

**Evaluación de dos diluyentes para la  
criopreservación de semen bovino**

**Javier Mauricio Raudales Zúniga  
Héctor Vidal Cerrato Zelaya**

302432

302432

**ZAMORANO**

Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria

Noviembre, 2006

T2337

ZAMORANO  
CARRERA DE CIENCIA Y PRODUCCIÓN AGROPECUARIA

# **Evaluación de dos diluyentes para la criopreservación de semen bovino**

Proyecto especial presentado como requisito parcial  
para optar al título de Ingeniero Agrónomo en  
el Grado Académico de Licenciatura.

Presentado por:

**Javier Mauricio Raudales Zúniga**  
**Héctor Vidal Cerrato Zelaya**

**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.



---

Javier Mauricio Raudales Zúniga



---

Héctor Vidal Cerrato Zelaya

Zamorano, Honduras  
Noviembre, 2006

**DEDICATORIA**  
**J.M.R.Z.**

A DIOS y a la Virgen María porque su misericordia ha sido grande para conmigo hasta el día de hoy.

A mis padres Juan Luis Raudales R. y Sandra Zúniga, con todo mi amor infinitas gracias por su apoyo, comprensión, dedicación y confianza.

A mis hermanas Ena Esperanza, Sandra Lourdes y mi hermano Juan Luis por su confianza, colaboración y consejos.

## **AGRADECIMIENTOS**

### **J.M.R.Z**

A DIOS y a la Virgen María por haberme dado la salud necesaria para concluir esta etapa de mi vida.

A mis padres, por sus sacrificios incontables y por creer siempre en mis capacidades.

A mis hermanos por el apoyo comprensión y confianza que siempre tuvieron en mi.

A mi compañero y amigo Héctor Vidal Cerrato por brindarme su amistad, confianza, paciencia y el apoyo para poder realizar este proyecto.

Al Dr. John J. Hincapié por su orientación, paciencia como asesor y consejos como amigo. Mil gracias por todo doctor.

Al Dr. Isidro Matamoros por su colaboración y paciencia para poder realizar este proyecto.

Al Ing. Rogel Castillo por su amistad, confianza y ayuda.

A la Ing. Martha Sofia por haber compartido sus conocimientos, experiencia y consejos para la realización de este proyecto.

A todos mis compañeros, colegas y amigos por su desinteresada amistad.

**AGRADECIMIENTOS A PATROCINADORES**  
**J.M.R.Z**

A mis padres por el sacrificio de financiarme la mayor parte de mis estudios.

A Food for Progress por financiar mi matrícula del cuatro año de estudio.

A la Escuela Agrícola Panamericana, por el financiamiento parcial de mis cuatro años de estudio.

## RESUMEN

Raudales, J.; Cerrato, H. 2006. Evaluación de dos diluyentes para la criopreservación de semen bovino. Proyecto Especial de Ingeniero Agrónomo, El Zamorano, Honduras. 21 p.

El proceso de congelación/descongelación provoca lesiones en los espermatozoides debido a su sensibilidad a las bajas temperaturas. El objetivo de este estudio fue evaluar dos diluyentes para la criopreservación del semen bovino. El ensayo se realizó en el laboratorio del Fondo Ganadero, Comayagua, Honduras. Se evaluaron 20 eyaculados provenientes de toros de cuatro razas y sus cruces. Los eyaculados que cumplieron los criterios de inclusión fueron divididos en dos fracciones: El tratamiento 1 fue 50% del eyaculado fue procesada con el diluyente Continental Two Step<sup>®</sup>. El tratamiento 2 fue 50% del eyaculado fue procesada con el diluyente a base de leche descremada UHT + antibiótico + 8% de glicerol. Las colectas de semen se hicieron mediante un electroyaculador. Las variables de Motilidad Masal (MM) Motilidad Individual (MI) precongelamiento y poscongelamiento no presentaron diferencia significativa ( $P > 0.05$ ) de igual manera para la anormalidad precongelamiento no fue significativa ( $P > 0.05$ ); el Índice de Recuperación (IR), la Calidad Biológica (CB), la anormalidad poscongelamiento y el porcentaje de muestras aptas y no aptas para Inseminación Artificial (I.A.) las diferencias fueron significativas entre si ( $P < 0.05$ ) obteniendo los mejores resultados el diluyente Continental Two Step<sup>®</sup>. Se utilizó un diseño experimental de Bloque Completos al Azar (BCA), realizando un ANDEVA y separación de medias, la variable porcentaje de muestras aptas y no aptas para la I.A. fue analizada con el PROC FREQ utilizando la prueba de Chi-cuadrado.

**Palabras clave:** Calidad biológica, leche descremada, motilidad individual.

## CONTENIDO

Portadilla .....	i
Autoría .....	ii
Página de firmas .....	iii
Dedicatoria J.M.R.Z. ....	iv
Agradecimientos J.M.R.Z .....	v
Agradecimientos a patrocinadores J.M.R.Z .....	vi
Resumen .....	vii
Contenido .....	viii
Índice de cuadros .....	x
Índice de figuras .....	xi
Índice de anexos .....	xii
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>4</b>
2.1 LOCALIZACIÓN .....	4
2.2. MATERIAL SEMINAL .....	4
2.3. CRITERIOS DE INCLUSIÓN PARA LOS EYACULADOS .....	4
2.4. TRATAMIENTOS .....	4
2.5. METODOLOGÍA .....	5
2.5.1 Motilidad Masal (MM) .....	5
2.5.2 Motilidad Individual (MI) .....	6
2.5.3 Concentración. ....	7
2.5.4 Morfología. ....	7
2.6. METODOLOGÍA PARA ENFRIAMIENTO Y CONGELACIÓN .....	8
2.7 VARIABLES MEDIDAS .....	9
2.8. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	10
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>11</b>
3.1 MOTILIDAD MASAL (MM) PRECONGELADO Y POSCONGELADO .....	11
3.2 MOTILIDAD INDIVIDUAL PRECONGELADO Y POSCONGELADO .....	11
3.3 ANORMALIDADES PRECONGELAMIENTO Y POSCONGELAMIENTO .....	12
3.4 ÍNDICE DE RECUPERACIÓN .....	13
3.5 CALIDAD BIOLÓGICA .....	13
3.6 PORCENTAJE DE MUESTRAS APTAS Y NO APTAS PARA LA I.A. ....	14
<b>4. CONCLUSIONES .....</b>	<b>16</b>

5.	<b>RECOMENDACIONES.....</b>	17
6.	<b>LITERATURA CITADA.....</b>	18
7.	<b>ANEXOS.....</b>	21

## ÍNDICE DE CUADROS

### Cuadro

1.	Determinación de la Motilidad Masal (MM) en eyaculados de toro.....	6
2.	Clasificación de la Motilidad Individual (MI) espermática en el toro.....	6
3.	Cálculo de la calidad biológica, expresada en el número de espermias viables por dosis de semen al descongelado (a concentración de 30 millones de espermias).....	9
4.	Disminución porcentual en la Motilidad Masal (MM) precongelamiento y poscongelamiento. ....	11
5.	Disminución porcentual de la MI precongelamiento y poscongelamiento....	12
6.	Incremento porcentual de anormalidades al poscongelamiento .....	13
7.	Calidad biológica (MI poscongelado $\times$ concentración de la dosis seminal) de acuerdo a cada tratamiento (a concentración de 30 millones de espermias).....	14

## ÍNDICE DE FIGURAS

### Figura

- |    |   |    |
|----|---|----|
| 1. | Porcentaje de muestras aptas y no aptas para la I.A. .... | 15 |
|----|---|----|

## ÍNDICE DE ANEXOS

### Anexo

1. Tabla para la medición de la concentración seminal. .... 21

## 1. INTRODUCCIÓN

En el pasado, los resultados obtenidos con el semen congelado eran poco satisfactorios, especialmente cuando el semen se depositaba fuera del útero, pero con el uso de diluyentes mejorados, la tasa de preñez con el semen congelado puede compararse a los niveles logrados con semen fresco. Aunque los procesos de congelación y descongelación matan a los espermatozoides (hasta un 20-50%), la congelación es necesaria para prolongar la vida del semen y el período de tiempo en que las hembras pueden ser inseminadas. Sin el uso del semen congelado, sería difícil inseminar en diferentes regiones geográficas e imposible poder utilizar semen de otros países (Schoenian 2001).

El proceso de congelación/descongelación provoca lesiones en cualquier tipo de célula, pero los espermatozoides son especialmente sensibles a las bajas temperaturas, sufriendo el proceso que se denomina choque por frío. Las particularidades que presenta el espermatozoide hace que sea muy sensible al choque por frío (Pursel *et al.* 1973), que produce una alteración de funcionalidad de la membrana espermática y compromete la viabilidad celular. Estas alteraciones del espermatozoide, hacen que disminuya el tiempo en el cual el espermatozoide puede ser fértil, de tal manera que al usarse en inseminación artificial se obtenían resultados inferiores a los obtenidos con semen refrigerado.

El proceso de criopreservación de semen causa reducción en la viabilidad espermática debido a las alteraciones en la temperatura y al efecto de osmolaridad, afectando las membranas. Los daños en las membranas pueden variar de cambios en la organización y composición lipídica, fluidez y de permeabilidad hasta ruptura total. De esta forma, los espermatozoides presentan daños en la producción del ATP y la motilidad espermática, reducción de la fertilidad, y hasta muerte, como consecuencia de las alteraciones en el plasma de las membranas acrosomal y mitocondria (Watson 2000).

El proceso de criopreservación de semen está dividido en cinco pasos: dilución, enfriamiento, congelación, almacenamiento y descongelado. Cada uno de esos pasos tiene una relación con la estructura funcional de las membranas y el metabolismo celular (Amanny y Pickett 1987; Hammerstedt *et al.* 1990). La preservación de las estructuras espermáticas pos-congelado es obtenida por una interacción entre diluyente, crioprotector, curvas de enfriamiento, congelación y descongelación, buscando minimizar los daños causados por el choque frío, formando cristales de hielo y deshidratación celular (Amanny y Pickett 1987; Jasko 1994; Yoshida 2000).

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1 LOCALIZACIÓN**

El estudio se realizó entre Mayo a Septiembre de 2006, en las instalaciones del Laboratorio de Reproducción Animal del Fondo Ganadero de Honduras, ubicado en Comayagua, Honduras, además se utilizó el laboratorio de reproducción animal de la Escuela Agrícola Panamericana.

### **2.2. MATERIAL SEMINAL**

Se analizaron 20 eyaculados recolectados de toros de las razas Pardo Suizo, Brahman, Angus, Rogmanola y sus cruces, provenientes del plantel de reproductores del Fondo Ganadero de Honduras. Los toros tenían edades comprendidas entre 18 y 48 meses. Todos los animales fueron sometidos a un examen clínico veterinario para verificar su buen estado de salud, además de ser sometidos a las pruebas serológicas de IBR, DVB, Leucosis, Brucelosis y Leptospira y fueron desparasitados 30 días antes de iniciar la investigación. Todos los animales se mantuvieron bajo las mismas condiciones de alimentación y manejo en sus respectivos toriles individuales.

### **2.3. CRITERIOS DE INCLUSIÓN PARA LOS EYACULADOS**

Los siguientes fueron los criterios exigidos

- a) Volumen del eyaculado no menor de 5 mL ni mayor de 10 mL
- b) Concentración  $\geq 500 \times 10^9$  espermatozoides/mL
- c) Motilidad en masa  $\geq 70\%$
- d) Motilidad espermática individual  $\geq 70\%$ .

### **2.4. TRATAMIENTOS**

Se procesaron 20 eyaculados, los que cumplieron los criterios de inclusión fueron divididos en dos fracciones y a cada una se le asignó un tratamiento.

Tratamiento CTS: 50% de la fracción del eyaculado fue procesada y congelada con el diluyente Continental Two Step<sup>®</sup>.

Tratamiento LDG: 50% de la fracción del eyaculado fue procesada y congelada con el diluyente a base de leche descremada UHT + antibiótico + 8% de glicerol.

El cambio de temperatura durante el enfriamiento de la célula altera las propiedades físicas de todas las membranas celulares. La adición de crioprotector penetrante altera el volumen celular y la congelación altera la estructura y el volumen de la membrana. El almacenamiento representa el estado celular de dormancia celular. Cuando la célula es descongelada, es removido el diluyente de almacenaje, ocurre la recuperación y expansión de la membrana (Amanny y Pickett 1987; Hammerstedt *et al.* 1990; Watson 1995).

Los espermatozoides se encuentran en el plasma seminal que suministra los nutrientes necesarios para mantener una elevada actividad metabólica, necesaria para el proceso de transporte espermático a través del genital femenino. En el eyaculado, esta actividad metabólica solo puede mantenerse durante un periodo de tiempo muy limitado. Para poder conservar el semen durante períodos prolongados es necesario que se reduzca la actividad metabólica de los espermatozoides, mediante la dilución en un medio adecuado y la reducción de la temperatura (Gadea 2003).

Un diluyente es una solución acuosa que aumenta el volumen del eyaculado hasta conseguir las dosis necesarias y preserva las características funcionales de las células espermáticas y mantiene el nivel de fertilidad adecuado (Gadea 2003).

El diluyente debe interactuar con el semen y proporcionar protección para los diferentes compartimentos celulares durante el enfriamiento, congelación y descongelación. Por eso, su constitución debe garantizar nutrición, protección, balance eletrolítico (pH y osmolaridad) e inhibición bacteriana. Los constituyentes básicos de los diluyentes son sustancias energéticas, crioprotectores, soluciones tampón y antibióticos (Graham 1995; Squires *et al.* 1999; Holt 2000).

El diluyente debe aportar los nutrientes necesarios (glucosa) para el mantenimiento metabólico de la célula espermática, la protección frente al shock térmico por frío, controlar el pH del medio (Bicarbonato, TRIS, HEPES), la presión osmótica (sales NaCl, KCl) y la inhibición del desarrollo microbiano (antibióticos) (Gadea 2003).

En ausencia del crioprotector, la congelación causa de 30-40% de destrucción de los liposomas ligados a las proteínas de la bicapa lipídica. Las altas concentraciones (10-20%) del crioprotector desestabilizan los liposomas igual que antes de la congelación, por lo tanto disuelven los fosfolípidos, mientras que en concentraciones moderadas, previenen un efecto perjudicial en la deshidratación de los lípidos en la congelación (Strauss e Ingenito 1980).

La yema de huevo posee lipoproteínas de baja densidad, principalmente la fosfatidilcolina, que son responsables de la acción protectora de las membranas (Watson 1995). La adición de la lipoproteína aislada al diluyente preserva mejor la calidad y la capacidad de fertilidad del semen de bovino, después del proceso de congelación y descongelación en comparación de la adición de la yema de huevo (Amirat *et al.* 2004).

La leche ha tenido auge en la inseminación artificial en bovinos especialmente mediante la utilización de semen refrigerado. Se hace necesario que se busquen nuevos medios de conservación y transporte (diluyentes) que sean de más fácil consecución, preparación y de menor costo que los diluyentes que se emplean en la actualidad. Este es el caso de la leche descremada ultrapasteurizada (UHT), la cual ofrece ventajas como la de proporcionar un medio libre de gérmenes para el esperma y el que solo requiere ser atemperada óptimamente para ser adicionada al semen. Por esto, se pretende comprobar la utilidad de la leche descremada ultrapasteurizada como medio de conservación de semen refrigerado.

El objetivo de este estudio fue evaluar la calidad biológica, el porcentaje de muestras aptas para la I.A. y los efectos sobre los parámetros microscópicos del semen bovino poscongelado utilizando dos diluyentes para críopreservación.

## 2.5. METODOLOGÍA

Para la extracción del semen se utilizó el método de electroeyaculación utilizando un equipo Ideal Instrumens Electrojack 5<sup>®</sup> el cual aplica 32 voltios/ciclo en el reóstato. Inmediatamente antes de la recolección del semen, los toros fueron sometidos a un lavado prepucial con Solución Salina Fisiológica (SSF 0.9% NaCl), se recortaron los pelos de la brocha del prepucio y se realizó un masaje transrectal de las glándulas accesorias.

Posteriormente se recolectó el semen en una bolsa plástica estéril adaptada al colector del equipo, inmediatamente el semen fue enviado al laboratorio en una incubadora a 35–37°C; una vez en el laboratorio se colocó en un tubo de vidrio graduado y atemperado para su procesamiento.

Todos los materiales que entraron en contacto con el semen se mantuvieron a 35- 37°C. Inmediatamente fueron evaluados el volumen, color, olor y pH, utilizando como criterios los propuestas por Holý (1987):

- a. Volumen: en toros el volumen del eyaculado varía entre 2-10 o más mL siendo el promedio de 5 a 6 mL dependiendo de la edad, raza, uso del toro y del tamaño de los testículos principalmente.
- b. Color: el semen de buena calidad debe tener un color blanco lechoso, grisáceo lechoso o amarillento cremoso (Holý 1987).
- c. Olor: es determinado por el contenido de un lípido, la espermina; se aceptó el semen que no presente olores extraños como: urinoso, excrementoso o putrefacto.
- d. pH: en el semen de bovino oscila en un rango de 6.5 a 7. Su medición se realizó utilizando papel tornasol.

Seguidamente se retiró una muestra de 100  $\mu$ L en un tubo eppendorf para la evaluación microscópica según Wenkoffy y Zavaleta (1997), la cual consistió en:

**2.5.1 Motilidad Masal (MM).** Este parámetro evalúa la capacidad de movimiento de los espermias. Para su evaluación se utilizó un porta-objetos atemperado a 35°C en el cual se depositó una gota de semen fresco sin diluir, la cual fue observada a 10X y 20X en un microscopio de contraste de fase con platina térmica. Para su puntuación se utilizó la clasificación propuesta por Vera (2001), la cual se presenta en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Determinación de la Motilidad Masal (MM) en eyaculados de toro.

Valor	%	Descripción	Clasificación
1	< 50	No hay ondas. Movimiento espermático vibrátil	Pobre
2	50-70	Ondas ligeras con movimiento apenas perceptibles	Aceptable
3	70-90	Ondas aparentes. Remolinos con movimiento moderado	Buena
4	90-100	Ondas oscuras con movimientos rápidos	Muy buena

Fuente: Vera (2001); Adaptado por los autores.

**2.5.2 Motilidad Individual (MI).** Esta evaluación permite calcular el porcentaje de espermatozoides con movimiento rectilíneo progresivo presentes en una muestra de semen; se tomó como anormal cualquier otro movimiento diferente al rectilíneo progresivo (pendular, circular, retroactivo). Su evaluación fue realizada colocando una gota de semen fresco diluido en Solución Salina Fisiológica (SSF) en proporción de 10:100 en un portaobjetos atemperado a 35°C, posteriormente se cubrió con una laminilla atemperada y se observó a 40X en el microscopio de contraste de fase. Para su clasificación se tomó como patrón la propuesta por Zemjanis (1981), la cual se presenta en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Clasificación de la Motilidad Individual (MI) espermática en el toro.

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

Fuente: Zemjanis (1981); Adaptado por los autores.

**2.5.3 Concentración.** Este parámetro indica la cantidad de espermatozoides presentes en una unidad de volumen (mL), siendo de gran importancia para la clasificación del eyaculado como para el cálculo de la dilución a utilizar. Se utilizó un espermiodensímetro Karras<sup>®</sup>, el cual se basa en la turbidez de una suspensión de diferentes concentraciones de espermios, vistas en la escala del densímetro. Se colocó 9 mL de agua dentro del densímetro mediante una pipeta. Después se adicionó un mL de semen puro en el densímetro. Se tapó el densímetro con el pulgar e invirtió suavemente 2 a 3 veces, a fin de suspender las células espermáticas. Se observó la escala y se comparó con los datos de una tabla la cual da la concentración (Anexo 1) (Minitub 2006).

**2.5.4 Morfología.** Este parámetro es de suma importancia, ya que de la normalidad e integridad de la célula espermática dependerá su capacidad fecundante. En un eyaculado normal de toro se puede encontrar un gran número de células anormales, consideradas como desecho fisiológico cuando su valor se encuentra entre 5 y 15% del total, sin embargo, si el valor encontrado es mayor que 15% se considera anormal y la fertilidad del toro se encontrará comprometida seriamente (Holý 1987).

Para su determinación se utilizó la coloración farelly stain, compuesta de 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 introdujo la preparación en la solución fijadora durante 10 segundos. Luego las preparaciones se mantuvieron verticales sobre un papel filtro, para dejar escurrir el exeso de la solución fijadora. Posteriormente las placas pasaron por cada uno de los colorantes. En el colorante A estuvo sumergido por 20 segundos, luego se lavó y secó con papel absorbente, para el colorante B se sumergió por 5 segundos se lavó y luego se escurrió verticalmente hasta secar. Para el cálculo se contó un mínimo de 200 espermatozoides por placa.

El tratamiento con el diluyente Continental Two-Step<sup>®</sup> (CTS) consta de una solución A y B que una vez restituida está compuesta de:

Tris	2.42%
Acido 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
Agua bidestilada	66.20%

El tratamiento con el diluyente LDG está compuesto de:

Leche descremada	92%
Glicerol	8%
Tilosina	5.50 mg
Gentamicina	27.50 mg
Lincospectina	16.50 mg
Espectinomicina	33.00 mg

## 2.6. METODOLOGÍA PARA ENFRIAMIENTO Y CONGELACIÓN

La metodología para el enfriamiento y empaque del tratamiento CTS se describe a continuación:

El semen fue prediluido en una proporción 1:1 con la fracción A del diluyente a una temperatura de 35°C durante 15 minutos y posteriormente se agregó el resto de la fracción A y se enfrió a 5°C. Una vez a 5°C se dejó equilibrar durante 2 horas, tiempo al cual se le agregó una cantidad igual de diluyente B a 5°C. Se envasó en pajillas de 0.5 mL utilizando una concentración de  $30 \times 10^6$  espermatozoides/pajilla, posteriormente se dejó equilibrando durante 4 horas a 5°C, al cabo de este tiempo se congeló en vapores de N<sub>2</sub> durante 10 minutos a 4 cm de altura sobre el nivel del N<sub>2</sub> y utilizando lotes de 50 pajillas. Después de los 10 minutos fueron agrupadas en los goblets de a cinco pajillas por goblets y dos goblets por escalerilla para luego ser depositadas directamente en el termo con N<sub>2</sub> líquido.

Al cabo de 24 horas posteriores a la congelación, se descongelaron cinco pajuelas de cada muestra a 37°C por 40 segundos en baño maría y se evaluaron nuevamente, calculando MI y concentración espermática. Para el cálculo de la MI el semen fue diluido en SSF en proporción 1:4 según lo recomendado por Rosas (1997).

La metodología para el enfriamiento y empaque del tratamiento LDG se describe a continuación:

La leche se lleva a 95°C durante 15 minutos en un agitador con placa de calentamiento (debe estar en constante movimiento evitando la formación de nata), posteriormente, se deja enfriar y se le agrega el resto de reactivos.

### Protocolo LDG

1. El diluyente preparado se lleva a 29°C en baño maría, al igual que la temperatura del semen.
2. Se diluye el semen (de acuerdo con los análisis pertinentes) se empaqueta en pajuelas de 0.5 mL y se pone a enfriar en la cámara climática a 5°C durante 4 horas.

3. Exponer las pajuelas a vapores de nitrógeno a 4 cm sobre el nitrógeno líquido por 10 minutos.
4. Después de exponerlas al vapor de nitrógeno líquido se introducen directamente en el termo.
5. Descongelar a 37°C durante 40 segundos para realizar las pruebas poscongelado. Colocar una gota pequeña en el portaobjetos, para que al colocar el cubreobjetos la película sea fina, de lo contrario los glóbulos de grasa dificultan el análisis de los espermatozoides.

La calidad biológica está representada por el valor obtenido de multiplicar la MI poscongelado por la concentración, dicho valor fue interpretado de acuerdo al Cuadro 3.

Cuadro 3. Cálculo de la calidad biológica, expresada en el número de espermias viables por dosis de semen al descongelado (a concentración de 30 millones de espermias).

Motilidad Individual (MI) (%)	# de espermias viables (Millones)	Resultado
20	6.0	No adecuada
25	7.5	No adecuada
30	9.0	Aprobada
35	10.5	Aprobada
40	12.0	Aprobada
45	13.5	Aprobada
50	15.0	Aprobada

Fuente: Rosas (1997); Adaptado por los autores

Se consideraron muestras aptas para la I.A. aquellas que presenta >35% de MI, calidad biológica igual o superior a  $9 \times 10^6$  y un Índice de Recuperación (IR) superior a 30, ya que valores entre 31 y 40 son considerados buenos, 41 a 50 muy buenos y mayores de 51 excelentes. El IR es el resultado de dividir la MI poscongelación por la MI antes de congelar por cien.

## 2.7 VARIABLES MEDIDAS:

- Motilidad en Masa (MM) pre y poscongelado (%).
- Motilidad Individual (MI) pre y poscongelado (%).
- Índice de recuperación (%).
- Calidad biológica.
- Anormalidades pre y poscongelado (%).
- Muestras aptas y no aptas para I.A. (%).

## 2.8. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó un Bloque Completamente al Azar (BCA) con dos tratamientos y 20 repeticiones por tratamiento. Para el análisis de las variables con división porcentual de MM, MI, porcentaje de recuperación y porcentaje de anormalidades, fueron corregidos a través de la función arc-seno para su normalización; se utilizó el Modelo Lineal General (GLM), realizando un ANDEVA y separación de medias, para los valores donde se encontraron diferencias se aplicó el procedimiento de Diferencia Mínima Significativa (DMS). La variable porcentaje de muestras aptas y no aptas para la I.A. fue analizada con el PROC FREQ utilizando la prueba de Chi-cuadrado; para la interpretación de la calidad biológica se utilizó procedimientos de estadística descriptiva. El valor de significancia exigido fue de 0.05 y el programa estadístico utilizado fue Statistic Analysis System (SAS 2002).

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 MOTILIDAD MASAL (MM) PRECONGELADO Y POSCONGELADO

El valor porcentual promedio obtenido de la MM precongelado se ubica dentro de la clasificación de bueno de acuerdo a lo propuesto por Vera (2001). El tratamiento CTS presentó un 8.57% más de MM al poscongelado que el tratamiento LDG (Cuadro 4). Las diferencias encontradas no fueron significativas entre tratamientos CTS y LDG tanto para la MM precongelado ( $P = 0.77$ ) como para poscongelado ( $P = 0.14$ ).

Cuadro 4. Disminución porcentual en la Motilidad Masal (MM) precongelamiento y poscongelamiento.

Tratamiento	Motilidad en Masa		Disminución (%)
	Precongelado (%)	Poscongelado (%)	
CTS	89.00 ± 7.53	76.00 ± 8.20	14.61
LDG	89.75 ± 7.34	70.00 ± 11.69	22.01
C.V	15.46	20.01	

CTS = Diluyente Continental Two Step<sup>®</sup>.

LDG = Diluyente a base de leche descremada UHT + antibiótico + 8% de glicerol.

#### 3.2 MOTILIDAD INDIVIDUAL (MI) PRECONGELADO Y POSCONGELADO

Las diferencias encontradas no fueron significativas entre tratamientos CTS y LDG tanto para la MI precongelado ( $P = 0.89$ ) como para el poscongelado ( $P = 0.051$ ). La MI precongelado fue clasificada dentro de la categoría de bueno de acuerdo a lo propuesto por Zemjanis (1981) para ambos tratamientos; la MI poscongelado presentó disminuciones porcentuales de hasta el 66% (Cuadro 5) al compararla con la MI precongelado (fresco), sin embargo, el tratamiento CTS presentó un 21.06% más de MI que el tratamiento LDG, cabe recalcar que en el campo ocular del microscopio los glóbulos de grasa que presenta la leche impiden tener una mejor visibilidad de los movimientos de los espermatozoides, lo que posiblemente afectó los resultados.

La importancia de la MI radica en que las células espermáticas tienen un movimiento progresivo de avance hacia el frente lo cual es crucial para facilitar el paso a través del cuello uterino y unión uterouvárica y, lo que es más importante, hace posible la penetración de las células del montículo ovárico y la zona pelúcida del óvulo (Hafez 1996). De igual manera, estos resultados coinciden con las investigaciones de Soto (2001) quien opina que la disminución en MI poscongelado puede oscilar entre 30-40% ó más dependiendo de las individualidades de cada toro y de la composición lipídica de la bicapa en la membrana del espermatozoide.

Cuadro 5. Disminución porcentual de la MI precongelamiento y poscongelamiento.

Tratamiento	Motilidad Individual (MI)		Disminución (%)
	Precongelado (%)	Poscongelado (%)	
CTS	75.25 ± 5.25	30.75 ± 6.54	59.14
LDG	75.50 ± 5.10	25.40 ± 8.79	66.36
C.V	10.11	20.51	

CTS = Diluyente Continental Two Step<sup>®</sup>.

LDG = Diluyente a base de leche descremada UHT + antibiótico + 8% de glicerol.

### 3.3 ANORMALIDADES PRECONGELAMIENTO Y POSCONGELAMIENTO

Los porcentajes de anomalías en ambos tratamientos fueron muy similares pero el incremento en anomalías para el tratamiento CTS fue mayor, sobre el tratamiento LDG en un 21.62% (Cuadro 6), sin embargo, los resultados muestran que las anomalías pre y poscongelamiento están dentro del rango de 5 y 15% establecido por Hóly (1987), para semen fresco y de hasta 25% para semen congelado (Vera 2001).

No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos CTS y LDG para las anomalías precongelado ( $P = 0.81$ ) pero para las anomalías poscongelado hay diferencias significativas ( $P = 0.028$ ).

Cuadro 6. Incremento porcentual de anormalidades al poscongelamiento

Tratamiento	Anormalidades (%)		Incremento (%)
	Precongelado	Poscongelado	
CTS	10.8 ± 2.98	21.45 ± 2.70*	98.61
LDG	11.1 ± 5.61	20.10 ± 2.61*	81.08
C.V	38.80	22.29	

\* Medias difieren entre si ( $P < 0.05$ ).

CTS = Diluyente Continental Two Step<sup>®</sup>.

LDG = Diluyente a base de leche descremada UHT + antibiótico + 8% de glicerol.

### 3.4 ÍNDICE DE RECUPERACIÓN

El índice de recuperación muestra que para el tratamiento CTS tiene un 41.66% en Índice de Recuperación (IR) y el tratamiento LDG presenta un 33.73% en IR mostrando así una mejora del 23.51% de el tratamiento CTS sobre el tratamiento LDG. Los índices de recuperación están considerados dentro de la calificación de bueno para el tratamiento LDG y muy bueno para el tratamiento CTS. Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos CTS y LDG ( $P = 0.042$ ).

### 3.5 CALIDAD BIOLÓGICA

La calidad biológica para el tratamiento CTS presenta la clasificación de aprobado mientras que el tratamiento LDG es no adecuada para la I.A. (Cuadro 7) según la clasificación de Rosas (1997). Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos CTS y LDG ( $P = 0.035$ ).

Cuadro 7. Calidad biológica (MI poscongelado × concentración de la dosis seminal) de acuerdo a cada tratamiento (a concentración de 30 millones de espermias).

Tratamiento	MI (%)	# de espermias viables/dosis	Resultado
CTS	30.75	9,225,000 *	Aprobado <sup>ψ</sup>
LDG	25.40	7,620,000 *	No adecuado

\* Medias difieren entre si ( $P < 0.05$ ).

<sup>ψ</sup> Se consideran muestras aptas para la I.A. aquellas que presentan un número igual o superior a  $9 \times 10^6$  espermias viables.

CTS = Diluyente Continental Two Step<sup>®</sup>.

LDG = Diluyente a base de leche descremada UHT + antibiótico + 8% de glicerol.

MI = Motilidad Individual.

C.V. = 29.71

### 3.6 PORCENTAJE DE MUESTRAS APTAS Y NO APTAS PARA LA I.A.

Para el análisis de estos resultado se consideraron muestras aptas para la I.A. aquellas que presentaron 35% o más de MI, calidad biológica igual o superior a  $9 \times 10^6$  y un Índice de Recuperación (IR) superior a 30, dando como resultado 14 muestras aptas para el tratamiento CTS y para el tratamiento LDG sólo 7 muestras fueron aptas; las diferencias fueron significativas entre tratamientos ( $P = 0.028$ ) (Figura 1).

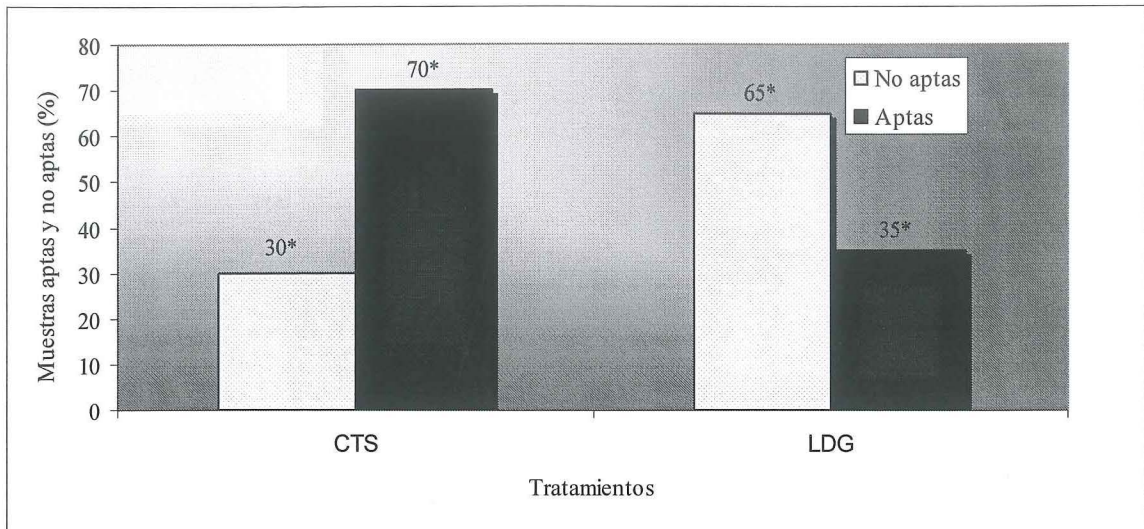


Figura 1. Porcentaje de muestras aptas y no aptas para la I.A.

CTS = Diluyente Continental Two Step<sup>®</sup>.

LDG = Diluyente a base de leche descremada UHT + antibiótico + 8% de glicerol.

\* Medias difieren entre si ( $P < 0.05$ ) expresada porcentualmente.

#### 4. CONCLUSIONES

La mayor calidad biológica del semen y el mayor porcentaje de muestras aptas para la I.A. se logró utilizando el diluyente Continental Two Step<sup>®</sup>.

El diluyente Continental Two Step<sup>®</sup> presentó los mejores resultados para los parámetros microscópicos del semen poscongelado.

## 5. RECOMENDACIONES

Bajo las condiciones de este estudio utilizar el diluyente Continental Two Step<sup>®</sup> para los procedimientos de congelación de semen bovino en el laboratorio del Fondo Ganadero de Honduras.

Investigar la fertilidad del semen *in vivo* mediante tasas de preñez para comparar los dos diluyentes.

## 6. LITERATURA CITADA

Amanny, R.P.; Pickett, B.W. 1987. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Veterinarian Sciences* 7:145-173.

Amirat, L.; Tainturier, D.; Jeannaau, L.; Thorin, C.; Gérard, O.; Counters, J.L.; Anton, M. 2004. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl<sup>®</sup>, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology* 61:895-907.

Gadea, J. 2003. Los diluyentes de inseminación artificial (en línea). Departamento de fisiología. Universidad de Murcia. Murcia, España Consultado 10 mayo 2006. Disponible en <http://www.agrodigital.com/UPLOAD>

Graham, J.K. 1995. Response of spermatozoa to freezing. In: Techniques for handling and utilization of transported cooled and frozen equine spermatozoa.. *Proceedings. Equine Sciences. Colorado State University Fort Collins, Colorado, USA.* p. 83-95.

Hafez, E. 1996. Reproducción e inseminación artificial en animales. México D.F., México. Ed. 542 p.

Hammerstedt, R.H.; Graham, J.K.; Nolan, J.P. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. *Journal Andrology* n.11:73-88.

Holt, W.V. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Sciences* 62:3-22.

Holý, L. 1987. Biología de la reproducción bovina. 3ª ed. La Habana, Cuba. Ed. Científico-Técnico. 332 p.

Jasko, D.J. 1994. Procedures for cooling and freezing of equine semen. *Arkansas Veterinarian* 10:156-65.

Minitub. 2006. Cómo procesar semen porcino en el plantel (en línea). Consultado 22 septiembre 2006. disponible en: [http://www.engormix.com/como\\_procesar\\_semen\\_porcino\\_s\\_articulos\\_811\\_POR.htm](http://www.engormix.com/como_procesar_semen_porcino_s_articulos_811_POR.htm)

## 7. ANEXOS

Anexo 1. Tabla para la medición de la concentración seminal.

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	1.35	675	450	337	270	225	193	168	159	135
90	1.50	750	500	375	300	250	214	187	167	150
85	1.65	825	550	412	330	275	235	206	183	165
80	1.80	900	600	450	360	300	257	225	200	180
75	1.95	975	650	487	390	325	278	243	216	195
70	2.10	1.05	700	525	420	350	300	262	233	210
65	2.25	1.125	750	562	450	375	321	281	250	225
60	2.45	1.225	816	612	490	408	350	306	272	245
55	2.65	1.325	883	662	530	441	378	331	294	265
50	2.95	1.475	893	737	590	491	421	369	328	295
45	3.35	1.675	1.116	837	670	558	478	418	372	335
40	3.75	1.875	1.25	937	750	625	536	469	416	375
35	4.25	2.125	1.416	1.062	850	708	607	531	472	425
30	4.85	2.425	1.616	1.212	970	808	693	606	539	485
25	5.55	2.775	1.85	1.387	1.11	925	793	694	617	555
20	6.35	3.175	2.116	1.587	1.27	1,058	907	794	705	635

302432

Pursel, V.G.; Johnson, L. Schulman, L. 1973. Effect of dilution seminal plasma e incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. *Journal of Animal Science* 37:528-531.

Rosas, P. J. 1997. Evaluación de la capacidad reproductiva de los toros. Determinación de la calidad del semen congelado. En: *Memorias del VI curso de actualización en reproducción animal*. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias. Tabasco, México. 1-24 p.

SAS. 2002. *SAS Users Guide* Statistical Analysis Institute Inc, Cary NC.

Schoenian, S. 2001. An update on Sheep AI (en línea). Maryland Ruminant Page. Maryland, U.S.A. Consultado 23 nov. 2005. Disponible en <http://www.agroterra.com/profesionales/articulos.asp>

Soto. 2001. Evaluación seminal comparativa pre y post-congelado en machos bovinos. En *reproducción Bovina C*. González-Staganaro (Ed). Fundación Girarz, Maracaibo. Venezuela. Cap XV. 251-262p.

Squires, E.L.; Pickett, B.W.; Graham, J.K.; Vanderwall, D.K.; Mccue, P.M.; Bruemmer, J.E. 1999. Cooled and frozen stallion semen. Fort Collins: Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory. 89 p.

Strauss, G; Ingenito, E.P. 1980. Stabilization of liposome bilayers to freezing and thawed: effects of cryoprotective agents and membrane proteins. *Cryobiology* 17:508-515.

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

Watson, P.F. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post thawing function. *Reproduction, Fertility and Development* 7:871-891.

Watson, P.F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science* 60(1):481-492.

Wenkoffy, M.S.; Zavaleta, C. 1997. Evaluación de la capacidad reproductiva de los toros, características del eyaculado. En: *Memorias del VI curso de actualización en reproducción animal*. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias. Tabasco, México. 1-24 p.

Yoshida, M. 2000. Conservation of sperms: current status and new trends. *Animal Reproduction Science* 60:349-355.

Zemjanis, R. 1981. *Reproducción animal. Diagnóstico y Técnicas Terapéuticas*. 6<sup>a</sup> ed. México. Ed. Limusa. 253 p.