

## Avances en la Investigación Agrícola, Pecuaria, Forestal y Acuícola en el Trópico Mexicano 2009

No está permitida la reproducción total o parcial de esta obra, ni la transmisión de ninguna forma o por cualquier medio, ya sea electrónico, mecánico, por fotocopia, por registro u otros medios, sin el permiso previo y por escrito de las instituciones participantes.

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.  
Av. Progreso Núm. 5  
Barrio Santa Catarina, Del. Coyoacán  
04010, México, D. F.  
Tel.: (55) 38 71 87 00

Primera edición 2009  
Impreso en México  
**ISBN 978-607-425-214-9**

Esta obra se terminó de imprimir en  
diciembre de 2009, en los talleres de:  
Litográfica Alfa y Omega  
Av. Guadalupe Victoria 3341 entre J. Soto y C. Cruz  
91700, Veracruz, Ver.  
Tel.: (229) 938 32 52; Fax (229) 934 29 95

Libro Científico No. 6

8 de diciembre de 2009

Tiraje: 500 ejemplares

La cita correcta de este libro científico es:

INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias); UV (Universidad Veracruzana); CP (Colegio de Postgraduados); UACH (Universidad Autónoma Chapingo); ITUG (Instituto Tecnológico de Úrsulo Galván); ITBOCA (Instituto Tecnológico de Boca del Río). 2009. Avances en la Investigación Agrícola, Pecuaria, Forestal y Acuícola en el Trópico Mexicano 2009. Libro Científico No. 6. Veracruz, México. 416 p.

## COMPARACIÓN DE DOS DILUYENTES COMERCIALES PARA CRIOPRESERVAR SEMEN DE BOVINO BAJO CONDICIONES DE CAMPO EN EL TRÓPICO HÚMEDO

Daniel M. Carballo Guerrero<sup>1</sup>  
Rodolfo Canseco Sedano<sup>1</sup>  
Rubén García González<sup>1</sup>  
Felipe Montiel Palacios<sup>1</sup>

### RESUMEN

Con el fin de evaluar un nuevo diluyente a base de soya (Andromed) para la criopreservación de semen bovino en el trópico húmedo y tratar de determinar su mejor tiempo de equilibrio, se comparó a éste con el Triladyl, diluyente ya validado con buenos resultados. El estudio se realizó en la zona centro del estado de Veracruz, y se utilizaron 18 eyaculados de toros de razas tanto europeas como cebuínas y sus cruza, colectados por medio de electroeyaculación. Cada eyaculado se dividió en dos partes, cada una de las cuales se diluyó con cada uno de los diluyentes, y el semen ya diluido se congeló utilizando tres tiempos de equilibrio: 1) 2 a 3 h; 2) 4 a 5 h; y 3) 8 a 9 h. Todos los eyaculados se procesaron de la misma forma, y la única variación fue en el congelamiento, ya que el tiempo en que las pajillas con semen estuvieron expuestas a vapor de nitrógeno líquido dependió de las indicaciones del fabricante para cada diluyente. Aproximadamente 15 días después de su congelación, se descongelaron dos dosis de cada eyaculado y se evaluó la motilidad espermática a los 0, 30, 60 y 90 min pos-descongelado, dejando el semen en baño maría durante este tiempo a 37° C. El diluyente tuvo un efecto significativo sobre la motilidad pos-descongelado, resultando mejor el Triladyl que el Andromed ( $P < 0.05$ ). Para ambos diluyentes, el mejor tiempo de equilibrio fue de 8 a 9 h ( $P < 0.05$ ). En conclusión, el Triladyl con un tiempo de equilibrio de 8 a 9 h fue el mejor tratamiento de los usados en este estudio, aunque el Andromed también puede ser utilizado con resultados aceptables.

**Palabras clave:** Congelación, diluyente, semen, toro

### INTRODUCCIÓN

La criopreservación del semen bovino se hace con la finalidad de tener a disposición semen proveniente de animales valiosos para utilizarlo en la inseminación artificial de hembras para mejorar la eficiencia productiva y reproductiva de los hatos. Uno de los pasos comprendidos en el procedimiento de criopreservación de semen bovino es su dilución. La dilución apropiada del semen tiene como objeto aumentar el volumen total de la masa espermática para que, a partir de una sola eyaculación, se pueda fecundar mediante inseminación artificial al mayor número de hembras posible (Derivaux, 1982), y al mismo tiempo se le den a los espermatozoides las condiciones óptimas para el mantenimiento de su vitalidad y capacidad fecundante a través del tiempo.

El término diluyente se refiere a una solución acuosa que permite aumentar el volumen del eyaculado hasta conseguir las dosis necesarias, preservar las características funcionales de las células espermáticas y mantener el nivel de fertilidad adecuado (Gadea, 2003). Las características que un diluyente debe reunir son: ser isotónico al semen, capacidad amortiguadora evitando cambios de pH al neutralizar los ácidos producidos por el metabolismo de los espermatozoides, proteger a los espermatozoides del choque térmico durante la congelación y descongelación, proporcionar nutrientes para el metabolismo de los espermatozoides, controlar contaminantes microbianos, y preservar la vida de los espermatozoides con un mínimo de efecto sobre la fertilidad (Bearden, 1982). Además, los diluyentes deben ser fáciles de preparar, estables y económicos (Salisbury *et al.*, 1982).

La mayoría de los diluyentes que se han desarrollado contienen yema de huevo; sin embargo, se han desarrollado también otros sin yema de huevo, que contienen soya. Las ventajas de estos últimos en comparación con los que incluyen yema de huevo son: no tienen ingredientes de origen animal, no existe

<sup>1</sup> Universidad Veracruzana. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. fmontiel@uv.mx



riesgo de contaminación bacteriana, altas tasas de concepción y mayores tasas de no retorno, fácil preparación y mayor facilidad de evaluación de los espermatozoides al microscopio.

Entre los diluyentes que contienen yema de huevo está el Triladyl® (Minitube, Germany). Éste es un concentrado para la preparación de un diluyente listo para su uso en un solo paso, que está basado en Tris (Hidroximetil aminometano, un amortiguador sintético) y contiene agua bidestilada, glicerol, ácido cítrico, fructosa y antibióticos; para su preparación se adicionan tres partes de agua bidestilada, una parte de yema de huevo y una parte del concentrado comercial. Este diluyente es el que se usa comúnmente para diluir y congelar semen de bovino con resultados exitosos (Villa, 1996).

Uno de los diluyentes que no contiene yema de huevo es el Andromed® (Minitube, Germany). Éste es un diluyente a base de lecitina de soya, libre de ingredientes de origen animal. Entre sus ventajas sobre el Triladyl están una tasa de no retorno de hasta 2.6% mayor (Aires *et al.*, 2003) y su más fácil preparación, ya que solamente debe agregarse agua bidestilada al concentrado comercial.

Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar la eficiencia del Andromed, en comparación con el Triladyl, sobre la tasa de motilidad espermática pos-descongelado de semen bovino, así como determinar el mejor tiempo de equilibrio para ambos diluyentes, reflejado por la tasa de motilidad espermática pos-descongelado.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Características y manejo de los animales experimentales

Se utilizaron 18 toros pertenecientes a un rancho comercial ubicado en el municipio de Boca del Río, Ver. Los toros fueron de las razas Brahaman, Suizo Europeo, Simmental y Simbrah de al menos 14 meses de edad y circunferencia escrotal mínima de 31 cm. De cada toro se colectó un eyaculado para hacer un total de 18 eyaculados. Cada eyaculado tuvo una motilidad espermática en masa e individual de al menos 70%, un total de células morfológicamente normales mínimo de 70% y una concentración espermática de al menos 350 millones de células por mililitro. Durante el estudio los toros fueron mantenidos con el manejo acostumbrado en el rancho para evitar situaciones de estrés que pudieran afectar las características del semen colectado; tampoco se realizaron cambios en su alimentación.

### Recolección y evaluación del semen

El semen se recolectó mediante la técnica de electroeyaculación. Una vez colectado el semen se determinó el volumen por observación directa en el tubo de colección. La concentración de células espermáticas se evaluó usando un hemocitómetro, diluyendo las muestras 1:200 en solución tampón-formol salino, y llenando las dos cámaras del hemocitómetro, contando cinco cuadros grandes de cada cámara (80 cuadros pequeños) empleando un microscopio de contraste de fases (40X); el total de células contadas se multiplicó por 10'000,000 para obtener el número de espermatozoides/ml de semen eyaculado (Sorensen, 1984; Salisbury *et al.*, 1982; Bearden, 1982). La motilidad espermática se determinó de manera subjetiva dándole un valor en porcentaje de 0% a 100%, observando en el microscopio de fases (10X y 40X) una gota de semen colocada en un portaobjetos y cubierta con un cubreobjetos, precalentados a 37° C. La motilidad espermática se evaluó inmediatamente después de recolectado el semen y después de descongelado. La descongelación del semen se hizo colocando la pajilla en baño maría a 37° C por 25 a 30 s. La determinación de la motilidad pos-descongelado se hizo a los 0, 30, 60 y 90 min, manteniendo siempre la pajilla con semen en baño maría. La morfología de los espermatozoides se evaluó usando el microscopio de contraste de fases; para esto, se contaron 100 células y de éstas se contó el número de las que presentaron anomalías, expresando esta proporción en porcentaje.

### Procesamiento del semen

Para determinar el número de espermatozoides viables en el eyaculado, se siguió la fórmula:

Espermatozoides viables = Volumen x Concentración x % de motilidad x % de células normales.

Para la determinación del número de dosis potenciales de semen se consideró como concentración mínima 20 millones de espermatozoides/dosis, y con base en esto se determinó el número de dosis que se podrían obtener de acuerdo con la siguiente fórmula:

Número total de espermatozoides viables / Número de espermatozoides por dosis.

La determinación de la cantidad de diluyente necesario se hizo multiplicando el número de dosis potenciales x el volumen de la pajilla, y restando a esta cantidad el volumen del eyaculado, obteniendo así el volumen de diluyente necesario.

### **Preparación del diluyente**

Los diluyentes usados en el presente estudio fueron Triladyl® y Andromed®. Los diluyentes se prepararon siguiendo las indicaciones del fabricante. Para el Triladyl, la composición final debió contener una parte del concentrado de Triladyl, tres partes de agua bidestilada y una unidad de yema de huevo. Para la preparación del Andromed sólo se utilizó agua bidestilada.

### **Dilución del semen**

Recién colectado el semen, se hizo una pre-dilución 2:1 (diluyente:semen) directamente en el recipiente de recolección y se transfirió a un matraz. Ya en el laboratorio, se agregó el diluyente necesario para completar el volumen obtenido según la fórmula antes descrita.

### **Empajillado del semen**

Una vez pasado el tiempo de equilibrio del semen (dependiendo del tratamiento y a 4° C), se envasó el semen diluido en las pajillas. Este proceso se realizó en una cámara fría a 5° C.

### **Congelación del semen**

El proceso de congelación se realizó en la cámara fría. Se vertió nitrógeno líquido (NL) en un termo de unicel de manera tal que el nivel superior quedara a 4 cm por debajo del nivel superior de la canastilla de congelación, con el fin de que las pajillas no tocaran directamente el NL, sino que fueran congeladas con sus vapores. Se colocó la gradilla de distribución y sobre ésta la canastilla y se distribuyeron uniformemente las pajillas. Esto se llevó al termo de unicel con NL, el cual se tapó y se dejaron las pajillas (7 a 10 min para Andromed y 15 a 20 min para Triladyl, según recomendaciones del fabricante) para ser congeladas por los vapores de NL. Pasado este tiempo, las pajillas fueron colocadas en los gobelets y éstos en los bastones, que fueron introducidos en el termo criogénico con NL para almacenar las pajillas hasta su uso.

### **Tratamientos**

Los tratamientos fueron los siguientes: 1) Triladyl en equilibrio por 2 a 3 h; 2) Andromed en equilibrio por 2 a 3 h; 3) Triladyl en equilibrio por 4 a 5 h; 4) Andromed en equilibrio por 4 a 5 h; 5) Triladyl en equilibrio por 8 a 9 h; y 6) Andromed en equilibrio por 8 a 9 h. Todos los tratamientos se hicieron a cada eyaculado, es decir, cada eyaculado se congeló de seis maneras diferentes.

### **Análisis estadístico**

Se empleó un diseño factorial 2 x 3, siendo el primer factor el diluyente y el segundo factor el tiempo de equilibrio. Los datos se analizaron mediante análisis de varianza.

## **RESULTADOS**

Se encontró diferencia estadística entre los tres diferentes tiempos de equilibrio para ambos diluyentes, obteniéndose el mayor porcentaje de motilidad pos-descongelado para el tiempo de equilibrio de 8 a 9 h y el menor para el de 2 a 3 h ( $P < 0.05$ ). El porcentaje de motilidad pos-descongelado fue de 34.3% para el tiempo de equilibrio de 8 a 9 h ( $P < 0.05$ ), 29.4% para 4 a 5 h y 18% para 2 a 3 h ( $P < 0.05$ ) (Figura 1).

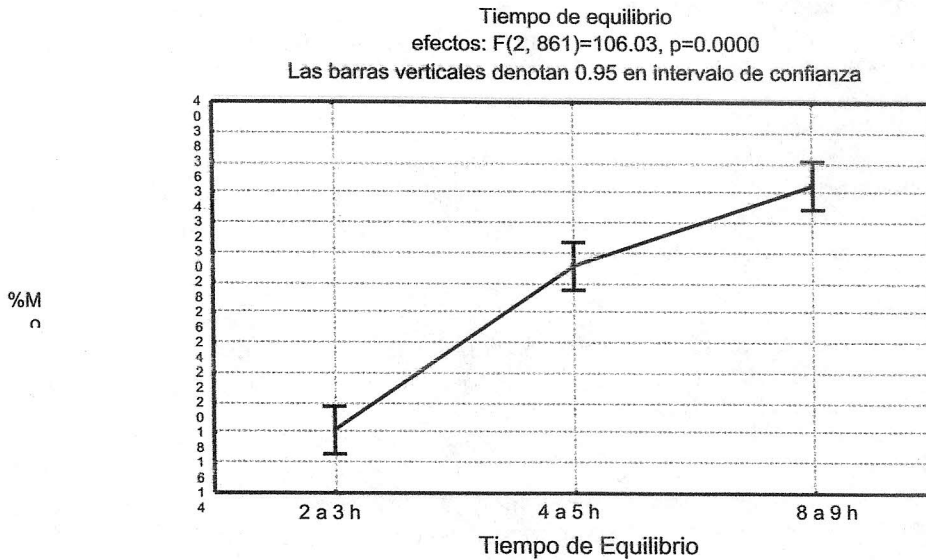


Figura 1. Efecto del tiempo de equilibrio antes de la congelación sobre la movilidad pos-descongelado de semen bovino.

En cuanto al diluyente, el semen diluido con Triladyl mostró 30.8% de motilidad pos-descongelado, comparado con el diluido con Andromed que mostró 23.8% de motilidad pos-descongelado ( $P<0.05$ ) (Figura 2).

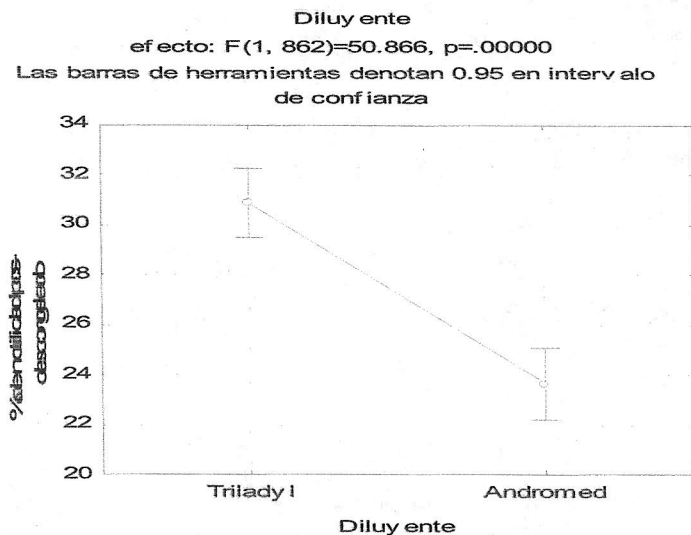


Figura 2. Efecto del diluyente sobre la motilidad pos-descongelado de semen bovino.

Al analizar la interacción entre el diluyente y el tiempo de equilibrio, se observó que el diluyente que permitió un mayor porcentaje de motilidad pos-descongelado fue el Triladyl con un tiempo de equilibrio de 8 a 9 h ( $P<0.05$ ), en comparación con el Andromed en ese mismo tiempo, o con Triladyl o Andromed en los otros tiempos de equilibrio. La motilidad pos-descongelado usando Triladyl fue de 40.7% para un tiempo de equilibrio de 8 a 9 h ( $P<0.05$ ), 32% para 4 a 5 h y 20% para 2 a 3 h ( $P<0.05$ ), mientras que para el Andromed la motilidad pos-descongelado fue de 28% a las 8 a 9 h, 26% a las 4 a 5 h ( $P>0.05$ ) y 16.7% para 2 a 3 h ( $P<0.05$ ) (Figura 3).

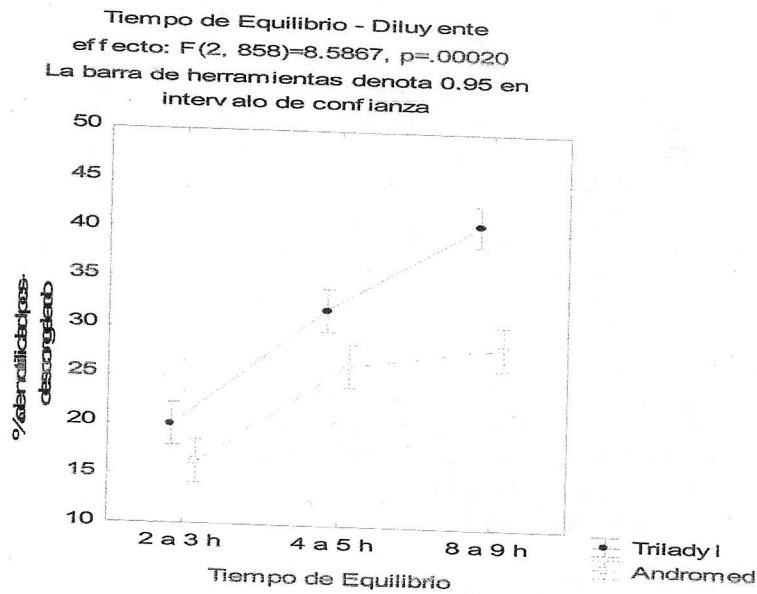


Figura 3. Efecto de la interacción tiempo de equilibrio - diluyente sobre la motilidad pos-descongelado de semen bovino.

Con respecto al porcentaje de motilidad espermática pos-descongelado según los minutos transcurridos desde la descongelación hasta la evaluación del semen, el mayor porcentaje de motilidad espermática se observó en el semen evaluado inmediatamente después de ser descongelado, y el menor porcentaje de motilidad fue para el semen evaluado a los 90 min pos-descongelado ( $P<0.05$ ). Se encontró diferencia entre todos los tiempos de evaluación ( $P<0.05$ ). El semen evaluado a los 0 min tuvo una motilidad de 32.8%, a los 30 min fue de 29.3%, a los 60 min fue de 25.6% y a los 90 min fue de 21.8% (Figura 4).

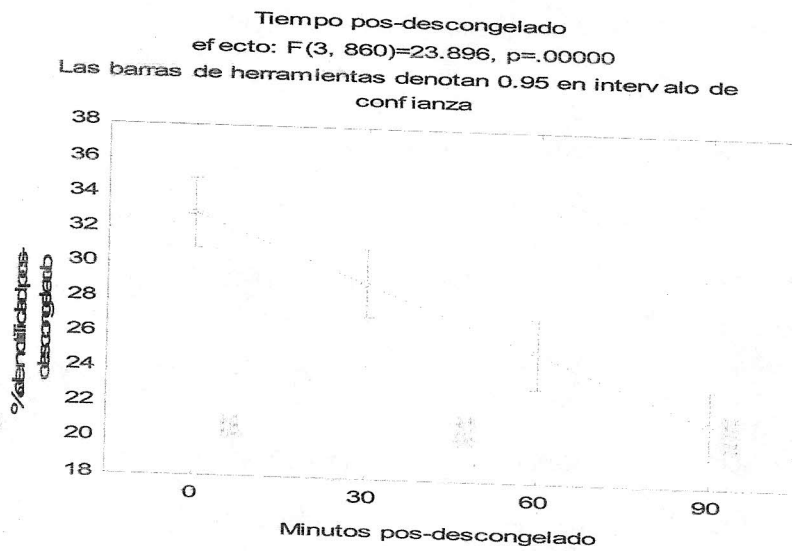


Figura 4. Efecto del tiempo transcurrido desde la descongelación hasta la evaluación del semen sobre el porcentaje de motilidad pos-descongelado de semen bovino.

## DISCUSIÓN

El diluyente Triladyl ha sido anteriormente estudiado y validado como efectivo para la congelación de semen bovino en regiones tropicales (Villa, 1996). En el presente estudio, el Triladyl mostró ser más efectivo que el Andromed para congelar semen bovino, contrario a lo indicado por Aires *et al.* (2003) en un estudio realizado en Alemania en el cual se evaluaron estos mismos diluyentes con resultados similares, sólo que bajo condiciones climáticas y de trabajo totalmente diferentes a las tenidas durante la realización del presente estudio. Se han llevado a cabo otros estudios usando diferentes diluyentes a base de soya, en donde se obtuvieron resultados similares a los de este estudio, indicando que los diluyentes a base de yema de huevo producen una tasa de no retorno en vacas inseminadas ligeramente mayor a la resultante de usar diluyentes a base de soya (van Wagtendonk-de Leeuw *et al.*, 2000; Thun *et al.*, 2002).

De acuerdo con el presente estudio, el tiempo de equilibrio antes de la congelación que produjo una mayor tasa de motilidad pos-descongelado para ambos diluyentes fue el de 8 a 9 h, similar al reporte de Villa (1996), y contrario a las indicaciones del fabricante del Andromed que recomienda un tiempo de equilibrio de mínimo 2 h.

Por otro lado, los eyaculados congelados diluidos con Andromed permiten una mejor visibilidad en el microscopio, además, aunado a la fácil preparación de este diluyente, el no poseer ingredientes de origen animal, que pueden representar un riesgo de contaminación bacteriana, así como el no necesitar de material como el papel filtro y huevos de gallina, representan ventajas de éste sobre el Triladyl. Sin embargo, el Andromed tiene un precio más elevado que el Triladyl y, como se demostró en este estudio, resultó en una menor motilidad espermática pos-descongelado en semen de bovino que el Triladyl.

## CONCLUSIONES

El semen congelado de bovino diluido con Triladyl produce una motilidad espermática pos-descongelado mayor que el semen congelado diluido con Andromed. El mejor tiempo de equilibrio evaluado en este estudio para ambos diluyentes fue de 8 a 9 h. El tratamiento que resultó en una mayor motilidad pos-descongelado de semen de bovino en el presente estudio fue la dilución con Triladyl con un tiempo de equilibrio de 8 a 9 h. Sin embargo, el Andromed también puede utilizarse como diluyente para congelar semen de bovino en el trópico, aunque con menor tasa de motilidad pos-descongelado que si se usa el Triladyl.

## LITERATURA CITADA

- Aires, V. A., K. D. Hinsch, F. Mueller-Schloesser, K. Bogner, S. Mueller-Schloesser and E. Hinsch. 2003. *In vitro* and *in vivo* comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology* 60:269-279.
- Bearden, H. J. 1982. Reproducción animal aplicada. Manual Moderno, México, D. F. 336 p.
- Derivaux, J. 1982. Reproducción de los animales domésticos. 2a ed. Acribia. Zaragoza, España. 486 p.
- Gadea, J. 2003. Semen extenders used in the artificial insemination of swine: Review. *Span. J. Agric. Res.* 2:17-28.
- Salisbury, G. W., N. L. Vandermark y R. J. Lodge. 1982. Fisiología de la reproducción e inseminación artificial de los bovinos. Acribia. Zaragoza, España. 831 p.
- Sorensen, M. A. 1984. Reproducción animal. McGraw-Hill, México, D. F. 394 p.
- Thun, R., M. Hurtado and F. Janett. 2002. Comparison of Biociphos-Plus and TRIS-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. *Theriogenology* 57:1087-1094.



- van Wagtendonk-de Leeuw, A. M., R. M. Haring, L. M. Kaal-Lansbergen and J. H. den Daas. 2000. Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soy bean extract. *Theriogenology* 54:57-67.
- Villa, L. G. 1996. Efecto de diferentes tratamientos en el procesamiento y en la motilidad pos-descongelado de espermatozoides criopreservados de bovino. Tesis licenciatura. Universidad Veracruzana. Veracruz, Ver., México. 56 p.