

70
Las



Universidad Nacional
Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores
CUAUTITLAN



EVALUACION DE 3 DIFERENTES TIEMPOS DE ENFRIAMIENTO
PARA LA CONGELACION DE SEMEN DE BOVINO POR
MEDIO DE LA RECUPERACION ESPERMATICA
POST-DESCONGELACION

T E S I S

Que para obtener el Título de
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

p r e s e n t a

SERGIO RAUL PINZON HOY

Asesor: M.C. ARTURO A. TREJO GONZALEZ

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx.

1993

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

| | |
|-----------------------------|----|
| RESUMEN..... | 1 |
| INTRODUCCION..... | 2 |
| OBJETIVOS..... | 7 |
| MATERIAL Y METODOS..... | 8 |
| RESULTADOS Y DISCUSION..... | 17 |
| CONCLUSIONES..... | 21 |
| BIBLIOGRAFIA..... | 22 |
| ANEXO 1..... | 24 |
| ANEXO 2..... | 27 |
| ANEXO 3..... | 30 |

RESUMEN

Para probar un sistema de enfriamiento de semen, con fines de congelación a nivel de campo, de tres toros mantenidos en clima tropical se utilizaron cinco eyaculados de cada uno, para determinar el efecto del enfriamiento de 35°C a 5°C en 45, 60 y 90 minutos, en la supervivencia post-descongelación de los espermatozoides congelados en nitrógeno dentro de pajillas francesas de 0.5ml. La descongelación se hizo por medio de inmersión en agua a una temperatura de 35°C durante 30 segundos.

Los eyaculados se diluyeron tomando como base su volumen en un diluyente a base de citrato de sodio-yema de huevo glicerolándose, congelándose y descongelándose de la misma manera todas las muestras.

El porcentaje de recuperación de la viabilidad de los espermatozoides post-descongelación resultó mejor cuando los espermatozoides se enfriaron de 35°C a 5°C en 90 minutos 45.3% seguido por 60 minutos 26.8% y finalmente por 45 minutos 22.2% existiendo entre los tres tratamientos una diferencia significativa ($P < 0.0001$)

INTRODUCCION

La inseminación artificial (I.A.), en las especies domésticas toma origen en el año de 1780 con Lazaro Spallanzani, fisiologo italiano del Ateneo de Pavia, quien experimentó fecundando a una perra en celo, infundiendole semen fresco de un macho normal, directamente en el útero, obteniendose al final de la gestación una camada normal de cachorros con características de los progenitores. En 1782, el propio Spallanzani le encargó al profesor Pietro Rossi del Ateneo de Pavia, la experimentación de la fecundación artificial de una perra, obteniendose pleno éxito (Bonadonna, 1962; Pérez y Pérez, 1966; Sorensen, 1982).

En 1787, Spallanzani durante sus investigaciones sobre el esperma del sapo y de otros animales, apreció por primera vez que mientras el calor tiende a abreviar la vitalidad, el frío, por el contrario, la prolonga impidiendo, según el autor, los fenómenos de putrefacción (Pérez y Pérez, 1966).

En 1793, Spallanzani demostró que el agua a 20°C resultaba, en el caso de la rana, la mejor condición para la conservación de los espermatozoides vivos (Bonadonna, 1962; Pérez y Pérez, 1966).

En 1856, a Kollker y Waldeyer, les corresponde el mérito de la primera dilución espermática a base de un medio de conservación orgánica. Se trata de orina recién recolectada como medio de dilución espermática (Pérez y Pérez, 1966).

En 1866, Colin demostró que el frío actuando sobre los espermatozoides disminuye la capacidad motora, la cual se recupera a medida que se eleva la temperatura (Bonadonna, 1962).

En 1876, Plönnis y Albrecht en Alemania, pusieron en

práctica la I.A., en la especie canina (Pérez y Pérez, 1966).

En 1890, Repiquet en Francia, plantea la posibilidad de la I.A., presentando a la Academia Veterinaria una interesante comunicación, para contrarrestar la esterilidad (Sorensen, 1982).

En 1900, se empezaron estudios extensivos en animales domésticos en Rusia y poco después en Japón (Bonadonna, 1962; Pérez y Pérez, 1966).

En 1905, Hoffmann experimentó con la leche fresca como diluyente para el semen (Pérez y Pérez, 1966).

De 1910 a 1913, Elias Ivanov demostró las ventajas de ciertas soluciones electrolíticas como el Cloruro de sodio (NaCl), cloruro de potasio (KCl), en la dilución del esperma. También observó que los testículos aislados de un morueco encontrado muerto entre la nieve hacia varias semanas y en estado de congelación, contenían espermatozoides vivos y con capacidad fecundante (Pérez y Pérez, 1966).

En 1914, Poyarkov adicionó azúcares y observó que mejoraban las condiciones iniciales de actividad espermática. En este mismo año, Amantea, de la Facultad de Medicina en Roma, inovó la vagina artificial (Bonadonna, 1962; Pérez y Pérez, 1966).

En 1920, se descubrió el verdadero sentido de las sustancias de acción amortiguadora. Wolf, demostró que los amortiguadores añadidos a los medios de dilución del semen, aumentaron el tiempo de supervivencia espermática (Pérez y Pérez, 1966).

En 1928, Ivanov efectuó inseminación artificial en vacas y ovejas (Sorensen, 1982).

En 1934, se intenta con éxito una técnica revolucionaria por Datwiler, Sato y Roemmele: la gelatinización del esperma. El

fundamento de la misma es que a mayor viscosidad en el medio líquido en el que se encuentran los espermatozoides, menor capacidad de movimientos de los mismos, y por lo tanto, hay mayor posibilidad de supervivencia al ahorrarse energía en la célula espermática (Pérez y Pérez, 1966).

En 1936, en Dinamarca se funda el primer centro de I.A. en el mundo (Pérez y Pérez, 1966).

En 1938, la primera institución de I.A. en Estados Unidos, fue la Cooperative Artificial Breeding Association No. 1, establecida en Nueva Jersey (Sorensen, 1982).

En 1939, Phillips comprobó el efecto favorable en la dilución del esperma en soluciones integradas por fosfato sódico, fosfato potásico y yema de huevo, obteniéndose tiempos de supervivencia de 180 horas (manteniendolo a temperatura de 40°C a 10°C (Pérez y Pérez, 1966).

En 1942, Salisbury utilizó el método de Phillips integrado con citrato de sodio y yema de huevo, obteniendo ventajas evidentes (Bonadonna, 1962; Pérez y Pérez, 1966).

En 1947, Wilcinska y Laurans demostraron con el método de Phillips, que la yema de huevo ofrecía acción protectora intensa sobre la morfología espermática (Pérez y Pérez, 1966).

En 1948, Smirnov consiguió éxitos fecundantes con esperma de toro mantenido durante 10 días a temperatura de -28°C a -83°C (Pérez y Pérez, 1966).

En 1950, Tacker y Almquist obtuvieron resultados favorables disolviendo el esperma con leche y extracto de yema. También, en este año Cassou, en Francia, puso en práctica un nuevo método de

conservación en base a leche descremada en polvo, pero no fue superior al de Salisbury con citrato de sodio y yema (Pérez y Pérez, 1966).

En 1952, Polge y Rowson experimentaron incorporando glicerina al medio en la concentración de 5-10%. Diluyeron material seminal inicialmente con diluyente citrato-yema, añadieron a continuación glicerina y se mantuvo en inmersión de nieve carbónica y etanol a la temperatura de -79°C (Bonadonna, 1962; Pérez y Pérez, 1966). En este mismo año en Inglaterra, Polge y Smith congelan el primer semen con nieve carbónica (Pérez y Pérez, 1966).

El descubrimiento de los antibióticos como la penicilina, estreptomocina y sulfanilamida, mejoró los resultados en la conservación del esperma (Bonadonna, 1962; Pérez y Pérez, 1966).

Bonadonna en 1962, hace notar que el enfriamiento puede ser nocivo cuando se realiza en forma repentina.

También hay autores que han bajado la temperatura de 35°C a 5°C en tiempos que varían de 75 minutos a 1.5 horas sin que se afecten o interfieran sus resultados al final de sus pruebas (Bonadonna, 1962; Almquist y Wiggin, 1973; Wiggin y Almquist, 1975; Robbins *et al.*, 1976; Almquist *et al.*, 1982).

Ennen *et al.*, 1976 menciona que en los resultados de su estudio, observó que la motilidad de los espermatozoides enfriados por 2 o 4 horas no varió y que los espermatozoides enfriados por más de 4 horas mostraron una motilidad superior a aquellos espermatozoides enfriados en 30 minutos.

Segun McDonald, 1978, el semen parcialmente diluido, se le disminuye la temperatura de 35°C hasta 5°C con un promedio de

descenso de 6°C por hora durante un tiempo que va de 5 a 5.5 horas.

Hafez, 1984, hace notar que el enfriamiento debe ser lento, tomando al menos una hora para enfriar la mezcla de 30°C a 15°C.

En general, dentro del proceso global de congelación de semen se han utilizado y se están utilizando los más diversos tiempos de enfriamiento del semen y que van de 75 minutos hasta 5.5 horas, pero no se tiene ninguna correlación entre los diferentes tiempos y sus efectos en la recuperación espermática post-descongelación.

El presente trabajo pretende hacer una evaluación de 3 diferentes tiempos de enfriamiento y su relación con la recuperación espermática post-descongelación.

- A) Tratamiento No. 1: de 35°C a 5°C en 45 minutos.
- B) Tratamiento No. 2: de 35°C a 5°C en 60 minutos.
- C) Tratamiento No. 3: de 35°C a 5°C en 90 minutos.

OBJETIVOS

- 1.- Evaluar 3 diferentes tiempos de enfriamiento para la congelación de semen bovino, por medio de la recuperación espermática después de la descongelación.
- 2.- Determinar cual de los tiempos de enfriamiento es el más eficaz para la congelación del semen.

MATERIAL Y METODOS.

MATERIAL UTILIZADO

Baño maria

Bastones de aluminio (Rack)

Colector de semen

Cubreobjetos

Diluyente Fracción "A": Citrato de sodio
Yema de huevo
Agua bidestilada
Estreptomcina
Penicilina G Potásica

Diluyente Fracción "B": Citrato de sodio
Yema de huevo
Agua bidestilada
Glicerol
Estreptomcina
Penicilina G potásica

Electroeyaculador

Embudos de latex

Empajilladora automática

Gobellets

Gradilla de congelación

Hielera

Hielo

Ligas de hule

Microscopio compuesto

Nitrógeno líquido

Platina térmica

Pajillas francesas de 0.5ml.

Portaobjetos

Recipientes para semen-diluyente

Regla para medir el nivel de nitrógeno

Reloj

Termómetro

Tijeras

Tinción eosina-nigrosina

Toros: 1 Brahman
1 Indobrasil
1 Simmental

Tubos de centrifuga graduados

Unidad de almacenamiento de nitrógeno (contenedor)

Unidad de congelación

METODO

De tres toros se utilizaron cinco eyaculados de cada uno, los toros pertenecían al Rancho "Don Pepe", ubicado en la colonia La Esperanza, Municipio de Jesus Carranza, Veracruz. La raza de cada uno de los toros fue:

1 Brahman
1 Indobrasil
1 Simmental

Se uso un diluyente a base de yema de huevo, citrato de sodio y glicerol (Figura 1). La porción amortiguadora contenía 2.9 gramos de citrato de sodio y se aforó a 100ml. con agua bidestilada. El amortiguador y la yema de huevo se combinaron para obtener una proporción de 80% de amortiguador y 20% de yema de huevo por volumen. El diluyente básico se dividió en 2 fracciones:

FRACCION "A": Consistió en el diluyente básico de yema-citrato y antibióticos (1mg de estreptomycin y 1000 U.I. de penicilina G potásica/ml de diluyente).

FRACCION "B": Consistió en el diluyente básico y una concentración de 14% de glicerol por volumen (Robbins et al. 1976).

2.9g DE CITRATO DE SODIO AFORADOS A 100ml CON AGUA BIDEUTILADA.
(Solucion amortiguadora)

80ml DE SOLUCION AMORTIGUADORA + 20ml DE YEMA DE HUEVO.
(Diluyente básico)

ANTIBIOTICOS
(FRACCION "A")

GLICEROL
(FRACCION "B")

FIGURA 1.
REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA PREPARACION DEL DILUYENTE A BASE
DE YEMA DE HUEVO Y CITRATO DE SODIO.

Cada uno de los toros se trabajó dentro de una manga de manejo de ganado. Después de que el toro fue colocado en el sitio de trabajo se procedió a asear y rasurar la zona prepucial. Posteriormente se introdujo el electroeyaculador vía rectal y por este medio se obtuvo el eyaculado. Los toros fueron trabajados el mismo día y una vez por semana.

El eyaculado fue evaluado y debió de tener por lo menos el 60% de motilidad, una concentración de 1500 millones de células espermáticas/ml como mínimo y un volumen de 5ml o más (Figura 2). Si el eyaculado no reunió estos requisitos, se desechó y se procedió a la obtención de otro nuevo eyaculado.

Si el eyaculado tenía una calidad satisfactoria de volumen, concentración y motilidad, se procedió a diluirlo a una temperatura de 35°C en una proporción de 1:3 (v/v) (una parte de semen por dos partes de diluyente), con la fracción "A", proporcionando así la mitad del volumen final y el doble de la concentración final de espermatozoides (Wiggin y Almquist, 1975; Ennen et al., 1976).

Esta primera mezcla de semen-diluyente se dividió en 3 porciones iguales y se enfriaron cada una de las muestras de la siguiente manera:

- A) Tratamiento No. 1 (T1): de 35°C a 5°C en 45 minutos.
- B) Tratamiento No. 2 (T2): de 35°C a 5°C en 60 minutos.
- C) Tratamiento No. 3 (T3): de 35°C a 5°C en 90 minutos.

Cada una de las muestras semen:diluyente, se colocó en recipientes de 125ml y estos a su vez se colocaron en baño maría a 35°C dentro de otros recipientes de 250ml, 500ml y 1000ml con el fin de formar una camisa térmica para proteger a la muestra durante el enfriamiento de 45, 60 y 90 minutos respectivamente de

acuerdo al tamaño de cada recipiente. Este conjunto de recipientes fue puesto en el agua con hielo para dar inicio al enfriamiento.

El promedio de velocidad de descenso de la temperatura por minuto fue de 0.66°C, 0.50°C y 0.33°C para las muestras de 45, 60 y 90 minutos respectivamente (gráfica 1).

Posteriormente, al terminar cada recipiente con su período de enfriamiento se procedió a glicerolar de la siguiente manera : A 5°C adicionando un volumen de la fracción "B" igual a la fracción "A" más semen, incrementando 10, 20, 30 y 40% del volumen de la fracción "B" a intervalos de 10 minutos (Robbins et al., 1976).

La congelación se realizó con vapor de nitrógeno líquido de la siguiente forma: las pajillas ya llenas se colocaron en forma horizontal sobre una gradilla que se encontraba dentro de la unidad de congelación junto con el nitrógeno líquido a unos 4 centímetros sobre el nivel del nitrógeno aproximadamente. La congelación con el vapor de nitrógeno duró 15 minutos y posteriormente se sumergieron las pajillas dentro del nitrógeno líquido (Almquist y Wiggin, 1973; Pickett y Berndtson, 1974; Wiggin y Almquist, 1975).

Las pajillas con el semen ya congelado, se almacenaron en un contenedor de nitrógeno durante 2 semanas.

Para la evaluación se seleccionaron al azar 5 pajillas por cada tratamiento, los cuales se descongelaron por inmersión en agua a una temperatura de 35°C durante 30 segundos (Robbins et al., 1973; Rodríguez et al., 1975; Becker et al., 1977; Pace et

al., 1981).

La evaluación se basó en el porcentaje de espermatozoides vivos post-descongelación. Esto se determinó por medio de una tinción de eosina-nigrosina, haciendo un frotis, la observación se hizo utilizando un microscopio compuesto.

Se procedió a teñir la muestra descongelada siguiendo la metodología propuesta por Herrick y Self, (1965), modificada por Cameron (1977) y Moss et al. (1979) de la siguiente manera: Se preparó una solución de citrato de sodio al 2.9% y se mantuvo a una temperatura de 35°C. Se diluyó el contenido de la pajilla (0.5ml) en 0.5ml de la solución de citrato de sodio en un tubo de ensaye mezclandose con suavidad.

A esta mezcla se le añadió una gota de eosina previamente calentada a 35°C, se mezcló suavemente y se dejó reposar por tres minutos.

Se añadió una gota de nigrosina a 35°C mezclando suavemente dejando reposar por dos minutos.

Se agregó una gota de la mezcla coloreada en un portaobjetos y se realizó un frotis que se dejó secar.

Se contaron cien espermatozoides de cada frotis, que se observó al microscopio compuesto diferenciando entre vivos y muertos y el resultado se expresó en porcentaje.

Los datos se evaluaron estadísticamente mediante análisis de varianza con arreglo factorial, transformando al arcoseno los valores expresados en porcentaje, mediante el paquete estadístico SAS en su modalidad PROC GLM utilizando el siguiente modelo matemático:

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + M_j + TE_k + E_{ijkl}$$

- Y_{ijkl} - Variable de respuesta de el porcentaje de espermatozoides vivos post-descongelacion para el toro i en el eyaculado j y en el tiempo de refrigeracion k .
- μ - Media poblacional constante.
- T_i - Efecto de toro muestreado ($i=1,2,3$)
- M_j - Efecto de cada muestra de eyaculado ($j=1,2,3,4,5$)
- TE_k - Efecto del tiempo de enfriamiento ($k=1,2,3$)
- E_{ijkl} - Error aleatorio asociado con cada observación.

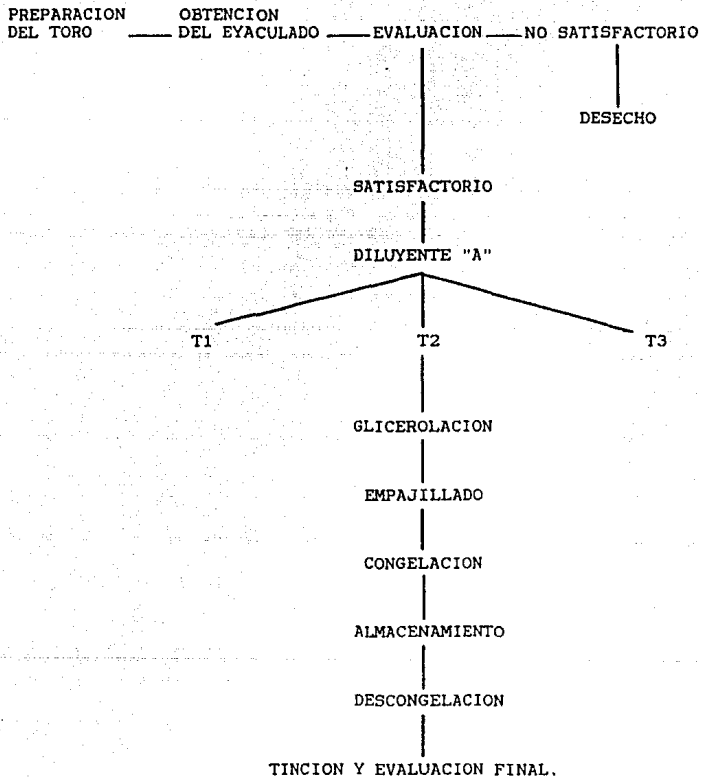


FIGURA 2.
 DIAGRAMA DE FLUJO PARA EL MANEJO DEL SEMEN.

CARACTERISTICAS DE LOS EYACULADOS OBTENIDOS Y VOLUMEN DE DILUCION

| TORO | A | B | C | D | E | F | G | H | I | J | K |
|------------|---|----|-----|----|----|----|----|----|-----|---|---|
| Brahman | 1 | 70 | 400 | 12 | 24 | 36 | 36 | 72 | 144 | 3 | 5 |
| | 2 | 70 | 500 | 9 | 18 | 27 | 27 | 54 | 108 | 3 | 5 |
| | 3 | 70 | 500 | 9 | 18 | 27 | 27 | 54 | 108 | 3 | 5 |
| | 4 | 70 | 500 | 9 | 18 | 27 | 27 | 54 | 108 | 3 | 5 |
| | 5 | 70 | 400 | 10 | 20 | 30 | 30 | 60 | 120 | 3 | 5 |
| Indobrasil | 1 | 70 | 500 | 10 | 20 | 30 | 30 | 60 | 120 | 3 | 5 |
| | 2 | 70 | 400 | 8 | 16 | 24 | 24 | 48 | 96 | 3 | 5 |
| | 3 | 70 | 400 | 9 | 18 | 27 | 27 | 54 | 108 | 3 | 5 |
| | 4 | 70 | 400 | 9 | 18 | 27 | 27 | 54 | 108 | 3 | 5 |
| | 5 | 70 | 400 | 9 | 18 | 27 | 27 | 54 | 108 | 3 | 5 |
| Simmental | 1 | 70 | 350 | 12 | 24 | 36 | 36 | 72 | 144 | 3 | 5 |
| | 2 | 70 | 500 | 10 | 20 | 30 | 30 | 60 | 120 | 3 | 5 |
| | 3 | 70 | 400 | 10 | 20 | 30 | 30 | 60 | 120 | 3 | 5 |
| | 4 | 70 | 500 | 9 | 18 | 27 | 27 | 54 | 108 | 3 | 5 |
| | 5 | 70 | 500 | 8 | 16 | 24 | 24 | 48 | 96 | 3 | 5 |

CLAVE DE LAS COLUMNAS:

- A: Numero de eyaculado
- B: Motilidad masal en porcentaje.
- C: Concentracion espermatica en miles/milimetro cubico.
- D: Volumen en mililitros.
- E: Cantidad agregada en mililitros de diluyente "A"
- F: Volumen total en mililitros de diluyente "A" + Semen
- G: Cantidad agregada en mililitros de diluyente "B"
- H: Volumen total en mililitro diluyente "A" + Semen + Diluyente "B"
- I: Número de dosis procesadas
- J: Número de tratamientos/eyaculado
- K: Número de dosis evaluadas/cada tratamiento

RESULTADOS Y DISCUSION

En el cuadro 1, se presentan los cuadrados medios del análisis de varianza para los diferentes factores que afectan la recuperación de los espermatozoides después de descongelar y se observa que no existieron diferencias significativas para el efecto del toro ni para el efecto del eyaculado, pero si entre tratamientos de enfriamiento ($P < 0.0001$)

CUADRO 1.
ANALISIS DE VARIANZA PARA LA RECUPERACION DE LA MOTILIDAD PROGRESIVA POST-DESCONGELACION DE ESPERMATOZOIDES DE TOROS, CON TRES DIFERENTES TIEMPOS DE ENFRIAMIENTO ANTES DE CONGELAR.

| FUENTES DE VARIACION | GL | CUADRADOS MEDIOS | F | P |
|----------------------|-----|------------------|--------|--------|
| TORO | 2 | 8.31 | 0.67 | 0.51 |
| ENFRIAMIENTO | 2 | 4291.91 | 345.24 | 0.0001 |
| EYACULADO | 4 | 5.50 | 0.45 | 0.77 |
| ERROR | 216 | 12.43 | | |

La recuperación espermática post-descongelación considerada como porcentaje de espermatozoides vivos fue de 22.2, 26.8 y 45.3% para los tratamientos de enfriamiento de 35°C a 5°C en 45, 60 y 90 minutos respectivamente, siendo estas diferencias significativas ($P < 0.0001$) (Cuadro 2) (Gráfica 1) (Anexos 1, 2 y 3).

El enfriar a los espermatozoides en un lapso de tiempo de 90 minutos dió por resultado más células vivas post-descongelación que los espermatozoides enfriados durante 45 y 60 minutos, pero a su vez 60 minutos fue mejor para el porcentaje de espermias vivas que 45 minutos. Mann en 1964, comparó el consumo espermático de fructuosa o fructuolisis en el medio de dilución en semen de toro bajo las siguientes condiciones: fresco, enfriado lentamente y

enfriado rápidamente observando que a los 30 minutos la fructuosa utilizada fue de 2.8, 2.1 y 0.3mg/ml de semen para cada uno de los tratamientos respectivamente, a los 60 minutos la fructuosa utilizada fue 5, 4.2 y 0.4mg/ml de semen en el mismo orden y finalmente a los 90 minutos los espermatozoides utilizaron 6.8, 5.9 y 0.5mg de fructuosa por mililitro de semen para cada tratamiento respectivamente, el enfriamiento lento en este trabajo consistió en bajar 5°C cada hora. los resultados sugieren que el bajo consumo de fructuosa señalado para el semen con enfriamiento rápido a más de 5°C por hora correspondió a espermatozoides muertos, pero el autor no menciona con que porcentaje se correlacionó, coincidiendo el principio fisiológico del consumo de fructuosa con la motilidad encontrada en este trabajo.

 CUADRO 2.
 PROMEDIOS \pm ERROR ESTANDAR PARA LA RECUPERACION DE LA MOTILIDAD PROGRESIVA POST-DESCONGELACION DE ESPERMATOZOIDES DE TOROS, CON TRES DIFERENTES TIEMPOS DE ENFRIAMIENTO ANTES DE CONGELAR.

| TRATAMIENTO | RECUPERACION DE LA MOTILIDAD PROGRESIVA (%) |
|-------------|---|
| 45 MINUTOS | 22.21 \pm 0.64 c |
| 60 MINUTOS | 26.86 \pm 0.64 b |
| 90 MINUTOS | 45.32 \pm 0.64 a |

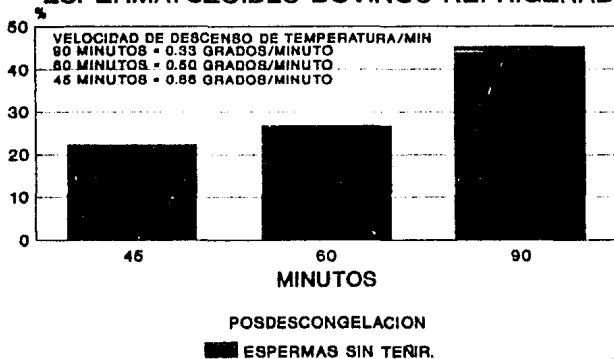
 Letras diferentes representan diferencias significativas (P<0.01)
 El enfriamiento consistió en bajar de 35 a 5 grados centígrados durante el tiempo del tratamiento.

Hubo diferencia significativa en el número de espermatozoides vivos post-descongelación en los tratamientos de 45 y 60 minutos. El enfriamiento de 35°C a 5°C durante 60 minutos fue superior al enfriamiento de 45 minutos, pero, ambas fueron inferiores al número de células vivas en el enfriamiento de 90

minutos. Foote (1978), menciona que la mortalidad espermática en el semen refrigerado con respecto al semen fresco puede ser de 20 a 60% dependiendo de varios factores, entre ellos la velocidad de enfriamiento, en base a los valores señalados, la recuperación de células espermáticas vivas en el tratamiento de 90 minutos de este trabajo fue de 45.32% coincidiendo con lo mencionado por Foote (1978), por lo que se puede considerar aceptable. Pero los tratamientos de 60 y 45 minutos aunque fueron diferentes estadísticamente, se sitúan en el límite más bajo mencionado por este autor por lo que se pueden considerar como no satisfactorios con fines de inseminación artificial. El mismo autor menciona que no se ha determinado adecuadamente la tasa óptima de enfriamiento en diferentes diluentes, pero como recomendación general el enfriamiento rápido debe evitarse.

El disminuir la velocidad de enfriamiento a 90 minutos resultó en una supervivencia post-descongelación superior, mientras que en los enfriamientos rápidos de 45 y 60 minutos no se mejoró la recuperación espermática post-descongelación. Los resultados obtenidos de la recuperación espermática post-descongelación en los tratamientos enfriados de 35°C a 5°C en 45, 60 y 90 minutos fueron independientes al método de glicerolación, congelación, descongelación y raza de los toros.

GRAFICA 1. PORCENTAJE DE SUPERVIVENCIA DE ESPERMATOZOIDES BOVINOS REFRIGERADOS



Pinzón H.S., 1992.

CONCLUSIONES

Los mejores resultados se obtuvieron cuando se enfrió de 35°C a 5°C en un período de 90 minutos y la recuperación de la viabilidad espermática post-descongelación disminuyó cuando se incrementó la velocidad de enfriamiento a 60 minutos y disminuyó aún más a 45 minutos.

La recuperación obtenida para el tratamiento de 90 minutos es un valor aceptable para el semen bovino, sin embargo las diferencias obtenidas entre los tratamientos del presente estudio no pueden ser comparadas ya que no se encontró información al respecto bajo condiciones tropicales.

Las diferencias posiblemente se debieron a:

- Choque frío, debido a posibles cambios en diferentes niveles de la superficie y/o porciones internas del espermatozoide durante el enfriamiento.
- Daños físicos de los espermatozoides.
- Daños químicos producidos por los diferentes componentes del diluyente y su interacción con la temperatura.

Los mejores resultados del estudio realizado a nivel de campo, se obtuvieron al enfriar el semen de 35°C a 5°C en 90 minutos, por lo tanto, puede recomendarse esta técnica evitando un enfriamiento más rápido en tanto no se realicen más investigaciones al respecto.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Almquist, J.O., K.E. Grube y J.L. Rosenberger. (1982). Effect of thawing time on fertility of bovine spermatozoa in french straws. *J. Dairy Sci.* 65:824.
- 2.- Almquist, J.O. y H.B. Wiggin. (1973). Survival of bull spermatozoa frozen and thawed by different methods in plastic straws. *A. I. Digest.* 21:6.
- 3.- Becker, W.C., P.L. Senger, E.P. Aalsth y C. E. Marshall. (1977). Influence of glycerol levels, diluent and post-thaw temperature on motility and acrosomal maintenance in bovine semen frozen in plastic straw. *J. Anim. Sci.* 44 (6):1067.
- 4.- Bonadonna, T. (1962). Fisiopatología de la reproducción y fecundación artificial ganadera. 1a. Edición. Tomo I y II. Salvat Editores S.A. Barcelona. España.
- 5.- Cameron, R.D.A., (1977). Semen collection and evaluation in the ram. The preparation of spermatozoa for morphological examination. *Aust. Vet. J.* 53: 384-386.
- 6.- Ennen, B.D., W.E. Berndtson, R.G. Mortimer y B.W. Pickett. (1976). Effect of processing procedures on motility of bovine spermatozoa freezen in 0.25ml straws. *J. Anim. Sci.* 43(3):651.
- 7.- Foote, R.F., (1978). Diluyentes y dilución del semen sin congelar. En. *Fisiología de la Reproducción e Inseminación Artificial de los Bóvidos*. Ed. Salisbury, G.W., Van Denmark, N.L. y Lodge J.R. Editorial Acribia, Zaragoza. España.: 463-517.
- 8.- Hafez, E.S.E. (1984). Reproducción e inseminación artificial en animales. 1a. Edición. Nueva Editorial Interamericana S.A. de C.V. México, D.F.
- 9.- Herrick, J.B. y Self, H.L., (1965). Técnicas para teñir espermatozoides. En. *Evaluación de la fertilidad del toro y del varraco*. Editorial Acribia, Zaragoza. España.: 75-76.
- 10.- Mann, T., (1964). Influence of ion concentration, dilution, temperature and other extraneous factors, on semen in vitro. En. *The Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract*. 2nd Ed. Methuen and Co. L.T.D. Reino Unido.: 339-364.
- 11.- McDonald, L.E. (1978). Reproducción y Endocrinología Veterinarias. 2a. Edición. Nueva Editorial Interamericana S.A. de C.V. México, D.F.
- 12.- Moss, J.A., Melrose, D.R., Reed, H.C.B. y Vandesplasseche, M., (1979). Spermatozoa, semen and Artificial Insemination. En. *Fertility and Infertility in Domestic Animals*. 3th ed. Bailliery Tindall. Londres.: 59-91.

13.-Pace, M.M., J.J. Sullivan, F.I. Elliott, E.F. Graham y G.H. Coulter. (1981). Effects of thawing temperature, number of spermatozoa and spermatozoal quality on fertility of bovine spermatozoa packaged in 0.5ml french straws. J. Anim. Sci. 53(3):693.

14.- Pérez y Pérez, F. (1966). Reproducción e inseminación artificial ganadera. 1a. Edición. Editorial Cientificomédica. Barcelona, España.

15.- Pickett, B.W. y W.E. Berndtson. (1974). Preservation of bovine spermatozoa by freezing in straws: A Review. J. Dairy Sci. 57(11):1287.

16.- Robbins, R.K., M.L. O'connor, P.T. Chandler y R.G. Saacke. (1973). Freezing of bovine semen in "french straws". J. Anim. Sci. 37:327 (Abstr.).

17.- Robbins, R.K., R.G. Saacke y P.T. Chandler. (1976). Influence of freeze rate, thaw rate and glycerol level on acrosomal retention and survival of bovine spermatozoa frozen in french straws. J. Anim. Sci. 42(1):145.

18.- Rodríguez, O.L., W.E. Berndtson, B.D. Ennen y B.W. Pickett. (1975). Effect of rate of freezing, thawing and level of glycerol on the survival of bovine spermatozoa in straws. J. Anim. Sci. 41(1):129.

19.- Sorensen, A.M. Jr. 1982. Reproducción animal. 1a. Edición. Ed. McGraw-Hill de México, S.A. de C.V. México, D.F.

20.- Wiggin, H.B. y J.O. Almquist. 1975. Effect of glycerol equilibration time and thawing rate upon acrosomal maintenance and motility of bull spermatozoa frozen in plastic straws. J. Anim. Sci. 40(2):302.

ANEXO 1

RESULTADOS OBTENIDOS EN EL TRATAMIENTO 1.

TORO BRAHMAN.

| NO. DE EYACULADO | PAJILLA | ESPERMATOZOIDES VIVOS/DOSIS | ESPERMATOZOIDES MUERTOS/DOSIS |
|---------------------|---------|--------------------------------|----------------------------------|
| 1 | 1 | 25 | 75 |
| 1 | 2 | 16 | 84 |
| 1 | 3 | 15 | 85 |
| 1 | 4 | 23 | 77 |
| 1 | 5 | 28 | 72 |
| 2 | 1 | 20 | 80 |
| 2 | 2 | 27 | 73 |
| 2 | 3 | 14 | 86 |
| 2 | 4 | 30 | 70 |
| 2 | 5 | 21 | 79 |
| 3 | 1 | 18 | 82 |
| 3 | 2 | 24 | 76 |
| 3 | 3 | 29 | 71 |
| 3 | 4 | 25 | 75 |
| 3 | 5 | 22 | 78 |
| 4 | 1 | 26 | 74 |
| 4 | 2 | 21 | 79 |
| 4 | 3 | 30 | 70 |
| 4 | 4 | 19 | 81 |
| 4 | 5 | 15 | 85 |
| 5 | 1 | 23 | 77 |
| 5 | 2 | 26 | 74 |
| 5 | 3 | 18 | 82 |
| 5 | 4 | 17 | 83 |
| 5 | 5 | 27 | 73 |

ANEXO 1

RESULTADOS OBTENIDOS EN EL TRATAMIENTO 1.

TORO INDOBRASIL.

| NO. DE EYACULADO | PAJILLA | ESPERMATOZOIDES VIVOS/DOSIS | ESPERMATOZOIDES MUERTOS/DOSIS |
|------------------|---------|-----------------------------|-------------------------------|
| 1 | 1 | 26 | 74 |
| 1 | 2 | 17 | 83 |
| 1 | 3 | 23 | 77 |
| 1 | 4 | 25 | 75 |
| 1 | 5 | 23 | 77 |
| 2 | 1 | 30 | 70 |
| 2 | 2 | 20 | 80 |
| 2 | 3 | 24 | 76 |
| 2 | 4 | 24 | 76 |
| 2 | 5 | 18 | 82 |
| 3 | 1 | 22 | 78 |
| 3 | 2 | 27 | 73 |
| 3 | 3 | 19 | 81 |
| 3 | 4 | 20 | 80 |
| 3 | 5 | 23 | 77 |
| 4 | 1 | 21 | 79 |
| 4 | 2 | 21 | 79 |
| 4 | 3 | 28 | 72 |
| 4 | 4 | 19 | 81 |
| 4 | 5 | 25 | 75 |
| 5 | 1 | 22 | 78 |
| 5 | 2 | 16 | 84 |
| 5 | 3 | 16 | 84 |
| 5 | 4 | 15 | 85 |
| 5 | 5 | 29 | 71 |

ANEXO 1

RESULTADOS OBTENIDOS EN EL TRATAMIENTO 1.

TORO SIMMENTAL.

| NO. DE EYACULADO | PAJILLA | ESPERMATOZOIDES VIVOS/DOSIS | ESPERMATOZOIDES MUERTOS/DOSIS |
|---------------------|---------|--------------------------------|----------------------------------|
| 1 | 1 | 21 | 79 |
| 1 | 2 | 17 | 83 |
| 1 | 3 | 25 | 75 |
| 1 | 4 | 15 | 85 |
| 1 | 5 | 27 | 73 |
| 2 | 1 | 26 | 74 |
| 2 | 2 | 15 | 85 |
| 2 | 3 | 23 | 77 |
| 2 | 4 | 22 | 78 |
| 2 | 5 | 30 | 70 |
| 3 | 1 | 21 | 79 |
| 3 | 2 | 19 | 81 |
| 3 | 3 | 29 | 71 |
| 3 | 4 | 20 | 80 |
| 3 | 5 | 25 | 75 |
| 4 | 1 | 18 | 82 |
| 4 | 2 | 16 | 84 |
| 4 | 3 | 24 | 76 |
| 4 | 4 | 27 | 73 |
| 4 | 5 | 30 | 70 |
| 5 | 1 | 28 | 72 |
| 5 | 2 | 11 | 89 |
| 5 | 3 | 18 | 82 |
| 5 | 4 | 18 | 82 |
| 5 | 5 | 23 | 77 |

ANEXO 2

RESULTADOS OBTENIDOS EN EL TRATAMIENTO 2.

TORO BRAHMAN.

| NO. DE EYACULADO | PAJILLA | ESPERMATOZOIDES VIVOS/DOSIS | ESPERMATOZOIDES MUERTOS/DOSIS |
|---------------------|---------|--------------------------------|----------------------------------|
| 1 | 1 | 15 | 85 |
| 1 | 2 | 19 | 81 |
| 1 | 3 | 32 | 68 |
| 1 | 4 | 28 | 72 |
| 1 | 5 | 20 | 80 |
| 2 | 1 | 30 | 70 |
| 2 | 2 | 25 | 75 |
| 2 | 3 | 22 | 78 |
| 2 | 4 | 18 | 82 |
| 2 | 5 | 32 | 68 |
| 3 | 1 | 29 | 71 |
| 3 | 2 | 26 | 74 |
| 3 | 3 | 24 | 76 |
| 3 | 4 | 28 | 72 |
| 3 | 5 | 34 | 66 |
| 4 | 1 | 27 | 73 |
| 4 | 2 | 30 | 70 |
| 4 | 3 | 31 | 69 |
| 4 | 4 | 28 | 72 |
| 4 | 5 | 21 | 79 |
| 5 | 1 | 36 | 64 |
| 5 | 2 | 24 | 76 |
| 5 | 3 | 28 | 72 |
| 5 | 4 | 21 | 79 |
| 5 | 5 | 32 | 68 |

ANEXO 2

RESULTADOS OBTENIDOS EN EL TRATAMIENTO 2.

TORO INDOBRASIL.

| NO. DE EYACULADO | PAJILLA | ESPERMATOZOIDES VIVOS/DOSIS | ESPERMATOZOIDES MUERTOS/DOSIS |
|------------------|---------|-----------------------------|-------------------------------|
| 1 | 1 | 35 | 65 |
| 1 | 2 | 25 | 75 |
| 1 | 3 | 24 | 76 |
| 1 | 4 | 34 | 66 |
| 1 | 5 | 26 | 74 |
| 2 | 1 | 17 | 83 |
| 2 | 2 | 28 | 72 |
| 2 | 3 | 35 | 65 |
| 2 | 4 | 30 | 70 |
| 2 | 5 | 20 | 80 |
| 3 | 1 | 34 | 66 |
| 3 | 2 | 27 | 73 |
| 3 | 3 | 23 | 77 |
| 3 | 4 | 22 | 78 |
| 3 | 5 | 33 | 67 |
| 4 | 1 | 24 | 76 |
| 4 | 2 | 20 | 80 |
| 4 | 3 | 30 | 70 |
| 4 | 4 | 31 | 69 |
| 4 | 5 | 25 | 75 |
| 5 | 1 | 31 | 69 |
| 5 | 2 | 36 | 64 |
| 5 | 3 | 26 | 74 |
| 5 | 4 | 23 | 77 |
| 5 | 5 | 35 | 65 |

ANEXO 2

RESULTADOS OBTENIDOS EN EL TRATAMIENTO 2.

TORO SIMMENTAL.

| NO. DE EYACULADO | PAJILLA | ESPERMATOZOIDES VIVOS/DOSIS | ESPERMATOZOIDES MUERTOS/DOSIS |
|------------------|---------|-----------------------------|-------------------------------|
| 1 | 1 | 33 | 67 |
| 1 | 2 | 27 | 73 |
| 1 | 3 | 16 | 84 |
| 1 | 4 | 34 | 66 |
| 1 | 5 | 21 | 79 |
| 2 | 1 | 33 | 67 |
| 2 | 2 | 19 | 81 |
| 2 | 3 | 31 | 69 |
| 2 | 4 | 22 | 78 |
| 2 | 5 | 29 | 71 |
| 3 | 1 | 29 | 71 |
| 3 | 2 | 33 | 67 |
| 3 | 3 | 23 | 77 |
| 3 | 4 | 25 | 75 |
| 3 | 5 | 21 | 79 |
| 4 | 1 | 29 | 71 |
| 4 | 2 | 22 | 78 |
| 4 | 3 | 20 | 80 |
| 4 | 4 | 24 | 76 |
| 4 | 5 | 32 | 68 |
| 5 | 1 | 27 | 73 |
| 5 | 2 | 27 | 73 |
| 5 | 3 | 23 | 77 |
| 5 | 4 | 35 | 65 |
| 5 | 5 | 26 | 74 |

ESTA TEST
 NO ESTE
 POLICIA

ANEXO 3

RESULTADOS OBTENIDOS EN EL TRATAMIENTO 3.

TORO BRAHMAN.

| NO. DE EYACULADO | PAJILLA | ESPERMATOZOIDES VIVOS/DOSIS | ESPERMATOZOIDES MUERTOS/DOSIS |
|---------------------|---------|--------------------------------|----------------------------------|
| 1 | 1 | 43 | 57 |
| 1 | 2 | 38 | 62 |
| 1 | 3 | 49 | 51 |
| 1 | 4 | 42 | 58 |
| 1 | 5 | 41 | 59 |
| 2 | 1 | 39 | 61 |
| 2 | 2 | 41 | 59 |
| 2 | 3 | 52 | 48 |
| 2 | 4 | 52 | 48 |
| 2 | 5 | 40 | 60 |
| 3 | 1 | 51 | 49 |
| 3 | 2 | 40 | 60 |
| 3 | 3 | 30 | 70 |
| 3 | 4 | 42 | 58 |
| 3 | 5 | 40 | 60 |
| 4 | 1 | 44 | 56 |
| 4 | 2 | 40 | 60 |
| 4 | 3 | 49 | 51 |
| 4 | 4 | 41 | 59 |
| 4 | 5 | 45 | 55 |
| 5 | 1 | 48 | 52 |
| 5 | 2 | 47 | 53 |
| 5 | 3 | 37 | 63 |
| 5 | 4 | 49 | 51 |
| 5 | 5 | 58 | 42 |

ANEXO 3

RESULTADOS OBTENIDOS EN EL TRATAMIENTO 3.

TORO INDOBRASIL.

| NO. DE EYACULADO | PAJILLA | ESPERMATOZOIDES VIVOS/DOSIS | ESPERMATOZOIDES MUERTOS/DOSIS |
|------------------|---------|-----------------------------|-------------------------------|
| 1 | 1 | 55 | 45 |
| 1 | 2 | 47 | 53 |
| 1 | 3 | 44 | 56 |
| 1 | 4 | 46 | 54 |
| 1 | 5 | 56 | 44 |
| 2 | 1 | 41 | 59 |
| 2 | 2 | 38 | 62 |
| 2 | 3 | 36 | 64 |
| 2 | 4 | 40 | 60 |
| 2 | 5 | 51 | 49 |
| 3 | 1 | 43 | 57 |
| 3 | 2 | 39 | 61 |
| 3 | 3 | 45 | 55 |
| 3 | 4 | 42 | 58 |
| 3 | 5 | 54 | 46 |
| 4 | 1 | 43 | 57 |
| 4 | 2 | 57 | 43 |
| 4 | 3 | 38 | 62 |
| 4 | 4 | 42 | 58 |
| 4 | 5 | 46 | 54 |
| 5 | 1 | 50 | 50 |
| 5 | 2 | 53 | 47 |
| 5 | 3 | 47 | 53 |
| 5 | 4 | 46 | 54 |
| 5 | 5 | 52 | 48 |

ANEXO 3

RESULTADOS OBTENIDOS EN EL TRATAMIENTO 3.

TORO SIMMENTAL.

| NO. DE EYACULADO | PAJILLA | ESPERMATOZOIDES VIVOS/DOSIS | ESPERMATOZOIDES MUERTOS/DOSIS |
|------------------|---------|-----------------------------|-------------------------------|
| 1 | 1 | 48 | 52 |
| 1 | 2 | 50 | 50 |
| 1 | 3 | 54 | 46 |
| 1 | 4 | 56 | 44 |
| 1 | 5 | 48 | 52 |
| 2 | 1 | 31 | 69 |
| 2 | 2 | 53 | 47 |
| 2 | 3 | 38 | 62 |
| 2 | 4 | 41 | 59 |
| 2 | 5 | 44 | 56 |
| 3 | 1 | 55 | 45 |
| 3 | 2 | 39 | 61 |
| 3 | 3 | 46 | 54 |
| 3 | 4 | 35 | 65 |
| 3 | 5 | 43 | 57 |
| 4 | 1 | 50 | 50 |
| 4 | 2 | 53 | 47 |
| 4 | 3 | 44 | 56 |
| 4 | 4 | 48 | 52 |
| 4 | 5 | 45 | 55 |
| 5 | 1 | 47 | 53 |
| 5 | 2 | 50 | 50 |
| 5 | 3 | 32 | 68 |
| 5 | 4 | 49 | 51 |
| 5 | 5 | 51 | 49 |