

4
230

01673



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

EFFECTO DE LA SUBSTITUCION DE YEMA DE HUEVO
POR ALBUMINA SERICA BOVINA, SUERO EQUINO
O SUERO BOVINO EN EL DILUYENTE DE
CONGELACION SOBRE LA VIABILIDAD
POSDESCONGELACION DEL
ESPERMATOZOIDE EQUINO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN PRODUCCION ANIMAL
R E P R O D U C C I O N
P R E S E N T A :
ARMANDO PALACIOS ANGOLA

MEXICO, D. F.

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.

**EFFECTO DE LA SUBSTITUCION DE YEMA DE HUEVO POR ALBUMINA
SERICA BOVINA, SUERO EQUINO O SUERO BOVINO EN EL DILUYENTE
DE CONGELACION SOBRE LA VIABILIDAD POSDESCONGELACION DEL
ESPERMATOZOIDE EQUINO**

Tesis presentada ante la
División de Estudios de Posgrado e Investigación de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
de la
Universidad Nacional Autónoma de México
para la obtención del grado de
Maestro en Producción Animal
por
Armando Palacios Angola

Asesor: M.V.Z., Ph.D. Luis Alberto Zarco Quintero

1993

INDICE

CONTENIDO

1.	INTRODUCCION.....	1
2.	REVISION DE LITERATURA.....	3
2.1	Aspectos fisiológicos en el congelamiento de semen.....	3
2.2	Integridad de la membrana espermática: acción de los crioprotectores intra y extracelulares.....	8
2.3	Objetividad y subjetividad en la evaluación de semen.....	11
2.4	Métodos novedosos en el análisis de semen.....	14
3.	MATERIAL Y METODOS.....	22
4.	RESULTADOS.....	27
5.	DISCUSION.....	30
6.	LITERATURA CITADA.....	39

APENDICE

CUADRO 1:	Análisis de correlación para los datos de semen fresco.....	46
CUADRO 2:	Análisis de correlación para los datos de los tratamientos estudiados.....	47
CUADRO 3:	Análisis de correlación entre la motilidad evaluada por la computadora y la evaluada visualmente.....	48
CUADRO 4:	Evaluación de la motilidad realizada por la computadora.....	49
CUADRO 5:	Evaluación de la motilidad realizada visualmente.....	50
CUADRO 6:	Evaluación de la velocidad.....	51
CUADRO 7:	Evaluación de la linealidad.....	52
CUADRO 8:	Evaluación de la motilidad, velocidad y linealidad en función del tiempo en posdescongelación.....	53
FIGURA 1:	Ajuste de los parámetros de medición.....	54

RESUMEN

ARMANDO PALACIOS ANGOLA. Efecto de la substitución de yema de huevo por albúmina sérica bovina, suero equino o suero bovino en el diluyente de congelación sobre la viabilidad posdescongelación del espermatozoide equino. (Bajo la dirección de Luis A. Zarco Quintero)

Se colectaron 14 eyaculados equinos, y de cada uno de ellos, previa centrifugación, se obtuvieron 7 alícuotas que fueron incorporadas a los diluyentes de congelación, cuya base general no difiere para ninguno de los tratamientos estudiados, excepto en el componente proteico, en el que usualmente se incluye la yema de huevo al 20% (YH) y que en este trabajo se substituyó por: suero equino al 3% (SE3), suero equino al 6% (SE6), suero bovino al 3% (SB3), suero bovino al 6% (SB6), albúmina sérica bovina al 2% (AS2) o albúmina sérica bovina al 3% (AS3). El proceso de congelación-descongelación fue el mismo para todos los tratamientos. Se utilizó el sistema P.A.S. (Programa para Análisis de Semen) con el fin de evaluar la motilidad, velocidad y linealidad del recorrido de las muestras en posdescongelación. En general se notó un efecto detrimental considerable de todos los substitutos al momento de la descongelación ya que sólo el 46% de las muestras en estudio tuvieron viabilidad detectable por la computadora. En cambio, todas las muestras control (YH) se pudieron analizar. La motilidad se presentó relativamente homogénea para todos los tratamientos, a excepción del diluyente SB6 con $36 \pm 5\%$ vs el diluyente SB3 con $14 \pm 4\%$ ($P < 0.01$). La motilidad también fue analizada visualmente, encontrándose que el diluyente YH resultó ser el de mayor motilidad, $30 \pm 3\%$, y el SB3 y SE6 los de menor motilidad con $13 \pm 3\%$ ($P < 0.001$). El diluyente YH presentó el mejor índice de velocidad con $64 \pm 2 \mu\text{m}/\text{seg}$, y el SB3, SB6 y SE3 con 49, 45 y $52 \mu\text{m}/\text{seg}$ respectivamente, como los de menor velocidad ($P < 0.001$). La linealidad resultó mejor para el diluyente YH y SB6 que para los demás diluyentes ($P < 0.001$). Se concluye que el uso de la yema de huevo en el diluyente de congelación de semen equino provee una mejor protección al espermatozoide ante dicho proceso, que los otros componentes o sus porcentajes de inclusión en el diluyente.

1. INTRODUCCION

En los últimos años las diferentes asociaciones de registro de razas de caballos han implementado cada vez más el método de inseminación artificial para la reproducción del equino, y no pocas utilizan el sistema de congelamiento de semen para tal propósito (Varner, 1986).

Independientemente de las controversias que ha causado el uso del semen congelado en la reproducción equina, es inobjetable que en el proceso de congelación-descongelación la pérdida espermática es de aproximadamente entre el 50-60% (Amann y Pickett, 1987; Varner, 1986), por lo que se han realizado diversas investigaciones en las cuales el objetivo ha sido modificar algún o algunos de los pasos del procedimiento, a fin de encontrar, no siempre de manera directa, una disminución en la merma de la viabilidad espermática posdescongelación. A tal efecto se han realizado estudios sobre modificaciones en la centrifugación, en la osmolaridad del diluyente de congelación, en el tipo de envase, en la concentración espermática, en el ritmo de descenso de la temperatura de congelamiento, así como en los crioprotectores intracelulares y en los azúcares del diluyente (Clay et al, 1984 a,b; Cochran et al, 1984; Cristanelli et al, 1984; Jiménez et al, 1987; Love et al, 1989; Martin et al, 1979; Palacios et al, 1992; Pickett y Amann, 1987; Volkmann, 1987). Sin embargo, ha sido difícil

ubicar en la literatura un estudio que se dedique a investigar el efecto de los crioprotectores de membrana, sobre todo los componentes proteicos del diluyente de congelación del semen equino, por lo que el objetivo del presente trabajo es determinar si existe variación en la viabilidad posdescongelación del semen equino al utilizar suero equino, suero bovino o albúmina sérica bovina, a diferentes porcentajes de inclusión, en substitución de la yema de huevo en el diluyente de congelación.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1 Aspectos fisiológicos en el congelamiento de semen.

Siendo el agua la fuente esencial para las funciones vitales de cualquier organismo, no es raro pensar que la falta o solidificación de ésta cause incompatibilidad para la vida (Beall, 1983; Mazur, 1984), sin embargo, la permanencia de una célula en estado de congelación se contrapone a lo anteriormente dicho, ya que con el método de congelamiento se puede preservar una célula a temperaturas extremadamente bajas, permitiendo que el metabolismo se reduzca "absolutamente", sin que pierda su potencial vital (Watson, 1986). A temperaturas de -196°C no hay reacciones bioquímicas ni energía térmica dentro de la célula, aún más, no hay evidencia de que puedan haber cambios de índole genético. No obstante, dicha estabilidad solamente puede ser mantenida a temperaturas por debajo de los -130°C , ya que a temperaturas mayores puede haber intracelularmente agua no congelada, la cual permite funciones metabólicas, causando la degradación de la célula (Mazur, 1984).

Al pensar en criopreservar semen se debe tener claro que el objetivo es mantener los requerimientos y propiedades de un espermatozoide para poder fertilizar, y que son:

- 1) Metabolismo para llevar a cabo la producción de energía para sus funciones (Abdelhakeam et al, 1991; Amann y Pickett, 1987; Mazur, 1984; Pontbriand et al, 1989).

2) Proteínas plasmáticas necesarias para la sobrevivencia dentro del aparato reproductor femenino, y para la adhesión al ovocito en el momento de la fertilización (Amann y Pickett, 1987).

3) Enzimas acrosomales útiles para la penetración al ovocito (Amann y Pickett, 1987; Pontbriand et al, 1989).

4) Capacidad de movimiento progresivo (Amann y Pickett, 1987; Pontbriand et al, 1989).

Está comprobado que al reducir la temperatura por debajo de los 20°C el espermatozoide comienza a presentar cambios biofísicos, principalmente en la membrana plasmática (Amann y Pickett, 1987; Daw et al, 1973; Watson, 1985), pero no es sino cuando se somete a temperaturas entre los 0°C y los -20°C, o hasta los -60°C, que el espermatozoide sufre efectos de descompensación iónica y de líquidos suficientemente graves para causar un choque térmico (Abdelhakeam et al, 1991; Amann y Pickett, 1987; Daw et al, 1973). Esto se puede detectar al microscopio por la presencia de espermatozoides con la cola doblada, con pérdida de la motilidad por la disminución de energía, o realizando movimientos en círculo, lo cual se debe al aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática y a la salida de iones y moléculas (Beall, 1983; Daw et al, 1973).

El problema en la crioconservación no es la habilidad del espermatozoide para mantenerse viable a

-196°C, sino sortear el daño que ocurre durante el congelamiento y descongelamiento al pasar la célula por una zona de temperatura crítica entre -15° y -60 °C (Aman y Pickett, 1987; Franks et al, 1983; Mazur, 1984; Parks y Graham, 1992; Watson, 1986), durante la cual se producen fenómenos que se derivan del proceso de enfriamiento, tales como formación de cristales intra y extracelularmente, deshidratación y distorsión de la membrana (Daw et al, 1973).

Bajo condiciones normales, el daño que una célula sufra durante el congelamiento depende de la velocidad de enfriamiento a la que ocurra dicho proceso. Mientras disminuye la temperatura, antes de llegar a -5°C, los líquidos aún no sufren cambios, pero al bajar de esta temperatura se comienzan a formar cristales extracelulares de agua pura, logrando que por el mismo fenómeno de cristalización, todos los solutos queden separados del cristal, aumentando así la concentración de sales en la porción de agua que aún no se congela (agua precongelada). El término precongelamiento (supercooling en inglés) define al momento umbral antes de que una célula o su ambiente sea congelado (Franks et al, 1983; Mazur, 1984). Dentro de la célula hay también agua precongelada, por lo que se mueve hacia afuera para equilibrar la concentración de sales en el exterior, sucediendo así la deshidratación celular. Si el agua no sale rápidamente hay formación de cristales intracelulares, que dañan mecánicamente a la célula. Si la tasa de enfriamiento es lenta, la alta

concentración de sales que queda en la porción no congelada dentro de la célula puede dañarla, además de deshidratarla, por lo que se hace importante encontrar el ritmo óptimo de enfriamiento (Amann y Pickett, 1987).

Con la finalidad de entender mejor este proceso se hace preciso remontarse a la fisiología de la membrana espermática. La configuración bilaminar de las cadenas de ácidos grasos de los fosfolípidos, junto con las proteínas integrales y periféricas conforman una barrera hidrofóbica difícil de atravesar. Las cadenas fosfolipídicas están arregladas en la membrana de tal manera que pueden moverse libremente en ella, esto da la propiedad de fluidez a la membrana, la cual puede ser interrumpida por varios factores, entre ellos la temperatura. Al bajar ésta, se produce un reacomodo de las cadenas de fosfolípidos en forma de paquetes, ya sea en forma bilaminar o hexagonal, formándose con esto regiones cristalinas. Sin embargo, hay regiones en las que todavía existen líquidos, y aquellas proteínas que fueron separadas del bloque cristalino se reagrupan, de forma que se construyen brechas de comunicación en la membrana (Amann y Pickett, 1987; Beall, 1983; Parks y Graham, 1992).

Una hipótesis que también se plantea (Watson, 1986) explica que al descender la temperatura por debajo de 0°C disminuye la formación de ATP, por lo que la bomba de sodio-potasio de la membrana plasmática (ATP-dependiente) también disminuye su actividad. Esto causa

que el potasio que atraviesa la membrana para salir, fluya a una tasa mayor que el potasio que entra, por lo que la concentración de K intracelular disminuye y la relación Na-K se altera. Esto causa una despolarización parcial de la membrana, abriéndose por ello los canales de calcio, el cual activa enzimas fosfolipasas, ocasionando una alteración general de las membranas. Otra alternativa de explicación plantea que la célula se vuelve menos tolerante a los cambios bruscos de volumen y concentración cuando está a temperaturas por debajo de -5°C (Fahy, 1986).

Tal y como se había comentado anteriormente, dependiendo del ritmo de enfriamiento los eventos que suceden son distintos. Cuando el ritmo de congelamiento es alto (reducción de temperatura mayor a $10-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$) y al agua intracelular no le da tiempo de salir, se forman cristales que, al aumentar el ritmo de congelamiento, se hacen cada vez mas pequeños, hasta hacerse imperceptibles aún por el microscopio electrónico. Esto es saludable para la célula mientras permanezca en ese estado. No obstante, esos microcristales son termodinámicamente inestables, por lo que al ser descongelados tienden a agruparse (recristalización) y formar cristales mas grandes, que sí son letales para la célula, por lo que la solución es un ritmo de descongelación rápido (Lehninger, 1985; Watson, 1986). No se conoce bien la forma como el proceso de recristalización daña a la célula. Se cree que no es físico el daño, es más, se piensa que directamente es

inócuo, pero que genera cambios desconocidos en el sistema celular, los que son de carácter letal (Mazur, 1984).

Con un ritmo de congelamiento lento (reducción de temperatura menor a 5°C/min) se puede evitar el congelamiento celular (Mazur, 1984) porque este ritmo permite que el agua intracelular y extracelular encuentren su equilibrio, ya que el agua intracelular puede salir continuamente mientras el exterior se va congelando. Llegado un momento, el de la temperatura de nucleación de hielo de la célula (Amann y Pickett, 1987; Beall, 1983; Franks et al, 1983; Watson, 1986), en que ésta prácticamente no tiene agua y no se congela. Hay evidencias que indican que cuando aproximadamente el 90% del agua es removida, el 10% restante no es capaz de congelarse a ninguna temperatura. Pero ante esta situación, la proporción de hielo extracelular es tan grande que le causa daño a la membrana por su lado externo (Mazur, 1984).

2.2 Integridad de la membrana espermática: Acción de los crioprotectores intra y extracelulares.

Teóricamente se podría hacer más resistente a un espermatozoide reduciéndole el número de poros en la membrana, y reduciéndole las funciones ATP-dependientes, así como la agregación proteica y la formación de bloques lipídicos. Se presume que esta es la acción de las lipoproteínas de la yema de huevo o leche en los diluyentes (Amann y Pickett, 1987; Clay et al, 1984b; Jasko et al, 1993b; Heiskanen et al, 1987; Palacios et al,

1992; Phillips y Lardy, 1940; Province et al, 1985), y de crioprotectores, como por ejemplo el dimetil sulfóxido, la betaina y el glicerol (Bustamante, 1980; Cristanelli et al, 1985; Cochran, 1984; Guay et al, 1981; Jones, 1965; Koskinen et al, 1989). Aunque no se tiene bien determinada si la acción del glicerol tiene efectos externos o internos en la célula, hay evidencias de que la presencia de un aditivo crioprotector reduce la concentración de sales intracelulares a una temperatura dada, debido a que incrementa la fracción no congelada en el exterior de la célula (Mazur, 1984; Park y Graham, 1992). El problema que se presenta con estos crioprotectores es que también producen toxicidad (Abdelhakeam et al, 1991; Fahy, 1986; Parks y Graham, 1992; Pontbriand et al, 1989; Rudolph et al, 1986), y que esta toxicidad disminuye la concentración de otros aditivos que pueden ser usados en el diluyente y por lo tanto limita la eficiencia de los mismos (Fahy, 1986; Rudolph et al, 1986).

En los diluyentes utilizados, tanto para semen refrigerado como para semen congelado, ha sido necesario incluir leche descremada o yema de huevo, sobre todo esta última. A pesar de haber sido utilizada desde hace varias décadas (Phillips y Lardy, 1940; Salisbury et al, 1941), lo único que se conoce sobre el efecto de la yema de huevo es que su inclusión mejora la fertilidad del semen. Tiene bondades conocidas pero perjuicios desconocidos, principalmente actividades de tipo enzimático potencialmente dañinas (Jasko, 1993a; Montes, 1991).

Uno de los obstáculos que se presentan para realizar la evaluación del semen en estudios de diluyentes con base en yema de huevo es la consistencia de la misma, la cual interfiere, tanto por la viscosidad que produce en el diluyente como por la poca nitidez que tiene el campo visual del microscopio. La densidad del diluyente con yema de huevo puede influir en la dirección o movimiento espermático. De hecho, los estudios de viabilidad espermática en humanos requieren efectuar lavado de las células para evitar distorsiones en la medición (Levine et al, 1989; Mortimer et al, 1988; Pedigo et al, 1989), aunque esto eventualmente puede causar pérdida en la motilidad.

Recientemente han surgido investigaciones en las que se utilizan alternativas proteicas dentro del diluyente en lugar de la yema de huevo, así pues, se ha utilizado albúmina sérica bovina (Arns et al, 1987; Kreider et al, 1985; Reid, 1986), suero equino (Klem, 1984; Pruitt, 1985), suero bovino (Gómez, 1968; Senger et al, 1981), proteína de soya (Coulter y Foote, 1975), calostro (Jiménez et al, 1986), alcohol polivinílico (Clay et al, 1984b), etc. Todos ellos proveen la oportunidad de hacer estudios in vitro con buena visibilidad ante el microscopio.

Los diversos ingredientes proteicos que se mencionaron anteriormente han sido utilizados de manera experimental sólo en diluyentes para semen fresco o

refrigerado, y no para semen congelado, excepto la albúmina sérica bovina (Arns et al, 1987). Por este motivo en el presente estudio se determinó el efecto sobre la viabilidad posdescongelación del semen al utilizar suero equino, suero bovino o albúmina sérica bovina en lugar de yema de huevo en el diluyente de congelación de semen de equino.

2.3. Objetividad y subjetividad en la evaluación de semen.

La espermatogénesis es un proceso que refleja la integridad de todo el sistema reproductivo de un animal, y para detectar de manera práctica la normalidad de este proceso se recurre a la evaluación de semen (Amann, 1988; Amann, 1989; Boyers et al, 1989; Katz y Davis, 1987).

El semen es un complejo grupo donde hay millones de células, normales y anormales. Aunque una sola célula es la que fertiliza, se requiere de un número grande de espermatozoides en buen estado para colaborar en el proceso. Por tanto, se hace necesario un efectivo análisis para identificar aquellos individuos que contengan al menos la dosis mínima requerida para poder fertilizar (Amann, 1989; Budworth et al, 1988; Katz, 1991; Morales et al, 1988).

Tradicionalmente, la evaluación de semen se ha basado en la observación visual realizada por personal que, debido a su capacitación y experiencia, ha permitido obtener resultados prácticos satisfactorios (Deibel et al, 1976; Jasko et al, 1988; Levine et al, 1989; Mortimer et al, 1988; Stephens et al, 1988). Sin embargo, la

observación visual del semen (volumen, concentración, porcentaje de motilidad, motilidad progresiva y morfología) ha tenido poca efectividad cuando se necesita hacer una predicción para el potencial de fertilidad. Esta pobre correlación proviene de muchos factores, que hacen al estudio subjetivo, impreciso, inexacto y difícil de estandarizar (Boyers et al, 1989; Gladen et al, 1991; Jasko et al, 1988; Katz y Davis, 1987; Katz, 1991).

De las variables a estudiar en el análisis visual del semen, el volumen del eyaculado y la concentración espermática son los únicos que se pueden catalogar como objetivos (Boyers et al, 1989; Budworth et al, 1988; Gladen et al, 1991; Morales et al, 1988), siendo éstos los menos correlacionados con la fertilidad, ya que el volumen va a variar en función de la técnica de colección y del periodo de descanso sexual. Por otra parte, el conteo de la concentración espermática utilizando el hemocitómetro o la cámara de Makler (Anzar et al, 1991; Levine et al, 1989; Pedigo et al, 1989), requiere de una previa dilución, lo cual implica una fuente de error y no siempre una repetibilidad aceptable (Gladen et al, 1991). Los contadores electrónicos (espectrofotómetros o colorímetros) mejoraron la técnica de conteo espermático. No obstante existe un error en la medición, sobre todo en aquellas muestras con baja concentración, debido a que al haber partículas celulares y debridaciones cristalinas, el contador las detecta como células espermáticas (Boyers et

al, 1989; Katz y Davis, 1987).

Las variables más representativas, como la motilidad, la motilidad progresiva y la morfología, no se pueden considerar mediciones objetivas (Boyers et al, 1989; Gladen et al, 1991) mientras sean evaluadas de manera visual, pero actualmente, en el caso de la motilidad espermática, la situación está cambiando mediante el uso de sistemas menos subjetivos.

La motilidad espermática es esencial para el transporte a través del aparato femenino y para la fertilización. Esta es una expresión de la viabilidad e integridad estructural de la célula. Desde un punto de vista práctico, la motilidad espermática puede ser usada como un marcador biológico del potencial de fertilidad de un individuo y de sus alteraciones (Amann y Pickett, 1987; Budworth et al, 1988; Gladen et al, 1991; Katz y Davis, 1987; Katz, 1991; Morales et al, 1988).

El cálculo del porcentaje de motilidad evaluado visualmente presenta un problema de sobrestimación, ya que el movimiento de las células atrae más atención que aquellas células no móviles, siendo aún más problemático el poder estimar la motilidad espermática con una calificación escalar, aquella que por lo general maneja una escala entre el uno y el cinco (Boyers et al, 1989; Gladen et al, 1991; Levine et al, 1989; Pedigo et al, 1989; Stephens et al, 1988).

2.4. Métodos novedosos en el análisis de semen.

La evolución del análisis de semen ha hecho que

se instrumenten equipos semiautomáticos, los cuales permiten una visualización mayor de la velocidad y trayectoria de las células. Estos métodos son: a) Fotografía con tiempo de exposición, cuyo mecanismo se concreta al uso de una cámara con tiempo de exposición de 1 ó 2 segundos, necesarios para que permita ver el recorrido continuo del espermatozoide. b) Fotografía de exposición múltiple: Es el mismo principio que el anterior, pero se toman muchas fotografías a un tiempo muy corto entre ellas, así se obtiene una trayectoria representativa pero con menos información que la anterior. c) Cinemicrografía: Utilizando la técnica del cine, se filman los espermatozoides cuadro por cuadro y después se superponen en secuencia para poder visualizar el recorrido y d) Videomicrografía: Similar a la técnica anterior, pero con el uso de las cámaras y grabadoras de video, las cuales permiten grabar el movimiento de un espermatozoide (Amann, 1988; Anzar et al, 1991; Boyers et al, 1989; Rikmenspoel, 1984).

Todos estos métodos tienen la desventaja de que el estudio de la muestra recogida se debe analizar manualmente, complicándose más con el uso del cine y el video por el hecho de ser numerosos cuadros de película. Sin embargo, la videomicrografía resultó el primer paso para que luego se acoplara la computadora y desarrollar el sistema CASA (Computer Assisted Semen Analysis) o PAS (Programa para Análisis de Semen), el método más novedoso

que se ha diseñado para la evaluación seminal en cualquier especie (Amann, 1988; Anzar et al, 1991; Ast et al, 1986; Boyers et al, 1989; Katz y Davis, 1987; Palacios, 1993a; Pedigo et al, 1989; Stephens et al, 1988; Varner, 1991).

Desde hace unos 8 años se emplea este método diagnóstico, cuyo equipo consiste en:

- * Un microscopio de contraste de fases con iluminación halógena de 100 vatios. En el revolver debe ir un objetivo 10X NH, el cual permite un fondo visual oscuro y una imagen uniforme de los espermatozoides, independientemente de que ellos se vean planos o de canto, evitando que se refleje el centelleo.

- * Una cámara de video de alta resolución conectada a un monitor, y que sirve para detallar la mejor imagen que pueda ofrecer el microscopio. Este proceso es crucial para el éxito en la evaluación, puesto que el sistema analiza lo que "ve".

- * Una grabadora de video convencional, necesaria en los casos en que no se pueda evaluar en el momento o lugar, o se desee evaluar con mas tranquilidad, lo cual es muy recomendable.

- * Una microcomputadora IBM compatible, la cual contiene las tarjetas y el programa para análisis de semen. A ella va conectada un monitor y una impresora. El monitor sirve para visualizar la imagen digitalizada que arroja la computadora, para evaluar entre otras cosas, si la imagen real (vista en el primer monitor) y la digitalizada es la misma en número y tamaño de los espermatozoides. La

impresora permite presentar un informe escrito de la evaluación realizada (Ast et al, 1986).

Este programa es, básicamente, un analizador de imágenes, el cual sólo puede "visualizar" la cabeza del espermatozoide, no el flagelo, pero realmente no ve una cabeza, sino un área bajo la cual, por cálculo integral, la convierte en un punto, siendo éste su objeto de estudio (Amann, 1987; Ast et al, 1986; Boyers et al, 1989; Budworth et al, 1988; Jasko, 1993; Katz y Davis, 1987).

Existen en el mercado diversos equipos computarizados, los cuales en su contexto hacen el mismo trabajo, y todos, sin excepción, deben ser calibrados para cada fin, es decir para cada individuo y cada especie. El sistema utilizado en el presente trabajo (Cellsoft versión 3.0. Cryo Resources Ltd. New York, U.S.A.), requiere de una calibración, la cual se basa en los siguientes parámetros: (FIGURA 1)

1) Números de cuadros a analizar:

La computadora tiene la capacidad de cuadricular la imagen de cada campo visual, y de ahí proviene la pregunta de cuántos cuadros se desean analizar para el recorrido de cada espermatozoide. Estudios realizados previamente (Blach et al, 1989; Kayser et al, 1992) recomiendan entre 15 y 20 cuadros para obtener el resultado más eficiente por parte de la máquina. Generalmente se usan 15 cuadros.

2) Número de cuadros por segundo:

Esto tiene que ver con la velocidad a la que se desea que trabaje el equipo en cada campo visual. Normalmente se le pide a la máquina que analice a razón de - 30 cuadros por segundo, por lo que el estudio lo realiza en medio segundo.

3) Muestra mínima para motilidad y velocidad/linealidad:

En el tiempo en que trabaja la máquina hay espermatozoides que no logran recorrer los 15 cuadros, por lo que al equipo se le pide que las células se deben mover por lo menos un mínimo de cuadros para considerarlas dentro del estudio. Esto sirve de filtro para aquellas partículas no celulares que por algún motivo se están moviendo en ese espacio y que la máquina podría identificarlas como espermatozoides. Es de entender que mientras más cuadros mínimos de movimiento se especifiquen para que el equipo considere a la célula en el análisis, más exigentes se está siendo con la muestra, lo que no es adecuado la mayoría de las veces, puesto que, más adelante se verá, hay otros parámetros que sirven como filtros, como son:

4) Velocidad umbral mínima:

Es aquella velocidad que se le exige a la computadora para que capte como mínima para validar a un espermatozoide motil y estudiar su comportamiento de velocidad y linealidad. Es recomendable comenzar el estudio con velocidades espermáticas por encima de los 20 $\mu\text{m}/\text{seg}$. Es pertinente aclarar que la velocidad promedio de

los espermatozoides de equino oscila entre 60-80 $\mu\text{m}/\text{seg}$ (Amann et al, 1989; Blach et al, 1989; Jasko, 1993; Kayser et al, 1992).

5) Nivel de color requerido:

Este punto es sumamente importante, debido a que dependiendo del contraste que se le de a la imagen digitalizada, la cabeza del espermatozoide se verá más chica, igual o más grande que la original; Lo recomendable es que ambas señales se vean iguales, y de hecho esto servirá para corroborar que el número de células que estudie el equipo sea el mismo número que se está viendo en el monitor del microscopio.

6) Factor de dilución:

En el caso de que se esté interesado en que la máquina ofrezca directamente en el informe el resultado de la concentración espermática, es preciso indicarle cuan diluida está la muestra estudiada. Esto se debe a que es necesario que la muestra se diluya antes de ser analizada, ya que el equipo no está diseñado para leer tantos espermatozoides juntos, como sería el caso de una muestra original. El problema radica en que, como se tiene que seguir a cada célula a lo largo de 15 cuadros, o por lo menos al mínimo exigido, se complicaría el estudio. De hecho el análisis de una célula se detiene cuando dos células chocan, aunque sea visualmente, es decir cuando pasan por un mismo punto al mismo tiempo, aunque sea en diferente plano. Como el equipo no puede determinar si la

trayectoria después del choque es la de cada quien o la consecuencia de un cambio de dirección, el estudio se realiza hasta el momento anterior al choque. Si se colocan demasiadas células en el campo visual el estudio se hace ineficiente, por lo que se recomienda diluir hasta obtener unos 20 millones de espermatozoides por mililitro, de tal forma que se logren ver en cada campo alrededor de 20-30 células.

Es de suma importancia, por ende, conocer bien el tipo de diluyente que se pretende utilizar para la dilución del semen, a fin de que la dilución no interfiera con la viabilidad celular, repercutiendo en pérdida de motilidad, aunque debe considerarse como normal un descenso en el movimiento espermático por concepto de la dilución (Harrison et al, 1982; Jasko et al, 1993; Vantman et al, 1988).

7) Rango de tamaño de la célula:

El tamaño de la célula espermática, y en especial la de su cabeza varía entre especies (Cummins y Woodall, 1985), por lo que se hace necesario calibrar el equipo con esa información, en función de la especie trabajada, y sobre todo porque esto sirve también para filtrar cualquier otra partícula diferente a ese tamaño indicado (Ast et al, 1986).

El análisis comienza con la colocación de una muestra de semen diluido en un portaobjetos cubierto; Una vez visualizado el campo en el microscopio, la computadora analizará la imagen, evaluando los siguientes parámetros:

CONCENTRACION ESPERMATICA

El programa es capaz de calcular este parámetro con bastante semejanza al que habitualmente se hace en forma visual. De hecho, estudios comparativos entre este sistema y la evaluación visual han demostrado la similitud en lo referente a la exactitud del cálculo, tanto que el fabricante recomienda que los resultados deben corroborarse a menudo con la evaluación visual (Ast et al, 1986; Boyers et al, 1989; Katz, 1991, Morales et al, 1988; Stephens et al, 1988).

Con la opción de que el operador puede especificar el volumen del eyaculado, el programa también entrega el dato de la cantidad total de espermatozoides en la muestra (Ast et al, 1986).

MOTILIDAD

Existen varias formas en que el sistema permite la evaluación de la motilidad en la muestra. De manera directa el programa detalla el porcentaje de motilidad que presentaron los diferentes campos estudiados. Describe también el número de células móviles y no móviles, por lo que puede entregar el dato de una concentración espermática de células en movimiento, siendo esto más práctico que el de la concentración espermática general. Asimismo, es posible entregar los resultados en forma individual, es decir lo sucedido a cada célula en particular. Por último, el operador puede calcular la motilidad de manera tradicional, visualizando los campos en el monitor que

tiene instalado el sistema.

VELOCIDAD

Este parámetro es de utilidad para conocer cómo se está movilizandó la población espermática, o sea, para detectar la viabilidad momentánea del eyaculado. Este sistema es capaz de detectar la velocidad promedio e individual, y además decidir cuáles son las células que no se mueven. Los datos son entregados tanto numéricamente, como en un histograma de frecuencias.

LINEALIDAD

Otro punto importante a considerar, y que se enmarca en el concepto de motilidad progresiva es el relacionado con la linealidad del recorrido del espermatozoide. Con base en una escala que va del 10 (trayectoria lineal progresiva) al 0 (trayectoria no progresiva), el sistema emite una calificación promedio e individual del comportamiento de todas las células estudiadas. Los datos son entregados en forma numérica y en histograma.

PATRON DE MOVIMIENTO

Mediante la técnica de video, el sistema PAS puede grabar la huella de la trayectoria de cada espermatozoide que se localice en el campo del microscopio, y de esta manera visualizar directamente, así como analizar con calma la progresividad del movimiento de cada célula (Ast et al, 1986).

3. MATERIAL Y METODOS

Se obtuvo el eyaculado de 14 caballos de las razas española y árabe, los cuales oscilaban entre los 3 y 11 años de edad, con buena constitución física y estado de salud satisfactorio. El semen fue colectado a mediados de febrero, por lo que se hizo necesario utilizar una hembra estrogenizada para el intento de monta. Para la colección se utilizó una vagina artificial modelo Hannover (Gummi-Bertrand, Hannover, West Germany) a la cual se le adaptaron en el receptáculo para semen 3 gasas como filtro para separar la fracción gelatinosa del eyaculado y evitar de esta manera la aglutinación espermática, además de retirar cualquier cuerpo extraño del semen (Amann y Pickett, 1987; Varnø, 1986).

Se grabaron en video los campos microscópicos de la muestra en fresco, para lo cual, previamente a la centrifugación se tomó una gota del semen fresco y se diluyó en 1 mililitro de una solución a 35°C, cuyos ingredientes son:

Leche descremada en polvo (g).....	2.40
Glucosa (g).....	4.90
Citrato de sodio (g).....	0.08
Agua bidestilada c.b.p. (ml).....	100.00

(Kenney et al, 1983).

La muestra, en un portaobjetos, fue presentada ante un microscopio de contraste de fases (Olympus BH-2), el cual utiliza un objetivo SPlan 10 NH. El microscopio tiene adaptada una cámara de video, ésta a su vez, conectada a una videograbadora y a un monitor que permite

definir mejor la imagen que se debe transmitir (Ast et al, 1986).

Se preparó el semen para ser centrifugado, para lo cual se verificó por medio de un hemocitómetro la concentración espermática original, para hacer una dilución que correspondiera con una concentración final de 30 millones de espermatozoides por mililitro. El diluyente que se utilizó para este propósito es el mismo utilizado para la centrifugación de los espermatozoides, y que tiene como fórmula:

Glucosa (g).....	59.98
EDTA disódico (g).....	3.69
Citrato de sodio dihidro (g).....	3.70
Bicarbonato de sodio (g).....	1.20
Penicilina G sódica (U.I.).....	1.50×10^6
Streptomycin (g).....	1.50
Agua bidestilada (l).....	1.00
pH.....	6.60
Temperatura (°C).....	36.00

(Martin et al, 1979).

Se colocaron 2 mililitros del semen diluido en cada uno de 7 tubos de ensayo tibios, para su consiguiente centrifugación a 170 x g durante 20 minutos.

Al finalizar la centrifugación, y luego de retirar el sobrenadante, se obtuvo el paquete espermático de cada tubo, el cual se resuspendió a temperatura ambiente bajo el mismo criterio de concentración en los diferentes diluyentes de congelación que fungieron como tratamientos del presente estudio:

DILUYENTE CON BASE EN SUERO EQUINO AL 3% (SE3)

Diluyente de centrifugación (ml).....	25.00
Lactosa (g).....	7.48
Suero equino inactivado (ml).....	3.00
Glicerol (ml).....	4.00
Agua bidestilada (ml).....	68.00

DILUYENTE CON BASE EN SUERO EQUINO AL 6% (SE6)

Diluyente de centrifugación (ml).....	25.00
Lactosa (g).....	7.15
Suero equino inactivado (ml).....	6.00
Glicerol (ml).....	4.00
Agua bidestilada (ml).....	65.00

(Klem et al, 1984; Pruitt, 1985)

DILUYENTE CON BASE EN SUERO BOVINO AL 3% (SB3)

Diluyente de centrifugación (ml).....	25.00
Lactosa (g).....	7.48
Suero bovino (ml).....	3.00
Glicerol (ml).....	4.00
Agua bidestilada (ml).....	68.00

DILUYENTE CON BASE EN SUERO BOVINO AL 6% (SB6)

Diluyente de centrifugación (ml).....	25.00
Lactosa (g).....	7.15
Suero bovino (ml).....	6.00
Glicerol (ml).....	4.00
Agua bidestilada (ml).....	65.00

(Gómez, 1968; Senger et al, 1981)

DILUYENTE CON BASE EN ALBUMINA SERICA BOVINA AL 2% (AS2)

Diluyente de centrifugación (ml).....	25.00
Lactosa (g).....	7.59
Albúmina sérica bovina (g).....	2.00
Glicerol (ml).....	4.00
Agua bidestilada (ml).....	68.00

DILUYENTE CON BASE EN ALBUMINA SERICA BOVINA AL 3% (AS3)

Diluyente de centrifugación (ml).....	25.00
Lactosa (g).....	7.48
Albúmina sérica bovina (g).....	3.00
Glicerol (ml).....	4.00
Agua bidestilada (ml).....	68.00

(Arns et al, 1987; Pruitt, 1985; Reid, 1986)

DILUYENTE CON BASE EN LACTOSA - YEMA DE HUEVO (YH)

Diluyente de centrifugación (ml).....	25.00
Solución de lactosa al 11% (ml).....	50.00
Yema de huevo (ml).....	20.00
Glicerol (ml).....	4.00
Pasta de orvus (ml).....	0.50

(Martin et al, 1979; Cochran et al, 1984)

Se utilizaron pajillas de 0.5 ml para envasar las muestras. De cada eyaculado se envasaron 2 pajillas por cada tratamiento (en el análisis estadístico se tomó en cuenta el promedio de ambas) para posteriormente realizar el precongelmiento de ellas en vapores de nitrógeno líquido a una distancia de 4 cms (congelmiento rápido-ultrarápido) (Amann y Pickett, 1987). Transcurridos unos 20 minutos fueron depositadas las muestras en el tanque de nitrógeno líquido.

En total se congelaron 98 muestras (14 eyaculados, 7 diluyentes con cada uno), mismas que coinciden con el estudio de tamaño de muestra que previamente se había calculado.

Las muestras se descongelaron individualmente en agua a 75°C durante 6 segundos, para luego pasarlas a un recipiente con agua a 37°C por 10 segundos (Amann y Pickett, 1987; Martin et al, 1979).

Se colocó una gota de cada muestra en un portaobjetos, y fue presentada al microscopio de contraste de fases para grabar en video los diferentes campos, tomados al azar (Boyers et al, 1989; Gladen et al, 1991). Tras obtener todas las grabaciones de las muestras, fueron

analizadas por la computadora que trae consigo el sistema P.A.S. (CellSoft 3.0, CRYO Resources Ltd. N.Y. U.S.A.), registrándose la motilidad, velocidad, linealidad y concentración espermática. La computadora fue previamente calibrada para los parámetros necesarios para el análisis en la forma que se presenta en la figura 1 (Ast et al, 1986, Palacios, 1993b).

En las muestras en las que hubo recuperación de motilidad después de la descongelación se repitió el análisis, realizándolo con intervalos de una hora. Durante este tiempo las muestras se mantuvieron en incubación aeróbica y a temperatura ambiente.

El estudio estadístico se realizó haciendo un análisis de correlación entre las variables. Además se realizó un análisis de varianza para las medias de motilidad, velocidad y linealidad. Para el caso del seguimiento de las muestras control en función del tiempo, se realizó un análisis de varianza de dos vías (Gladen et al, 1991; Littell et al, 1991).

4. RESULTADOS

En el cuadro 1 se muestra que la motilidad y la velocidad en el semen fresco tuvieron un coeficiente de correlación de 0.7, que es altamente significativo ($P=0.0047$). También existió una correlación significativa ($P=0.0087$) entre la velocidad y la linealidad. Las demás correlaciones no fueron significativas.

Al hablar del semen procesado en sus diferentes tratamientos (cuadro 2) sólo hay correlación entre la velocidad y la linealidad, ($r=0.39$, $P=0.0038$).

El cuadro 3 presenta el análisis de correlación entre los datos de motilidad que calculó la computadora y los datos de la evaluación subjetiva que se hizo simultáneamente, viendo el monitor. En él se observa que hay una alta y significativa correlación entre los dos sistemas de evaluación ($r=0.81$, $P=0.0000$). Asimismo se observa en este cuadro que la motilidad no se correlaciona con la concentración espermática de la muestra, independientemente del método utilizado para evaluar motilidad.

El cuadro 4 muestra los cambios que se suscitaron en la motilidad una vez que fueron descongeladas las pajillas con los diferentes tratamientos. Cabe destacar que en el caso de los tratamientos SE6, SB3, AS2 y AS3, en muchas pajillas era nula o tan poca la motilidad que no se consideraron, desde el punto de vista estadístico, para el experimento. Por lo tanto, los resultados de motilidad que

se presentan corresponden únicamente a aquellos eyaculados en los que hubo motilidad posdescongelación. La máxima motilidad posdescongelación se obtuvo en el semen diluido en yema de huevo (29.39%). Aunque los grupos experimentales se comportaron relativamente homogéneos, se presentó una diferencia en el tratamiento con base en suero bovino al 6% como el que ofreció significativamente mayor motilidad, y el mismo suero bovino, pero al 3%, tuvo significativamente menor motilidad que los demás tratamientos. Como era de esperarse, la motilidad en el semen fresco fue superior a todas las demás ($P < 0.01$).

En el caso de la evaluación en forma visual ante el monitor no varió mucho con respecto a los datos anteriores. Todos los grupos se comportaron de manera similar, sin embargo, fue el semen diluido en yema de huevo el que se vió con mayor motilidad, y los de suero equino al 6% y suero bovino al 3% los que se notaron con menor movimiento. Se puede ver que para el estudio de motilidad subjetiva se lograron evaluar mas muestras que en el inciso anterior (cuadro 5).

En el caso de la velocidad se nota un efecto más específico por cada tratamiento. A pesar de que el semen fresco presentó una velocidad media superior a los demás, no es estadísticamente diferente a la presentada por el semen diluido en yema de huevo, ni por la del semen diluido en albúmina sérica bovina al 2%, aunque en este último caso la fuente de datos es inferior por el motivo

esbozado anteriormente. Hubo algunos tratamientos que tuvieron estadísticamente menor velocidad, y fueron los tratamientos SE3, SB3 y SB6 (cuadro 6).

La calificación que da la computadora para evaluar a la linealidad fue muy superior en el caso del semen diluido en yema de huevo, y en segundo término al tratamiento con suero bovino al 6%, que a los otros, los cuales se comportaron de forma homogénea (cuadro 7).

En principio, todas las muestras descongeladas iban a ser analizadas cada hora para que la computadora detectara los cambios de motilidad, velocidad y linealidad producidos en función del tiempo. Sin embargo, las muestras de los diferentes tratamientos, excepto los controles, no mantuvieron la motilidad por más de 15 minutos, por lo que sólo se presentan en el cuadro 8 los resultados de las muestras del diluyente con yema de huevo. No se detectaron cambios significativos en ninguna de las variables a través del tiempo transcurrido, es decir, se mantuvieron constantes tanto la motilidad, la velocidad y la linealidad de todas las muestras del diluyente con yema de huevo.

5. DISCUSION

En el cuadro 1 se aprecia que en el semen fresco existe una correlación significativa entre la velocidad de los espermatozoides y su motilidad, pudiéndose suponer que si una muestra de semen tiene altos porcentajes de motilidad, como es el caso de semen fresco, significa que los espermatozoides en general están en buen estado, lo que demuestran movilizándose más rápido que cuando tienen un porcentaje de motilidad menor. Cuando los porcentajes de motilidad son bajos, como ocurre en el caso de semen descongelado, se pierde la correlación entre motilidad y velocidad, posiblemente debido a que muchos espermatozoides son eliminados del análisis por su lentitud (cuadro 2). Estos datos coinciden con trabajos previos en los que utilizando semen fresco las correlaciones se estrechan, sobre todo en el caso de motilidad y velocidad (Pedigo et al, 1989), pero utilizando semen descongelado, se pierde esa correlación (Budworth et al, 1988).

En el cuadro 3 se presenta la correlación que resultó del monitoreo de la motilidad hecho por la computadora y el cálculo determinado visualmente por un sólo operario. Este tipo de correlaciones relativamente altas deben ser comunes, puesto que el equipo está diseñado para algo que el hombre está acostumbrado a hacer de tiempo atrás, por lo que las lecturas de esta variable deberían ser similares, siempre y cuando el técnico

evaluador sea conocedor del oficio (Amann, 1987; Budworth et al, 1988; Gladen et al, 1991; Mahony et al, 1988; Mortimer et al, 1988; Tuli et al, 1992; Varner et al, 1991; Wang et al, 1991). En el mismo cuadro está la correlación existente entre la concentración espermática que tenían las diferentes muestras y la determinación de la motilidad en cada una de ellas, implicando que el cálculo de la motilidad no se vió afectado por lo concentrado o diluido que estaba un eyaculado, ni de manera visual ni con el uso de la computadora. Dichos resultados concuerdan con anteriores expuestos por diversos autores (Pedigo et al, 1989; Varner et al, 1991). Sin embargo, es necesario aclarar que estos sistemas computarizados requieren que la muestra a analizar sea diluida a concentraciones espermáticas menores a los 40-50 millones por mililitro (Jasko, 1993; Levine et al, 1989; Vantman et al, 1988; Varner et al, 1991), por lo que no se puede extrapolar dicha falta de correlación para concentraciones espermáticas mayores a 50 millones/ml.

Antes de comentar acerca de los resultados de las diferentes pruebas realizadas, es preciso hacer notar que se presentaron problemas al momento de monitorear una gran cantidad de muestras. Dos causas principalmente se suscitaron 1) En muchas de las muestras descongeladas, la motilidad detectada visualmente fue casi nula instantes después de descongelar y peor al dejarlas incubar a temperatura ambiente por mas de 15 minutos. Todas aquellas

que si presentaron una motilidad evaluada visualmente mayor al 5%, y que se les hizo el análisis en la computadora también se incubaron, pero tampoco mostraron un mantenimiento de los índices de movimiento, por lo que no se pudo obtener un seguimiento de la viabilidad de las muestras en estudio, salvo las congeladas en yema de huevo. 2) Algunas muestras presentaban visualmente motilidad, pero al momento de diluirlas (en su propia solución) para que la máquina las detectara mejor, bajaba drásticamente la motilidad. Todo esto redundó en que el 40 % de las muestras se perdieran, todas ellas pertenecientes a los tratamientos en estudio, ninguna del control, o sea del de yema de huevo. En este sentido, se realizó una medición de la osmolaridad de estas muestras, encontrando que estaban en los rangos normales para este tipo de proceso, el cual oscila entre los 300-400 mOsm/Kg (Amann y Pickett, 1987).

Estos dos hallazgos sugieren que existe la posibilidad de que se haya presentado un daño celular por falta de protección de los componentes que se utilizaron en los diluyentes como substitutos de la yema de huevo (Coulter y Foote, 1975). Es posible que la protección hacia la membrana que ofrece la yema de huevo consista en una interacción de la superficie celular más con los lípidos que con las proteínas, esto basado en el estudio de la constitución físico-química de la yema de huevo y del suero, tanto equino como bovino. Existe una gran diferencia entre el aporte de lípidos y proteína por parte

de la yema de huevo y el de los componentes del suero. Hablando de lípidos se sabe que la yema de huevo contiene un mínimo de 65 mg de fosfolípidos por cada gramo de yema (Larsen y Froning, 1981; Warren y Ball, 1991). Para efectos del diluyente de congelación, en cada 100 ml se colocan 20 ml de yema de huevo. Si un huevo pesa en promedio 55 g y la yema de huevo significa su 30%, ésta pesa aproximadamente 16.5 g (Larsen y Froning, 1981; Marion et al, 1965; Squires y Naber, 1992; Warren y Ball, 1991), y si normalmente se obtiene un volumen promedio de 10 ml por yema, implica que cada ml de yema de huevo pesa aproximadamente 1.65 g, por lo que:

$20 \text{ ml} \times 1.65 \text{ g/ml} = 33 \text{ g}$ de yema de huevo en el diluyente

Y en lo que respecta al total de lípidos:

$33 \text{ g} \times 65 \text{ mg/g} = 2.145 \text{ g}$ de fosfolípidos en el diluyente

Si en el suero hay en promedio 500 mg de lípidos por cada 100 ml (Benjamin, 1984; Kronfeld y Medway, 1980), y en el diluyente de congelación se utilizaron inclusiones de 3 y 6 ml, dá como resultado un aporte de 15 a 30 mg solamente.

Si hablamos de proteínas la situación es parecida. La yema de huevo tiene un 55% de proteína en sus 16.5 g (Larsen y Froning, 1981), es decir, 9.08 g en cada 10 ml de volumen, y pensando en el diluyente de congelación que requiere de 20 ml de yema de huevo, ésta aporta en total aproximadamente 18 g de proteína, en cambio, el suero posee una inclusión proteica de 7 g/100 ml (Benjamin,

1984; Kronfeld y Medway, 1980). Si se utilizan en el diluyente de congelación 3 ó 6 ml de suero, el aporte de proteína se reduce a 210-420 mg.

Los casos en donde se notó en general una merma mayor fue en el uso de albúmina sérica bovina en baja concentración, y se puede suponer que se debe a que esta sustancia, que viene con un alto grado de pureza (fracción V), adolece de los factores que se describen anteriormente. Esta situación se presentó en el único trabajo que se encontró donde reportan el uso de albúmina sérica bovina como componente proteico para el diluyente de congelación en equinos (Arns et al, 1987). En él se informa que de 8 caballos trabajados sólo a 2 lograron descongelar satisfactoriamente las muestras, y con porcentajes de motilidad posdescongelación de 18%.

La motilidad se vió afectada, como ya es conocido, por el proceso de congelación-descongelación (Amann y Pickett, 1987; Amann et al, 1989; Budworth et al, 1988; Cochran et al, 1984; Martin et al, 1979; Mazur, 1984; Palacios et al, 1992; Varner, 1991). En el mejor de los casos la merma resultó en un 40% (cuadro 4). Al analizar los tratamientos en estudio se puede notar que casi todos los tratamientos ofrecen resultados similares en lo que respecta a motilidad, sin embargo, sobresale el efecto producido por el suero bovino al 6%, con una motilidad promedio de 36%, y este mismo diluyente pero al 3% con motilidad de 14%. Sin embargo, es importante tener presente que en el cálculo de motilidad sólo entraron

los resultados de aquellas muestras en los que hubo motilidad. La realidad es que el comportamiento de todos los tratamientos experimentados fue más bajo de lo que la motilidad sugiere, ya que en todos los casos hubo muestras con 0% de motilidad.

Estando tan homogéneo este resultado se podría estimar que tanto el suero bovino al 6%, como el suero equino al 3%, el cual tuvo una motilidad del 27% con un índice de descongelamiento del 86% (12 de 14), son los diluyentes de mejor actuación para con este parámetro.

Cuando la motilidad fue calculada de manera visual la situación no varió mucho, porque siguió siendo el diluyente de suero bovino al 3% el de menor efectividad, el suero bovino al 6% y el suero equino al 3% fueron de los más altos en el grupo homogéneo, pero en este caso correspondió al diluyente con yema de huevo el de mejor resultado a la descongelación. No se han encontrado evidencias anteriores con el uso de este tipo de diluyentes para congelar espermatozoides equinos, por lo que no se puede plantear una comparación al respecto, pero no es desconocido que hasta ahora los experimentos usando yema de huevo, en general, resultan más beneficiosos que con otra clase de diluyentes (Arns et al, 1987), por demás, motivo principal de esta investigación.

En el cuadro 6 se puede notar que la velocidad no se vió tan afectada por el proceso de congelación-descongelación. Esto coincide con resultados obtenidos de

trabajos realizados en otras especies, de lo que se deduce que la diferencia es una pérdida normal (Amann et al, 1989; Jasko et al, 1993). Cuando se analiza el efecto de los diluyentes en descongelación se nota que la computadora detecta que el comportamiento de la yema de huevo provee al espermatozoide capacidad de movilizarse más rápido que algunos otros diluyentes, aunque las diferencias son sutiles, si bien son estadísticamente significativas. En el mismo cuadro se puede apreciar que aquellos diluyentes que tuvieron los mejores índices de motilidad, SB6 y SE3, fueron de los menos eficientes en el estudio de la velocidad, pudiendo especular que dichos componentes, si bien permitieron que se movilaran mas espermatozoides, estos espermatozoides no tienen mejor viabilidad (referida por la rapidez en su movimiento) que los que estan congelados en yema de huevo o albúmina sérica bovina al 2%.

En el caso de la linealidad en el trayecto de los espermatozoides, la computadora determinó que las muestras con yema de huevo se movilaron más linealmente rectas que las demás, incluso que las del semen fresco, presentándose además un ligero despunte del diluyente con suero bovino al 6%. Regresando al terreno de las especulaciones, se podría comentar que debe haber algo en la yema de huevo que permite una mejor "canalización" a las células, vías de comunicación sin espacios para desviarse (Rikmenspoel, 1984; Watson, 1975). Al igual que para los parámetros anteriores, no se encontró en la

literatura resultados que incluyan el efecto de diluyentes sobre la linealidad, no obstante, existen trabajos que han informado una linealidad en posdescongelación de 6 ± 0.7 , independientemente del diluyente utilizado para congelar, la cual concuerda con lo hallado en este estudio (Amann, 1987; Budworth et al, 1988).

Como se comentó anteriormente, las muestras de los tratamientos estudiados no soportaron mas allá de los 10-15 minutos, a excepción de las muestras control, por lo que solamente a éstas se les hizo un seguimiento, que muestra que no hubo diferencia significativa en función del tiempo estudiado en ninguna de las variables consideradas, eso quiere decir que con este diluyente, el de yema de huevo, los espermatozoides subsistieron al periodo de seis horas, aún cuando fueron sometidos a un proceso de incubación inapropiado: medio aerobio, falta de obscuridad total y a temperatura ambiente (Mann, 1964; Varner et al, 1991). Estos datos no difieren en su contexto de cambios en función del tiempo de los encontrados en la literatura en estudios realizados tanto con semen descongelado como con semen fresco diluido y almacenado a diferentes temperaturas, diluyentes, tasas de enfriamiento, etc (Arns et al, 1987; Heiskanen et al, 1987; Kayser et al, 1992; Klem et al, 1984; Kreyder et al, 1985).

Haciendo un análisis global del presente estudio, pareciera que el uso de la yema de huevo en el diluyente

de congelación del semen equino sigue siendo la mejor alternativa, sin embargo, queda la interrogante de si en los demás diluyentes en cuestión el porcentaje de inclusión del ingrediente principal era el adecuado, sobre todo pensando en el aporte lipoproteico de los sueros y la albúmina sérica bovina en comparación al de la yema de huevo. Todos los ingredientes tratados, en algún momento del experimento demostraron que presentaban un beneficio, pero por un lado no eran suficientemente consistentes como la yema de huevo, y por otro lado, la merma encontrada en el proceso de descongelación en algunos casos, hace pensar que se necesita profundizar en el estudio de las posibles causas que motivaron esta pérdida de viabilidad espermática. Es menester proseguir en la consecución de fracciones lipoproteicas y sus correspondientes inclusiones en los diluyentes de congelación que favorezcan aún más la viabilidad del semen equino, pero manteniendo los niveles de osmolaridad adecuados (Amann y Pickett, 1987), tanto mas porque, en estudios preliminares (Jasko, 1993) se ha encontrado que puede existir una posible reacción inmunológica por parte de la yegua hacia la yema de huevo, por tener ésta un volumen considerable en el momento de la inseminación.

6. LITERATURA CITADA

1. Abdelhakeam, A.A., Graham, E.F. and Vázquez, I.A.: Studies on the presence and absence of glycerol in unfrozen and frozen ram semen: fertility trials and the effect of dilution methods on freezing ram semen in the absence of glycerol. *Cryobiology*, 28: 36-42 (1991).
2. Amann, R.P.: Computerized evaluation of stallion spermatozoa. Proc. 33th Ann. Conv. Am. Ass. Eq. Prac., Louisiana U.S.A. nov-dec 1987 453-473.
3. Amann, R.P. and Pickett, B.W.: Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Eq. Vet. Sci.*, 7: 145-173 (1987).
4. Amann, R.P., Blach, E.L. and Bowen, R.A.: Motion of stallion sperm before and after cryopreservation. *J. Reprod. Fert. Abstr.*, 1: 27 (1989).
5. Anzar, M., Hassan, M.M., Graham, E.F., Deyo, R.C.M. and Singh, G.: Efficacy of the hamilton Thorn Motility analyzer (HTM-2030) for the evaluation of bovine semen. *Theriogenology*, 36: 307-317 (1991).
6. Arns, M.J., Webb, G.W., Kreider, J.L., Potter, G.D. and Evans, J.W.: Use of different nonglycosable sugars to maintain stallion sperm viability when frozen or stored at 37°C and 5°C in a bovine serum albumin medium. *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 35: 135-141 (1987).
7. Ast, M., Kahn, D. and Rosenberg, S.: CellSoft versión 3.0 User Manual. *Cryo Resources Ltd.*, New York, U.S.A. (1986).
8. Beall, P.T.: States of water in biological systems. *Cryobiology*, 20: 324-334 (1983).
9. Benjamin, M.M.: Manual de Patología Clínica en Veterinaria, Ed. Limusa, México 1984 pp.131-141.
10. Blach, E.L., Amann, R.P., Bowen, R.A. and Frantz, D.: Changes in quality of stallion spermatozoa during cryopreservation: Plasma membrane integrity and motion characteristics. *Theriogenology*, 31: 283-298 (1989).
11. Boyers, S.P., Davis, R.D. and Katz, D.F.: Automated semen analysis. *Curr. Probl. Obstet. Gynecol. Fertil.*, 12: 167-200 (1989).
12. Budworth, P.R., Amann, R.P. and Chapman, P.L.: Relationships between computerized measurements of motion of frozen-thawed bull spermatozoa and fertility. *J. Androl.*, 9: 41-53 (1988).

13. Bustamante, G.C.: Acción del sulfóxido de dimetil y glicerol como agentes crioprotectores del acrosoma del espermatozoide de carnero durante la congelación. Tesis de Maestría. *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia*. Universidad Nacional Autónoma de México (1980).
14. Clay, C.M., Slade, N.P., Amann, R.P. and Squires, E.L.: Effects of extenders, storage temperature and centrifugation on stallion spermatozoal motility and fertility. *Proc. 10th Int. Congr. Anim. Reprod. and A.I. Illinois U.S.A.* 164-166 (1984a).
15. Clay, C.M., Slade, N.P., Amann, R.P. and Squires, E.L.: Effect of dilution, polyvinil alcohol (PVA) and bovine serum albumin (BSA) on stallion spermatozoa motility. *Proc. 10th Int. Congr. Anim. Reprod. and A.I. Illinois U.S.A.* 167-169 (1984b).
16. Cochran, J.D., Amann, R.P., Froman, D.P. and Pickett, B.W.: Effects of centrifugation, glycerol level, cooling to 5°C, freezing rate and thawing rate on the post-thaw motility of equine sperm. *Theriogenology*, 22: 25-34 (1984).
17. Coulter, G.H. and Foote, R.H.: Lipid deficient extender for bovine spermatozoa: its development and use in measuring freezing-induced lipid loss. *J. Dairy Sci.*, 58: 82-87 (1975).
18. Cristanelli, M.J., Amann, R.P., Squires, E.L. and Pickett, B.W.: Effects of egg yolk and glycerol levels in lactose-egg yolk extender and on freezing rate on the motility of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 24: 681-686 (1985).
19. Cristanelli, M.J., Squires, E.L., Amann, R.P. and Pickett, B.W.: Fertility of stallion semen processed, frozen and thawed by a new procedure. *Theriogenology*, 22: 39-45 (1984).
20. Cummins, J.M., Woodall, P.F.: On mammalian sperm dimensions. *J. Reprod. Fert.*, 75: 153-175 (1985).
21. Daw, A., Farrant, J. and Morris, G.J.: Membrane leakage of solutes after thermal shock or freezing. *Cryobiology*, 10: 126-133 (1973).
22. Deibel, F.C., Crabo, J.F. and Graham, E.F.: Evaluation of six assays of sperm quality by means of their accuracy, precision and sensitivity in separating known induced levels of damage. *Proc. 8th Int. Congr. Anim. Reprod. Artf. Insem.*, 4: 888 (1976).
23. Fahy, G.M.: The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology. *Cryobiology*, 23: 1-13 (1986).
24. Franks, F., Mathias, S.F., Galfre, P., Webster, S.D. and Brown, D.: Ice nucleation and freezing in undercooled cells. *Cryobiology*, 20: 298-309 (1983).

25. Gladen, B.C., Williams, J. and Chapin, R.E.: Issues in the statistical analysis of sperm motion data derived from computer-assisted systems. *J. Androl.*, 12: 89-97 (1991).
26. Gómez, J.A.: The use of bovine blood serum as an extender for bull semen. M.S. Thesis Texas A&M University, U.S.A. 1968.
27. Guay, P., Rondeau, M. and Boucher, S.: Effect of glycerol on motility, viability, aspartate aminotransferase release and of stallion semen before and after thawing. *Eq. Vet. J.*, 13: 177-182 (1981).
28. Harrison, R.A.P., Dott, H.M. and Foster, G.C.: Bovine serum albumin, sperm motility and the "dilution effect". *J. Exp. Zool.*, 222: 81-88 (1982).
29. Heiskanen, M., Pirhonen, A., Koskinen, E. and Mäenpää, P.H.: Motility and ATP content of extended equine spermatozoa in different storage conditions. *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 35: 103-107 (1987).
30. Jasko, D.J.: Evaluation of stallion semen. Memorias del Curso Internacional de Reproducción Equina. *Fac. Med. Vet. Zoot.*, México D.F. 22-24 feb. 1993 99-118.
31. Jasko, D.J., Little, T.V., Smith, K., Lein, D.H. and Foote, R.H.: Objective analysis of stallion sperm motility. *Theriogenology*, 30: 1159-1165 (1988).
32. Jasko, D.J., Moran, D.M., Farlin, M.E., Squires, E.L., Amann, R.P. and Pickett, B.W.: Pregnancy rates utilizing fresh, cooled and frozen-thawed stallion semen. Memorias del Curso Internacional de Reproducción Equina. *Fac. Med. Vet. Zoot. UNAM*, México D.F. 22-24 feb. 1993 77-98.
33. Jiménez, C.F.: Effects of Equex STM and equilibration time on the prefreeze and posthaw motility of equine epididymal spermatozoa. *Theriogenology*, 28: 773-782 (1987).
34. Jiménez, D.A., Chandler, J.E., Adkinson, R.W., Barta, O., Ingraham, R.H. and Saxton, A.: Effect of serum sources and colostrum whey on bovine semen quality and spermatozoa immunoglobulin G immunofluorescence. *J. Dairy Sci.*, 69: 2704-2710 (1986).
35. Jones, R.: The use of dimethyl sulfoxide, glycerol and reconstituted skim milk on the preservation of ram spermatozoa. *Aust. J. Biol. Sci.*, 18: 887-900 (1965).
36. Katz, D.F.: Characteristics of sperm motility. *Ann N.Y. Acad. Sci.*, 637: 09-23 (1991).
37. Katz, D.F. and Davis, R.O.: Automated analysis of human sperm motion. *J. Androl*, 8: 170-181 (1987).

38. Kayser, J.P., Amann, R.P., Shideler, R.K., Squires, E.L., Jasko, D.J. and Pickett, B.W.: Effects of linear cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 38: 601-614 (1992).
39. Kenney, R.M., Hurtgen, J., Pierson, R., Witherspoon, D. and Simons, J.: Clinical fertility evaluation of the stallion. *J. Soc. Theriogenology*, 9 (1983).
40. Klem, M.E., Kreider, J.L. and Potter, G.D.: Influence of blood protein on the motility and viability of equine spermatozoa. Proc. Horse Short Course. Texas A&M University 17-18 May, 1984 37-38.
41. Koskinen, E., Junnila, M., Katila, T. and Soini, H.: A preliminary study on the use of betaine as a cryoprotective agent in deep freezing of stallion semen. *J. Vet. Med.*, 36: 110-114 (1989).
42. Kreider, J.L., Tindall, W.C. and Potter, G.D.: Inclusion of bovine serum albumin in semen extenders to enhance maintenance of stallion sperm viability. *Theriogenology*, 23: 399-408 (1985).
43. Kronfeld, D.S. y Medway, W.: Química sanguínea en: Patología Clínica Veterinaria. Editado por: Medway W., Prier J.E. and Wilkinson J.S., Uteha México, D.F. 1980, 2-60.
44. Larsen, J.E. and Froning, G.W.: Extraction and processing of various components from egg yolk. *Poultry Sci.*, 60: 160-167 (1981).
45. Lehninger, A.L.: Bioquímica. 2da ed., Ed. Omega, Barcelona, España (1985).
46. Levine, R.J., Ravi, M.M., Brown, M.H., Hurtt, M.E., Bentley, K.S. and Moho, K.L.: Computer assisted semen analysis: results vary across technicians who prepare videotapes. *Fertil. and Steril.*, 52: 673-677 (1989).
47. Littell, R.C., Freund, R.J. and Spector, P.: SAS System for linear models, 3rd ed., SAS Institute Inc. Cary, NC. U.S.A. (1991).
48. Love, C.C., Loch, W.L., Bristol, F., García, M.C. and Kenney, R.M.: Comparison of pregnancy rates achieved with frozen semen using two packaging methods. *Theriogenology*, 31: 613-622 (1989).
49. Mahony, M.C., Alexander, N.J. and Swanson, R.J.: Evaluation of semen parameters by means of automated sperm motion analyzers. *Fertil. Steril.*, 49: 876-880 (1988).

50. Mann, T.: The biochemistry of semen and of the male reproductive tract. *Methuen & Co. Ltd*, London 1964.

51. Marion, J.E., Woodroof, J.G. and Tindell, D.: Physical and Chemical properties of eggs as affected by breeding and age of hens. *Poultry Sci.*, 44: 1189-1195 (1965).

52. Martin, J.C., Klug, E. and Gunzel, A.: Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 27: 47-51 (1979).

53. Mazur, P.: Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am. J. Physiol.*, 247: 125-142 (1984).

54. Montes, R.C.: Comparación de tres fuentes biológicas para producir anticuerpos contra progesterona para utilizarse en radioinmunoanálisis o enzimoimmunoanálisis. Tesis de Doctorado. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Universidad Nacional Autónoma de México, (1991).

55. Morales, P., Katz, D.F., Overstreet, J.W., Samuels, S.J. and Chang, R.J.: The relationship between the motility and morphology of spermatozoa in human semen. *J. Androl.*, 9: 241-247 (1988).

56. Mortimer, D., Serres, C. Mortimer, S.T. and Jouannet, P.: Influence of image sampling frequency on the perceived movement characteristics of progressively motile human spermatozoa. *Gamete Res.*, 20: 313-327 (1988).

57. Palacios, A.: La computación como herramienta para la evaluación espermática: Uso del Programa para Análisis de Semen equino. Sistema P.A.S. Memorias del Curso Internacional de Reproducción Equina. México D.F. 22-24 feb. 1993a 119-125.

58. Palacios, A.: Uso de la computadora en la evaluación de semen. *Vet. Mex.*, 24: 93-95 (1993b).

59. Palacios, A., Valencia, J. y Zarco, L.: Efecto del sistema de envasado y la concentración espermática sobre el daño acrosomal y la motilidad posdescongelación del semen de equino. *Vet. Mex.*, 23: 315-318 (1992).

60. Parks, J.E. and Graham, J.K.: Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, 38: 209-222 (1992).

61. Pedigo, N.G., Vernon, M.W., Curry, T.E.: Characterization of a computerized semen analysis system. *Fertil. and Steril.*, 52: 659-666 (1989).

62. Phillips, P.H. and Lardy, H.A.: A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull semen. *J. Dairy Sci.*, 23: 399-404 (1940).

63. Pickett, B.W. and Amann, R.P.: Extension and storage of stallion spermatozoa: A review. *Eq. Vet. Sci.*, 7:289-301 (1987).
64. Pontbriand, D., Howard, J.G., Schiewe, M.C., Stuart, L.D. and Wildt, D.E.: Effect of cryoprotective diluent and method of freeze-thawing on survival and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiology*, 26: 341-354 (1989).
65. Province, C.A., Squires, E.L., Pickett, B.W. and Amann, R.P.: Cooling rates, storage temperatures and fertility of extended equine spermatozoa. *Theriogenology*, 23: 925-934 (1985).
66. Pruitt, J.B.: Fertility of stallion semen extended with a sucrose-BSA extender. M.S. Thesis *Texas A&M University, U.S.A.* (1985).
67. Reid, J.L.: An application of a bovine serum albumin extender for stallion semen. M.A. Thesis *Texas A&M University, U.S.A.* 1986.
68. Rikmenspoel, R.: Movements and active moments of bull sperm flagella as a function of temperature and viscosity. *J. exp. Biol.*, 108: 205-230 (1984).
69. Rudolph, A.S., Crowe, J.I., Spargo, B. and Crowe, L.M.: Interaction of cryoprotectants with lipid bilayers. *Cryobiology*, 23: 543 (abstract) (1986).
70. Salisbury, G.W., Fullers, H.K. and Willett, E.L.: Preservation of bovine spermatozoa in poly-citrate diluent and field results from its use. *J. Dairy Sci.*, 24: 910 (1941).
71. Senger, P.L., McCutchan, J.F. and Hillers, J.K.: Influence of blood serum from bulls and heifers on head-to-head agglutination and acrosomal maintenance in bovine spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 25: 433-437 (1981).
72. Squires, M.W. and Naber, E.C.: Vitamin profiles of eggs as indicator of nutritional status in the laying hen: Vitamin B-12 study. *Poultry Sci.*, 71: 2075-2082. (1992).
73. Stephens, D.T., Hickman, R. and Hoskins, D.D.: Description, validation and performance characteristics of a new computer-automated sperm motility analysis system. *Biol. Reprod.*, 38: 577-586 (1988).
74. Tuli, R.K., Schmidt-Baulian, R. and Holtz, W.: Computer-assisted motility assessment of spermatozoa from fresh and frozen-thawed semen of the bull, boar and goat. *Theriogenology*, 38: 487-490 (1992).

75. Vantman, D., Koukoulis, G., Dennison, L., Zinaman, M. and Sherins, R.: Computer-assisted semen analysis: evaluation of method and assessment of the influence of sperm concentration on linear velocity determination. *Fertil. Steril.*, 49: 510-515 (1988).

76. Varner, D.D.: Collection and preservation of stallion spermatozoa. Proc. Ann. Meet. Soc. Theriogenology, New York, U.S.A.: 13-33 (sept. 17-19, 1986).

77. Varner, D.D., Vaughan, S.D. and Johnson, L.: Use of a computerized system for evaluation of equine spermatozoal motility. *Am. J. Vet. Res.*, 52: 224-230 (1991).

78. Volkmann, D.H.: Acrosomal damage and progressive motility of stallion semen frozen by two methods in 0.5 milliliter straws. *Theriogenology*, 27: 689-698 (1987).

79. Wang, C., Leung, A., Tsoi, W., Leung, J., Ng, V., Lee, K. and Chan, S.Y.W.: Computer-assisted assessment of human sperm morphology: comparison with visual assessment. *Fertil. Steril.*, 55: 983-988 (1991).

80. Warren, M.W. and Ball, H.R.: Lipid composition of hexane and supercritical carbon dioxide reduced cholesterol dried egg yolk. *Poultry Sci.*, 70: 1991-1997 (1991).

81. Watson, P.F.: The interaction of egg yolk and ram spermatozoa studied with a fluorescent probe. *J. Reprod. Fert.*, 42: 105-111 (1975).

82. Watson, P.F.: Problems in the cryopreservation of mammalian spermatozoa. *Cryobiology*, 23: 547 (abstract) (1986).

CUADRO 1

Análisis de Correlación Simple entre las variables Motilidad, Velocidad, Linealidad y Concentración Espermática para los datos de semen fresco.

MOT.	VEL.	LIN.	CONC
MOT. -----	r = 0.7069 p = 0.0047	r = 0.2822 p = 0.3283	r = -0.1910 p = 0.5131
VEL.	-----	r = 0.6705 p = 0.0087	r = 0.0082 p = 0.9779
LIN.		-----	r = 0.3861 p = 0.1728

r = Coeficiente de correlación

p = Nivel de significancia

n = 14

CUADRO 2

**Análisis de Correlación Simple entre las variables
Motilidad, Velocidad, Linealidad y Concentración Espermática
para los datos de los tratamientos estudiados**

	MOT.	VEL.	LIN.	CONC.
MOT.	-----	r = -0.0317 p = 0.8215	r = 0.1528 p = 0.2748	r = 0.2723 p = 0.0486
VEL.		-----	r = 0.3905 p = 0.0038	r = -0.2982 p = 0.0301
LIN.			-----	r = -0.3683 p = 0.0067

r = Coeficiente de correlación
p = Nivel de significancia
n = 53

CUADRO 3

Análisis de Correlación Simple entre las variables Motilidad evaluada por la computadora, Motilidad evaluada visualmente y la Concentración Espermática de la muestra calculada por la computadora.

	COMPUTADORA	VISUAL	CONCENTRACION
COMPUTADORA	-----	r = 0.8100 p = 0.0000	r = 0.0264 p = 0.8321
VISUAL		-----	r = -0.1549 p = 0.2106

r = Coeficiente de correlación
p = Nivel de significancia
n = 67

CUADRO 4

Evaluación de la Motilidad realizada por la computadora para los diferentes tratamientos en estudio, como para el semen fresco.

TX	n ORIGINAL	n VIABLE POSDESCONGELACION	MOTILIDAD (% \pm e.e.)
SF	14	14	60.51 \pm 3.07 ^a
SE3	14	12	27.43 \pm 3.32 ^{bc}
SE6	14	6	18.21 \pm 4.70 ^{bc}
SB3	14	8	14.04 \pm 4.07 ^c
SB6	14	5	36.28 \pm 5.15 ^b
AS2	14	5	11.38 \pm 5.15 ^{bc}
AS3	14	3	33.08 \pm 6.65 ^{bc}
YH	14	14	29.39 \pm 3.07 ^{bc}

Literales de renglón diferentes varían significativamente. (P<0.01)

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

CUADRO 5

Evaluación de la Motilidad realizada visualmente para los diferentes tratamientos en estudio, como para el semen fresco.

TX	n ORIGINAL	n VIABLE POSDESCONGELACION	MOTILIDAD (% ± e.e.)
SF	14	14	57.85 ± 2.74 ^a
SE3	14	12	19.58 ± 2.97 ^{bc}
SE6	14	6	12.91 ± 2.97 ^c
SB3	14	8	12.91 ± 2.97 ^c
SB6	14	5	16.66 ± 3.42 ^{bc}
AS2	14	5	16.50 ± 3.25 ^{bc}
AS3	14	3	19.00 ± 4.60 ^{bc}
YH	14	14	29.85 ± 2.74 ^b

Literales de renglón diferentes varían significativamente. (P<0.001)

CUADRO 6

Evaluación de la Velocidad para los diferentes tratamientos en estudio, como para el semen fresco.

TX	n ORIGINAL	n VIABLE POSDESCONGELACION	VELOCIDAD ($\mu\text{m}/\text{seg} \pm \text{e.e.}$)
SF	14	14	71.86 \pm 2.26 ^a
SE3	14	12	52.37 \pm 2.38 ^c
SE6	14	6	53.54 \pm 3.37 ^{bc}
SB3	14	8	49.07 \pm 2.92 ^c
SB6	14	5	45.85 \pm 3.69 ^c
AS2	14	5	62.59 \pm 3.69 ^{abc}
AS3	14	3	54.07 \pm 4.77 ^{bc}
YH	14	14	64.29 \pm 2.26 ^{ab}

Literales de renglón diferentes varían significativamente.
(P<0.001)

CUADRO 7

Evaluación de la Linealidad para los diferentes tratamientos en estudio, como para el semen fresco.

TX	n ORIGINAL	n VIABLE POSDESCONGELACION	LINEALIDAD (1 - 10 ± e.e.)
SF	14	14	4.33 ± 0.31 ^b
SE3	14	12	4.64 ± 0.31 ^b
SE6	14	6	4.07 ± 0.44 ^b
SB3	14	8	3.71 ± 0.38 ^b
SB6	14	5	5.12 ± 0.48 ^{ab}
AB2	14	5	4.01 ± 0.48 ^b
AS3	14	3	4.04 ± 0.62 ^b
YH	14	14	6.18 ± 0.28 ^a

Literales de renglón diferentes varían significativamente. (P<0.001)

CUADRO B

Evaluación de la Motilidad, Velocidad y Linealidad del semen diluido en yema de huevo, en función del tiempo en posdescongelación.

TIEMPO*	MOTILIDAD (% ± e.e.)	VELOCIDAD (µm/seg ± e.e.)	LINEALIDAD (1 - 10 ± e.e.)
1	29.39 ± 2.66	64.29 ± 2.13	6.18 ± 0.19
2	34.20 ± 2.66	60.55 ± 2.13	5.38 ± 0.19
3	29.43 ± 3.16	60.69 ± 2.54	5.37 ± 0.23
4	29.13 ± 4.94	57.84 ± 3.97	5.41 ± 0.36
5	34.16 ± 5.53	58.76 ± 4.44	5.72 ± 0.40
6	32.77 ± 10.95	74.02 ± 8.80	7.33 ± 0.80

* El tiempo entre cada evaluación fue de 1 hora.
Para todos los análisis (P>0.05).

FIGURA 1

AJUSTE DE LOS PARAMETROS DE MEDICION:

NUMERO DE CUADROS A ANALIZAR: [15]
NUMERO DE CUADROS POR SEGUNDO: [30]

MUESTRA MINIMA PARA MOTILIDAD: [1]
MUESTRA MINIMA PARA VELOCIDAD: [3]

VELOCIDAD MAXIMA ($\mu\text{m}/\text{seg}$): [200]
VELOCIDAD MINIMA ($\mu\text{m}/\text{seg}$): [20]
NIVEL UMBRAL DE GRIS: [55]

ESCALA PIXEL ($\mu\text{m}/\text{pixel}$): [1.376]
FACTOR DE DILUCION: [1]
RANGO DE TAMAÑO CELULAR (pixels): [15] [60]

(Ast et al, 1986; Palacios, 1993)