

**Efecto de la variación de temperatura en la
curva de enfriamiento y en el proceso de
empaquete sobre la calidad biológica del
semen bovino**

Ángel Enrique Alban García

Roberto Carlos Olmedo Charro

ZAMORANO

Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria

Noviembre, 2006

ZAMORANO

Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria

**Efecto de la variación de temperatura en la
curva de enfriamiento y en el proceso de
empaque sobre la calidad biológica del semen
bovino**

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

Presentado por

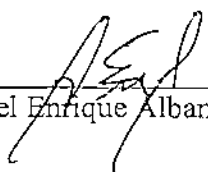
Ángel Enrique Alban García

Roberto Carlos Olmedo Charro

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 Enrique Alban García



Roberto Carlos Olmedo Charro

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2006

AGRADECIMIENTOS

A.E.A.G

A Dios por ser mi luz y mi camino, por ayudarme en todo momento de mi carrera.

A mi padre y a mi madre, que gracias a su ayuda y amor estoy cumpliendo mis objetivos y metas paso a paso.

A mis hermanos por estar presente en todos los momentos más importantes de mi vida.

Al Dr. John Jairo Hincapié, por sus conocimientos impartidos por su paciencia y su gran apoyo.

A Roberto mi compañero y gran amigo que durante este tiempo ha sido un apoyo grande para culminar esta carrera.

A David, Paúl, Marco Vinicio, Juan Francisco, Andrés, Esteban, Juan Pablo, Ángel Hernán, Héctor, Mauricio, Mario David por haber demostrado ser buenos amigos.

A Zamorano que ha sido mi casa durante cuatro años y que me ha brindado la oportunidad de conocer y aprender sobre diferentes campos.

AGRADECIMIENTOS R.C.O.CH

A mis padres Gonzalo Olmedo y María Charro, por todos sus consejos y apoyo incondicional en todo momento de mi vida.

A mi familia que desde la distancia me han dado fuerzas para culminar la carrera.

Al Dr. John Jairo Hincapié que por medio de sus conocimientos y experiencia nos guió en la tesis.

A la Ing. Sofía Ortega por la ayuda brindada en el Fondo Ganadero Comayagua-Honduras para la toma de los datos.

A todos los asesores de la tesis, Dr. Hincapié, Dr. Matamoros, al Ing. Castillo e Ing. Ortega que por todos sus consejos, conocimientos y experiencia nos guiaron para culminar con éxito.

A Enrique Alban compañero de tesis por todo su trabajo y esfuerzo durante la realización de la tesis.

A mis amigos Sebastián Araya, José Araya, Sebastián Calle, Fabián Cárdenas, Miguel Castillo, Juan Chicaiza, Cristian Castro, Serafín Garzón, Marco Lara, Felipe Morán, Moshe Tipán, que estuvieron en los buenos y malos momentos durante toda la carrera. Gracias por todo y éxitos amigos, siempre les recordaré.

RESUMEN

Ángel Alban y Roberto Olmedo 2006. Efecto de la variación de temperatura en la curva de enfriamiento y en el proceso de empaque sobre la calidad biológica del semen bovino. Proyecto Especial de Ingeniero Agrónomo, Zamorano, Honduras. 35 p.

Se utilizan varios parámetros para medir la calidad de semen: volumen, densidad, motilidad, proporción de espermatozoides vivos, proporción de anormales y una serie de medidas bioquímicas. La dilución y uso de diluyentes del semen es vital para disminuir la mortalidad de los espermatozoides. La capacidad o incapacidad de las células espermáticas para resistir alteraciones físicoquímicas a medida que disminuye rápidamente la temperatura hasta 0°C se denomina resistencia o susceptibilidad al choque por frío. El objetivo del estudio fue evaluar la calidad biológica del semen bovino poscongelado, con curva de enfriamiento 0.5°C/minuto y sin curva de enfriamiento 35°C a 5°C; con empaque a temperatura ambiente 20°C y en cámara fría 5°C, durante el proceso de criopreservación utilizando el diluyente Continental Two Step®. El estudio se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Reproducción Animal del Fondo Ganadero Comayagua; Honduras. Se utilizaron 20 toros de distintas razas y sus cruces; se les recolectó el semen en forma aleatoria para un total de 20 eyaculados. Los eyaculados que cumplieron los criterios de inclusión se dividieron en cuatro fracciones y a cada una se le asignó a un tratamiento. Se utilizó un diseño de Bloques Completamente al Azar (BCA). No se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) en las variables Motilidad en Masa (MM), Motilidad Individual (MI), índice de recuperación y calidad biológica entre los tratamientos; sin embargo se encontró diferencias significativas en la variable de anormalidades entre los tratamientos CCE-E20 y CCE-E5 ($P = 0.0395$) y entre el tratamiento CCE-E5 y SCE-E20 ($P = 0.0040$). Después del análisis se determinó que los tratamientos donde la fracción del eyaculado se procesó y congeló utilizando la curva de enfriamiento de 0.5°C/minuto hasta llegar a 5°C entre la fracción A y B con el diluyente Continental Two Step® y se empacó a 5°C o 20°C fueron los que presentaron mayor número de muestras aptas para inseminación artificial. Los tratamientos en los que el semen fue sometido a un cambio brusco de temperatura de 35°C a 5°C presentaron menor porcentaje en la calidad biológica; mientras que la temperatura de empackado que dio mayor porcentaje de muestras aptas para la Inseminación Artificial (IA) fue a 5°C.

Palabras clave: Anormalidades, índice de recuperación, inseminación artificial, motilidad individual, motilidad masa, espermatozoide.

CONTENIDO

Portadilla	i
Autoría	ii
Página de firmas.....	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	vii
Resumen.....	viii
Contenido	ix
Índice de cuadros	x
Índice de gráficos.....	xi
Índice de anexos.....	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS	4
2.1 LOCALIZACIÓN.....	4
2.1. MATERIAL SEMINAL	4
2.2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN PARA LOS EYACULADOS.....	4
2.3. TRATAMIENTOS	5
2.4. METODOLOGÍA	5
2.5. METODOLOGÍA DILUYENTE	8
2.6 VARIABLES ANALIZADAS	10
2.7. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	10
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	11
3.1 MOTILIDAD EN MASA (MM) PRECONGELADO Y POSCONGELADO	11
3.2 MOTILIDAD INDIVIDUAL (MI) PRECONGELADO Y POSCONGELADO	11
3.3 ÍNDICE DE RECUPERACIÓN (IR)	12
3.4 CALIDAD BIOLÓGICA.....	13
3.5 PORCENTAJE DE ANORMALIDADES PRECONGELADO Y POSCONGELADO	14
3.6 PORCENTAJE DE MUESTRAS APTAS Y NO APTAS PARA LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL	15
4. CONCLUSIONES.....	17
5. RECOMENDACIONES.....	18
6. LITERATURA CITADA	19
7. ANEXOS	21

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1 Determinación de la Motilidad Masal (MM) en eyaculados de toro	6
2 Clasificación de la Motilidad Individual (MI) espermática en el semen toro.....	7
3 Cálculo de la calidad biológica, expresada en el número de espermatozoides viables por dosis de semen al descongelado	9
4 Interpretación del Índice de Recuperación (IR) de semen poscongelado	10
5 Porcentaje de disminución en la Motilidad en Masa (MM) para los tratamientos de acuerdo a la velocidad de enfriamiento y temperatura de empaque.	11
6 Porcentaje de disminución en la Motilidad Individual (MI) para los tratamientos de acuerdo a la velocidad de enfriamiento y temperatura de empaque.	12
7 Calidad biológica para los tratamientos de acuerdo a la velocidad de enfriamiento y temperatura de empaque	14
8 Porcentaje de anomalías precongelado y poscongelado, y el incremento para los tratamientos de acuerdo a la velocidad de enfriamiento y temperatura de empaque.	15
9 Porcentaje de pruebas aptas y no aptas del semen para la inseminación aplicando distintos tratamientos de acuerdo a la velocidad de enfriamiento y temperatura de empaque.	16

1. INTRODUCCIÓN

La base de toda finca ganadera radica en contar con un buen plantel de toros en el hato de cría. El objetivo principal es producir el mayor número de terneros posibles, lo que implica una serie de cuidados sanitarios y de manejo en los reproductores (Acuña *et al.* 2003).

Los primeros estudios de inseminación artificial datan de 1779 cuando Spallanzani, un fisiólogo italiano inyecta en la vagina de una perra en celo esperma recogido previamente por excitación mecánica del pene; la hembra así tratada parió tres cachorros. En Francia Repiquet en 1890 aplicó el método con éxito en una yegua. En Dinamarca, Sorensen establece la primera cooperativa de inseminación artificial en 1936 y 1700 vacas son inseminadas en el primer año con un 59% de fecundaciones a la primera intervención (Derivaux 1961).

La Inseminación Artificial (IA) puede representar una herramienta útil para el mejoramiento de la eficiencia reproductiva de hatos ganaderos, permite fertilizar un gran número de animales con un solo eyaculado, de igual manera le da al ganadero una mayor libertad en la elección de sus metas y la estrategia a seguir para aumentar la productividad de un hato. (Vélez *et al.* 2002).

La capacidad de producción de semen en toros varía según la edad, tamaño, raza y peso. Se estima que uno o dos toros de cada cinco de una población no seleccionada, no serán capaces de producir tasas de concepción satisfactoria en vacas, debido a una cantidad o calidad inadecuada de semen y/o por defectos físicos que no permiten la cópula o por una falta de libido. La incidencia más alta de toros satisfactorios reproductivamente se encuentra entre los dos y ocho años de edad (Wenkoff y Zavaleta 1997).

Para elegir los reproductores a utilizarse en monta natural o en programas de inseminación artificial, se debe tener como objetivo principal lograr animales superiores, que vayan a dar una progenie más productiva y rentable. El seleccionar animales con fertilidad comprobada o con potencialidad para ello es un requisito indispensable para alcanzar mayores niveles de productividad. Cuando se realice la evaluación de un reproductor, solo deberán ser escogidos aquellos que tengan un sistema genital sano, que produzcan la mayor cantidad de espermatozoides viables, que gocen de excelentes condiciones físicas para eyacular semen de calidad, bien en la vagina de la vaca o en su defecto para la obtención de las muestras de éste, y aquellos que tengan aptitud de monta y deseo sexual

lo suficientemente buenos como para servir el mayor número de hembras en el menor tiempo posible (Bury 2001).

El examen de fertilidad incluye el examen clínico, especialmente el de los órganos sexuales y examen de laboratorio donde se estudian, la morfología y bioquímica del semen. El semen es la suspensión celular líquida o semi-gelatinosa que contiene los gametos masculinos (espermatozoides) y las secreciones de los órganos accesorios del aparato reproductor masculino (Hafez 1996).

Los componentes de mayor importancia en el semen eyaculado son los espermatozoides, ya que sin ellos tan solo sería plasma seminal, con lo cual carece de la característica vital de la fecundación. El número de espermatozoides existentes en un volumen de semen se refleja directamente en su aspecto: color, densidad y viscosidad, presión osmótica, pH, conductividad eléctrica y capacidad tampón (Salisbury y Vandemark 1994).

Se utilizan varios parámetros para medir la calidad de semen: volumen, densidad, motilidad, proporción de vivos, proporción de anormales y una serie de medidas bioquímicas. Existe una gran variedad de parámetros tanto en eyaculado como congelamiento, con lo que su importancia en determinar la fertilidad es una cuestión bien debatida e importante (Watson 1979).

Para un buen manejo de semen es necesario realizar buenas prácticas en los métodos de: recolección, dilución, envasado y acondicionamiento de semen. La dilución y uso de diluyentes del semen es vital para disminuir la mortalidad de los espermatozoides por lo que se debe tener en cuenta los siguientes requisitos (Huertas y Huertas 1991):

1. No contener sustancias tóxicas para el espermatozoide.
2. La presión osmótica debe ser isotónica con el semen puro (300-380 mOsm/kg).
3. pH de 6.8 a 7.2 de preferencia 7 para conservar la vitalidad espermática.
4. Capacidad buffer para protección de variaciones de pH.
5. Electrolitos carentes de toxicidad.
6. Contener sustancias orgánicas como la yema de huevo o leche.
7. Protección contra el choque térmico.
8. Contener nutrientes adecuados que favorezcan a la anabiosis.
9. Antibióticos para controlar el crecimiento microbiano.

La sustancia más empleada para la protección contra el choque frío y crioprotección es la yema de huevo, normalmente se emplea al 10% del volumen; también se puede utilizar leche o una mezcla de leche y yema de huevo. Las células espermáticas sin protección se rompen y mueren, ya que durante la práctica de congelación se forman cristales de hielo. El descubrimiento de la glicerina como sustancia protectora durante la congelación, ha

supuesto un gran avance en la consecución práctica de la inseminación artificial (Peters y Ball 1991).

Investigaciones realizadas por Graham *et al.* (1978) descubrieron el efecto protector del glicerol sobre el espermatozoide durante la congelación y descongelación; actualmente el protocolo de manejo en la congelación del semen es:

- Agregar glicerol al diluyente en una proporción de 2 al 9% dependiendo de la especie.
- La velocidad de enfriamiento de 32 a 5°C para mantener alta fertilidad con un descenso de temperatura a una tasa de 0.5°C /min.

El semen se evalúa antes de la criopreservación y después de congelar. Las principales anomalías que pueden producirse son:

1. Algunos organelos espermáticos, como el acrosoma, pueden presentar cambios estructurales.
2. Rotura del acrosoma, observada por microscopía óptica de frotis de semen teñido con el colorante de Giemsa.
3. Cambios degenerativos en el acrosoma.
4. Rupturas en la membrana plasmática que cubre el acrosoma: la membrana se hincha y la posterior ruptura de la membrana externa se asocia a la pérdida de sustancias acrosómicas.
5. Las mitocondrias pierden su estructura interna y se tiñen más débilmente que en testigos no congelados.
6. El escape de enzimas espermáticas puede usarse para evaluar el daño de los espermatozoides (Hafez 1996).

Considerando la importancia del procesamiento de semen en el desarrollo de la genética y el valor del mismo para realizar prácticas de congelamiento y procesamiento de semen se decidió determinar la calidad biológica del semen bovino poscongelado, con y sin curva de enfriamiento; con empaque a temperatura ambiente y en cámara fría, durante el proceso de criopreservación utilizando el diluyente Continental Two Step®. De esta manera se estableció los porcentajes de muestras aptas para IA de cada tratamiento.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 LOCALIZACIÓN

La investigación se desarrolló entre los meses de mayo a septiembre 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°C, una precipitación anual de 715 mm y una altitud de 595 msnm. Además se utilizó el laboratorio de reproducción animal de El Zamorano, ubicado a 32 km de Tegucigalpa.

2.1. MATERIAL SEMINAL

Se utilizaron 20 toros de las razas: Angus, Brahaman, Charolais, Holstein, Pardo Suizo, Romagnola y sus cruces, provenientes del plantel de reproductores del Fondo Ganadero de Honduras. Los toros tenían edades comprendidas entre 15 y 42 meses, de los cuales en forma aleatoria se obtuvieron un total de 20 eyaculados; los toros fueron sometidos a un examen clínico veterinario a fin de verificar su buen estado de salud, además fueron sometidos a las pruebas serológicas de Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR), Diarrea Viral Bovina (DVB), Leucosis, Brucelosis y Leptospira y desparasitados 30 días antes de iniciar la investigación. El manejo y la alimentación fueron igual para todos los sementales, los cuales se alojaron en toriles individuales.

2.2. 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 $\geq 70\%$.

2.3. TRATAMIENTOS

Los eyaculados que cumplieron los criterios de inclusión se dividieron en cuatro fracciones y cada una fue asignada a un tratamiento:

Tratamiento 1 (CCE-E20) 25% de la fracción del eyaculado fue procesado y congelado utilizando la curva de enfriamiento de 0.5°C/minuto hasta llegar a 5°C entre la fracción A y B con el diluyente Continental Two Step[®] y empacado a temperatura ambiente (20°C).

Tratamiento 2 (CCE-E5) 25% de la fracción del eyaculado fue procesado y congelado utilizando la curva de enfriamiento de 0.5°C/minuto hasta llegar a 5°C entre la fracción A y B con el diluyente Continental Two Step[®] y empacado a 5°C.

Tratamiento 3 (SCE-E20) 25% de la fracción del eyaculado fue procesado y congelado directamente pasando de 35°C a 5°C entre la fracción A y B con el diluyente Continental Two Step[®] y empacado a temperatura ambiente (20°C).

Tratamiento 4 (SCE-E5) 25% de la fracción del eyaculado fue procesado y congelado directamente pasando de 35°C a 5°C entre la fracción A y B con el diluyente Continental Two Step[®] y empacado a 5°C.

2.4. METODOLOGÍA

Para la extracción del semen se utilizó el método de electroeyaculado mediante el equipo Ideal Instrumens Electrojack 5[®] el cual aplica 32 voltios/ciclo en el reóstato a nivel de las glándulas accesorias.

Antes de iniciar la recolección del semen, los sementales fueron sometidos a un lavado prepucial con Solución Salina Fisiológica (SSF 0.9% NaCl), se recortaron los pelos del prepucio y se realizó un masaje transrectal de las glándulas accesorias.

Inmediatamente se recolectó el semen en una bolsa plástica estéril colocada en la extensión colectora del equipo, una vez obtenido el semen se llevó al laboratorio en una incubadora a 35–37°C; donde se colocó en un tubo de vidrio de centrifuga graduado y atemperado para su evaluación y procesamiento.

Todo el material que se utilizó en el proceso de evaluación y que entró en contacto con el semen se mantuvo a una temperatura de 35–37°C y debidamente estéril. La primera fase de evaluación consistió en los parámetros macroscópicos: volumen, color, olor y pH, utilizando como criterios los propuestos por Holý (1987):

- a. Volumen: en toros el volumen del eyaculado varía entre 2-10 o más mililitros siendo el promedio de 5 a 6 mL, dependiendo de la edad, raza, explotación 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.
- c. Olor: es determinado por el contenido de un lípido, la espermina; se aceptó el semen que no presentó 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.

Posteriormente se extrajo una muestra de 100 μ L de semen en un tubo eppendorf para la evaluación microscópica propuesta por Wenkoff y Zavaleta (1997), la cual consiste en:

Motilidad en Masa (MM). Permite determinar el porcentaje de células espermáticas con capacidad de movimiento. Se depositó una gota de semen fresco sin diluir en un porta-objetos atemperado a 35°C, el cual se observó a 10X y 20X en un microscopio de contraste de fase con platina térmica. Para su evaluación se utilizó la clasificación propuesta por Vera (2001) (Cuadro 1).

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

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

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

Motilidad Individual (MI). Este parámetro revela el porcentaje de células espermáticas con movimiento rectilíneo progresivo los cuales en última instancia son los que poseen la capacidad de fecundar; se tomó como anormal cualquier otro movimiento diferente al rectilíneo progresivo (pendular, circular, retroactivo). Su evaluación se realizó colocando una gota de semen fresco diluido en SSF 0.9% en proporción de 10:100 en un porta-objetos atemperado a 35°C, posteriormente se cubrió con una laminilla atemperada y se observó a 20X, luego se pasó a 40X en el microscopio de contraste de fase. Para su evaluación se tomó la propuesta por Zemjanis (1982) (Cuadro 2).

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

Células móviles %	Valor numérico	Valor descriptivo
81-100	5	Muy bueno
61-80	4	Bueno
41-60	3	Regular
21-40	2	Pobre
0-20	1	Muy pobre

Fuente: Zemjanis (1982); adaptado por los autores.

Concentración. Este valor indica la cantidad de espermatozoides presentes en una unidad de volumen (mL), siendo este parámetro de vital importancia para el cálculo de la dilución a utilizar y para la clasificación del mismo.

Se utilizó un espermiodensímetro Karras, se basa en la turbidez de una suspensión de diferentes concentraciones de espermatozoides, vistas en la escala del densímetro. Se colocaron 9 mL de agua dentro del densímetro con una pipeta. Después se agregó 1 mL del semen puro. Se tapó el densímetro con el pulgar e invirtió suavemente dos a tres veces, a fin de suspender las células espermáticas. Se observó la escala y se comparó con los datos de la tabla suministrada por el equipo, la cual indica la concentración (Anexo 1) (Minitub 2006).

Morfología. Esta característica indica la normalidad e integridad de la célula espermática de la cual dependerá su capacidad fecundante. En el proceso normal de la espermatogénesis se produce el llamado desecho fisiológico, el cual consiste en la presencia de células espermáticas anormales, presentando valores normales entre 5 y 15% del total de células, sin embargo, si el valor encontrado está entre 15 y 30% se considera anormal y la fertilidad del toro se encontrará comprometida seriamente (Holý 1987).

Para su determinación se utilizó la tinción FARELLY STAIN[®], compuesta de tres pasos: un fijador y dos colorantes (A y B). Para uso de este se realizó un frotis de semen diluido 10:100 y fijado al aire, luego se introdujo en una solución FIX (solución fijadora) durante 10 segundos. Una vez fijado el semen se introdujo durante 20 segundos en el colorante A seguido de un lavado con agua limpia para eliminar el exceso del colorante, posteriormente el frotis se introdujo en el colorante B durante cinco segundos, se lavó nuevamente con agua limpia y se dejó secar en una platina térmica o a temperatura ambiente. Para el cálculo se contó como mínimo 200 espermatozoides por placa.

2.5. METODOLOGÍA DILUYENTE

El diluyente Continental[®] Two-Step consta de una solución A y B las cuales una vez restituidas y mezcladas dan como resultado el siguiente medio:

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	c.s.p.

La metodología que se utilizó para el enfriamiento y empaque de los tratamientos sometiendo a curva de enfriamiento de 0.5°C/minuto y empaçado a temperatura ambiente (20°C) (CCE-E20) y a 5°C (CCE-E5) 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 cinco minutos, posteriormente se agregó el resto de la fracción A determinado por la concentración deseada (30×10^6 espermatozoides/pajilla) y enfriarlo a 5°C a una curva de enfriamiento de 0.5°C/minuto utilizando el equipo Biocool[®]. El semen a 5°C se equilibró durante dos horas, tiempo en el que se agregó una cantidad igual de diluyente B el cual se encontraba a 5°C, después se equilibró durante cuatro horas; al cabo de este tiempo se envasó en pajillas de 0.5 mL utilizando una concentración de 30×10^6 espermatozoides/pajilla. El 50% de las pajillas fueron empacadas a temperatura ambiente del laboratorio (20°C) y el otro 50% se empacaron en una cámara fría a 5°C. A continuación se congelaron en vapores de N₂ (-110 a -130°C) durante 10 minutos a 4 cm de altura sobre el nivel del N₂, utilizando lotes de 50 pajillas. Al cabo 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 N₂ líquido.

La metodología de enfriamiento para los tratamientos sin curva de enfriamiento pasando directamente de 35°C a 5°C y empaçado a temperatura ambiente (20°C) (SCE-E20) y a 5°C (SCE-E5), inició con una predilución 1:1 con la fracción A del diluyente a una temperatura de 35°C durante cinco minutos, posteriormente se agregó el resto de la fracción A determinado por la concentración a la cual queremos llegar (30×10^6 espermatozoides/pajilla) y enfriarlo a 5°C pasándola a una refrigerador previamente equilibrada a 5°C y se dejó allí por dos horas, al cabo de las cuales se agregó la fracción B del diluyente el cual se encontraba a 5°C y nuevamente se dejó equilibrando por cuatro horas más, después se envasó en pajillas de 0.5 mL utilizando una concentración de 30×10^6 espermatozoides/pajilla, el 50% se empacaron a temperatura ambiente del laboratorio

(20°C) y el otro 50% se empacaron en una cámara fría a 5°C; a continuación se congelaron en vapores de N₂ (-110 a -130°C) durante 10 minutos a 4 cm de altura sobre el nivel del N₂, utilizando lotes de 50 pajillas. Al cabo 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 N₂ líquido.

Veinticuatro horas después del congelamiento se descongelaron cinco pajuelas de cada muestra, a 37°C por 40 segundos en baño maría y se evaluaron nuevamente, calculando MI, para la cual el semen fue diluido en SSF (0.9% NaCl) en proporción 1:4 según lo recomendado por Rosas (1997) y depositando una gota en el portaobjetos atemperado y cubriéndolo con una laminilla, siendo observados inmediatamente a 20X y 40X en el microscopio de contraste de fase.

La calidad biológica se obtiene de multiplicar la MI por la concentración, y el resultado se interpretó de acuerdo al Cuadro 3:

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

% MI	# espermatozoides viables	Resultado
0.20	6,000,000	No adecuado
0.25	7,500,000	No adecuado
0.30	9,000,000	Aprobado
0.35	10,500,000	Aprobado
0.40	12,000,000	Aprobado
0.45	13,500,000	Aprobado
0.50	15,000,000	Aprobado

Fuente: Rosas (1997); adaptado por los autores

Se consideraron muestras aptas para la I.A. aquellas que presentaron 35% o más de MI, calidad biológica igual o superior a 9×10^6 y un Índice de Recuperación (IR) superior a 30 (Cuadro 4), 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.

Cuadro 4. Interpretación del Índice de Recuperación (IR) de semen poscongelado

< 30	Malo
31-40	Bueno
41-50	Muy bueno
> 51	Excelente

Fuente: Hincapié *et al.* (2003); adaptado por los autores

2.6 VARIABLES ANALIZADAS

Se analizaron las siguientes variables para los cuatro tratamientos:

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

2.7. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó un diseño de Bloques Completamente al Azar (BCA) con cuatro tratamientos y 20 repeticiones por tratamiento. Los valores porcentuales de MM, MI, porcentaje de recuperación y porcentaje de anormalidades, se corrigieron a través de la función arc-seno; se utilizó el Modelo Lineal General (GLM), realizando un ANÁLISIS UNIVARIADO y separación de medias, para los valores donde se encontraron diferencias se aplicó el procedimiento de Diferencia Mínima Significativa (DMS). El valor exigido fue 0.05 y el programa estadístico a utilizado fue Statistic Analysis System (2006). Para las variables porcentaje de muestras aptas y no aptas para la I.A. y la interpretación de la calidad biológica se utilizaron procedimientos de estadística descriptiva.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 MOTILIDAD EN MASA (MM) PRECONGELADO Y POSCONGELADO

Las diferencias encontradas de la MM poscongelado entre los tratamientos no fueron significativas ($P = 0.1252$). La MM precongelado presentó valores porcentuales clasificados como buenos (Cuadro 1). Sin embargo, al poscongelado este valor disminuyó biológicamente dependiendo del tratamiento desde un 14% hasta 20% (Cuadro 5), variaciones que se atribuyen, posiblemente, al efecto detrimento del choque de frío (cambio de temperatura drástico) y la susceptibilidad del espermatozoide al mismo.

Cuadro 5. Porcentaje de disminución en la Motilidad en Masa (MM) para los tratamientos de acuerdo a la velocidad de enfriamiento y temperatura de empaque.

Tratamientos	Motilidad en Masa (%)		Disminución (%)
	Precongelado	Poscongelado	
CCE-E20	89.75 ± 7.34	76.47 ± 7.86	14.80
CCE-E5	89.75 ± 7.34	76.84 ± 7.49	14.38
SCE-E20	89.75 ± 7.34	71.00 ± 10.21	20.89
SCE-E5	89.75 ± 7.34	71.58 ± 10.15	20.25
C.V.	15.0928		

CCE-E20: Curva de enfriamiento de 0.5 °C/minuto hasta llegar a 5 °C, empacado a 20 °C.

CCE-E5: Curva de enfriamiento de 0.5 °C/minuto hasta llegar a 5 °C, empacado a 5 °C.

SCE-E20: Sin curva de enfriamiento, reducción directa de temperatura 35 °C a 5 °C, empacado a 20 °C.

SCE-E5: Sin curva de enfriamiento, reducción directa de temperatura 35 °C a 5 °C, empacado a 5 °C.

3.2 MOTILIDAD INDIVIDUAL (MI) PRECONGELADO Y POSCONGELADO

Las diferencias no fueron significativas para la MI poscongelado entre tratamientos ($P = 0.3237$). La MI precongelado mostró valores porcentuales clasificados como buenos según la escala propuesta por Zemjanis (1982). Al poscongelado se obtuvo una disminución porcentual promedio de 60% en todos los tratamientos (Cuadro 6). Estos resultados están por encima de lo reportado por Soto (2001) quien menciona que la motilidad individual poscongelación tiene una disminución promedio de 30 a 40% en relación a la motilidad individual en el semen fresco; sin embargo, este autor indica que

hay toros cuyo semen se ve afectado en su motilidad individual poscongelado, debido a que la susceptibilidad de la célula espermática al enfriamiento está relacionada con la composición lipídica de la membrana del espermatozoide.

Cuadro 6. Porcentaje de disminución en la Motilidad Individual (MI) para los tratamientos de acuerdo a la velocidad de enfriamiento y temperatura de empaque.

Tratamientos	Motilidad individual (%)		Disminución (%)
	Precongelado	Poscongelado	
CCE-E20	76.25 ± 6.04	32.94 ± 19.13	56.80
CCE-E5	76.25 ± 6.04	32.37 ± 11.10	57.55
SCE-E20	76.25 ± 6.04	28.50 ± 14.75	62.62
SCE-E5	76.25 ± 6.04	28.32 ± 17.84	62.86
C.V.	27.5679		

CCE-E20: Curva de enfriamiento de 0.5 °C/minuto hasta llegar a 5 °C, empacado a 20 °C.

CCE-E5: Curva de enfriamiento de 0.5 °C/minuto hasta llegar a 5 °C, empacado a 5 °C.

SCE-E20: Sin curva de enfriamiento, reducción directa de temperatura 35 °C a 5 °C, empacado a 20 °C.

SCE-E5: Sin curva de enfriamiento, reducción directa de temperatura 35 °C a 5 °C, empacado a 5 °C.

3.3 ÍNDICE DE RECUPERACIÓN (IR)

De igual manera, las diferencias no fueron significativas en el IR para los tratamientos ($P = 0.2653$). Los resultados obtenidos de los índices de recuperación indican que los tratamientos CCE-E20 y CCE-E5 son clasificados como muy buenos mientras que los dos restantes se clasifican como buenos según lo recomendado por Hincapié *et al.* (2003) (Gráfico 1). Las disminuciones porcentuales con los tratamientos SCE-E20 y SCE-E5, posiblemente, se deben a los cambios bruscos de temperatura (35°C a 5°C), ya que el congelamiento demasiado rápido causa choque térmico y formación de hielo intracelular (Peters y Ball 1991).

Así mismo, Hafez (1996) concluye que si el proceso se realiza lentamente, las concentraciones de sal aumentan a medida que el agua se congela. Este incremento en la presión osmótica durante un periodo prolongado de congelamiento puede dañar las proteínas y lipoproteínas de las células espermáticas y el acrosoma. La curva de enfriamiento que se utilice para el proceso es muy importante pues de esto depende que el semen no sufra daños físicos que se verán reflejados en la calidad biológica e índice de recuperación.

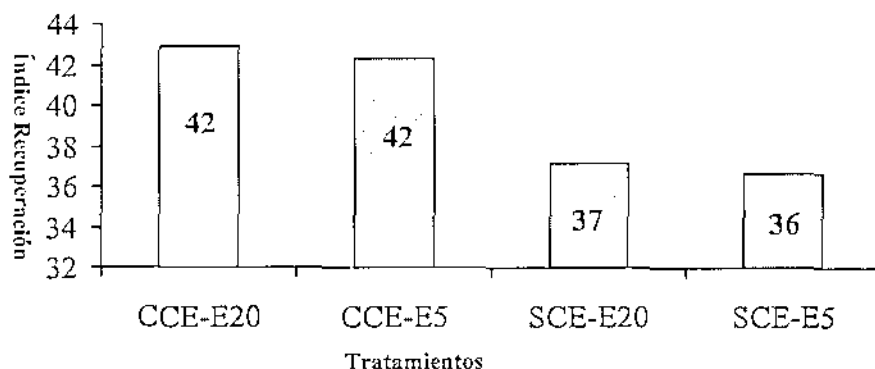


Gráfico 1. Índice de recuperación (IR) para los tratamientos de acuerdo a la velocidad de enfriamiento y temperatura de empaque.

CCE-E20: Curva de enfriamiento de 0.5 °C/minuto hasta llegar a 5 °C, empacado a 20 °C.

CCE-E5: Curva de enfriamiento de 0.5 °C/minuto hasta llegar a 5 °C, empacado a 5 °C.

SCE-E20: Sin curva de enfriamiento, reducción directa de temperatura 35 °C a 5 °C, empacado a 20 °C.

SCE-E5: Sin curva de enfriamiento, reducción directa de temperatura 35 °C a 5 °C, empacado a 5 °C.

C.V. = 28.50

3.4 CALIDAD BIOLÓGICA

La calidad biológica indica el número de espermias viables (con capacidad fecundante) en una dosis de semen al descongelado, para aprobar este parámetro la muestra de semen tiene que ser mayor o igual a 9×10^6 después de realizar los respectivos cálculos en relación motilidad individual poscongelado y la concentración (Cuadro 3). No se encontraron diferencias significativas en la calidad biológica entre tratamientos ($P = 0.2384$).

La calidad biológica en los tratamientos CCE-E20 y CCE-E5 son aprobados para la inseminación artificial, mientras que los tratamientos SCE-E20 y SCE-E5 no cumplen con la calidad biológica al no llegar al mínimo aceptable del número de espermias viables (Rosas 1997) (Cuadro 7).

Cuando se congela el semen, éste sufre un deterioro en la membrana plasmática y en su acrosoma a causa del proceso de congelación, reduciendo directamente la motilidad individual, afectando directamente la calidad biológica del semen (Soto 2001). Al realizar un cambio brusco de temperatura las células espermáticas sufren un choque del frío, éstas

al estar sin protección se rompen y mueren por que durante la congelación se forman en su interior cristales de hielo (Peters y Ball 1991).

Cuadro 7. Calidad biológica para los tratamientos de acuerdo a la velocidad de enfriamiento y temperatura de empaque.

Tratamientos	# Espermas Viabiles	Resultado
CCE-E20	9,882,353 ± 5,737,838	Aprobado [§]
CCE-E5	9,710,526 ± 3,330,481	Aprobado [§]
SCE-E20	8,550,000 ± 4,424,632	No adecuado
SCE-E5	8,494,737 ± 5,352,619	No adecuado
C.V.	24.9181	

[§] Se consideran muestras aptas para la I.A. aquellas que presenten número de espermas viables mayor o igual a 9×10^6 .

CCE-E20: Curva de enfriamiento de 0.5 °C/minuto hasta llegar a 5 °C, empacado a 20 °C.

CCE-E5: Curva de enfriamiento de 0.5 °C/minuto hasta llegar a 5 °C, empacado a 5 °C.

SCE-E20: Sin curva de enfriamiento, reducción directa de temperatura 35 °C a 5 °C, empacado a 20 °C.

SCE-E5: Sin curva de enfriamiento, reducción directa de temperatura 35 °C a 5 °C, empacado a 5 °C.

3.5 PORCENTAJE DE ANORMALIDADES PRECONGELADO Y POSCONGELADO

Los porcentajes de anomalías precongelado se encuentran dentro de los valores máximos establecidos por Holý (1987) considerando hasta un 15% como desecho fisiológico. De igual manera en el poscongelado las anomalías se mantuvieron por debajo del 25% (Cuadro 8), sin embargo, las diferencias encontradas fueron significativas entre el tratamiento CCE-E20 y CCE-E5 ($P = 0.0395$) y entre el tratamiento CCE-E5 y SCE-E20 ($P = 0.0040$); de lo anterior se deduce que pese a las diferencias entre tratamientos, todos los valores están por debajo del máximo propuesto por Vera (2001) de 25% de anomalías, lo cual se atribuye a que el crioprotector (diluyente) utilizado protege eficazmente las células espermáticas contra los daños físicos que pueden sufrir éstas durante el proceso de criopreservación, tal como lo reporta Hafez (1996).

Cuadro 8. Porcentaje de anomalías precongelado y poscongelado, y su incremento para los tratamientos de acuerdo a la velocidad de enfriamiento y temperatura de empaque.

Tratamientos	Anormalidades (%)		Incremento (%)
	Precongelado	Poscongelado	
CCE-E20	11.8 ± 4.98	21.60 ± 2.98 ^{Y*}	83.05
CCE-E5	11.8 ± 4.98	22.90 ± 4.01 ^{Y*}	94.07
SCE-E20	11.8 ± 4.98	21.05 ± 2.77 ^{Y*}	78.39
SCE-E5	11.8 ± 4.98	22.05 ± 3.50 ^Y	86.86
C.V.			19.4395

* Medias difieren entre sí (P < 0.05).

^Y Semen apto para la inseminación artificial menor al 30% en sus anomalías poscongelado.

CCE-E20: Curva de enfriamiento de 0.5 °C/minuto hasta llegar a 5 °C, empacado a 20 °C.

CCE-E5: Curva de enfriamiento de 0.5 °C/minuto hasta llegar a 5 °C, empacado a 5 °C.

SCE-E20: Sin curva de enfriamiento, reducción directa de temperatura 35 °C a 5 °C, empacado a 20 °C.

SCE-E5: Sin curva de enfriamiento, reducción directa de temperatura 35 °C a 5 °C, empacado a 5 °C.

3.6 PORCENTAJE DE MUESTRAS APTAS Y NO APTAS PARA LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

El análisis de muestras aptas y no aptas para la inseminación artificial esta dada por la motilidad individual, índice de recuperación y calidad biológica. Se observa que el mayor porcentaje de muestras aptas para la inseminación artificial se logra en el tratamiento CCE-E5 el cual presentó menor porcentaje de disminución en la motilidad individual razón por la cual el índice de recuperación y la calidad biológica son más altos. En los tratamientos CCE-E5 y CCE-E20 el número de espermias viables se encuentra por arriba del mínimo establecido de 9×10^6 , lo cual indica que este semen es apto para la inseminación artificial (Cuadro 9).

Lo anterior indica que el procesamiento de semen con curva de enfriamiento reduciendo la temperatura a 0.5°C/minuto hasta llegar a 5°C y empacado a esta misma temperatura es lo más óptimo ya que se disminuye el efecto del choque térmico permitiendo que el agente crioprotector realice su labor.

Cuadro 9. Porcentaje de muestras aptas y no aptas del semen para la inseminación aplicando distintos tratamientos de acuerdo a la velocidad de enfriamiento y temperatura de empaque.

Tratamientos	Índice de Recuperación (%)	Cáalidad Biológica (# Espermas Viabes)	Muestras Aptas (%)
CCE-E20	42.96	9,882,353 [§]	55
CCE-E5	42.43	9,710,526 [§]	75
SCE-E20	37.17	8,550,000	40
SCE-E5	36.40	8,494,737	35

[§] Se consideran muestras aptas para la I.A. aquellas que presenten número de espermas viables mayor o igual a 9×10^6 .

CCE-E20: Curva de enfriamiento de 0.5 °C/minuto hasta llegar a 5 °C, empacado a 20 °C.

CCE-E5: Curva de enfriamiento de 0.5 °C/minuto hasta llegar a 5 °C, empacado a 5 °C.

SCE-E20: Sin curva de enfriamiento, reducción directa de temperatura 35 °C a 5 °C, empacado a 20 °C.

SCE-5: Sin curva de enfriamiento, reducción directa de temperatura 35 °C a 5 °C, empacado a 5 °C.

5. RECOMENDACIONES

Trabajar en ambiente controlado con cámara fría a 5°C para obtener mayor porcentaje de muestras aptas para la inseminación artificial.

Implementar el uso del Biocool[®] en el Laboratorio de Reproducción Animal del Fondo Ganadero de Honduras.

Realizar otros estudios con pruebas de vitalidad para evaluar la diferencia entre espermatozoides vivos y muertos.

Realizar mayor número de repeticiones por toro para evitar la variación amplia en los datos.

Realizar investigaciones comparando otros diluyentes con el Continental Two Step[®].

6. LITERATURA CITADA

Acuña, C.; de Apellaniz, A.; Canosa, M. 2003. Preñez en vacas y vaquillonas mediante servicio natural con toros para carne de baja y alta capacidad de servicio (en línea). Accesado 5 de junio de 2006. disponible en http://produccionbovina.com/informacion_tecnica/cria_toros/23-penez_con_toros_alta_capacidad.htm.

Bury, N. 2001. Evaluación de la aptitud reproductiva del toro. Ed. GIRARZ 2060. Madrid, España. 263-281 p.

Derivaux, J. 1961. Fisiopatología de la reproducción e inseminación de los animales domésticos. Ed. ACRIBIA. Zaragoza, España. 416 p.

Graham, E.F., M.K.L. Schmehl, B.K. Eversen 1978. Semen preservation in non domestic mammals. Symp. Zool. Soc. Lond. 43:153-173 p.

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

Hincapié, J.J; Pipaon, E.C; Blanco, G.S. 2003. Trastornos reproductivos en la hembra bovina. Ed. Litocom. Tegucigalpa, Honduras. 167 p.

Holý, L. 1987. Biología de la reproducción bovina: Introducción al proceso del examen de fertilidad de la hembra y el macho. Ed. Científico-Técnica. La Habana, Cuba. 283-333 p.

Huertas, J.I y Huertas, J.V. 1991. Manual práctico y moderno de inseminación. Ed. ALEN IMPREORES. Bogotá, Colombia. 160 p.

Mínitub. 2006. Cómo procesar semen porcino en el plantel (en línea). Accesado 22 sep. 2006. disponible en http://www.engormix.com/como_procesar_semen_porcino_s_articulos_811_POR.htm.

Peters, A y Ball, P. 1991. Reproducción de ganado vacuno. Barcelona. España. Ed. ACRIBIA, 216 p.

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

Salisbury, G. y Vandermark, N. 1994. Physiology of reproduction artificial insemination of cattle. San Francisco.U.S.A. Ed. Freeman. 639 p.

SAS. 2006. SAS Users Guide Statistical Analysis Institute Inc, Cary NC.

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

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 p.

Vélez, M; J.J. Hincapié; I. Matamoros; R. Santillán. 2002. Producción de ganado lechero en el trópico. 4ª ed. Zamorano Academic Press, Zamorano, Honduras. 326 p.

Watson PF. 1979. The preservation of semen in mammals. In: Oxford Reviews of Reproductive Biology Vol. 1. Finn CA. Ed. Oxford: Oxford University Press, 283-351 p.

Wenkoff, M.S. y Zavaleta, C. 1997. Actualización en reproducción animal: 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.

Zemjanis, R. 1982. Reproducción animal: diagnóstico y técnicas terapéuticas. México D.F., México. Ed. LIMUSA. 253 p.

7. ANEXOS

Anexo 1. Tabla para leer la densidad del eyaculado de toro 10^6 /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	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	1,050	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	1,250	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	1,850	1,387	1,110	925	793	694	617	555
20	6,35	3,175	2,116	1,587	1,270	1,058	907	794	705	635