

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

**LAURA EMILIA PADILLA GONZALEZ**

**T E S I S**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS  
EN PRODUCCION ANIMAL**



**Universidad Autónoma Agraria**

**Antonio Narro**

**PROGRAMA DE GRADUADOS**

**Buenavista. Saltillo, Coah.**

**SEPTIEMBRE DE 1997.**

Tesis elaborada bajo la supervisión del Comité Particular de Asesoría y aprobada como requisito parcial para optar al grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS  
EN PRODUCCION ANIMAL**

**COMITE PARTICULAR**

Asesor Principal:



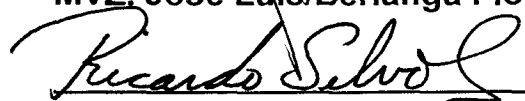
Dr. Carlos de Luna Villarreal

Asesor:



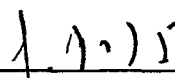
MVZ. José Luis Berlangá Flores

Asesor:

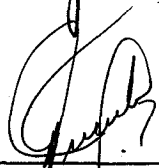


MSc. Ricardo Silva Cerrón

Asesor:



Dr. Heriberto Díaz Solís



Dr. Jesús M. Fuentes Rodríguez  
Subdirector de Postgrado

Buenavista, Saltillo, Coahuila.  
Septiembre de 1997

## AGRADECIMIENTOS

Dr. Carlos de Luna Villarreal, por los conocimientos teóricos y prácticos recibidos con un espíritu de responsabilidad, y demostrar con hechos el continuar el camino de la superación. Pero sobre todo por su amistad y confianza.

MVZ. José Luis Berlanga Flores, por su apoyo de siempre y por forjar en mi el ir más allá, pero ante todo por ser mi amigo.

Ing. Ricardo Silva Cerrón, por la motivación que siempre me ha dado, pero ante todo por su apoyo y amistad incondicional.

Dr. Heriberto Díaz S., por el trabajar siempre juntos y el confiar en mi. Gracias mi amigo.

MVZ. José A. Gallardo M., gracias por estar siempre conmigo.

Dr. Eduardo Aizpuru G., muchas gracias doctor por todas sus sugerencias.

Agradezco infinitamente a todos mis amigos y compañeros de trabajo. Gracias.

Lic. Diana Castro A., Gracias por todo

Sra. Ana María Fuentes, por tu apoyo y paciencia en mi. Muchas gracias Anita.

Sra. Lupita Rodríguez..... gracias por brindarme parte de tu tiempo para este trabajo.

## DEDICATORIA

A Dios por mi vida

A mis Padres por la oportunidad de ser y estar aquí

A Mema, Goya y Tilo, por siempre. Gracias

A Pepe por ser así conmigo

A ese espíritu que encausó mi camino para realizar un sueño

A todos los que saben cuanto los quiero

## COMPENDIO

Efecto del tipo de diluyente y temperatura de descongelamiento sobre la  
calidad del semen ovino procesado.

POR

LAURA EMILIA PADILLA GONZALEZ

MAESTRIA

PRODUCCION ANIMAL

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA. MEXICO SEPTIEMBRE DE 1997

DR. CARLOS DE LUNA VILLARREAL - Asesor-

Palabras clave; Semen, diluyente, temperatura de descongelamiento y motilidad.

Con el propósito de establecer el medio de criopreservación adecuado para semen 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° C/15 min, 35° C/30 seg y 75° C/10 seg). El parámetro observado fue la motilidad recuperada post-descongelamiento.

Los datos obtenidos fueron analizados por el paquete estadístico Statgraphics, Ver. 5.0 (1993) mediante el diseño completamente al azar con arreglo factorial de 4x3 y pruebas de comparación de medias por Tuckey. Encontrándose diferencias altamente significativas ( $P < .01$ ) para diluyentes y significativas ( $P < .05$ ) para temperaturas, lo cual indican que para ambas variables hay una respuesta diferente de motilidad recuperada post-descongelación. Sin embargo, la interacción entre estas variables es no significativa (NS):

Con el fin de establecer que diluyente y temperatura de descongelamiento es la más adecuada para semen ovino se hizo una comparación de medias (Tuckey) donde se observó que el diluyente Combinación de leche y yema deshidratadas y la temperatura de 35° C/30 seg dan los mejores resultados para la respuesta de pérdida de motilidad post-descongelación.

## ABSTRACT

Effect of extender and thawing temperature on processed ovine semen quality.

By

LAURA EMILIA PADILLA GONZALEZ

MASTER OF SCIENCE

ANIMAL PRODUCTION

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA. MEXICO SEPTEMBER OF 1997

DR. CARLOS DE LUNA VILLARREAL -Advisor-

Key words: Semen, Extenders, Temperature Post thawing, Motility.

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° C/15 min,

35° C/30 seconds, 75° C/10 seconds were tested to evaluate the best medium for crio-preservation 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 Tuckey 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 dehydrated milk and yolk combination combined with a temperature of 35° C thawed for 30 seconds gave the best response.



## INDICE DE CONTENIDO

	Pág.
INDICE DE CUADROS.....	xi
INDICE DE FIGURAS.....	xii
INTRODUCCION.....	1
Objetivos.....	3
REVISION DE LITERATURA.....	4
Selección del semental .....	4
Evaluación de la producción de semen y factores que intervienen....	6
Procesamiento de semen.....	8
Generalidades.....	8
Diluyentes más comunes.....	13
Características generales.....	13
Composición de los diluyentes.....	15
Tipos de diluyentes.....	20
Preparación.....	23
Descongelamiento.....	26
Temperaturas y tiempos de descongelamiento.....	26
Evaluación post-descongelamiento.....	29
Motilidad recuperada.....	29
MATERIALES Y METODOS.....	31

	Pág.
Area de Estudio.....	31
Animales utilizados.....	31
Muestreo.....	32
Evaluación de semen.....	33
Diluyentes.....	34
Procesamiento.....	35
Descongelamiento.....	38
Evaluación post-descongelamiento.....	39
Diseño Estadístico.....	39
RESULTADOS Y DISCUSION.....	41
CONCLUSIONES.....	48
RESUMEN.....	50
LITERATURA CITADA.....	52
APENDICE.....	58

## INDICE DE CUADROS

Cuadro		Pág.
3.1	Distribución de Temperaturas y tiempos de descongelamiento en diluyentes.....	38
3.2	Conformación del diseño estadístico.....	39

## INDICE DE FIGURAS

Figura		Pág.
4.1	Reducción en motilidad por efecto de diluyentes. Medias y rangos para prueba de Tuckey al 95% (co: Solución buffer de sales minerales lc: combinación de leche y yema deshidratadas ci: Citrato, le: Leche).....	42
4.2	Reducción en motilidad por efecto de temperaturas y tiempos de descongelamiento. Medias y rangos para prueba de Tuckey al 95% (1: 5° C/15 min; 2: 35° C/30 seg; 3: 75° C/10 seg).....	43
4.3	Reducción en motilidad por efecto de la interacción de diluyentes (co: Solución buffer de sales minerales lc: Combinación de leche y yema deshidratadas; ci: Citrato, le: Leche) por temperaturas (1: 5° C/15 min; 2: 35° C/30 seg; 3: 75° C/10 seg).....	45

## INTRODUCCION

La inseminación artificial continúa siendo la técnica más importante utilizada para el mejoramiento genético animal, lo cual ha influido notablemente en incrementar la productividad de los hatos ganaderos, a través del empleo de semen de animales genéticamente superiores conservado por métodos de criopreservación.

La criopreservación es una técnica que permite mantener "vivo" material biológico en medios artificiales; su aplicación ha hecho posible preservar semen en medios nutritivos que permiten prolongar la capacidad de fertilización de los espermatozoides, reduciendo su actividad metabólica durante el congelamiento. Estos medios, además de ser una fuente de energía, mantiene la presión osmótica y balance electrolítico, así mismo inhiben el desarrollo microbiano, preservan de material tóxico y previenen el choque por cambios de temperatura; y sirven como medio diluyente para incrementar el volumen utilizable de semen y de esta manera obtener mayores rendimientos del mismo.

Parte importante de este proceso de conservación, es el descongelamiento del semen preservado, ya que esta es una etapa muy crítica, pudiéndose causar daños irreversibles al espermatozoide, si no se hace de

manera adecuada. La temperatura empleada en el descongelamiento depende en gran medida del medio nutritivo y de la temperatura a la cual se realizó el congelamiento, ya que lo que se persigue es obtener el mayor grado de recuperación de espermatozoides viables, lo cual depende de la estrecha interacción existente entre los pasos del proceso.

Los estudios realizados en relación a tipos de medios o diluyentes y temperatura óptima de descongelamiento prácticamente se han reducido a la preservación de semen de ganado bovino, lo cual ha ocasionado que la mayoría de las especies domésticas restantes aún estén en vías de desarrollo experimental.

Bajo este contexto, en lo relativo a la especie ovina, particularmente en nuestro país, se ha mantenido al margen del avance tecnológico lo que obedece entre otras causas, a los costos para establecer un programa de IA dentro de una explotación, ya que éstas, en la mayoría de los casos, sobrepasan a las posibles retribuciones, debido básicamente a la fuerte dependencia de material genético proveniente del extranjero, así como el operar dentro de un mercado muy limitado.

Por lo anterior, es de interés buscar opciones para eficientar los recursos disponibles y así incrementar el empleo de nuevas tecnologías dentro de esta especie.

Dada la importancia de lo expuesto, se planteó el presente estudio, marcándose los siguientes:

### **Objetivos**

- Estimar el efecto del tipo de diluyente (Combinación de leche y yema deshidratadas, Citrato-yema, Leche, Solución buffer de sales minerales) en la pérdida de motilidad post-descongelación en semen ovino preservado.
- Evaluar la temperatura de descongelamiento (5° C/15min, 35° C/30 seg, 75° C/10 seg) que ofrece la mejor respuesta en la criopreservación de semen ovino.

## REVISION DE LITERATURA

### Selección del Semental

El principio de un programa de inseminación artificial en ovinos es mejorar las características de producción, lo cual depende en gran medida del semental a utilizar. Una estimación de su propio valor genético depende de su producción así como del valor de su progenie. Existen otros criterios a considerar en la selección de sementales, como pueden ser salud y condición corporal. Los órganos reproductores deben ser examinados con particular atención al tamaño, forma y textura testicular, así como que el prepucio, pene y uretra no presenten alteraciones.

Otro aspecto importante es su capacidad de servicio y vigor sexual, así como producir semen en buena cantidad y calidad.

Los sementales pueden mostrar esterilidad transitoria debido a condiciones variantes de estres como altas temperaturas y humedad, cambios ambientales o de dieta, enfermedades u otros factores.



Por otro lado, en el caso de ovinos uno de los factores más importantes que controlan la cantidad y calidad del semen producido es la estación del año. (Evans y Maxwell, 1987).

Con el fin de multiplicar la utilidad de los sementales con rasgos sobresalientes, Sorensen (1982) menciona que se han desarrollado métodos que permiten incorporar un medio al volumen del eyaculado, para prolongar la vida de los espermatozoides, así como para almacenarlo a largo plazo.

Por lo tanto, es indispensable apearse a los criterios estrictos de selección. Uno macho fértil debe ser masculino y los rasgos que lo caracterizan es ser musculoso y tosco, considerando la cabeza, cuello, espalda, costillar, grupa, patas, pezuñas, testículos, vaina y tamaño esquelético.

Shelton *et al.* (1996) definen que parte importante en la selección del semental es la producción de semen, la cual se ve afectada principalmente por nutrición, temperaturas y enfermedades. Así mismo, mencionan que en borregos de lana aquellos más cubiertos de la cara presentan una fertilidad más baja.

En un estudio realizado por Yarney *et al.* (1990), con borregos Suffolk indican la importancia de seleccionar sementales con buen desarrollo testicular,

ya que esto está relacionado ampliamente con la función espermatozoaria.

Así mismo, Trejo *et al.* (1990) encontraron diferencias significativas entre el tiempo de reacción (contacto con una hembra) y la circunferencia escrotal (+) y de esta con las horas-luz (-) y peso corporal (+).

### **Evaluación de la producción del semen y factores que intervienen**

Después de la colección de semen, la cantidad y calidad de cada eyaculado deberá ser cuidadosamente analizada antes de usarlo. Tener cuidado de no ser expuesto a condiciones desfavorables después de la colección. La cantidad depende del volumen y concentración, mientras que la calidad incluye morfología y motilidad espermática (Evans y Maxwell, 1987).

Los cambios estacionales están asociados estrechamente con los ciclos de luz mostrando en la concentración de fructosa los cambios más grandes. Estos cambios son considerados ser un reflejo de la secreción de testosterona e indirectamente de la secreción de gonadotropina y por lo tanto de la producción de espermatozoides. Así mismo, las altas temperaturas causan una disminución en el volumen, concentración, motilidad, porcentaje de espermatozoides vivos y normales. Sin embargo, no afecta la concentración de fructosa, ni el líbido, indicando así mismo que la secreción de testosterona no se ve afectada (Cupps, *et al.*, 1959).

Delgadillo *et al.* (1992) mencionan que la calidad seminal presenta variaciones estacionales muy marcadas principalmente influenciados por cambios en el fotoperíodo. Porcentajes mínimos de espermias normales y disminución de su velocidad ocurren durante la primavera y verano en sementales caprinos, sin embargo, la fertilidad espermática no se ve afectada.

Por otro lado, De Alba (1985) dice que el semen contiene espermatozoides los cuales realizan un metabolismo utilizando materiales del plasma seminal (fructosa), así como plasmalógeno (Holy, 1983). Dicho metabolismo produce  $\text{CO}_2$ , agua y algo de ácido láctico; por lo que el  $\text{CO}_2$  en alta concentración puede inhibir la motilidad espermática, y alterar el pH (Evans y Maxwell, 1990).

Colas (1979) observó cambios morfológicos en términos de porcentaje de espermatozoides anormales (principalmente gota citoplasmática y colas anormales) es manifiesto cuando las horas-luz se incrementan, aunque la motilidad no se vea afectada, por lo tanto hay una relación muy estrecha entre la fertilidad del macho y la morfología del semen.

En un estudio realizado por Chakrabarti *et al.* (1993), se utilizaron sementales caprinos (Black Bengal) de dos a tres años, donde se encontró que la concentración de fructosa presenta una alta correlación (0.85) con la concentración espermática y con el porcentaje de motilidad (0.49). Así mismo,

Zheltobeyukh *et al.* (1990) trabajando con borregos por dos años, establecieron que al disminuir las horas-luz (nueve a diez hr/día) aumentó el volumen eyaculado (0.77 a 1.98 ml), la concentración espermática (3.69 a 4.24 x 10<sup>9</sup>/ml), la motilidad post-descongelación (44-46 por ciento), la concentración de testosterona (0.7 -1.7 ng/ml) en comparación al control de 12-17 hr/día. Esto mismo fue observado en borregos Corriedale por Girao y Filho (1985) sobre el efecto de las condiciones ambientales (horas-luz) en la producción espermática.

Parece ser que la melatonina secretada durante la noche por la glándula pineal habilita a los animales a determinar la duración del día. Por lo que esta hormona puede ser usada en cabras y borregas para incrementar su fecundidad. Así mismo, bajo un estrés de calor el libido, producción de semen y fertilidad son significativamente alterados (Chemineau, 1993).

## **Procesamiento de Semen**

### **Generalidades**

Pocas investigaciones se han realizado con semen congelado de borregos, lo cual ha limitado la inseminación artificial. El espermatozoide congelado puede ser usado pudiendo sobrevivir un almacenamiento prolongado en frío y ser capaz de fertilizar un óvulo (First, *et al.*, 1961).

El avance genético logrado por medio de la inseminación artificial y utilizando semen fresco han limitado su aplicación debido a la pérdida de viabilidad por tiempo transcurrido, sin embargo, esto se puede resolver mediante el empleo de semen congelado lo cual ha presentado baja fertilidad y alta mortalidad embrionaria (Langford, *et al.*, 1979).

En este contexto Evans y Maxwell (1987) mencionan que el principio de preservar semen congelado es prolongar la capacidad de fertilización del espermatozoide al reducir su motilidad y reacciones metabólicas. Así mismo ofrece las ventajas de conservar genética a futuro, facilitar el transporte (internacional) y poder ser colectado y almacenado fuera de la estación reproductiva.

López y Sosa (1986) afirman que la mayoría de los resultados en inseminación artificial con semen congelado son muy bajos debiéndose entre otras causas a la falta de una técnica de congelación y descongelación, así como de diluyentes adecuados para el espermatozoide ovino.

El Manual Técnico IMV (1980) recomienda congelar el semen ovino en el otoño, ya que la mayor demanda de semen congelado es en primavera, pero desafortunadamente en esta estación el semen colectado y congelado es de baja capacidad de fertilización. Dos variables críticas influyen fuertemente

durante el proceso de congelamiento - descongelamiento y son la presión osmótica y el pH (Steinbach y Foote, 1967).

En la preservación de semen, Weitze y Petzoldt (1992) manejan lo siguiente: Bajar gradualmente la temperatura a un nivel en el cual la actividad funcional del espermatozoide se reduce mínimamente, pero que sea reversible, la adición de varias sustancias al semen, lo cual supla de nutrientes y controle la actividad metabólica y la remoción de secreciones accesorias y concentrar los espermatozoides en un volumen pequeño.

Por otro lado, el grado de crio-daño en espermatozoides durante los procedimientos de preservación varía considerablemente entre especies, sin embargo, las correlaciones estructurales y funcionales de este efecto no han sido identificadas, por lo que Holt y North (1991) han encontrado que espermatozoides con proporciones iguales de colesterol y fosfolípidos (humano y mono) son menos susceptibles al choque frío ya que contienen menor cantidad de colesterol (toro, borregos), por lo que el contenido alto de ácidos grasos saturados confiere estabilidad a la membrana.

Así mismo, el cito-esqueleto de proteínas (actina) asociado a la membrana del espermatozoide quizá influye en la respuesta al enfriamiento del esperma. La actina se localiza en el segmento principal del acrosoma, pero en la región ecuatorial fue negativo. Así, el enfriamiento del esperma afecta la

membrana plasmática, por lo tanto las interacciones entre proteínas de la membrana y actinas puede desestabilizarse durante el enfriamiento.

Varios investigadores, entre ellos Hill *et al.* (1953) han analizado los efectos de un enfriamiento o congelamiento rápido o lento, así como la adición de un agente crioprotector al diluyente para la preservación del semen ovino, ya que los porcentajes de concepción han resultado muy bajos (5-17 por ciento).

De tal manera que Salisbury y Van Demarck (1964) mencionan que la forma más efectiva de disminuir las tasas metabólicas de los espermatozoides para así prolongar su vida es disminuir la temperatura. Puede soportar altas temperaturas, pero las necesidades de energía son altas y los productos tóxicos pueden acumularse rápidamente. Su necesidad más fuerte de energía es para la motilidad; ya que los espermatozoides desarrollan un metabolismo aerobio y anaerobio, por lo que al preservarse se debe aportar una fuente de energía para proteger las reservas intracelulares y sus componentes.

Por otro lado, los sementales caprinos producen enzimas en el plasma seminal, cuyos niveles se incrementan durante la estación no reproductiva, obstruyendo la conservación de semen por congelamiento, causando daño celular.

La motilidad también disminuye y las anomalías en el acrosoma son inducidas. Con lo cual decrece la capacidad de fertilización que junto con la pérdida de espermatozoides durante el congelamiento, requiere incrementar el número de espermatozoides/dosis. Por lo que al adicionar buffers amino-orgánicos puede disminuir las alteraciones durante el procesamiento (Dunner, 1993).

En el caso del toro, borrego y cerdo, Nauck (1988) menciona que el acrosoma, membrana plasmática y mitocondria fueron las estructuras más dañadas en el proceso congelamiento - descongelamiento.

Tibary (1990) encontró en pruebas realizadas para evaluar el efecto de la diálisis en la motilidad espermática que al hacerse con semen fresco la diálisis de plasma seminal decreció la motilidad espermática, mientras que la diálisis de semen antes de congelar mejoró la motilidad post-descongelación. No encontrando diferencias significativas ( $P < .05$ ) en fertilidad para hembras servidas naturalmente (44.4 por ciento) y de hembras inseminadas con diálisis de semen fresco (44.7 por ciento) (Schmehl *et al.*, 1986).

Srivastava *et al.* (1989) menciona que las pajillas son preferidas para preservar semen de borrego porque facilita el enfriamiento y calentamiento más uniforme durante el proceso completo comparado con pellets y ampollitas.



## Diluyentes más comunes

### Características generales

Los diluyentes son sustancias que se agregan al eyaculado para conservar su fertilidad y con esta dilución se persigue:

- Añadir al semen sustancias nutritivas, protectoras y amortiguadoras
- Aumentar el volumen y por lo tanto inseminar mayor número de hembras
- Reducir el metabolismo de los espermatozoides al mínimo al descender la temperatura del semen diluido.
- Restringir el crecimiento microbiano mediante la adición de antibióticos

Existen gran cantidad de diluyentes desde los químicos constituidos por soluciones salinas isotónicas hasta los que contienen sustancias orgánicas como yema de huevo y leche (Valencia *et al.*, 1986).

Así mismo, Evans y Maxwell (1990) mencionan que los diluyentes apropiados deben proporcionar a los espermatozoides nutrientes, sistemas amortiguadores a los cambios de pH y un ambiente isotónico. Además de protegerlos del choque frío durante la congelación.

Otra de las funciones del diluyente, que afirma Sosa (1976) es la que tiene como objeto aumentar el volumen total y así poder ser aplicable en inseminación artificial. Así mismo, ofrece un medio favorable para la

supervivencia de los espermatozoides "in vitro". Mencionando este mismo autor, las siguientes cualidades de un medio de dilución:

- Presión osmótica isotónica
- pH favorable para conservar la viabilidad espermática
- Capacidad buffer para proteger contra variaciones de pH sobre todo en semen de alta concentración.
- Contener electrolitos carentes de toxicidad

Se observa que la calidad del semen procesado en ovinos está usualmente afectada por el tipo de diluyente, su naturaleza y la concentración del agente crioprotector (El Gaafary, 1990). Un buen diluyente de semen para inseminación artificial depende del resultado de la inclusión de sustancias orgánicas como la yema de huevo y la leche cuyas propiedades no han sido totalmente entendidas (Shannon y Curson, 1987).

Así, Evans y Maxwell (1987) concluyen que la dilución de semen se lleva a cabo por dos razones fundamentales:

- a. Técnicas: Es posible lograr preñar una proporción más alta de hembras por inseminación artificial, empleando un volumen y concentración mínima de espermatozoides.
- b. Biológicas: Los diluyentes adecuados deben proporcionar nutrientes a los espermatozoides, amortiguar los cambios de pH y ofrecer un ambiente

isotónico. Así mismo, proteger a los espermias del choque frío durante el congelamiento.

### **Composición de los diluyentes**

Los diluyentes deben tener propiedades amortiguadoras para proteger de los cambios de pH y tonicidad, contener una fuente de energía. Así mismo, un agente protector de la membrana celular durante el enfriamiento a 5° C y un agente crioprotector que protege a la membrana del espermatozoide durante el congelamiento a -196° C. Es importante conocer que la tonicidad óptima del diluyente depende de sus constituyentes.

La cantidad de crioprotector requerido para proteger el espermatozoide varía de acuerdo al método de congelamiento y a la composición y tonicidad del diluyente (Evans y Maxwell, 1987).

Así mismo, Salisbury y Van Demarck (1964) dicen que un buen diluyente debe proporcionar una fuente de energía, regular la presión osmótica y el equilibrio electrolítico, acción amortiguadora de pH, inhibición en el desarrollo microbiano y libre de sustancias tóxicas, así como contener un agente crioprotector para el choque frío.

Fiser *et al.* (1982) encontraron que la crio-supervivencia del espermatozoide se incrementó significativamente en diluyentes hipertónicos

comparado con diluyentes isotónicos. Así es posible substituir la combinación dextran - azúcar en lugar de yema de huevo, ya que un compuesto hipertónico reduce el volumen de la formación de hielo intracelular.

Es descrito por Weitze y Petzoldt (1992) que la fracción lipoprotéica de la yema de huevo es aparentemente el componente activo de protección al choque frío. La lecitina (fosfatidilcolina) es probablemente un componente activo adicional de la yema de huevo principalmente para espermatozoides de toro y carnero.

Se ha mostrado que el plasma seminal incrementa la susceptibilidad del espermatozoide de toros y borregos al choque frío, por lo que es recomendable la eliminación del plasma seminal por centrifugación.

En un trabajo realizado por Sahni y Mohan (1990) encontraron que dependiendo de la especie animal a procesar es la cantidad de yema de huevo necesaria para preservar semen congelado. Así con semen de búfalo se requiere del cinco por ciento de yema, mientras que en bovinos es de 20 por ciento para una buena recuperación espermática.

Salisbury y Van Demark (1961) establecen que la yema de huevo tiene una acción protectora frente al choque térmico de los espermatozoides debido al contenido de lipoproteínas y lecitinas, ya que intervienen en la integridad de la cubierta lipoprotéica del espermatozoide.

Dentro de las fuentes de energía más frecuentemente utilizadas en diluyentes para semen de carneros, son algunos azúcares como glucosa, fructosa, lactosa, rafinosa, etc., quienes también actúan en el mantenimiento de la presión osmótica del medio (López y Sosa, 1986). De igual manera en un estudio de evaluación de azúcares, Kumar *et al.* (1993) determinaron que los azúcares junto con otros crioprotectores como glicerol y yema son usados en el diluyente para reducir la pérdida de espermatozoides motiles durante la preservación. Dentro de estos azúcares la fructosa sola o combinada con azúcares de alto peso molecular como rafinosa y sucrosa y en combinación con niveles óptimos de glicerol y yema de huevo mantienen una buena motilidad durante la congelación.

Molina *et al.* (1994) establecen que a partir de numerosos estudios con diferentes agentes crioprotectores, se ha definido que el glicerol continúa siendo el mejor agente crioprotector para semen de diferentes especies.

El glicerol actúa uniéndose al agua y disminuye el punto de congelación de las soluciones, se forma menos hielo y deshidrata parcialmente a los espermatozoides (Bearden y Fuquay, 1982).

Así mismo, Kumar *et al.* (1992) mencionan que normalmente el glicerol penetra la membrana celular del espermatozoide lentamente, en ausencia de yema (por lo que la membrana espermática no está cubierta con yema) el

glicerol quizá entre fácilmente al espermatozoide y en un lapso de 24 horas muestre una influencia adversa inhibiendo la motilidad espermática, sin embargo, este comportamiento también depende del diluyente utilizado (leche, citrato, yema, etc.).

Es importante la temperatura y tiempo en que se adiciona el glicerol, ya que Almquist y Wickershaw (1962) encontraron que la ultraestructura y motilidad del espermatozoide se ve menos afectada cuando se adiciona lentamente y a 5° C debido a que ya existe un equilibrio osmótico en el espermatozoide y por lo tanto se ve menos afectado.

En semen ovino procesado, el adicionar exceso de agente crioprotector (glicerol > 10 por ciento) así como de nutrientes y protectores al enfriamiento (yema de huevo) pueden afectar los porcentajes de motilidad post-descongelación y así la fertilidad (First *et al.*, 1961). Así mismo, Hill *et al.* (1953) definieron en borregos niveles de crioprotector > 14 por ciento (glicerol) decrece la supervivencia espermática después del congelamiento.

En otro sentido, Courtens *et al.* (1989) mencionan que el calcio es importante en el proceso de iniciación de la reacción del acrosoma; por lo que el almacenamiento en un medio con alto contenido de calcio (leche o yema) pudiera ser considerado como un paso para iniciar la capacitación.

La contaminación bacteriana del semen puede afectar directamente a los espermatozoides, entrar en competencia por el sustrato de los diluyentes e infectar las hembras inseminadas, por lo que es necesario adicionar agentes eficaces que puedan utilizarse con facilidad y que controlen el desarrollo bacteriano siendo atóxicos para los espermatozoides y por lo tanto que aumenten la fertilidad (Salisbury y Van Demark, 1964). Por otro lado, Ahmad y Foote (1986) dicen que los antibióticos penicilina, estreptomina y polimixina se adicionan usualmente a los diluyentes, convirtiéndose en componentes estandar de los mismos, sin embargo, debido a su prolongado uso muchas bacterias se han vuelto resistentes.

Fue probado por Ahmad (1987) nuevos antibióticos para semen de toro como amikacina, dicloxacilina, cefapirina, ceforanida, gentamicina, miocin y tiamulin encontrándose que todos ellos pueden ser empleados como medidas preventivas en semen procesado.

En un estudio realizado por Stoyanov (1987) en bovinos encontró que el dato de concepción de vacas inseminadas con semen conteniendo gentamicina fue 15 por ciento superior al comparar el semen con penicilina y estreptomina.

### Tipos de diluyentes

Una ventaja de los diluyentes con yema de huevo o leche descremada radica en que contiene catalasa, la cual evita la formación de peróxido de hidrógeno (Hafs, 1961).

Los diluyentes comúnmente usados para diluir semen de borrego contiene tris (hidróximetilo amino metano) o citrato de sodio como buffers, glucosa o fructosa como fuente de energía y yema de huevo como protector al choque frío.

La yema debe ser de huevo fresco, sin restos de albúmina ni membranas. En el caso de la leche, de preferencia se utiliza como leche desnatada o ultrapasteurizada. Si el semen-diluyente va a ser congelado deberá contener un agente crio protector como el glicerol (Evans y Maxwell, 1987).

Kumar *et al.* (1992) establecieron que en la preservación de semen diluido y mantenido a temperaturas de refrigeración es más importante la presencia de yema de huevo que de glicerol. Sin embargo, Kumar *et al.* (1993) dicen que durante el congelamiento es más importante la presencia del glicerol, sus niveles y la forma en como se adiciona, ya que esto mejoró en gran medida



la motilidad recuperada, aunque ésta todavía puede ser superior si previamente se adicionó yema de huevo.

First *et al.* (1961) probaron que 50 eyaculados de borregos, el efecto de adicionar diferentes niveles de yema (0, 3, 6, 12, 24 por ciento) y glicerol (6, 9, 12 y 15 por ciento) al diluyente de leche encontrándose que el nivel de mejor respuesta (motilidad recuperada) para glicerol fue de seis a nueve por ciento, y para yema no mejoró la respuesta en ningún nivel, incluso conforme aumentaba el porcentaje la recuperación espermática disminuía.

Por otro lado, en un trabajo con toros de carne, Smith *et al.* (1979) evaluaron los porcentajes de yema de huevo a adicionar en diluyentes a las temperaturas de enfriamiento (5° C) y congelamiento (-196° C) encontrando que el nivel de yema que dio la mejor supervivencia espermática fue a 5° C con 0.5 a 8 por ciento de yema y a -196° C con 4-32 por ciento.

En otra investigación, Sahni y Mohan (1990) realizada con toros y búfalos donde se probaron diferentes niveles de yema de huevo, se encontró que el porcentaje de yema de huevo que dio las más altas motilidades recuperadas fueron para búfalos al reducirlo hasta un cinco por ciento, mientras que en toros un 20 por ciento.

Por otro lado al emplear leche se debe calentar a 92-95° C durante ocho a diez minutos para inactivar los factores tóxicos de su fracción protéica y que pueden dañar el espermatozoide (Evans y Maxwell, 1990). Así mismo, contiene enzimas como la lactenina que es espermicida, pero que también es destruida a altas temperaturas (Bearden y Fuquay, 1982).

Salisbury y Van Demarck (1964), dicen que la motilidad de los espermatozoides es difícil de determinar en los preparados a base de leche, sin embargo da resultados semejantes al de citrato-yema, sobre todo la desnatada.

En un estudio realizado por Kumar *et al.* (1993) con semen de búfalo, cinco por ciento más seis por ciento de glicerol con leche y cinco por ciento yema más nueve por ciento glicerol con citrato; se encontró que la leche fue superior para motilidad recuperada con bajos niveles de yema y glicerol.

El citrato sódico tiene propiedades quelantes, y dispersa los glóbulos grasos de yema de huevo mejorando su visibilidad. La concentración óptima que se maneja es de 2.9 por ciento con 20-25 por ciento de yema al cual se le puede adicionar glucosa o fructosa (Salisbury y Van Demarck, 1964). Así mismo, Dharni *et al.* (1993) utilizando el diluyente tris tuvieron una mejor respuesta a mantener una alta motilidad a 5° C por 48 horas (76.4 por ciento) que el citrato (70.6 por ciento), esto significa que el tris tiene mayor capacidad

amortiguadora y de penetración dentro del espermatozoide, así como también después de descongelar.

Combinación de leche y yema deshidratadas es un diluyente de leche en polvo que proporciona buena fertilidad cuando se mezcla con el diez por ciento de yema fresca (Salisbury y Van Demarck, 1964). Ansari (1988) efectuó con semen de toros Holstein una dilución con citrato-yema y Combinación de leche / yema deshidratadas encontrando que los porcentajes de motilidad post-descongelamiento fueron 32 y 47 por ciento en promedio respectivamente.

Así, se puede decir que el Combinación de leche y yema deshidratadas es un diluyente de leche en polvo que da buena fertilidad cuando se combina con diez por ciento de yema de huevo (Salisbury y Van Demark, 1978). En un estudio realizado en toros donde se comparó el diluyente Combinación de leche y yema deshidratadas con azúcares combinados (lactosas, fructosa y glicina) con yema de huevo, resultó superior este último con un 50 por ciento de recuperación espermática (Ala-ud-Din *et al.*, 1985)

### **Preparación**

Debe procesarse el semen de manera que pueda asegurar la fertilidad máxima. La tasa de dilución final del semen debe planificarse de manera que el número de espermatozoides presentes en un envase adecuado para su manejo inseminación debe ser suficiente.

La dilución inicial del semen es por lo general a 30-35° C, para la dilución final se va enfriando gradualmente hasta llegar a 5° C y agregar el diluyente final (crio-protector) a esa misma temperatura. Así la velocidad de enfriamiento es de suma importancia (Salisbury y Van Demarck, 1964).

Evans y Maxwell (1986), recomiendan que al mezclarse el semen con el diluyente se debe hacer a la misma temperatura ambos para evitar el choque frío y la consecuente disminución de la fertilidad. Siempre adicionar el diluyente al semen y no lo contrario.

Ha sido demostrado por Weitze y Petzoldt (1992), que el plasma seminal incrementa la susceptibilidad del espermatozoide del toro y borrego al choque frío. Esto parece suceder durante el tiempo de equilibración, ya que hay cambios en la composición de la membrana del espermatozoide.

Por otro lado, dicen Fiser y Batra (1984) que el tiempo de equilibración de dos a seis horas es el que da los mejores resultados de motilidad post-descongelación, en presencia de glicerol para semen de carneros. Por lo que se evaluó la interacción del glicerol (concentración) con la velocidad de enfriamiento sobre la recuperación espermática post-descongelación en diluyentes de leche (15 por ciento) encontrándose el rango de cuatro a seis por ciento de glicerol con una velocidad de enfriamiento de 10-100° C/min, como mejor respuesta (Fiser y Fairfull, 1986).

En un estudio en borregos, Fiser y Batra (1984) probaron el tiempo de equilibración para semen diluido, encontrando que con 4.5 por ciento de glicerol a 5° C por dos a seis horas hubo más espermatozoides recuperados que por 0 a 18 horas.

Así mismo, la adición de yema de huevo al diluyente de leche no necesariamente incrementa la supervivencia espermática post-descongelación (First *et al.*, 1961).

First *et al.* (1957) utilizando semen de borregos tratados con diferentes diluyentes (leche y citrato-yema) y con diferentes niveles de glicerol (0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 y 15 por ciento) y de yema (50, 37.5 y 30 por ciento), se encontró que la mayor recuperación de motilidad espermática se tuvo con leche más seis por ciento de glicerol y con yema en los diferentes niveles.

Fiser y Fairfull (1989) mencionan que la adición de glicerol gradualmente al semen diluido en borregos anterior al congelamiento mejora el porcentaje de motilidad post-descongelamiento.

A temperatura ambiental, el adicionar ácido cítrico (10 por ciento) a un diluyente de citrato-yema mejora la preservación de semen, evaluando en porcentaje de preñez por inseminación artificial (58 vs 31 por ciento) (Lafluf *et al.*, 1990).

Por otro lado, Shannon y Curson (1987) adicionaron iones de K, Mg o Ca al buffer de yema de huevo resultando una ampliación en la duración de la motilidad de semen incubado a 37° C; ya que estos iones son importantes durante el proceso enzimático que provee energía para el espermatozoide.

En un trabajo con borregos, se encontró al descongelar el semen procesado que la dilución de semen a congelar es significativo. Así una dilución de  $1000 \times 10^6$  espermatozoides/ml tuvo una mejor motilidad y porcentaje de espermatozoides vivos que la dilución  $2000 \times 10^6$  (Mathur, 1991).

En otro sentido, la diálisis del semen diluido antes de congelar mostró un incremento en la recuperación después del descongelamiento de espermatozoide motiles (Schmehl *et al.*, 1986).

Choudhry *et al.* (1995) encontró que las variaciones de fertilidad post-descongelamiento son independientes de la motilidad post-descongelamiento, donde se incluye la variación estacional.

## **Descongelamiento**

### **Temperaturas y tiempos de descongelamiento**

El descongelamiento de semen procesado es un procedimiento crítico por el daño que pueda sufrir el espermatozoide. No hay una técnica que pueda

medir separadamente el daño espermático debido al enfriamiento o descongelamiento. Sin embargo, se recomienda que si el congelamiento es rápido, el descongelamiento también debe ser rápido.

El semen de carnero o caprino debe ser descongelado a una temperatura no menor de 37° C. Puede hacerse a altas temperaturas y quizá se mejore la recuperación de espermatozoides viables pero hay peligro de exponer el semen a elevadas temperaturas en un límite de tiempo crítico y esto puede ser fatal a los espermatozoides (Evans y Maxwell, 1987).

Weitze y Petzoldt (1992) definen que el mayor efecto del choque frío es en reducir el número de espermatozoides viables, la liberación de enzimas, el movimiento de iones a través de la membrana y la pérdida de lípidos.

Así se tiene que en un trabajo realizado por Ala-ud-Din *et al.* (1985) al comparar temperaturas de descongelamiento a 35° C por 2.5 min y 0° C por 10 min en semen ovino procesado con varios diluyentes se reportó una mayor recuperación espermática a 35° C/ 2.5 min.

En otra investigación de Srivastava *et al.* (1989) se probaron diferentes temperaturas de descongelamiento a 40° C, 50° C y 75° C encontrándose 7.5, 20.8 y 6.6 por ciento de motilidad recuperada en semen ovino procesado con

yema de huevo, también se concluyó que a 50° C por 10 y 15 seg, dio mejor recuperación espermática a 15 seg.

Otro estudio que se llevó a cabo en Querétaro con semen ovino diluido en tris-yema se probaron diferentes temperaturas de descongelamiento (75° /8 seg, 35° /30 seg y 5° C/3 min) encontrando la mayor motilidad recuperada a 75° C/8 seg (33.4 por ciento) (López y Sosa, 1986).

En 1989, Mathur *et al.* llevaron a cabo el descongelamiento de semen ovino diluido en yema-lactosa-rafinosa -citrato-glicerol, (EYLRCG) a 45° y 50° C dando los porcentajes de espermatozoides motiles post-descongelamiento 55.0 vs 66.7 por ciento respectivamente.

Por otro lado, en un estudio realizado en toros con semen diluido con tris comparando diferentes temperaturas y tiempos de descongelación, se concluyó que la mayor respuesta post-descongelamiento se dio a 40° C por 20 seg (Chandler *et al.*, 1984).

En este mismo contexto pruebas realizadas en borregos por Fiser *et al.* (1986) indican que la integridad del acrosoma y la motilidad recuperada son mayores en una velocidad de congelamiento de 20° C/min y descongelados en agua a 60° u 80° C por ocho o cinco segundos respectivamente.



## Evaluación post-descongelamiento

### **Motilidad recuperada**

Las pruebas de calidad de semen después de descongelar son el principio de predicción de su posible fertilidad. Se han establecido varias pruebas prácticas para predecir dicha fertilidad como pueden ser: motilidad, viabilidad, cambios ultra estructurales y bioquímicos del espermatozoide. Sin embargo, la prueba de rutina sigue siendo la motilidad recuperada, la cual se recomienda sea no menos del 40 por ciento de espermatozoides motiles.

Una de las alteraciones más fuertes en el espermatozoide es el acrosoma, lo cual generalmente sucede durante el enfriamiento y no necesariamente pierde su motilidad. No debe de exceder de un 70 por ciento. Las pruebas disponibles son observación microscópica de espermatozoides teñidos o pruebas enzimáticas (Evans y Maxwell, 1987).

En estudios realizados por Fiser y Fairfull (1989) se ha comprobado que la supervivencia del espermatozoide post-descongelación puede estar influenciada por la manera en la cual el glicerol es adicionado antes de congelarse.

Hinkovska *et al.* (1989) encontraron que el cambio más importante después del congelamiento del semen procesado fue la translocación del

difosfatidil glicerol de las capas internas y externas de la membrana plasmática. Así mismo, es recomendado por Petrujkic *et al.* (1987) que debido a las propiedades específicas del semen de borrego que necesita un rápido congelamiento, el descongelamiento también debe ser rápido a temperatura de 40-42° C.

En un trabajo en bovinos donde se probó descongelar a  $38 \pm 2^{\circ}$  C por 8 o 25 seg en agua, se comprobó que la mayor motilidad recuperada se dio a 25 seg. Sin embargo, estos resultados dependen de muchos factores como tipo de diluyente, porcentaje de glicerol, enfriamiento, tiempo de equilibración, envasado, velocidad de congelamiento y descongelamiento (Gaillard y Kupferschmied, 1982).

## **MATERIALES Y METODOS**

### **Area de Estudio**

El presente estudio, se llevó a cabo en el Laboratorio de Reproducción Animal y Unidad Ovina de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, ubicada al sur de Saltillo, con una altitud de 1742 msnm, sobre las coordenadas 25 o 22' 44" de latitud norte y una longitud oeste de 100o 00' 00", con una temperatura media anual de 17.7° C y una precipitación media anual de 303.9 mm. El clima se caracteriza por ser muy seco, semicálido, con invierno fresco extremo.

### **Animales Utilizados**

Se utilizaron seis sementales ovinos adultos (2-3 años de edad) de la raza Rambouillet, los cuales estuvieron sujetos a las prácticas de manejo de la Unidad Ovina, en cuanto a la aplicación de vitaminas, desparasitantes y vacunas.

El manejo alimenticio consistió de pastoreo durante la mañana, y por la tarde recibían 500g/animal de un suplemento con 13 por ciento de proteína cruda; los ingredientes utilizados fueron: sorgo, alfalfa molida, harinolina, soya y minerales.

Los sementales se seleccionaron con base a su condición corporal, prueba de fertilidad, examen físico de sus órganos reproductores y manifestación de libido, con el fin de asegurar su respuesta durante el ensayo.

### **Muestreo**

El estudio comprendió los meses de septiembre a noviembre, época en la cual los borregos manifiestan su mayor actividad reproductiva. Los muestreos de semen se realizaron utilizando de dos a tres animales por semana, durante los tres meses de trabajo. Cada muestra de semen fue probada con cada uno de los diluyentes y de las temperaturas establecidas. Previo a la utilización de cada animal, se aseaba particularmente la región abdominal, con el fin de evitar que la muestra de semen se contaminara al ser colectada.

Así preparados, se procedió a eyacularlos utilizando el método de electroeyaculación descrito por Sorensen (1982 ). El semen obtenido se protegió de los cambios de temperatura y luminosidad, colocándolo en un baño

de temperatura controlada a 35° a 37° C hasta ser evaluado, evitando la exposición directa a la luz solar.

### **Evaluación de Semen**

Las pruebas de evaluación del semen previas a su procesamiento comprendieron: Volumen, motilidad, concentración y morfología. Las cuales se realizaron conforme a técnica descrita por Holy (1983) bajo las siguientes restricciones:

- Volumen: Se utilizaron muestras con volumen superior a 0.8 ml.
- Motilidad: Se seleccionó semen con 50 por ciento de movimiento lineal y progresivo como mínimo.
- Concentración: Se aceptaron densidades superiores a 800 millones de espermatozoides/ml.
- Morfología: Se incluyeron muestras con un máximo de 15 por ciento de anomalías primarias y 25 por ciento de secundarias.

Estas limitantes fue necesario fijarlas previamente, dado el número de diluyentes y temperaturas de descongelamiento que se probaron.

## Diluyentes

Los medios de preservación utilizados para esta investigación incluyen los siguientes:

- Solución buffer de sales minerales. \*
  - a) 80 por ciento en volumen de Solución buffer de sales minerales
  - b) 20 por ciento en volumen de yema de huevo sin restos de clara y membrana.
  - c) 1000 microgramos de sulfato de dihidro estreptomina/ml de diluyente.
  - d) 1000 unidades internacionales de penicilina /ml de diluyente
  - e) 10 por ciento de glicerol en volumen total de diluyente
  
- Combinación de leche y yema deshidratadas.\*
  - a) 50 g del preparado de leche y yema deshidratadas en 400 ml de agua bidestilada a 40° C
  - b) 50 ml de yema de huevo fresco en 100 ml de agua bidestilada a 50° C.  
Mezclar ambas soluciones
  - c) 10 por ciento de glicerol para volumen final
  - d) Antibióticos (Penicilina y dihidro estreptomina)
  
- Solución de citrato de sodio y yema de huevo.
  - a) 80 por ciento en volumen de solución del citrato de sodio al 2.9 por ciento

---

\* Productos comerciales registrados

- b) 20 por ciento en volumen de yema de huevo pura
  - c) 1000 microgramos de sulfato de dihidro estreptomycin /ml de diluyente
  - d) 1000 unidades internacionales de penicilina/ml de diluyente
  - e) 10 por ciento de glicerol en volumen final
- Leche ultrapasteurizada.
- a) Volumen requerido de leche desnatada y enfriada.
  - b) 1000 microgramos de sulfato de dihidroestreptomycin/ml de diluyente
  - c) 1000 unidades internacionales de penicilina/ml de diluyente
  - d) 10 por ciento de glicerol en volumen total de diluyente

Para todos los diluyentes, se fraccionaron en dos volúmenes iguales, llamándoseles fracción A y B respectivamente.

La fracción A, es la que primeramente se le adiciona al semen a una temperatura de 35° C. Mientras que la fracción B se agrega a 5° C, es la parte que contiene el glicerol, haciéndolo en dos partes con un intervalo de 15 min.

### **Procesamiento**

Preparados los diluyentes y evaluadas las muestras de semen para su procesamiento, se hicieron los cálculos necesarios para conocer la cantidad de cada uno de los medios o diluyentes que se requería.

Los cálculos fueron los siguientes:

$CV = C.V.M.$       donde       $CV =$  Células vivas (espermatozoides)

$C =$  Concentración

$V =$  Volumen de semen

$M =$  Por ciento de Motilidad

Para luego calcular

$$P = \frac{CV}{Cd}$$

$P =$  Número de pajillas

$Cd =$  Concentración de espermatozoides /dosis

y así determinar

$$Vt = P \times 0.5$$

$Vt =$  Volumen total de diluyente

0.5 Volumen pajilla

Del volumen total de diluyente se dividió en dos partes que fueron la fracción A y fracción B que contiene el volumen de glicerol.

La muestra de semen evaluada y calificada se dividió en cuatro partes iguales que fueron los cuatro diluyentes a probar; una vez separadas se procedió a adicionarles un volumen igual de la fracción A de cada uno de los diluyentes incluidos, para así mantener y asegurar la viabilidad de los espermatozoides, todo esto a una temperatura de 35° C.

Posterior a esto, se le sumó el volumen faltante de la misma fracción de acuerdo a los cálculos anteriores. Una vez cubierta esta etapa se procedió a bajar gradualmente la temperatura de 35° a 5° C, lo cual se cumplió en



aproximadamente una hora y media, para después adicionar la fracción B de cada diluyente, en dos partes iguales, con un intervalo de 15 min entre una y otra adición.

Para continuar con el tiempo de equilibración que es el lapso necesario para la estabilización de los espermatozoides en el medio nutritivo, el cual tuvo una duración de cuatro horas como mínimo.

El semen, diluyente pajillas y demás material necesario, en este paso se mantuvo a una temperatura de 5° C, lo cual se requiere para no alterar la viabilidad de los espermatozoides por cambios de temperatura.

El llenado y sellado de las pajillas se llevó a cabo automáticamente por medio de la máquina envasadora de semen MRS 1.

Es necesario mencionar que entre la utilización de un diluyente y otro, el material utilizado fue reemplazado por otro limpio, con el fin de evitar contaminación entre ellos. Una vez cubierta esta etapa se procedió con el siguiente punto.

El congelamiento consistió en colocar las pajillas en una canastilla dentro de un termo de cuello ancho a vapores de nitrógeno (-80 a -100° C) durante nueve minutos, ya que de esta manera los espermatozoides no sufren un daño tan marcado por el cambio brusco a baja temperatura.

El almacenamiento consistió en colocar las pajillas congeladas directamente en el nitrógeno líquido (-196° C) en donde permanecieron hasta ser utilizadas.

### Descongelamiento

El descongelamiento se realizó un día posterior a haber sido depositadas en el nitrógeno líquido, para así evaluar la recuperación espermática post-descongelación. En esta etapa se probaron las siguientes temperaturas de descongelamiento:

- 5 ° C por 15 min
- 35° C por 30 seg
- 75° C por 10 seg

Por lo tanto, fue necesario incluir cada diluyente en cada una de las temperaturas y tiempos a probar; tal y como se observa en el cuadro 3.1.

**Cuadro 3.1 Distribución de Temperaturas y tiempos de descongelamiento en diluyentes**

DILUYENTES	CO			LC			CITRATO DE SODIO			LECHE		
Temp. ° C	5	35	75	5	35	75	5	35	75	5	35	75
	15 m	10s	10 s	15m	10s	10 s	15 m	10 s	10 s	15 m	10s	10 s
(m) minutos, (s) segundos												

co= Solución buffer de sales minerales

lc= Combinación de leche y yema deshidratadas

De esta forma, se descongeló como mínimo una pajilla por cada diluyente y temperatura en cada muestreo.

### Evaluación Post-descongelamiento

El contenido de la pajilla, una vez descongelado a la temperatura indicada se colocaba en un porta objetos para observarse al microscopio y así calificar la recuperación espermática mediante el movimiento progresivo y rectilíneo del espermatozoide; evaluado en porcentaje de espermatozoides viables recuperados.

En cada muestra de semen se evaluaron como mínimo 12 pajillas en total (cuatro diluyentes con tres temperaturas de descongelamiento).

### **Diseño Estadístico**

Para este estudio se utilizó el diseño experimental completamente al azar con diferente número de repeticiones y arreglo factorial de tratamientos. (4 x 3). Para las pruebas de comparación de medias se empleó Tuckey al 95 por ciento. Los datos generales quedaron conformados en el siguiente cuadro (Cuadro 3.2).

**Cuadro 3.2 Conformación del Diseño Estadístico**

-Factores y Niveles	
A1: Solución buffer de sales minerales	B1: 5° C/15 min
A2: Comb.de leche y yema deshid.	B2: 35° C/30 seg
A3: Citrato + yema	B3: 75° C/10 seg
A4: Leche	

Cuadro 3.2. .... Continuación.

- Unidad experimental:	Pajilla
- Número de repeticiones por tratamiento:	mínimo 42
	máximo 48
- Total de observaciones:	544

Se analizó por el paquete estadístico Statgraphics, Ver 5.0 (1993).

## RESULTADOS Y DISCUSION

La variable respuesta de esta investigación en donde fueron evaluados cuatro diluyentes y tres temperaturas de descongelamiento, fue la pérdida de motilidad espermática post-descongelación.

El análisis de varianza mediante el diseño completamente al azar con arreglo factorial de 4 x 3 señala que existe una diferencia altamente significativa entre diluyentes ( $P < 0.01$ ), o sea que hay diferencia en la respuesta de motilidad recuperada entre los diluyentes a probar (Cuadro A.1 y Figura 4.1); lo cual indica que el comportamiento del semen ovino es diferente de acuerdo al medio en que es diluido, debiéndose esto principalmente a los constituyentes de cada diluyente analizado.

Para temperaturas se presenta una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ), esto indica que las temperaturas marcadas en este estudio dan una respuesta diferente a la motilidad post-congelación (Cuadro A.1 y Figura 4.2); es conocido el efecto que ejerce los cambios de temperatura en el semen, ocasionando cambios morfológicos y fisiológicos en el espermatozoide, y sobre todo por la alteración tan manifiesta que se observa en el proceso congelamiento-descongelamiento del semen procesado.

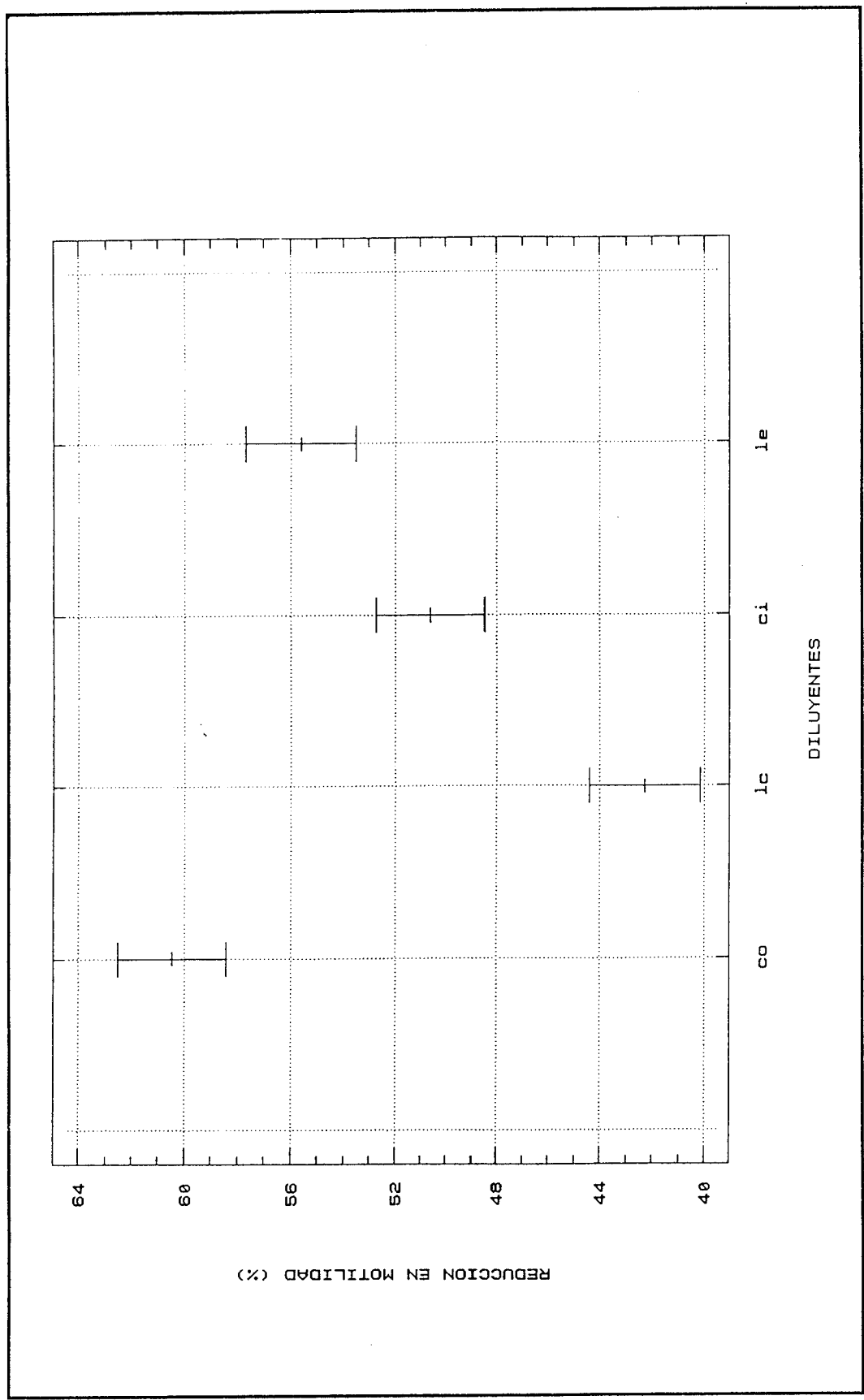


Figura 4.1 REDUCCION EN MOTILIDAD POR EFECTO DE DILUYENTES. MEDIAS Y RANGOS PARA PRUEBA DE TUCKEY AL 95% (co: Solución buffer de sales minerales, ic: Combinación de leche y yema deshidratadas, ci: Citrato le. Leche)

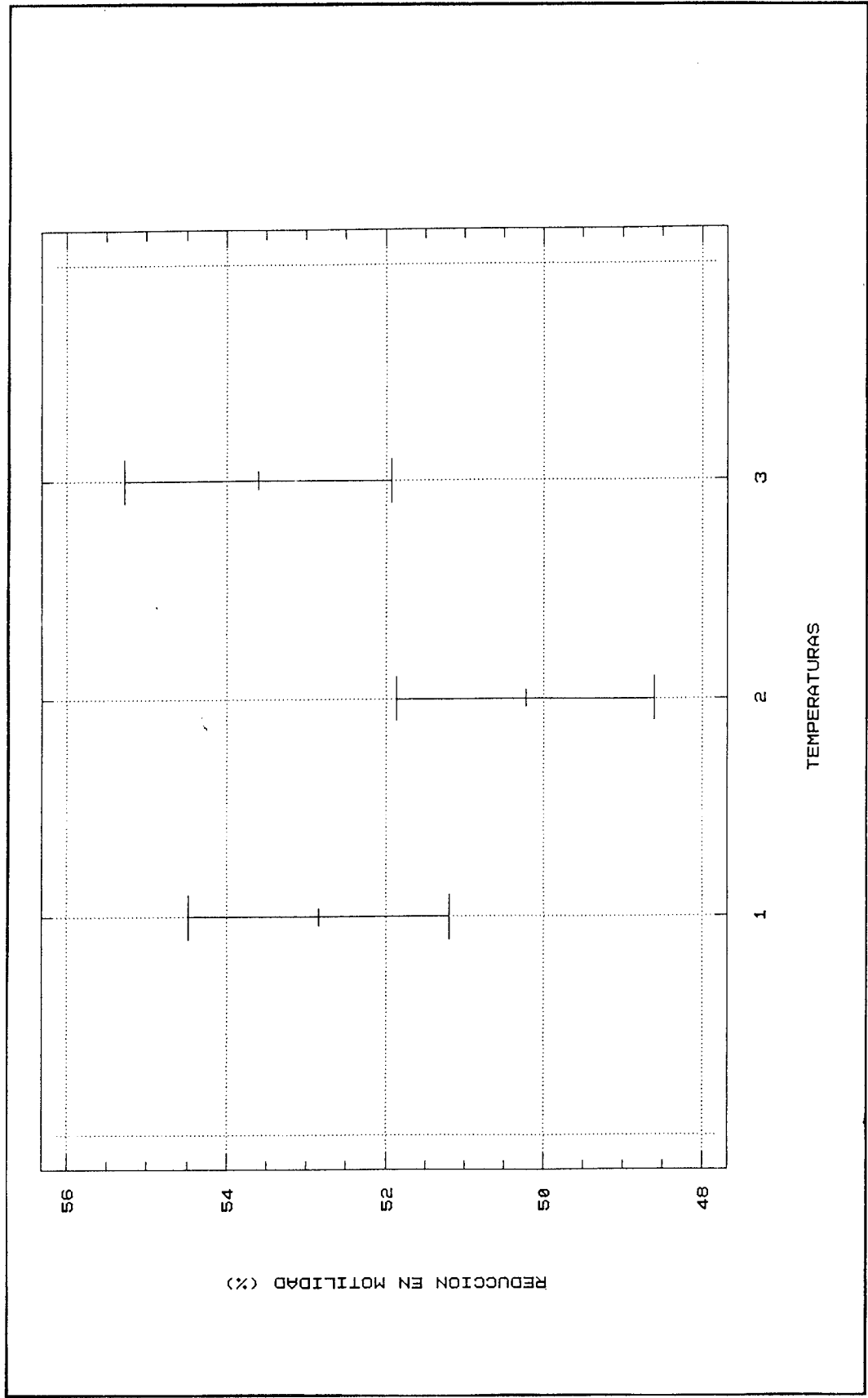


Figura 4.2 REDUCCION EN MOTILIDAD POR EFECTO DE TEMPERATURAS Y TIEMPOS DE DESCONGELAMIENTO. MEDIAS Y RANGOS PARA PRUEBA DE TUCKEY AL 95% (1:5°C /15 min; 2:35°C/30 seg; 3:75°C /10 seg).

Así mismo dentro de este mismo análisis (ANVA) se encontró un efecto no significativo (NS) en la interacción ( $P > 0.05$ ), lo cual indica que el comportamiento de los diluyentes no se ve afectado por las temperaturas utilizadas, (Cuadro A.1 y Figura 4.3).

Dada la respuesta altamente significativa para diluyentes y significativa para temperaturas, se realizó una prueba de comparación de medias para efectos principales mediante la prueba de Tuckey al 95 por ciento.

Se encontró que todos los diluyentes son estadísticamente diferentes ( $P < 0.05$ ) con una media de 42.26 por ciento, 50.59 por ciento, 55.59 por ciento y 60.45 por ciento en pérdida de motilidad para Combinación de leche y yema deshidratadas, Citrato, Leche y Solución buffer de sales minerales respectivamente (Cuadro A.2 y Figura 4.1).

La superioridad manifiesta en la respuesta post-descongelamiento para el diluyente Combinación de leche y yema deshidratadas cuyos componentes del mismo son leche en polvo y yema de huevo deshidratada, dos de los principales productos de la mayoría de los diluyentes, lo cual le confiere una protección extra durante los pasos de enfriamiento y congelamiento, ya que dichos componentes aportan fracciones lipoprotéicas y enzimas que por un lado protegen la membrana celular del espermatozoide y por otro catalizan los compuestos tóxicos producto del metabolismo espermático.



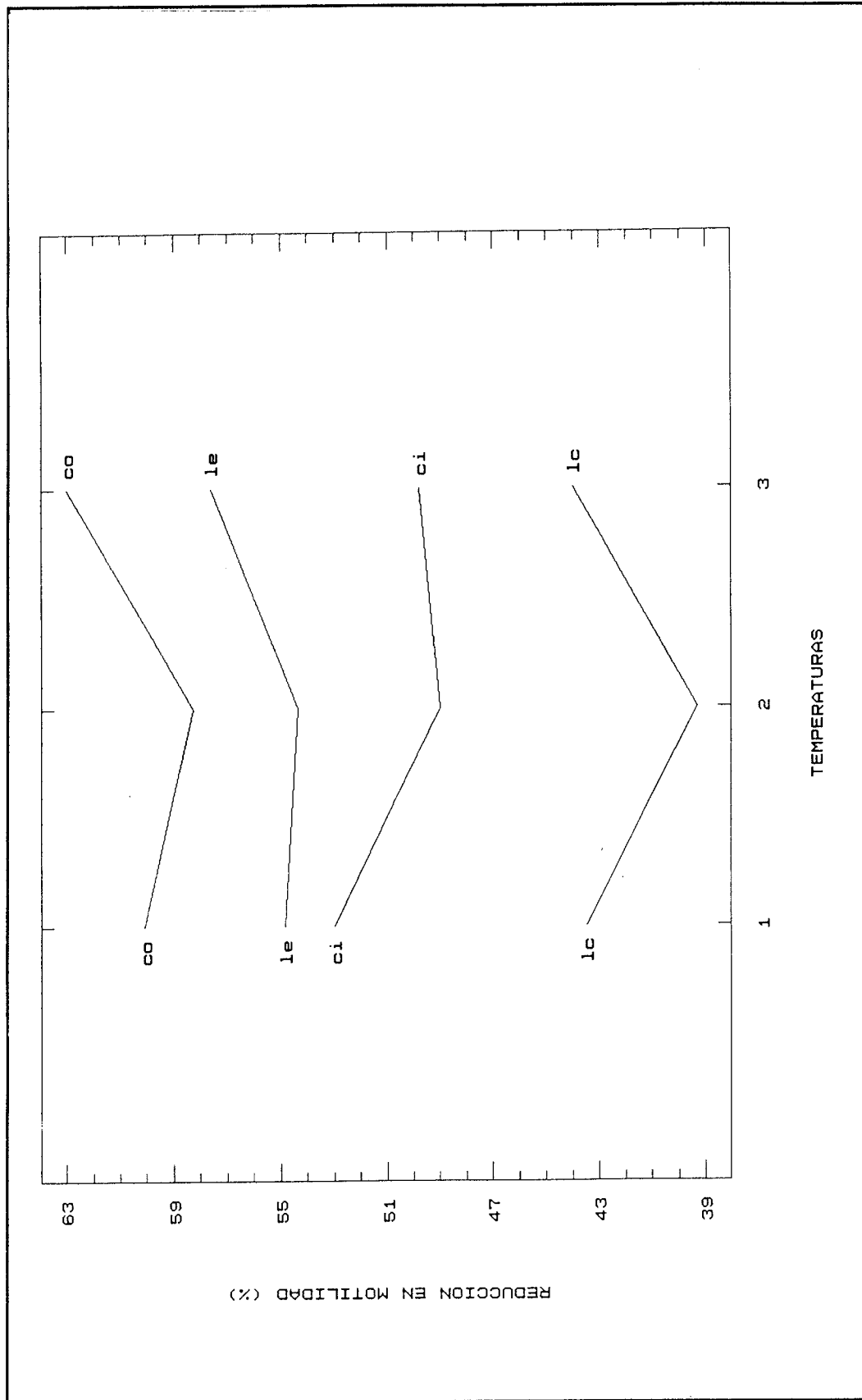


Figura 4.3 REDUCCION EN MOTILIDAD POR EFECTO DE LA INTERACCION DE DILUYENTES (co: Solución buffer de sales minerales, lc: Combinación de leche y yema deshidratadas, ci: Citrato, le: Leche) POR TEMPERATURAS (1: 5°C/15 min; 2: 35°C/30 seg; 3: 75°C/10 seg).

En estudios realizados por Ansari (1988), Salisbury y Van Demark (1978), y Ala-ud-Din *et al.* 1985) con toros y borregos donde probaron el diluyente Combinación de leche y yema deshidratadas con otros diluyentes, en todos los casos resultó superior dicho diluyente para motilidad recuperada post-descongelamiento.

Con respecto al resto de los diluyentes, se puede decir que el diluyente citrato-yema y el de leche tienen una respuesta de motilidad recuperada aceptable, no siendo así para el diluyente Solución buffer de sales minerales el cual es utilizado mayormente en semen de toros, y en lo que concierne a este trabajo no presentó una respuesta favorable para borregos, por lo que se recomienda seguir investigando al respecto.

Existe diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre las temperaturas  $35^{\circ}\text{C}/30$  seg y  $75^{\circ}\text{C}/10$  seg en lo que respecta a pérdida de motilidad post-descongelación 50.23 por ciento vs 53.60 por ciento respectivamente, no siendo significativa para  $5^{\circ}\text{C}/15$  min (52.84 por ciento) en relación a las otras dos temperaturas; y esto tal vez se debe a que su efecto se corrige por el diferente tiempo de descongelación, tal como se observa en el Cuadro A.3 y Figura 4.2.

El descongelamiento es uno de los pasos más críticos en el procesamiento de semen ovino, ya que el espermatozoide es sumamente sensible a los cambios de temperatura, aun con semen fresco.

El descongelar a bajas temperaturas involucra mayor tiempo de descongelado y si el proceso de congelamiento fue rápido puede verse afectada la motilidad recuperada post-descongelamiento, tal y como lo establecen Evans y Maxwell (1990) y Peterujkic *et al.* (1987).

Por otro lado, altas temperaturas al descongelar ocasionan que se acelere el metabolismo del espermatozoide y hace que se acumulen sustancias tóxicas que pueden dañar al espermatozoide así como el riesgo de alterar su morfología.

Numerosas investigaciones han establecido la temperatura óptima de descongelamiento para semen ovino procesado de 35° a 37° C/30 seg.

## CONCLUSIONES

De acuerdo al análisis de los resultados obtenidos en esta investigación, se puede concluir lo siguiente:

- Sobre el efecto de pérdida de motilidad espermática post-descongelación el diluyente Combinación de leche y yema deshidratadas resultó ser el más apropiado para su empleo en semen ovino.
- Los diluyentes citrato-yema y leche pueden ser empleados en el procesamiento de semen ovino dada la respuesta observada en este estudio.
- Respecto a la respuesta del diluyente Solución buffer de sales minerales en este trabajo, no se recomienda su uso en el procesamiento de semen ovino.
- El descongelamiento de semen ovino procesado a temperaturas de 35° C/30 seg es quien ofrece la mejor respuesta de motilidad recuperada.

- Las temperaturas de 5° C y 75° C pueden ser utilizadas siempre y cuando se manejen los tiempos marcados para el descongelamiento a 15 min y 10 seg respectivamente.

## RESUMEN

La criopreservación es una técnica que permite mantener “vivo” material biológico en medios artificiales, como lo es en este estudio para el semen ovino, donde la información disponible aun no está bien establecida. Parte importante de este proceso de conservación son los diluyentes y las temperaturas a las cuales se descongela el semen preservado.

Se utilizaron seis borregos Rambouillet durante la época reproductiva a los cuales se les extrajo semen que fue evaluado y calificado para posteriormente fraccionarlo y ser probado en los siguientes tratamientos: Diluyentes (Combinación de leche y yema deshidratadas, Citrato-yema, Leche y Solución buffer de sales minerales) y temperaturas de descongelamiento (5° C/15 min, 35° C/30 seg, y 75° C/10 seg) donde fue evaluado su efecto mediante la variable respuesta pérdida de motilidad post-descongelamiento, para lo cual se evaluaron 544 pajillas distribuidas en cada uno de los tratamientos.

Los datos obtenidos se analizaron en un diseño completamente al azar con arreglo factorial de 4 x 3 y pruebas de comparación de medias por Tuckey (Statgraphics, Ver. 5.0). Encontrándose diferencias altamente significativas ( $P < 0.01$ ) para diluyentes y significativas ( $P < 0.05$ ) para temperaturas, lo cual indica

que para ambas variables hay una respuesta diferente de motilidad recuperada post-descongelamiento. Sin embargo, la interacción entre estas variables es no significativa (NS).

Con el fin de establecer cual de los diluyentes y temperaturas de descongelamiento probadas dio los mejores resultados para semen ovino se hizo una comparación de medias (Tuckey), observándose que el diluyente Combinación de leche y yema deshidratadas (42.26 por ciento) y la temperatura 35° c/30 seg (50.23 por ciento) dan la mejor respuesta para pérdida de motilidad post-descongelación.

## LITERATURA CITADA

- Ahmad, K. 1987. Antibiotics for bull semen: Effects of new antibiotics on posthaw survival and fertility of frozen bull spermatozoa. Cornell University Dissertation abstract International B. Sciences and Engineering. 47:7, 2689. U.S.A.
- Ahmad, K. and R.H. Foote. 1986. Posthaw survival and fertility of frozen bull spermatozoa treated with antibiotics and detergent. J. Dairy Sci. 69:534-541. U.S.A.
- Ala-ud-Din, Nazir Ahmad and Osama Ibrahimazawi. 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. Pakistán.
- Alba, J., De 1985. Reproducción Animal. Ed. La Prensa Médica Mexicana, Costa Rica 538 p. Costa Rica.
- Almquist, J.O. and E.W. Wickershaw. 1962. Diluents for bovine semen. XII Fertility and motility of spermatozoa in skim milk with various levels of glycerol and methods of glycerotization. J. Dairy Sci. 45(6): 782-787 p. U.S.A.
- Ansari, M.R. 1988. Freezability of bovine spermatozoa in Combinación de leche y yema deshidratadas-478 employing "tupol" technique. Indian Journal of Animal Production. 9(1): 13-15. India.
- Bearden, J.H. y J.W. Funquay. 1982. Reproducción Animal Aplicada. Ed. El Manual Moderno, México.
- Chakrabarti, D. and Atanu Baran Goha. 1993. Influence of sperm density and motility on seminal fructose content of Black Bengal Goat (*Capra hircus*). Indian Journal of Animal Science. 63 (7): 733-724 p. India.
- Chandler, J.E., R.W. Adkinson and R.L. Nebel. 1984. Thawing optimums for bovine spermatozoa processed by three methods and packaged in Solución buffer de sales minerales and french straws. J. Dairy Sci. 67:398-404. U.S.A.



Chemineau, P. 1993. Environment and animal reproduction. *World Animal Review*. No. 77: 2-14 p. U.S.A.

Choudhry, T.M. T.H. Berger and M. Dally. 1995. In vitro fertility evaluation of cryopreserved ram semen and its correlation with relative in vivo fertility. *Theriogenology* 43:1195-1200. U.S.A.

Colas, G. 1979. Fertility in the ewe after artificial insemination with fresh and frozen semen at the induced oestrus, and influence of the photoperiodo on the semen quality of the ram. *Livertsock production science* 6:153-166 p. U.S.A.

Courtens, J.L., H. Ekwall, M. Paquignon and L. Plöen. 1989. Preliminary study of water and some element contents in boar spermatozoa, before, during and after freezing. *J. Reprod. Fert* 87:613-626. U.S.A.

Cupps, P.T., B. Mc Gowan, D.F. Rahlmaun, A.R., Reddon and W.C., Weis. 1959. Seasonal changes in the semen of rams. University of California Davis. U.S.A.

Delgadillo, J.A., B. Leboeuf and P. Chemineau. 1992. Abolition of seasonal variations in semen quality and maintenance of sperm fertilizing ability by photoperiodic cycle in goat bucks. *Small Ruminant Research*. 9 :47-59 p. U.S.A.

Dhami, A.J., G. Mohan and K.L. Shani. 1993. Effect of extenders and additives on preservability of cattle and buffalo semen at 5o C and -196 oC. *Indian Journal of Animal Science*. 63(5):492-498. India.

Dunner, S. 1993. Freezing buck semen diluted in amine -organic buffers. *Animal Production* 56:387-391 p. U.S.A.

El Gaafary, M.N. 1990. A diluent for freezing of ram semen. *Indian Journal of Animal Sciences* 60(7):769-772 p. India.

Evans, G. and WMC Maxwell. 1987. *Salomon's Artificial Insemination of Sheep and goats*. Butterworths Australia. W.M.C.

---

\_\_\_\_\_ . 1990. *Inseminación Artificial de ovejas cabras*. Ed. Acriba, España. 192 p. España.

First, N.L, H.A. Henneman and J.A. Williams. 1957. The Influence of glycerol and various diluents on low temperature survival of ram spermatozoa. *J. Animal Science*. (16) 1-4. U.S.A.

- First, N.L., H.A., Henneman, W.T., Magee, and J.A., Williams. 1961. The frozen storage of ram semen. *J. Reprod. Fertil.* 20:74-78 p. U.S.A.
- Fiser, P.S., L. Ainsworth, and R.W. Fairfull. 1982. Cryosurvival of ram spermatozoa in hypertonic and isotonic diluents. *Can J. Anim. Sci.* 62: 425-428. Canadá.
- Fiser, P.S. and T.R. Batra. 1984. Effect of equilibration time at 5o C and photoperiod on survival of ram spermatozoa frozen in straws. *Can. J. Anim. Sci.* 64: 777-780. Canadá.
- Fiser, P.S., R.W. Fairfull and G.J. Marcus. 1986. The effect of thawing velocity on survival and acrosomal integrity of ram spermatozoa frozen at optimal and suboptimal rates in straws. *Cryobiology* 23(2): 141-149. U.S.A.
- Fiser, P.S., and R.W. Fairfull. 1986. Combined effects of glycerol concentration, cooling velocity, and osmolality of skin milk diluents on cryopreservation of ram spermatozoa. *Teriogenology* 25(3) 473-484. U.S.A.
- 
- \_\_\_\_\_ 1989. The effect of glycerol related osmotic changes on post-thaw motility and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiology.* 26(1): 64-67.U.S.A.
- Gaillard, C. and H. Kupferschmied. 1982. Thawing time and non return rate of bovine semen frozen in fine french straws. *Theriogenology.* Vol. 18 No. 4. U.S.A.
- Girao, R.N., and A.M., Filho. 1985. *Pesqui Agropecubras* 20(12): 1395-1408 p. Brasil.
- Hafs, H.C. 1961. Fertility of bull sperm with added catalase. *J. Dairy Sci.* 44:1529. U.S.A.
- Hill, J.R. Jr., W.C. Godley and V. Hurst. 1953. Effect of glycerol equilibration time, glycerol level, and rate of temperature descent on the freezing of ram spermatozoa. *J. Animal Science* 15:614-621 p. U.S.A.
- Hinkovska-Galcheva, V., D. Petkova and K. Koumanov. 1989. Changes in the phospholipid composition and phospholipid asymmetry of ram sperm plasma membranes after cryopreservation. *Cryobiology* 26(1):70-75. U.S.A.
- Holt, W.V. and R.D. North. 1991. Cryopreservation, actin localization and thermotropic phase transitions in ram spermatozoa. *Journal of Reproduction and fertility* 91:451-461. U.S.A.

- Holy, L. 1983. Bases biológicas de la Reproducción Bovina. Ed. Diana, México. 463 p. México.
- Instruments de Medicine Veterinaire. (I.M.V.) Society. 1980. The french paillet technique, France.
- Kumar, S., K.L. Sahni and G. Mohan. 1993. Effect of different concentrations of sugars on storageability of buffalo semen in tris diluent. Indian Journal of Animal Sciences 63 (10):1069-1071. India.
- Kumar, S., K.L. Shani, M. Greesh and B.R. Benjamin. 1992. Effect of various levels of glycerol on keeping quality of buffalo semen in dilutors without yolk at refrigeration temperature. Indian Journal of Animal Science 62(4):337-340. India.
- Lafluf, O., M. Chiossio, A. Cresci and H. Rodríguez. 1990. Veterinaria-Montevideo. 26:110-4-9. Uruguay.
- Langford, F.A., G.J. Marcus, A.J. Hackett, L. Ainsworth, M.S. Wolynetz and H.F. Peters. 1979. A comparison of fresh and frozen semen in the insemination of confined sheep. Can. J. Animal Sci. 59:685-694 p. Canadá.
- 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. México.
- Mathur, A.K. 1991. Effect of extension rate on the cryo survival of ram spermatozoa. International Journal of Animal Science 6(2):82-83. U.S.A.
- Mathur, A.K., R.S. Srivastava, A. Joshi and D.B. Kalra. 1989. Pellet freezing of ram semen. Indian Journal of Animal Science. 59(12) :1529-1531. India.
- Molina, F.C., G. Evans. and M.W.C. Maxwell. 1994. Incorporation of penetrating cryoprotectants in diluents for pellet-freezing ram spermatozoa. Theriogenology 42:5 849-858. U.S.A.
- Nauck, V.A., 1988. Structural and functional features of farm animals spermatozoa at cryopreservation. 11th. International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, Dublin Irlanda Vol. 3. Irlanda
- 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. Glas. 41(11-12):938-940. Russia

- Sahni, K.L. and G. Mohan. 1990. Yolk as a cryoprotectant in deep-freezing of bovine semen. *Indian Journal of Animal Sciences* 60 (7) 828-829. India.
- Salisbury, G.W. and L.N. Van Demark 1964. *Fisiología de la Reproducción e Inseminación Artificial de los bovinos*. Ed. Acribia, España. 463-503 p. España.
- \_\_\_\_\_. 1978. *Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle*. Ed. W.H. Freeman and Co. U.S.A
- Schmehl, M.K., S.P. Anderson, I.A. Vázquez, and E.F., Graham. 1986. *Cryobiology* 23 (5):406-414 p. U.S.A.
- Shannon, P. and B., Curson. 1987. The effect of ions and caffeine on the maintenance of motility of bovine spermatozoa diluted in egg yolk buffers. *Animal Reproduction Science*, 15:161-168 p. U.S.A.
- Snelton, M., J.T. Morrow and O.D. Butler. 1996. *Reproductive Efficiency of Fine-wool sheep*. Texas A. & M. University. U.S.A.
- Smith, R.L., W.E. Berndtson, M.B. Unal and B.W. Pickett. 1979. Influence of percent egg yolk during cooling and freezing and survival of bovine spermatozoa. *J. Dairy Sci.* 62:1297-1303. U.S.A.
- Sorensen, A.M. Jr. 1982. *Reproducción Animal. Principios y prácticas* Mc Graw-Hill México. México.
- Sosa, G.S.. 1976. Prueba de diez diluyentes para la conservación de semen de verraco. Tesis Licenciatura U.A.N.L. Monterrey, N.L., México.
- Srivastava, R.S., A.K. Mathur, D.B. Kalra and P.S. Rawat. 1989. Cryopreservation of ram semen in straws . *Indian Journal of Animal Sciences* 59(8) 970-972 p. India.
- Statgraphics, Ver. 5.0 (1993) Paquete Estadístico.
- Steinbach, J. and R.H. Foote. 1967. Osmotic pressure and pH effects on survival of frozen bovine spermatozoa. *J. Dairy Science* Vol. 50 No. 2. U.S.A.
- Stoyanov, T. 1987. Effect of antibiotics on the microflora of bull semen and its fertility. *Veterinarnomeditsinski-nauki* 24:3,57,66. Bulgaria.

- Tibary, A. - 1990. Factors affecting semen preservation and estrus synchronization in moroccan sheep. Actes de L'Institute Agronomique et Vetérinaire. Hassan II 10(1) 47 Francia.
- Trejo, G.A., P.E. González, y P.C. Vázquez. 1990. Seasonal Effects on Fertility in Rams of Five Breeds in the High Plateau in Mexico. 1 líbido. In Memoria, III Congreso Nacional de Producción Ovina. Universidad Autónoma de Tlaxcala. 198-202 p. México.
- Valencia, M.J., H.C. Galna., C.A. Saltiel, J.A., Becerril C.G., Bustamante, Y.A., Calderón B.A., Duchateou., B.S. Fernández, B.A., Olguin, R.R., Paramo O.L. y Zasco, 1986. Reproducción de los animales domésticos. Ed.Limusa, México 177-189 p. México.
- Weitze, K.F. and R. Petzoldt. 1992. Preservation of semen. Animal Reproduction Science 28: 229-235 p. U.S.A.
- Yarney, T.A., L.N. Sanford and W.M., Palmer. 1990. Pubertal development of ram lambs: Body weight and testicular size, measurements as indices of postpubertal reproductive function. Canadian Journal of Animal Science. 70(1) 139-147 p. Canadá.
- Zheltobryukh, N.A., V.K. Ivakhnenke and M.M. Aibazov. 1990. Increasing the effectiveness of using frozen semen. Outsevodstvo. No. 1 17-18 p. Russia.

# APENDICE

**Cuadro A.1. Análisis de varianza para la diferencia de motilidad.**

Fuentes de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrados Medios	Fcalc.	P. Error
Efectos principales					
A: Diluyentes	24614.008	3	8204.6694	45.875**	.0000
B: Temperatura	1148.234	2	574.1169	3.210*	.0411
Interacción					
AB	648.26856	6	108.04476	.604 ns	.7271
Error	95146.872	532	178.84750		
TOTAL	121557.38	543			

\*\* = Altamente significativa (P < .01)

\* = Significativa (P < .05)

ns = No significativa

C.V.= 25.61%

C.V= Coeficiente de variación

Cuadro A.2. Comparación de medias de diluyentes

Método: Tuckey 95%		n	Media %	Grupos homogéneos
Nivel				
lc		132	42.262795	a
ci		132	50.595599	b
le		138	55.599945	c
co		142	60.451389	d

Contraste	Diferencia	+/- límite
co -lc	18.1886	4.16771 *
co -ci	9.85579	4.16883 *
co -le	4.85144	4.12046 *
lc - ci	-8.33280	4.24412 *
lc - le	-13.3372	4.19662 *
ci - le	-5.00435	4.19773 *

\* Diferencia significativa

Letras diferentes: Existe diferencia significativa (P&lt;.05)

lc: Combinación de leche y yema deshidratada

co: Solución buffer de sales minerales

le: Leche

ci: Citrado de sodio + yema



Cuadro A.3. Comparación de medias de temperaturas de descongelamiento.

Método: Tuckey 95%		n	Media%	Grupos homogéneos
Nivel				
35		185	50.232443	a
5		183	52.841917	ab
75		176	53.607937	b

Contraste	Diferencia	+/- límite
5 - 35	2.60947	3.27858
5 - 75	-0.76602	3.32061
35 - 75	-3.37549	3.31101 *

\* Diferencia significativa

Letras diferentes: Existe diferencia significativa ( $P < .05$ )

Letras iguales: No hay diferencia significativa (ns)