

**EFFECTO DEL TIPO DE DILUYENTE Y TEMPERATURA DE  
DESCONGELAMIENTO SOBRE LA CALIDAD DEL SEMEN  
OVINO PROCESADO**

Carlos de Luna Villarreal<sup>1</sup>, José Luis Berlanga Flores<sup>2</sup>, Ricardo Silva Cerrón<sup>3</sup>  
Heriberto Díaz Solís<sup>4</sup>, Laura E. Padilla González<sup>5</sup>

---

1, 2, 3 y 4 Maestros Investigadores del Departamento de  
Producción Animal y Recursos Naturales. UAAAAN  
5 Tesista de Maestría en Producción Animal. UAAAAN

## **RESUMEN**

Con el propósito de establecer el medio de criopreservación adecuado para semen de ovino, así como la temperatura óptima para su descongelamiento, se evaluaron 544 pajillas distribuidas en cuatro diluyentes diferentes (combinación de leche y yema deshidratadas, "citrato-yema", leche y solución buffer de sales minerales) y tres temperaturas de descongelamiento ( $5^{\circ}\text{ C}/15\text{ min}$ ,  $35^{\circ}\text{ C}/30\text{ seg}$  y  $75^{\circ}\text{ C}/10\text{ seg}$ ). El parámetro que se observó, fue la motilidad espermática recuperada post-descongelamiento. Se analizaron los datos obtenidos mediante el diseño completamente al azar con arreglo factorial de  $4 \times 3$ ; se encontraron diferencias significativas para diluyentes ( $P < .01$ ) y temperaturas ( $P < .05$ ); no se encontró interacción entre estas variables. Para establecer qué diluyente y qué temperatura de descongelamiento resultan más adecuados para semen de ovinos, se hizo una comparación de medias (Tuckey) donde se observó que el diluyente combinación de leche y yema deshidratada, y la temperatura de  $35^{\circ}\text{C}/30\text{ seg}$  dan los mejores resultados contra la pérdida de motilidad post-descongelación.

**Palabras clave:** semen, diluyente, temperatura de descongelamiento y motilidad.

## **ABSTRACT**

Five-hundred and forty four straws prepared with four extenders, dehydrated milk and yolk combination, citrate-yolk, milk, buffer solution of mineral salts and thawing at three different temperatures and times  $5^{\circ}\text{ C}/15\text{ min}$ ,  $35^{\circ}\text{ C}/30\text{ seconds}$ ,  $75^{\circ}\text{ C}/10\text{ seconds}$  were tested to evaluate the best medium for cryopreservation and optimum thawing temperature of ovine semen. The parameter

observed was the motility recovered post-thawing. The statistical model was a complete random design with a factorial arrangement four by three with the Tukey test used to compare the means. There were significant differences for main effects extenders ( $P < .01$ ) and motility recovered post-thawing ( $P < .05$ ). No interaction effects were found. The extender combined with a temperature of 35° C thawed for 30 seconds gave the best response.

**Key words:** semen, extenders, temperature post thawing, motility.

## INTRODUCCIÓN

La crio-preservación es una técnica que ha hecho posible mantener el semen en medios nutritivos que permiten prolongar la capacidad de fertilización de los espermatozoides. En este proceso es también importante el descongelamiento del semen procesado, ya que no hacerlo en forma adecuada, puede ocasionar daños irreversibles al espermatozoide.

Pocas investigaciones se han realizado con semen congelado de carneros, lo cual ha limitado la inseminación artificial (First *et al.*, 1961). López y Sosa (1986) afirman que la mayoría de los resultados con semen congelado, revelan índices de fertilidad muy bajos, lo que se debe, entre otras causas, a la falta de una técnica óptima de congelación y descongelación, así como de diluyentes adecuados, por lo que es importante plantear los siguientes objetivos:

- Estimar el efecto del tipo de diluyente (solución buffer de sales minerales, combinación de leche y yema deshidratadas), en la pérdida de motilidad post-descongelamiento en semen procesado de ovinos.
- Evaluar la temperatura de descongelamiento ( $5^{\circ}\text{ C}/15\text{ min}$ ,  $35^{\circ}\text{ C}/30\text{ seg}$  y  $75^{\circ}\text{ C}/10\text{ seg}$ ) que ofrezca la mejor respuesta en la crio-preservación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Reproducción Animal y Unidad Ovina de la UAAAN, ubicado al sur de Saltillo, Coahuila, cuya altitud es de 1742 msnm, con una temperatura media anual de  $17.7^{\circ}\text{ C}$  y una precipitación media de 303.9 mm, con clima seco, semicálido, con invierno fresco extremoso.

Se utilizaron seis sementales ovinos Rambouillet durante los meses de septiembre a noviembre, a los cuales se les extrajo semen por el método de electroeyaculación (Sorensen, 1982), para evaluar su volumen, motilidad, concentración y morfología con las técnicas descritas por Holy (1983).

Posterior a esta calificación, el semen de cada eyaculado se distribuyó en cada uno de los tratamientos señalados en el siguiente cuadro.

Cuadro 1.- Distribución de temperaturas y tiempos de descongelamiento en diluyentes

DILUYENTES	CO			LC			CITRATO LECHE DE SODIO		
Temp. °C	5	35	75	5	35	75	5	35	75
	15 m	10s	10s	15m	10s	10 s	15 m	10 s	10 s

s  
(m) minutos, (s) segundos

CO= Solución buffer de sales minerales

LC= Combinación de leche y yema deshidratadas

La variable a evaluar fue la motilidad espermática post-descongelación, para lo cual se utilizó un diseño experimental completamente al azar con diferentes repeticiones y arreglo factorial de 4x3 con pruebas de comparación de medias de Tukey.

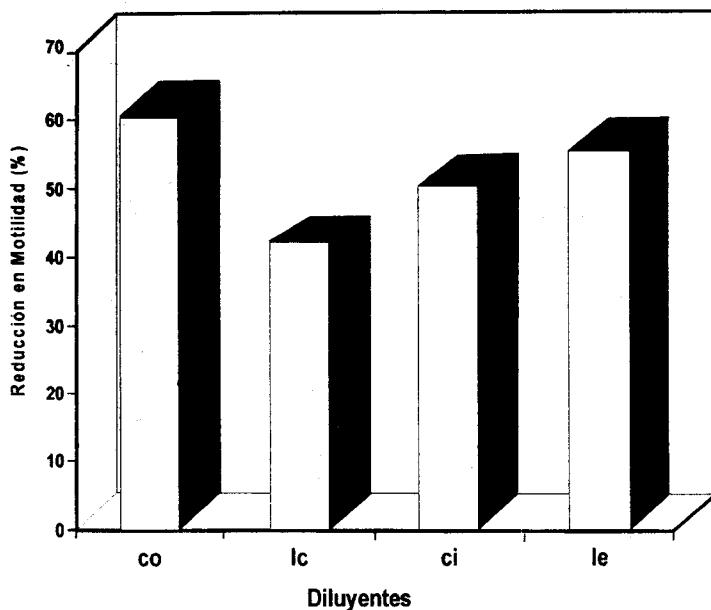
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de varianza señala que hay una diferencia significativa ( $P < .01$ ) para diluyentes, lo que indica que se presenta una respuesta diferente de motilidad recuperada entre los diluyentes a probar, mientras que para las

temperaturas, existe una diferencia significativa ( $P>.05$ ), lo cual indica que las temperaturas marcadas en este estudio dan una respuesta diferente a la motilidad post-descongelación. Asímismo, se encontró no significativo el efecto de la interacción, lo cual indica que el comportamiento de los diluyentes no se ve afectado por las temperaturas utilizadas.

Con esto se establece que la respuesta del semen ovino procesado es diferente según el medio en que se diluya, lo cual se debe, principalmente, a los componentes de cada diluyente analizado; por otro lado, es conocido el efecto que ejercen las alteraciones de temperatura en el semen, pues ocasionan cambios morfológicos y fisiológicos en el espermatozoide, sobre todo durante el proceso congelamiento-descongelamiento.

Mediante prueba de Tukey se encontró que todos los diluyentes son estadísticamente diferentes ( $P<05$ ), con una media de pérdida de motilidad post-descongelamiento de 42.26 %, 50.50 %, 55.59 % y 60.45 % para combinación de leche y yema deshidratada, citrato-yema, leche y solución buffer de sales minerales, respectivamente (figura 1). La superioridad manifiesta para el diluyente se da por sus componentes, ya que contiene leche en polvo y yema de huevo, dos de los principales componentes de la mayoría de los diluyentes; se confiere así una protección extra durante los pasos del enfriamiento y congelamiento, ya que tales componentes aportan fracciones lipoprotéticas y enzimas que cubren la membrana celular del espermatozoide, y catalizan los compuestos tóxicos producto del metabolismo (Ansari, 1988; Salisbury y Van Demark, 1978; Ala-ud-Din y Osana, 1985).



**Figura 1.** Reducción en motilidad por efecto de diluyentes. (co: solución buffer de sales minerales; lc: combinación de leche y yema deshidratadas; ci: citrato-yema; le: leche).

Respecto a las temperaturas, existe diferencia significativa ( $P < .05$ ) entre 35°C/30 seg y 75°C/10 seg respecto a pérdida de motilidad post-descongelación 50.23 % vs 53.60 %, respectivamente, por lo que no es significativa para 5° C/15 min (52.84 %) figura 2. El espermatozoide es sumamente sensible a los cambios de temperatura, por lo que descongelar a bajas o altas temperaturas puede afectar su motilidad recuperada, así como acelerar el metabolismo espermático y, por lo tanto, la acumulación de sustancias tóxicas que dañan al espermatozoide (Evans y Maxwell, 1986; y Peterjkic *et al.*, 1987).

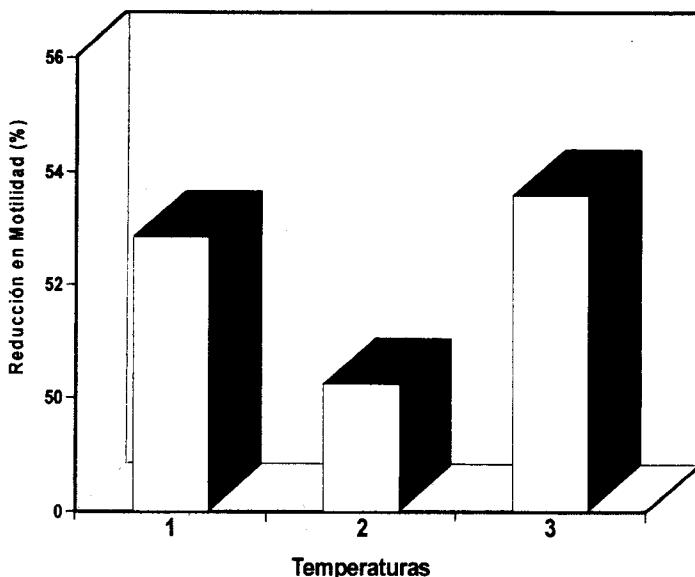


Figura 2. Reducción en motilidad por efecto de temperaturas y tiempos de descongelamiento (1: 5°C/15 min; 2: 335°C/30 seg; 3: 75°C/10 seg).

## CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos se concluye lo siguiente:

- Sobre el efecto de pérdida de motilidad espermática post-descongelación, el diluyente 478 resultó ser el más adecuado para semen ovino.
- El descongelamiento de semen ovino procesado a temperatura de 35°C/30 seg es el que ofrece la mejor respuesta de motilidad recuperada.

## LITERATURA CITADA

- Ala-ud-Din, N.A. and I.A. Osama 1985. A comparative study of the effects of diluents and thawing temperature on rate of motility and livability of spermatozoa stored at 4 celsius. Pakistán Vet. J. 5(3):116-119.
- Ansari, M.R. 1988. Freezability of bovine spermatozoa in Laiciphos-478 employing "Tupol" technique. Indian Journal of Animal Production. 9(1):13-15.
- Evans, G. and W.M.C. Maxwell. 1987. Salomon´s Artificial Insemination of sheep and goats. Butterworths Australia.
- First, N.L., H.A. Henneman, W.T. Magee, and J.A. William. 1961. The frozen storage of ram semen. J. Reprod. Fertil. 20:74-78 .
- Holy, L. 1983. Bases biológicas de la Reproducción bovina. Ed. Diana México. p.463.
- López, P.G. y C. Sosa, F. 1986. Evaluación de diferentes técnicas para la congelación de semen ovino. Dirección de Normatividad Pecuaria (SARH). Reunión de Investigación Pecuaria en México.
- Petrujkic, T.G., M.B. Markovic, and V. Miljkovic. 1987. The study of adequacy of some solvents for the miniature deep-freezing of ram semen. Vet. Glass 41(11-12):938-940. Russia.
- Salisbury, G.W. y N.L. Van Demark. 1964. Fisiología de la reproducción e inseminación artificial de los bovinos. Ed. Acribia, España. 463-503.

Sorensen, A.M. Jr. 1982. Reproducción animal. Principios y prácticas. McGraw-Hill  
México.