

**Comparación de la calidad biológica del
semen bovino poscongelado utilizando como
crioprotector leche al 2% de grasa,
Andromed[®] y Continental[®] one step**

**Ana Lucia Nuñez Villalobos
Andrea Azucena Rubio Molina**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**
Noviembre, 2015

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**Comparación de la calidad biológica del
semen bovino poscongelado utilizando como
crioprotector leche al 2% de grasa,
Andromed[®] y Continental[®] one step**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingenieras Agrónomas en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

**Ana Lucia Nuñez Villalobos
Andrea Azucena Rubio Molina**

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2015

Comparación de la calidad biológica del semen bovino poscongelado utilizando como crioprotector leche al 2% de grasa, Andromed[®] y Continental[®] one step

Presentado por:

Ana Lucia Núñez Villalobos
Andrea Azucena Rubio Molina

Aprobado:

John Jairo Hincapié, Ph.D.
Asesor principal

John Jairo Hincapié, Ph.D.
Director
Departamento de Ciencia
y Producción Agropecuaria

Isidro Matamoros, Ph.D.
Asesor

Raúl Zelaya, Ph.D.
Decano Académico

Comparación de la calidad biológica del semen bovino poscongelado utilizando como crioprotector leche al 2% de grasa, Andromed[®] y Continental[®] one step

**Ana Lucia Núñez Villalobos
Andrea Azucena Rubio Molina**

Resumen: El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la leche al 2% de grasa, Andromed[®] y Continental[®] one step como crioprotectores sobre la calidad biológica del semen bovino, específicamente sobre la motilidad individual espermática, el porcentaje de muestras con calidad biológica aceptable e índice de recuperación. Se evaluó el semen de 6 toros, recolectado en la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. En el laboratorio se evaluó el volumen del eyaculado, color, olor, pH, motilidad en masa, motilidad espermática individual, concentración y morfología. Una vez evaluado el semen, se separó el total del eyaculado en tres fracciones iguales para cada tratamiento. Para la congelación, se expusieron las pajuelas a nitrógeno líquido y luego se almacenaron en el termo. Seguidamente, se descongelaron para las pruebas poscongelado. Se usó el Modelo Lineal General realizando un ANDEVA y separación de medias utilizando la prueba de Duncan al 5%. El Continental[®] one step fue el que presentó los mejores resultados en la mayoría de las características evaluadas: mayor motilidad individual poscongelado (60%), mejor calidad biológica (18.00) y mayor índice de recuperación (66.8%). El Andromed[®] presentó el mayor porcentaje de anomalías en fresco y poscongelado, 9 y 16% respectivamente. La leche no presentó diferencias con el Continental[®] one step en cuanto a porcentaje de anomalías. Con base en los resultados del estudio, el diluyente Continental[®] one step obtuvo la mayor motilidad individual poscongelado y la menor diferencia de motilidad individual fresco vs poscongelado. El menor porcentaje de anomalía poscongelado y la menor diferencia de anomalías entre fresco vs poscongelado se obtuvo en los diluyentes a base de Leche al 2% y Continental[®] one step. La mejor calidad biológica y el mejor índice de recuperación se obtuvo en el diluyente Continental[®] one step.

Palabras clave: Anormalidades, calidad biológica, diluyentes, eyaculado, índice de recuperación, motilidad individual.

Abstract: The objective of this study was to evaluate the effect of 2% fat milk, Andromed[®] and Continental[®] one step as cryoprotectants over the biological quality of bovine semen, specifically over the individual motility, the percentage of samples with acceptable biological quality and the recuperation index. The semen of six bulls was evaluated, recollected at Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. At the laboratory the volume of the ejaculate, color, odor, pH, mass motility, individual spermatic motility, concentration and morphology were evaluated. Once evaluated, the total volume was separated in three equal fractions for every treatment. For the cryopreservation, the straws were exposed to liquid nitrogen vapors and finally stored in a thermos. Later, straws were thawed to be able to evaluated post freezing. The General Lineal Model was used along with an ANDEVA and mean separation using the Duncan test at 5% probability. The Continental one step diluent presented the best results in the majority of characteristics that were evaluated: most individual motility post freezing (60%), best biological quality (18.00) y best recuperation index (66.8%). Andromed[®] presented the highest abnormality percentage, both fresh and post freezing, 9 and 16% respectively. The milk did not present significant differences with Continental one step[®] as to abnormality percentage. Based on the results of this study, the diluent Continental one step[®] obtained the highest individual motility post freezing and the least difference in motility fresh vs post freezing. The least percentage of abnormalities post freezing and the least difference between fresh and post freezing was obtained with Milk at 2% fat and Continental one step[®]. The highest biological quality and the best recuperation index was obtained with the diluent Continental one step[®].

Key words: Abnormalities, biological quality, diluents, ejaculation, individual motility, recuperation index.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	v
Índice de Cuadros	vi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	10
4. CONCLUSIONES.....	14
5. RECOMENDACIONES.....	15
6. LITERATURA CITADA.....	16

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadros	Página
1. Clasificación de la motilidad masal en eyaculados bovinos	
2. Escala numérica y descriptiva para determinar la motilidad espermática individual del toro.....	5
3. Número de espermias viables por dosis de semen al descongelado. Cálculo de la calidad biológica	8
4. Porcentaje de Motilidad Individual en Fresco (MI Fresco), Motilidad Individual Poscongelado (MI Poscongelado) y Diferencia en la motilidad individual en fresco vs. Poscongelado.	11
5. Porcentaje de anormalidades en fresco y poscongelado del semen.	12
6. Evaluación del Índice de Recuperación (IR) y Calidad Biológica (CB) del semen poscongelado.....	13

1. INTRODUCCIÓN

La inseminación artificial en bovinos es una herramienta importante para la mejora de aspectos reproductivos en las explotaciones ganaderas. La inseminación artificial ha permitido la manipulación de una genética superior en fincas. El uso de ésta herramienta permite tener un mejor control de enfermedades venéreas e implementación de diferentes programas de cruzamientos, además, se evitan problemas en el manejo de los toros (Sara 2000). Es un campo de mucha investigación y se dirige hacia nuevos métodos de preservación del semen, además, busca alternativas para extender el tiempo de almacenado. La viabilidad del semen es crítica para cumplir con el protocolo de calidad (Gordon 2004).

En el aspecto económico, ésta técnica permite reducir costos por mantenimiento y alimentación de los toros, además, permite utilizar toros de alto valor genético sin incurrir en la compra del toro. Actualmente, la inseminación artificial se realiza en bovinos, específicamente en las explotaciones de ganado lechero y el manejo rutinario es de fácil acceso (Urdaneta y Olivares 1985). Se puede observar una reducción en los costos por el aumento de vientres y reducción en la cantidad de machos (Witt *et al.* 1977).

El proceso de criopreservación del semen bovino incluye varias etapas: la primera, es la recolección del semen. Es importante realizar un examen físico del animal para determinar su valor genético y salud. La recolección se puede hacer con una vagina artificial, masaje transrectal o electroeyaculador. En segundo lugar, se hace una evaluación del semen recolectado y se calcula el número de dosis obtenidas y su dilución. Posteriormente, se añade un diluyente o crioprotector. Existen tipos de crioprotectores: los que penetran la membrana como el dimetilsulfóxido (DMSO), 1,2-propanodiol (PROH), el etilén-glicol (EG), y el glicerol; los que no penetran la membrana: sacarosa, glucosa, dextrosa, polivinil-pirrolidona (PVP), dextran, polietilen-glicol (PEG) (Jiménez s.f). Finalmente, se empaca en pajillas y se congela usando nitrógeno líquido en un tanque o congeladores computados (Baracaldo *et al.* 2007). El congelamiento es vital para la funcionalidad espermática; existe una relación cercana entre el número de espermias viables y la fertilidad después de la inseminación artificial. Se cree que espermias muertas o anormales pueden liberar sustancias tóxicas que afecten la fertilidad (Gordon 2004).

Los crioprotectores pueden clasificarse como permeables o intracelulares e impermeables o extracelulares. Los crioprotectores permeables son los que contienen compuestos que penetran la membrana celular y la deshidratan para ayudar a proteger el citoplasma. Los impermeables o extracelulares pueden subdividirse en alto peso molecular, por ejemplo: glucosa, fructosa y ficol. Estos compuestos extraen el agua libre intracelular, ayudando a proteger la estructura de las membranas utilizando la diferencia de presión osmótica.

Existen ingredientes de origen animal contenidos en los diluyentes, como la yema de huevo y la leche. La yema de huevo preserva las membranas del acrosoma y mitocondrias del espermatozoide (Carpio 2015). La leche tiene constituyentes con mayor efecto protector que son las micelias de caseína las cuales secuestran proteínas que causan pérdidas de colesterol y fosfolípidos (Sandoval López 2010).

Los de bajo peso molecular protegen a la célula durante el congelado y actúan sobre la formación de cristales de hielo, permite que tengan el tamaño correcto. Trabajan mejor al ser combinados con los permeables. En general, los crioprotectores previenen la deshidratación de las membranas y evitan la degeneración proteica (Belascoain *et al.* 2010).

El valor del semen recolectado está determinado por parámetros de calidad, por ejemplo, un semen libre de residuos de orina ó heces. La sanidad del semen debe ser asegurada, posteriormente, sus características físicas son evaluadas, por ejemplo: volumen, densidad y motilidad. Las características morfológicas de los espermatozoides y la concentración del semen también son consideradas (Gonzalez Granda y Muñoz Molina 2002).

De Leeuw *et al.* (1993) demostraron que el glicerol como crioprotector tiene un efecto positivo al disminuir los daños mecánicos sufridos por los espermatozoides durante la preservación. El glicerol tiene una rápida penetración en la membrana, además, se ha descubierto que los azúcares y los polioles (carbohidratos) son una fuente importante de protección para el semen congelado y previene daño mecánico al aumentar la viscosidad. Es importante evitar la tendencia de los líquidos a formar cristales durante el proceso de congelamiento (Nicolajsen *et al.* 1994).

Con base en lo anterior se realizó esta investigación en Zamorano que tuvo como objetivo general determinar el efecto de la leche al 2% de grasa, Andromed[®] y Continental[®] one step utilizados como crioprotectores sobre la calidad biológica del semen bovino poscongelado. Como objetivos específicos determinar el efecto de la leche al 2% de grasa Andromed[®] y Continental[®] one step sobre la motilidad individual espermática poscongelado, determinar el porcentaje de muestra con calidad biológica aceptable por tratamiento poscongelado y determinar el índice de recuperación del semen.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo entre julio a septiembre de 2015 en las instalaciones de la Unidad de Ganado Lechero y en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Escuela Agrícola Panamericana ubicada a 32 km de Tegucigalpa, con una temperatura promedio de 24 °C, una altura sobre el nivel del mar y precipitación anual de 800 msnm y 1100 mm respectivamente.

Se utilizaron seis toros adultos de las razas: Holstein (dos), Jersey (uno), Brahman (tres) con edades comprendidas entre 24 y 36 meses; todos 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, Tuberculosis y Leptospira para garantizar un estado sanitario óptimo. Todos los animales fueron mantenidos bajo las mismas condiciones de manejo y alimentación.

Se tomaron como criterios de inclusión de los eyaculados los siguientes:

Volumen del eyaculado entre cinco y 12 mL

Concentración mayor o igual a 400×10^6 espermias por mL (400×10^9 cc)

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

Grupo Leche al 2% de grasa (LE): 14 eyaculados diluidos, procesados y congelados (ver protocolo adjunto en metodología).

Grupo Andromed[®] (A): 14 eyaculados serán diluidos, procesados y congelados de acuerdo a la metodología de la casa productora.

Grupo Continental[®] one step (C): 18 eyaculados serán diluidos, procesados y congelados de acuerdo a la metodología de la casa productora.

La extracción del semen se realizó con el proceso de electroeyaculación utilizando un equipo Ideal Instruments Electrojack 5[®] el cual genera 32 voltios por ciclo en el reóstato.

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

Una vez en el laboratorio el semen fue depositado en un tubo de centrifuga graduado en donde se midió el volumen y se evaluó el color, olor y pH de la muestra. Los criterios que se utilizaron para la evaluación fueron:

Volumen del eyaculado: el semen fue depositado en un tubo de policarbono graduado en donde se mide el volumen en mL.

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 acepta el semen que no presente olores extraños como: urinoso, excrementoso o putrefacto.

El pH: normalmente en semen fresco de toro el pH oscila entre 6.2 y 6.8, sin embargo, los diluyentes utilizados comercialmente incrementan estos valores entre 6.8 y 7.2. Los eyaculados de mayor acidez son más fértiles (Holý 1987). Para este proceso se usó el papel tornasol, el cual está graduado en la escala de cuatro a 12.

Inmediatamente fue retirada una alícuota de 100 µL y depositada en un tubo Eppendorf para realizar la evaluación microscópica; se utilizaron los siguientes criterios:

Motilidad en masa: 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
1	Pobre	No hay ondas. Movimiento espermático vibrátil
2	Aceptable	Ondas ligeras con movimiento apenas perceptibles
3	Bueno	Ondas aparentes. Remolinos con movimiento moderado
4	Muy bueno	Ondas oscuras con movimientos rápidos

Fuente: (Bury 1998)

Motilidad espermática individual: Se observaron particularmente las células espermáticas a fin de calcular el porcentaje total de células móviles en el eyaculado (Zemjanis 1987). 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. Solo se utilizaron muestras con más de 70% 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 1987)

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 espectrofotómetro Spermacue de Minitüb®, en el cual se depositó una gota fina de semen puro sin diluir directamente en el pozo de la cubeta del equipo. La lectura es dada en espermatozoides/10⁶ mL.

Morfología: Este parámetro 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 cinco al 10%, los cuales son considerados como desperdicio fisiológico. Valores anormales mayores a 30% comprometen seriamente la fertilidad del toro (Holý 1987).

Para su evaluación se utilizó la tinción Spermac, Minitüb[®], la cual consiste en cuatro pasos: un fijador y tres 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 FIX (solución fijadora) durante cinco minutos. Luego las preparaciones se mantuvieron verticales sobre un papel filtro, para dejar escurrir el exceso de la solución fijadora. El secado completo teniendo la preparación sobre una platina temperada durante 15 minutos, o dejando la preparación hasta el día siguiente a temperatura ambiente. Posteriormente las placas pasaron por cada uno de los colorantes A, B y C en donde fueron sumergidos por un minuto en cada uno de ellos; entre un colorante y otro se lavó la placa con agua destilada y se secó en la platina térmica antes de sumergirla en el siguiente colorante. Para el cálculo se contaron un mínimo de 200 espermatozoides. La observación de la preparación se realizó bajo aceite de inmersión. Los acrosomas aparecen teñidos de verde, la zona ecuatorial de verde claro y el resto de la cabeza de color rojo. La pieza intermedia y la cola se tiñen de verde.

Una vez evaluado el semen, cada eyaculado fue dividido en tres fracciones iguales: la primera fue el Leche al 2% de grasa (LE), la segunda fracción fue el grupo Andromed[®] (A) y la tercera fue el grupo Continental[®] one step (C) las cuales fueron diluidas, procesadas y congeladas de acuerdo a cada grupo experimental.

Para la dilución del semen en el grupo Leche al 2% de grasa (LE) se utilizó el siguiente procedimiento:

92% Leche estandarizada y pasteurizada (Leche Zamorano al 2% de grasa)

8% de Glicerol al 99%

Unicil - S[®] (1 UI por cada 100 mL de diluyente que se preparen)

Procedimiento

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

Protocolo LE:

1. El diluyente preparado se llevó a 28-30 °C (promedio 29 °C) en baño maría, al igual que la temperatura del semen.

2. Se diluyó el semen (de acuerdo con los análisis pertinentes) se empacó en pajuelas de 0.5 cc y se puso a enfriar en la cámara climática a 4-5 °C durante cuatro horas.
3. Se expusieron las pajuelas a vapores de nitrógeno a cuatro cm sobre el nitrógeno líquido como mínimo ocho minutos (8-12 minutos).
4. Después de exponerlas al vapor de nitrógeno líquido se introdujeron directamente en el termo.
5. Se descongelaron a 35-38 °C durante 35-40 segundos para realizar las pruebas poscongelado. Se colocó una gota pequeña en el porta-objetos, para que al colocar el cubreobjetos la película fuera fina, de lo contrario los glóbulos de grasa dificultarían el análisis de los espermatozoides.

Para el grupo Andromed[®] (A) se utilizó el siguiente procedimiento:

Para la preparación del diluyente se mezclaron 200 mL del concentrado con 800 mL de agua bidestilada, ambas fracciones temperadas a +30 °C hasta +35 °C, en una proporción de 1:4 (1 parte de concentrado + 4 partes de agua bidestilada). Mientras se realizaban los exámenes del eyaculado colectado (examen microscópico, concentración etc.) éste se mantuvo, junto con el diluyente, en un baño maría a +28 °C hasta +30 °C. Durante la mantención del eyaculado en el baño maría se prediluyó con Andromed[®] en proporción 1:1, su mantención en el baño maría no excedió unos pocos minutos; a continuación se continuó con la dilución final y envasado del eyaculado a temperatura ambiente, preferentemente a +20 °C hasta 23 °C. Las pajuelas se depositaron en parrillas y se colocaron a enfriar en la cámara climática a 4-5 °C durante cuatro horas, tiempo al cual se congeló en vapores de nitrógeno durante 10 minutos a cuatro centímetros de altura sobre el nivel del nitrógeno, en un recipiente aislante (icopor), utilizando lotes de 50 pajuelas. Al cabo de los 10 minutos fueron agrupadas en los goblets de a cinco pajuelas por goblets y dos goblets por escalerilla y depositadas directamente en el termo con nitrógeno líquido.

Para el Continental[®] one step (C) se utilizó el siguiente procedimiento:

El diluyente concentrado Continental One-Step[™] Extender[®] está compuesto de:

Tris	24.2 g
Ácido cítrico	13.8 g
Fructosa	10.0 g
Glicerol	70.0 mL
Agua estéril desionizada por ósmosis reversa	340 mL

A este volumen de 340 mL se le agregaron 460 mL de agua bidestilada para completar un volumen de 800 mL; luego se agregaron 200 mL de yema de huevos frescos. Previo al uso se calentó entre 28 y 30 °C, esta mezcla se puede almacenar por espacio no mayor de una semana a 4 °C.

Se adicionó la solución de Continental One Step® necesaria para la dosis de semen calculadas, siempre realizando una predilución 1:1 procurando siempre que la temperatura del semen y el diluyente fuese similar a fin de evitar el choque térmico, se envasó en pajuelas de 0.5 mL utilizando una concentración de 30×10^6 espermatozoides/pajuela, se selló y se dejó enfriar y equilibrar por cuatro horas a +4 °C (+39.2 °F), tiempo al cual, fue depositado en las parrillas y se colocó en vapores de nitrógeno durante 10 minutos a cuatro centímetros de altura sobre el nivel del nitrógeno. Al cabo de los 10 minutos fueron agrupadas en los goblets de a cinco pajuelas por goblets y dos goblets por escalerilla y depositadas directamente en el termo con nitrógeno líquido.

Setenta y dos horas posteriores a la congelación se descongelaron cinco pajuelas de cada uno de los tratamientos a 37 °C por 40 segundos en baño maría y fueron evaluadas nuevamente, calculando motilidad progresiva individual, para lo cual se diluyó el semen de dos pajuelas de diferentes sitios del termo, en SSF en proporción de 1:4 según Rosas (1997).

Solo se consideraron muestras aptas aquellas que presentaron 35% o más de motilidad individual, y calidad biológica igual o superior a 10×10^6 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 calculó como: motilidad progresiva individual poscongelación dividida por la motilidad individual antes de congelar por 100. El Cuadro 3 muestra los valores de referencia que se utilizaron.

Cuadro 3. Número de espermias viables por dosis de semen al descongelado. Cálculo de la calidad biológica

Concentración	% Motilidad	# de espermias viables	Resultado
30 000 000	0.20	6 000 000	No adecuada
	0.25	7 500 000	No adecuada
	0.30	9 000 000	No adecuada
	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)

Se midieron las siguientes variables:

- Motilidad individual poscongelado
- Porcentaje de anormalidades poscongelado
- Porcentaje de recuperación
- Calidad biológica

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con tres tratamientos (leche al 2% de grasa, Andromed[®] y Continental[®] one step) 14, 14 y 18 repeticiones respectivamente. Se utilizó el Modelo Lineal General (GLM) realizando un ANDEVA y separación de medias, utilizando la prueba de Duncan. Todos los valores porcentuales fueron convertidos a través de la función arcoseno. El valor de significancia exigido fue de $P \leq 0.05$. El programa estadístico utilizado fue “Statistical Analysis System” (SAS[®] 2013).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Motilidad Individual en Fresco. Los tratamientos no presentaron diferencia significativa ($P > 0.05$; Cuadro 4) estando todos alrededor del 90% de motilidad individual. Éstos resultados superaron en 10% a Carpio Chuchuca (2015) quien reportó un 80% de motilidad individual en fresco, al igual que Sikes y Merilan (1958) quienes reportaron una media de 80% de motilidad individual en fresco. Zemjanis (1987) concluye que la motilidad individual para bovinos debe oscilar entre 80-100% de células móviles para ser considerado muy bueno con un valor numérico de 5. Igualmente, Holt y Van Look (2004), apuntan que hay toros cuyo semen una vez entra en contacto con el diluyente bajan su motilidad individual a niveles por debajo de 50%, estos y los que presentan motilidad individual nula deben ser descartados inmediatamente para su congelación. Las diferencias encontradas entre la literatura pueden deberse a las razas de los toros, la edad de los toros, las condiciones climáticas del área y el método utilizado para extraer el semen.

Motilidad Individual Poscongelado. Los tratamientos presentaron diferencias significativas ($P \leq 0.05$; Cuadro 4). El porcentaje de motilidad individual poscongelado para el Continental One Step[®] fue mayor que los demás tratamientos, superando al Andromed[®] y leche en 15.7 y 37.9% respectivamente. La leche presentó la menor motilidad individual poscongelado. Los resultados encontrados fueron menores a los encontrados por Carpio Chuchuca (2015) quien utilizando el diluyente Triladyl[®] con yema de huevo obtuvo 72.5% de motilidad individual posdescongelado, sin embargo, Gallardo Bustillos y Vargas Sandoval (2015) reportaron valores de 21 y 40% utilizando Andromed[®] y Triladyl como diluyentes respectivamente. Los resultados del diluyente Continental One Step[®] coinciden con los estudios de Briandt-Amirat *et al.* (2006) quienes apuntan que los diluyentes a base de huevo a la descongelación deben presentar valores de motilidad individual alrededor de 54.4%. De igual manera, el menor porcentaje de diferencia entre motilidad individual en fresco vs motilidad individual poscongelado la presentó el Continental One Step[®] superando al Andromed[®] y leche en 17 y 39.7% respectivamente. Catena y Cabodevila (1999) indican que un semen de buena calidad que ha sido recientemente descongelado debe presentar un 40-50% de motilidad individual, siendo alcanzado por el Andromed[®] y el Continental One Step[®], no así por la leche al 2% de grasa. La diferencia entre los autores puede deberse a la raza de los toros, ya que Gallardo Bustillos y Vargas Sandoval (2015) utilizaron toros de cruce Sahiwal, mientras que en este estudio se utilizaron toros de raza Jersey y Holstein. Igualmente, las diferencias pueden atribuirse a las condiciones de la zona o la etapa fisiológica de los toros.

Cuadro 4. Porcentaje de Motilidad Individual en Fresco (MI Fresco), Motilidad Individual Poscongelado (MI Poscongelado) y Diferencia en la motilidad individual en fresco vs. Poscongelado.

Tratamiento	n	% MI Fresco	% MI poscongelado	Diferencia motilidad individual fresco vs poscongelado
Andromed [®]	14	90.7	44.3 a	46.4 a
Leche al 2% de grasa	14	91.4	22.1 b	69.3 b
Continental [®] one step	18	89.4	60.0 c	29.4 c
Probabilidad		0.5044	<0.0001	<0.0001
Coefficiente de variación		5.9883	27.1482	28.2706

abc: Valores en la misma columna con distinta letra difieren estadísticamente entre sí ($P \leq 0.05$).

Porcentaje de anomalías. El porcentaje de anomalías en poscongelado con Andromed[®] fue mayor ($P \leq 0.05$) en un 2.7% que el de los demás tratamientos (Cuadro 5). Esto se atribuye a que el Andromed[®] no es un diluyente con ingredientes de contenido animal. Según estudios, éstos diluyentes desarrollan propiedades protectoras durante enfriamiento y congelación de semen. Además, se sugiere que las proteínas aumentan la acción de protección espermática (Gallardo Bustillos y Vargas Sandoval 2015). Los tratamientos con leche y Continental[®] one step no presentaron diferencias significativas en el porcentaje de anomalías poscongelado. Esto se atribuye a las sustancias orgánicas como la caseína (leche) y las lipoproteínas (yema de huevo) contenidas en los diluyentes y que ayudan a prevenir el choque por enfriamiento (Carpio Chuchuca 2015). Los tratamientos no presentaron diferencias significativas ($P > 0.05$) en el porcentaje de anomalías en fresco (Cuadro 5). Los resultados fueron comparados según el estudio realizado por Gallardo Bustillos y Vargas Sandoval (2015), quienes no obtuvieron diferencias significativas entre tratamiento del semen en fresco y demostraron que el 45% de los espermatozoides en fresco mantienen su membrana plasmática y luego del proceso de poscongelado se reduce.

Cuadro 5. Porcentaje de anomalías en fresco y poscongelado del semen.

Tratamiento	n	% de anomalías en fresco	% de anomalías poscongelado	Diferencia de anomalías fresco vs poscongelado
Andromed [®]	14	9.0	16.0 a	7.0 a
Leche al 2% de grasa	14	9.2	13.3 b	4.1 b
Continental [®] one step	18	9.4	13.0 b	3.6 b
Probabilidad		0.7731	0.0010	0.0009
Coefficiente de variación		8.9263	8.5856	27.568

abc: Valores en la misma columna con distinta letra difieren estadísticamente entre sí ($P \leq 0.05$).

Calidad biológica. Las diferencias obtenidas entre tratamientos para la calidad biológica del semen fueron significativas ($P \leq 0.05$; Cuadro 6). La calidad biológica con el diluyente Continental[®] one step presentó un 26.2% más de concentración que el Andromed[®]. Uno de los principales ingredientes en el diluyente Continental[®] one step es la yema de huevo; según Carpio Chuchuca (2015), preserva las membranas del acrosoma y mitocondrias del espermatozoide. Además, se adhiere a la membrana del espermatozoide y la recubre, esto se debe a la gran densidad de la fracción de lipoproteínas (Carpio Chuchuca 2015). Stornelli (2007) establece que los fosfolípidos y proteínas de baja densidad protegen el espermatozoide por shock de frío. El Andromed[®] tuvo un mejor desempeño con una concentración de 13.2 millones de espermatozoides viables, siendo la leche el más bajo con 6.6 millones. La leche, como toda sustancia biológica, puede diferir en sus composiciones químicas. Los constituyentes de la leche con mayor efecto protector aparentan ser las micelias de caseína (Sandoval López 2010). Estos resultados fueron comparados con el estudio de Sandoval López (2010) quien demostró que suplementando el semen diluido en leche, se puede mejorar la motilidad. Es importante que se puedan controlar las fracciones en leche para un mejor resultado. Según Rosas (1997), la calidad biológica se considera aprobada con 0.35-0.50% de motilidad y de 10-15 millones de espermatozoides viables. Sin embargo, se considera no adecuada con 0.20-0.30% y de 6.9 millones respectivamente.

Índice de Recuperación. Se encontró diferencia significativa ($P \leq 0.05$) para los valores de Índice de Recuperación (IR) entre los tratamientos (Cuadro 6). Los resultados fueron comparados con el estudio Eveline Padilla y Vaquero Castañeda (2006) quienes definieron que esta variable es afectada por MI fresco y poscongelado, Rosas (1997) clasifica los valores de IR mayor al 51% como excelentes.

Cuadro 6. Evaluación del Índice de Recuperación (IR) y Calidad Biológica (CB) del semen poscongelado.

Tratamiento	n	Índice de Recuperación	Clasificación Índice de Recuperación	Calidad Biológica	Clasificación Calidad Biológica
Andromed [®]	14	48.8 a	Muy Bueno	13.29 a	Adecuada
Leche al 2% de grasa	14	24.4 b	Malo	6.64 b	No adecuada
Continental [®] one step	18	66.8 c	Excelente	18.00 c	Adecuada
Probabilidad		<0.0001		<0.0001	
Coefficiente de variación		29.5332		1.9943	

4. CONCLUSIONES

- Con base en los resultados de nuestro estudio, con el diluyente Continental® one step se tuvo la mejor motilidad individual poscongelado y la menor diferencia de motilidad individual fresco vs poscongelado.
- El menor porcentaje de anormalidades poscongelado y la menor diferencia de anormalidades entre fresco vs poscongelado se obtuvo en los diluyentes a base de Leche al 2% de grasa y Continental® one step.
- La mejor calidad biológica y el mejor índice de recuperación se obtuvo en el diluyente Continental® one step.

5. RECOMENDACIONES

- Se recomienda el uso de diluyente Continental® one step para los procedimientos de congelación de semen bovino en el Laboratorio de Reproducción Animal de Zamorano.
- Realizar investigaciones relacionando los diluyentes con diferentes razas bovinas.
- Analizar las relaciones entre el método de recolección (vagina artificial y electroeyaculador) y la calidad biológica.
- Desarrollar estudios con diferentes concentraciones de grasa en la leche.

6. LITERATURA CITADA

- Baracaldo, M., A. Barth, y W. Bertrand. 2007. Steps for freezing bovine semen: from semen collection to liquid nitrogen tank. *IVIS Reviews in Veterinary Medicine*. Ithaca, New York, USA.
- Belascoain, M., E. Diaz, y S. Huter. 2010. Técnicas para la criopreservación de embriones bovinos. Tesis para optar al título de Especialista en Reproducción Bovina. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina. p 3-4.
- Briant-Amirat, L., M. Anton, O. Gerard, y D. Tainturier. 2006. Etude de la fertilité in vitro de la semence de taureau après congélation-décongélation avec les LDL du jaune d'œuf de poule: Comparaison avec l'Optidyl[®], diluer a base de jaune d'œuf. *Revue Médecine Vétérinaire*. 157(4): 205-212
- Carpio Chuchuca, S. 2015. Evaluación de dos diluyentes para la crio conservación de semen bovino: yemas de huevo vs leche descremada. Tesis para optar al título de Médico Veterinario Zootecnista. Universidad Politécnica Salesiana. Cuenca, Ecuador. p 56-64.
- Catena, M, y J. Cabodevila. 1999. Evaluación del semen bovino. Simposio Internacional de Reproducción Bovina. *Taurus*. 1(3):18-31
- De Leeuw F., A. De Leeuw, H. Den Daas, B. Colenbrander, y A. Verkleij. 1993. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*. 30(1):32-44
- Gallardo Bustillos, J. y C. Vargas Sandoval. 2015. Evaluación de tres diluyentes para criopreservar semen bovino de toros cruce Sahiwal (*Bos Taurus*) en el trópico húmedo. Tesis Ingeniero Agropecuario. Santo Domingo, Ecuador, Universidad de las Fuerzas Armadas. 89 p.
- Gonzalez Granda, B. y A. Muñoz Molina. 2002. Determinación de la calidad biológica del semen congelado de la unidad de ganado lechero y doble propósito en Zamorano, Honduras. Tesis Ing. Agr. El Zamorano, Honduras. Escuela Agrícola Panamericana. p 7-10
- Gordon, I. 2004. Reproductive technologies in farm animals. CABI Publishing. Wallingford, Oxfordshire. p 79-84

Holt, W. y K. Van Look. 2004. Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality. *Reproduction*. 127(5):527-535

Holy, L. 1987. *Biología de la reproducción bovina: semen y sus características*. Unidad productora 101 "Osvaldo Sanchez". Instituto Cubano del Libro. p 276-292.

Jiménez, C. s.f. Técnicas de congelación y sexado del semen bovino y su importancia en reproducción bovina. (en línea). Consultado 17 de junio de 2015. Disponible en <http://www.docentes.unal.edu.co/cjimeneze/docs/8209.pdf>

Eveline Padilla, A. y M. Vaquero Castañeda. 2006. Efecto de la disminución parcial del plasma seminal sobre la calidad biológica del semen bovino poscongelado. Tesis Ing. Agr. El Zamorano, Honduras . Escuela Agrícola Panamericana. 33 p.

Rosas, J. 1997. Memorias del VI Curso de "Actualización en reproducción animal": Determinación de la calidad biológica del semen congelado. Instituto Nacional de Investigación Forestales y Agropecuarias. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, Tabasco, México. p 25-30.

Sandoval López, C.A. 2010. Efecto sobre motilidad espermática de distintas leches descremadas comerciales utilizadas como diluyente de refrigeración de semen equino. Tesis Médico Veterinario. Santiago, Chile, Universidad de Chile. 59 p.

Sara, R. 2000. Inseminación Artificial: Usted lo puede hacer ahora. Las soluciones del siglo XXI, Difusión ganadera. (en línea) Consultado 10 de junio de 2015. Disponible en http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/inseminacion_artificial/22-IA_usted_puede.pdf

Sikes, J.D. y C.P. Merilan. 1958. Preliminary results on the preservation of bovine semen in a milk-egg yolk-glycerol extender. *Journal of Dairy Science*. 41: 205-206

Stornelli, MA. 2007. Fertilidad y supervivencia del semen canino criopreservado. La Plata, Argentina. (en línea). Consultado 09 de septiembre de 2015. Disponible en http://www.voraus.com/adiestramientocanino/modules/wfsection/html/a000502_115_Stornelli_criopreservacion.pdf

Urdaneta, R. y R. Olivares. 1985. Uso de la técnica de inseminación artificial en bovinos. Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias. FONAIAP divulga No. 17. 1-3

Vishwanath, R y P. Shannon. 2000. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Animal Reproduction Science*. 62(1): 23-53

Witt A., C. Sackmann-Muriel y R. Arosteguy. 1977. Inseminación Artificial. En: *Compilado de temas sobre manejo reproductivo e inseminación artificial en bovinos y ovinos*. J. Ostrowski (Ed). 1980. Editorial Hemisferio Sur S.A. Buenos Aires, Argentina. p 377-378.

Zavaleta, C. 1997. Memorias del VI Curso de “Actualización en reproducción animal”: Evaluación de la capacidad reproductiva de los toros. Instituto Nacional de Investigación Forestales y Agropecuarias. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, Tabasco, México. p 1-12

Zemjanis, R. 1981. Reproducción Animal: Diagnóstico y técnicas terapéuticas. Pacheco. Primera Edición. México, Limusa, S, A. p. 155-170.