminal es cuestionable, ya que en algunas especies es posible inducir a la preñez con espermatozoides epididimarios. Sin embargo, dicho plasma parece ser un componente esencial en el apareamiento natural por que actúa como portador y protector de los espermatozoides (Hafez 1996). También se ha encontrado que el plasma seminal no es un medio ideal para el congelamiento de las células espermáticas a tal punto que altas concentraciones de plasma seminal han demostrado que genera cierto deterioro a las células espermáticas expuestas a congelamiento y almacenamiento, a la vez que reduce la motilidad espermática en el semen del toro (Pickett 1975). Esto se convierte en un problema ya que al almacenar semen se debe buscar siempre una excelente calidad del mismo para que al momento de ser utilizado en la inseminación artificial se obtengan los resultados esperados.

La reducción de plasma seminal en el semen antes de su congelamiento es una práctica que puede ayudar a mejorar la calidad biológica del semen al momento de su descongelación. Una alternativa utilizada para la disminución de la concentración del plasma seminal en eyaculados es la centrifugación (Brinsko *et al.* 2000). Este proceso divide las células espermáticas del plasma seminal facilitando el proceso de remoción de una fracción del plasma para aumentar la concentración espermática y facilitar el trabajo de agregar la proporción adecuada de nutrientes y crioprotectores al semen.

Basados en lo anterior, se realizó una investigación que tuvo como objetivo general determinar el efecto de la disminución parcial del plasma seminal del semen bovino sobre la calidad biológica poscongelado y como objetivos específicos determinar el efecto de la disminución parcial del plasma seminal del semen bovino sobre la motilidad en masa y progresiva individual, el porcentaje de muestras con calidad biológica aceptable, el índice de recuperación, el porcentaje de anomalías y el porcentaje de muestras aptas y no aptas para la inseminación artificial (I.A).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. LOCALIZACIÓN

La investigación se desarrolló entre los meses de mayo a agosto de 2006 en las instalaciones del Fondo Ganadero de Honduras ubicado en Comayagua, a 80 km de Tegucigalpa. El sitio tiene una temperatura promedio de 24.9 °C, una precipitación anual de 750 mm y una altitud de 595 msnm; además se utilizó el laboratorio de reproducción animal de El Zamorano, ubicado a 32 km de Tegucigalpa.

2.2. ANIMALES

Se utilizaron 10 toros de las razas: Brahman, Romagnola, Pardo Suizo, Holstein y Angus, todos adultos con edades comprendidas entre 15 y 42 meses, de los cuales, en forma aleatoria se obtuvo un total de 20 eyaculados; los sementales fueron sometidos a un examen clínico veterinario y pruebas serológicas para Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR), Diarrea Viral Bovina (DVB), Leucosis Enzoótica Bovina, Brucelosis y Leptospira a fin de asegurar que se encontraran clínicamente sanos. Todos los animales fueron mantenidos bajo las mismas condiciones de manejo y alimentación en sus toriles individuales.

2.3. CRITERIOS DE INCLUSIÓN PARA LOS EYACULADOS

Como criterio de inclusión se consideraron como diluidos, todos aquellos eyaculados con:

Volumen del eyaculado mayor a 9 mL.

2.4. TRATAMIENTOS

Los 20 eyaculados que cumplieron con los criterios de inclusión fueron divididos en dos fracciones y asignados a dos tratamientos:

Grupo control: 20 eyaculados diluidos, procesados y congelados de acuerdo a la metodología convencional.

Grupo con disminución parcial del plasma seminal (DPPS): 20 eyaculados fueron sometidos a disminución del 50% del plasma seminal luego de la centrifugación a 3000 rpm por 5 minutos y posteriormente fueron diluidos, procesados y congelados de acuerdo a la metodología convencional.

2.5. METODOLOGÍA

Para la extracción del semen se utilizó el proceso de electroeyaculación utilizando el equipo Ideal Instruments Electrojack 5[®] el cual aplica 32 voltios por ciclo en el reóstato.

Previo a la extracción, los toros fueron sometidos a un lavado prepucial con solución salina fisiológica (SSF 0.9% NaCl), recorte de pelos del prepucio y estimulación de las glándulas accesorias por vía transrectal. Posteriormente se procedió a la recolección del semen para lo cual se utilizó una bolsa plástica estéril colocada en la extensión recolectora, inmediatamente fue enviado al laboratorio en una incubadora a 35-37°C. Todos los materiales (cristalería, agitadores, y bolsa plástica) que entraron en contacto con el semen estuvieron a la misma temperatura (35-37°C), a fin de evitar los choques térmicos con el material biológico.

Una vez en el laboratorio se inicio la evaluación de los parámetros macroscópicos:

Volumen: el semen fue depositado en un tubo de centrifuga graduado en donde se midió el volumen y se evaluó el color, olor tomando los criterios que se describen a continuación.

Color: el semen de buena calidad tiene un color blanco lechoso, grisáceo lechoso o amarillento cremoso (Holý 1987).

Olor: es determinado por el contenido de un lípido, la espermina (Rosas 1997) se aceptó el semen que no presente olores extraños como: urinoso, excrementoso o putrefacto.

pH: normalmente en semen de toro el pH oscila entre 6.2 y 6.8. Los eyaculados de mayor acidez son más fértiles (Holý 1987). Para este proceso se uso el papel tornasol, el cual esta graduado en la escala de 6-8.

Posteriormente fue retirada una alícuota de 100 µL en un tubo eppendorf para la evaluación microscópica, en la cual se utilizaron los siguientes criterios:

Motilidad en Masa (MM): La evaluación de la motilidad masal indica la capacidad de movimiento de los espermatozoides. Para la evaluación se depositó una gota de semen fresco sin diluir en una esquina de un porta-objetos atemperado, utilizando un microscopio con platina térmica y observando a 10X y 20X. La clasificación que se utilizó se presenta en el Cuadro 1; Solo se utilizaron eyaculados con más de 70% de motilidad en masa.

Cuadro 1. Clasificación de la motilidad masal en eyaculados bovinos

Valor	%	Clasificación	Descripción
4	91-100	Muy bueno	Ondas oscuras con movimientos rápidos
3	71-90	Bueno	Ondas aparentes. Remolinos con movimiento moderado
2	51-70	Aceptable	Ondas ligeras con movimiento apenas perceptibles
1	0-50	Pobre	No hay ondas. Movimiento espermático vibrátil

Fuente: Vera (2001); adaptado por los autores

Motilidad Progresiva Individual (MPI): Se observan individualmente las células espermáticas a fin de calcular el porcentaje total de células móviles en el eyaculado (Zemjanis 1981). Se consideró como movimiento normal únicamente el movimiento progresivo rectilíneo, cualquier otro movimiento se tomó como anormal. Para su evaluación se depositó una gota de semen diluido con SSF en proporción de 10:100 en un portaobjetos atemperado y cubierto con una laminilla atemperada, observando a 40X. La clasificación que se utilizó se presenta en el Cuadro 2. Sólo se utilizaron muestras con más de 60% de motilidad espermática individual.

Cuadro 2. Escala numérica y descriptiva para determinar la motilidad espermática individual del toro

Células móviles %	Valor descriptivo	Valor numérico
80-100	Muy bueno	5
60-80	Bueno	4
40-60	Regular	3
20-40	Pobre	2
0-20	Muy pobre	1

Fuente: Zemjanis (1981); adaptado por los autores

Concentración: La concentración espermática se expresa como el contenido de espermatozoides en una unidad de volumen (milímetros o centímetros cúbicos) y su apreciación tiene gran significación, no sólo para la clasificación, sino para la dilución del semen (Zavaleta 1997). Para su cálculo se utilizó el densímetro de Minitüb®, para lo cual se diluyó una muestra de semen 4:100 en SSF y se agitó para homogenizar la dilución, luego se observó a tras luz el último valor del densímetro totalmente visible, posteriormente se dio lectura a la tabla para leer la densidad del eyaculado de toro de Minitüb®. Cuadro 3.

Cuadro 3. Cuadro para leer densidad del eyaculado de toro ($10^6/\text{ml}$).

Valor	Factor de dilución									
	0.1/10	0.2/10	0.3/10	0.4/10	0.5/10	0.6/10	0.7/10	0.8/10	0.9/10	1.0/10
95	1350	675	450	337	270	225	193	168	150	135
90	1500	750	500	375	300	250	214	187	167	150
85	1650	825	550	412	330	275	235	206	183	165
80	1800	900	600	450	360	300	257	225	200	180
75	1950	975	650	487	390	325	278	243	216	195
70	2100	1050	700	525	420	350	300	262	233	210
65	2500	1125	750	562	450	375	321	281	250	225
60	2450	1225	816	612	490	408	350	306	272	245
55	2650	1325	883	662	530	441	378	331	294	265
50	2950	1475	983	737	590	491	421	369	328	295
45	3350	1675	1116	837	670	558	478	418	372	335
40	3750	1875	1250	937	750	625	536	469	416	375
35	4250	2125	1416	1062	850	708	607	531	472	425
30	4850	2425	1616	1212	970	808	693	606	539	485
25	5550	2775	1850	1387	1110	925	793	694	617	555
20	6350	3175	2116	1587	1270	1058	907	794	705	635

Fuente: Guía de uso densímetro Minitüb®.

Morfología: Este aspecto es de suma importancia ya que el espermatozoide solamente podría cumplir con su función biológica de fecundar cuando se encuentra bien constituido morfológicamente, es decir, cuando tiene la estructura típica de cabeza, cuello, parte intermedia y cola. Es necesario tener en cuenta que cada eyaculado contiene un número de espermatozoides normales y que también se encuentran algunos anormales en una proporción del 5 al 10%, los cuales son considerados como desperdicio fisiológico. Valores de anormales mayores a 30% comprometen seriamente la fertilidad del toro (Holý 1987).

Para la evaluación se utilizó la tinción Farelly Stain®, la cual consiste en tres pasos: un fijador y dos colorantes. Para esta tinción se realizó un frotis delgado diluido 10:100 y fijado al aire en una placa, posteriormente se introduce la preparación en la solución FIX (solución fijadora) durante 10 segundos. Luego la preparación es introducida durante 20 segundos en el colorante A, seguido de un lavado con agua limpia de la llave para eliminar el exceso del colorante, posteriormente el frotis es introducido en el colorante B durante 5 segundos, seguido por un nuevo lavado con agua de la llave y dejándolo secar en una platina térmica o a temperatura ambiente. Para el cálculo se contaron un mínimo de 200 espermatozoides. En la tinción se observaron los bordes de la cabeza y las colas de los espermatozoides de color azul y dentro de la cabeza de color violeta.

Una vez evaluado el semen, cada eyaculado fue dividido en dos fracciones iguales: la primera fue el grupo control y la segunda fracción fue el grupo DPPS, la cual fue centrifugada a 3000 rpm por 5 minutos. Luego de centrifugar se retiró con una pipeta graduada el 50% del plasma

seminal sobrenadante, posteriormente se homogenizó y evaluó microscópicamente para diluirla, procesarla y congelarla.

Para la dilución del semen en ambos tratamientos, se utilizó el diluyente Continental Two-Step™ Extender® compuesto de dos fracciones A y B, se mezcló un 10% con yema de huevo de gallina. La parte A y B una vez restituido está compuesto de:

Tris	2.42%
Ácido cítrico	1.38%
Fructosa	1.00%
Yema de huevo	20.00%
Glicerol	7.00%
Tilosina	5.50 mg
Gentamicina	27.50 mg
Lincospectina	16.50 mg
Espectinomicina	33.00 mg

Metodología que se utilizó para el enfriado del semen: el semen fue prediluido en una proporción 1:1 con la fracción A del diluyente a una temperatura de 35°C y enfriado a 5°C en una cámara fría. Una vez a 5°C se equilibró durante 2 horas, tiempo al cual se agregó una cantidad igual de diluyente B, el cual se encontraba a 5°C, posteriormente se dejó equilibrando durante 2 horas; al cabo de este tiempo se envasó en pajillas de 0.5 mL utilizando una concentración de 30×10^6 espermatozoides/pajilla, posteriormente se depositó en las parrillas y se congeló en vapores de N₂ durante 10 minutos a 4 cm de altura sobre el nivel del N₂, utilizando lotes de 50 pajillas. Luego fueron agrupadas en los goblets de a 10 pajillas por goblets y 2 goblets por escalerilla y depositadas directamente en el termo con N₂ líquido. Todas las muestras fueron sometidas al mismo proceso de congelado.

Veinticuatro horas posteriores a la congelación, se descongeló el semen a 37 °C por 40 segundos en baño maría y fue evaluado nuevamente, calculando motilidad progresiva individual para lo cual se diluyó el semen de dos pajillas de diferentes sitios del termo, en SSF en proporción de 1:4 (Rosas 1997)

Sólo se consideró muestras aptas aquellas que presentaron 30% o más de motilidad individual poscongelado y un índice de recuperación superior a 30, ya que valores entre 31 y 40 se consideran buenos, 41 a 50 muy buenos y mayores de 51 excelentes; el índice de recuperación se calcula como: motilidad progresiva individual poscongelación dividida por la motilidad individual antes de congelar por cien. El Cuadro 4 muestra los valores de referencia que se utilizaron.

Cuadro 4. Número de espermatozoides viables por dosis de semen al descongelado. Con una concentración de 30 millones de espermatozoides/dosis.

Motilidad	# de espermatozoides viables	Resultado
0.20	6 000 000	No adecuada
0.25	7 500 000	No adecuada
0.30	9 000 000	Aprobada
0.35	10 500 000	Aprobada
0.40	12 000 000	Aprobada
0.45	13 500 000	Aprobada
0.50	15 000 000	Aprobada

Fuente: Rosas (1997); adaptado por los autores

2.6. VARIABLES ANALIZADAS

Todo lo anterior se realizó para analizar las siguientes variables con disminución parcial del plasma seminal y del semen entero:

- Motilidad en Masa (%) en fresco y poscongelado.
- Motilidad progresiva individual (%) en fresco y poscongelado.
- Concentración.
- Calidad biológica.
- Índice de recuperación.
- Muestras aptas y no aptas para la Inseminación Artificial (IA) (%).

2.7. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó un diseño de Bloques Completamente al Azar (BCA) con dos tratamientos y 20 repeticiones por tratamiento. Los valores porcentuales de motilidad en masa y progresiva individual e índice de recuperación fueron normalizados a través de la función arc-seno; se utilizó el Modelo Lineal General (GLM), aplicando un ANDEVA y separación de medias, para determinar el porcentaje de muestras aptas y no aptas para la I.A se utilizó la prueba Chi-cuadrado. Para el análisis de la calidad biológica se utilizaron procedimientos de estadística descriptiva; el nivel de significancia exigido fue de $P < 0.05$ utilizando el programa Statistical Analysis System (SAS 2006) .

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 MOTILIDAD EN MASA (MM) Y PROGRESIVA INDIVIDUAL (MI) DEL SEMEN FRESCO

Para la MM del semen fresco no se encontró diferencias significativas ($P = 0.9488$) entre los tratamientos. Estas medias se clasifican como buenas de acuerdo con lo recomendado por Vera (2001) (Cuadro 5). Lo anterior demuestra que el proceso de disminución del plasma seminal no afecta la MM.

De igual manera las diferencias encontradas no fueron significativas ($P = 0.1021$) para la MI entre tratamientos (Cuadro 5); los valores de las medias encontradas están por debajo de los encontrados por Aké-López y Sánchez (1997) de 73.2% y 78.2% para el grupo control y con DPPS respectivamente, pero según Zemjanis (1981), valores entre 60% y 80% de motilidad individual son clasificados como buenos.

Cuadro 5. Comparación de medias entre tratamientos para las variables: Motilidad en Masa (MM) y Motilidad Individual (MI) de 20 eyaculados en semen fresco.

Grupo	MM %	MI %
Control	84.25 ± 9.21	64.50 ± 9.85
DPPS	84.50 ± 7.05	69.75 ± 10.19
CV	9.98	18.69

DPPS = Disminución Parcial del Plasma Seminal

MM = Motilidad en masa

MI = Motilidad individual

CV = Coeficiente de Variación

3.2. MOTILIDAD EN MASA (MM) Y PROGRESIVA INDIVIDUAL (MI) DEL SEMEN POSCONGELADO.

No se encontró diferencias significativas ($P = 0.3141$) para los valores de MM poscongelado (Cuadro 6); en los valores de MI tampoco se obtuvo diferencias significativas ($P = 0.3346$), sin

embargo, los valores encontrados de MI son superiores a los reportados por Aké-López y Sánchez (1997) del 25% y 28.3% para el control y el tratamiento con DPPS respectivamente.

Cuadro 6. Comparación de medias entre tratamientos para las variables: Motilidad en Masa (MM) y Motilidad Individual (MI) de 20 eyaculados para semen poscongelado.

Grupo	MM %	MI %
Control	70.00 ± 24.70	36.75 ± 15.01
DPPS	76.50 ± 8.75	40.15 ± 12.20
CV	26.33	29.33

DPPS = Disminución Parcial del Plasma Seminal

MM = Motilidad en masa

MI = Motilidad individual

CV = Coeficiente de Variación

Al categorizar los eyaculados de acuerdo a la concentración de 500×10^6 espermatozoides/mL, propuesta por Holý (1987), no se encontró diferencia entre los eyaculados de ambos tratamientos con baja concentración ($< 500 \times 10^6$) para MM (P = 0.2276) y MI (P = 0.0978) (Cuadro 7); de igual manera los eyaculados con alta concentración de ambos tratamientos tampoco presentaron diferencias significativas para MM (P = 0.8292) y MI (P = 0.9957). Estos resultados demuestran que el proceso de centrifugación, la DPPS y la concentración no afectan la MM ni la MI del semen poscongelado.

Cuadro 7. Comparación de medias entre tratamientos para las variables: Motilidad en Masa (MM), Motilidad Individual (MI), Calidad Biológica (CB), Índice de Recuperación (IR) y Anormalidades (AN) para semen poscongelado con alta y baja Concentración Espermática (CE).

Grupo	CE	MM %	MI %
Control	$> 500 \times 10^6$	68.89 ± 26.66	38.77 ± 15.53
DPPS	$> 500 \times 10^6$	72.22 ± 12.07	38.66 ± 14.08
CV		31.46	28.95
Control	$< 500 \times 10^6$	70.91 ± 24.27	35.09 ± 15.10
DPPS	$< 500 \times 10^6$	80.00 ± 0.00	42.72 ± 8.76
CV		23.03	25.81

DPPS = Disminución Parcial del Plasma Seminal

CE = Concentración espermática

CV = Coeficiente de Variación

MI = Motilidad individual

MM = Motilidad en masa

3.3 CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA (CE)

La diferencia fue significativa ($P = 0.0001$) para la CE en semen fresco (Cuadro 8) entre tratamientos, obteniendo que el grupo con DPPS incrementó en 63.23% la concentración de células espermáticas; este incremento se debe a la disminución del volumen del plasma seminal por efecto de la centrifugación, ya que ésta separa el paquete de células espermáticas del plasma del cual se retira el 50% conservando la misma concentración de células espermáticas.

Cuadro 8. Comparación de medias entre tratamientos para la variable Concentración Espermática (CE) de 20 eyaculados en semen fresco.

Grupo	Concentración espermática (Millones de espermias/mL)
Control	481.50 ± 196.31*
DPPS	785.95 ± 233.74*
CV	20.67

* Medias en columnas difieren entre si ($P < 0.0001$)

DPPS = Disminución Parcial del Plasma Seminal

CV = Coeficiente de Variación

3.4 ANORMALIDADES (AN)

Las diferencias obtenidas entre tratamientos para AN en semen fresco fueron significativas ($P = 0.0087$) (Cuadro 9); de igual manera para el semen poscongelado las diferencias fueron significativas ($P = 0.0009$), sin embargo, ambos valores se encuentran dentro del rango sugerido por Holý (1987) quien concluye que en los eyaculados normales se puede encontrar hasta un 15% de espermias anormales producto del desecho fisiológico, el cual puede aumentar cuando el toro es sometido a largos periodos de descanso; posiblemente estas diferencias en la disminución del porcentaje de células anormales en el grupo con DPPS se atribuyen al proceso de centrifugación, ya que una parte de estas células flotan en el plasma seminal y son eliminadas con la disminución parcial del mismo.

Cuadro 9. Comparación de medias entre tratamientos para la variable Anormalidades (AN) para 20 eyaculados en semen fresco y poscongelado.

Grupo	AN semen fresco %	AN semen poscongelado %
Control	8.69 ± 2.69*	7.22 ± 1.90*
DPPS	7.52 ± 3.60*	5.25 ± 2.54*
CV	15.61	21.34

* Medias en columnas difieren entre si ($P < 0.05$)

DPPS= Disminución Parcial del Plasma Seminal

AN= Anormalidades

Los resultados obtenidos al analizar las muestras de semen fresco con base en alta y/o baja concentración, las diferencias encontradas no fueron significativas ($P = 0.2538$) entre las muestras de baja concentración, mientras que en las de alta concentración si fueron significativas ($P = 0.0044$); al poscongelado los resultados fueron significativos para las muestras con baja y alta concentración ($P = 0.0087$ y $P = 0.0383$ respectivamente) (Cuadro 10).

Cuadro 10. Comparación de medias entre tratamientos para la variable Anormalidades (AN) en semen fresco y poscongelado con alta y baja Concentración Espermática (CE).

Grupo	CE	AN semen fresco	AN semen poscongelado
		%	%
Control	$> 500 \times 10^6$	$8.44 \pm 2.59^*$	$7.16 \pm 1.95^*$
DPSS	$> 500 \times 10^6$	$6.77 \pm 3.70^*$	$5.16 \pm 2.43^*$
CV		11.85	27.80
Control	$< 500 \times 10^6$	8.89 ± 2.88	$7.26 \pm 1.95^*$
DPSS	$< 500 \times 10^6$	8.12 ± 3.58	$5.81 \pm 2.70^*$
CV		17.38	15.94

* Medias en columnas difieren entre si ($P > 0.05$)

DPSS = Disminución Parcial del Plasma Seminal

CE = Concentración Espermática

AN = Anormalidades

CV = Coeficiente de Variación

3.5 CALIDAD BIOLÓGICA (CB)

Las diferencias encontradas no fueron significativas ($P = 0.3408$) para la CB entre los dos tratamientos (Cuadro 11). De igual manera, en los eyaculados de baja y alta concentración espermática tampoco se obtuvo diferencias significativas ($P = 0.0927$ y $P = 0.9835$ respectivamente) (Cuadro 12). Estos resultados se atribuyen a que este parámetro está afectado directamente por la MI poscongelado.

3.6 ÍNDICE DE RECUPERACIÓN (IR)

No se encontró diferencias significativas ($P = 0.8486$) para los valores de IR entre tratamientos (Cuadro 11). Tampoco se obtuvo diferencias entre los eyaculados de baja y alta concentración ($P = 0.2281$ y $P = 0.5556$ respectivamente) (Cuadro 12), igualmente estos resultados se pueden atribuir a que esta variable es afectada por la MI del semen fresco y poscongelado, sin embargo, según Rosas (1997) valores de IR arriba de 51% son clasificados como excelentes.

Cuadro 11. Comparación de medias entre tratamientos para las variables Calidad Biológica (CB) e Índice de Recuperación (IR) de 20 eyaculados en semen poscongelado.

Grupo	CB (¥)	IR
Control	11, 025,000 ± 4, 503,551	57.70 ± 23.31
DPSS	12, 045,000 ± 3, 660,381	58.83 ± 18.64
CV	28.61	35.02

DPSS = Disminución Parcial de Plasma Seminal

CB = Calidad Biológica

IR = Índice de Recuperación

¥ = Millones de espermias viables por dosis seminal

CV = Coeficiente de Variación

Cuadro 12. Comparación de medias para las variables Calidad Biológica (CB) e Índice de Recuperación (IR) en semen poscongelado de baja y alta Concentración Espermática (CE).

Grupo	CE	CB (¥)	IR
Control	$> 500 \times 10^6$	11, 633,333 ± 4, 661,544	60.35 ± 26.24
DPSS	$> 500 \times 10^6$	11, 600,000 ± 4, 226,700	54.00 ± 23.20
CV		28.57	38.52
Control	$< 500 \times 10^6$	10, 527,272 ± 4, 532,789	55.52 ± 21.67
DPSS	$< 500 \times 10^6$	12, 818,181 ± 2, 629,379	64.59 ± 9.13
CV		24.76	28.84

DPSS = Disminución Parcial de Plasma Seminal

CE = Concentración Espermática

CB = Calidad Biológica

IR = Índice de Recuperación

¥ = Millones de espermias viables por dosis seminal

CV = Coeficiente de Variación

3.7 MUESTRAS APTAS Y NO APTAS PARA LA I.A

Se tomó como criterios una MI poscongelado $> 30\%$, un índice de recuperación $> 35\%$ y una CB $> 9 \times 10^6$, las medias encontradas para muestras aptas para la I.A. (Figura 1), mostraron similitud en las muestras de alta CE $> 500 \times 10^6$, sin embargo, para muestras de baja CE el porcentaje de muestras aptas para la I.A aumentó en 9.89% para el grupo con DPSS, los valores encontrados para el grupo con DPSS coinciden con los encontrados por Aké-López y Sánchez (1997) de un 100% de muestras aptas, pero los valores para el grupo control fueron diferentes (52.9%), esta diferencia se puede atribuir al tipo de diluyente usado.

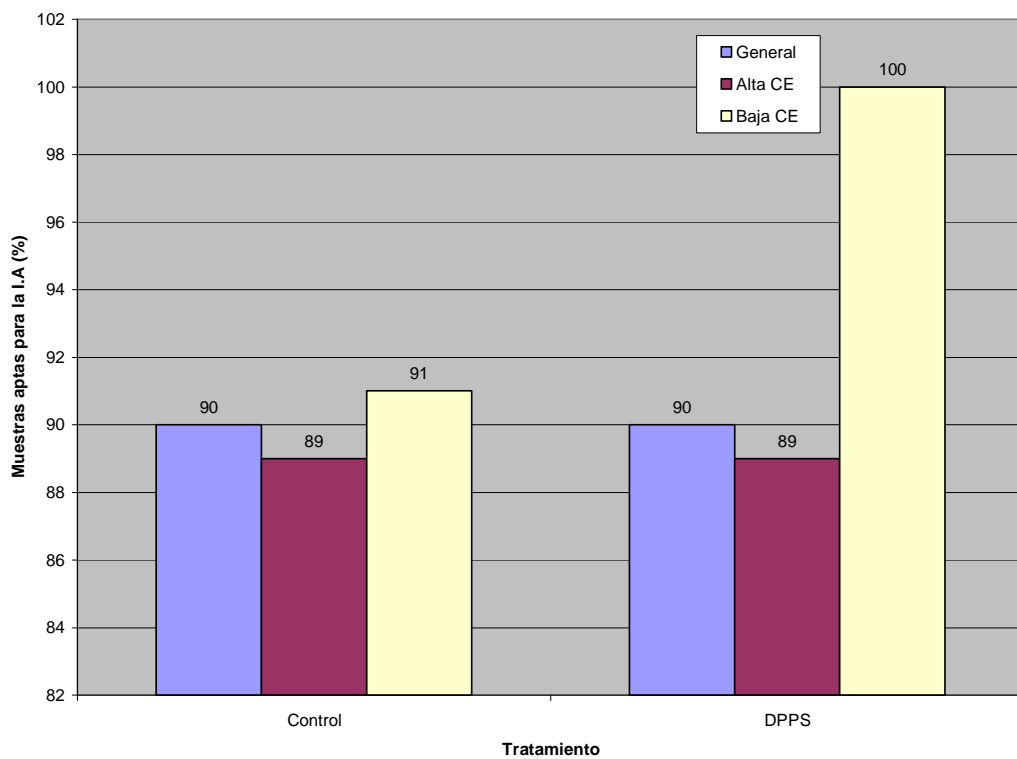


Figura 1. Porcentaje de muestras aptas para la Inseminación Artificial (IA) en semen poscongelado del total de las muestras y muestras con alta y baja Concentración Espermática (CE).

4. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones de este estudio:

La DPPS en semen fresco con volumen mayor a 9 mL, mejora la concertación espermáticas y disminuye las anormalidades en el semen poscongelado en todas aquellas muestras de baja concentración espermática; la motilidad en masa, motilidad individual, calidad biológica e índice de recuperación no fueron afectados por la DPPS en fresco o poscongelado.

La DPPS aumentó el porcentaje de muestras aptas para la I.A. en muestras de semen diluido y con baja concentración espermática.

5. RECOMENDACIONES

Realizar una reducción parcial del plasma seminal en todo eyaculado que presente baja concentración espermática, para incrementar las posibilidades de congelar con éxito muestras muy diluidas.

Investigar el porcentaje ideal que se debe reducir de plasma seminal en todas las muestras de baja concentración espermática.

5. LITERATURA CITADA

Ablin, R. 1974. Immunologic properties of sex accessory tissue components. In Male Accessory Sex Organs. D. Brandes ed. New York, Academic Press.

Aké-López, R. Sánchez, W. 1997. Efecto de la remoción parcial del plasma seminal sobre la congelabilidad del semen bovino. *Biomed*; 8:21-26

Brinsko, S. Crockett, E. Squires, E. 2000. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. *Theriogenology*; 54:129-136.

Fields, M. Burns, W. Warnick, A. 1979 Age, season and breed effect on testicular volumen and semen traits in young beef bulls. *Journal of Animal Science*. 48 1299-1304.

Foster, J. 1970. Changes in sexual behavior and semen characteristics among successive ejaculation. In *Reproductive Capacity of beef bulls*. *Journal of Animal Science*. 46:160-163.

Hafez, E. 1996. Espermatozoides y plasma seminal. En: *Reproducción e inseminación artificial en animales*. 6^o ed. McGRAW-HILL. México D. F. 7:172-173.

Holý, L. 1987. *Biología de la reproducción bovina*. 3^{ra} ed. La Habana, Cuba. Ed. Científico-Técnico. 332 p.

Huertas, J. 1991. *Manual práctico y moderno de inseminación artificial*. Bogotá, Colombia. Ed. Elen impresores. 160 p.

Mann, T. Lutwak-Mann, C. 1981. *Male Reproductive Function and Semen*. New York, Springer-Verlag.

Pickett, B. 1975. Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa. *Fertil steril*; 26:167-174.

Rosas, J. 1997. *Fisiología y mejoramiento animal*. INIFAP-SAGAR. Memorias del VI Curso de Actualización en reproducción animal. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias. Tabasco, México. 25-32 p.

SAS. 2006. *SAS User Guide Statistical Analysis Institute Inc, Cary NC*.

Shivaji, S. Bharagava, P. Scheit, K. 1984. Immunological identification of seminalplasmin in tissue extracts of sex glands of bull. *Biology of Reproduction*, 30:1237-1241.

Sorensen AM. 1982. *Reproducción animal: Principios y prácticas*. McGraw-hill. México; 1982: 91-116.

Vera M., O. 2001. Evaluación seminal comparativa pre y postcongelación en machos bovinos. En: *Reproducción Bovina*. C. González-Stagnaro (Ed). Fundación Girarz, Maracaibo-Venezuela. 15: 251-262.

White, I. 1980. Secretion of male reproductive tract and seminal plasm. In *Reproductive in farm Animals*. 4th ed. E.S.E. Hafez (ed.). Philadelphia, Lea & Febiger.

Zavaleta, C. 1997, Evaluación de la capacidad reproductiva de los toros, características del eyaculado. INIFAP-SAGAR. *Memorias del VI Curso de Actualización en Reproducción Animal*. Tabasco, México. 1-24p.

Zemjanis, R. 1981. *Reproducción animal, diagnóstico y técnicas terapéuticas*. 6ta Ed. México. Ed. Limusa. 253 p.