

16  
20



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES**  
**CUAUTITLÁN**

**“EFECTO DE LA CENTRIFUGACION Y TIEMPO DE  
ALMACENAMIENTO SOBRE LA MOTILIDAD PROGRESIVA  
Y LA MORFOLOGIA DE ESPERMATOZOIDES DE  
VERRACO CONGELADOS EN DOS DILUENTES”**

**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:**  
**MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**  
**P R E S E N T A N**  
**ROBERTO CASTILLO DELGADO**  
**FRANCISCO REYES HERNANDEZ**  
**ASESOR: M.V.Z. ARTURO ANGEL TREJO GONZALEZ**

**CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MEX. 1987**



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.

## I N D I C E

I RESUMEN.....	1
II INTRODUCCION.....	3
III OBJETIVOS.....	7
IV REVISION LITERARIA.....	8
V MATERIAL Y METODO.....	22
VI RESULTADOS.....	28
VII DISCUSION.....	42
VIII CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES....	45
XI ANEXOS.....	47
X LITERATURA CITADA.....	48

CASTILLO DELGADO ROBERTO Y REYES HERNANDEZ FRANCISCO.

" EFECTO DE LA CENTRIFUGACION Y TIEMPO DE ALMACENAMIENTO SOBRE LA MOTILIDAD PROGRESIVA Y LA MORFOLOGIA DE ESPERMATOZOIDES DE VERRACO CONGELADOS EN DOS DILUYENTES."

Los objetivos de este trabajo fueron: 1) determinar el efecto de la centrifugación sobre las cualidades del espermatozoide descongelado de verraco. 2) comparar dos diluyentes para determinar qué diluyente puede preservar mejor las cualidades del espermatozoide de verraco descongelado en diferentes tiempos.

Del semen de cada eyaculado se tomaron cuatro alícuotas, dos de 3 ml. para ser centrifugadas a 1000 rpm. durante 10 mint. quedando 1 ml. aproximadamente de paquete celular, por otro lado se tomaron dos alícuotas de 1 ml. de semen. En ambos casos el semen fué diluido con los diluyentes TFE compuesto a base de Tris, Fructuosa, Acido Cítrico, EDTA, Yema de Huevo y glicerol. y el BF3 constituido por Tris, Fructuosa, Acido Cítrico, Lactosa, Caseína y glicerol. A una temperatura entre 25-30 °C. empleando un período de enfriamiento de 4 hr. para alcanzar una temperatura de 4 °C. momento en que se adicionó el glicerol. Posteriormente el semen se envasó en forma de pastillas para su almacenamiento en nitrógeno líquido, posteriormente se descongelaron las muestras a la semana y al mes en la solución descongeladora de BTS compuesta por Dextrosa Anhidrida, Citrato de Sodio, Bicarbonato de Sodio, EDTA, Cloruro de potasio. A una temperatura de 40 °C.

El semen fué evaluado en todos los casos antes y después del proceso de congelación. Las cualidades espermáticas de los tres verracos utilizados se vieron igualmente modificadas indicando que no hubo efecto del macho en la congelación del semen.

En cuanto a motilidad progresiva y morfología espermática se puede asumir que: La congelación no aumento las anormalidades primarias y secundarias de los espermatozoides. El semen descongelado mostró un rango de  $11.19 \pm 6.68$  a  $22.27 \pm 12.95$  de recuperación de la motilidad progresiva y un área de  $24.19 \pm 3.35$  a  $35.07 \pm 12.52$  de espermatozoides con acrosoma tipo NAR. El diluyente TFE se comporto mejor que el diluyente BFJ y el efecto de centrifugación se acentuó más en el diluyente TFE ya que fué positivo para la recuperación seminal al descongelado, el tiempo de almacenamiento afecto considerablemente las cualidades del semen al descongelarlo al mes, el semen aquí tratado reunió las características para ser aplicado en explotaciones de tipo comercial.

## I N T R O D U C C I O N

La sobre población del país ha traído como consecuencia grandes problemas para la sociedad. De mayor importancia entre otros la alimentación de la población (5).

De las fuentes de alimentación las proteínas de origen animal son las más importantes, por esto es importante realizar nuevas técnicas y métodos que eleven en cantidad y calidad genética a nuestros hatos para obtener animales con mayor rendimiento (5).

Por ser la población porcina una importante fuente de carne para el abasto es necesario la aplicación de programas tales como alimentación, medicina preventiva, reproductivos, genéticos y de comercialización lo que repercutiría en el incremento de nuestra producción (5).

Dentro de los programas reproductivos y genético la inseminación artificial con semen fresco de verraco ha permitido alcanzar a pasos agigantados una ganadería más productiva, por lo tanto un gran número de porcicultores la han puesto en práctica como método de reproducción con sementales genéticamente superiores en cuanto a índices de selección, lo que permitiría eliminar a corto plazo los cerdos tipo grasa e ir substituyéndolos por cerdos con menor conversión alimenticia de tipo carne en forma más extensa y económica (13).

Otra alternativa para mejorar la calidad genética de nuestros hatos porcinos es la inseminación artificial con semen congelado de verraco.

Desde que los investigadores lograron la congelación de semen de toro desde hace más de treinta años. Se aplicaron técnicas similares para la congelación de semen de verraco las cuales produjeron pérdida irreversible de la capacidad fertilizante de los espermatozoides (7).

En la década pasada se desarrollaron un gran número de técnicas (cuadro 1) para la preservación del semen de verraco por medio de la congelación lo que ha permitido su utilización en forma más extensa (14,15).

Dichas técnicas tuvieron como resultado numerosos reportes de logros en la preservación de la motilidad y reportes de aceptable fertilidad, muchos componentes del proceso de congelación variaron ampliamente, sin embargo en todos los procedimientos se usaron bajas concentraciones de glicerol como agente crioprotector y el tiempo de equilibrio fué corto (7).

La mayor cantidad de reportes se refieren al diluyente conocido como Beltville BF5 el cual ha sido ampliamente usado por ser el que mejor preserva la motilidad y capacidad fertilizante del es-

permatozoide (2,7,14,15,27,28,33,34,35,37).

Sin embargo se sabe que el espermatozoide de verraco es el que más daño sufre durante el proceso de congelación reflejado en la pérdida irreversible de la motilidad. La susceptibilidad al choque frío se debe básicamente a que la membrana plasmática del espermatozoide de verraco es sumamente permeable al glicerol y además porque posee un factor plasmático que impide que las lipoproteínas de la yema de huevo se fijen a la membrana y su efecto -- crioprotector, por tanto es incompleto (44).



C U A D R O 1

COMPOSICION DE LOS DILUENTES UTILIZADOS PARA LA  
CONGELACION DE SEMEN DE VERRACO.

AUTOR Y AÑO.	TIPO DE DILUENTE.	TIEMPO DE ALMACENAMIENTO.	CONCENTRACION ESPERMATICA INSEMINADA.	FERTILIDAD INSEM./PARIDAS.	NUMERO DE LECHONES POR CERDA.
Crabo y Einarsson 1971.	TES-gluc. Yh-2-3% glic.	1-7 dias.	$2.5 \times 10^9$	4 100%	8
Graham 1971	TES-sol. iso.de fruc. CtNa.	-----	$2.5 \times 10^9$	26 76%	10.6
Crabo y Einarsson 1971.	TES-gluc.- Yh-glic.	-----	$2.5 \times 10^9$	14 71%	8.3
Pursel y Jhonson 1971.	BP3	-----	$2 \times 10^9$	28 46%	7.8
Einarsson 1972.	TESNaK- Yh. gluc.glic.	-----	$2-2.5 \times 10^9$	10 70%	10.6
Vicente 1972.	Ct.Na-gluc. kCL. Bicar.	-----	-----	19 26%	7.8

AUTOR Y AÑO.	TIPO DE DILUENTE.	TIEMPO DE ALMACENAMIENTO.	CONCENTRACION ESFERMÁTICA (ESPERMIALES).	FERTILIDAD (HEM./DARIDAS).	NÚMERO DE LECHEONES POR CENDA.	
Richter y Liedcke. 1973.	Halsenberg.	-----	$4.7 \times 10^9$	24	75%	7.4
Boonke 1974.	-----	-----	$2.4-3.7 \times 10^9$	21	57%	5.7
Graham y Ren 1974.	-----	-----	$2.5 \times 10^9$	13	46%	---
Burzel y Johnson 1975.	BF5	-----	$6 \times 10^9$	26	76%	10.5
Paquinon y Coupet 1975.	Halsenberg.	-----	$4.4 \times 10^9$	43	46%	7.4
Salamon y Visser 1975	Tris-fruc.-glic.	-----	$8-15 \times 10^9$	8	87%	10.5
Larson 1976.	Tris-glic.-Fruc.-glic.	-----	$6 \times 10^9$	22	72%	7.8
Maxwell y Salamon 1979.	TFE	2.5 años	$9 \times 10^9$	16	68%	9.4
Paquinon. 1980.	Halsenberg.	-----	$4.7 \times 10^9$	18	50%	---

Glic. = Glucosa.  
 Fruc. = Fructosa.  
 Glic. = Glicerol.  
 Bicar. = bicarbonato.

Cl. H3. = Citrato de Sodio.  
 YH. = Yema de Huevo.  
 Sol. Iso. = Solución Isotónica.

O B J E T I V O S

- DETERMINAR EL EFECTO DE LA CENTRIFUGACION SOBRE LAS CUALIDADES DEL ESPERMATOZOIDE DESCONGELADO DE VERRACO.
  
- COMPARAR DOS DILUENTES PARA DETERMINAR QUE DILUENTE PUEDE PRESERVAR MEJOR LAS CUALIDADES DEL ESPERMATOZOIDE DESCONGELADO DE VERRACO EN DIFERENTES TIEMPOS.

## REVISION LITERARIA

### RECOLECCION DEL SEMEN.

Se han descrito tres diferentes métodos de recolección del semen de verraco:

#### Vagina Artificial.

Este método es el que más se parece a las condiciones naturales, con él se pretende simular la temperatura, presión, lubricación y posición de la vagina de la hembra con el objeto de obtener del macho los mejores resultados. Este método esta poco difundido para el verraco (4,10).

#### Mano Enguantada.

Es la técnica más utilizada, que consiste en sujetar el glande del pene con la mano enguantada a medida que sale del prepucio aplicando una presión constante para estimular la eyaculación la cual puede durar entre cinco y quince minutos. En forma natural el verraco eyacula cuando el glande en forma de espiral se encuentra atrapado dentro del cervix del útero de la cerda el cual ejerce una presión constante (10).

#### Electroeyaculación.

Para el uso de este método se requiere sedación o anestesia general, una sonda bipolar que se introduce dentro del recto, la

cual produce pulsaciones de bajo voltaje que estimula la musculatura del aparato genital provocando la eyaculación (4).

El eyaculado del verraco para su estudio se ha dividido en tres fracciones.

#### Fracción preespermática.

Contiene fluidos seminales con alto contenido de bacterias y material gelatinoso que proviene de la glándulas bulbouretrales o de Cowper por lo cual debe desecharse y es de aspecto claro (4).

#### Fracción espermática.

Es líquida de color cremoso emitida en intervalos cortos durante la eyaculación, conocida como fracción rica y fluctúa entre 50-120 ml. (3,4,10).

#### Fracción postespermática.

Contiene líquido de las glándulas vesículas seminales y material gelatinoso el cual se separa con un filtro de gasa que cubre el instrumento de recolección, Teniendo como función en forma natural de sellar el cervix del útero de la cerda para evitar el reflujo de espermatozoides (3,4,10).

### Frecuencia de recolección.

La pubertad del semental porcino, por término general se presenta cuando cuenta con cinco o seis meses de edad. A medida que la edad del cerdo aumenta, se eleva el número total de espermatozoides en el eyaculado, a los seis y medio meses se alcanza el límite en la calidad de los eyaculados de tal manera que desde los ocho meses de edad los verracos jóvenes pueden ser trabajados una o dos veces por semana, aún sin sobrepasar el máximo de seis eyaculaciones mensuales (10).

Los verracos de más de un año de edad se pueden incluir en un ritmo normal de obtención de semen, es decir de dos a tres eyaculados por semana y un máximo de ocho a nueve por mes (4,10).

Al aumentar la frecuencia de obtención del semen, de un eyaculado cada dos semanas a dos eyaculados por día disminuyeron los valores referentes a volumen, concentración total por eyaculado, incidencia de gota citoplasmática distal y formas anormales en la región de la cola (11).

### Evaluación del semen.

El principal objetivo de los métodos IN VITRO para medir el potencial de la capacidad fertilizante, es determinar cuantas y cuales células son funcionalmente competentes para llevar a cabo el proceso de fertilización (3).

Los criterios más comúnmente usados para la clasificación del semen son: Concentración que en el verraco va de 200-300 x 10<sup>6</sup> espermatozoides por ml., Motilidad progresiva que va del 50-80%, Normalidades espermáticas del 70-80%, el Volumen que va 150-300 ml. (10).

La evaluación de la motilidad progresiva es uno de los criterios más usados para determinar la calidad del semen de verraco antes de ser sometido al proceso de congelación y descongelación (17,18,20).

La evaluación de la motilidad progresiva debe realizarse inmediatamente después de colectado y descongelado el semen, se coloca una gota de semen diluido (1:10) en una laminilla tibia (38 °C), limpia y seca. Dicha prueba se fundamenta en la determinación subjetiva de los espermatozoides que se mueven de un punto a otro del campo microscópico en línea más o menos recta. La evaluación se realiza con aumento de 40X y se expresa en múltiplos de diez (4).

#### Morfología del espermatozoide.

Los defectos del espermatozoide se han dividido en dos grupos: 1) Anomalías primarias.- que son aquellas que se desarrollan durante la espermatogénesis y son causadas por procesos patológicos en el epitelio germinal. 2) Las anomalías secundarias.-son las desviaciones que probablemente se originan después de que las células

las espermáticas abandonan el testículo (4,10,47).

Es común encontrar eyaculados que contengan espermatozoides con algún defecto, de ahí que en el cerdo se considere que un eyaculado es normal cuando tenga menos de: 5% de cabezas deformes, 10% de gotas citoplasmáticas proximales, 5% de anomalías en el segmento de la pieza intermedia y 5% de colas dobladas (11).

#### Integridad acrosomal.

La porción final anterior del núcleo del espermatozoide se cubre por el acrosoma, que es un saco membranoso delgado de doble capa que se adosa fuertemente al núcleo durante la espermiogénesis. Esta estructura similar a un capuchón contiene enzimas hidrolíticas tales como la acrosina, hialuronidasa, y enzima penetradora de la corona que durante el proceso de fecundación el esperma sufre la reacción acrosomal en la cual el contenido espermático es liberado por orificios creados por fusión de membranas plasmáticas y acrosomales externas. Es por esto que la integridad del acrosoma es una buena medida de la capacidad fertilizante del espermatozoide (4,10).

Durante los años recientes el examen morfológico de los acrosomas espermáticos con un microscopio de contraste de fase ha sido un valioso criterio para la evaluación de los espermatozoides (30, 31,33)



Larsson et al. (20) solo toman en cuenta tres categorías: NA acrosomas normales, son aquellos que tienen un borde apical bien delineado sin signos de hinchazón; DA acrosomas dañados, en este grupo se incluyen un número variado de anomalías, pero sin pérdida de la substancia acrosomal; SDA acrosomas severamente dañados, en estos el borde acrosomal está desintegrado con aparente pérdida de la substancia acrosomal.

Pursel et al. (30,31). Categorizan en cinco grupos la morfología del espermatozoide de acuerdo a la integridad del acrosoma: 1) NAR si la capa acrosomal se adhiere suavemente al núcleo y posee un borde apical liso; 2) NAR' estos espermatozoides son iguales a los anteriores excepto por la adherencia de partículas pequeñas a la capa acrosomal; 3) DAR estos espermatozoides fueron identificados si el borde posterior de la cresta apical era más amplio y tenía forma irregular; 4) MAR son espermatozoides que han perdido la cresta apical, pero la capa anterior del acrosoma permanece estrechamente adherida a la cabeza del espermatozoide; 5) LAC son espermatozoides caracterizados por vesiculación del capuchón acrosomal anterior.

Potter et al. (27). solo concideran cuatro categorías de daño acrosomal; Acrosomas normales, acrosomas con ligero daño, acrosomas severamente dañados y pérdida del acrosoma durante el proceso de enfriamiento y congelación de los espermatozoides sufren la pérdida

de la motilidad, pero además existe pérdida irreversible de la actividad metabólica, licuado de enzimas y proteínas intracelulares. Incremento de la permeabilidad de la membrana celular a las tinciones y el acrosoma sufre pérdida marcada o desintegración que va acompañada de salida de enzimas que juegan un papel importante en la penetración (30).

Estudiando la motilidad a gran aumento vieron que los espermatozoides clasificados como DAR y MAR frecuentemente son móviles pero, los LAC no lo son y los NAR se encuentran móviles o inmóviles (30).

La motilidad y la morfología espermática guardan una relación inseparable; Wilmut et al. (47). obtuvieron una buena recuperación de la motilidad, pero encontraron que a medida que la motilidad era mejor el número de células espermáticas disminuía.

Durante la glicerolización del semen que se va a congelar, se dan cambios bioquímicos en el espermatozoide, estos consisten en una pérdida de enzimas del acrosoma (hialuronidasa, acrosina) y de la pieza intermedia (GOT) las cuales pueden ser medidas (44).

La liberación de GOT dentro del medio extracelular es el mejor indicador de daño celular. De ahí que se haya usado para estudiar los efectos de diferentes concentraciones de glicerol en las

técnicas de congelación de semen de verraco (1,14,15).

Larsson y Einarsson (18). encontraron que había relación entre la fertilidad y la liberación de aspartato aminotransferasa. (ASAT) en el semen de verraco e indican la posibilidad de detectar a los verracos que producen semen de baja congelabilidad por medio de esta prueba de laboratorio.

Por otro lado Moore e Habbit (23). demuestran que los altos niveles de enzimas liberadas, después del descongelamiento, no son indicadores exactos de la capacidad fertilizante del semen de verraco que ha sido congelado y descongelado.

La retención de la enzima acrosomal acrosina en forma de proacrosina ha sido usada para medir el potencial del espermatozoide en la fertilización, pero resulta poco útil por su complejidad (3).

Composición de los diluentes usados para la congelación del semen de verraco.

Desde el inicio de la inseminación artificial con semen diluido de verraco se han venido implementando una gran cantidad de diluentes o medios para congelar teniendo como objetivo: Proveer de nutrientes para el proceso metabólico del espermatozoide, protección del choque frío neutralizar los efectos tóxicos de sustancias producidas por el metabolismo del espermatozoide, mantener una presión osmóti-

ca y un balance mineral (46).

En forma general los diluentes están compuestos por: a) Azúcares, b) Proteínas, c) Soluciones amortiguadoras y d) glicerol, adicionalmente ácidos o bases pueden ser incluidos para ajustar el pH.

Debido quizá a la carencia de azúcares en el moco estral y a la poca cantidad de fructuosa en el plasma seminal y escasa reserva energética del espermatozoide (4). Los azúcares vienen formando la mayor parte de los componentes del diluyente (38). Los azúcares más utilizados son la arabinosa, manosa, glucosa, lactosa, sucrosa, fructuosa y rafinosa (41).

Las proteínas o lipoproteínas protegen al espermatozoide durante la congelación y son provistas generalmente por la yema de huevo, leche descremada y pausterizada a 90 °C. para inactivar el factor tóxico la lactenina, también se puede adicionar la caseína al diluyente en forma pura (4,26)

El efecto protector de la yema de huevo se debe a que fortifica las membranas de las células vivas por los lípidos polares, este efecto protector se mantiene después de la total remoción de la yema de huevo del medio intercelular demostrándose que existen componentes antichoque los cuales podrían usarse para dar protección al semen (26).

La caseína o proteína láctea tiene el mismo papel que las proteínas de la yema de huevo, la caseína se adhiere a la membrana espermática proporcionando estabilidad y fortaleza al choque frío (23).

El papel de las soluciones amortiguadoras es mantener el pH del diluyente y proporcionar un medio isotónico al espermatozoide (38). Las principales soluciones amortiguadoras utilizadas en la congelación del semen de verraco son el hidroximetil-2- aminoetano sulfónico (TES-N-TRIS), hidroximetil aminometano (TRIS), TESNaK y el Citrato de sodio.

El glicerol es importante en la congelación de semen de verraco pues mantiene la capacidad fertilizante del espermatozoide tiene como papel unirse al agua intra y extracelular disminuyendo el punto de congelación de las soluciones, deshidratando parcialmente al espermatozoide, reduciendo aún más la selectividad de la congelación del agua (4).

Hood y Foley et al. (9). concluyeron que el efecto crioprotector del DMSO (sulfoxido de dimetilo) y el glicerol son similares ya que la concentración de los cationes sodio, potasio, magnesio y zinc variaron muy poco durante el proceso de congelación al comparar los dos tratamientos (8,36).

Wilmut et al. (47). usando concentraciones de glicerol de 2.5, 5.0 y 7.5% encontraron los mejores resultados con la concentración del 5% si el período de enfriamiento se extendía de una a dos horas. Sin embargo en la actualidad es común el uso del glicerol en los medios para congelar semen de verraco en una concentración del 1 al 2%.

La introducción en el diluyente de sustancias que actúen en la superficie celular, resulta en la dispersión de los conglomerados de yema los cuales se forman inmediatamente después de la dilución, este fenómeno aumenta el efecto estabilizador de la membrana por la lipoproteína de la yema de huevo, aumentando el porcentaje de espermatozoides móviles y el porcentaje de espermatozoides con el borde acrosomal normal después de la descongelación. Una de estas sustancias es la pasta orvus (OEP) la cual mejora la fertilidad (26,34).

La susceptibilidad al choque frío disminuye notablemente al hacer diluciones no mayores de 1:2 y mantener al semen ya diluido en un período de incubación de 5hr mínimo ya que el espermatozoide de verraco adquiere dicha resistencia la cual es una propiedad inherente (25,32).

Envasado del semen de verraco que va a ser congelado.

Los espermatozoides de verraco que van a ser sometidos al proceso de congelación se envasan en dos formas: 1) Pastillas de 0.1 a 0.25 ml., 2) En popotes de plástico que almacenan un volumen de 5 a 10 ml. La forma más común de envasar es en forma de pastillas las cuales se preparan mediante el pipeteo de gotas de semen diluido en depresiones hemisféricas hechas en un bloque de hielo seco (24). Este método es el que ha garantizado la mejor sobrevivencia de espermatozoides con aceptable capacidad fertilizante y por ello es el más ampliamente usado (1,2,7,12,14,15,19,21).

Métodos y medios para descongelar el semen de verraco que ha sido congelado.

Caen en dos categorías:

- a) Descongelamiento en un recipiente caliente sin la dilución simultánea de los espermatozoides.
- b) Descongelamiento del semen en una solución caliente, descongelando y diluyendo el semen simultáneamente.

Este último procedimiento parece ofrecer mayores ventajas debido a que la solución caliente cubre toda la superficie de las pastillas con la aceleración del ritmo de descongelación y un incremento en la sobrevivencia de los espermatozoides (14,28,35).

Se reportaron mejores resultados con el sistema de descongelación en seco, a temperaturas que van de 50 a 60 °C (7).

Respecto a la temperatura para descongelar la mayoría de los investigadores han encontrado óptimos resultados descongelando a 50 °C. (37).

Cuando se usa el sistema de popotes para congelar el semen de verraco se usan dos procedimientos para descongelar:

- a) Descongelar colocando los popotes en una caja de poliuretano vacía durante tres minutos dejándolos a temperatura ambiente (5,40).
- b) Descongelar los popotes en baño maría a 50 °C. durante 50 seg. (7,21).

En ambos métodos el semen se diluye después del descongelamiento.

El uso de diluyentes para descongelar el semen de verraco se ha estudiado ampliamente desde el uso del plasma seminal el cual dió buenos resultados (1,7,16,17,18).

En varias investigaciones (16,17,18,19) se compararon varias soluciones descongelantes; el plasma seminal completo, el plasma seminal sin proteínas, el medio OLPE (composición basada en aná-



lisis físicos y bioquímicos del plasma seminal) y una solución glucosada isotónica. Los tres primeros medios produjeron resultados similares mientras que la solución glucosada isotónica produjo pobres resultados.

Otros autores (23) han encontrado que algunas proteínas básicas del plasma seminal se enlazan con el espermatozoide durante la eyaculación y en el proceso de enfriamiento promueven que la membrana del espermatozoide se rompa, para probar la importancia de este hecho Moore y Habbit (23) quitaron las glándulas vesículas seminales a verracos usados en la IA y los sometieron a una prueba de fertilidad, los resultados mostraron sólo una pequeña diferencia a favor de los verracos sin vesículas seminales, la cual no fué significativa, lo que indica que la presencia o ausencia de las glándulas solo tienen un pequeño efecto sobre la habilidad fertilizante de los espermatozoides de verraco congelados y descongelados en un medio adecuado.

También se ha utilizado como solución descongeladora la leche descremada y pausterizada la cual ha dado resultados satisfactorios debido probablemente a sustancias o proteínas naturales de la leche que protegen al espermatozoide congelado durante la descongelación (7,19).

En diferentes investigaciones se han utilizado como medios des-

congelantes el mismo medio de congelación exceptuando los crioprotectores como son la yema de huevo y el glicerol (21,22,29,45).

Sin embargo está demostrado que la solución descongeladora de BTS proporciona mejores resultados tanto de motilidad como de acrosomas normales, que cualquiera de las otras soluciones descongeladoras antes estudiadas (35). Por esto es la más ampliamente utilizada (2,7,14,15,28,34,35).

## MATERIAL Y METODO

La presente investigación se llevó a cabo en la granja El Retoño ubicada en el barrio de Santa María Caliacac, Teoloyucan Estado de México. Su localización geográfica es a los 19°45' de latitud norte a los 99°11' de longitud oeste del Meridiano de Greenwich, a una altura sobre el nivel del mar de 2285 m. y en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (6).

Para el propósito del presente trabajo se procesaron treinta eyaculados utilizando unicamente la fracción rica en espermatozoides los cuales fueron obtenidos por el método de la mano enguantada de dos verracos Duroc y un Yorkshire. La recolección se hizo dos veces por semana, obteniendo un eyaculado por verraco.

Inmediatamente después de la recolección para su transporte el semen se colocó en una caja térmica manteniendo una temperatura entre 25-30 °C. evitando el contacto con el agua, luz y aire. Llevo un tiempo no mayor a diez minutos para llegar al laboratorio.

Una vez que las muestras llegaron al laboratorio se colocaron en baño maría manteniendolas a una temperatura dentro del rango antes mencionado mientras se hacía el estudio valorativo del semen.

La evaluación del semen consistió en la determinación del pH,

motilidad progresiva y morfología espermática.

La lectura del pH se hizo con el potenciómetro con el propósito de ajustar el pH de los diluentes con el del semen. Previamente a la dilución.

La evaluación de la motilidad progresiva de cada una de las muestras se basó en la observación de una gota de semen fresco sin diluir con objetivo de poco aumento (40X). Debiendo colocar la gota en una laminilla tibia (38 °C), limpia y seca. Solo se utilizaron las muestras que manifestaron una motilidad mayor al 70%.

Realizadas las evaluaciones anteriores se procedió a realizar para cada muestra de semen un frotis con la tinción de eosina-nigrosina para observar las anomalías primarias, secundarias, gotas citoplasmáticas y el porcentaje de acrosomas normales.

Los diluentes que se utilizaron son: 1) TFE compuesto por Tris, Fructuosa, Acido Cítrico, EDTA, Yema de Huevo y glicerol. 2) BF3 que contiene Tris, Acido Cítrico, Fructuosa, Lactosa, Caseína y glicerol. (anexo 1).

Cada uno de los diluentes se dividió en dos volúmenes iguales uno sin glicerol (diluyente A) y otro con glicerol (diluyente B).

De un mismo eyaculado se tomaron dos alícuotas de semen de 3 ml. cada una y se centrifugaron a 1000 rpm. durante 10 minutos, el plasma seminal se retiró por aspiración quedando aproximadamente 1 ml., de cada paquete celular los cuales fueron resuspendidos en ambos diluentes.

Por otra parte del mismo eyaculado se tomaron dos alícuotas de 1 ml. de semen sin centrifugar las cuales fueron diluidas una con el diluyente TFE y la otra con el diluyente BF3.

En ambos casos las diluciones se hicieron a una temperatura entre 25-30°C. en una proporción de 1:1 (v/v) con el diluyente sin glicerol (diluyente A).

Así diluidas las muestras se colocaron en baño maría a la temperatura de dilución con el fin de que el descenso de la temperatura fuera homogéneo y paulatino durante el período de enfriamiento que consistió en bajar la temperatura del semen diluido hasta 4°C.

El enfriamiento se llevo a cabo en dos etapas: 1) Se hizo descender la temperatura de 30 a 15°C. durante un período de dos horas esto se logro colocando las alícuotas en una caja de poliuretano con la cantidad suficiente de hielos para mantener una temperatura constante de 15°C. 2) Esta etapa comprendió el descenso de la temperatura de 15 a 4°C. en un período de dos horas al colocar las mues-

tras en el refrigerador.

Una vez que las muestras cumplieron una hora de estar en el refrigerador a una temperatura de 4°C., a cada una de las muestras se les adicionó 0.5 ml. del diluyente B. y cuando se cumplieron dos horas se adicionó de nuevo 0.5 ml. del diluyente B. De esta forma se obtuvo una dilución final de 1:2 (v/v) por cada una de las alícuotas tratadas.

Después del período de adaptación se procedió a la congelación de la siguiente manera: Se fabricaron de cada uno de los tratamientos cuatro pastillas de 0.1 ml. sobre una placa de hielo seco alcanzando una temperatura de -79°C. durante diez minutos. Inmediatamente después las pastillas se colocaron en gobelettes previamente identificados para ser almacenados en nitrógeno líquido (-196°C).

De las 16 pastillas resultantes por muestra se descongelaron 8 a la semana y 8 al mes. Dos pastillas de cada tratamiento se colocaron en un tubo de ensaye que contenía 0.5 ml. de solución descongeladora de BTS (anexo 2) a una temperatura de 40°C. durante diez minutos., al cumplirse dicho plazo se procedió a la evaluación de la motilidad progresiva.

Posteriormente se hicieron cuatro frotis por muestra (uno por tratamiento) con la tinción de eosina-nigrosina para evaluar las

anormalidades primarias, secundarias y el daño acrosomal de los espermatozoides después de ser congelados y descongelados.

La evaluación de la morfología del acrosoma se llevó a cabo con un microscopio de contraste de fase con aumento de 1000X contando 100 espermatozoides de cada frotis, y de acuerdo con el tipo de daño acrosomal fueron clasificados en cinco categorías según las describe Pursel et al. (31). 1) NAR si la capa acrosomal se adhiere suavemente al núcleo y posee un borde apical liso; 2) NAR' estos espermatozoides son iguales a los anteriores excepto por la adherencia de partículas pequeñas en la capa acrosomal; 3) DAR estos espermatozoides fueron identificados como los que tenían el borde posterior de la cresta apical más amplio y tenían forma irregular; 4) MAR son espermatozoides que perdieron la cresta apical pero la capa anterior del acrosoma permanece estrechamente adherida a la cabeza del espermatozoide; 5) LAC estos espermatozoides caracterizados por vesiculación del capuchón acrosomal anterior.

#### ANALISIS ESTADISTICO.

Los valores correspondientes a motilidad inicial, motilidad del semen descongelado y las diferentes categorías de morfología espermática fueron transformados al arcoseno y sometidos también al análisis de varianza para determinar si existían diferencias o efectos entre las medidas debidas a los tratamientos. Se utilizó también la prueba de rango múltiple de Duncan (43).

De acuerdo al siguiente modelo según (Steel y Torrie) (43).

$$Y_{ijklm} = \mu + C_j + D_k + T_l + CD_{jk} + Dk_{kl} + CT_{jl} + CDT_{jkl} + E_{ijklm}.$$

DONDE:

Y = Son los valores del l-ésimo tiempo de conservación en el k-ésimo diluyente con la j-ésima centrifugación del i-ésimo semental, para cada variable.

$\mu$  = Media general.

S<sub>i</sub> = El efecto del i-ésimo semental.

C<sub>j</sub> = El efecto de la j-ésima centrifugación.

D<sub>k</sub> = El efecto del k-ésimo diluyente.

T<sub>l</sub> = El efecto del l-ésimo tiempo de conservación.

CD<sub>jk</sub> = Efecto de las interacciones centrifugado-diluyente.

Dk<sub>kl</sub> = Efecto de las interacciones diluyente-tiempo.

CT<sub>jl</sub> = Efecto de las interacciones centrifugado-tiempo.

CDT<sub>jkl</sub> = Efecto de las interacciones centrifugación-diluyente-tiempo.

E<sub>ijklm</sub> = Error aleatorio para cada observación.



## RESULTADOS

El efecto del verraco sobre las cualidades de los espermatozoides descongelados fué mínimo ya que los valores correspondientes no mostraron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) como se puede observar en el cuadro 2.

El cuadro 4 se refiere a los valores correspondientes al análisis de varianza de la motilidad progresiva en donde se observa que el tiempo de congelación (T), los diluentes empleados (D), la centrifugación (C), y las interacciones: 1) tiempo diluyente (TxD), 2) tiempo centrifugación (TxC), 3) diluyente centrifugación (DxC) y 4) tiempo diluyente centrifugación (TxDxC); tuvieron un efecto directo sobre la motilidad en todos los tratamientos ya que los valores mostraron diferencias significativas de ( $P < 0.05$ ). En el cuadro 3 se describen los efectos antes mencionados; en donde el semen fresco fué mejor y diferente que el semen descongelado ( $P < 0.05$ ). También se observa que el diluyente TFE (diluyente 1) fué mejor que el diluyente BF3 (diluyente 2) al mostrar una diferencia significativa de ( $P < 0.05$ ). El diluyente TFE centrifugado fué mejor que el no centrifugado al mostrar una diferencia significativa en sus valores de ( $P < 0.05$ ) y un comportamiento igual al descongelarlos a la semana y al mes. El diluyente BF3 sin centrifugar y descongelado al mes fué el peor y mostro una motilidad mínima y diferencia significativa en sus valores de ( $P < 0.05$ ) al compararlo con el diluyente BF3 centrifugado. La motilidad progresiva se vio influida por el tiempo de con-

gelación que fué menor al mes y significativa ( $P < 0.05$ ) solo en el diluyente BF3.

En el cuadro 5 se pueden observar los datos correspondientes al análisis de varianza para la recuperación de la motilidad progresiva donde se muestran los efectos de la centrifugación (C), el tipo de diluyente empleado (D), así como las interacciones: 1) tiempo diluyente (TxD), tiempo centrifugación (TxC), 3) diluyente centrifugación (DxC), que fueron determinantes para dicha variable al observarse diferencias significativas entre sus valores de ( $P < 0.05$ ). En el cuadro 3 se muestra que el semen sin centrifugar resistió menos la descongelación al mes, al compararlo con el semen centrifugado que siempre fué mejor y con mayor razón en el diluyente TFE al observarse una diferencia significativa de ( $P < 0.05$ ). El diluyente TFE fué mejor y diferente que el diluyente BF3 al descongelarlos en los dos tiempos (semana y mes).

La congelación no aumento las anormalidades primarias y secundarias de los espermatozoides ya que no se observó alguna diferencia significativa entre sus valores como se muestra en los cuadros 3 y 6.

El cuadro 7 se refiere al análisis de varianza para los valores correspondientes a la categoría NAR de la clasificación del daño acrosomal. El cual muestra que no hubo influencia de algún factor sobre el semen congelado ya que no se observó alguna diferencia signi-

ficativa entre los valores. Sin embargo se observó una diferencia significativa de ( $P < 0.05$ ) en el factor tratamientos, mostrando así (en el cuadro 3) que el semen fresco fué mejor que el semen descongelado al mostrar una diferencia significativa de ( $P < 0.05$ ).

El cuadro 8 se refiere al análisis de varianza de la categoría DAR de la clasificación para daño acrosomal. Donde se puede observar la influencia de los factores tiempo (T), diluyente (D), centrifugación (C), y las interacciones: tiempo diluyente (TxD), tiempo-centrifugación (TxC), al notarse las diferencias significativas entre los valores correspondientes de ( $P < 0.05$ ) y ( $P < 0.01$ ). De tal forma como se muestra en el cuadro 3 el semen fresco fué mejor que el descongelado por ser diferentes ( $P < 0.05$ ). Se puede observar también que el diluyente BF3 mostró tendencia a ser mejor que el diluyente TFE excepto para el tratamiento diluyente TFE centrifugado y descongelado al mes que fué el peor y diferente ( $P < 0.05$ ), que la mayoría de los tratamientos del diluyente BF3.

El cuadro 9 se refiere al análisis de varianza de los valores correspondientes a la categoría MAR de la clasificación para daño acrosomal. Donde se puede observar la influencia de los factores o efectos del tiempo de congelación (T), tipo de diluyente usado (D), la centrifugación (C), y las interacciones: 1) tiempo diluyente (TxD), 2) tiempo centrifugación (TxC), diluyente centrifugación (DxC). Ya que muestran diferencias significativas en los valores de

( $P < 0.001$ ) y ( $P < 0.05$ ). En el cuadro 3 se muestra que el semen fresco fué mejor y diferente ( $P < 0.05$ ) que el semen descongelado. El tiempo de congelación afectó más al diluyente BF3 al ser diferente con el diluyente TFE ( $P < 0.05$ ). A la vez los espermatozoides centrifugados y descongelados al mes fueron peor y diferentes ( $P < 0.05$ ) que los centrifugados y descongelados a la semana en ambos tratamientos y los que mostraron mayor diferencia fueron los tratados con el diluyente BF3 centrifugado y descongelado al mes y el BF3 no-centrifugado y descongelado al mes.

El cuadro 10 se refiere al análisis de varianza de la categoría LAC de la clasificación para daño acrosomal. Donde se puede observar que no existen diferencias significativas entre los valores de los tratamientos. Poniendo en claro así (en el cuadro 3) que la congelación no aumentó el número de espermatozoides tipo LAC.

Las categorías en que se clasificaron las distintas formas del acrosoma se redujeron de 5 a 4 eliminando la clase NAR' (espermatozoides con acrosoma normal conteniendo granulados) debido a que el porcentaje de espermatozoides con esta característica fue muy reducido en todos los casos, por lo que los espermatozoides de esta categoría se sumaron a los espermatozoides con acrosoma normal (NAR) para su evaluación estadística.

Las observaciones de este trabajo en este aspecto están de acuerdo con otros autores que evaluando semen descongelado solo to-

man en cuenta las cuatro categorías eliminando la categoría NAR' -  
(31,33).

C U A D R O 2

EFFECTO DEL MACHO SOBRE LAS CARACTERISTICAS ESPERMATICAS EN SEMEN DE VERRACO DESCONGELADO  
DESPUES DE ALMACENARSE HASTA UN MES EN DOS DILUYENTES CON Y SIN CENTRIFUCACION.

MACHO	MOTILIDAD PROGRESIVA		RECUPERACION DE MOTILIDAD		ANORMALIDADES		NAR	DAR	MAR	LAC
1	8.72	7.05	11.38	8.98	6.26	6.25	30.80	44.38	23	1.50
	n= 80		n= 80		n= 76		n= 76	n= 76	n= 76	n= 76
2	9.81	7.57	12.61	9.68	4.92	0	27.22	47.82	23.40	1.40
	n= 80		n= 80		n= 76		n= 76	n= 76	n= 76	n= 76
3	9.41	6.61	12.43	8.83	6.78	4.41	34.36	43.08	21.31	1.33
	n= 80		n= 80		n= 80		n= 80	n= 80	n= 80	n= 80

NAR= BORDE APICAL NORMAL.

MAK= BORDE APICAL AUSENTE.

DAR= BORDE APICAL DAÑADO.

LAC= BORDE APICAL LIBRE O SUELTO.

LAS DIFERENCIAS DE LOS VALORES NO FUERON SIGNIFICATIVAS ( P.< 0.05)

C O N T E N I D O

CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS EN SEMEN DE VEBRACO FRESCO Y DESCONGELADO DESPUES DE -  
ALMACENARSE HASTA UN MES EN DOS DILUYENTES CON Y SIN CENTRIFUGACION.

TRATAMIENTO SEMEN FRESCO	MOTILIDAD PROGRESIVA	RECUPERACION DE MOTILIDAD	ANORMALIDADES	NAR	DAR	NAR	LAC
	76.50 ± 5.07 n=30 a	-----	13.33 ± 8.57 n=30 a	72.53 ± 14.46 n=30 a	19.40 ± 11.93 n=30 a	5.63 ± 4.23 n=30 a	-----
DILUYENTE 1 CENTRIFUGADO SEMANA	16.83 ± 9.44 n=30 a	22.27 ± 12.95 n=30 a	6.56 ± 5.54 n=28 a	11.89 ± 12.73 n=28 b	46.89 ± 12.11 n=28 bc	17.75 ± 9.44 n=28 b	1.32 ± 2.63 n=28a
DILUYENTE 1 NORMAL SEMANA	10.03 ± 4.77 n=30 bc	13.08 ± 6.13 n=30 ab	5.75 ± 2.39 n=28 a	35.07 ± 12.52 n=28 b	44.85 ± 10.89 n=28 bc	18.92 ± 9.08 n=28bcd	1.07 ± 2.03 n=28a
DILUYENTE 1 CENTRIFUGADO MES	13.20 ± 6.42 n=30 b	17.89 ± 9.29 n=30 a	6.06 ± 5.10 n=30 a	24.19 ± 8.35 n=30 b	49.73 ± 9.92 n=30 c	18.13 ± 14.40 n=30cd	1.73 ± 1.89 n=30a
DILUYENTE 1 NORMAL MES	8.60 ± 5.13 n=30 cd	11.19 ± 6.68 n=30 bc	6.05 ± 4.99 n=30 a	28.70 ± 11.44 n=30 b	47.1 ± 10.47 n=30 bc	22.76 ± 19.14 n=30cd	1.36 ± 1.90 n=30a
DILUYENTE 2 CENTRIFUGADO SEMANA	9.53 ± 5.18 n=30 cd	12.47 ± 6.93 n=30 bc	7.07 ± 3.16 n=28 a	31.28 ± 11.43 n=28 b	46.25 ± 11.60 n=28 bc	18.53 ± 9.41 n=28 bc	1.14 ± 1.48 n=28a
DILUYENTE 2 NORMAL SEMANA	4.83 ± 3.75 n=30 e1	6.19 ± 4.83 n=30 d	6.40 ± 3.83 n=28 a	32.71 ± 11.03 n=28 b	41.1 ± 9.48 n=28 b	24.39 ± 12.67 n=28 de	1.25 ± 2.10 n=28a
DILUYENTE 2 CENTRIFUGADO MES	7.30 ± 4.88 n=30 cd	9.41 ± 6.20 n=30 c	6.60 ± 8.22 n=30 a	28.93 ± 11.69 n=30 b	43.23 ± 8.73 n=30 b	27.46 ± 12.62 n=30 c	1.30 ± 1.41 n=30a
DILUYENTE 2 NORMAL MES	3.60 ± 3.60 n=30 1	4.72 ± 4.65 n=30 d	6.00 ± 3.86 n=30 a	30.26 ± 10.42 n=30 b	41.23 ± 10.34 n=30 b	27.36 ± 12.82 n=30 c	2.06 ± 1.70 n=30a
	NAR= BORDE APICAL NORMAL.			NAR= BORDE APICAL AUSENTE.			
	DAR= BORDE APICAL DANADO.			LAC= BORDE APICAL LIBRE O SUELTO.			

LETRAS DIFERENTES EN LAS COLUMNAS REPRESENTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS (P < 0.05)

C U A D R O 4

ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA MOTILIDAD PROGRESIVA  
DE SEMEN FRESCO Y DESCONGELADO DE VERRACO.

FUENTES DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD.	CUADRADOS MEDIOS.	PROBABILIDAD
TRATAMIENTOS.	8	7262.03	0.005
MACHOS	2	28.57	NS
TIEMPO DE CONGELACION (T)	2	27230.23	0.005
DILUENTE (D)	1	2024.26	0.005
CENTRIFUGACION (C)	1	1307.26	0.005
T X D	2	1611.56	0.005
T X C	2	2326.53	0.005
D X C	1	504.09	0.005
T X D X C	2	304.27	0.005
ERROK	259	29.70	-----
NS= (P. > 0.05)			



C U A D R O 5

ANALISIS DE VARIANZA PARA LA RECUPERACION DE LA MOTILIDAD PROGRESIVA EN SEMEN DE VERRACO DESPUES DE LA CONGELACION CON O SIN CENTRIFUGACION EN DOS DILUYENTES.

FUENTES DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD.	CUADRADOS MEDIOS.	PROBABILIDAD.
TRATAMIENTOS	7	896.11	0.01
MACHOS	2	23.93	NS
TIEMPO DE CONGELACION (T)	1	465.14	0.01
DILUYENTE (D)	1	2247.01	0.001
CENTRIFUGACION (C)	1	3537.70	0.001
T X D	1	2269.93	0.001
T X C	1	3560.62	0.001
D X C	1	488.06	0.01
T X D X C	1	22.93	NS
ERROR	233	45.99	----

NS= (P. > 0.05).

C U A D R O 6

ANALISIS DE VARIANZA PARA LAS ANORMALIDADES ESPERMATICAS  
DEL SEMEN DE VERRACO FRESCO Y DESCONGELADO.

FUENTES DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD.	CUADRADOS MEDIOS.	PROBABILIDAD.
TRATAMIENTOS	8	37.53	NS
HACHOS	2	1.56	NS
ERROK	251	37.60	--

NS= (P. > 0.05).

C U A D R O 7

ANALISIS DE VARIANZA PARA LA NORMALIDAD EN EL BORDE APICAL DE  
LOS ESPERMATOZOIDES DE VERRACO EN SEMEN FRESCO Y DESCONGELADO.

FUENTES DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD.	CUADRADOS MEDIOS.	PROBABILIDAD.
TRATAMIENTOS	8	4389.20	0.005
MACHOS	2	1.08	NS
TIEMPO DE CONGELACION (T)	2	677.13	NS
DILUENTE (D)	1	25.40	NS
CENTRIFUGACION (C)	1	71.93	NS
T X D	2	231.89	NS
T X C	2	185.36	NS
D X C	1	130.20	NS
T X D X C	2	159.96	NS
ERRORES	224	478.18	--
NS= (P. > 0.05).			

C U A D R O 8

ANALISIS DE VARIANZA PARA EL DAÑO EN EL BORDE APICAL DE LOS  
ESPERMATOZOIDES DE VERRACO EN SEMEN FRESCO Y DESCONGELADO

FUENTES DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD.	CUADRADOS MEDIOS.	PROBABILIDAD.
TRATAMIENTOS	8	870.57	0.01
MACHOS	2	127.06	0.05
TIEMPO DE CONGELACION (T)	2	48.08	NS
DILUENTE (D)	1	380.46	0.01
CENTRIFUGACION (C)	1	209.02	0.05
T x D	2	161.93	0.05
T x D	2	353.37	0.01
D x D	1	20.99	NS
T x D x C	2	1.02	NS
ERROR	228	58.63	--

NS= (P. > 0.05).

C U A D R O 9

ANALISIS DE VARIANZA PARA LA AUSENCIA DEL BORDE APICAL DE LOS  
ESPERMATOZOIDES DE VERRACO EN SEMEN FRESCO Y DESCONGELADO.

FUENTES DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD.	CUADRADOS MEDIOS.	PROBABILIDAD.
TRATAMIENTOS	8	861.81	0.001
MACHOS	2	821.75	0.001
TIEMPO DE CONGELACION (T)	2	832.99	0.001
DILUENTE (D)	1	232.06	NS
CENTRIFUGACION (C)	1	72.67	NS
T x D	2	304.60	0.05
T x C	2	463.99	0.05
D x C	1	1064.92	0.001
T x D x C	1	231.93	NS
ERROK	228	59.49	-----

NS= (P. > 0.05)

C U A D R O 10

ANALISIS DE VARIANZA PARA LA VESICULACION DEL BORDE APICAL  
DE LOS ESPERMATOCITOS DE VERRACO EN SEMEN FRESCO Y DESCONGELADO.

FUENTES DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD.	CUADRADOS MEDIOS.	PROBABILIDAD.
TRATAMIENTOS	7	31.41	NS
MACHOS	2	415.62	NS
TIEMPO DE CONGELACION (T)	1	22.66	NS
DILUENTE (D)	1	52.53	NS
CENTRIFUGACION (C)	1	7.93	NS
T x D	1	144.71	NS
T x C	1	189.31	NS
D x C	1	159.44	NS
T x D x C	1	136.78	NS
ERROR	222	4970.80	--

NS= (P. > 0.05).

Se ha probado que existen verracos que tienen la característica de eyacular semen de alta congelabilidad (14, 16, 42). Por ser un grupo pequeño en la presente investigación ninguno de los verracos utilizados mostró ser superior.

La motilidad progresiva del semen que se utilizó fué del 70-80% la cual coincide con la mayoría de los autores.

La recuperación de la motilidad progresiva para los tratamientos del semen con el diluyente TFE (diluyente 1) centrifugado y sin centrifugar descongelados a la semana y al mes fué - aceptable con rango de 11.19 6.68 a 22.27 12.95 coincidiendo con Maxwell y Salamon (21) quienes utilizaron el mismo tipo de diluyente. En cuanto a los tratamientos del semen con el diluyente BF3 (diluyente 2) centrifugado y sin centrifugar descongelado a la semana y al mes la recuperación de la motilidad progresiva que mostraron fué de 4.72 4.65 a 12.47 6.43 rango poco aceptable, sin embargo, coincide con los valores reportados por Pursel y Johnson (7,29) utilizando el mismo medio de congelación y como solución descongeladora utilizaron el mismo medio de congelación exceptuando los crioprotectores. - Potter y Dunn (27) publican el 15% empleando el diluyente BF5. Mientras que Ovando y tarcisio (25) obtuvieron el 29% con ese mismo diluyente. En otra investigación Crabo y Einarsson reportan el 30% con el diluyente TES-glucosa. Paquignon citado por Graham encuentra 27% que también se acerca a nuestros re-

sultados pero no indica la metodología utilizada. Sin embargo, gran cantidad de reportes demuestran que se puede lograr arriba del 40% de recuperación de la motilidad (7,14,15,27,33,36,-42,45) utilizando la mayoría de las veces el diluyente BF5.

Por otro lado se consideró que la recuperación de la motilidad progresiva del semen descongelado se vió afectada por el traslado del semen desde la granja hasta el laboratorio.

Los espermatozoides tipo NAR disminuyen notablemente cuando se someten al proceso de congelación. Sin embargo, diferentes investigaciones (7,14,15,27,36,42,45,28) reportan como mejor rango obtenido, de 44 a 80% utilizando el diluyente BF5. Al comparar los valores obtenidos en este estudio se observó que los espermatozoides así categorizados se redujeron sensiblemente pero coinciden con los obtenidos por Boenke, Crabo, Romeny citados por Graham (7) y Potter (27) quienes utilizaron diferentes técnicas y métodos de congelación.

Los espermatozoides clasificados como DAR aumentaron considerablemente en todos los tratamientos del semen descongelado al compararlos con los valores obtenidos por Pursel (34), - Johnson (14), Aalbers (15) quienes reportan el 21,15,18 % respectivamente utilizando el diluyente BF5. Los valores obtenidos en este estudio caen dentro del rango 41.15 9.48 a 49.73 9.92- coincidiendo unicamente con Potter (27) al utilizar la metodología de Betsville 5 para la congelación.



Los espermatozoides caracterizados como LAC disminuyeron -  
considerablemente en comparación con otros experimentos (33,34),  
coincidiendo únicamente con Johnson y Aalbers (14,15) quienes -  
utilizaron diferentes medios de preservación a los utilizados en  
este trabajo.

Reportes concretos sobre los valores obtenidos en este es -  
tudio son escasos. La mayoría de los trabajos que logran mejores  
resultados requieren para la preparación de los diluentes sus -  
tancias que no pueden ser adquiridas en el país como son la pas-  
ta orvus y el boffer TES (hidroxi-metil-amino-sulfónico).

Aunque Salamon (1973) menciona que la centrifugación fué de  
trímetal para la calidad del semen de verraco. En este trabajo -  
el semen se vió favorecido probablemente al reducir el pH del -  
medio evitando reacciones químicas entre el plasma seminal y el  
diluyente. Sin embargo, Pursel y Johnson (32) reportan que la cen-  
trifugación del semen reduce el efecto adverso del choque frío -  
sobre las normalidades acrosomales y la recuperación de la moti-  
lidad progresiva.

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Bajo las condiciones de este experimento se puede concluir que:

- El diluyente TFE (diluyente 1) se comportó mejor que el diluyente BF3 (diluyente 2).
- El centrifugado del semen para retirar el plasma seminal tuvo reció la respuesta seminal al descongelado.
- El almacenaje durante un mes fué diferente al de una semana - observandose menor recuperación de la motilidad y más anormalidades tipo MAR.
- El semen preparado en los tratamientos con el diluyente TFE - centrifugado y no centrifugado descongelados al mes y a la semana así como el tratamiento con el diluyente BF3 centrifugado y descongelado a la semana reunieron las características para ser aplicado en explotaciones de tipo comercial.
- La cantidad de espermatozoides con acrosoma normal fué aceptable como para estimar cierta fertilidad.
- Resultaron significativas todas las interacciones simples.

## RECOMENDACIONES

Se recomienda probar los tratamientos del semen que fueron aceptables contra otros diluyentes y con diferentes soluciones - descongeladoras.

- Probar nuevos tratamientos para evitar al máximo el daño acro-

somai.

- Trabajar con más verracos en diferentes ambientes.
- Probar la fertilidad de hembras inseminadas con semen que -  
ha sido congelado por diferentes métodos y técnicas.
- Tratar de contar con un laboratorio en la misma granja.

## A N E X O " 1 "

COMPOSICION DE LOS DILUENTES QUE SE UTILIZARON EN EL PRESENTE TRABAJO.

<u>DILUENTE</u>	<u>TFE</u>	<u>BF3</u>
TRIS	250 mM.	165 mM.
Fructuosa	111 mM.	27 mM.
Acido Cítrico	75 mM.	47 mM.
EDTA (sal disódica)	15 mM.	-----
Yema de huevo	15 mM.	-----
Lactosa	-----	111 mM.
Caseína	-----	2 g.
Glicerol	2 ml.	5 ml.
Penicilina (4000,000. UI)	1000 UI/ml.	1000 UI/ml.
Estreptomocina (1g.)	$\frac{1 \text{ mg.}/\text{ml.}}{100 \text{ ml.}}$	$\frac{1 \text{ mg.}/\text{ml.}}{100 \text{ ml.}}$

## A N E X O " 2 "

COMPOSICION DE LA SOLUCION DESCONGELADORA DE BTS.

<u>REACTIVOS</u>	<u>mM.</u>
Dextrosa Anhidrida	187
Citrato de sodio	20
Bicarbonato de Sodio	14
EDTA (Sal disodica)	3
Cloruro de Potasio	<u>10</u>
	100 ml.

LITERATURA CITADA

1. Crabo, B and Einarsson, S.: Fertility of Deep Frozen boar espermatozoa. Acta Vet. Scand. 12: 125-127 (1971).
2. Crabo B.C., Palvelko, M.K., Lodhi, L.A. and Loseth K.J.: - Evaluation of frozen boar semen by surgical insemination, sperm motility and sephadex filtracion. Proc. 10th. Congr. Int. Anim. Reprod. Artif. Insem. Urbana-Champaign Illinois. 2: 52-54 (1984).
3. Duane, L. Garner.: In vitro method for estimating fertili- zing capacity of sperm celis. Proc. 10th. Congres. int. - Anim. Reprod. Artif. Insem. Urbana-Champaign Illinois. 4: X9-15 (1984).
4. Fuquay J. and Bearden H.: Reproducción Animal Aplicada, Ed. El manual moderno. Cap. 15-16. (1982).
5. Garbuno Z.R.: Congelación de semen porcino. Tesis Licenciatura Fac. Med. Vet. Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. Méx. D.F. (1978).
6. García, E.: Modificaciones del Sistema de Clasificación - Climática de Kopen, UNAM México D.F. (1980).
7. Graham E.F., Crabo and Pace: Current status of semen preser- vation in the ram, boar, and stallion. J. Anim. Sci. 80: 93- 112 (1980).

8. Graham E.F. and Dukelow R.: Freezing of porcine semen. - J. Anim. Sci. 21:1020 (1975).
9. Hood R.D., Foley C.W. and Martin: Effects of cold shock, dilution, glycerol and dimethyl sulfoxide on cation concentrations in porcine spermatozoa. Austr. J. Biol. Sci. - 20: 91-94 (1976).
10. Hafez. E.S.E.: Reproducción e inseminación Artificial en Animales de granja. Ed. Interamericana. Cap. 20 (1984).
11. Hurtgen R., Larssen and B. Crabo.: Factors affecting semen quality in the boar. Proc. 9th. Int. Congr. Anim. - Reprod. Artif. Insem. Madrid-Spain. 3: 271-274 (1980).
12. Ibrahim, and Kovacs L.: Effects of deep freezing on boar sperm. Acta Vet. Academ. Sci. Hung. 30: (4): 243-245 - (1980).
13. Johnson L.A., Aalbers J.G., Willens C.M.T. and J.M. Rademaker: Fecundity of boar spermatozoa stored in Beltsville liquid and kiev extenders for three days at 18° C. Proc. 6th. Int. Congr. Pig. Vet. Sos. Copenhagen. 33 (1980).
14. Johnson L.A., Aalbers J.G., Willens C.M.T. and J.M. Sybesma: Use of boar spermatozoa for artificial insemination. I Fertilizing capacity of fresh and frozen spermatozoa in sowns on 36 farms. J. Anim. Sci. 52: (5): 1130 - 1136 (1981).
15. Johnson L.A.: Fertility of boar semen frozen at diffe -

- ring sperm concentrations. Proc. 10th. Int. Congr. Anim. Re -  
prod. Artif. Insem. Urbana-Champaign. Illinois 2:199-201 -  
(1984).
16. Larsson K.: Fertility of deep frozen boar spermatozoa at va -  
rius intervals between insemination and induced ovulation, -  
influents of boars and thawing diluents. Acta Vet. Scand. 17:  
63-73 (1975).
17. Larsson K. and Einarsson S.: Fertility of deep frozen boar -  
spermatozoa. Influence of thawing diluents and of boars. Acta  
Vet. Scand. 17: 42-52 (1976).
18. Larsson K. and Einarsson: Influence of boars on the relation-  
ship between fertility and postthawing sperm quality of deep -  
frozen boar spermatozoa. Acta Vet. Scand. 17: 74-82 (1976).
19. Larsson and Einarsson: On the fertility and survival of deep-  
frozen boar spermatozoa thawed in skim milk, Acta Vet. Scand.  
13:446-448 (1972).
20. Larsson and Einarsson: Influence of thawing diluents on vita-  
lity, acrosome morphology, ultrastructure and enzymes release  
of deep frozen boar spermatozoa. Acta Vet. Scand. 17: 93-100  
(1976).
21. Maxwell W.M.C. Salomon and S.: Fertility of frozen Thawed boar  
semen. Austr. J. Biol. Sci. 32: 242-249 (1979).

22. Maxwell W.M.C. Salamon and S.: Fertility of boar semen after longterm frozen storage. Theriogenology 8:(4): 206 (1977).
23. Moore H.D.M. and Habbit. and K.G.: Fertility of boar spermatozoa after freezing in the absence of seminal vesicular proteins. J. Reprod. Fert. 50: 349-352 (1977)
24. Nagase T., Niwa, K. and Iritani A. : Deep freezing bull semen in concentrated pellets from. Proc. 5th. Int. Congr. Anim. - Reprod. Artif. Insem. Trento 3: 410 (1964)
25. Obando H. and Tarcisio T.: Evaluation of some factors affecting swine spermatozoa during freezing. Proc. 10th. Congr. Anim. - Reprod. Artif. Insem. 2: 197 (1984)
26. Ostashko F.I. Pavlencko M.P. and Pavlencko L.N.: Antishock effects of yolk and its components in cooling bull, ram, and boar spermatozoa. Proc. Int. 10th. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem. Urbana Champaign Illinois 2:209-211 (1984).
27. Potter W.L., Upton P.C. and Dunn B.L.: Morphological changes as observed by light microscopy of the acrosome boar spermatozoa subjected to deep freezing. Austr. J. Biol. Sci. 32: 575-579 (1979).
28. Pursel V.G., Rexroad C.E. and Wall R.: Relationship competitive fertility to quality of boar semen. Proc. 10th. Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem. 1: 78 (1984).



29. Pursel V.G. Johnson L.A.: Fertility with frozen boar spermatozoa. J. Anim. Sci. 33:265 (1984).
30. Pursel V.G., Johnson L.A. and Rampacek G.B.: Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cooid shock. - J. Anim. Sci. 34: (2): 278-283 (1972).
31. Pursel V.G., Jonnson L.A. and Schulman L.L.: Acrosome morphology of boar spermatozoa during IN VITRO aging. J. Anim. Sci. 34:(1): 113-116 (1974).
32. Pursel V.G., Johnson and Schulman L.: Effect of dilution, seminal plasma, and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. J. Anim. Sci. 37: 528-531 (1973).
33. Pursel V.G. and Johnson L.A.: Glutaraldehyde fixation of boar spermatozoa for acrosom evaluation. Theriogenology 1:(2): 63-68 (1974).
34. Pursel V.G., Elliott D.O.: Synchronization of estrus in girls with alliltrembolone; Fecundity after natural service and insemination with frozen semen. J. Anim. Sci. 52: 130-133 (1981).
35. Pursel V.G. and Johnson L.A.: Freezing of boar spermatozoa-Fertilizing capacity with concentrated semen and new thawing procedure. J. Anim. Sci. 40:(1): 65-67 (1975).

36. Pursel V.G., Johnson L.A. and Gerrits R.J.: Effect of cold - shock and freezing on cation of boar spermatozoa. J. Anim. - Sci. 29: 196 (1969).
37. Pursel V.G., Ellite and Newman C.W.: Mating by vasectomized boar failed to improve fertility in girls inseminated with frozen semen. Theriogenology. 18:(1): 61-64 (1982).
38. Salamon S.: Deep freezing of boar semen III: Effects of centrifugation, diluent, and dilution rate, pellet volume and - method of thawing on survival of spermatozoa. Austr. J. Biol. Sci. 26: 239-247 (1973).
- 39.- Salamon S. and Pearse G.N.: Fertility of boar semen Frosen - stored for 2.5 years. J. Reprod. Fert. 46: 538 (1976)
40. Salamon S. and Visser D.: Fertility test of frozen boar spermatozoa. Austr. J. Biol. Sci. 26: 291-293 (1973).
41. Salamon S., Wilmut I. and Pulge C. Deep freezing of boar semen I: Effects of diluents composition, protective agents and method of thawing on survival of spermatozoa. Autr. J. Biol. Sci. 26: 217-220 (1973).
42. Schilling E., Vengust M. and Smidt D.: Prediction of the quality of boar spermatozoa after freezing and long storage. Proc. - 10th. Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem. Urbana-Champaign, Illinois. 2: 64 (1984).

43. Steel R.G.D. and Torrie J.M.: Principles and procedure of -  
statistics a biometrical approach. 2nd Ed. Mc. Graw Hill -  
inc. USA. (1980).
- 44.- Strzezek J., Glowanki, J. Magiessaka E., Luberda, Z. and -  
Joblonaweska.: Some aspects of cryobiochemistry of boar se-  
men. Proc. 10th. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem. Urbana-  
Champaign. Illinois 3:244-245 (1984).
45. Torbjorn A. and Staune S.E.: Experience with deep-frozen -  
boar semen. Proc. 10th. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem.-  
Urbana-Champaign. Illinois. 1: 181 (1984).
46. Trillanes A.M. y Velasco M.: La inseminación artificial en-  
cerdas. Apuntes de la materia de Zootecnia Porcina, Facultad  
de Estudios Superiores Cuautitlán. Cuautitlán Izcalli Méx.-  
(1979).
- 47.- Wilmut I., Salamon and Pulge.: Deep freezing of boar semen.  
II Effects of method of dilution, glycerol concentration -  
and time of semen glycerol contac in survival of spermatozoa.  
Austr. J. Biol. Sci. 26:(1): 231-237 (1973).