

TECNICA SIMPLIFICADA DE CONGELACION DE SEMEN DE TORO EN PAJILLAS

Dr. Raymond JONDET*

I. CONSIDERACIONES GENERALES.

En los comienzos de la inseminación bovina, y en la época de la conservación a + 5°C, el semen diluido era transportado, por los técnicos, en tubos de vidrio de una capacidad de 10 a 15 ml. de los cuales se sacaba, directamente, con la ayuda de un cateter abastecido por una jeringa, la cantidad requerida para una inseminación. La necesidad de presentar el semen en dosis individuales se hizo sentir rápidamente. Así aparecieron sucesivamente las pajillas de plástico (SORENSEN, 1940; CASSOU, 1950), la ampolla de vidrio, y el pellet. El "sistema" de las pajillas ha encontrado su pleno empleo a medida que la congelación de semen se ha generalizado; él remplaza hoy en día el uso de las ampollas y de los pellets.

Concebida al inicio para obtener 1,2 ml de semen diluido, la pajilla, a través de los años, disminuyó el volumen, pasando así sucesivamente a 0.50 ml y 0.25 ml (CASSOU, 1968). La longitud no ha variado (133 mm) pero el diámetro no mide más de 2 mm, y tiene por objeto aumentar, de una manera considerable, el número de dosis que es posible almacenar en un recipiente dado, apareciendo esto como una ventaja importante para la conservación en nitrógeno líquido, cuyo precio es muy caro. La llenada y obturación son hoy en día realizadas automáticamente y simultáneamente por una misma máquina (soldadura ultrasónica) y esta máquina asegura una cadencia horaria de 8.000 dosis.

El primer método de congelación de esperma bovino fue descrito por POLGE y ROWSON (1952). Esta técnica básica, "madre" de todas las siguientes, utilizaba el hielo carbónico (-790°C) como fuente de frío. El semen diluido era enfriado de 30°C a 5°C en 4 a 6 horas. El volumen era luego

* Centre d'Insémination Artificielle (U.R.C.E.O.) - RENNES (FRANCIA).

duplicado por la adición, en cuatro a cinco veces, a intervalos de 15 minutos, de un segundo diluyente que contiene 20 p. 100 glicerol. Después de un tiempo de estabilización de 12 a 20 horas a 5°C, el semen era repartido en ampollas de vidrio de 1 ml, sumergidas en un vaso de Dewar con alcohol etílico a 5°C. La temperatura del baño de alcohol era entonces disminuida, al agregar progresivamente gas carbónico en polvo, a razón de 1°C por minuto desde 0°C a -15°C y de 3°C a 4°C por minuto de -15°C. Así, bajo la dirección de POLGE es que nosotros pudimos, en 1952, en Brasil, proceder a nuestros primeros ensayos de congelación de esperma.

Numerosas modificaciones debieron ser propuestas en lo que concierne a la composición del diluyente, el tiempo de estabilización, el ritmo y el modo de refrigerar el semen. Nuestros propios esfuerzos se unieron, entre otros, a la búsqueda de una automatización de la técnica.

Para simplificar entonces el trabajo, habría también que orientarse hacia la utilización de un solo y único refrigerante. Al Congreso Internacional de la Reproducción Animal de Trento (Italia), nosotros presentamos un proceso de congelación con los vapores de nitrógeno líquido, proceso que modificamos por primera vez en 1968 para arribar al que nosotros empleamos hoy en día. La tabla 1 muestra como las mejoras sucesivas de la técnica pudieron en nuestros laboratorios influir favorablemente sobre los resultados.

II. TECNICA DE LA CONGELACION DE SEMEN EN PAJILLAS.

La búsqueda de un buen método de congelación, es decir de un método que asegure un reanimación máxima de espermatozoides, tanto en cantidad como en calidad, debe tener en cuenta un cierto número de factores que condicionan la velocidad de enfriamiento: el volumen de la dosis, el volumen del recipiente utilizado, el número de pajillas en el interior del recipiente, la distancia entre las dosis colocadas en los vapores y el nivel del nitrógeno líquido mismo, etc.

Nosotros utilizamos un recipiente de volumen relativamente ligero (60 litros), cuyo diámetro de la boca no mide sino 34,5 cm. y la altura total un poco menos de 1 m. Es ligero, poco voluminoso, móvil y de un precio relativamente moderado (fig. 1). En el fondo de este recipiente está dispuesto un zocalo en alambre de acero en forma de prisma con una altura de 20 cm. El nitrógeno líquido es vertido en el recipiente hasta que alcance el nivel una altura de 21 cm. Así los bordes superiores del zócalo se sitúan a 1 cm. por debajo del nivel.

Numerosos diluyentes pueden ser utilizados para la preparación de semen bovino. Despues de haber ensayado muchos de ellos, nosotros seguimos fieles al antiguo medio clítrato de sodio-yema de huevo (SALISBURY, 1941), con la ligera modificación de adición de fructosa (HAFS y ELLIOTT, 1955) y, lógicamente, de glicerol. Partiendo de esa composición (lecitinas, lipoproteínas), la yema de huevo, es sabido, está comprobado como particularmente propicia para la vida de los espermatozoides (PHILIPPS y LARDY, 1940). Nuestro diluyente comprende dos partes (I y II), la segunda que contiene solamente fructosa y glicerol*.

El tubo de semen recolectado es colocado en un baño de María a 32°C durante algunos minutos que requiere su examen. El semen es rápidamente prediluido en 30 ml del diluyente I (cuya temperatura estaba previamente a 32°C). El volumen alcanzará entonces la mitad del volumen final por la adición de una nueva cantidad del diluyente I (mantenido a 5°C). Al final de un período de estabilización de 2 horas, una cantidad igual del diluyente II (mantenido a 5°C) es agregada, en 5 etapas, a intervalos de 10 minutos. La adición del diluyente II (y por lo

* Composición del diluyente:

- primera parte (diluyente I): clítrato de sodio (2HO): 14,7 g.; yema de huevo: 250 ml; penicilina: 1 millón de unidades; estreptomicina: 2 g.; agua bidestilada: 750 ml.
- segunda parte (diluyente II): clítrato de sodio (2HO): 25,3 g.; yema de huevo: 250 ml; fructosa: 20 g.; glicerol: 140 ml; penicilina: 1 millón de unidades; estreptomicina: 2 g.; agua bidestilada: 750 ml.

tanto el glicerol que le contiene) puede además hacerse de una sola vez, y también inmediatamente antes de la congelación (JONDET, 1972). En este último caso, la proporción de espermatozoides reanimados a la descongelación puede ser un poco menos elevada, sin que los resultados de fecundación sean de todas maneras afectados, pero, fuera de condiciones estrictamente experimentales, este modo de operar no deja suficiente tiempo para llegar un número importante de pajillas.

De una manera general, la tasa de dilución está calculada de tal suerte que cada dosis contiene, antes de la congelación, un total de 20 millones de espermatozoides. Las pajillas, llenadas y selladas por la máquina automática, son repartidas, por lotes de 180 (dosis de 0,50 ml) o 250 (dosis de 0,25 ml) en unas pequeñas canastillas en material plástico (fig. 2).

Cuando faltan pajillas para llenar las canastillas, entonces son completadas con placas en material plástico de un volumen correspondiente. Dejamos entonces que el semen "se equilibre" de nuevo, a 5°C durante 5 a 6 horas, tiempo que transcurre entre el momento en que los espermatozoides entran en contacto con el glicerol y el curso en que ellos son congelados. Este tiempo "de estabilización" es clásicamente considerado como un período necesario de los espermatozoides para adaptarse al nuevo medio que les es impuesto en presencia del glicerol. De hecho, nosotros pensamos, con PICKETT y col. (1976) que la permanencia a 5°C de los espermatozoides en su diluyente, aún en la ausencia del glicerol, puede ser considerada como tiempo "de estabilización". Para la congelación, 12 canastillas, sean 2.160 pajillas de 0,50 ml o 3.000 pajillas de 0,25 ml, son puestas en una cesta metálica con el fondo miltiperforado, de 33 cm de diámetro (fig. 3). La cesta es rápidamente introducida en el recipiente, de tal forma que repose sobre el zócalo (fig. 3), y la tapa es puesta sobre el recipiente. El fondo de la cesta entra entonces en contacto con el nitrógeno líquido en el cual penetra alrededor de 1 cm. En seguida hay una violenta liberación de vapores los cuales envuelven instantáneamente todas las pajillas asegurando así su

congelación. Al cabo de 15 minutos, la cesta es sacada rápidamente del recipiente, y las pajillas son sumergidas en el nitrógeno líquido de un recipiente, más grande, destinado al almacenamiento del semen, en espera de su utilización. El valor del semen es controlado por el examen de 2 dosis por eyaculado, escogidas al azar, descongeladas en agua a 35°C, durante al menos 50 segundos para las pajillas de 0,50 ml y 21 segundos para las de 0,25 ml. Los criterios de apreciación son el porcentaje de espermatozoides vivos inmediatamente después de la descongelación y, sobretodo, después de la prueba de termoresistencia.

RESULTADOS.

a. Velocidad de enfriamiento.

El descenso de la temperatura a partir de 5°C es rápido y la curva es perfectamente regular. La temperatura arriba a -90,6°C en el décimo minuto, -134,4°C al vigésimo y a -157,0°C al trigésimo (promedio de 15 curvas, tabla 2). El ritmo de enfriamiento es igual a 9,0°C/minuto durante la primera etapa de 10 minutos, 4,3°C/minuto durante la segunda etapa y 2,2°C/minuto durante la tercera etapa. Al transcurso de los primeros minutos, se puede observar diferencias en el gradiente de temperatura debido a la colocación de las dosis en las canastillas. Entonces, el enfriamiento es a veces más rápido para las pajillas situadas en la periferia de la cesta donde la temperatura desciende muchas veces por debajo de -60°C en 3 minutos. Este enfriamiento es un poco menos rápido para las pajillas situadas del otro lado de la canastilla sobre el centro de la cesta y para aquellas que se encuentran en el centro de la canastilla. Sin embargo, después del décimo minuto, la temperatura es prácticamente la misma para todas las pajillas, cualquiera que sea su posición (91,4°C; 89,4°C; 91,2°C; respectivamente) y al vigésimo minuto, la temperatura ha sobrepasado los -100°C (-134°C).

b. Reanimación de los espermatozoides congelados.

Los resultados de reanimación de los espermatozoides después de la congelación son satisfactorios y constantes. Las diferencias de temperatura observadas en los

primeros minutos, en función de la localización de las pajillas en las canastillas, no tienen ningún efecto sobre la proporción de espermatozoides vivos encontrados en la descongelación. Por cada una de tres localizaciones consideradas los promedios son respectivamente iguales a 66,23% (periferia de la cesta), 66,73% (centro del canastilla), 66,16% (centro de la cesta). Por otra parte, la uniformidad de la congelación es la misma sobre toda la longitud de la pajilla: un control realizado seccionando las pajillas en 4 fracciones no registro diferencias entre el porcentaje de espermatozoides reanimados en ninguna de las partes.

Calculado a partir de un gran número de eyaculados (12.694), el porcentaje de espermatozoides vivos después de la descongelación, y dotados de una buena motilidad de progresión, se llegó, en promedio, a 64,91%, o sea prácticamente 65% (tabla 3). La pérdida en espermatozoides, siempre relativamente baja, permanece inferior al 5%: para 193 eyaculados recolectados sobre 102 toros, ella no llega sino a 3,71%, y el porcentaje de espermatozoides reanimados se lleva al 96,29% (tabla 1).

Para facilitar la interpretación de los datos recolectados, repartimos los 12.694 eyaculados anteriormente citados (tabla 3) en 3 grandes grupos en función de su valor a la descongelación: grupo A (65 a 70% de espermatozoides vivos), grupo B (60 a 65%), grupo C (menos de 60%). Se constata que los 6.629 eyaculados del grupo A (más de la mitad del total) presentaron, en promedio, 66,66% de espermatozoides vivos, sea un poco más que los 5.896 del grupo B (un poco menos de la mitad del total) que se sitúa a 63,12%, y sobretodo que los 169 del grupo C (58,91%).

Después de la congelación, la casi totalidad de los eyaculados son sometidos a la prueba de termoresistencia (JONDET y RABADEUX, 1976; MIES y JONDET, 1978). Todo lote de semen que, después de la descongelación y 5 horas de incubación a 38°C, no presente al menos 20% de espermatozoides dotados de una buena motilidad de progresión son eliminados. El análisis de la tabla 4 muestra que los

eyaculados del grupo A, los cuales presentan el porcentaje más elevado de espermatozoides vivos después de la descongelación (66,66%) son también los que mejor soportan la prueba de termoresistencia. Al cabo de 5 horas de incubación a 38°C, hay aun 57,37% de espermatozoides activos dotados de una buena motilidad de progresión. La diferencia entre las 2 cifras (9,29%) es poca. En el grupo B, el porcentaje de espermatozoides vivos después de la descongelación arriba a 63,12 mientras que en la prueba de termoresistencia nos muestra una cifra de 39,93. Aparece entonces que la diferencia es mucho más importante en el grupo B (23,19%) que en el grupo A (9,29%), mientras que la diferencia en los porcentajes de espermatozoides vivos a la descongelación entre los 2 grupos no es sino de 3,54%. Notamos en fin que los eyaculados del grupo C (58,91% de espermatozoides vivos a la descongelación) soportan aún mucho menos los rigores de la incubación, porque al cabo de 5 horas a 38°C, no quedan sino 21,73% de espermatozoides vivos, sea este un descenso, importante, de 37,18%.

De hecho, los eyaculados que se comportan habitualmente bien en el curso de las operaciones de congelación y descongelación sufren poco a la prueba de incubación. Inversamente, todo eyaculado que soporta fácilmente la prueba de termoresistencia puede ser considerado como de buena calidad. Así, sobre los 6.629 eyaculados del grupo 1 (juzgados los mejores, a priori, al examen de descongelación) 35 sólamente, o sea el 0,52% han debido ser eliminados porque titularon menos del 20% de espermatozoides vivos después de la incubación. En el grupo B, el número de eyaculados es ligeramente más elevada (250 sobre el total de 5.896, o sea el 4,24%). El grupo C perdió 48 es decir el 28,40% de sus eyaculados (Tabla 5). En total, sobre los 12.694 eyaculados recolectados, 333 sólamente (2,62%) debieron ser descartados, lo que es realmente poco. Estos resultados refuerzan nuestra opinión de que solo deben ser diluidos y congelados los eyaculados que, después de la colecta, presenten las cualidades requeridas, quiere decir, de una manera general, los que titulan al menos 1×10^8 espermatozoides por

millilitro, con una motilidad al menos 4 sobre 5. El empleo del examen de termoresistencia que amplía los descartes entre los eyaculados retenidos permite entonces decidir mejor cual debe ser eliminado.

Todas las cifras antes mencionadas han sido obtenidas en Europa, en la utilización de razas europeas (*Bos taurus*). Con esas mismas razas, en regiones tropicales, los resultados son mucho más variables (MIES y PAULO GRACA, 1950) y el porcentaje de espermatozoides reanimados después de la descongelación se elevan, según BARNABE (1979), a 46,15% (tabla 6). La calidad del esperma del toro cebú (*Bos indicus*) ha sido ya objeto de un cierto número de estudios. Entre los trabajos recientes, citamos, entre otros los de GARCIA (1971), CASAGRANDE (1973), VALE FILHO y col. (1974), DA SILVA y CASAGRANDE (1976).

Aceveran que, puede ser por falta de selección en la aptitud reproductiva, que la calidad del esperma cebú es menos bueno. Con los toros portadores de diversos grados de sangre cebú (cruzamiento *Bos taurus* x *Bos indicus*) los resultados son también menos buenos que los obtenidos en Europa con los toros de razas europeas. En efecto, en el curso de un estudio realizado recientemente (JONDET y PEREIRA ELER, 1980), pudimos comparar el comportamiento de 86 eyaculados recolectados de los toros resultantes del cruce "cebú x raza europea", congelados en Brasil, y de 100 eyaculados suministrados por los toros europeos puros congelados en Francia bajo la misma técnica. El análisis de la tabla 7 hace resaltar diferencias sensibles a favor de las congelaciones realizadas en Francia. Esas diferencias pueden ser atribuidas, al menos en parte, al hecho de que los toros europeos hayan producido los 100 eyaculados habiendo sido objeto de un control severo de la espermatoogénesis en su edad temprana (entre 11 y 15 meses).

El calor específico de la sustancia a congelar, su conductibilidad térmica, su estructura, su forma y sus dimensiones constituyen, insistimos, como un conjunto de datos que hay que tener en cuenta. La pajilla en material plástico, gracias a su pequeño diámetro (2 mm) y al espesor

ínfimo de su pared (0,2 mm) representa seguramente los mejores acondicionamientos para congelar el esperma de toro. Es sin duda la mejor razón por la cual las tasas de reanimación de los espermatozoides que nosotros obtenemos son sensiblemente superiores a las señaladas con las ampollas. A pesar de lo que se pensó por mucho tiempo no existe gran diferencia de supervivencia para los espermatozoides de un mismo eyaculado congelado a la vez en pajillas de 0,50 ml y en pajillas de 0,25 ml. En el curso de un ensayo sobre 35 eyaculados, nos dispusimos los dos tipos de pajillas en orden alterno, en las canastillas: al cabo de las operaciones de congelación y descongelación, el porcentaje de espermatozoides vivos alcanzó, en promedio, 4,97% para el semen empacado en dosis de 0,50 ml y 4,34% para el semen empacado en dosis de 0,25 ml; la pérdida efectiva de espermatozoides se elevó respectivamente a 7,27 y 6,35% (tabla 8).

El hecho de que la homogeneidad del descenso de la temperatura en el interior de un cilindro aumente en razón inversa de su diámetro (MERYMAN, 1960) basta posiblemente para explicar este mínimo/mejoramiento (0,92%) de la tasa de reanimación obtenida la reducir el diámetro de las pajillas utilizadas.

c. Poder fecundante de los espermatozoides congelados.

El poder fecundante de los espermatozoides congelados, según el método descrito da entera satisfacción. Numerosos factores, se sabe, son susceptibles de hacer variar la tasa de fecundación de las vacas inseminadas, después la conducta del hato, donde el ganadero es el único responsable (alimentación, manejo de los animales, detección del estro, etc.) justo hasta la inseminación hecha por el técnico. El cálculo teniendo en cuenta un gran número de vacas inseminadas en un año (778.622 para 1979), el número de inseminadores (191), y un gran número de toros (368), el porcentaje de no retorno en calor arriba a 67,45% después de la primera inseminación.

d. Duración de la supervivencia de los espermatozoides cuando se conserva a bajas temperaturas.

Cuando el semen era conservado a -79°C, él sufría, con el tiempo, una pérdida no despreciable. MIXNER y WIGGIN (1964) indicaron que una dosis de 1 ml que contenía 18 x 10 espermatozoides activos entonces a la descongelación que sigue a la congelación no contenía más que 15 x 10 a cabo de 4 años, y 12 x 10 al cabo de 8 años. En promedio, el porcentaje de espermatozoides vivos pasó de 44%, al inicio, a 36% al cuarto año, y 28% al octavo año.

Los ensayos comparativos de conservación de los espermatozoides a -79, -92, -96, -196°C ponemos en evidencia por lo tanto la superioridad de las temperaturas inferiores a -79°C. Estas son las que permiten obtener un porcentaje más elevado de espermatozoides reanimados, dotados de una mejor motilidad (ETGEN y al., 1957; BEAN y al., 1963), y de una resistencia propia superior. Por lo tanto, los espermatozoides mantenidos en el nitrógeno líquido (-196°C) soportan, mejor que los conservados en alcohol enfriado a -79°C, los rigores de una prueba consistente en 3 operaciones sucesivas de congelación-descongelación (FOWLER y al., 1961). Las actividades metabólicas potenciales de los espermatozoides (respiración, consumo de fructosa, producción de ácido láctico) son también mucho mejor preservadas a -196°C que a -79°C (KELLY y HURST, 1964; O'DELL y ALMQUIST, 1958; PICKETT y al., 1960; SULLIVAN y MIXNER, 1963). Habrá interés en recurrir a las temperaturas todavía más bajas? La respuesta es negativa: la vitalidad y el poder fecundante de los espermatozoides en el helio líquido (-296°C), de un precio que es mucho más elevado, no son superiores a las de los espermatozoides conservados en el nitrógeno líquido (NISHIKAWA y al., 1972).

El nitrógeno líquido permite —se constata— conservar los espermatozoides en buenas condiciones de seguridad para su vitalidad. Todo hace creer que la calidad de los espermatozoides descongelados después de haber tenido una permanencia de

cierto tiempo en el nitrógeno líquido es mejor que la de los que son descongelados inmediatamente después de la congelación: ETGEN y al. (1957), y PICKETT y al. (1960) constataron así una mejor motilidad después de 3 semanas de conservación. Parece entonces que los espermatozoides sean capaces de ajustar su propia reacción a los rigores de los grandes fríos. Nosotros mismos lo hemos observado en el curso de los controles periódicos de la calidad del semen. No hemos, de todas maneras, jamás podido poner en evidencia alguna reducción de la vitalidad sobre alguno de los numerosos lotes de semen que hemos preparado, sea cual sea la edad, con tal que ellos hayan sido conservados a -196°C. Así es entonces que disponemos todavía de dosis de semen en perfecto estado, congelados con hielo carbónico (-79°C) en 1957 y transpasados al nitrógeno líquido en 1962.

La duración de supervivencia de los espermatozoides en el nitrógeno líquido es indefinida? No es posible afirmar que la temperatura de -196°C bloquee íntegramente el metabolismo de las células. Sin embargo ese metabolismo no es de tal manera inhibido que, sin querer anticipar, se puede contar con un período de utilización, muy extenso en el tiempo, de los espermatozoides.

Las ventajas del método de congelación que nosotros propusimos son numerosas. Citamos los principales, para resumir:

- El enfriamiento del semen en los vapores de nitrógeno líquido llegó a ser una manipulación extremadamente simple, realizada de repente, sin un ajuste previo de la temperatura del recipiente. El ritmo de la homogenización de la temperatura fue puesta en su punto, de una vez por todas, por la ayuda del electrotermómetro. En el trabajo de rutina, se puede perfectamente prescindir de este aparato.

- La cantidad de nitrógeno líquido consumido para congelar 2.160 dosis de 0,50 o 3.000 dosis de 0,25 ml es muy poca: no excede a los 2 litros.

- El rendimiento es particularmente elevado: 2.160 dosis de 0,50 ml o 3.000 dosis de 0,25 ml son congeladas de una sola vez, en 15 minutos, lo que corresponde, manipulaciones accesorias comprendidas, a más de 6.000 pajillas medianas o 9.000 pajillas finas tratadas en una hora y con un solo recipiente de congelación. En un día de trabajo de 8 horas, 4 personas de laboratorio preparan, congelan y clasifican corrientemente 15.000 a 20.000 dosis con los eyaculados recolectados a 30 o 40 toros.

- El poder fecundante de los espermatozoides congelados es, también, muy satisfactorio: el porcentaje de no retorno en calores de las hembras (después de una primera inseminación), calculado para 60-90 días, oscila, según los años, entre 65 y 70%.

- El porcentaje de espermatozoides encontrados vivos a la descongelación es particularmente satisfactorio, arriba, en promedio de un 65%, y la pérdida en espermatozoides permanece inferior al 5%.

Tabla 1 - Evolución de las técnicas de congelación en los centros de inseminación de RENNES y PLOUNEVZEL (FRANCIA)

Métodos de congelación	Espermatozoides vivos (%)			Espermatozoides reanimados (%)	Pérdida efectiva de espermatozoides (%)
	antes de la congelación	después de la descongelación	diferencia		
1964 - congelación de las pajillas de 1,2 m., en posición vertical, en los vapores de nitrógeno líquido de un recipiente de 185 litros (cesta de 11 gobelets de 48 dosis cada uno) (1)	64,72	48,05	16,67	74,25	25,25
1968 - congelación de las pajillas de 0,50 ml, en posición vertical, en los vapores de nitrógeno líquido de un recipiente de 185 litros (cesta con cuatro canastillas en un cuarto de cilindro portadores de 320 dosis cada uno) (2)	66,52	64,08	2,44	96,34	3,66
1978 - congelación de las pajillas de 0,25 ml, en posición vertical, en los vapores de nitrógeno líquido de un recipiente de 60 litros (cesta con 12 canastillas portadoras de 250 dosis cada uno) (3)	67,33	64,83	2,50	96,29	3,71

(1) - Promedios de 18 eyaculados recolectados en 18 litros

(2) - Promedias de 6.115 eyaculados recolectados en 209 toros

(3) - Promedias de 193 eyaculados recolectados en 102 toros

Tabla 2 - Congelación de semen en pajillas de 0,25 ml: ritmo de descenso de la temperatura

Tiempo (minutos)	Temperatura (en grados centígrados)			
	A	B	C	Promedios
0	+ 5.8	+ 3.8	+ 4.0	+ 4.5
10	- 91.4	- 89.4	- 91.2	- 90.6
20	- 132.6	- 135.0	- 135.8	- 134.4
30	- 156.5	- 156.8	- 157.6	- 157.0

A: sonda del electrotermómetro en una pajilla situada en la periferia de la cesta (promedios establecidos después de la lectura de 5 curvas); B: sonda en una de las pajillas situadas en la mitad del portador (promedios de 5 curvas); C: sonda en una pajilla situada en el centro de la cesta (promedios de 5 curvas).

Tabla 3 - Supervivencia de los espermatozoides después de la congelación y descongelación (pajillas de 0,25 ml.)

Repartición de los eyaculados en función del porcentaje de espermatozoides vivos a la descongelación	Número de eyaculados congelados (a)	Espermatozoides vivos a la descongelación (%)
A: 65 a 70%	6.629	66,66
B: 60 a 65%	5.896	63,12
C: menos de 60%	169	58,91
Total/promedios	12.694	64,91

(a) - recolectados en 166 toros

Tabla 4 - Influencia de la prueba de termoresistencia (Incubación 5 h a +38°C) sobre el porcentaje de espermatozoides vivos (pajillas de 0,25 ml)

Repartición de eyaculados en función del porcentaje de espermatozoides vivos a la descongelación	Número de eyaculados congelados (a)	Espermatozoides vivos (%)		
		después de la descongelación	después de la incubación 5 h a 38°C	diferencia
A: 65 a 70%	6.629	66,66	57,37	9,29
B: 60 a 65%	5.896	63,12	39,93	23,19
C: menos de 60%	169	58,91	21,73	37,18

(a) - recolectados en 166 toros

Tabla 5 - Tasa de eliminación de los eyaculados después de la prueba de termoresistencia

Repartición de los eyaculados en función del porcentaje de espermatozoides vivos a la descongelación	Número de eyaculados congelados	Número de eyaculados eliminados después de la prueba de termoresistencia (menos del 20% de espermatozoides vivos)
A: 65 a 70%	6.629	35 = 0,52%
B: 60 a 65%	5.896	250 = 4,24%
C: menos de 60%	169	48 = 28,40%
Totales/promedios	12.694	333 = 2,62%

**Tabla 6 - Porcentaje de espermatozoides vivos después de la congelación y la descongelación
(toros de razas europeas utilizados en Brasil)**

año de la congelación	Número de eyaculados eliminados	% de espermatozoides vivos después de la congelación (motilidad progresiva)
1975	50	46,40
1976	50	50,80
1977	50	42,40
1978	50	45,00
Totales/promedios	200	46,15

según BARNABE (1979)

Tabla 7 - Comportamiento comparado entre las pruebas de congelación y descongelación de eyaculados de toros de razas europeas puras y de toros usados en cruzamientos diversos "cebú x raza europea"

Número de eyaculados congelados	Porcentaje de espermatozoides vivos (motilidad progresiva)		
	antes de la congelación	después de la descongelación	después de la prueba de termoresistencia
100 (Francia)	67,78	64,43	37,15
86 (Brasil)	52,55	31,45	16,29

Tabla 8 - Influencia del volumen de la pajilla sobre la supervivencia de los espermatozoides después de la congelación y descongelación (promedios de 35 eyaculados de 35 toros diferentes)

Volumen de la pajilla	Espermatozoides vivos (%)		Diferencias	Pérdida efectiva (%) de espermatozoides (%)
	antes de la congelación	después de la descongelación		
0,50 ml	68,34	63,37	4,97	7,27
0,25 ml	68,34	64,00	4,34	6,35

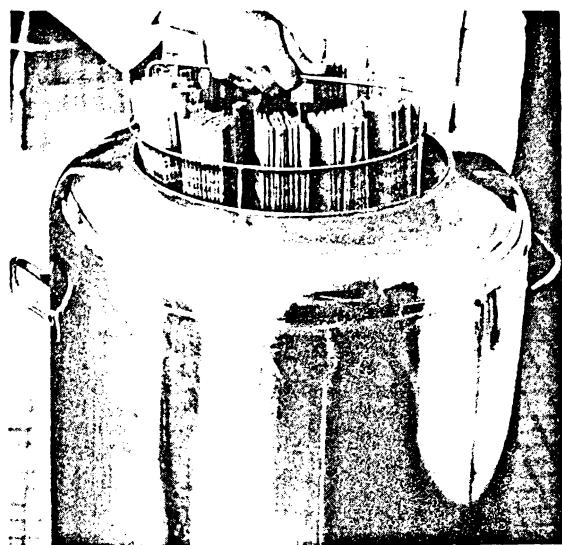


Figura 1. La cesta es introducida en el recipiente.



Figura 2. Las pajillas son repartidas en una pequeña canastilla en material plástico.

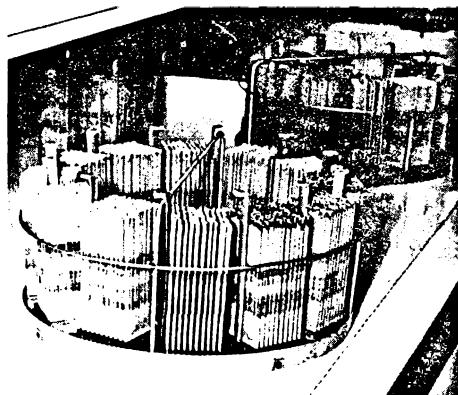


Figura 3. Una cesta metálica con las canastillas (3.000 pajillas de 0,25 ml o 2.160 de 0,50 ml.).

BIBLIOGRAFIA

1. BARNABE (V.H.) —1979—. Avalacao de semen congelado de bovinos, con especial referencia à integridade do acrosomo - Tese de doutoramento - Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia, Univ. Sao Paulo, Brasil - 70 p.
2. BEAN (B.H.), PICKETT (B.W.), MARTIG (R.C.) - 1963 - Influence of freezing methods, extenders and storage temperatures on motility and pH of frozen bovine semen. *J. Dairy Sci.* **46**. 145-149.

3. CASAGRANDE (J.F.) -1973- Relacoes entre algumas caracteristicas fisicas e morfológicas de semen de zebuinos e sua congelabilidade —Tese de doutoramento— Faculdade de Medicina Veterinaria e Agronomia - Jaboticabal (S.P.), Brasil — 61 p.
4. CASSOU (R.) -1950- Nouvelle technique d'insémination artificielle - C.R. Soc. Biol., 144. 486-487.
5. CASSOU (R.) -1968- La miniaturisation des palliettes - VIé Cong. Inter. Reprod. Anim. Insém. Artif. - Paris - Vol. II -1009-1011.
6. ETGEN (W.M.), LUDWICK (T.M.), RICHARD (H.E.), HESS (E.A.), ELY (F.) -1957- Use of mechanical refrigeration in preservation of bull semen - J. Dairy Sci. 40. 774-778.
7. FOWLER (A.K.), PICKETT (B.W.), GOSSLEE (D.G.), COWAN (W.A.) -1961- Effects of -196 and - 76°C storage on the resistance of bull sperm to three repeated freeze-thaw treatments - J. Dairy Sci. - 44. 715-720.
8. GARCIA (O.S.) -1971- Características físicas e Morfológicas do semen de touros normais e de touros com distúrbios reprodutivos, de raças europeias e Indianas, criadas no Estado de Minas Gerais - Tese de doutoramento - Esc. Vet. UFMG - Belo Horizonte (M.G.), Brasil - 61 p.
9. HAFS (H.D.), ELLIOT (F.I.) - 1955 - The effect of methods of adding egg yolk and monosaccharides on the survival of frozen bull spermatozoa - J. Dairy Sci. - 38 - 811-815.
10. JONDET (R.) - 1972- Survival rate and fertility ability of frozen bull spermatozoa following 8 and 1 minute exposure to glycerol - VIIé Cong. Inter. Reprod. Anim. Insém. Artif., Munich - Vol. II. 1373-1378.
11. JONDET (R.), RABADEUX (Y.) - 1973 - Utilisation du test de thermorésistance dans l'appréciation de la valeur du sperme congelé de taureau - Elevage et Insémination (Publication U.N.C.E.I.A., 149, rue de Bercy, Paris) - Novembre - N° 158. 13-19.
12. JONDET (R.), PEREIRA ELER (J.) - 1980 - Projeto EMBRAPA/FAO. PNUD, EMBRAPA - UEPAE- São Carlos (SP) - Brasil - não publicado.
13. KELLY (J.W.), HURST (V.) - 1964 - Evaluation of frozen bovine semen packaged in glass and plastic ampules for 3 methods of storage and shipping - Amer. J. Vet. Res. 25. 1148-1149.
14. MERYMAN (H.T. - 1960 - The mechanisms of freezing in biological systems. In "Recent research in freezing and drying" - Blackwell Scientific Publications, edit., Oxford. 23-29.
15. MIES FILHO (A.), PAULO GRACA (V.) - 1950- Observações sobre a influência das estocadas do ar no espermatogênese de reprodutores bovinos importados - publicação nº 9 - dez - 1950 - 13 p. - Instituto de Zootécnica - Ministério de Agricultura - Rio de Janeiro - Brasil.
16. MIES FILHO (A.), JONDET (R.) - 1978 - Avaliação da qualidade do sêmen bovino congelado - Comunic. científ. Fac. Med. Vet. Zootec. - Univ. São Paulo (Brasil) - 2 - (34) 7-18.
17. MIXNER (J.P.), WIGGIN (H.) - 1964 - The effects of ageing on the motility and fertility of frozen bull semen - Ve Cong. Inter. Reprod. Anim. Insém. Artif., Trente - Vol. IV. 264-268.
18. NISHIKAWA (Y.), IRITANI (A.), OGAWA (S.) - 1972- Studies on the effect of liquid helium temperature (-269°C) on spermatozoa of farm animals, domestic fowl and man - VIIé Cong. Inter. Reprod. Anim. Insém. Artif., Munich - Vol II - 1265 - 1270.
19. O'DELL (W.T.), ALMQUIST (J.O.) - 1958 - Freezing Bovine Semen. IV Effect of freezing on the metabolic activity of bovine spermatozoa during and after storage at - 79°C - J. Dairy Sci. - 41 - 1792.
20. PHILLIPS (P.H.), LARDY (H.A.) - 1940 - A yolk buffer pabulum for the preservation of bull semen - J. Dairy Sci. - 23 - 399-401 - Cit. por SALISBURY y VAN DEMARK (1961) - 386.
21. PICKETT (B.W.), FOWLER (A.K.), COWAN (W.A.) - 1960 - Effects of continuous and alternating storage temperatures of - 79 and - 196°C on motility of frozen bull semen J. Dairy Sci. - 43 - 281-283.
22. PICKETT (B.W.), BERNDTSON (W.E.), SULLIVAN (J.L.) - 1976 - Techniques for processing and packaging bovine semen - 64 Conf. Techn. Insém. Artif. Reprod. (N.A.A.B., P.O. Box 1033, Columbia, Missouri, U.S.A.) - 34-50.
23. POLGE (C.), ROWSON (L.E.A.) - 1952 - Fertilizing capacity of bull spermatozoa after freezing at - 79°C - Nature (Lon.) - 169 - 628-628.
24. SALISBURY (G.W.) - 1941 - Recent research development in the preservation and handling of bovine semen - Cornell Vet. - 31 - 149-159.
25. SORENSEN (E.) - 1940 - Insemination with gelatinized sperm in paraffined cellophane tubes - Medlemsbl. danskr. Dyrlegeloren - 23 - 168.
26. SULLIVAN (J.J.), MIXNER (J.P.) - 1963 - Effects of storage temperature and length of storage time upon the post-thawing motility and metabolic activity of frozen bull semen - J. Dairy Sci. - 46 - 850-853.
27. VALE FILHO (V.R.), PINTO (P.A.), LEMOS (G.B.), FONSECA (J.), FURLAN (H.) - 1974 - Normas para seleção de touros Bos Indicus quanto à fertilidade, para uso em centrais de inseminação artificial e em testes de progenie, em concícoes de Brasil - Anais do XIVº Cong. Bras. Med. Vete - 179.
28. DA SILVA (R.G.), CASAGRANDE (J.F. - 1976 - Influence of high environmental temperatures on some characteristics of zebu bull semen - 8º Congr. Inter. Reprod. Anim. Insém. Artif. - Cracóvia - Julho 1976 - Vol. IV - 939-942.