

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL



Estudio Comparativo de Tres Diluyentes de Semen Bovino (Triladyl, Andromed Y Optidyl) para su Criopreservación

Por:

ISRAEL JESÚS PÉREZ SÁNCHEZ

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO ZOOTECNISTA

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Diciembre de 2019

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL

Estudio Comparativo de Tres Diluyentes de Semen Bovino (Triladyl,
Andromed Y Optidyl) para su Criopreservación

POR:

ISRAEL JESÚS PÉREZ SÁNCHEZ

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
TÍTULO DE:**

INGENIERO AGRÓNOMO ZOOTECNISTA

Aprobada por:


M.C. Pedro Carrillo López

Asesor principal


Dra. Laura E. Padilla González

Coasesor


M.C. Enrique Esquivel Gutiérrez

Coasesor


Dr. José Dueñez Alanís

Coordinador de la División de Ciencia Animal



Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Diciembre de 2019

Dedicatoria

A mis padres.

Oscar Pérez Martínez

Irma Sánchez Pastrana

Gracias por el apoyo brindado a lo largo de estos años, por sus consejos y por forjarme en un hombre de bien.

Este trabajo de tesis se los dedico a ustedes como muestra de todo lo que me han dado.

Sé que la mejor herencia que me pudieron dar fue el estudio y poder culminar esta etapa.

A mis hermanos.

Paco, Omar, Ulises y May.

Les agradezco y dedico este trabajo por siempre brindarme su apoyo y por permanecer unidos.

A mis abuelas *Abel* y *Dora* por su cariño y por tenerme siempre en sus oraciones.

A Dios por darme la fortaleza de seguir adelante y protegerme.

Agradecimientos

“La gratitud no es solo la más grande de las virtudes, sino la madre de todas las demás”.

Marco Tulio Cicerón

Al M.C. Pedro Carrillo López por ser mi asesor principal de tesis y apoyarme en la revisión de tesis y en el trabajo de campo para poder realizar este trabajo.

A la Dra. Laura E. Padilla González por darme la oportunidad de realizar mi tesis y por su apoyo en el laboratorio y el procesamiento del semen y por toda la ayuda brindada.

Al M.C. Enrique Esquivel Gutiérrez por aceptar ser asesor de tesis y su apoyo a lo largo de la carrera.

Al Ing. Ricardo Deyta por todo su apoyo y amistad a lo largo de la carrera.

A mis compañeros de la generación CXXVIII.

En especial a Imelda Chávez por brindarme su gran amistad, apoyo y consejos a lo largo de la carrera, gracias por ser una excelente amiga y siempre estar ahí.

A mi amiga Luz por su gran amistad y siempre darme su mano cuando lo necesite, muchas gracias por todo.

A Eliud por apoyarme en el trabajo de campo y laboratorio en la realización de mi tesis.

A mis compañeros de casa Fernando, Joaquín (BAM-BAM) y Abel (Pelón), gracias por todo su apoyo y amistad que vivimos juntos.

A Oscar, Elmer, Alexis y Reymundo por su gran amistad y su apoyo en todos los momentos.

A mi ALMA MATER por brindarme todos los conocimientos y experiencias en mi estancia.

INDICE

| | |
|--|----|
| ÍNDICE DE GRAFICAS | IV |
| ÍNDICE DE CUADROS | V |
| I.INTRODUCCIÓN | 1 |
| Objetivo general | 3 |
| Objetivo específico | 3 |
| II.REVISIÓN DE LITERATURA | 4 |
| 2.1. Anatomía y fisiología del aparato reproductor del macho bovino | 4 |
| 2.1.1. Escroto | 4 |
| 2.1.2. Testículos | 5 |
| 2.1.3. Epidídimo | 6 |
| 2.1.4. Conductos deferentes | 7 |
| 2.1.6. Glándulas bulbo uretrales o de cowper | 8 |
| 2.1.7. Vesículas seminales | 9 |
| 2.1.8. Pene | 9 |
| 2.1.9. Uretra | 10 |
| 2.1.10. Prepucio | 10 |
| 2.2. Sistema hormonal del macho bovino. | 10 |
| 2.3. Ciclo de vida reproductivo | 11 |
| 2.3.1. Pubertad | 11 |
| 2.3.2. Fisiología del macho en la pubertad | 12 |
| 2.4. Espermatogénesis | 13 |
| 2.5. Características generales del espermatozoide | 14 |
| 2.6. Composición del semen | 16 |
| 2.7. Metabolismo Espermático | 16 |
| 2.7.1. Maduración | 17 |
| 2.7.2. Capacitación | 17 |
| 2.7.3. Reacción acrosomal | 18 |
| 2.8. Métodos de extracción y recolección | 18 |
| 2.9. Evaluación de la calidad espermática | 23 |

| | |
|---|-----------|
| 2.9.1. Análisis macroscópico | 24 |
| 2.9.2. Análisis microscópico | 25 |
| 2.10. Morfología y viabilidad del esperma | 26 |
| 2.11. Concentración espermática..... | 27 |
| 2.12. Importancia de la conservación del semen bovino | 27 |
| 2.13. Diluyentes | 28 |
| 2.13.1. Componentes de los diluyentes | 29 |
| 2.13.2. Principales diluyentes comerciales utilizados | 30 |
| 2.14. Procesamiento de semen bovino | 32 |
| 2.14.1. Dilución..... | 32 |
| 2.14.2. Envasado..... | 32 |
| 2.14.3. Congelación..... | 33 |
| 2.14.4. Descongelación | 33 |
| 2.15. Evaluación post congelación | 34 |
| III. MATERIALES Y MÉTODOS | 36 |
| 3.1. Localización del área de estudio | 36 |
| 3.2. Materiales | 36 |
| 3.3. Sementales utilizados | 38 |
| 3.4. Método de obtención de la muestra de semen | 38 |
| 3.5. Evaluación de la muestra de semen | 39 |
| 3.5.1. Concentración | 40 |
| 3.5.2. Volumen..... | 40 |
| 3.5.3. Motilidad | 40 |
| 3.6. Preparación de los diluyentes a utilizar | 41 |
| 3.6.1. Preparación del Optidyl..... | 41 |
| 3.6.2. Preparación del Andromed | 43 |
| 3.6.3. Preparación del Triladyl con yema de huevo | 43 |
| 3.7. Dilución del semen | 44 |
| 3.7.1. Cálculo de dilución..... | 45 |
| 3.8. Gliceralización y equilibración | 46 |
| 3.9. Envasado de semen | 46 |
| 3.10. Congelamiento y almacenamiento de pajillas | 46 |
| 3.11. Evaluación post-descongelación | 46 |

| | |
|---|-----------|
| 3.12. Diseño experimental | 47 |
| IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 48 |
| V. CONCLUSIONES..... | 54 |
| VI. RESUMEN | 55 |
| VII. LITERATURA CITADA | 56 |

ÍNDICE DE GRAFICAS

| | |
|--|----|
| Grafica 1. Porcentaje de motilidad promedio recuperada de cada diluyente. | 49 |
| Grafica 2. Porcentaje de motilidad post-congelación de cada uno de los diluyentes en el total de las pajillas evaluadas..... | 51 |
| Grafica 3. Porcentaje promedio de motilidad recuperada del diluyente Andromed. ... | 52 |
| Grafica 4. Porcentaje promedio de motilidad recuperada del diluyente Optidyl. | 53 |
| Grafica 5. Porcentaje promedio de motilidad recuperada del diluyente Triladyl..... | 53 |

ÍNDICE DE CUADROS

| | |
|--|-----------|
| Cuadro 1. Componentes y proporciones utilizadas en diluyente Optidyl..... | 42 |
| Cuadro 2. Componentes y proporciones utilizadas en diluyente Andromed | 43 |
| Cuadro 3. Componentes y proporciones utilizadas en el diluyente Triladyl | 44 |
| Cuadro 4. Diferencias entre el porcentaje de motilidad espermática recuperada de las fases de pre y post-congelación referente al proceso de motilidad del semen en fresco..... | 50 |

I.INTRODUCCIÓN

El conocimiento de la fertilidad o de la capacidad fecundante de cada toro es uno de los principales objetivos en la producción de semen bovino. Un requisito indispensable para el desarrollo de la inseminación artificial es que el semen utilizado mantenga su capacidad de fertilidad después de haber sido criopreservado (Hidalgo *et al.*, 2005).

En la actualidad la industria cárnica y láctea de bovinos está en un crecimiento exponencial donde para ello se deben de tener en cuenta las biotecnologías reproductivas tanto en el macho como en la hembra para poder tener buenas poblaciones en los hatos ganaderos y poder cumplir con las necesidades que demanda el mercado.

Los machos y hembras deben reunir características genóticas y fenotípicas deseables, y además transmitir a su descendencia sus características positivas, mediante el empleo de la monta natural o inseminación artificial.

En los últimos años la medición de la calidad y la capacidad fecundante del semen bovino ha incrementado su importancia en la industria de la inseminación artificial y en los programas de selección de reproductores y mejoramiento genético; no sólo porque involucra directamente la fertilidad de los toros, sino también por el alcance que puede tener esta búsqueda en la fertilidad de su descendencia. Aunque se han propuesto muchos y variados métodos de evaluación seminal como predictores de la fertilidad de los toros, la aplicación de una única prueba de evaluación seminal no siempre es suficiente. Por ello, existe una búsqueda continua de alguna prueba seminal o combinación de varias de ellas que permita predecir la fertilidad con mayor exactitud y a costos más bajos.

El procedimiento correcto de la colecta de semen y su procesamiento para tener las pajillas listas para la inseminación artificial tiene gran importancia, ya que aquí es donde se puede perder gran cantidad espermática o conservarla, esto depende de la manera de procesarlo.

La importancia que tienen los diluyentes en la criopreservación del semen bovino, es que ayudan a extender la vida de las células espermáticas, ya que son sustancias nutritivas que intervienen en su mantenimiento y preservación.

Palabras clave:

Motilidad espermática, semen, inseminación artificial, criopreservación, diluyente seminal y pajilla.

Objetivo general

Estudio del efecto de tres diluyentes (Triladyl, Andromed y Optidyl) sobre la recuperación de la motilidad espermática de semen procesado en bovinos.

Objetivo específico

Evaluar la recuperación de motilidad espermática del semen en la pre-congelación (fase de refrigeración) y la post-congelación de cada uno de los diluyentes utilizados.

Hipótesis

Se han planeado al menos dos hipótesis para el siguiente experimento.

H0: $T_i = T_j$ (todos los tratamientos son iguales)

H1: $T_i \neq T_j$ (al menos un tratamiento es diferente)

II.REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Anatomía y fisiología del aparato reproductor del macho bovino

El aparato reproductor del macho bovino consiste en varios órganos que trabajan de manera coordinada para la producción de gametos masculinos (espermatozoides) para que al momento de la copula sean depositados en el tracto reproductor de la hembra.

La emisión es la liberación de espermatozoides y de fluidos de las glándulas accesorias a la uretra pélvica, mientras que la eyaculación es la expulsión enérgica del semen en la uretra (Cunningham, 2003).

Las principales partes del aparato reproductor del macho incluyen los testículos, el epidídimo y el conducto deferente correspondiente a cada testículo, la parte distal de la uretra, el pene, el escroto y las glándulas accesorias (Shively, 1993).

2.1.1. Escroto

El escroto junto con los músculos cremaster y la anatomía vascular de las arterias y venas testiculares, protegen los testículos y regulan la temperatura. El escroto está presente en todos los animales domésticos y es básicamente un saco de piel con una capa de tejido muscular fibroelástico denominado túnica de dartos. La disposición vascular de la arteria testicular, rodeada por el plexo de venas testiculares (plexo pampiniforme), proporciona un mecanismo de intercambio de calor a contracorriente vital para la termorregulación testicular. La contracción y relajación de la túnica dartos y del músculo cremaster se producen por los cambios de temperatura ambiental y en respuesta a determinados estímulos táctiles (Cunningham, 2003).

2.1.2. Testículos

Cada testículo funciona para producir espermatozoides y la hormona sexual masculina testosterona. Los espermatozoides se producen en el interior de los tubos seminíferos y las células intersticiales. El esperma madura en el epidídimo.

Los líquidos nutritivos y el sustento se agregan en las glándulas sexuales accesorias durante la eyaculación para producir el semen (Shively, 1993).

De la red testicular salen 8 a 12 conductos excretores testiculares densamente enrollados que perforan la túnica albugínea e ingresan en la cabeza del epidídimo (König, 2005).

El testículo es responsable de la esteroidogénesis, principalmente de la producción de andrógenos, así como de la generación de células germinales haploides mediante la espermatogénesis. Estas dos funciones ocurren en las células de Leydig y en los túbulos seminíferos, respectivamente.

En los túbulos seminíferos, las células de Sertoli, que proporcionan apoyo y nutrientes a las células germinales en desarrollo, se extienden desde el comportamiento basal hasta el adluminal (Shively, 1993).

En los mamíferos domésticos, la función testicular normal, especialmente la espermatogénesis, depende de la temperatura y requiere un medio con una temperatura inferior a la corporal. Por tanto, los testículos de los machos domésticos se localizan fuera de la cavidad abdominal, en el escroto. El fallo en el descenso de uno o ambos testículos hasta el escroto se conoce como criptorquidia. Aunque el testículo criptorquidiano es capaz de producir andrógenos, es incapaz de producir espermatozoides normales, por lo que un macho con criptorquidia bilateral es estéril.

En los animales domésticos el descenso de los testículos al escroto suele producirse durante los siguientes periodos:

- Caballo: a los 9-11 meses de gestación
- Toro: a los 3.5-4 meses de gestación
- Oveja: a los 80 días de gestación
- Cerdo: a los 90 días de gestación

La mayoría de las especies domesticas requieren el paso de los testículos a través de los dos anillos internos a las dos semanas del nacimiento para que pueda adaptar su posición escrotal final (Cunningham, 2003).

2.1.3. Epidídimo

El epidídimo está compuesto por cabeza, cuerpo y cola. En la cabeza del epidídimo que está fuertemente unida a los testículos ingresan los conductos eferentes del testículo para reunirse en el canal o conducto del epidídimo. El conducto densamente contorneado forma en primer lugar el cuerpo del epidídimo que, fijado por medio del meso epidídimo está situado en posición dorsal (Kônig, 2005).

La cola del epidídimo está fijada por ligamentos por una parte al testículo mediante el ligamento propio del testículo (lig. Testis proprium), y por otro a la base del proceso vaginal mediante el ligamento de la cola del epidídimo (lig caudae epididymides). Después de abandonar la cola del epidídimo el conducto del epidídimo se continua como conducto deferente en posición medial con respecto al epidídimo (Kônig, 2005).

El epidídimo no solo es un conducto para los espermatozoides, sino que aporta un medio adecuado en el que estos se concentran, maduran y adquieren la capacidad de fecundación. Los espermatozoides que entran en la cabeza del epidídimo, desde la red de testis son inmóviles y solo alcanzan la motilidad y la

capacidad de fecundar tras experimentar el proceso de migración y maduración a lo largo de la cabeza y del cuerpo del epidídimo. La cola de este y el conducto deferente donde desemboca, constituyen un punto de almacenamiento de espermatozoides maduros y se conocen como reservas extra gonadales de esperma. El tiempo de tránsito de los espermatozoides a través de la cabeza y el cuerpo no se altera con la eyaculación y es similar en todas las especies domésticas (2 a 5 días). La duración del almacenamiento en la cola del epidídimo es más variable entre especies (3 a 13 días) y puede reducirse en varios días en machos sexualmente activos. Los animales en reposo sexual durante 7-10 días tienen una reserva máxima de espermatozoides en dicha cola que se reduce al menos un 25% con eyaculaciones diarias o alternas (Cunningham, 2003).

2.1.4. Conductos deferentes

Se extiende desde la cola del epidídimo a la parte pelviana de la uretra, asciende por el canal inguinal incluido en un pliegue derivado del mesorquio. En el anillo inguinal se separa de los demás constituyentes del cordón espermático y gira caudal y medialmente dentro de la cavidad pelviana, asienta sobre el borde libre del pliegue genital el cual está unido a la porción inguinal de la pared abdominal y ventral de la pared lateral de la pelvis. Posteriormente sobre la superficie dorsal de la vejiga deja el borde del pliegue y se inclina medialmente entre estas capas para entrar en contacto con la vesícula seminal. Sobre el cuello de la vejiga los dos conductos asientan flanqueados lateralmente por el cuello de las vesículas seminales, desaparecen bajo el istmo de la próstata y se continúan a través de la pared uretral para abrirse en un pequeño divertículo sobre el folículo seminal con el conducto excretor de la vesícula seminal. La abertura común es el orificio eyaculatorio, el diámetro es de 6 mm. La ampolla del conducto deferente es de 15 a 20 cm. de longitud y 2 cm. de diámetro (Sisson, 1982).

2.1.5. Próstata

Está presente en todos los mamíferos domésticos y consta de un cuerpo y una parte diseminada formando una capa glandular en la pared uretral (Shively, 1993).

Es una glándula lobulada, asienta en el cuello de la vejiga y el principio de la uretra, ventral al recto. Está formada por 2 lóbulos laterales, derecho e izquierdo, tiene forma prismática, presenta 15 o 20 conductos prostáticos, los cuales perforan la uretra y se abren lateralmente al folículo seminal (Sisson, 1982).

La próstata elabora una proteína conjugada llamada antiglutinina cefálica que previene la aglutinación de los espermatozoides. También algunas especies producen prostaglandinas que favorecen las contracciones uterinas en las hembras (García *et al.*, 1995)

2.1.6. Glándulas bulbo uretrales o de cowper

Son 2 y se localizan a los lados de la parte pelviana de la uretra, unidos al arco isquiático, cubiertos por el musculo uretral, tienen forma ovoide, miden aproximadamente 4 centímetros (cm.) de longitud y 2.5 cm. de ancho (Sisson, 1982).

En el toro los conductos de las glándulas bulbo uretrales desembocan en la depresión uretral, con localización dorsal, la cual puede impedir el paso del catéter en esta especie. El conducto excretor termina bajo un pliegue de la mucosa uretral; dicho pliegue dificulta enormemente el cateterismo de la porción pelviana de la uretra, una vez que se logra superar con la sonda la flexura sigmoidea del pene (García *et al.*, 1995).

2.1.7. Vesículas seminales

Son dos y están situadas a ambos lados del cuello de la vejiga, sobre la próstata y dirigidas hacia adelante. Tienen una longitud aproximada de 8 a 10 cm., son de forma lobulada y secretan un líquido rico en azúcares como fructosa y ácido cítrico (Shively, 1993).

2.1.8. Pene

Es el órgano de la copulación, tiene una estructura muscular que fija el pene en su parte posterior a la pelvis. El pene desciende por debajo de la pared abdominal y forma una S para luego salir por el prepucio.

El interior del pene está formado por el tejido cavernoso el cual permita almacenar suficiente cantidad de sangre para producir la erección. A lo largo del pene va la uretra hasta la punta o glande. La uretra da salida a la orina y cuando el toro cubre a la vaca y el pene esta erecto, da salida al semen o eyaculado (Sisson, 1982).

Cuando el toro se excita sexualmente, el musculo retractor del pene se relaja y la estructura cavernoso y eréctil se llena de sangre haciendo que el pene se ponga túrgido, erecto y aumente de tamaño. Al cubrir la hembra, introduce el pene erecto en la vagina, y deposita allí el semen mediante un fuerte empujón hacia adelante llamado corrientemente “golpe de riñón”.

La salida del semen o eyaculación es debida a un reflejo de contracción del epidídimo, vasos eferentes, uretra y glándulas accesorias del aparato reproductor del toro. El reflejo es causado por estimulación del glande del pene durante la monta natural o por la vagina artificial usada para colectar el semen para la inseminación artificial (Shively, 1993).

2.1.9. Uretra

Esta estructura hace parte del aparato urinario y a su vez sirve de conducto para el plasma seminal, por esta razón incluimos la uretra dentro del tracto reproductivo masculino. La uretra es un tubo o conducto que va desde la vejiga hasta el exterior, ésta va por el interior del pene. Su función es común para el aparato urinario y el aparato reproductivo, al permitir la salida de la orina y del semen al exterior (Sisson, 1982).

2.1.10. Prepucio

El prepucio es la extensión de la suave capa de piel que rodea el pene, que sirve para cubrir y proteger el glande, la cabeza del pene.

En el toro es largo y estrecho, su cavidad prepucial mide de 35 a 40 cm. de largo y 3 cm. de diámetro. Presenta 2 pares de músculos prepuciales. Los músculos prepuciales craneales son 2 bandas, nacen cerca de la región xifoidea, caudalmente divergente y abandonan el ombligo para unirse caudalmente al orificio prepucial, delimita el prepucio hacia delante. Los músculos prepuciales caudales se originan en la región inguinal y terminan en la parte craneal del prepucio (Sisson, 1982).

2.2. Sistema hormonal del macho bovino.

El control hormonal de la actividad reproductora en el macho se debe a que la hormona luteinizante (LH) induce la producción de andrógenos en conjunto con la hormona folículo estimulante (FSH).

Los andrógenos producidos en el testículo estimulan a las células intersticiales del mismo para producir la testosterona la cual lo mantiene funcionalmente en actividad manifestándose en el cuerpo del macho los caracteres sexuales secundarios. La aparición la libido y necesidad de

reproducirse, mayor talla y corpulencia, incremento del sistema músculo-esquelético, mugir más grave que la hembra e instinto de pelea (Vera, 1993).

El periodo previo a la pubertad, donde comienza la espermatogénesis, se caracteriza por estar bajo la influencia de una adecuada producción a nivel del hipotálamo del factor de liberación de las gonadotropinas (GnRH) y la secreción hipofisaria de FSH (hormona estimulante de células de Sertoli) y LH (hormona estimulante de las células de Leydig), al igual que de esteroides sexuales que se producen en las células de Leydig a nivel gonadal.

La liberación continua de LH ocurre entre 10 y 20 minutos aproximadamente de 4 a 8 veces diarias; mientras que las concentraciones de FSH son más bajas, pero con unos pulsos de mayor duración que los de LH y con la constante secreción de inhibina a nivel testicular. Las células de Leydig poseen receptores de membrana para LH, y sintetizan y secretan testosterona antes de 30 minutos luego de la liberación de LH. Esta secreción de testosterona es corta, con una duración de entre 20 y 30 minutos (Lozano, 2009).

2.3. Ciclo de vida reproductivo

2.3.1. Pubertad

El comienzo de la pubertad en los toros fue definido como el momento en que un toro es capaz de producir un eyaculado con por lo menos 50 millones de espermatozoides con al menos 10% de motilidad progresiva. Los toros pertenecientes a razas europeas alcanzan la pubertad dentro de un rango de edad aproximado de entre las 37 a 50 semanas de edad, siendo primero en las razas de tipo lechero que en las razas para carne. A pesar de que la circunferencia escrotal en la pubertad varía entre las razas, la circunferencia escrotal del toro de 28 cm es a menudo utilizada como parámetro o edad de la pubertad. Sin embargo,

la cantidad de semen y calidad aumentan por algún tiempo después de la edad de pubertad (González, 2018).

La espermatogénesis se inicia con la división de células fetales germinales para la producción de espermatogonias, las cuales posteriormente van a dar lugar a distintos tipos de células. El lumen de los túbulos seminíferos se establece aproximadamente entre los 5 y 8 meses de edad del ternero. Ocurre una especie de pico de producción de FSH en esta época, lo cual da lugar a una alta proliferación de células de Sertoli, elongación de los túbulos seminíferos, al igual que incremento en el diámetro de los mismos.

Cuando la mayoría de estas células diferenciadas aparecen por primera vez en el lumen del túbulo seminífero, se alcanza la pubertad. En las células germinales en desarrollo existen puentes intercelulares que intercomunican los citoplasmas de estas células, permitiendo que todo un grupo en desarrollo se encuentre interconectado. Los eventos que ocurren durante la espermatogénesis son la espermatocitogénesis y la espermatogénesis (Lozano, 2009).

Es difícil predecir el peso que éste alcanza debido a múltiples factores que influyen directamente sobre el inicio de la pubertad y que son similares a los de la hembra. Por otra parte, para que haya una espermatogénesis completa se requiere de la secreción de la hormona sexual masculina llamada testosterona, la cual hará que sean visibles los caracteres sexuales secundarios, la mucosa prepucial, manifestación de la libido y el desarrollo del pene que permitirá la eyaculación normal (Vera, 1993).

2.3.2. Fisiología del macho en la pubertad

Entre los 5 y 8 meses de edad la FSH y LH permanecen bajas y luego aumentan nuevamente junto con el comienzo de la pubertad. Se ha demostrado recientemente que mientras mayor sea el aumento de LH a los 3-5 meses de

edad, antes se producirá el comienzo de la pubertad y mayor será el tamaño de los testículos al año de edad (datos no publicados).

El crecimiento testicular es muy rápido entre los 8 y 14 meses de edad. Como regla de oro, el crecimiento testicular en toros en pruebas de performance (ROP) sería de 0,06 cm por día o 1,8 cm por mes. Sin embargo, el crecimiento testicular no es lineal, con un aumento más rápido en el tamaño de los testículos desde los 7 hasta los 12 meses de edad (0,5 -0,7 cm/día) y con un aumento más lento desde los 12 hasta los 16 meses de edad (0,3-0,5 cm/día). A los 24 meses, los testículos estarán en un 90% de su tamaño de animal maduro en toros *Bos Taurus* bien alimentados (González, 2018).

2.4. Espermatogénesis

Consiste en el conjunto de eventos que se llevan a cabo en el estroma testicular a nivel de los túbulos seminíferos, y que se inicia con la pubertad del toro, dando lugar a la producción de espermatozoides a partir de células primordiales, con base en un control de tipo endocrino, paracrino y autocrino (Lozano, 2009).

Se llama espermatogénesis a la formación, almacenamiento y posterior expulsión de los espermatozoides a partir de las espermatogonias. El proceso tiene lugar en los túbulos seminíferos del parénquima testicular.

Para la realización de la función espermatogénica se necesitan dos grupos de células diferentes: las espermatogonias (células germinativas), que son células redondas con un gran núcleo adyacente a la membrana basal, y las células de Sertoli, impropiaamente llamadas células de sostén, que son unas células grandes con prominentes prolongaciones citoplasmáticas que se extienden desde las capas donde están las espermatogonias hasta la zona central de la luz tubular (García *et al.*, 1995).

Una vez que las células entran en meiosis, el resto de las espermatogonias que permanecían en la membrana basal, comienzan de nuevo a dividirse por mitosis, manteniendo el proceso a ritmo constante. Estas nuevas células empujan hacia la luz a las células que habían comenzado a dividirse en el ciclo anterior (Dunlop, 2004).

La espermatogénesis incluye dos fases: la espermatocitogénesis, en la cual las espermatogonias sufren división celular hasta transformarse en espermatides y la espermatogénesis, en la que las espermatides sufren cambios morfológicos progresivos y se transforman en espermatozoides completamente formados (Angelino, 2009).

Las espermátidas modifican notablemente su estructura para transformarse en espermatozoides funcionales. En general, el espermatozoide es una célula pequeña y móvil que consta de una cabeza y una cola. En la cabeza, cerca de la punta, se observa el acrosoma, donde se acumulan las vesículas de Golgi que forman enzimas hidrolíticas para permitir al espermatozoide penetrar al óvulo. En la pieza intermedia se disponen las mitocondrias, que proporcionan energía suficiente al flagelo para permitir su desplazamiento hasta encontrarse con el óvulo (Toledo, 2016).

2.5. Características generales del espermatozoide

Los gametos masculinos que se forman en los túbulos seminíferos de los testículos. Son células alargadas consistentes con cabeza aplanada portadora de núcleo y de cola que es el aparato necesario para la motilidad celular (Angelino, 2009).

El espermatozoide es una célula altamente especializada y su actividad metabólica varía de acuerdo a diferentes etapas de la vida del gameto la cual está determinada por señales del medio que lo rodea con el fin de lograr la fecundación.

El espermatozoide requiere de un metabolismo energético que genere suficiente energía libre para movilidad flagelar, que ocurre de manera más eficiente en condiciones aeróbicas, principalmente por fosforilación oxidativa a nivel de las mitocondrias que se encuentran en la pieza intermedia del flagelo; sin embargo, esto no es suficiente para alcanzar la hiperactividad del movimiento flagelar durante la capacitación, por lo que la pieza principal posee toda la maquinaria enzimática para generar el trifosfato de adenosina (ATP) a partir de la glicólisis, la cual es fundamental para el proceso de fecundación (Flores, 2005).

El espermatozoide presenta dos áreas bien definidas, la cabeza y el flagelo; a nivel de la cabeza se encuentra el núcleo con la cromatina altamente condensada y el acrosoma formado a partir del aparato de Golgi, el cual está ubicado en la región apical de la cabeza y tiene forma de capucha sobre el segmento anterior del núcleo. El acrosoma determina que en la superficie cefálica existan dos regiones, la región acrosomal (RA) y postacrosomal (RP), separadas ambas por una fina banda de transición de la membrana plasmática denominada segmento ecuatorial (SE).

El flagelo presenta el axonema que está constituido por dos pares de microtúbulos centrales y 9 pares periféricos, estos últimos asociados a la dineína (proteína contráctil) con actividad ATPasa que convierte la energía química en energía mecánica. El flagelo morfológicamente se divide en 4 partes: la pieza de conexión (PC), la pieza intermedia (PI), la pieza principal (PP) y la pieza terminal (PT) (Flores, 2005).

Un espermatozoide normal en diferentes especies animales como conejo, cerdo y borrego suele tener una apariencia simétrica con cabeza oval de contorno regular y que al teñirlo se observan zonas bien definidas como: zona acrosómica que cubre más de la tercera parte de la cabeza y la sub acrosómica que cubre el resto de la cabeza. La cabeza tiene una longitud de 3 a 8 micrómetros (μm) y ancho entre 2 a 4 μm . 10 La pieza intermedia es recta y de contorno regular. Se

halla alineada con el eje longitudinal de la cabeza y mide de 7 a 8 μm de longitud. La cola es única, delgada, no enrollada y de contorno irregular, tiene una longitud de 45 a 60 μm (Avalos *et al.*, 2018).

2.6. Composición del semen

La mayor parte del líquido en semen se compone de secreciones de los órganos reproductivos masculinos. El semen contiene el ácido cítrico, los aminoácidos libres, la fructosa, las enzimas, phosphorylcholine, la prostaglandina, el potasio, y el zinc (Mandal, 2019).

46-80% del líquido es producido por las vesículas seminales.

13-33% por el casquillo de los prensaestopas de próstata.

5% de los testículos y del epidídimo.

2-5% de los casquillos de los prensaestopas bulbo uretrales y uretrales.

2.7. Metabolismo Espermático

En los espermatozoides de mamíferos es necesario que se presenten tres procesos fisiológicos para que obtengan la capacidad fertilizante, estos son: maduración epididimaria, capacitación y reacción acrosomal. La maduración del espermatozoide se adquiere durante su tránsito por el epidídimo. Una vez que los espermatozoides son transportados en el epidídimo y transitan a través de la cabeza, cuerpo hasta llegar a la cola del epidídimo, se consideran igualmente maduros que los eyaculados y son potencialmente fértiles. La capacitación y reacción acrosomal ocurren después de que el espermatozoide ha sido eyaculado dentro del aparato reproductor de la hembra y es transportado hacia el oviducto. Sin embargo, a diferencia de los espermatozoides de eyaculado, los espermatozoides de epidídimo no tienen componentes adquiridos del plasma seminal que pudieran modificar las características estructurales de la membrana plasmática (Yanagimachi, 1994).

Estas diferencias confieren cierta ventaja, en cuanto al tiempo necesario para alcanzar la capacitación, a los espermatozoides de cola de epidídimo sobre los espermatozoides de eyaculado. Dicha ventaja prosigue durante la reacción acrosomal (García *et al.*, 2001).

2.7.1. Maduración

En esta fase hay porciones del manguito que migran hacia la cola y comienzan a desaparecer, mientras que el resto va a formar la capa posnuclear. Las mitocondrias son ensambladas rápidamente en forma helicoidal alrededor del flagelo en la región posterior del núcleo para formar la pieza media. Alrededor del axonema se forma una vaina fibrosa junto a unas fibras gruesas, las cuales se asocian con los nueve pares de túbulos del axonema y se continúan con las que se encuentran a nivel del cuello. Las células de Sertoli forman la membrana citoplasmática restante luego del alargamiento de la espermátida (Lozano, 2009).

2.7.2. Capacitación

La capacitación espermática es un proceso que le acontece al gameto cuando este es depositado en la vagina o en el cérvix dependiendo de la especie de mamífero que se trate y es transportado a través del útero y oviducto. Durante este proceso, los espermatozoides pasan de un ambiente en el cual estaban inmersos en plasma seminal, compuesto por diferentes sustancias como glucosa, colesterol, triglicéridos, albumina, calcio y otros compuestos más, para ahora pasar al moco uterino, el cual entre sus diversos compuestos se encuentra, el calcio y albumina. Una vez que se da la sustitución de plasma seminal a moco uterino, la membrana de los espermatozoides comienza a tener cambios en sus componentes estructurales entre los que se encuentra la salida de colesterol, facilitada por las concentraciones de albumina del moco uterino y hace más flexible la membrana plasmática (Yanagimachi, 1994; Gadella *et al.*, 1999), lo que permite la pérdida de la asimetría fosfolipídica al aumentar la concentración de

fosfatidilserina expuesta en la cara externa de la membrana plasmática del espermatozoide que favorece la fusión de la membrana plasmática con la membrana acrosomal externa (Avalos *et al.*, 2004), otros cambios que se presentan son, la eliminación gradual o alteración de glicoproteínas, cambios en la distribución y composición de los fosfolípidos, así como cambios en el metabolismo espermático y movilización de calcio intracelular. Otro cambio muy marcado en los espermatozoides que han adquirido la capacitación es el aumento de la movilidad flagelar conocido como hipermovilidad. Existen diversas sustancias involucradas en la inducción de la capacitación espermática, entre las que se encuentran iones, como calcio, sodio, cloro, potasio, así como bicarbonato y hormonas como progesterona y estradiol.

2.7.3. Reacción acrosomal

Una vez que los espermatozoides han pasado por el proceso de capacitación, estos son susceptibles a que, si entran en contacto con progesterona y/o zona pelúcida, estas sustancias desencadenan que la membrana plasmática se fusiona con la membrana acrosomal externa, seguida de la formación de vesículas, lo que produce la formación de agujeros que facilitan la salida del contenido acrosomal. Las enzimas que son liberadas por el acrosoma permiten la degradación de la zona pelúcida y la penetración del espermatozoide hacia el citosol del ovocito fertilizándolo. La reacción acrosomal puede inducirse *in vitro* con zona pelúcida, progesterona, estradiol, así como con ionóforos como el A-23187 (Avalos *et al.*, 2004).

2.8. Métodos de extracción y recolección

El método ideal para la obtención de muestras espermáticas no debe implicar riesgos físicos para los animales vivos, ni para el personal encargado de realizar la recolección del eyaculado. Además, el semen obtenido debe tener una composición química y física normal (Watson, 1979). Los métodos de recolección

de eyaculados en animales son aquellos en los que se recurre al entrenamiento de los machos para poder obtener semen de forma rutinaria mediante el empleo de una vagina artificial. En animales no acostumbrados al manejo humano es necesario recurrir a la obtención de semen mediante técnicas de electroeyaculación bajo anestesia general. Esta técnica es segura, con riesgos mínimos, y se ha empleado ya en muchas especies animales (Holt, 2001). La recolección de semen con cualquier tipo de técnica permite conservar un elevado número de muestras para su utilización en fresco o siendo criopreservadas.

La preparación del animal antes de la colecta ejerce efecto importante sobre la cantidad y calidad del semen. Dentro de los pasos a seguir están los siguientes:

- Debe estimularse la micción mediante masajes de la zona del prepucio.
- Debe lavarse el prepucio con agua (idealmente con manguera) y secar muy bien la piel y mucosas con toallas de papel.
- Debe cortarse solo el exceso de vellosidades púbicas y muy contaminadas del prepucio, ya que los pelos del prepucio tienen una función protectora de la mucosa (Escamilla, 2005).

2.8.1. Electroeyaculador

La recolección de semen con electroeyaculador produce un volumen y concentración menor, este tiene ventajas cuando se trabaja con toros que no están acostumbrados al manejo, cuando son muchos sementales o bien, cuando estos presentan defectos físicos no hereditarios sobre todo en las patas, lo que les impide efectuar una monta natural y dificultan la colección de semen con vagina artificial, este método consiste en provocar la eyaculación por medio de estímulos eléctricos de menor a mayor intensidad, el aparato contiene un electrodo que se introduce en el recto y un transformador que manda la corriente eléctrica (Instituto Nacional de Capacitación del Sector Agropecuario, 1983).

El mecanismo del electroeyaculador es que da descargas eléctricas a las glándulas accesorias del aparato reproductor del macho, como son las vesículas seminales y la próstata, pero principalmente el centro eyaculatorio que se encuentra en las ramificaciones nerviosas de la columna vertebral, entre las últimas vértebras lumbares y las dos primeras vértebras sacras (Mejía *et al.*, 2008).

Para aplicar los estímulos se utiliza un dispositivo rectal de forma cónica, con dimensiones para pequeños rumiantes de entre 2.2 y 2.5 cm de diámetro por 15 cm de largo. Del electroeyaculador se introducen 10 cm en el recto, previa lubricación, con los polos apuntando hacia las vesículas seminales. La intensidad en la que se han obtenido los mejores resultados se incrementa paulatinamente de 0 a 10 voltios, ya sean de corriente alterna o directa y con 160 miliamperios a 2 amperios, mientras que los ciclos cuando se utiliza corriente alterna, puede variar entre 20 y 60 ciclos/segundo.

Para provocar la electroeyaculación, una persona aplicará periodos de estimulación de entre 3 a 7 segundos, seguidos por periodos de descanso con la misma duración. Con electroeyaculadores manuales y portátiles, se aplican estímulos con un voltaje constante, pero se modifica el ritmo de la estimulación eléctrica. En cuanto se considere adecuado el volumen del semen eyaculado (No menos de medio mililitro en caprinos, ovinos y bovinos), se suspende la estimulación eléctrica para tratar de contaminar lo menos posible el semen con orina, ya que en ocasiones los machos orinan en cualquier momento antes o inmediatamente después de la eyaculación, por lo que es importante una buena coordinación entre el que estimula al macho y él que recolecta el semen. El semen contaminado con orina puede usarse, una vez diluido, para inseminar en fresco a las hembras. En caso de que se pretenda conservar el semen refrigerado o enfriado durante algunas horas, es conveniente centrifugarlo (500 g/5 min) y suspenderlos en otro medio o diluyente (Mejía *et al.*, 2008).

- La recolección se realizará con la ayuda de un electroeyaculador de 6 a 9 volts.
- El macho se puede trabajar parado sobre sus 4 extremidades como en equinos, bovinos y caprinos entre otros o decúbito lateral en algunos felinos, se limpiará la zona prepucial y se cortarán los vellos para evitar contaminación de la muestra seminal.
- Una vez realizado esto se lubrica el electrodo y se introduce por el ano para estimular las glándulas accesorias, el periodo de descargas, varía para cada especie.
- Después de lograr la eyaculación, se retira el tubo colector evitando derrames, así como contaminación.
- Una vez cerrado el tubo con el eyaculado, se lleva al laboratorio, con las características ya descritas en párrafos anteriores.

2.8.2. Masaje rectal

Para la ejecución de esta técnica se requiere de la participación de dos personas, una que efectúe el masaje rectal y otra para colectar el semen. Es necesario ubicar al toro en una manga, después de remover las heces del recto se aplica un movimiento vigoroso de ida y vuelta de la mano sobre el área de la pelvis, uretra, próstata y ampollas. Al iniciarse la pulsación del musculo uretral, el masaje debe continuar en sincronía con las pulsaciones y la otra persona debe recoger el semen en una probeta de vidrio.

Ventajas

- No requiere equipo costoso
- Evita el dolor que puede ocasionar otras técnicas

Desventajas

- Irritación de la mucosa rectal
- Falta de protrusión del pene que resulta en muestras contaminadas.
- Se necesita de una segunda persona para colectar la muestra.

- Dificulta la estimulación de machos excitados o de mal carácter
- Se requiere de un operador con mucha destreza (Brito, 2017).

2.8.3. Vagina artificial

El método más adecuado para la obtención de eyaculados en algunas especies animales como bovinos, ovinos, caprinos y équidos es la vagina artificial, cuya temperatura y presión adecuadas, imitan de mejor manera las condiciones naturales del depósito del semen en la vagina de las hembras, por esto también provee eyaculados con características normales y representativas. Inicialmente es común entrenar los machos con hembras en celo natural o sincronizado, y posteriormente y con algo de práctica puede utilizarse cualquier hembra, aún sin estar en celo o machos de temperamento dócil. Sementales con experiencia y buena libido eyaculan rápidamente en el primer o segundo intento de monta, mientras que la mayoría lo hará después de algunas montas falsas (monte y desmonte), hasta que penetren completamente en la vagina artificial (Cortes *et al.*, 1996).

Aunque existen muchos tipos de vaginas artificiales, fabricadas de manera doméstica o industrial, éstas consisten en un tubo rígido de plástico o de metal, que va desde 5 hasta 60 cm de longitud y 4.5 a 10 cm de diámetro, con una válvula metálica que permite introducir agua y aire, el diámetro y longitud de la vagina depende de la especie. Por la parte interna se introduce una funda de látex, cuyos extremos se doblan y sujetan sobre el tubo rígido, formando un espacio que es llenado con agua caliente que oscila entre 42 °C y 45 °C y aire, de tal manera que el pene entre libremente a la vagina, pero con cierta presión. Algunas personas recomiendan el lubricar el extremo de la vagina artificial por el que entra el pene, teniendo la precaución de que el lubricante no sea tóxico para los espermatozoides. Por el otro extremo de la vagina artificial y dependiendo de su longitud, se coloca directamente una copa colectora graduada o un cono colector al que se le une un tubo graduado (Mejía *et al.*, 2008).

Procedimiento para la recolección

- Se prepara la hembra en celo o maniquí en un lugar limpio y seco.
- Se acerca al semental para que reconozca a la hembra.
- Se limpia la zona genital con agua y con jabón secando perfectamente y se cortan los pelos del prepucio para evitar la contaminación del eyaculado.
- Se prepara la vagina artificial con todos los requerimientos descritos anteriormente.
- Cuando el macho monte a la hembra se desvía el pene hacia la vagina.
- Una vez obtenido el eyaculado se procede a quitar el tubo colector graduado para ser llevado al laboratorio y procesar la muestra (Avalos *et al.*, 2018).

2.9. Evaluación de la calidad espermática

Para evaluar semen resulta esencial contar con un microscopio de calidad, preferente con adaptación para contraste de fase, una platina térmica y un baño maría. En la evaluación del semen se deben tener en cuenta al menos 3 parámetros básicos. Ellos son:

- Viabilidad post-descongelación
- Morfología
- Numero de espermatozoide con motilidad (Catena *et al.*, 1999).

El análisis morfológico de los espermatozoides es uno de los principales componentes de la evaluación de las características de una muestra seminal. La valoración de la morfología del espermatozoide se basa en la relación directa que haya entre la proporción de espermatozoides anormales en el eyaculado, el tipo de defecto morfológico y su relación con la fertilidad in vivo de los toros.

Atendiendo a una clasificación estrictamente morfológica, las anomalías que puedan generarse se clasifican en anomalías en la cabeza, en el tracto

intermedio y en la cola. Según el órgano donde pueden haberse generado diferenciamos las anomalías primarias y secundarias. (Hidalgo *et al.*, 2005).

2.9.1. Análisis macroscópico

Las características macroscópicas que se evalúan de manera general en el semen de los bovinos son: olor, color y volumen. Algunos exámenes también evalúan el aspecto y la densidad macroscópica del semen (Páez *et al.*, 2014).

2.9.1.1. Volumen

Se percibe mediante observación directa del eyaculado colectado y se expresa en mililitros (ml); puede estar entre 2 ml por eyaculado en animales jóvenes y entre 4 y 12 ml en animales adultos.

2.9.1.2. Apariencia

Se percibe mediante observación directa del eyaculado colectado. El color del eyaculado depende del contenido de riboflavina, y varía de acuerdo con la concentración espermática; puede ir desde un líquido blanquecino claro hasta un líquido lechoso oscuro.

2.9.1.3. Olor

Es característico de la especie, no debe tener mal olor, si lo presenta puede ser indicativo de algún proceso infeccioso.

2.9.1.4. Circunferencia Escrotal

Se mide con una cinta métrica (testímetro) tomando la lectura en la parte más ancha del escroto, ejerciendo una leve presión para el descenso de los

testículos (Ruiz *et al.*, 2010). La circunferencia escrotal es una medida de gran importancia, para determinar la fertilidad de toros, ya que es una medida altamente correlacionada con calidad y cantidad de semen (Batista, 2011).

2.9.2. Análisis microscópico

2.9.2.1. Motilidad

Para que un espermatozoide sea capaz de fecundar a un ovocito ha de reunir una serie de requisitos, entre ellos, tener motilidad progresiva. Dicho parámetro ha sido y sigue siendo el más utilizado para valorar la calidad de un eyaculado o de una dosis seminal.

El movimiento activo de los espermatozoides es impredecible para la colonización del oviducto durante la fase de transporte espermático sostenido en el tracto genital de la hembra, y para que tenga lugar la fecundación. Además, la motilidad es una manifestación de viabilidad espermática y de integridad celular. Un eyaculado con un porcentaje bajo de espermatozoides móviles, o ausencia de motilidad, automáticamente será descartado para el procesado posterior (Muiño, 2005).

La motilidad espermática normalmente se valora de forma subjetiva, mediante la observación de una muestra de semen con un microscopio de contraste de fases y platina térmica a 37°C. En el eyaculado de los rumiantes dada su elevada concentración espermática se puede valorar la motilidad masal, definida como el movimiento de remolinos del total de espermatozoides de la muestra. Normalmente la motilidad masal se valora de forma subjetiva en una escala de 0 a 5, con una puntuación de 5 cuando se observan oleadas o remolinos con movimiento rápido y vigoroso, y de 0 cuando no se observan movimiento de ondas. Tras la dilución del eyaculado, o la descongelación de dosis de semen congelado, se estima el porcentaje de espermatozoides individuales que están en

movimiento y el tipo de movimiento que realizan (progresivo o no progresivo). Las dosis descongeladas con una motilidad progresiva inferior al 40% se descartan para la IA (Muiño, 2005).

2.10. Morfología y viabilidad del esperma

Para una interacción normal del espermatozoide del tracto genital femenino y con las envolturas del ovocito, además de tener motilidad progresiva, los espermatozoides han de ser morfológicamente normales. Cualquier anomalía que afecte a algún atributo del espermatozoide puede dificultar su migración en el tracto genital de la hembra impidiendo la unión con el ovocito.

A medida que aumenta la proporción de espermatozoides anormales en el eyaculado, desciende la capacidad fecundante del mismo. Por tanto, se ha de tener muy presente que las muestras de semen con un porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales inferior al 70% han de descartarse para la congelación. (Muiño, 2005).

Mediante este examen se identifican las anomalías que pueden afectar el potencial reproductivo del toro. Desde el punto de vista de la morfo fisiología, las anomalías que puedan generarse se clasifican en anomalías en la cabeza, en el tracto intermedio y en la cola. Clasifican las anomalías de los espermatozoides en tres grupos: primarias (aquellas que afectan la cabeza y el acrosoma del espermatozoide), secundarias (las que afectan la pieza o tracto intermedio) y terciarias (las que causan daño de la cola). Otra escala de clasificación, que va acorde al órgano donde puede haberse generado la anomalía, las clasifica en anomalías primarias y secundarias.

La evaluación morfológica se puede realizar por medio de una tinción con eosina-nigrosina o con tinta china. En la evaluación morfológica es necesario

determinar la cantidad y el tipo de anormalidades; se acepta un máximo de 30% de espermatozoides anormales (Páez, 2014).

2.11. Concentración espermática

La concentración es un parámetro importante en la evaluación espermática, ya que existe una elevada correlación significativa entre el número de espermatozoides inseminados y la fertilidad del toro. En este punto se debe señalar que existe gran variabilidad en la concentración de un eyaculado a otro, y de un toro a otro, siendo importante conocer el número de espermatozoides por eyaculado, ya que de este parámetro depende el número de hembras por inseminar.

Existen diversos métodos para medir la concentración espermática; algunos de estos métodos son: la espectrofotometría, la colorimetría, la citometría de flujo y el uso de cámaras de recuento celular, como las de Bürker, Neubauer o Thoma. En Colombia el método más utilizado es el de la cámara de Neubauer, denominado también Hemocitómetro (Páez, 2014).

2.12. Importancia de la conservación del semen bovino

El procesamiento de semen permite utilizar recursos genéticos a largo plazo. Uno de los objetivos prioritarios de la industria de la IA ha sido la predicción de la capacidad fecundante del semen comercializado; de esta forma se han sucedido a lo largo del tiempo diferentes métodos diagnósticos, desde la evaluación de la motilidad, volumen, concentración y morfología espermática de los eyaculados hasta la contratación de dosis de semen bovino congelado mediante sistemas de análisis computarizado, citometría de flujo y test de funcionalidad espermática basados en la fecundación in vitro (Muiño, 2005).

El toro, además de aportar el 50% del material genético para la generación de un nuevo ser, representa, aproximadamente, el 85% de la eficiencia del comportamiento reproductivo del hato como lo menciona Cardozo; en este sentido, debería ser evaluado de manera periódica, con el fin de determinar su aptitud reproductiva, sin embargo, esta práctica es poco tradicional en el país, y se aplica principalmente aquellos reproductores destinados a los procesos de colecta con fines de criopreservación para obtención de pajillas y a toros destinados para la venta como reproductores.

En procesos de servicio natural la relación toro-hembra está alrededor de 1/25 a 1/50, en tanto que en procesos de inseminación artificial esta relación puede llegar a ser de 1/10000 o superior, razón por la cual es fundamental realizar la evaluación de esos toros utilizados, ya que si falla una hembra, se puede perder una cría, pero si lo que se tiene es un toro con problema de fertilidad se puede llegar a perder hasta 40 crías o más por cada 100 hembras (Páez, 2014).

Otra acción por la cual es importante la conservación del semen bovino es tener pajillas de sementales de los cuales se desea conservar por varias generaciones por sus características deseables.

2.13. Diluyentes

Los diluyentes son compuestos químicos, o conjunto de sustancias que preservan la viabilidad y fertilidad del semen, a la vez que posibilitan el procesamiento de un número previamente establecido de espermatozoides, acondicionados en envases adecuados, de un tamaño conveniente para la inseminación (Curbelo, 2013).

Funciones de un diluyente:

- a) Proveer nutrientes a los espermatozoides, como fuente de energía.
- b) Proteger los espermatozoides contra los efectos dañinos de un enfriado rápido.

- c) Proveer un buffer para prevenir efectos nocivos de cambios de pH al formarse ácido láctico, resultante del metabolismo de la glucosa por los espermatozoides.
- d) Mantener una presión osmótica y un balance electrolítico adecuado.
- e) Inhibir el crecimiento bacteriano.
- f) Aumentar el volumen de semen de modo que pueda ser utilizado para múltiples inseminaciones.
- g) Proteger los espermatozoides del congelado.

2.13.1. Componentes de los diluyentes

- Agua, que se comporta como solvente de los componentes seminales y del diluyente.
- Sustancias disueltas iónicas y no iónicas, para mantener la osmolaridad y tamponar el pH del medio (generalmente citrato de sodio, Tris amino metano o glutamato monosódico).
- Sustancias orgánicas con capacidad de impedir el choque de frío (por lo general yema de huevo o leche).
- Agentes crioprotectores, como glicerina o DMSO (dimetil sulfóxido).
- Azúcares simples como fuente de energía o di- y tri-sacáridos como crioprotectores adicionados.
- Aditivos tales como enzimas que puedan mejorar la fertilidad.
- Antibióticos para el controlar el crecimiento microbiano (Curbelo, 2013).

2.13.1.1 Sustancias nutritivas (buffer)

Los Buffer se adicionan con la finalidad de neutralizar los productos de desecho del metabolismo espermático, principalmente el ácido láctico. Un diluyente debe ser isotónico al semen (tener la misma concentración de iones libres, debe tener capacidad amortiguadora para evitar cambios en el pH al neutralizar los productos del metabolismo). Un buffer común es el citrato de sodio,

aunque también se han usado otros como el tris (hidroximetil-amino-metano) con buenos resultados, proporcionando un pH adecuado (6.5-7.2) (Baca, 2019).

2.13.1.2. Sustancias crio protectoras

El agente crio protectores son los que tienen la finalidad de proteger a los espermatozoides durante la fase de cristalización debido a las bajas temperaturas, el glicerol es la sustancia más empleada debido a los resultados obtenidos. La eficiencia protectora del glicerol ha sido atribuida a su capacidad de “atrapar” el agua y ayuda a que solo se lleguen a formar pequeños cristales de hielo (Carpio, 2015).

La función de los crio protectores es la de proteger a las células de las lesiones producidas por la congelación.

Se cree que los crio protectores actúan reduciendo la cantidad de hielo presente a cualquier temperatura durante la congelación, moderando así los cambios en la concentración de solutos.

Los crio protectores incrementan la probabilidad de supervivencia celular, pero a determinadas concentraciones resultan ser tóxicos para las células, por ello, debe establecerse un equilibrio entre la mínima cantidad necesaria que provea protección celular durante el proceso de congelación-descongelación, y la máxima cantidad que no presente efectos tóxicos para las mismas (Carpio, 2015).

2.13.2. Principales diluyentes comerciales utilizados

2.13.2.1. Andromed

Diluyente sin yema de huevo para semen bovino, sus principales beneficios son:

- Sin ingredientes de origen animal

- Sin riesgo de contaminación microbiológica
- Protocolos de producción eficiente
- Altas tasas de fertilidad
- Amplio rango de aplicación
- Estándar GMP de producción Minitube

Composición

AndroMed® contiene fosfolípidos, TRIS, ácido cítrico, azúcares, antioxidantes, tampones, glicerina, agua de altísima pureza y antibióticos, de acuerdo a la Directiva de la UE 88/407 (Tilosina, Gentamicina, Espectinomicina, Lincomicina). AndroMed®, concentrado, con antibióticos GTLS, de acuerdo a la Directiva 88/407 de la UE (MINITUBE, 2018).

2.13.2.2. Optidyl

Elaborado por Cryo Vet S.A.S. Es un concentrado para diluyente con fórmula tris, yema de huevo ionizada, glicerol, antibiótico (penicilina, estreptomina, espectinomicina, lincomicina) (García, 2016).

2.13.2.3. Triladyl

Triladyl® es un concentrado estéril para la preparación de un diluyente con yema de huevo para la congelación de semen bovino en un solo paso. Triladyl® se presta también para la congelación de semen de otros rumiantes por ejemplo ovino, caprino, ciervo etc. Su contenido en antibióticos corresponde al estándar de la UE: EC norma 88/407.

Composición

- TRIS
- Ácido cítrico

- Azúcar
- Tampones
- Glicerina
- Antibióticos
- Agua de extrema pureza
- 100 ml del diluyente preparado contienen (unidades activas)
- Tilosina 5,7 miligramos (mg)
- Gentamicina 28,6 mg
- Espectinomicina 34,3 mg
- Lincomicina 17,2 mg (MINITUBE, 2012).

2.14. Procesamiento de semen bovino

2.14.1. Dilución

Se agrega al semen una cantidad igual de diluyente (fracción A) y se mantiene a 35°C con el fin de que no se vea afectada la supervivencia de los espermatozoides, de acuerdo a los resultados se procederá a hacer los cálculos de dilución para lo cual se consideran los siguientes parámetros:

- Volumen
- Concentración
- Motilidad

Para determinar el número de células vivas y a la vez determinar el número de pajillas para así definir la cantidad de diluyente necesario para cada una de las muestras a procesar (Cruz, 2014).

2.14.2. Envasado

Existen básicamente tres tipos de pajuelas: -La pajuela francesa, de 113 milímetros (mm) de largo y un volumen de 0,5 cm³ (es la más común). -La “mini pajuela”, de igual largo que la anterior, pero de 0,25 cm³ de volumen. -El “minitub”, de

origen alemán, es una pajuela de aproximadamente la mitad largo que las anteriores y un volumen de 0,25 cm³. Las pajuelas tienen un tapón de algodón y alcohol polivinílico en una punta. Luego del llenado, el otro extremo se sella con ultrasonido (si se usa la envasadora automática de Cassou) o sumergiendo el extremo de la pajuela en alcohol polivinílico (esta droga viene en polvo, y al contacto con el líquido se humedece, sellando la pajuela).

2.14.3. Congelación

Después de enfriar el semen diluido a 4-5 °C y posterior equilibración, se realiza la congelación de las pajuelas. Estas se suspenden horizontalmente en vapor de nitrógeno líquido (NL) a 4-5 cm por encima del NL durante 4-5 min, luego al llegar a los -100° C, las pajuelas son sumergidas en el nitrógeno. La velocidad de enfriamiento puede ser regulada por la distancia de las pajuelas desde el nivel de NL y el tamaño de la pajuela (0,25 o 0,50 cm³) (Leboeuf *et al.*, 2000).

2.14.4. Descongelación

Es difícil, sino imposible, separar los efectos del congelado de los del descongelado. Teóricamente, cuanto más rápido es el congelado, más rápido debe ser el descongelado. Sin embargo, el descongelado puede estar influenciado por otros eventos. Existen interrelaciones entre las tasas de congelado y descongelado y los diluyentes, así como factores como concentración de glicerol, tamaño y forma del envase del semen, composición del contenido, medio de descongelado (agua, aire, etc.), temperatura y método de descongelación. No hay una receta específica en cuanto a la mejor técnica de descongelado, sino que el técnico debe seleccionar el método más conveniente a lo expresado en el párrafo anterior, y a las condiciones particulares de cada trabajo. En términos generales, la principal norma a tener en cuenta es que el semen, desde el momento en que es retirado del termo de inseminación, no debe ser sometido a oscilación de temperatura. Dentro de los métodos de descongelado están los siguientes (sin que el orden en que se enumeren

signifique necesariamente una jerarquización de los mismos): 1) Descongelado al aire a temperatura ambiente. Este método consiste en sacar la pajuela del termo y mantenerla en el bolsillo hasta la inseminación. 2) Descongelado en agua a 40° C por 1 minuto. La pajuela se coloca en baño María a esa temperatura, y luego se traspasa a la pistola de inseminación. 3) Descongelado a 75° C por 12 segundos. 4) Descongelado en agua a 37° C (Cavestany, 1994).

2.15. Evaluación post congelación

Debido a la relación entre la calidad del material genético y la fertilidad seminal, se realiza a menudo la determinación de la calidad del semen para ser utilizado en IA (Bicudo *et al.*, 2007). Normalmente los laboratorios con el objetivo de estimar el potencial de fertilidad de una muestra de semen realizan determinadas pruebas: Motilidad espermática (%), vigor (0-5), concentración espermática (millones/ml), morfología (%) y prueba de termorresistencia (lenta o rápida) (Arruda *et al.*, 1992).

Lo que se busca es evaluar si el semen fue capaz de superar el proceso de congelación y de descongelación. Se evalúan factores intrínsecos (semen) y extrínsecos (manejo de N² líquido en termo, etc.). La evaluación post descongelación consiste en descongelar dos pajuelas de 0,5 ml o 0,25 ml en baño de agua a 36°C. A los 45 segundos se extrae una de las pajuelas y se seca con toalla de papel, debido a que el agua puede ser nociva para los espermatozoides. El contenido de la pajuela se agita hacia el extremo con tapón de algodón, en tanto que el extremo opuesto de la pajuela se corta, para liberar el semen en un tubo de ensayo pequeño, limpio y desechable, cortando la abertura pequeña que se encuentra justamente por debajo del tapón de algodón. Se coloca una gota pequeña del semen sobre el portaobjetos tibio con cubreobjetos (Curbelo, 2013).

Según Barth y Oko (1989) para evaluar semen congelado se deben tener en cuenta al menos 3 parámetros básicos:

- Viabilidad post-descongelación (% de motilidad progresiva, vigor y acrosomía)
- Morfología
- Concentración de espermatozoides con motilidad progresiva por dosis inseminante

Estas tres pruebas si bien deben hacerse inmediatamente post-descongelación, debido a que el daño de membrana puede no ser completamente expresado en este momento, se deberían hacer la evaluación conocida como prueba de termorresistencia o de incubación, donde el semen se incuba a 37°C durante 2 horas.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Localización del área de estudio

Este trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de producción animal, así como en el establo lechero de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, en Buenavista, al sur de la ciudad de Saltillo, Coahuila, la cual se ubica aproximadamente a 8 km. Al sur de la ciudad de Saltillo, en las coordenadas terrestres 25°22'44" latitud norte y 101° 00' 00" longitud oeste, a una altura de 1743 msnm, con una temperatura media anual de 17.9°C y una precipitación media anual de 303.9 mm (INEGI.<http://www.inegi.org.mx/geo/contenidos/mapadigital>).

3.2. Materiales

En campo:

- Sementales
- Tijeras
- Agua destilada
- Cinta métrica
- Protector para tubo de ensayo
- Tubo de ensayo graduado
- Toallas de papel higiénicas
- Lubricante
- Guantes para palpar
- Cono de látex
- Electroeyaculador automático (Electrojac)
- Prensa para sujetar al ganado
- Cuerda para sujetar a los toretes
- Caja de herramienta
- Microscopio

- Agitadores
- Gradilla
- Termómetro
- Baño maría
- Extensión eléctrica
- Multicontactos
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Hemocitometro
- Diluyentes
- Vehículo de transporte

En laboratorio:

- Microscopio
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Hemocitometro
- Mangueras de látex
- Gasa estéril
- Pajillas
- Matraz Erlenmeyer
- Probeta graduada
- Pipetas serológicas
- Espátula
- Baño maría
- Lámpara de luz ultravioleta
- Papel filtro
- Frascos de vidrio
- Autoclave para esterilizar material
- Papel aluminio

- Cinta
- Agujas para maquina envasadora
- Envasadora de semen automática MRS 1(I.M.V. 1980)
- Diluyentes

3.3. Sementales utilizados

Para la realización de este trabajo de investigación se hizo una selección previa de 5 toretes del establo lechero de la universidad, de raza sintética Holstein x Angus, donde se buscó que fueran lo más homogéneos uno de otro en cuanto a edad, peso, condición corporal y circunferencia escrotal.

Posterior a ello se realizó la extracción de semen de cada uno y se evaluó donde de los 5 toretes con los que se inició se seleccionaron 3 los cuales fueron identificados con los aretes de SINIGA (6888, 6880 y 6881).

Al concluir esto se tomó la decisión de utilizar solo al torete identificado con número de arete 6881, la circunferencia escrotal registrada para este animal fue de 31 cm y en cuanto a su eyaculado se reportó una motilidad espermática de 80% (semen fresco).

Los trabajos para el procesamiento del semen se realizaron en el laboratorio, para lo cual se requirieron 2 días. El semen colectado fue diluido y fraccionado en partes iguales para los 3 diluyentes en estudio, quedando así un total de 20 pajillas para cada uno.

3.4. Método de obtención de la muestra de semen

La obtención de la muestra de semen (eyaculado) se realizó a través de la técnica de electroeyaculación descrita por Morillo *et al.* (2012), Rangel (2007), Angelino (2009). Utilizando un electroeyaculador de corriente alterna que va conectado

a una batería que transmite corriente eléctrica la cual estimula los diversos segmentos de las vías urogenitales del semental.

Se inmovilizo al animal en una prensa para evitar movimientos bruscos y que el propio semental se lesionara, una vez sujeto se procedió a recortar el pelo y el vellón largo que rodea la vaina del prepucio, se lavó toda el área del prepucio con agua destilada y se secó con una toalla de papel higiénico para evitar contaminación.

Posteriormente e lubrico el electroeyaculador y se introdujo vía rectal del semental a una profundidad de 35 centímetros, procurando no lastimar la mucosa y las paredes internas del mismo.

Una vez introducido el electroeyaculador por el recto del animal se inició con los estímulos eléctricos con un intervalo de 2 segundos entre un estímulo y otro, el cual asciende gradualmente hasta 30 voltios.

Para recoger el semen se utilizó un colector, el cual estaba provisto de un embudo de hule látex, que lleva conectado un tubo de ensayo graduado y protegido con un aislante térmico para evitar que la luz solar y los cambios de temperatura puedan dañar a los espermatozoides.

3.5. Evaluación de la muestra de semen

La muestra de semen fue mantenida en condiciones adecuadas a 35-37°C con la ayuda de un baño maría, siendo cautelosos de no exponer a los espermatozoides a factores que afecten su viabilidad, como lo es: los cambios bruscos de temperatura, exposición prolongada a la luz solar, material sucio y agitación brusca.

Para determinar si era óptima la calidad, y determinar si debía ser procesado se incluyeron varios parámetros a considerar como:

- Apariencia

- Volumen
- Motilidad
- Concentración

3.5.1. Concentración

Según Hafez (1968) es muy importante la determinación exacta de la concentración, o número de espermatozoides por mililitro de semen, ya que esto es una de sus características más variables que se usan para juzgar la calidad del mismo. La concentración, cuando esta combinada con el volumen y el porcentaje de espermatozoides móviles, da el número de espermatozoides móviles por eyaculación: cantidad que determina cuantas hembras pueden ser inseminadas.

3.5.2. Volumen

Se mide directamente en el tubo colector, aunque es sabido que el volumen del eyaculado puede variar entre machos dentro de una misma especie.

3.5.3. Motilidad

La motilidad se determinó mediante el uso del microscopio y es subjetiva, ya que no existen aparatos que proporcionen una medida directa. Se determina en dos formas:

- **Movimiento masal:** se coloca una gota de semen en un portaobjetos limpio, seco y templado a 35-37°C, se cubre y se observa la onda de movimiento con el objetivo de 10x, la estimación de la motilidad de los espermatozoides se hace sobre la base del vigor o potencia de la onda, según este o no presente dicho movimiento.
- **Movimiento individual:** se deposita una gota de semen diluido con una gota de citrato de sodio al 2.9% sobre un portaobjetos limpio y templado a 35-37°C, se coloca un cubreobjetos y se observa a través del microscopio, donde se

valora el porcentaje de espermatozoides que son móviles (movimiento rectilíneo progresivo).

3.5.4. Concentración

La concentración es el número de espermatozoides por ml, esta determinación se realizó por medio de un hemocitometro o cámara de Neubauer y una pipeta para glóbulos rojos con una dilución de 1:200.

Para estimar la concentración se procedió de la siguiente manera, se montó la pipeta y la boquilla y se aspiró una muestra de semen hasta la marca de 0.5ml y se adicionó colorante de anaranjado de metilo para facilitar los conteos por la postura estática que presentaban los espermatozoides. Una vez que el semen fue mezclado perfectamente con el colorante se contactó la punta de la pipeta por debajo del cubreobjetos hasta cubrir la superficie señalada y permitiendo un reposo de dos minutos (es importante mencionar que las primeras 4 o 5 gotas se sedimenten, posteriormente se colocó el hemocitometro al microscopio con aumento de 10x, para realizar el conteo de espermatozoides, esta acción consistió en considerar el número de células presentes en los 4 cuadros extremos y uno central (de un total de 16 cuadros) de cinco cámaras del hemocitometro, de tal forma que cada lectura obtenida se multiplicó por 10 millones (factor de dilución) determinando así el número de espermatozoides por mililitro.

3.6. Preparación de los diluyentes a utilizar

La preparación de los diluyentes debe hacerse en un medio aséptico; por lo que el material utilizado en este trabajo fue esterilizado previamente.

3.6.1. Preparación del Optidyl

El diluyente Optidyl se compone de un 40 % de concentrado (diluyente Optidyl) y 60% de agua bidestilada, su preparación es sumamente fácil, dado que el concentrado Optidyl es un concentrado para diluyente con fórmula tris, yema de huevo ionizada, glicerol, antibiótico (penicilina, estreptomycin, espectinomycin, lincomycin) de conformidad con la Directiva Europea 2003/43/CE que modifica la Directiva CEE 88/407.

Los pasos para su elaboración fueron sencillos a excepción de que requiere más tiempo de equilibración en relación a los otros diluyentes utilizados, ya que se consideró un 40 % de concentrado Optidyl y 60 % de agua bidestilada para preparar el volumen requerido de diluyente (30 ml), el procedimiento de elaboración se desarrolló de la siguiente manera, se midieron 12 ml de concentrado Optidyl y 18 ml de agua bidestilada, el agua bidestilada se colocó en un matraz Erlenmeyer al igual que los 12 ml de Optidyl durante 15 minutos a una temperatura de 32-34°C, se agregó el Optidyl concentrado en el matraz Erlenmeyer que contiene el agua bidestilada, se homogenizó la solución para su posterior empleo.

Como recomendación planteada por el laboratorio Cryo vet S.A.S., el medio debe usarse dentro de las 6 horas posteriores a su preparación con el fin de reducir los riesgos de contaminación bacteriana o fúngica del medio.

Cuadro 1. Componentes y proporciones utilizadas en diluyente Optidyl

| Componente | Proporción |
|------------------------|-------------------|
| Concentrado Optidyl | 12 ml |
| Agua bidestilada | 18 ml |
| Tris | ----- |
| Yema de huevo ionizada | ----- |
| Glicerol | ----- |
| Penicilina | ----- |
| Estreptomycin | ----- |
| Espectinomycin | ----- |
| Lincomycin | ----- |

*No se encontraron datos

3.6.2. Preparación del Andromed

El diluyente Andromed se compone de 1 parte de concentrado (diluyente Andromed) y 4 partes de agua bidestilada, su preparación es sumamente fácil, dado que el concentrado Andromed ya contiene fosfolípidos, ácido cítrico, antioxidantes, glicerina y antibióticos (Tilosina, Gentamicina, Espectinomomicina y Licomicina).

Los pasos para su utilización fueron muy sencillos, ya que se consideró la proporción de 1:4 (1 parte de concentrado Andromed y 4 partes de agua bidestilada) para preparar el volumen requerido de diluyente (30 ml). El procedimiento de elaboración se desarrolló de la siguiente manera, se midieron 6 ml de concentrado Andromed y 24 ml de agua bidestilada, ambas proporciones se temperaron a 35°C por medio de baño maría, para luego mezclarlas y agitarlas manualmente hasta que se homogenizó por completo para su posterior utilización.

Cuadro 2. Componentes y proporciones utilizadas en diluyente Andromed

| Componente | Proporción |
|----------------------|-------------------|
| Concentrado Andromed | 6 ml |
| Agua bidestilada | 24 ml |
| Tilosina | 5.7 mg/100 ml |
| Gentamicina | 28.6 mg/100 ml |
| Espectinomomicina | 34.3 mg/100 ml |
| Lincomicina | 17.2 mg/100 ml |

3.6.3. Preparación del Triladyl con yema de huevo

El procedimiento para la preparación del diluyente consistió en mezclar 18 ml de agua bidestilada, 6 ml de concentrado Triladyl y 6 ml de yema de huevo, esta última proporción fue establecida considerando las recomendaciones contempladas en el manual de preparación para este diluyente, dado a que, para el semen bovino se

requiere una cantidad mayor de yema de huevo, en comparación con el semen caprino. Proporcionalmente hablando, la yema de huevo representa para este caso el 20 % de la mezcla, el agua 60 % y el concentrado de Triladyl el 20 %, el componente final contiene glicerol, ácido cítrico, fructosa, tampones y antibióticos (Tilosina, Gentamicina, Espectinomicina y Lincomicina).

Los pasos para la elaboración fue el siguiente, se depositaron 6 ml de concentrado Triladyl en un vaso de precipitado, posteriormente se agregó 18 ml de agua bidestilada. Seguido de esto se casco un huevo fresco de manera cuidadosa para separar la clara de la yema, esta última porción se colocó en un papel filtro, haciéndola rodar cuidadosamente sobre el para eliminar los restos de clara y de la membrana, la yema filtrada se colocó en un vaso de precipitado y con la ayuda de una pipeta se tomaron 6 ml de yema; en seguida se agregó la yema a la solución madre (concentrado Triladyl y agua bidestilada) y se procedió al mezclado general. Es importante respetar este orden en que se agregaron los componentes, para garantizar el 100 % de las cualidades del diluyente.

La mezcla final se filtró con la ayuda de una gasa estéril, quedando listo el diluyente para su utilización.

Cuadro 3. Componentes y proporciones utilizadas en el diluyente Triladyl

| Componente | Proporción |
|----------------------|-------------------|
| Concentrado Triladyl | 6 ml |
| Agua bidestilada | 18 ml |
| Yema de huevo fresco | 6 ml |
| Tilosina | 5.7 mg/100 ml |
| Gentamicina | 28.6 mg/100 ml |
| Espectinomicina | 34.3 mg/100 ml |
| Lincomicina | 17.2 mg/100 ml |

3.7. Dilución del semen

Una vez evaluada la muestra de semen, se le agregó a este una cantidad igual de diluyente y se mantuvo a una temperatura de 35°C con la finalidad de que no se viera afectada la supervivencia de los espermatozoides y que tampoco se presente un declive en el poder de fertilización. De acuerdo a los resultados se procedió a realizar los cálculos de dilución, para lo cual, se tomaron a consideración los siguientes parámetros: volumen, concentración y motilidad para determinar el número de células vivas y por ende el número de pajillas, lo cual permite definir la cantidad de diluyente a utilizar.

3.7.1. Cálculo de dilución

Los cálculos de dilución se realizaron de la siguiente manera. Para la determinación de células vivas se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Células vivas} = (\text{VOLUMEN}) \times (\text{CONCENTRACION}) \times (\% \text{DE MOTILIDAD})$$

La determinación del número de pajillas se obtuvo de la siguiente manera:

$$\# \text{ De pajillas} = \# \text{ de células vivas} / \text{millones de espermatozoides deseados por dosis}$$

La determinación de la cantidad de diluyente necesario para el procedimiento de semen se utilizó la siguiente fórmula.

$$\text{Cantidad de diluyente} = (\text{número de pajillas}) \times (0.5 \text{ ml})$$

Donde:

0.5= volumen de la pajilla en ml.

Los medios nutritivos probados en este trabajo de investigación son los siguientes:

- Optidyl
- Andromed
- Triladyl con yema de huevo

3.8. Gliceralización y equilibración

Una vez realizado los cálculos de dilución se procedió a realizar la mezcla de semen diluyente de la siguiente forma.

Para los diluyentes Andromed, Triladyl y Optidyl solo se procedió a darles el tiempo de equilibración (de dos a tres horas), esto debido a que los 3 diluyentes ya contienen glicerol en su composición, por lo que no fue necesario agregarles.

3.9. Envasado de semen

Posteriormente al tiempo de equilibración se procedió a envasar el semen diluido en pajillas francesas de 0.5 ml; con ayuda de la maquina automática envasadora de semen "MRS 1 (I.M.V.1980), es importante señalar que para la manipulación del semen fue necesario mantener la maquina empajilladora a una temperatura constante de 5°C. De la misma manera el material utilizado para este procedimiento debió mantenerse a esta temperatura (5°C) y estar previamente esterilizado.

3.10. Congelamiento y almacenamiento de pajillas

Una vez envasado el semen, se expusieron las pajillas al vapor de nitrógeno líquido (-80°C) durante un tiempo de 9 minutos, posteriormente fueron almacenados en el termo haciendo contacto con el nitrógeno líquido a una temperatura de -196°C, todas las pajillas fueron previamente identificadas y colocadas en bastones dentro de las canastillas del termo.

3.11. Evaluación post-descongelación

La evaluación post-descongelación para cada diluyente utilizado en este estudio se realizó obteniendo un total de 18 pajillas descongeladas por diluyente.

Se procedió a descongelar pajillas en agua destilada a una temperatura de 35°C durante un lapso de 30 segundos, enseguida se observaron las muestras de semen procesado al microscopio y así se determinaba el porcentaje de motilidad recuperada des espermatozoide en la post-descongelación y de esta manera se evaluó el efecto de cada uno de los diluyentes empleados.

3.12. Diseño experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar. Con la ayuda del programa estadístico de la Universidad Autónoma de Nuevo León de la facultad de agronomía de Olivares (1994).

Con el objetivo de saber cuál o cuáles de los diluyentes son iguales o diferentes en su comportamiento, se procedió a realizar una prueba de medias aplicando la prueba de Tukey al 95% de confianza ($p \geq 0.05$). Dado que esta prueba es una de las utilizadas debido a su alto grado de confiabilidad.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El proceso de criopreservación de semen conduce a una pérdida de aproximadamente el 50% de los mismos, es por tal motivo que los protocolos de congelación deben ser realizados de acuerdo a la especie doméstica.

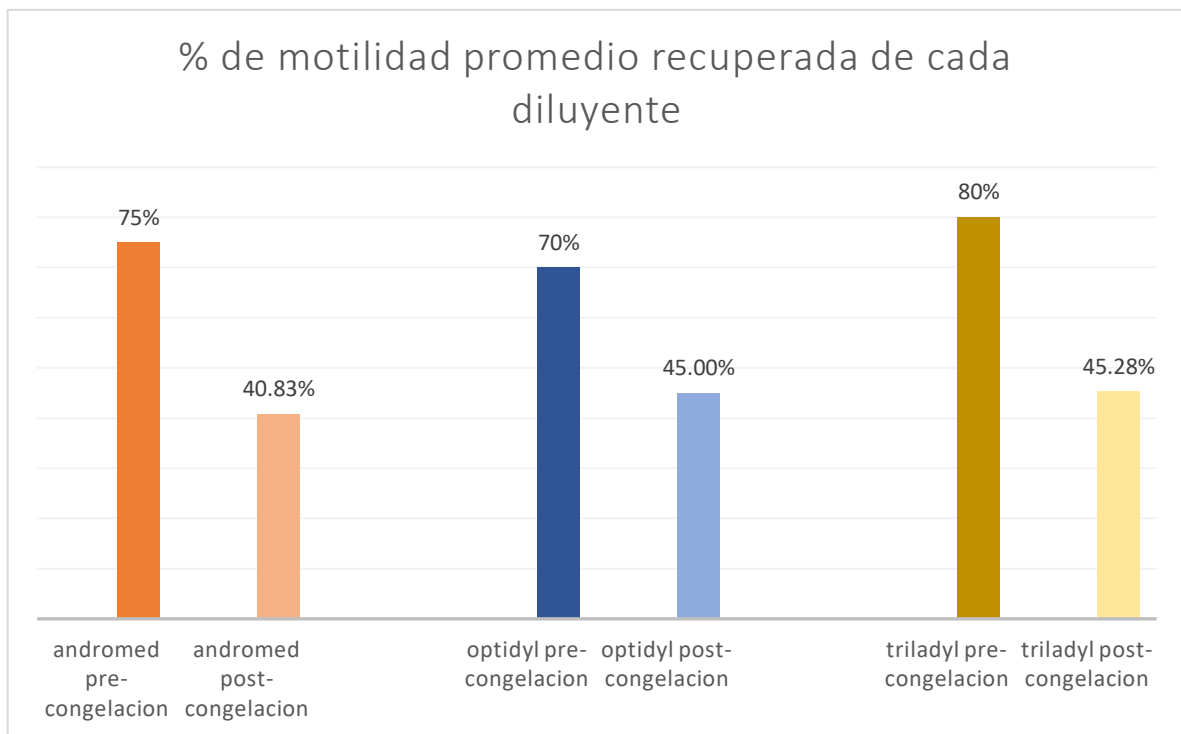
Los resultados obtenidos en la primera fase de pre-congelación permitirán conocer la diferencia en porcentajes de la recuperación de motilidad espermática con respecto a la segunda fase de post-congelación de cada uno de los diluyentes empleados en este trabajo.

Aclarando que en la primera fase el semen se encontraba ya con los diluyentes utilizados y se encontraba estandarizado y atemperado a 5°C dentro de la maquina envasadora de semen MRS 1 (I.M.V. 1980).

Así mismo los resultados de la evaluación en la fase de post-descongelación, aunado a la menor diferencia entre porcentajes de motilidad conservada en las dos fases (pre y post), así como el porcentaje de motilidad espermática del semen fresco, indicaran la o las respuestas del comportamiento de los diluyentes, por lo que el mejor diluyente será aquel que presente el mayor porcentaje de motilidad espermática en la fase de la post-descongelación y la menor diferencia entre la motilidad observada en el semen fresco y en las dos fases (pre y post-descongelación), ya que esto podría mostrar el grado de adaptabilidad de los espermatozoides a los diferentes diluyentes.

Como se mencionó previamente, la respuesta del porcentaje de recuperación de motilidad espermática se midió en dos momentos, uno en la fase de pre-congelación y el otro en la post-descongelación. Los resultados de las mediciones en la primera fase muestran que el diluyente Andromed obtuvo una recuperación de motilidad espermática del 75%, el Optidyl del 70% y el Triladyl del 80%, mientras que, al realizar la medición en la fase de post-descongelación, se obtuvieron los siguientes

resultados: 40.83% el Andromed, 45% el Optidyl y 45.28% el Triladyl, con estos resultados se observa que la respuesta al porcentaje de recuperación espermática de los diluyentes Optidyl y el Triladyl es prácticamente igual, mientras que al compararlos con la respuesta del Andromed se aprecia una diferencia significativa quedando este último diluyente con la respuesta más baja de los tres (Grafica 1).



Grafica 1. Porcentaje de motilidad promedio recuperada de cada diluyente.

De acuerdo a los resultados presentados en la gráfica anterior y en base a los criterios previamente establecidos donde se determinó que el mejor diluyente sería aquel que presentara el mayor porcentaje de motilidad espermática en la fase de la post-descongelación aunado a la menor diferencia entre porcentajes de motilidad observada en las dos fases (pre y post), así como el porcentaje de motilidad espermática del semen fresco, sugiere que, el diluyente Triladyl presentó un mejor comportamiento de recuperación de motilidad espermática con relación a los diluyentes Andromed y Optidyl, esto de acuerdo al comportamiento numérico y

tendencial de los resultados entre diluyentes, sin embargo, estadísticamente el Optidyl y el Triladyl tuvieron un efecto prácticamente igual, mientras que andromed queda con la respuesta más baja de los tres .

Cuadro 4. Diferencias entre el porcentaje de motilidad espermática recuperada de las fases de pre y post-congelación referente al proceso de motilidad del semen en fresco.

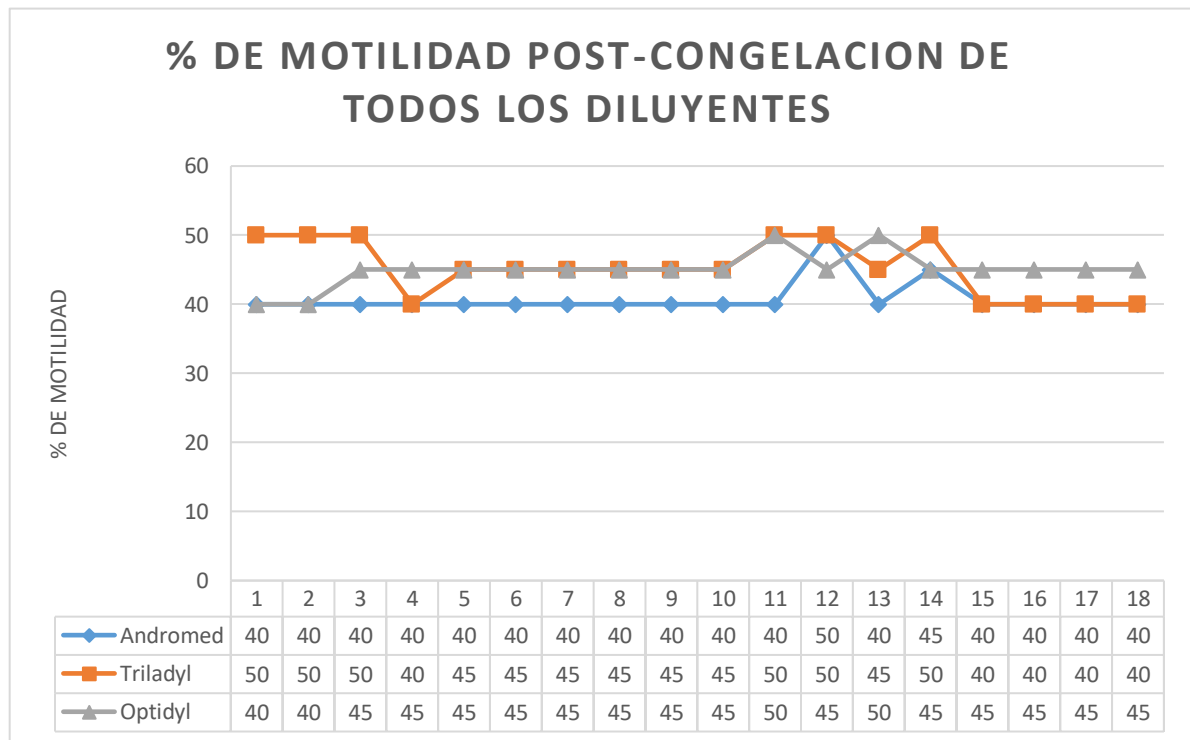
| Motilidad de semen fresco (%) | Diluyente | Motilidad pre-congelación (%) | Motilidad post-congelación (%) Media | Diferencia de motilidad en fresco vs pre-congelación (%) | Diferencia de motilidad pre vs post (%) | Diferencia de motilidad en fresco vs post (%) |
|-------------------------------|-----------|-------------------------------|--------------------------------------|--|---|---|
| 80 | Andromed | 75 | 40.83 | 5 | 34.17 | 39.17 |
| 80 | Optidyl | 70 | 45 | 10 | 25 | 35.00 |
| 80 | Triladyl | 80 | 45.28 | 0 | 34.72 | 34.72 |

Con los datos obtenidos en el presente trabajo de investigación se encontró, aunque no estadísticamente pero si en diferencia numérica y tendencial, una mejor respuesta en el diluyente Triladyl con respecto al Andromed y Optidyl en las dos fases evaluadas (pre y post-congelación), esto puede deberse a la composición y contenido de antibióticos en el diluyente; adicional a ello en la preparación del Triladyl dado a que se adiciona yema de huevo de gallina y el efecto que este tiene es que la yema

protege a las células espermáticas frente al shock por los cambios de temperatura, causa principal de la muerte espermática. Este efecto ha sido evaluado por Marín (2014) en su trabajo de grado de maestría, donde evaluó la comparación del efecto de la yema de huevo de codorniz, pata y gallina sobre las variables espermáticas de toros antes y después del proceso de criopreservación.

Ramónez (2013), en su tesis de maestría obtuvo el resultado más alto de espermatozoides vivos se presentó en el diluyente Triladyl con una media de recuperación espermática del 51.80% en comparación a los diluyentes Trehalosa (33,85%) y Sacarosa (31,85%).

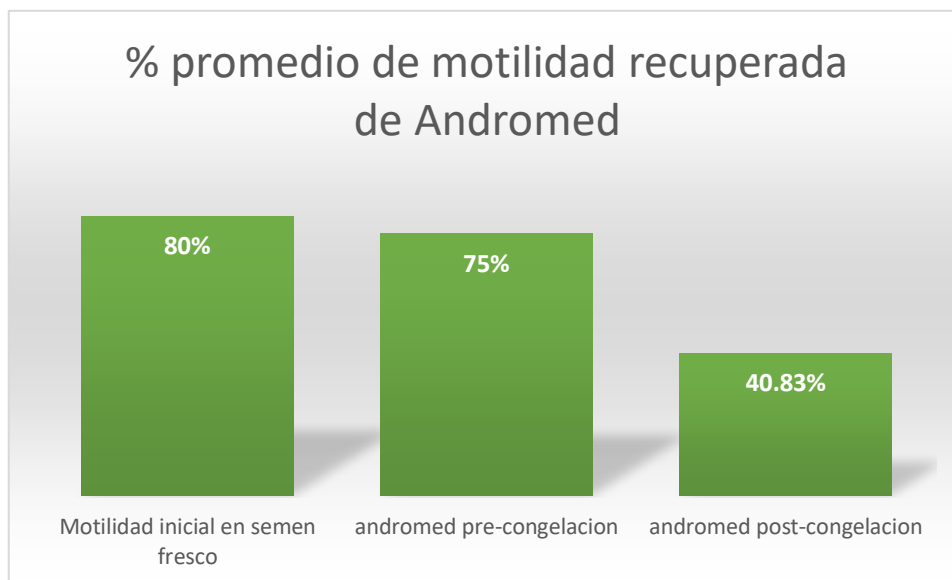
Por su parte Cruz (2014), en su tesis de licenciatura obtuvo resultados favorables con el Triladyl donde obtuvo una recuperación espermática de semen bovino del 40% en comparación al Tris y Citrato de sodio.



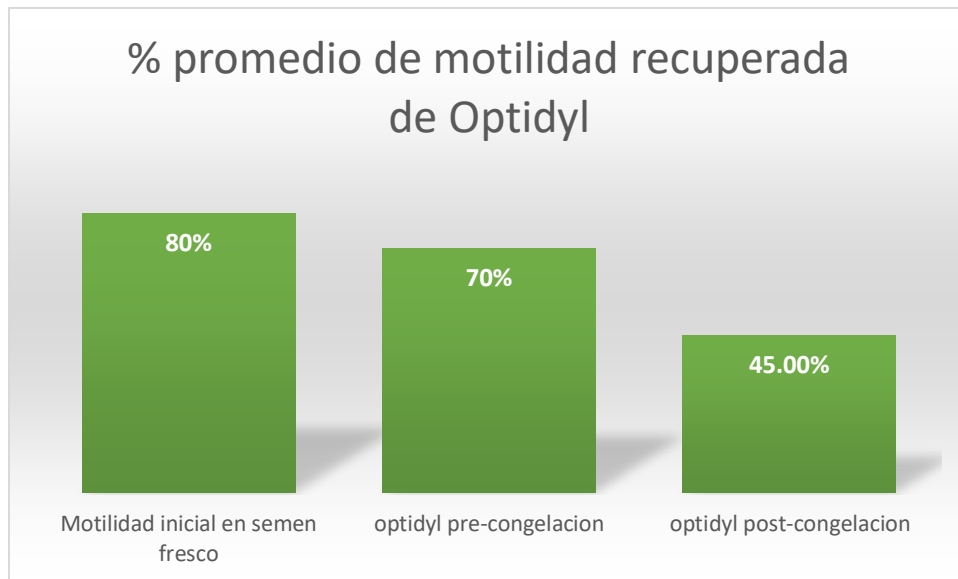
Grafica 2. Porcentaje de motilidad post-congelación de cada uno de los diluyentes en el total de las pajillas evaluadas

En la gráfica anterior (Grafica 2), se puede observar el comportamiento que mostraron los tres diluyentes en torno a los porcentajes de recuperación de motilidad espermática en la fase de post-congelación empleando cada una de sus respectivas muestras.

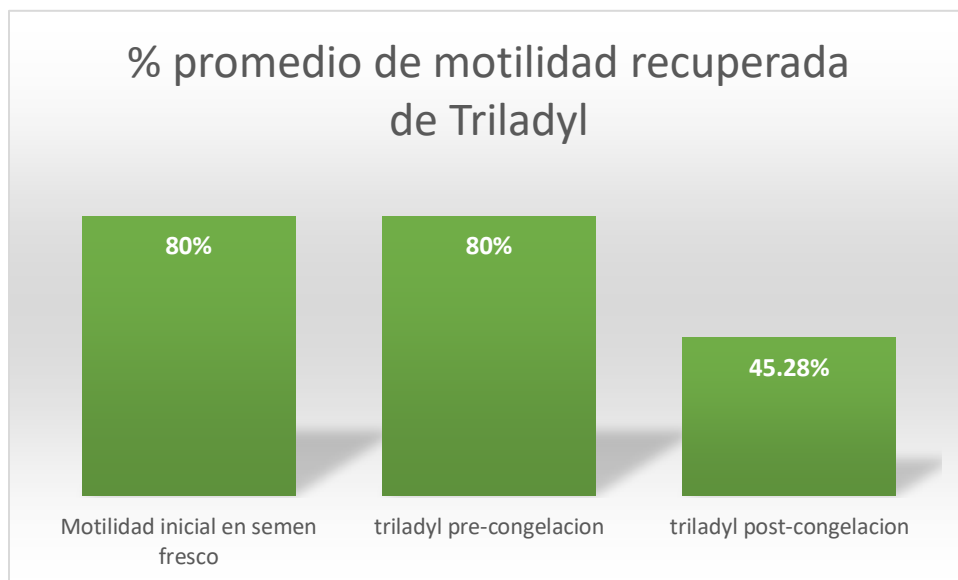
En las siguientes graficas (Grafica 3, Grafica 4 y Grafica 5) se observa el comportamiento de cada uno de los diluyentes usados en este trabajo de investigación con respecto al porcentaje de recuperación espermática que presentó cada uno en las fases de pre-congelación y post-congelación.



Grafica 3. Porcentaje promedio de motilidad recuperada del diluyente Andromed.



Grafica 4. Porcentaje promedio de motilidad recuperada del diluyente Optidyl.



Grafica 5. Porcentaje promedio de motilidad recuperada del diluyente Triladyl.

V. CONCLUSIONES

Al emplear los diluyentes Optidyl, Triladyl y Andromed como medio de criopreservación espermática en semen bovino se observa que el ultimo en mención queda por debajo de los dos primeros con prácticamente 5 puntos porcentuales, mientras que los dos primeros mostraron un efecto muy similar y en un rango porcentual muy recomendable, por lo que de acuerdo a los resultados de este estudio podría decirse que los diluyentes Optidyl y Triladyl son los más recomendables para su uso en los fines ya mencionados.

Aunque numérica y tendencialmente el Triladyl ofreció una mejor respuesta en el porcentaje de recuperación de motilidad espermática, pero no así estadísticamente se recomienda realizar otros estudios comparativos principalmente entre los diluyentes Triladyl y Optidyl.

VI. RESUMEN

El conocimiento de la fertilidad o de la capacidad fecundante de cada toro es uno de los principales objetivos en la producción de semen bovino. Un requisito indispensable para el desarrollo de la inseminación artificial es que el semen utilizado mantenga su capacidad de fertilidad después de haber sido criopreservado (Hidalgo *et al.*, 2005).

La importancia que tienen los diluyentes en la criopreservación del semen bovino, es que ayudan a extender la vida de las células espermáticas, ya que son sustancias nutritivas que intervienen en su mantenimiento y preservación.

Para este trabajo se utilizaron tres diluyentes de semen bovino (Triladyl, Andromed y Optidyl) como medio de criopresevacion, donde se evaluó el porcentaje de recuperación de motilidad espermática en la pre y post-descongelación, con la finalidad de determinar el grado de efecto sobre la conservación del semen bovino.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes, Triladyl 45.28%, Optidyl 45.00% y Andromed 40.83%. Existe una diferencia significativa del Triladyl y Optidyl con respecto al Andromed. Sin embargo, numérica y tendencialmente el Triladyl ofreció una mejor respuesta en el porcentaje de recuperación de motilidad espermática.

Aun así, sería recomendable realizar otros estudios comparativos para tratar de corroborar los resultados.

Palabras clave:

Diluyente seminal, motilidad, criopreservación, inseminación artificial.

VII. LITERATURA CITADA

- Arruda, R.P.;** Barnabe, V.H.; Alencar, M.M.; Barnabe, R.C. (1992) Avaliação de sêmen congelado de bovinos. Provas lenta e rápida de termoresistência: efeitos sobre a fertilidade. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 29(1):131- 137.
- Avalos, A.,** Vargas, A., González, J. & Herrera, J. (2018). Recolección y manipulación seminal in vitro. México: UAM.
- Avalos-Rodríguez A,** Ortiz-Muñiz AR, Ortega-Camarillo C, Vergara-Onofre M, Rosado-García A, Rosales-Torres am. 2004. Fluorometric study of rabbit sperm head membrane phospholipid asymmetry during capacitation and acrosome reaction using Annexin-V fitc. *Arch Androl.* 2004 Jul-Aug; 50(4):273-85.
- Baca, D.** (2019). Procesamiento de semen bovino (Monografía). Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad laguna, Torreón, Coahuila, México.
- Barth, A.D.;** Oko, R.J. (1989) *Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa.* Ames, IA, Iowa State University Press. 285p.
- Batista, J.** (2011). Relación y correlación existente entre la circunferencia escrotal, pero corporal y edad, en toros Brahmán de 18 a 60 meses de edad en la provincia de Chiriquí. *Revista electrónica de veterinaria,* 12(1), 1-9 Pp.
- Bicudo, S.D.;** Azevedo, H.C.; Maia, S.M.; Green, R.E.; Rodello, L.; Meira, C. (2007) Avanços na criopreservação do semen ovino visando sua aplicação em programas de inseminação artificial e em biotecnologias com embriões. *Acta Scientiae Veterinariae* 35(3):787-798.

- Brito, D., & Reinoso, N. (2017).** Evaluación cuali-cuantitativa de semen colectado con electroeyaculador (EE) de toros tratados con y sin tranquilizante. Tesis de licenciatura, Cuenca Ecuador: Universidad de Cuenca.
- Carpio, S. (2015).** Evaluación de dos diluyentes para la crio conservación de semen bovino vs Leche descremada. (Tesis de licenciatura). Universidad Politécnica Salesiana, sede Cuenca, Ecuador.
- Catena, M., & Cabodevila, J. (1999).** Evaluación de semen bovino congelado. Obtenido de sitio argentino de producción animal: www.produccion-animal.com.ar
- Cavestany, D. (1994)** Procesamiento y Congelación de Semen de Toro. Montevideo. Santa Catalina 23p.
- Cortes S., Santiago-Moreno J., González-Bulnes A., 1996.** Recogida De semen de muflón (*Ovis gmelini musimon*) mediante vagina artificial. Trofeo 1317, 34-36.
- Cruz, D. (2014).** Estudio comparativo de 3 diluyentes (Tris, Citrato de sodio y Triladyl) en el procesamiento de semen bovino. (Tesis de licenciatura). Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila, México.
- Cunningham, j. (2003).** Fisiología veterinaria (3ed). Madrid, España: Graficas Muriel, S.A.
- Curbelo, M & Rodríguez, Z. (2013).** Relevamiento de laboratorios de procesamiento de semen bovino en Uruguay. (Tesis de Doctorado). Universidad de la Republica, Montevideo, Uruguay.

- Escamilla, A.** (noviembre de 2005). Aplicación de clorhidrato de xilacina (.05 mg/kg) en toros como facilitador de la colecta de semen con el método de electroeyaculador (tesis de licenciatura). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Flores, C & Vilanova, L.** (Julio 2015). Metabolismo espermático. Gaceta de Ciencias Veterinarias, Vol. 20 N° 1, pp 23-32.
- García, A., Castejón, f., De la cruz, L., González, J., Murillo, M., & Salido, G.** (1995). Fisiología Veterinaria. Madrid España: McGraw-Hill.
- García, Macedo R1, Rosales AM, Hernández-Pérez O, Chavarría me, Reyes A, Rosado A.** 2001. Effect of bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar (V-type) proton ATPases, on the capacitation of rabbit spermatozoo. Andrología. 2001 Mar; 33(2):113-21.
- García. L.** (2016). Comparación de la motilidad posdescongelación de semen de bovino crio preservado en triladyl y optidyl fresco y congelado. Veracruz - México.
- Hafez E.S.E.,** (1968). Reproducción de los animales de granja, editorial hemisferio, S.A. Filadelfia, Pensilvania E.U.A.
- Hidalgo, C, Tamargo, C & Díez, C.** (2005). Análisis del semen bovino. Tecnología Agroalimentaria, Época 2. Número 2, pp. 39-43.
- Holt, W.** 2001. Germoplasm cryopreservation in elephants and wild ungulates. In: Cryobanking the genetic resource. Wildlife conser- Recolección y manipulación seminal in vitro 55 vation for the future? Watson pf, Holt W. Eds. Taylor and Francis. 319-348 pp.

- Instituto** Nacional de Capacitación del Sector Agropecuario, (1983). Inseminación artificial en ganado bovino, segunda parte. México D.F.
- Kevin**, G. (2018). Pubertad en la ganadería bovina. 2018, de zootecnia y veterinaria es mi pasión Sitio web: https://zoovetesmipasion.com/ganaderia/reproduccion-bovina/pubertad-en-la-ganaderia-bovina/#pubertad_del_toro
- Kônig**, H., & liebich, H.-G. (2005). Anatomía de los animales domésticos (2 ed.). Buenos Aires, Bogotá, Caracas, Madrid, México, Porto alegre, Órganos genitales masculinos: editorial Medica Panamericana.
- Leboeuf**, B.; Restall, B.; Salamon, S. (2000) Production and storage of goat semen for artificial insemination. Animal Reproduction Science 62:113-141.
- Lozano**, H. (septiembre-diciembre, 2009). FACTORES QUE AFECTAN LA CALIDAD SEMINAL EN TOROS. Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, vol. 56, pp. 258-272.
- Manual**, 2012. Uso y preparación del diluyente Triladyl, de laboratorios minitube.
- Manual**, 2018. Uso y preparación del diluyente Andromed, de laboratorios minitube.
- Marín**, L. (2014). Comparación del efecto de la yema de huevo de codorniz, pata y gallina sobre las variables espermáticas de toros antes y después del proceso de criopreservación (Tesis de maestría). Universidad de la Salle, Bogotá, Colombia.
- Mejía-Villanueva** O, Ramos-Contla D, Rivera-Rebolledo J, Ordáz-López R, Palma-Irizarry M. 2008. Congelación de semen de borregos Cimarrón (*Ovis canadensis mexicana*) obtenido mediante electroeyaculación o post-mortem: 205-215. En: Sánchez AJ, Hidalgo-Mihart mg, Arriaga-Weiss sl, Contreras-Sánchez wm

(Comps). Perspectivas en Zoología Mexicana. Fondo Editorial ujat. 1ª ed. 2008. Isbn 978-968-9024-42-2.

Morillo, M., Salazar, S. y Castillo, E. 2012. Evaluación del potencial reproductivo del macho bovino. Maracay, VE, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Pp. 23-28.

Muiño-Blanco, T, Perez R, Cebrián-Perez JA. 2008. Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. *Reproduction in domestic animals*: 43 (Suppl. 4):18-31.

Muñoz, A. (2018). Estudio comparativo de tres diluyentes (Andromed, Triladyl y Citrato de sodio con yema de huevo) en la preservación de semen caprino (Tesis de licenciatura). Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila, México.

Natalia, T. (2016). Espermatogénesis y ovogénesis animal. 2017, de UACh Sitio web: <https://www.studocu.com/es-mx/document/universidad-autonoma-de-chapingo/genetica/apuntes/espermatogenesis-y-ovogenesis-animal/4248253/view>

Páez, E & Corredor, E. (2014). Evaluación de la aptitud reproductiva del toro. *Ciencia y Agricultura*, Vol. 11 - N°. 2, p.49-59.

Ramònez, J. (2013). Evaluación de dos agentes crioprotectores no permeables y un diluyente comercial (Triladyl) en la congelación de semen bovino (Tesis de maestría). Universidad de Cuenca, Cuenca, Ecuador.

Rangel P.L.E. 2007. Evaluación de la salud de sementales bovinos. Reproducción bovina, FMVZ-UNAM.

- Ruiz, B., Ruiz, H., Mendoza, P., Olivia, M., Gutiérrez, F., Rojas, R., Villalobos, A.** (2010). Caracterización reproductiva de toros *Bos Taurus* y *Bos Indicus* y sus cruzas en un sistema de monta natural y sin reposo sexual en el trópico mexicano. *Revista científica UDO agrícola*, 94-102Pp.
- Shively, M.** (1993). *Anatomía veterinaria Básica, Comparativa y clínica*. México, D.F.: El manual moderno S.A de C.V.
- Sisson, S., & Grossman, J.** (1982). *Anatomía de los animales domésticos* (5ed., vol.1). Salvat editores, s.a.
- Vera, G.** (1993). Universidad autónoma de nuevo león, centro regional de fomento agropecuario. Reproducción de ganado caprino.
- Watson, P. F.** 1979. The preservation of semen in mammals. In: *Oxford Reviews of Reproductive Biology*. Oxford University Press. 283-351 pp.
- Yanagimachi, R.** (1994). Mammalian fertilization. In *The Physiology of Reproduction*, E. Knobil and J.D. Neill, eds. (Raven Press, New York), pp. 189–317.