



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**COMPARACION DE DOS TECNICAS PARA LA
CONGELACION DE SEMEN CAPRINO
UTILIZANDO YEMA DE HUEVO**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A**

VICTOR MANUEL MARTINEZ TORRES



ASESORES:

**M. V. Z. VERONICA CABALLERO GUTIERREZ
M. V. Z. JOSE LUIS CERBON GUTIERREZ**

MEXICO, D. F.

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

**COMPARACIÓN DE DOS TÉCNICAS PARA LA CONGELACIÓN DE SEMEN CAPRINO
UTILIZANDO YEMA DE HUEVO.**

**Tesis presentada ante la
División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia**

de la

**Universidad Nacional Autónoma de México
para la obtención del título de
Médico Veterinario Zootecnista**

Por

Victor Manuel Martínez Torres

Asesores:

M.V.Z. Verónica Caballero Gutiérrez

M.V.Z. José Luis Cerbón Gutiérrez

México, D.F., 2001

AGRADECIMIENTOS

A los integrantes del jurado: Dr. Javier Valencia Méndez, M.V.Z. Julio Cervantes Morali, M.P.A. Juan Alberto Balcázar Sánchez, M.V.Z. Aldo Alberti Navarro y M.V.Z. Verónica Caballero Gutiérrez. Gracias por el tiempo que dedicaron a enriquecer con sus consejos éste trabajo.

A mis asesores: M.V.Z. Verónica Caballero Gutiérrez y M.V.Z. José Luis Cerbón Gutiérrez. Gracias por su confianza, su paciencia, sus enseñanzas y consejos, pero sobre todo por su amistad.

Al M.P.A. José Ramón Mier Ferreira t: Gracias por tus consejos y por tu amistad, a pesar de que ya no estás entre nosotros, te tenemos presente en cada trabajo que realizamos.

A Miguel Angel Cuevas Díaz y Malinalli Ledesma López, por que nunca me negaron su ayuda para la realización de éste trabajo, por ser tan grandes amigos.

A todo el personal del departamento de Reproducción de la F.M.V.Z.-U.N.A.M. Especialmente al Dr. Joel Hernández Cerón, por todo el apoyo proporcionado para la realización de éste trabajo y al Dr. Carlos Gutiérrez Aguilar, por su invaluable apoyo en la realización del análisis estadístico.

A todo el personal del rancho cuatro milpas de la F.M.V.Z.-U.N.A.M. Especialmente al M.P.A. Gerardo Serratos y al M.V.Z. Jose Luis Cerbón, por las facilidades para la realización de éste trabajo, al M.V.Z. Ernesto Valencia quien tuvo siempre la mejor disposición para ayudarme y a Sara, Eduardo y Benjamín, todos ellos médicos del rancho y que con su alegría hicieron mejor mi estancia en cuatro milpas.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

A las cabras: vivaces, traviesas, curiosas, trabajar con ustedes ha sido un honor.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
OBJETIVO.....	5
HIPÓTESIS.....	6
REVISIÓN DE LITERATURA.....	7
COLECCIÓN DE SEMEN.....	7
EVALUACIÓN DE SEMEN.....	8
VOLUMEN.....	9
COLOR.....	9
DENSIDAD.....	9
PH.....	9
OLOR.....	9
MOTILIDAD EN MASA O EN OLEADAS.....	10
MOTILIDAD INDIVIDUAL DE LOS ESPERMATOZOIDES.....	10
CONCENTRACIÓN DEL EYACULADO.....	11
PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES VIVOS/MUERTOS Y DE ANORMALIDADES ESPERMÁTICAS.....	12
TIPOS DE DILUYENTES PARA CONGELACIÓN DE SEMEN.....	13
AMORTIGUADORES ORGÁNICOS.....	13
AZÚCARES.....	14
CRIOPROTECTORES.....	15
CONGELACIÓN DE SEMEN.....	18
DESCONGELACIÓN DE SEMEN.....	21
MATERIAL Y MÉTODOS.....	22
COLECCIÓN Y MANEJO DEL SEMEN.....	22

EVALUACIÓN DEL SEMEN Y CÁLCULO DE DOSIS POR EYACULADO.....	22
COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CONGELACIÓN Y DESCRIPCIÓN DE LAS TÉCNICAS COMPARADAS.....	23
ENVASADO Y CONGELACIÓN DEL SEMEN.....	24
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	25
RESULTADOS.....	26
CUADRO 1 y CUADRO 2.....	27
CUADRO 3 Y CUADRO 4.....	28
DISCUSIÓN.....	29
CONCLUSIÓN.....	32
LITERATURA CITADA.....	33

RESUMEN

MARTÍNEZ TORRES VICTOR MANUEL. COMPARACIÓN DE DOS TÉCNICAS PARA LA CONGELACIÓN DE SEMEN CAPRINO UTILIZANDO YEMA DE HUEVO (Bajo la dirección de: M.V.Z. Verónica Caballero Gutiérrez y M.V.Z. José Luis Cerbón Gutiérrez).

Se utilizaron cinco sementales caprinos de las razas Alpino Francesa y Toggenbourg, de ellos se colectaron 36 eyaculados mediante la técnica de vagina artificial durante la época reproductiva. Cada eyaculado se evaluó macroscópica y microscópicamente y se dividió en partes iguales para congelarse mediante dos técnicas diferentes, la técnica A incluyó la inactivación de la yema de huevo por calor en baño María y la técnica B incluyó el lavado del semen mediante centrifugación, ambas técnicas utilizaron un diluyente conteniendo Tris, glucosa, ácido cítrico, glicerol y yema de huevo, envasando el semen en pajillas de 0.25 mililitros conteniendo por lo menos 100 millones de espermatozoides. Para la evaluación de la movilidad individual y del porcentaje de espermatozoides vivos postdescongelación, se utilizaron la mitad de las dosis congeladas mediante cada técnica (de un total de 684 pajillas), la descongelación de las pajillas se realizó en baño maría a 37° C por 15 segundos. Los resultados de movilidad individual y de porcentaje de espermatozoides vivos después de la descongelación se analizaron mediante un análisis de varianza utilizando el modelo de procedimientos lineales generales, encontrando diferencia estadísticamente significativa entre ambas técnicas ($p < 0.0001$), siendo superiores ambos valores para la técnica B (49.57% y 65.53% respectivamente) que para la técnica A (17.41% y 49.47% respectivamente). Concluyendo que, bajo las condiciones referidas, el utilizar la técnica que incluye el lavado del semen es mejor para congelar semen caprino.

INTRODUCCIÓN

La preservación de semen ha interesado a los ganaderos desde que se comenzó a utilizar la inseminación artificial. Con el gran aumento del uso de la inseminación artificial en el siglo veinte surgió la necesidad de preservar a los espermatozoides bajo condiciones artificiales durante largos períodos de tiempo, deteniendo su metabolismo y prolongando su vida fértil.¹⁻⁴ En 1776, Spallanzani realizó el primer intento por congelar semen; sin embargo fue hasta 1938 cuando Jahnel demostró que pueden encontrarse espermatozoides móviles después de 40 días de congelación profunda, utilizando hielo seco (-79° C) y nitrógeno líquido (-196° C).²

En los caprinos la inseminación artificial comenzó a desarrollarse alrededor de 1930, al mismo tiempo se investigaron métodos de congelación de semen, sin embargo, hasta la década de los sesentas y a pesar de que ya se describían técnicas para congelar semen caprino, ésta opción aún no se consideraba conveniente para la reproducción caprina con fines productivos.^{1,2,5} Actualmente, en los programas de inseminación artificial en pequeños rumiantes se utiliza tanto semen fresco diluido como semen congelado, presentando el primero ciertas limitantes como el uso de sementales que se encuentren en lugares alejados de las hembras siendo necesario desplazarlos, limitando así el número de hembras inseminadas, además el estrés del transporte disminuye el porcentaje de fertilidad.^{4,6} Por otra parte, el uso de semen congelado ofrece numerosas ventajas tales como: mejoramiento genético del rebaño utilizando semen de diferentes sementales,⁵ disminución del riesgo de diseminación de enfermedades de transmisión sexual, mayor aprovechamiento de los sementales,^{4,8} intercambio o transporte internacional de germoplasma, obtención de ingresos extra por la venta del semen, contar con semen viable en época no reproductiva.^{4,7} Aunque también presenta la desventaja de elevar costos y reducir la fertilidad.⁹ Esta reducción de la fertilidad se debe principalmente a la incapacidad de los procedimientos de congelación de semen para mantener la capacidad fertilizante del espermatozoide durante su tránsito por el cérvix,¹⁰ paso por el cual muchos espermatozoides son perdidos rápidamente.¹¹ Lo anterior disminuye directamente el número de espermatozoides que alcanzan el oviducto para garantizar la fertilización de los ovocitos.¹⁰ Con la implementación de la inseminación artificial

intrauterina por laparoscopia, la barrera natural que representaba el cérvix ha sido superada, ya que esta técnica permite el depósito directo del semen dentro del lumen uterino,^{3,4,12,13} con lo que ha dejado de ser limitado el uso comercial del semen congelado en los pequeños rumiantes.¹⁴

Para congelar el semen es necesario diluirlo. La dilución se realiza por razones técnicas y biológicas.¹⁵ Las razones técnicas se refieren a que una de las mayores ventajas de la inseminación artificial es que los sementales de gran valor puedan utilizarse para servir a muchas más hembras que por monta natural. En una monta natural, el macho cabrío deposita miles de millones de espermatozoides en la vagina de la cabra, sin embargo, de éste gran número sólo 100 ó 150 millones atraviesan el cérvix.^{3,4,8,15} En la inseminación artificial el semen se puede depositar vaginal, intracervical o intrauterinamente, por lo que el volumen de semen y su concentración pueden ser menores a los presentes en un eyaculado, por lo que al diluir el semen se expande su volumen, elaborando dosis de inseminación con concentraciones entre 100 y 150 millones de espermatozoides.³ Cuando se usa semen congelado, el límite normal más bajo para obtener tasas aceptables de concepción inseminando por vía transcervical es de al menos 60 millones de espermatozoides móviles por dosis y de 20 millones de espermatozoides móviles por dosis para el caso de la inseminación artificial intrauterina por laparoscopia.^{2,3,15} Estas concentraciones mínimas son importantes para mantener la fertilidad en programas de inseminación artificial con semen congelado. La principal razón biológica es que los diluyentes proporcionan nutrientes a los espermatozoides, amortiguan el pH y los conservan en un ambiente isotónico, además, protegen a los espermatozoides del choque térmico al ser sometidos a congelación.^{2,3,4,8,15,16,17}

Durante el desarrollo de diluyentes para semen de pequeños rumiantes se han utilizado diferentes ingredientes como amortiguadores sintéticos, azúcares, yema de huevo o sus fracciones, leche de varias fuentes, glicerol como crioprotector, etc. Estos ingredientes se han agrupado ya sea por su origen (naturales o sintéticos) o por su efecto sobre el semen (amortiguadores de pH, nutriente o ambos).^{2,3,9,16}

Desde que en 1939 se mostró el efecto benéfico de la yema de huevo en la preservación de semen, esta ha sido un componente común de los diluyentes de toro, equino, cerdo y carnero. Sin embargo, existen informes en los que el uso de la yema de huevo ha producido baja fertilidad en el

semen caprino después de descongelar, esto se debe a una enzima (fosfolipasa A) contenida en el plasma seminal del caprino, la cual causa la coagulación del medio de mantenimiento y provoca hidrólisis de las lecitinas de la yema de huevo produciendo ácidos grasos y lisolecitinas, las cuales resultan tóxicas para los espermatozoides.^{2,18-20} Este efecto adverso de la yema de huevo sobre el semen caprino puede disminuirse mediante la remoción del plasma seminal por centrifugación (lavado del semen), este lavado del semen no siempre es necesario pues la concentración de la enzima en el plasma seminal del caprino varía entre individuos y de acuerdo a la época del año,^{4,9,21-}
²⁸ también pueden inactivarse las lecitinas de la yema de huevo mediante el mantenimiento del medio de congelación en baño María a 56° C por 30 minutos y de esta forma destruir el sustrato de la enzima contenida en el plasma seminal evitando así su acción.¹⁶

OBJETIVO

Comparar dos técnicas de congelación de semen caprino, en una se realiza el lavado del semen y en la otra se inactiva la yema de huevo, para determinar con cual se obtienen mejores resultados de movilidad individual y de porcentaje de espermatozoides vivos al momento de descongelar el semen.

HIPÓTESIS

Durante el proceso de congelación, realizando el lavado de semen caprino se obtienen valores más altos de movilidad individual y de porcentaje de espermatozoides vivos al descongelar el semen, que cuando se realiza la inactivación de la yema de huevo incluida en el medio de congelación.

REVISIÓN DE LITERATURA

COLECCIÓN DE SEMEN

Para coleccionar semen es necesario contar con un área destinada específicamente para ese fin, de manera que los sementales sean condicionados al trabajo que van a realizar en ella.^{1,29}

Antes de realizar la colección de semen y una vez que el semental ha sido sujetado, se debe realizar una limpieza de la región abdominal cercana al prepucio. Se recomienda lavar el interior del prepucio con solución salina (0.9%) con el objeto de eliminar las impurezas acumuladas.¹

Existen principalmente dos técnicas que pueden ser usadas para coleccionar semen de pequeños rumiantes. El método principal y de elección es mediante el uso de una vagina artificial, y el segundo es mediante el uso de un electroeyaculador.^{1,4,8,15}

La vagina artificial es un instrumento que proporciona el estímulo térmico (temperatura) y mecánico (presión) necesarios para producir la eyaculación.^{4,15} La vagina artificial consiste de un tubo externo rígido aislante de 15 cm de largo por 5.5 cm de diámetro y de una funda interna de látex flexible que debe sobresalir 2 ó 3 cm del tubo externo con el fin de poderse plegar sobre éste y ser fijado con bandas de goma, de tal manera que se forma una cavidad donde depositar aire y agua entre 48 y 50° C a través de una válvula colocada en la pared del tubo externo de la vagina artificial; de ésta forma se obtiene una temperatura de entre 41 y 45° C en el interior de la vagina artificial.^{1,8,15} En uno de los extremos de la vagina artificial se conecta un cono colector de látex o de plástico que a su vez se conecta a un tubo o una copa coleccionadora graduada en mililitros, que debe ser protegida de los rayos solares y mantenida a una temperatura entre 37 y 38° C para evitar el choque térmico sobre los espermatozoides.¹⁵ No es recomendable obtener un segundo eyaculado del mismo macho con la misma copa o tubo coleccionador debido al efecto negativo del plasma seminal sobre la supervivencia de los espermatozoides caprinos *in vitro*, por lo que el semen debe ser procesado tan pronto como sea coleccionado.¹

La electroeyaculación resulta ser conveniente cuando los machos rechazan la vagina artificial, no pueden ser adiestrados a ella, o bien se encuentran imposibilitados para realizar la monta. El volumen del eyaculado obtenido mediante éste método es mayor que el obtenido por el método de vagina artificial, sin embargo, su concentración es menor.^{15,29} Este método consiste en

aplicar, por vía rectal, estímulos eléctricos sobre el piso de la pelvis. Dichos estímulos eléctricos son de 10 a 15 voltios de intensidad durante 3 a 8 segundos y se aplican con intervalos de 7 a 15 segundos con incrementos de un voltio. El animal debe encontrarse preferentemente en decúbito lateral y generalmente bajo tranquilización.²⁹ Con éste método se obtiene una eyaculación rápida con o sin erección del pene, obteniéndose de 8 a 10 gotas al principio y posteriormente más de 1 ml. El semen colectado por éste método puede ser contaminado con orina durante la colección y algunos machos pueden no responder a una segunda o tercera colección, además, la elevada cantidad de plasma seminal obtenida por éste método provoca una disminución de la resistencia del espermatozoide al choque por frío y un decremento en la tasa de supervivencia espermática postdescongelación.^{15, 29,30} Esta técnica ha sido empleada en el pasado con resultados variables, el semen que se obtiene mediante electroeyaculación tiene menor calidad que el semen obtenido mediante vagina artificial. Además, éste método de colección es doloroso para los sementales y debe ser evitado.³

EVALUACIÓN DE SEMEN

El objetivo de evaluar el semen es determinar la utilidad de un eyaculado o como predictor del valor reproductivo de un semental.^{1,17}

Los parámetros de evaluación de semen se encuentran sujetos a variaciones de acuerdo a la estación del año, la temperatura, la raza y el número de servicios, estos factores deben considerarse al evaluar a un semental para evitar calificarlo como insuficiente.^{1,4,19,31-33}

La evaluación del semen incluye parámetros macroscópicos y microscópicos, dentro de los macroscópicos se encuentran el volumen, el color, la densidad, el pH y el olor, mientras que en los microscópicos se encuentran la movilidad en masa o en oleadas, la movilidad individual, la concentración espermática, el porcentaje de espermatozoides vivos y de anomalías espermáticas.^{1,15,17,29,34}

Volumen

La medición del volumen del eyaculado se realiza directamente en el tubo colector utilizando las graduaciones del mismo. El rango de volumen normal para un eyaculado es de 0.8 a 1.5 ml pero varía entre cada eyaculado.^{1,15,29,34}

Color

El semen normal tiende a ser de un color blanco o amarillo pajizo, con una apariencia cremosa. El color puede ayudar a detectar anomalías como la presencia de orina (color amarillento), pus (color verdoso), o bien de sangre (color rosa a rojizo).^{15,29,34}

Densidad

La relación entre la parte celular y la plasmática es conocida como densidad, aspecto o consistencia y tiene relación con el color del eyaculado. Los colores cremosos generalmente presentan alta viscosidad y alta concentración espermática, y un color lechoso o con tono grisáceo indica baja concentración espermática. La densidad de un eyaculado se puede apreciar tomando una muestra de semen con una pipeta Pasteur y dejándola fluir sobre la pared de un tubo de ensaye, si la muestra no fluye con facilidad se considera viscosa.²⁹

pH

La determinación del pH de un eyaculado se realiza colocando una muestra del mismo sobre papel tornasol (o papel pH), el cual variará su color de acuerdo con el pH de la muestra. El pH normal del semen caprino es de 6.8, pero puede variar desde 5.9 hasta 7.3. Las alteraciones en el pH están relacionadas con las secreciones de las glándulas accesorias y con la contaminación del eyaculado con orina.^{15,29,34}

Olor

Se deben tomar en cuenta olores extraños que pueden ser resultado de infecciones o de la contaminación del eyaculado con orina.^{15,29,34}

Movilidad en masa o en oleadas

Es un parámetro fácil y rápido de obtener y requiere de observación microscópica del semen con un aumento de 10 x colocando una gota del semen en un portaobjetos tan pronto como este sea colectado, para obtener una buena apreciación del movimiento en masa del semen. La observación se debe realizar rápidamente puesto que el movimiento en masa del semen, a temperatura ambiente, disminuye rápidamente después de 15 a 20 segundos. Para evitar la influencia de la temperatura deben precalentarse los portaobjetos utilizados para esta determinación entre 37 y 38° C.^{1,15,29,34}

La evaluación se realiza tomando en cuenta una escala subjetiva desde cero hasta cinco, también puede usarse una escala en porcentaje desde cero hasta cien por ciento, correspondiendo los valores de la siguiente forma:¹

Calificación	Aspecto del movimiento.
0	Totalmente inmóvil.
1	Movimiento individual.
2	Movimiento muy lento.
3	Movimiento en oleada generalizado, ondas con amplitud lenta.
4	Movimiento en oleada rápido, sin remolinos.
5	Movimiento en oleada rápido, con remolinos.

Movilidad individual de los espermatozoides

Esta se determina utilizando una gota de semen colocada entre un portaobjetos y un cubreobjetos y examinándola en un microscopio.^{1,17} El aumento del microscopio debe ser de 200 x y el portaobjetos debe precalentarse a 37-38° C.^{1,15,29,34} Se realiza una apreciación visual del movimiento de los espermatozoides, se debe tomar en cuenta la velocidad del desplazamiento de los espermatozoides, la linealidad del desplazamiento y los movimientos laterales de los espermatozoides y se otorga una calificación al semen utilizando una escala que parte de cero hasta cinco, también puede usarse una escala en porcentaje desde cero hasta cien por ciento, correspondiendo los valores de la siguiente forma:¹

Calificación	Movilidad individual
0	Sin desplazamiento de los espermatozoides.
1	Desplazamiento muy lento o ausente, temblor del espermatozoide, oscilación de la cola.
2	Desplazamiento lento, temblor, movimientos desorganizados, algunos espermatozoides se mueven muy rápido.
3	Los espermatozoides presentan un movimiento curvilíneo sin temblores.
4	Desplazamiento rápido, algunos espermatozoides presentan trayectoria recta, otros presentan trayectoria circular.
5	Desplazamiento recto y rápido de los espermatozoides.

Las dos evaluaciones antes descritas, pueden ser suficientes para decidir si un eyaculado se descarta o no y, junto con la determinación de espermatozoides vivos / muertos y de anomalías espermáticas, son las mayormente utilizadas para la estimación de la supervivencia de los espermatozoides al ser descongelados. Sin embargo, aunque están relacionadas con la fertilidad, no son suficientes para predecir, con certeza, la fertilidad del semen evaluado.¹

Concentración del eyaculado

El propósito de esta medición es determinar el número de espermatozoides por mililitro de semen, usando la mínima cantidad de semen posible durante el proceso. La concentración de semen en el caprino generalmente varía de 2 a 6 mil millones de espermatozoides por mililitro. Existen diferentes métodos de medir la concentración de un eyaculado.^{1,15,29,34}

Apresiasión visual directa de la densidad de un eyaculado. Esta es una técnica que se practica en algunos centros de inseminación artificial. Sin embargo, debe evitarse pues no es confiable debido a que es de gran inexactitud por ser una apreciación subjetiva.¹

Conteo exacto de los espermatozoides en un hemocitómetro. Esta es una técnica precisa si se practica cuidadosamente. El principio de medición es el conteo del número exacto de espermatozoides presentes en un volumen determinado de solución con grado de dilución conocido.

Esta técnica es la más exacta para la determinación de la concentración espermática de cada eyaculado.^{1,15,29,34}

Midiendo la densidad óptica mediante el uso de un espectrofotómetro. Esta es la técnica más efectiva pues reúne rapidez y precisión. El principio general es medir la densidad óptica (a una longitud de onda de 550 nanómetros) de la solución salina con formol conteniendo los espermatozoides, y comparándola con un control sin espermatozoides. Antes de realizar la primera medición, es necesario calibrar el espectrofotómetro mediante la obtención de una curva estándar usando 20 ó 25 muestras de diferentes concentraciones conocidas de espermatozoides, previamente determinadas por medio de conteo en hemocitómetro.^{1,15}

Porcentaje de espermatozoides vivos / muertos y de anomalías espermáticas

Esta determinación, utilizando colorante eosina-nigrosina, es eficiente para determinar el porcentaje exacto de espermatozoides muertos y/o anormales. El porcentaje de espermatozoides anormales puede variar de acuerdo a la estación (o fotoperiodo), las temperaturas ambientales elevadas y el estado físico del semental.^{1,15,17,29,34}

Al realizar la evaluación de espermatozoides muertos y de anomalías espermáticas, es necesario diferenciar entre:

- Espermatozoides teñidos: cualquier espermatozoide teñido de rosa o rojo es un espermatozoide que estaba muerto al momento de realizar la tinción. Este conteo se usa para calcular el porcentaje de espermatozoides vivos / muertos.¹
- Espermatozoides anormales, clasificados de la siguiente forma:
 - Espermatozoides sin cola.
 - Espermatozoides con anomalías en la cabeza (acrosoma anormal, cabeza pequeña o angosta, cabeza alargada, etc.)
 - Espermatozoides con anomalías en la cola (cola corta, cola enroscada, etc.)
 - Espermatozoides con gota citoplasmática proximal.
 - Espermatozoides con gota citoplasmática distal.

Estas anomalías morfológicas de los espermatozoides pueden ser primarias o secundarias, las primarias se deben a fallas durante la espermatogénesis, en tanto que las secundarias ocurren durante el paso de los espermatozoides por el epidídimo.¹

El calcular éstos porcentajes permiten evaluar al animal correctamente y tomar decisiones sobre su uso en programas de inseminación artificial o congelación de semen.¹

La evaluación regular del semen permite detectar anomalías inesperadas o monitorear problemas en el animal que puedan causar daño en los espermatozoides.^{1,15,29,34}

TIPOS DE DILUYENTES PARA CONGELACIÓN DE SEMEN

Debido a que el plasma seminal, por sí solo, provee a los espermatozoides una limitada protección contra los cambios de temperatura, es necesario diluir el semen en medios especiales cuando se va a mantener a bajas temperaturas. Dichos diluyentes deben proveer energía, un pH adecuado y una buena capacidad amortiguadora, osmolaridad adecuada y deben proteger a los espermatozoides de los daños provocados por la congelación.^{2,3} A continuación se describen los ingredientes utilizados en los medios de congelación de semen caprino.

Amortiguadores orgánicos

Los amortiguadores orgánicos se comenzaron a utilizar en los diluyentes para la congelación de semen de toro en 1963, entre estos amortiguadores se encuentran el hidroximetil aminometano (Tris), el ácido N - Tris (hidroximetil) - amino etano sulfónico (Tes), el ácido N - 2 - hidroxietilpiperazina - N - 2 - etano sulfónico (Hepes) y el 3 - (N-morfolino) ácido propano sulfónico (Mops).^{2,3,4,16,17} Estos amortiguadores han demostrado tener mejor capacidad amortiguadora que el fosfato y el citrato.^{21,22,35-40}

Los amortiguadores antes mencionados han sido evaluados en la congelación de semen solos o combinados obteniendo resultados variados. El Tris ha sido el amortiguador orgánico más utilizado en la congelación de semen de bovino, porcino y equino, y se comenzó a utilizar en la congelación de semen de pequeños rumiantes alrededor de 1970.²³

Este tipo de amortiguadores actúa penetrando en la célula espermática, evitando cambios intracelulares de pH e incrementando la tolerancia de las células a un aumento intracelular de cationes monovalentes. Así mismo aumentan la tonicidad total del diluyente, lo cual es importante cuando el semen es congelado por periodos largos.^{2,3}

El Tris es el amortiguador orgánico más utilizado en la congelación de semen caprino y es con el que se han obtenido mejores resultados en cuanto a los parámetros de movilidad progresiva y de espermatozoides vivos al descongelar y ha sido usado junto con el ácido cítrico para mantener el pH del medio de congelación en un rango compatible con la vida de los espermatozoides (5.9 a 7.3).^{4,17,22,35,39-42} La combinación Tris - Tes (Test) parece mejorar los parámetros antes mencionados pero tiene el inconveniente de resultar inferior en términos de la preservación de la integridad acrosomal del espermatozoide.^{2,3}

Azúcares

Las investigaciones sobre el efecto de los azúcares sobre la fertilidad del semen congelado datan de la década de los cincuentas, cuando se desarrollaron diluyentes de semen utilizando lactosa, sacarosa, arabinosa, fructosa y glucosa; durante la década de los sesentas se utilizaron principalmente fructosa y glucosa en los medios de congelación de semen obteniendo resultados más favorables que con otros azúcares.^{2,3,4}

Los azúcares, cuando son incluidos en los medios de congelación de semen pueden actuar como fuente de energía, como reguladores de la presión osmótica del diluyente o de manera extracelular en el espermatozoide manteniendo la integridad de su membrana.^{2,3,17}

En la mayoría de las investigaciones se ha encontrado que la adición en los medios de congelación de los azúcares antes mencionados, principalmente la glucosa y la fructosa, resulta favorable para la recuperación de la movilidad individual de los espermatozoides al ser descongelados,^{2,3,4,17,21,36,43} esto se debe principalmente a que el aumento de la tonicidad del diluyente, al agregar los azúcares, compensa la disminución de la presión osmótica provocada por el glicerol, cuando éste es usado como crioprotector.^{23,17}

Crioprotectores

Existen diversos compuestos que han sido investigados y han demostrado tener la capacidad de proteger a los espermatozoides de los daños provocados por los procesos de congelación, entre estos compuestos se encuentran el glicerol, el sulfóxido de dimetilo (DMSO), el propilenglicol, la polivinil pirrolidona (PVP), el hidroxietil almidón (HES)⁴⁴⁻⁴⁷ y la yema de huevo; también se ha incluido albúmina en los medios de congelación, pero no ha resultado benéfica para la recuperación de los espermatozoides al descongelar el semen ni para la fertilidad, la albúmina de suero bovino y el suero fetal bovino parecen tener cierto efecto crioprotector pero ningún ingrediente ofrece la protección que ofrecen el glicerol y la yema de huevo, los cuales en diferentes concentraciones, han sido los crioprotectores más usados en la congelación de semen de pequeños rumiantes.^{2,3,4,17}

Uno de los primeros informes del uso de crioprotectores fue hecho por Bernstein y Petropavlovsky en 1937, quienes utilizaron exitosamente una solución con glicerol para congelar espermatozoides de mamífero y aves. Sin embargo, la acción crioprotectora del glicerol fue más ampliamente estudiada en 1949 por Polge et al, quien congeló a -79°C espermatozoides de gallo y posteriormente por Smith y Polge en 1950 quienes congelaron exitosamente espermatozoides de toro y caprino.^{2,3}

El glicerol, que tiene la capacidad de penetrar en las células, es el crioprotector más ampliamente usado en la congelación de semen.^{2,3,4,17,18,45-48} Su efecto crioprotector se atribuye a su propiedad coligativa o ligadora del agua. El glicerol también actúa como diluyente y al disminuir el grado de disociación de sales, provoca una disminución en la presión osmótica del medio de congelación. Para compensar este efecto hipotónico se ha optado por aumentar la concentración de los componentes del diluyente, como es el caso de los azúcares.^{2,18} La actividad osmótica del glicerol se debe a su habilidad de penetrar en el espermatozoide, lo cual también le permite impedir la formación de cristales de hielo intracelulares.^{2,3,17,48}

El glicerol puede añadirse al semen en uno o varios pasos. En el primer caso, el diluyente glicerolado se agrega en la dilución final a 30°C y después se enfría el semen hasta 5°C en 1.5 - 2.5 horas.^{2,15,30} En el segundo caso, el diluyente no glicerolado se añade a una temperatura entre 29 y

37° C, posteriormente se enfría el semen hasta 5° C en 1.5 - 2.5 horas, para después agregar la fracción glicerolada del diluyente, esta adición puede realizarse en un solo paso, en tres partes agregadas con intervalos de 15 minutos o hasta en cuatro pasos en 20 minutos.^{2,3,4,15,30} Para el semen caprino el método de dos pasos no ofrece ventajas sobre el de un sólo paso, por ello se prefiere éste por su simplicidad y menor manejo del semen antes de la congelación.^{2,3,4,15,27,30}

El semen y el glicerol requieren de un periodo de equilibrio, el cual es el tiempo total que pasa el semen en contacto con el glicerol antes de ser congelado, durante el cual penetra en los espermatozoides estableciéndose un equilibrio entre la concentración intra y extracelular. Este periodo comienza, en el método de un solo paso desde los 30° C y en el de dos o más pasos cuando el semen diluido alcanza los 5° C.^{2,3,4,30} En general, aunque se han usado tiempos de equilibrio hasta de 16 horas, la mayoría de los trabajos muestran que un periodo de equilibrio de 1.5 a 2.5 horas es recomendable.^{2,3,4,30,46}

Desde que en 1939 se mostró el efecto benéfico de la yema de huevo en la preservación de semen, ésta ha sido un componente común de los diluyentes de semen de bovino, equino, porcino, ovino y caprino. Esto se debe a la protección que proporciona a los espermatozoides durante el enfriamiento cercano a los cero grados, durante la congelación y durante la descongelación.^{2,3,4,17,18} La yema de huevo preserva la movilidad, así como la integridad de las membranas acrosomales y mitocondriales de los espermatozoides.² También es un amortiguador osmótico, pues en su presencia los espermatozoides son más tolerantes tanto a diluyentes hipotónicos como hipertónicos.² Se ha sugerido que la yema de huevo protege al adherirse a la membrana plasmática de los espermatozoides.^{2,3,18} La protección dada por la yema de huevo se atribuye a su fracción lipoprotéica de baja densidad.^{2,3}

A pesar de la protección que aporta la yema de huevo, hay informes en los que su uso en el medio de congelación de semen caprino, ha producido baja recuperación espermática al descongelar el semen y baja fertilidad.^{4,19,20,23,30,49} Este efecto adverso fue descrito en 1957 por Roy, quién lo describió como la extinción de la vida espermática en el medio con yema de huevo que siempre era precedida por la coagulación del medio de mantenimiento.²⁰ Esta coagulación se produce por una enzima contenida en el plasma seminal del caprino que es producida en las glándulas bulbouretrales

y se conoce como "enzima coaguladora de la yema de huevo" o fosfolipasa A, y es una glicoproteína de 60 kDa con actividad lipasa.^{4,20,23,30,49} Ésta actividad enzimática causa la hidrólisis de las lecitinas de la yema de huevo produciendo ácidos grasos y lisolecitinas, las cuales resultan tóxicas para los espermatozoides, trayendo como consecuencia un decremento del porcentaje de espermatozoides móviles, deterioro de la calidad del movimiento de los espermatozoides, ruptura acrosomal y muerte celular de los espermatozoides de caprino diluidos en medios con yema de huevo.^{4,19,20,49} o leche, pues dicha enzima se activa en presencia de calcio.²³

Existen diversas alternativas para evitar la manifestación de ésta reacción enzimática, como el realizar pruebas de coagulación de la yema de huevo poniéndola en contacto con semen íntegro de diferentes sementales y escogiendo para congelación solo aquellos cuyo semen no induzca la coagulación de la yema de huevo.^{4,21,26,28} Otra opción es inactivar la yema de huevo sometiéndola a calor y de esta forma destruir el sustrato de la enzima, evitando así su acción.¹⁶ La alternativa más investigada es el lavado del semen mediante la centrifugación, con lo cual se retira el plasma seminal y junto con él se retira también la enzima responsable de la coagulación de la yema de huevo.^{1,4,9,19,20,22,23,30} El lavado de semen ha demostrado resultar benéfico para la viabilidad de los espermatozoides al descongelar el semen congelado utilizando cualquier diluyente, y permite la inclusión de la yema de huevo en altas concentraciones (20 %).^{4,19,20,23-26} Existe controversia en relación con el beneficio que aporta el lavado del semen, pues se dice que los efectos adversos que se producen al agregar yema de huevo en el medio de congelación pueden evitarse disminuyendo su concentración a 2 y hasta 1.5 %³⁰ y de ésta forma conservar la protección que provee el plasma seminal y evitar el daño celular sobre los espermatozoides,^{4,23} que se hace evidente cuando se miden enzimas indicadoras de dicho daño como la transaminasa glutámico oxaloacética (TGO).^{27,30} Sin embargo, se ha insistido en la necesidad de realizar el lavado del semen para mejorar la viabilidad de los espermatozoides al ser descongelados.^{4,19,20,23,24,26,27,30} La alternativa mas recientemente investigada consiste en agregar al diluyente sustancias que inhiban específicamente la acción de la enzima contenida en el plasma seminal, y de esta forma evitar los efectos adversos que pueda tener el lavado del semen sobre los espermatozoides, sin embargo, esta opción aún requiere mayor investigación.²³

CONGELACIÓN DE SEMEN

Los estudios del efecto de las temperaturas sub-cero sobre la viabilidad de los espermatozoides datan desde 1776, cuando Spallanzani colocó bajo la nieve viales conteniendo semen de mamífero, y después de exponerlos a temperatura ambiente observó espermatozoides móviles.²

El fundamento de conservar el semen es prolongar la capacidad de fertilización de los espermatozoides, al reducir o detener su movimiento y reacciones metabólicas. El semen caprino, al igual que el de toro y ovino, se puede conservar en estado líquido o congelado.^{2,3,15,17}

La conservación en estado líquido depende de la reducción reversible de la movilidad y actividad metabólica de los espermatozoides a temperaturas reducidas (5 ó 15° C) o en dióxido de carbono. En cualquiera de los dos casos, la vida de los espermatozoides se puede prolongar durante varios días.^{1,3,4,15}

La conservación del semen en estado líquido durante corto tiempo consiste en enfriar el semen desde 30° C hasta 15° C o más frecuentemente a 5° C, manteniéndolo en esta temperatura hasta el momento de utilizarlo.^{1,3,15}

El semen debe ser envasado previo a su enfriamiento.¹ El enfriamiento puede realizarse en un refrigerador a 5° C o en termos o cualquier recipiente aislado que contenga hielo o agua fría. Si se usa un refrigerador, los envases que contengan el semen deben colocarse primero en un recipiente que contenga agua a 30° C y posteriormente colocarlos en el refrigerador. El ritmo de enfriamiento debe regularse por el tamaño del recipiente y la cantidad de agua que rodea al semen.^{1,15}

El enfriamiento del semen a 15° C se hace entre 1 y 1.5 h y el enfriamiento a 5° C se hace entre 2 y 3 h, debiendo ser gradual el descenso de temperatura. Se debe poner especial atención para evitar un descenso rápido desde 18 a 5° C ya que en este margen de temperatura los espermatozoides son especialmente sensibles al choque por frío.^{1,15} Cuando se conserva a 5° C también es importante que el semen se mantenga precisamente a esa temperatura, durante todo el tiempo que dure su almacenaje.^{3,15}

La viabilidad de los espermatozoides es mas corta a 15° C que a 5° C, pero lo suficientemente prolongada para permitir el transporte del semen.^{3,15}

Cuando se insemina con semen conservado a bajas temperaturas, no es necesario el calentamiento del mismo ya que esto sucederá tan pronto se le introduzca en el aparato genital de la hembra. El tiempo de conservación durante el cual se obtienen los mejores resultados en la inseminación artificial en caprinos, al utilizar esta técnica de conservación es de 6 a 12 horas, pero el semen puede permanecer viable hasta 48 horas. Sin embargo cuando se utiliza la inseminación artificial intrauterina con la ayuda de un laparoscopio, el semen caprino puede ser fértil hasta 6 días después de haber sido sometido a conservación a bajas temperaturas.¹⁵

Cuando el semen se congela en nitrógeno líquido a -196°C , las reacciones metabólicas de los espermatozoides quedan detenidas. Esto hace que el semen se pueda conservar durante mucho tiempo con lo que se pueden conservar genes para uso futuro y se asegure la disponibilidad de un semental en particular.^{15,30} De esta forma también se facilita el transporte de semen, tanto nacional como internacionalmente, y el semen puede ser colectado y conservado en épocas distintas a la estación reproductiva. En consecuencia, la utilización de los sementales se amplía considerablemente al congelar y conservar el semen.^{15,30}

El semen se puede congelar tanto lentamente como muy rápido en vapores de nitrógeno líquido variando la altura del semen sobre la superficie del nitrógeno o en bloques de hielo seco (dióxido de carbono sólido a -79°C).^{1,3,30} Cuando se utilizan los dos primeros métodos el semen se congela generalmente en pajillas de plástico, mientras que cuando se utiliza hielo seco, se deposita el semen en las oquedades de un bloque de hielo seco o en una placa especial enfriada en nitrógeno líquido. Independientemente de la forma de congelación, el semen se transfiere, después, a tanques de nitrógeno líquido para su conservación.^{1,3,15,17,30}

El método de congelación en pastillas o pellets tiene la ventaja de ser muy simple, los pellets congelados son fáciles de manejar y tienen buena recuperación de las características de los espermatozoides después de descongelar.^{15,34} Sin embargo, los pellets son más difíciles de identificar que las pajillas, que pueden ser de coloración variable y además llevar estampada su identificación. Otro inconveniente de los pellets es que el semen, al carecer de protección, puede contaminarse fácilmente, durante la congelación y conservación.^{15,34} Las pajillas requieren menor espacio de almacenamiento, tienen mejores características de congelamiento y pueden ser llenadas,

etiquetadas y selladas de manera automática. Además, la pérdida de espermatozoides durante el manejo para la inseminación es mínima.^{1,3,4,15,17,30}

Para congelarse, el semen diluido se debe enfriar a 5° C en 1.5 – 2 horas, este periodo de enfriamiento es más corto que el que se precisa para conservar en semen líquido puesto que el glicerol, que se incluye en los medios de congelación, proporciona una protección contra los peligros de lesión de la membrana por el frío.^{1,15,30}

Para congelar el semen, por el método de pellets, se requiere un bloque de hielo seco, en cuya superficie se realizan agujeros para colocar el semen utilizando una placa metálica especial, la cual se esteriliza con alcohol. Para congelar el semen, una vez enfriado a 5° C, éste debe mantenerse a 5° C colocando los recipientes que lo contengan en agua enfriada o de hielo. Para la congelación se deben pipetear volúmenes de 0.1 – 0.3 ml (3 a 8 gotas) de semen, mediante succión rápida, en los agujeros de la superficie de hielo seco, dejándolo allí durante 2 – 3 minutos, para luego transferirlo a nitrógeno líquido. Es importante que las pipetas utilizadas sean mantenidas frías.^{1,3,15,30}

Para la congelación de semen en pajillas que contengan semen que ha sido diluido en un solo paso, éstas se deben enfriar a 5° C en 1.5 – 2 horas y luego se congelan.^{1,30} El semen diluido en dos etapas se coloca en pajillas, después de enfriadas a 5° C y después de haber hecho la segunda dilución, se mantienen a esa temperatura durante 1 – 1.5 horas, para que exista equilibrio entre el semen y el glicerol, y luego se congelan.^{3,4,15,17}

Para ser congeladas, las pajillas se colocan horizontalmente en una gradilla fría (5° C), que se expone a los vapores de nitrógeno líquido (-75 a -100° C), 3 - 5 cm por encima de su superficie. Transcurridos 8 – 10 minutos las pajillas con el semen congelado, se introducen en nitrógeno líquido (-196° C).^{1,3,15,30}

En términos de calidad espermática después de congelar y descongelar, tanto la congelación en pellets como la congelación en pajillas, dan los mismos resultados. La congelación en pellets es más barata y más rápida que la congelación en pajillas, sin embargo, su almacenamiento y descongelación son más difíciles.^{1,15,30}

DESCONGELACIÓN DEL SEMEN.

Durante la descongelación del semen la fase de calentamiento es tan importante para la supervivencia de los espermatozoides como la fase de enfriamiento. Los espermatozoides que sobrevivieron la congelación a -196°C aún deben superar el ser calentados y descongelados, y así habrán atravesado dos veces la zona crítica de temperatura (-15 a -60°C).^{2,3,15,17,18,30}

Tanto la velocidad de enfriamiento como la de descongelación ejercen un efecto sobre la supervivencia de los espermatozoides. Este efecto depende de que la tasa de enfriamiento haya sido lo suficientemente rápida para inducir congelación intracelular, o lo suficientemente lenta para producir deshidratación celular. En el primer caso, se requiere de descongelación rápida para prevenir la recristalización de cualquier hielo intracelular presente en el espermatozoide. Los espermatozoides descongelados rápidamente también son expuestos, por un periodo corto de tiempo, a las concentraciones de solutos y del crioprotector (glicerol) y la restauración del equilibrio intra y extracelular es más rápida que al ser descongelados lentamente.^{2,3,17,18}

El semen congelado en pellets se puede descongelar en seco o utilizando una solución de descongelación, la cual puede ser solución salina fisiológica o una solución generalmente compuesta por un azúcar, ácido cítrico y yema de huevo. El descongelamiento en seco consiste en colocar uno o varios pellets directamente en un tubo de vidrio seco sumergido en baño María a 37°C . El no usar solución de descongelación ofrece buenos resultados de movilidad al descongelar, evita una mayor dilución del semen y evita el introducir algún artificio por la composición de la misma solución.^{2,3,4,15,17,30}

La descongelación del semen congelado en pajillas se consigue sumergiéndolas en agua a 37°C durante 15 ó 20 segundos. La descongelación rápida consiste en colocar las pajillas a temperaturas más elevadas ($55 - 60^{\circ}\text{C}$) durante menor tiempo (8 segundos). Al comparar la descongelación lenta con la rápida no se han obtenido diferencias en la recuperación de la movilidad espermática y el daño acrosomal es mayor en la rápida. La descongelación rápida requiere mantener el agua a 60°C , lo que es muy difícil obtener en el campo y existe el riesgo de dañar a los espermatozoides si se mantiene el semen más tiempo que el indicado a esa temperatura, por lo que para fines prácticos, es mejor descongelar a 37°C .^{2,3,4,15,17,30,50}

MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó durante la época reproductiva, en los meses de octubre a diciembre, en las instalaciones del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Bovina y Caprina "Rancho Cuatro Milpas" y en del Departamento de Reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. El rancho cuatro milpas se localiza en el kilómetro 44.5 de la autopista México-Querétaro, Av. del trabajo s/n, Tepetzotlán, Estado de México, en las siguientes coordenadas: 19 grados 43 minutos latitud norte y 94 grados 14 minutos longitud oeste. Presenta un clima del tipo C (wo) (w) b (i') que equivale al clima templado subhúmedo con lluvias en verano (de 400 a 610 mm), con una temperatura promedio entre 14 y 18° C y con vientos dominantes de norte a sur y de este a oeste.⁵¹

COLECCIÓN Y MANEJO DEL SEMEN

Se utilizaron 5 sementales caprinos adultos, 3 de ellos de la raza Alpino Francesa y dos de la raza Toggenbourg, de ellos se obtuvo un total de 36 eyaculados, con un intervalo entre colecciones de al menos 2 días, de los cuales se congelaron 684 dosis de semen en pajillas de 0.25 ml.

Los sementales utilizados se mantuvieron en sementaleras individuales, se encontraban en un rango de edad de 1.5 a 2.5 años y en un rango de condición corporal de 3.5 a 4.

La colección del semen se realizó con la ayuda de una vagina artificial. Después de colectado, el semen se colocó en baño María a 37° C.

EVALUACIÓN DEL SEMEN Y CÁLCULO DE DOSIS POR EYACULADO

La evaluación del semen incluyó tanto las características macroscópicas como las características microscópicas. La evaluación macroscópica abarcó color y volumen, los cuales fueron evaluados directamente en el tubo colector. La evaluación microscópica incluyó la movilidad en masa y la movilidad individual, así como la concentración del eyaculado y el porcentaje de espermatozoides vivos. Para evaluar la movilidad en masa se tomó una muestra del semen con una pipeta Pasteur y se colocó en un portaobjetos para su observación en un microscopio óptico. Para evaluar la movilidad individual se siguió el mismo procedimiento, pero se colocó, además, un cubreobjetos. La determinación de la concentración espermática se realizó mediante el uso de un

hemocitómetro y la determinación del porcentaje de espermatozoides vivos por medio de la realización de un frotis utilizando la tinción eosina-nigrosina.¹⁵ Las pipetas, los portaobjetos y los cubreobjetos utilizados para la evaluación se mantuvieron a la misma temperatura del semen para evitar la influencia de la temperatura en las características del mismo durante la evaluación.

Por cuestiones prácticas, la evaluación completa de los eyaculados de cada semental se realizó cada 15 días, la evaluación de rutina de los eyaculados sólo incluyó la movilidad en masa, la movilidad individual y el porcentaje de espermatozoides vivos.

No se utilizó ningún eyaculado que presentara una movilidad individual menor a 70% ni con menos de 80% de espermatozoides vivos.

Para obtener el número de dosis de semen por eyaculado se siguió el siguiente procedimiento:

$$N = \frac{(C)(V)(M)}{H}$$

H

Donde: N = número de dosis a preparar; C = concentración del eyaculado; V = volumen del eyaculado ml; M = movilidad en masa en porcentaje; H = concentración requerida de espermatozoides por dosis.⁹

COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CONGELACIÓN Y DESCRIPCIÓN DE LAS TÉCNICAS COMPARADAS

El medio de congelación fue igual para ambas técnicas con los siguientes componentes:

Glucosa	1.89	gramos
Ácido cítrico	1.48	gramos
TRIS	3.60	gramos
Glicerol	6	mililitros (6 %)
Yema de huevo	20	mililitros (20 %)
Agua tridestilada	c.b.p. 100	mililitros. ^{3,4,16,50}

Una vez evaluado, cada eyaculado se dividió en dos partes iguales, cada una de las cuales se procesó con una de las técnicas comparadas en el presente trabajo y que se describen a continuación, de manera que cada eyaculado se procesó mediante las dos técnicas.

Técnica A

Inactivación de la yema de huevo.

Una vez disueltos los componentes del medio de congelación en el agua tridestilada, se realizó la inactivación de la yema de huevo colocando el medio de congelación en baño María a 56° C durante 30 minutos, para posteriormente mantenerlo a 37° C por al menos 30 minutos antes de diluir el semen.¹⁶

Dilución del semen.

Se realizó una dilución única utilizando el volumen necesario de diluyente obtenido del cálculo de dosis por eyaculado, para tener una concentración de 100 millones de espermatozoides por dosis.

Técnica B

Dilución inicial y lavado del semen.

El semen fue diluido a un factor de 1:20 (semen : diluyente) con el medio de congelación a 37° C, sin glicerol y sin yema de huevo, para su centrifugación a 900 gravedades por 10 minutos, posteriormente, se extrajo el sobrenadante utilizando una pipeta Pasteur estéril.^{4,19,21,26}

Dilución final del semen.

El semen se resuspendió, inmediatamente después de extraer el sobrenadante, con el medio de congelación completo a 37° C,⁴ al volumen necesario obtenido del calculo de dosis por eyaculado, para tener una concentración de 100 millones de espermatozoides por dosis.

ENVASADO Y CONGELACIÓN DEL SEMEN (TÉCNICAS A Y B)

Después de diluir el semen, se colocaron los tubos que lo contenían en un vaso de precipitados con agua a 37° C, el cual se colocó en el interior de un refrigerador para su enfriamiento a 5° C en un transcurso de 2.5 horas (periodo de equilibrio).^{3,6,7,28,30,40,50}

Posteriormente, el semen se envasó en pajillas estériles de 0.25 mililitros identificadas con el número y raza del semental y con la técnica empleada para la congelación, las cuales fueron selladas con alcohol polivinílico. Posteriormente, se vació nitrógeno líquido en una caja de poliestireno y se expuso a las pajillas a los vapores del nitrógeno (-75°C) colocándolas en posición horizontal a 5 cm sobre el nivel del mismo durante 10 min. Posteriormente se sumergieron en el nitrógeno líquido para su congelación a -196°C y conservarlas en ese estado durante al menos 15 días.^{30,50}

Para la evaluación de las dosis de semen congelado, se tomaron la mitad de las dosis de cada eyaculado preparadas con cada una de las técnicas (385 pajillas en total). La descongelación del semen se realizó en baño María a 37°C por 15 segundos y se evaluó la movilidad individual y el porcentaje de espermatozoides vivos mediante los procedimientos descritos anteriormente.^{4,15,17} Las evaluaciones tanto previas como posteriores a la congelación fueron realizadas por la misma persona.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza utilizando el procedimiento de modelos lineales generales (PROC GLM) del paquete estadístico SAS (SAS/STAT, 1991), en donde se tomaron la movilidad individual y el porcentaje de espermatozoides vivos como variables dependientes y transformando los valores expresados en porcentaje al arcoseno.^{16,50,52}

RESULTADOS

En el cuadro 1 se presenta el promedio de la movilidad en masa en porcentaje obtenida en los eyaculados evaluados de los diferentes sementales, teniendo como mínimo 81.25 % de movilidad.

En el cuadro 2 se presenta el promedio de la movilidad individual en porcentaje y el porcentaje de espermatozoides vivos obtenido en los eyaculados evaluados de los diferentes sementales, previo a la congelación

En el cuadro 3 se presentan los porcentajes de la movilidad individual al descongelar para cada técnica. Después de transformar al arcoseno los porcentajes de la movilidad individual al descongelar, se encontró diferencia significativa entre las técnicas comparadas, siendo mayor la movilidad del semen congelado mediante la técnica B en la que se realizó el lavado del semen.

En el cuadro 4 se presentan los porcentajes de espermatozoides vivos al descongelar para cada técnica. Después de transformar al arcoseno los porcentajes de espermatozoides vivos al descongelar, se encontró diferencia significativa entre las técnicas comparadas, siendo mayor el porcentaje de espermatozoides vivos del semen congelado mediante la técnica B en la que se realizó el lavado del semen.

CUADRO 1. Movilidad en masa y concentración espermática de los diferentes eyaculados evaluados, previo a la congelación.

NUMERO DE SEMENTAL	NUMERO DE EYACULADOS	CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA PROMEDIO / EYACULADO (miles de millones / ml)	PORCENTAJE DE LA MOVILIDAD EN MASA
1	10	3.59522	82.22
2	7	3.78428	81.42
3	8	2.70928	82.14
4	4	2.86500	81.25
5	7	3.08500	82.14

CUADRO 2. Movilidad individual y porcentaje de espermatozoides vivos de los diferentes eyaculados evaluados, previo a la congelación.

NUMERO DE SEMENTAL	NUMERO DE EYACULADOS	PORCENTAJE DE LA MOVILIDAD INDIVIDUAL	PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES VIVOS
1	10	85.82	89.64
2	7	87.85	88.85
3	8	88.12	87.87
4	4	88.75	88.50
5	7	87.85	88.57

CUADRO 3. Porcentaje de la movilidad individual al descongelar.

	TÉCNICA A (INACTIVACIÓN DE LA YEMA DE HUEVO)	TÉCNICA B (LAVADO DEL SEMEN)
MOVILIDAD INDIVIDUAL %	17.41a	49.57b

*Diferente literal indica diferencia significativa (P 0.0001).

CUADRO 4. Porcentaje de espermatozoides vivos al descongelar.

	TÉCNICA A (INACTIVACIÓN DE LA YEMA DE HUEVO)	TÉCNICA B (LAVADO DEL SEMEN)
ESPERMATOZOIDES VIVOS %	49.47a	65.53b

*Diferente literal indica diferencia significativa (P 0.0001).

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se obtuvieron mejores resultados de movilidad individual (M.I.) al descongelar el semen congelado mediante la técnica B que incluyó el lavado de semen (49.57 % M.I.), que al descongelar el semen congelado mediante la técnica A que incluyó la inactivación de la yema de huevo (17.41 % M.I.), estos resultados concuerdan con los obtenidos por Ritar y Salamon en 1982 (48.7% M.I.)²⁶ y en 1991 (35 % M.I.),¹⁹ Sinha et al en 1992 (46 - 52 % M.I.),⁴⁶ Misra et al en 1993 quien obtuvo 80 % M.I. en semen lavado mantenido a 5° C,²⁵ Singh M.P. et al en 1995 (51.8 % M.I.),⁴⁸ Dutta et al en 1996 (45.53 % M.I.),⁵³ Singh L.P. y Purbey en 1996 (38.7 - 52.9 % M.I.)⁴² y Karatzas et al en 1997 (60 % M.I.),³³ en dichos trabajos se comparó el efecto de lavar o no lavar el semen sobre el parámetro de movilidad individual, obteniendo mejores resultados cuando el semen se sometió al proceso de lavado, en los trabajos citados se utilizaron técnicas de congelación similares a la utilizada en el presente estudio, variando en ocasiones el tipo de azúcar utilizado en el medio de congelación y el periodo de equilibrio del semen con el glicerol, lo cual puede ser la causa de las variaciones en los resultados, exceptuando el trabajo de Misra et al en 1993 en el que los resultados fueron notablemente superiores a los obtenidos en el presente estudio, sin embargo, esto puede deberse a que en dicho trabajo el semen no fue sometido a un proceso de congelación profunda que pudiera disminuir drásticamente las características del mismo. En cuanto al parámetro de espermatozoides vivos al descongelar (E.V.), en el presente estudio este parámetro fue superior para el semen congelado mediante la técnica B (65.53 % E.V.), que para el semen congelado mediante la técnica A (49.47 %), lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Singh M.P. et al en 1995 (56.7 % E.V.),⁴⁸ Dutta en 1996 (43.01 % E.V.)⁵³ y Singh L.P. y Purbey en 1996 (50.8 - 63.6 % E.V.),⁴² quienes concluyeron que el realizar el lavado del semen resulta benéfico para el parámetro de espermatozoides vivos al descongelar.

Existen informes en los que se obtuvieron mejores resultados en semen caprino congelado con medios conteniendo yema de huevo sin realizar el lavado del semen que realizando éste procedimiento, tal es el caso de los trabajos de Deka y Rao en 1985 (68 % M.I.),²² Tuli y Holtz en 1992 (43.75 % M.I.)³⁵ y Tuli y Holtz en 1994 (45.5 % M.I.),²⁷ incluso en éste último trabajo, el efecto del lavado además de resultar desfavorable para la movilidad individual al descongelar el semen, aumentó la liberación de la transaminasa glutámico oxaloacética, la cual es una enzima indicadora

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

de daño celular. A pesar de que en los trabajos anteriores la yema de huevo no parece tener efecto negativo sobre la movilidad individual, los resultados de espermatozoides vivos en los trabajos de Tuli y Holtz en 1992 (49.30% E.V.),³⁵ y en 1994 (47.6% E.V.), resultaron inferiores a los obtenidos por medio de la técnica B del presente estudio (65.53 % E.V.), por lo que es posible afirmar que el lavado del semen contribuye a preservar dicho parámetro. Sin embargo, Roca en 1997⁵⁴ comparó la recuperación de la movilidad individual del semen caprino congelado lavado y no lavado, obteniendo resultados sobresalientes (80% M.I. y 90% E.V. en semen lavado y 78% M.I. y 90% E.V. en semen no lavado), sin encontrar diferencia significativa entre ambos procedimientos, pero esto puede deberse a que en dicho trabajo las concentraciones de la yema de huevo fueron variadas de acuerdo a la técnica utilizada para la congelación del semen y así poder disminuir el efecto de la fosfolipasa A del plasma seminal del caprino, al reducir la concentración de la yema de huevo a 2 % en el medio de congelación utilizado cuando el semen no fue lavado y aumentándola a 12 % cuando el semen fue sometido a lavado. Otros trabajos, como el de Valencia et al en 1994,⁵⁰ donde se obtuvo una movilidad individual de 59% al descongelar, no incluyen el lavado del semen caprino pero buscan una alternativa para destruir las micelas de los lípidos de la yema de huevo al utilizar un detergente, (Orvus ES paste, Proctec and Gamble), el fundamento del uso de dicho detergente era que facilitaba una interacción más eficiente de los lípidos de la yema de huevo con la membrana del espermatozoide, sin embargo esto ha sido descartado recientemente al no ser consistente a lo largo de diversos estudios realizados en diferentes especies y al haberse encontrado que éste detergente solubiliza en exceso los lípidos de la yema de huevo que confieren protección a las membranas espermáticas, resultando en un efecto negativo sobre los espermatozoides.¹⁷ Otra opción para evitar el efecto de la fosfolipasa A del plasma seminal del caprino y del lavado del semen es la utilizada por Salamon y Ritar en 1982 (40% M.I.)²¹ donde previo a la congelación, realizan pruebas de coagulación de la yema de huevo al poner en contacto semen caprino íntegro con una solución conteniendo yema de huevo y solo utilizan para congelación a los sementales cuyo semen no haya inducido la coagulación de la solución con yema de huevo, sin embargo, a pesar de la seguridad que brinda, esta opción no puede considerarse conveniente en explotaciones donde se cuenta con un número limitado de sementales para la realización de programas reproductivos, ni cuando es necesario congelar semen de un semental de alto valor genético cuyo semen induzca la

coagulación de la yema de huevo. Durante el presente estudio, en la técnica A, se pretendió disminuir el efecto de la fosfolipasa A del plasma seminal del caprino, al someter a calor el medio de congelación conteniendo yema de huevo con el propósito de inactivar sus lecitinas para de esta forma eliminar el sustrato de la fosfolipasa A y evitar su acción, lo anterior se llevó a cabo utilizando el mismo procedimiento utilizado por Brito en 1995, quien trabajó con semen ovino obteniendo 40.20% de M.I. al descongelar el semen,¹⁶ en el presente trabajo el resultado de dicho procedimiento en términos de la movilidad individual fue de 17.41%, tal diferencia puede deberse a que el semen ovino no presenta el problema de la fosfolipasa A del plasma seminal del caprino y a que el proceso de inactivación de las lecitinas sea insuficiente y que pueda llegar a afectar a otros componentes del medio de congelación disminuyendo así la protección que este brinda a los espermatozoides al ser congelados.

Los beneficios de realizar el lavado del semen caprino cuando se utiliza yema de huevo en el medio de congelación se han estudiado desde que Roy, en 1957,²⁰ informó del efecto de la fosfolipasa A del plasma seminal del caprino sobre la yema de huevo y de las consecuencias de dicho efecto sobre la movilidad individual del semen caprino al ser descongelado. Diversos investigadores han realizado trabajos, como los antes citados, buscando alternativas para evitar el efecto adverso que el lavado del semen caprino pudiera tener sobre los espermatozoides, sin embargo, no han logrado superar los resultados obtenidos en los trabajos donde se realiza el lavado del semen. Los resultados de porcentaje de movilidad individual y de porcentaje de espermatozoides vivos obtenidos en el presente estudio al congelar semen caprino mediante la técnica B, en la que se realizó el lavado del semen, han igualado y en algunos casos han superado los resultados obtenidos en los trabajos citados anteriormente.

CONCLUSIÓN

Los resultados de éste estudio concluyen que la técnica de congelación de semen caprino, en la cual se realizó el lavado del semen utilizando un diluyente compuesto por tris, glucosa, ácido cítrico, glicerol y yema de huevo, es superior que la técnica de congelación en la que se realizó la inactivación de la yema de huevo utilizando el mismo diluyente, una vez que se evaluó la movilidad individual y el porcentaje de espermatozoides vivos al descongelar las pajillas.

LITERATURA CITADA

1. Chemineau P, Cagnie Y, Guérin Y, Orgeur P, Vallet J.C. Training manual on artificial insemination in sheep and goats. FAO Animal Production and Health Paper. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1991.
2. Salamon S, Maxwell WMC. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 1995;37:185-249.
3. Salamon S, Maxwell WMC. Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* 2000;62:77-111.
4. Leboeuf B, Restall B, Salamon S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 2000;62:113-141.
5. Fraser A.F. A technique for freezing goat semen and results of a small breeding trial. *Canadian Vet. J.* 1962;3:133-144.
6. Angulo MR. Determinación de la temperatura y tiempo óptimos para la descongelación del semen de ovino. (Tesis de Licenciatura). México, D.F.: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1988.
7. Valencia MJ. Dilución y congelación de semen caprino. Memorias del Curso Manejo Reproductivo e Inseminación Artificial en Pequeños Rumiantes; 1997 octubre 20 - 24; México, D.F.: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, 1997: 60-66.
8. Agraz A. Caprinotecnia II. México: Limusa, 1989.
9. Caballero GV. Dilución de semen fresco e inseminación artificial transcervical. Memorias del Curso Manejo Reproductivo e Inseminación Artificial en Pequeños Rumiantes ; 1997 octubre 20-24 ; México, D.F.: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, 1997: 50-56.
- 10.-Windsor DP, Széll AZ, Buschbeck C, Edward AY, Milton JTB, Buckrell BC. Transcervical artificial insemination of australian Merino ewes with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 1994;42:147-157.
11. Hawk HW. Sperm survival and transport in the female reproductive tract. *J. Dairy Sci.* 1983;66:2645-2660.
12. Armstrong DT, Evans G. Intrauterine insemination enhances fertility of frozen semen in superovulated ewes. *J. Reprod. Fertil.* 1984;71:89-94.

- 13 Maxwell WMC, Salamon S. Liquid storage of ram semen: a Review. *Reprod. Fertil. Dev.* 1993;5:613-638.
- 14.- Killen ID, Caffery GJ. Uterine insemination of ewes with the aid of a laparoscope. *Aust. Vet. J.* 1982;59:95
15. Evans G, Maxwell WMC. Inseminación artificial de ovejas y cabras. Zaragoza, España: Acribia, 1990.
16. Brito FI. Evaluación de dos diluyentes utilizados para la congelación de semen de carnero en pellets. (Tesis de Licenciatura). México, D.F.: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1995.
17. Holt WV. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim. Reprod. Sci.* 2000;62:3-22.
18. Parks JE, Graham JK. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 1992;38:209-222.
19. Ritar AJ, Salamon S. Effects of month of collection, method of processing, concentration of egg yolk and duration of frozen storage on viability of Angora goat spermatozoa. *Small Rum. Res.* 1991;4:29-37.
20. Roy A. Egg yolk-coagulating enzyme in the semen and Cowper's gland of the goat. *Nature* 1957;179:318-319.
21. Salamon S, Ritar AJ. Deep freezing of Angora goat semen: Effects of diluent composition and method and rate of dilution on survival of spermatozoa. *Aust. J. Biol. Sci.* 1982;35:295-303.
22. Deka BC, Rao AR. Effect of extenders on sperm motility and acrosomal integrity of frozen buck semen. *Indian Vet. J.* 1985;62:414-417.
23. Pellicer-Rubio M, Magallon T, Combarrous Y. Deterioration of goat sperm viability in milk extenders is due to a bulbourethral 60-kilodalton glycoprotein with triglyceride lipase activity. *Biol. Reprod.* 1997;57:1023-1031.
24. Memon MA, Bretzlaff KN, Ott RS. Effect of washing on motility and acrosome morphology of frozen-thawed goat spermatozoa. *Am. J. Vet. Res.* 1985;46:473-475.
25. Misra DN, Deka BC, Borgohain BN. Effect of washing on the quality of goat semen during preservation at +5°C. *Indian J. Anim. Reprod.* 1993;14:49-50.

26. Ritar AJ, Salamon S. Effects of seminal plasma and of its removal and of egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the Angora goat. *Aust. J. Biol. Sci.* 1982;35:305-312.
27. Tuli RK, Holtz W. Effect of glycerolization procedure and removal of seminal plasma on post-thaw survival and GOT release from Boer goat spermatozoa. *Theriogenology* 1994;42:547-555.
28. Ritar AJ, Salamon S. Fertility of fresh and frozen-thawed semen of the Angora goat. *Aust. J. Biol. Sci.* 1983;36:49-59.
29. Cerbón GJ. Evaluación del semental caprino. Memorias del Curso Manejo Reproductivo e Inseminación Artificial en Caprinos ; 1998 noviembre 9-12 ; México, D.F.: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, 1998:39-47.
30. Valencia MJ. Dilución y congelación de semen caprino. Memorias del Curso Manejo Reproductivo e Inseminación Artificial en Caprinos ; 1998 noviembre 9-12 ; México, D.F.: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, 1998:53-60
31. Delgadillo JA, Leboeuf B, Chemineau P. Abolition of seasonal variations in semen quality and maintenance of sperm fertilizing ability by photoperiodic cycles in goat bucks. *Small Rum. Res.* 1992;9:47-59.
32. Tuli RK, Holtz W. Effect of season on the freezability of Boer goat semen in the northern temperature zone. *Theriogenology* 1995;43:1359-1363.
33. Karatzas G, Karagiannidis A, Varsakeli S, Brikas P. Fertility of fresh and frozen-thawed goat semen during the nonbreeding season. *Theriogenology* 1997;48:1049-1059.
34. Hafez ESE. Reproducción e inseminación artificial en animales. 2ª. Distrito Federal, México: McGraw-Hill Interamericana, 1996.
35. Tuli RK, Holtz W. The effect of zwitterion buffers on the freezability of Boer goat semen. *Theriogenology* 1992;37:947-957.
36. Azawi OI, Al-Dahash SYA, Juma FT. Effect of different diluents on Shami goat semen. *Small Rum. Res.* 1993;9:347-352.
37. Puranik SV, Pargaonkar DR, Bakshi SA, Markandeya NM. Preservation of Osmanabadi and crossbred buck semen at refrigerant temperature. *Indian J. Anim. Reprod.* 1994;15:57-59.

38. Maxwell WMC, Watson PF. Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* 1996;42:55-65.
39. Deka BC, Rao AR. Effects of extenders on freezability of buck semen. *Indian J. Anim. Sci.* 1985;55:1035-1040.
40. Deka BC, Rao AR. Effect of glycerol level in tris-based extender and equilibration period on quality of frozen goat semen. *Theriogenology* 1986;26:231-238.
41. Kakadiya PT, Kavani FS. Comparative efficacy of different dilutors for preservation of Patawandi ram semen at refrigeration temperature. *Indian J. Anim. Reprod.* 1995;16:53-56.
42. Singh LP, Purbey LN. Preservability of goat spermatozoa in tris and citrate extenders at -196°C and 5°C . *Indian J. Anim. Sci.* 1996;66:1139-1141.
43. Das KK, Rajkonwar CK. Effects on the motility of buck semen during freezing with lactose egg yolk glycerol extender. *Int. J. Anim. Sci.* 1995;10:127-128.
44. Bustamante CG, Valencia MJ. Acción del sulfóxido de dimetilo y glicerol como agentes crioprotectores del acrosoma del espermatozoide de carnero durante la congelación. *Veterinaria Méx.* 1981;12:211-216.
45. Misra DN, Deka BC, Borgohain BN. Effect of glycerol on preservation of goat semen at $+5^{\circ}\text{C}$. *Int. J. Anim. Sci.* 1996;11:319-321.
46. Sinha S, Deka BC, Borgohain BN, Tamuli MK. Study on freezing of goat semen in skim milk extender with different glycerol levels and equilibration periods. *Indian J. Anim. Reprod.* 1992;13:38-41.
47. Deshpande SB, Mehta VM. Effect of dilutors and different glycerol levels on pre-freeze and post-freeze sperm motility and live sperm count in Surti buck semen. *Indian J. Anim. Sci.* 1991;61:1093-1095.
48. Singh MP, Sinha AK, Singh BK. Effect of cryoprotectants on certain seminal attributes and on the fertility of buck spermatozoa. *Theriogenology* 1995;43:1047-1053.
49. Chauhan MS, Anand SR. Effect of egg yolk lipids on the freezing of goat semen. *Theriogenology* 1990;34:1003-1013.

50. Valencia MJ, González HG, González GM, Trejo GA. Motilidad y daño acrosomal del semen caprino congelado en pajillas de 0.25 y 0.5 ml y descongelado a dos diferentes ritmos de temperatura. *Veterinaria Méx.* 1994;25:127-131.
51. García ME. Modificación al sistema de clasificación climática de Köppen. 3ª. México, D.F.: Offset Larios, 1981.
52. SAS Institute Inc. SAS/STAT guide for personal computers. Version 6.03. North Carolina, USA: SAS Institute Inc, 1991.
53. Roca J, Carrizosa JA, Campos I, Lafuente A, Vazquez JM, Martinez E. Viability and fertility of unwashed Murciano-Granadina goat spermatozoa diluted in tris-egg yolk extender and stored an 5° C. *Small. Rum. Res.* 1997;25:147-153.
54. Dutta S, Ghosh BB, Bondyopadhyay SK, Roy Choudhury R, Basu S, Dutta Gupta R. Effect of different extenders, glycerol levels and equilibration times on deep freezing of buck semen. *Indian J. Anim. Hlth.* 1996;35:35-38.