

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL



Evaluación de la viabilidad del semen bovino con el empleo de tres diluyentes (Optixcell 2®, Optidyl® y Citrato de sodio con Yema de huevo), sometido a condiciones de refrigeración (4 - 6°C) a través del tiempo (0, 3, 6, 12, 24 y 48 horas)

Por:

RUBÉN YÁÑEZ HERNÁNDEZ

Tesis

Presentada como requisito parcial para Obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO ZOOTECNISTA

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Junio 2022

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

Evaluación de la viabilidad del semen bovino con el empleo de tres diluyentes (Optixcell 2®, Optidyl® y Citrato de sodio con Yema de huevo), sometido a condiciones de refrigeración (4 - 6°C) a través del tiempo (0, 3, 6, 12, 24 y 48 horas)

Por:

RUBÉN YAÑEZ HERNÁNDEZ

Que somete a la consideración del H. Jurado Examinador como requisito para obtener el título de:

Ingeniero Agrónomo Zootecnista

Aprobada por:

M.C. Pedro Carrillo López

Director

Dra. Laura E. Padilla González

Codirector

Dr. Joel Ventura Rios

Codirector

Dr. José Daniel Almis

Coordinador de la división de Ciencia Animal

Buénavista, Saltillo, Coahuila, México



Junio 2022

DEDICATORIA

Quiero dedicar esto principalmente a mis padres:

Erasto Yáñez Hernández, por todo el apoyo recibido y por creer en mí, siendo uno de los motivos de tanto esfuerzo dado día con día, y gracias por enseñarme el significado de la palabra trabajo y responsabilidad y no con palabras, si no con hecho.

Ausencia Hernández Ortiz, a ti mamá por todo ese gran amor y cariño que siempre me demuestras, por enseñarme y forjarme con valores, que el día de hoy estoy muy agradecido, y por estar siempre conmigo.

Por todo muchas gracias.

A mis hermanos J. Jorge, Ramiro, Juan, y Erasto por confiar en mí y por todo ese apoyo incondicional, por esos consejos, sinceridad, y por compartir momentos juntos.

Joaquín (†) por el ánimo que me dabas de seguir con mis estudios, vives en nuestros recuerdos.

A toda mi familia en general.

AGRADECIMIENTOS

A mi “Alma Mater “la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro por el regocijo durante mi permanencia en ella.

Al M.C. Pedro Carrillo López, por permitirme y aceptarme en este nuevo proyecto de investigación, además por todo el apoyo recibido en campo con la obtención de las muestras de semen de los toros, por estar pendiente de las revisiones y redacción de este trabajo y sobre todo por su gran amistad.

A la Dra. Laura Emilia Padilla González por todo el apoyo en campo y en laboratorio para realizar las evaluaciones correspondientes, además de enseñarme como realizarlas, por las revisiones de redacción de este trabajo y por tan bonita amistad.

Al Dr. Joel Ventura Ríos en coordinación con el M.C. Fidel Maximiano Peña Ramos por el apoyo en la ejecución del análisis de los datos en el programa estadístico SAS®, y por su gran amistad.

Al M.C. Lorenzo Suarez García por el asesoramiento del analisis estadistico, permitiendome ejecutarlo a cálculos manuales.

A mis compañeros y amigos de geración CXXXII por tantos momentos juntos y ese gran compañerismo.

RESUMEN

Los más común en semen criopreservado a -196°C , son los bajos % de motilidad. Mediante la presente investigación se pretende hacer un estudio para evaluar los % de motilidad, con el empleo de diluyentes, bajo condiciones de refrigeración, como una alternativa en uso de la IA, para ello, se utilizaron 6 sementales bovinos de la raza Charoláis, a los cuales se les realizó la extracción de semen por el método de electroeyaculación y se estimó el % de motilidad espermática con el empleo de tres diluyentes (Optixcell 2®, Optidyl® y Citrato de sodio – Yema de huevo) bajo condiciones de refrigeración ($4-6^{\circ}\text{C}$), para después realizar las evaluaciones microscópicas correspondientes a través del tiempo (0, 3, 6, 12, 24 y 48 horas), evaluando las variables: efecto del diluyente sobre la motilidad, efecto del tiempo sobre la motilidad y la interacción del diluyente y tiempo sobre la motilidad. Las muestras con el semen tratado, presentaron resultados con diferencias significativas ($p < 0,05$). Las medias de los porcentajes de la motilidad espermática a través del tiempo que presentan, Optixcell 2®, Optidyl® y Citrato de sodio – Yema de huevo son 55.83%, 68.89% y 48.64% respectivamente. De acuerdo a estos resultados los mejores rangos fueron de la h 0 a al h 24, siendo el Optidyl® el que destaca, manteniendo los mejores % de motilidad.

Palabras clave: refrigeración, motilidad espermática, tiempo, diluyente.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE CUADROS	v
ÍNDICE DE GRAFICAS.....	vi
I INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivo General	3
1.2. Objetivos Específicos	3
1.3. Hipótesis	3
II REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. Anatomía del Aparato Reproductor Bovino.....	4
2.1.1 Testículos.....	4
2.1.2 Escroto.....	5
2.1.3 Epidídimo	5
2.1.4 Conducto deferente	6
2.1.5 Glándulas accesorias	6
2.1.6 Uretra.....	6
2.1.7 Pene y prepucio	7
2.2. Pubertad del bovino.....	7
2.3. Espermatogénesis del bovino.....	8
2.3.1 Mitosis	9
2.3.2 Meiosis	10
2.3.3 Espermiogénesis.....	10
2.4. Características Generales del Semen.....	11
2.4.1 Estructura del espermatozoide	11
2.4.2 La membrana plasmática	11
2.4.3 Plasma seminal.....	12
2.5. Extracción y Recolección de Semen	13
2.5.1 Método de la vagina artificial.	15
2.5.2 Método de la electroeyaculación.....	16
2.5.3 Método de masaje transrectal	17

2.5.4 Extracción testicular de espermatozoides.....	18
2.6. Evaluación Macroscópica.....	18
2.6.1 Color.....	18
2.6.2 Volumen.....	19
2.6.3 Aspecto.....	20
2.6.4 Olor.....	21
2.6.5 pH.....	21
2.7. Evaluación Microscópica.....	22
2.7.1 Motilidad espermática.....	22
2.7.2 Motilidad masal.....	23
2.7.3 Motilidad Individual.....	24
2.7.4 Vigor.....	25
2.8. Morfología Espermática.....	26
2.7.5 Malformaciones primarias y secundarias.....	27
2.9. Conservación de Semen Bovino.....	29
2.10. Refrigeración de Semen.....	30
2.10.1 Ventajas del semen refrigerado.....	32
2.10.2 Desventajas del semen refrigerado.....	33
2.11. Diluyentes.....	33
2.11.1 Funciones de un diluyente:.....	33
2.12. Componentes de los Diluyentes.....	34
2.12.1. Azucares.....	34
2.12.2. Sustancias tampón.....	34
2.12.3. Sustancias orgánicas.....	35
2.12.4. Crioprotectores.....	35
2.13. Principales Diluyentes Utilizados para Semen Bovino.....	36
2.14.1 Triladyl®.....	36
2.14.2 Citrato de Na - Yema de huevo.....	37
2.14.3 TRIS.....	37
2.14.4 Andromed®.....	38
2.14.5 Optidyl®.....	38
2.14.6 Optixcell 2®.....	39

III	MATERIALES Y MÉTODOS	41
3.1.	Localización del Área de Estudio	41
3.2.	Materiales	41
3.3.	Sementales Utilizados	43
3.4.	Método de Obtención de la Muestra de Semen	43
3.5.	Evaluación de la Muestra de Semen	45
3.5.1	Apariencia.....	45
3.5.2	Volumen	45
3.5.3	Motilidad	45
3.5.4	Morfología espermática.....	46
3.6.	Preparación de los Diluyentes.....	46
3.6.1	Preparación del Optixcell 2®.....	47
3.6.2	Preparacion del Optidyl®	47
3.6.3	Preparacion del Citrato de sodio con yema de huevo	48
3.7.	Evaluación y Dilución de la Muestra de Semen	48
3.8.	Variables a Evaluar	49
3.8.1	Motilidad	50
3.9.	Diseño Experimental	50
IV	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
4.1.	Evaluación de la Motilidad por Diluyente.....	51
4.2.	Evaluacion de la Motilidad en Tiempo	53
4.3.	Evaluacion de la Motilidad por Diluyente-Tiempo	56
V	CONCLUSIONES	58
VI	LITERATURA CITADA.....	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía y Fisiología del Tracto Reproductivo del Toro.....	7
Figura 2. Esquema de un espermatozoide.	26
Figura 3. Evaluación microscópica, anormalidades primarias y secundarias.....	29

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Escala de evaluación de volumen seminal en toros	19
Cuadro 2. Esquema del grado de concentración espermática (número de espermatozoides por mm ³)	20
Cuadro 3. Escala de evaluación de la motilidad individual de los espermatozoides.	25
Cuadro 4. Esquema de composición de los sistemas de clasificación de algunos defectos morfológicos.	28
Cuadro 5. Valores promedios de la viabilidad del semen a través del tiempo.	54

ÍNDICE DE GRAFICAS

Grafica 1. Porcentaje promedio de la motilidad con el empleo de Diluyentes.....	52
Grafica 2. Porcentaje promedio de la motilidad a traves del tiempo.	53
Grafica 3. Comportamiento de la motilidad espermática con 3 diluyentes a través del tiempo.	57

I INTRODUCCIÓN

En los últimos 30 años, la inseminación artificial ha sido realizada con uso de semen congelado en diluyente a base de yema de huevo, sin embargo, la criopreservación de las células espermáticas sigue siendo perjudicial a sus funciones, y la yema de huevo un factor de variabilidad y potencial con riesgo a la contaminación por microorganismos (Vishwanath, 2003).

La inseminación artificial (IA) es una técnica utilizada en diferentes especies. La congelación de los espermatozoides es uno de los métodos más sencillos que ha permitido ampliar el tiempo de viabilidad de los espermatozoides, ya que puede reducir su metabolismo y por lo tanto prolongar la durabilidad del semen. La criopreservación consiste en utilizar el frío extremo para disminuir las funciones vitales de una célula o un organismo y poderla mantener en condiciones de "vida suspendida" durante mucho tiempo (Díaz y López, 2018).

El éxito de la criopreservación está supeditado a factores tales como tipo de diluyente, tasa de descongelación y empaque, variación individual del reproductor, crioprotector y tasa de enfriamiento, principalmente.

Es posible realizar la IATF tanto con semen congelado (almacenado en estado de congelación en nitrógeno líquido a -196°C) como con semen refrigerado (conservado en estado líquido a bajas temperaturas, pudiendo ser entre $15-20^{\circ}\text{C}$ o $4-5^{\circ}\text{C}$) Utilizando semen refrigerado, los espermatozoides sufren menos ya que no se enfrentan al proceso de congelación-descongelación, por lo que la dosis inseminante con semen refrigerado presenta aproximadamente 10 veces menos de espermatozoides (Holt, 2000).

Por otro lado, la refrigeración del semen preserva la viabilidad espermática, garantizando mayor longevidad cuando comparado al semen in natural, y menores daños celulares cuando es comparado al semen criopreservado. La utilización del semen refrigerado en bovinos presenta como principales ventajas la optimización de toros genéticamente superiores y que poseen baja resistencia a la criopreservación del semen, ausencia de costos relacionados al almacenamiento de las muestras y mayor simplicidad en la manipulación del semen (Vishwanath, 2003).

La implementación de semen refrigerado en sistemas de IATF podría aumentar la eficiencia y la rentabilidad de la producción, disminuyendo notablemente el costo de preñez al utilizar menor número de espermatozoides por dosis y por ende, por eyaculado se podrían tener mayor cantidad de dosis y así preñar más vacas (Martínez y López s/f).

1.1. Objetivo General

Monitorear el comportamiento de la motilidad espermática a través de tiempo (0, 3, 6, 12, 24 y 48 horas), en condiciones de refrigeración (4-6°C) por efecto de la adición de tres diluyentes (Optixcell 2®, Optidyl® y Citrato de sodio con Yema de huevo).

1.2. Objetivos Específicos

Identificar el diluyente con mejor adaptación a las características propias del semen bovino para su refrigeración a través del tiempo.

Evaluar el comportamiento de la motilidad en semen refrigerado (4-6°C) con la adición de cada diluyente a través del tiempo.

1.3. Hipótesis

Ho= (Todos los diluyentes presentan igual comportamiento sobre la motilidad espermática de semen refrigerado a través del tiempo).

H1= (Al menos un diluyente presenta un comportamiento de respuesta diferente sobre la motilidad espermática de semen refrigerado a través del tiempo).

II REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Anatomía del Aparato Reproductor Bovino.

Es sumamente importante conocer la anatomía y parte de la fisiología del sistema reproductor del bovino ya que nos permite comprender, el cómo cada una de estas estructuras desempeña un papel sumamente importante y permite desarrollar las funciones que fueron destinadas, dentro de procesos importantes que tiene que suceder para cumplir con el objetivo principal de producir células reproductivas.

2.1.1 Testículos

Los testículos tienen dos funciones muy vitales: Producir los espermatozoides y producir la hormona masculina específica, testosterona. Se encuentran fuera de la cavidad corporal en el escroto. Esto es esencial para la formación normal de espermatozoides, ya que esto ocurre solo a una temperatura varios grados por debajo de la temperatura corporal normal. Sin embargo, las temperaturas muy frías pueden dañar el testículo. Este contiene muchos túbulos largos, pequeños y enrollados, los túbulos seminíferos, dentro de los cuales se forman y maduran los espermatozoides.

Dispersas por todo el tejido conectivo laxo que rodea los túbulos seminíferos hay muchas células altamente especializadas, las células intersticiales de Leydig que producen la hormona masculina (Turman y Rich, 2010).

2.1.2 Escroto

Las bolsas testiculares están constituidas por una evaginación casi simétrica de la pared abdominal; y por lo tanto existe una relación entre los planos anatómicos de la pared abdominal y las capas de la bolsa testicular. Las bolsas pueden ser pendulares con un cuello o sésiles, con una mayor base de implantación. En el toro o en el carnero, por ejemplo, son pendulares con un cuello bien marcado. Sus capas son:

Escroto: es común para los dos testículos y está formado por la piel y el dartos.

Envolturas del testículo y cordón espermático: son independientes para cada testículo y su cordón. Comprenden, de la superficie a la profundidad: fascia espermática externa, fascia cremastérica y músculo cremáster, fascia espermática interna y lámina parietal de la túnica vaginal (peritoneo) (Hafez, 2002).

2.1.3 Epidídimo

Cada epidídimo tiene un cuerpo que consiste en el conducto del epidídimo que está muy contorneado y en donde los espermatozoides son almacenados para pasar las etapas finales de su maduración, y una cola del epidídimo que se continúa con el conducto deferente que transporta el espermatozoide hacia el conducto eyaculador para su expulsión hacia la uretra. Ayuda a expulsar los espermatozoides hacia el conducto deferente durante la excitación sexual por medio de contracciones peristálticas del músculo liso de su pared. Los espermatozoides pueden permanecer almacenados y viables en el epidídimo durante meses (Palacios, 2014).

2.1.4 Conducto deferente

El conducto deferente comienza en la cola del epidídimo y termina en la uretra, en su porción prostática. Dicho conducto se encuentra conectado al epidídimo. Esta situado en la parte de afuera, y portando uno cada testículo (Hafez, 2002).

2.1.5 Glándulas accesorias

Las secreciones de estas glándulas constituyen la mayor parte de la porción líquida del semen. La glándula prostática se encuentra en el cuello de la vejiga urinaria, donde desemboca en la uretra. La próstata es relativamente pequeña en el toro, en comparación con otras especies, y produce una secreción de gran volumen (vol.), que es rica en enzimas para los espermatozoides. Y las glándulas de Cowper dan origen a la secreción clara y amortiguada que sirve para enjuagar y limpiar la uretra de cualquier residuo de orina que pueda ser dañino para los espermatozoides, además asegura un pH optimizador para el semen (Cortes, 2017).

2.1.6 Uretra

La uretra es un solo tubo que se comunica con dos conductos deferentes. Anatómicamente, la uretra es el canal que atraviesa el pene. La uretra sirve como un conducto común para el semen del tracto reproductivo y la orina del tracto urinario (Cortes, 2017).

2.1.7 Pene y prepucio

El pene es el órgano copulador (figura 1). Esponjoso es el tipo de material dentro del pene, se llena de sangre durante la excitación sexual, lo que resulta en la erección del órgano. El extremo del pene es el glande y contiene nervios ricos en nutrientes que se estimulan durante la cópula para inducir la eyaculación (Whittier, 2010).

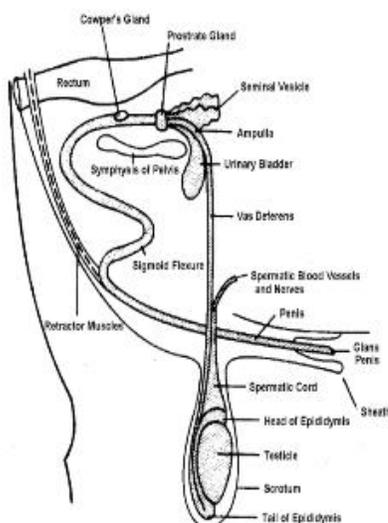


Figura 1. Anatomía y Fisiología del Tracto Reproductivo del Toro.

Fuente: (Turman y Rich, 2010).

2.2. Pubertad del bovino

La pubertad es la edad en la cual un animal pasa a ser sexualmente maduro y es precedida por un período de maduración sexual y desarrollo fisiológico. La función de las gónadas es regulada por factores locales endócrinos, a través de la hipófisis y el hipotálamo teniendo roles críticos en la actividad de las gónadas. La edad a la pubertad para toros en el trópico se encuentra entre 13 y 24 meses de edad (Espitia *et al.* 2006 ; Evans y Rawlings, 2010).

Se sabe que en los terneros se presentan distintos cambios hormonales, generalmente esto se da a los 2 meses de edad pero depende mucho de la raza llegando hasta los 10 meses. Los machos Holstein friesian ellos tardan un poco más. Los andrógenos testiculares forman parte del proceso del desarrollo testicular:

De 2 a 4 meses existe un desarrollo acelerado donde se presenta la división de gametos y se origina la espermatogonia tipo A1. De 2 a 4 meses hay un desarrollo testicular rápido y de diferentes células de espermatogénesis. De 6 a 9 meses esta muy marcada la diferenciación celular , comienzo de espermatogénesis y producción de metamorfosis (Sequeira, 2005).

2.3. Espermatogénesis del bovino

El testículo está conformado principalmente por túbulos seminíferos, donde se encuentran los espermatozoides y células espermatogoniales en diferentes períodos de proliferación y maduración. Cuando se encuentran en período de diferenciación terminal (espermatozoides) están situados cerca de la luz del túbulo, mientras que cuando las células con una menor diferenciación están ubicadas hacia la lámina basal (Sharma y Agarwal, 2011).

Para Sharma y Agarwal (2011), cada vez que las células espermatogoniales van sufriendo cambios de diferenciación, hasta el punto de poder distinguirlos en sus diferentes periodos se les ha colocado una nueva nomenclatura. Siendo de esa manera, que se inicia con espermatogonia fetal, esta pasará a ser una espermatogonia postnatal de transición (gonocitos), y posteriormente una tipo A. Las espermatogonias tipo A, tienen aun características de células madre y son las que entraran al proceso de mitosis, donde posteriormente dará origen a las espermatogonias tipo B y luego a los espermatozoides primarios, secundarios, espermátidas y espermatozoides.

Según Staub y Johnson (2018), en los bovinos la duración, o bien el ciclo de espermatogénesis es de 61 días (d), dividiéndose en tres etapas; proliferación mitótica o espermatocitogénesis que dura 21 d, meiosis con una duración de 23 d y por último la citodiferenciación o también llamada espermiogénesis con 17 d.

En la primera fase de la proliferación de espermatogonias, cuenta con tres tipos de células: las células madres, espermatogonias en proceso de diferenciación y espermatogonias en proliferación. Las primeras células son la línea base germinal para el proceso y se caracterizan por tener la capacidad de repoblar epitelio seminífero en caso de daños (Guevara, 2019).

2.3.1 Mitosis

Según Rooij y Griswold (2012), en toros la primera división celular se da con la presencia de la espermatogonia A_0 en la cual hay procesos de división y da origen a células hijas conocidas como espermatogonias A_1 , una de las células permanecerá como célula madre, en cambio la otra seguirá con el proceso de diferenciación. Esta misma célula continúa con la división mitótica dando origen a las espermatogonias A_2 .

Para formar la espermatogonia A_3 e intermedias B_1 y B_2 sucesivamente la división continua. La lamina basal del tubo seminífero es el principal sitio donde se ubican todas estas células. Es de suma importancia resaltar que las células espermatogoniales B_2 que se encuentren en un estado más avanzado en cuanto a diferenciación se dividirán dando origen a los espermátocitos preleptoténicos, duplicándose en su ADN pero sin dividirse; pasan de 30 a 60 pares de cromosomas.

2.3.2 Meiosis

Cuando los espermatoцитos primarios entran en meiosis I cuenta con 60 pares de cromosomas, entonces al presentarse esta fase ocurre una división cromosómica resultando dos células hijas, pero ahora con 30 pares de cromosomas. Ha estas células resultantes reciben el nombre de espermatoцитos secundarios. Para posteriormente estas células entren en una meiosis II, donde sufren un proceso de división y de esa manera cada una genere dos espermátidas redondas haploides (Griswold, 2016).

2.3.3 Espermiogénesis

Para Olivera *et al.* (2006), encontraron que en esta fase la espermátidas pasan por un proceso hasta convertirse en espermatozoides, pasando por cuatro fases características como son: la fase de Golgi, la de capuchón, la acrosomal y la de maduración.

En la primera fase llamada de Golgi, se acerca al núcleo, desprende vesículas que se superponen y poco a poco se unen para convertirse en la vesícula acrosomal que generalmente esta situada en la parte apical del núcleo. Posteriormente pasa a la segunda fase, la de capuchón, aquí las vesículas formadas en la fase de Golgi, ahora se aplanan, formando una verdadera capucha sobre el núcleo. En la tercera fase la espermátide gira de tal forma que el acrosoma queda en dirección de la membrana basal, en ella se depositan gránulos en el acrosoma, el citoplasma se desplaza hacia la base de la cabeza y se localiza por debajo de la unión núcleo axonema, y la morfología del espermatozoide queda definida. En la última fase, la de maduración, la cabeza del espermatozoide toma la forma característica de cada especie y finalmente los espermatozoides son liberados a la luz de los túbulos seminíferos (Olivera *et al.*, 2006).

2.4. Características Generales del Semen

2.4.1 Estructura del espermatozoide

Según Garner y Hafez (1996), los espermatozoides son células alargadas consistentes de una cabeza aplanada que contiene un núcleo y una cola que consta del aparato necesario para poder movilizarse. La célula espermática está cubierta en su totalidad por una membrana plasmática. El extremo anterior del núcleo espermático está cubierto por el acrosoma, un delgado saco membranoso de doble capa estrechamente adherido al núcleo durante las últimas etapas de la formación del espermatozoide en los testículos. También consta de un cuello que une la cabeza del espermatozoide con la cola, que también se le puede conocer como flagelo, la cual se subdivide en los segmentos medio, principal y caudal.

2.4.2 La membrana plasmática

Según García *et al.* (2011), describen a la membrana plasmática como una doble capa, que está constituida principalmente por lípidos, que recubre al espermatozoide. Cuando se presentan condiciones normales, los grupos hidrófilos (cabezas) de los fosfolípidos se asocian formando las capas interna y externa de la bicapa lipídica, mientras que las colas hidrófobas se mantienen entre ambas capas. Cuando se presenta una deshidratación, en el proceso de congelación se modifica la disposición, trayendo como consecuencia la exposición de la cola.

2.4.3 Plasma seminal

El plasma seminal consiste en una compleja mezcla de secreciones que principalmente dan origen en el epidídimo y las glándulas sexuales accesorias del macho. Este desempeña un importante rol, dando protección a los espermatozoides dentro del tracto reproductivo de la hembra. (Troedsson *et al.*, 2005).

Muiño *et al.* (2008), mencionan que el plasma seminal tiene una importante participación en la maduración final del espermatozoide a través de cambios hormonales, enzimáticos y modificación de la superficie de membrana espermática. De igual manera actúa como vehículo para los espermatozoides. Parte de la extensa variación de la calidad espermática del semen refrigerado que se observa entre machos de una misma especie puede asociarse o referirse a diferencias en la composición de su plasma seminal.

Augusto y Ozanam, (2012), mencionan en sus estudios que el plasma seminal logra varias funciones en el metabolismo espermático y el proceso de fertilización, dentro de estos se incluyen: activación de la motilidad, actividad antimicrobiana, neutralización de los metabolitos de los espermatozoides y protección contra acrosina por inhibidores de la proteasa.

El principal componente molecular del plasma seminal tiene características inherentes a cada especie y puede diferir entre los tipos y el rendimiento de las proteínas del esperma.

El plasma seminal bovino tiene la familia de proteínas denominadas BSP-A1 / -A2 y BSP-A3 (15-17 kDa), BSP-30 (28-30 kDa) (MANJUNATH, 1984) y FMP, relacionadas con la motilidad progresiva (37,5 kDa) (Töpfer *et al.*, 2005).

2.5. Extracción y Recolección de Semen

Cuando los animales alcanzan la pubertad, la producción de espermatozoides continua a lo largo de su vida reproductiva. Como se sabe durante la vida reproductiva de los sementales o machos, existen descansos por lo cual en estos periodos los espermias, mueren, se degeneran y son absorbidos en el epidídimo. Cuando se toman muestras de animales con inactividad sexual, muchas veces suele suceder, que al realizar las evaluaciones correspondientes, contenga alta mortandad y anormalidad de los mismos, es por ello que la evaluación de semen no debe realizarse con una sola colecta (Escamilla, 2005).

La obtención y extracción de semen, es el primer paso dentro de un programa de IA, esta labor resulta de gran importancia para la obtención de eyaculados de buena calidad y para la adecuada utilización de los sementales, consiguiéndose así una vida prolongada para los mismos (Garde, 1993).

Morillo *et al.* (2012), mencionan que se debe contar con un área de recolección de semen acompañado de un puesto de monta, piso sólido y anti resbalante, defensas de seguridad y un ambiente de trabajo acorde con la actividad que se realiza, evitando cualquier tipo de ruido, es sumamente importante tener el área de trabajo cerca del laboratorio donde se realizara la evaluación.

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 y Holt, 1997).

Existen una gran variedad de métodos recolección de eyaculados en animales, principalmente son aquellos en los que se recurre al entrenamiento de los machos para poder obtener muestras representativas de 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 muestras de semen mediante técnicas de electroeyaculación e inclusive algunos otros métodos y técnicas. Esta técnica es segura, con riesgos mínimos, y se ha empleado ya en muchas especies animales, ha mostrado resultados muy significativos (Watson y Holt, 1997).

Santiago *et al.* (1996), en sus estudios demuestran que el método más adecuado para la obtención de muestras de eyaculados en algunas especies animales como bovinos, ovinos, caprinos y équidos es la vagina artificial, cuya temperatura (T) y presión adecuadas, simulando de la mejor manera las condiciones naturales del depósito del semen en la vagina de las hembras, consecuentemente 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 harán después de algunas montas falsas (monte y desmonte), hasta que penetren completamente en la vagina artificial (VA) (Cortes *et al.*, 1996).

La técnica de electroeyaculación consiste en la obtención de material seminal tras la aplicación de un estímulo eléctrico, a través de un electrodo que se inserta en el recto. Además, puede utilizarse en animales en estado silvestre capturados puntualmente. Esta técnica se ha utilizado con éxito en un amplio rango de especies animal (Giulini *et al.*, 2004).

Rodríguez *et al.* (2018), describen que para la extracción del material seminal se utiliza un potro o maniquí, el cual momentos antes es impregnado con secreciones vaginales de una hembra en celo o fracciones del semen, lo cual genera un estímulo suficiente para aumentar la actividad sexual. Para realizar esta técnica es necesario un entrenamiento previo con el potro, siendo indispensable disponer de un lugar o sala de recolección donde el animal no pueda distraerse y deberá realizar la monta normalmente sin alteraciones de ruidos, olores o la vista de otros machos.

2.5.1 Método de la vagina artificial.

La VA consiste en un tubo cilíndrico de plástico rígido y resistente, de 7 centímetros (cm) de diámetro y 35–40 cm de largo, recubierto internamente por una camisa de goma que se dobla sobre los extremos del cilindro formando una cámara que se llena con agua caliente (45–46 ° C) y aire, con el fin de proveer el estímulo adecuado de T y presión, lográndose así la eyaculación. Algunas personas recomiendan el lubricar el extremo de la VA por el que entra el pene, teniendo la precaución de que el lubricante no sea tóxico para los espermatozoides (Morillo; *et al.*, 2012; Mejía *et al.*, 2008).

Teniendo en cuenta el otro extremo de la VA y de acuerdo a 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).

Para la monta se utiliza un señuelo que puede ser una vaca, un macho o un maniquí. Antes de colectar el semen se debe de tener en cuenta dos aspectos importantes: la higiene y el estímulo del semental (Rangel, 2007).

Cuando se realiza el procedimiento se apoya con el método más efectivo para estimular al toro, la monta falsa, permite la monta por parte del semental sobre el señuelo o maniquí y desviar el pene tomando con la palma de la mano la piel del prepucio sin ofrecerle la vagina. Posteriormente de algunos segundos de intento de búsqueda de la vagina, el animal desciende; nunca se deberá tocar con la mano la mucosa del pene. En el siguiente intento de monta se coloca la punta del pene desviado en la entrada de la vagina; inmediatamente el toro se lanza hacia delante en un empuje final que acompaña a la eyaculación. La monta falsa en el bovino aumenta la calidad del semen en cuanto a volumen (vol.), concentración espermática y motilidad (Rangel, 2007).

2.5.2 Método de la electroeyaculación

Según Escamilla (2005), la electroeyaculación, es el método más útil para obtener muestras de semen de toros o carnero, cuando no resulta práctico o posible el uso de VA. Se ha comprobado que las características del semen recogido por electroeyaculación pueden variar un poco en relación al obtenido con VA. La electroeyaculación proporciona muestras de mayor vol. y pH más alto, pero cuyas concentraciones de células espermáticas son inferiores.

La técnica de electroeyaculación consiste en dar pulsos eléctricos muy leves en la próstata y vesículas seminales para que el animal presente erección y eyaculación. El mecanismo del electroeyaculador, 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; Duarte, 2012; Cancino, 2009).

Para aplicar los estímulos, primeramente se debe activar el botón de función “Batt” que tiene significado de batería o bien botón de encendido. Para introducir el electroeyaculador, es de importancia asegurarse que este apagado, para evitar cualquier accidente o movimiento brusco en nuestro ejemplar. El botón se regresa a la posición inicial (girándolo hacia la izquierda) y se continúa girando hacia la derecha, cuidadosa y rítmicamente, incrementado progresivamente la intensidad del estímulo hasta lograr la primera reacción del toro, la cual generalmente se manifiesta por una contracción del esfínter del ano que trata de empujar hacia adentro el electrodo (Barrios, 2005).

2.5.3 Método de masaje transrectal

Según Angelino (2009), esta técnica requiere dos personas, una para efectuar el masaje rectal y otra para colectar el semen. El toro se ubica y mantiene en una manga o prensa. Después de remover completamente las heces del recto, este método consiste, en esencia, aplicar un masaje longitudinal repetitivo hacia delante y atrás, principalmente sobre la terminación de los canales deferentes, de las vesículas seminales y de la región de la próstata, introduciendo la mano y el antebrazo en el recto del animal. Ocasionando que el semen fluya hacia la uretra pélvica. Al iniciarse la pulsación del musculo uretral, el masaje deberá continuar en sincronía con las pulsaciones que otra persona recoge con una probeta de vidrio.

Aquellos reproductores que han tenido un adecuado descanso sexual, son dóciles y se manejan con calma, son buenos candidatos para esta técnica. También se recomienda en animales que posean lesiones dolorosas en cuartos posteriores (Pezzone, 2008).

2.5.4 Extracción testicular de espermatozoides

Cuando un animal de valor genético importante y tiene alguna incapacidad para realizar la monta o tiene dificultades de eyacular, se podría aplicar la técnica de extracción espermática de la cauda epididimaria mediante una biopsia, la cual es depositada en una caja de Petri con 1 ml de medio de cultivo. Con ayuda del microscopio estereoscópico y par de agujas para insulina se realiza una disección completa del tejido. Posteriormente se toma una alícuota de 10 microlitro (μ l) y se deposita en una caja de cultivo para ser examinada en un microscopio invertido y buscar la presencia de espermatozoides (Rodríguez *et al.*, 2018).

Es importante realizar lo más preciso y pronto posible este procedimiento para avisar el resultado al cirujano que realiza la obtención de la biopsia y evaluar la posibilidad o necesidad de obtener una segunda muestra.

En los casos anteriores al tener completa la muestra, se procede a realizar lo siguiente, añadiendo un volumen máximo de 0.5 ml de medio y centrifugando 10 minutos a 12 g. se resuspende el pellet formado en un vol. conocido de medio de cultivo y proceder con su utilización o conservación (Rodríguez *et al.*, 2018).

2.6. Evaluación Macroscópica

2.6.1 Color

Olivares y Urdaneta (1985), describen que depende de la cantidad de espermatozoides; cuando el semen es de buena calidad, presenta una coloración blanco lechosa o cremosa y cuando es de baja calidad su color es similar a leche aguada.

Suele suceder que el semen presenta color verdoso, lo cual indica la existencia de procesos necrotizantes, de carácter purulento, causados por algún órgano del aparato genital masculino. Las muestras seminales pueden estar coloreado de rojo vivo por la presencia de sangre cuando hay presencia de heridas ya sea cerca o inclusive dentro del prepucio, el glande o la uretra, a menudo producidas durante la recolección artificial. Cuando el semen tiene presencia de pus es un indicativo de inflamación. La sangre contiene eosinófilos, que presentan una enzima (amilasa) que destruye los factores de capacitación producidos en el epidídimo (Curbelo y Rodríguez, 2013).

2.6.2 Volumen

Sarabia (2015), menciona que el vol. del eyaculado es principalmente aportado por las vesículas seminales y glándula prostática, con un pequeño aporte de las glándulas bulbouretrales y el epidídimo. El vol. del líquido seminal es esencial para obtener el número total de espermatozoides y células no espermáticas en el eyaculado.

El vol. de eyaculado tiene un rango entre 2 y 12 mililitros (ml) todo dependiendo de la edad del animal, pero sobre todo existe un promedio entre 4 y 6 ml, se mide en el tubo colector graduado de uso de laboratorio, y varía fisiológicamente en función de varios factores tales como son: edad, raza, preparación sexual, tamaño y circunferencia testicular así como características individuales de los mismos, método de colección y frecuencia de recolección (Rutter y Russo 2006) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Escala de evaluación de volumen seminal en toros

Parámetro	Valores		
	I (Bueno)	II (Regular)	III (Malo)
Volumen ml	3-5	2-4	<2-4

2.6.3 Aspecto

El semen con aspecto opaco y relativamente uniforme, indica una alta concentración de células espermáticas. Las muestras translucidas contienen pocos espermatozoides, la muestra debe estar libre de pelos, suciedad y otros contaminantes. Aspecto lechoso o con fragmentos de material, debe desecharse ya que es un indicativo de infección, los toros pueden producir semen de color amarillo debido a la presencia inocua de riboflavina. Un semen limpio también debe de estar libre de orina, es muy fácil de identificarla ya que cuenta con un olor muy característico. Los animales jóvenes y los de menor talla dentro de una especie producen menor vol. de semen (Hafez y Hafez, 2000).

Un semen que presenta color blanco, marfil, blanco amarillento o inclusive grisáceo, se esta hablando de una muestra normal. Muchas de las veces, cuando el semen presenta tinte amarillento, es razón de ciertos pigmentos. La coloración de todos sus eyaculados está dentro de la gama de los amarillentos. Cuando se presentan habitualmente eyaculados amarillentos, se debe sospechar de agentes patológicos. Todo aquello que se aparte de estos colores se considera anormal y habrá que determinar el motivo de ese hallazgo. Como colores anormales más frecuentes se describen los tonos verdosos y rojizos.

Mediante la observación del aspecto y según la densidad aparente de un eyaculado puede estimarse aproximadamente, aunque de manera subjetiva, el grado de concentración espermática (Cuadro 2).

Cuadro 2. Esquema del grado de concentración espermática (número de espermatozoides por mm³)

Fuente: (Rutter y Russo,2006).

Semen	Concentración aparente	Aspecto
Muy denso	Mas de 1.300.000/mm ³	Creinoso
Denso	Entre 800.000 y 1.300.000/mm ³	Lechoso
Semi-denso	Entre 500.000 y 800.000/mm ³	Turbio
Ralo	Entre 200.000 y 500.000/mm ³	Seroso
Oligozoospermico	Menos de 200.000/mm ³	Seroso a acuoso
Azoospermico	Ausencia de espermatozoides en el campo óptico	Acuosos

2.6.4 Olor

Según Vera (2011), el semen fresco de toro tiene un olor típico producto de la aspermia. El olor es un poco dulzón, recordando el de leche fresca; muchas veces se encuentra enmascarado por el olor típico del animal mismo y de la cavidad prepucial. El olor a orina es indeseable, así como el olor pútrido ya que confirman enfermedades del testículo y de las glándulas sexuales accesorias.

El olor del semen es característico de cada especie animal (*sui generis*) y generalmente no es muy intenso. Si se mezcla con orina, puede tomar un olor urinoso, mientras que si el olor se intensifica a un olor de putrefacción, se debe a la mezcla de productos purulentos y restos necróticos, toma de mismo olor cuando el orificio del prepucio está lesionado o presenta contaminación (Moncayo, 2016).

2.6.5 pH

Refleja el balance entre las diferentes secreciones, principalmente entre el pH alcalino de vesículas seminales y el ácido de la próstata (López *et al.*, 2012).

Según Padrón *et al.* (1998), el pH del semen varía normalmente en un rango muy estrecho (7,2 - 8,0), pocos son los trastornos capaces de alterarlo. Se ha sugerido que un pH elevado (> 8) puede considerarse un signo de infección seminal si se asocia a otros síntomas y signos de sospecha, mientras que un pH disminuido (< 7,2) se observa cuando existe un déficit de la función de las vesículas seminales, en especial en pacientes con el síndrome de ausencia funcional de los conductos eyaculadores.

El pH varía entre 6,2 y 6,8 en un eyaculado normal; puede virar al pH alcalino en seminovesiculitis, epididimitis, cuando existe contaminación importante, o contiene muchos espermatozoides muertos (Rutter y Russo, 2006).

2.7. Evaluación Microscópica

Las características microscópicas que se evalúan en el semen de bovinos son: motilidad masal, motilidad individual, morfología y viabilidad y concentración espermática.

2.7.1 Motilidad espermática

La motilidad espermática, se puede determinar en base a la proporción de espermatozoides progresivamente móviles y se determina en porcentaje (%). Para realizar el procedimiento se coloca una gota de semen, sobre a lamina portaobjetos y se recubre con la laminilla. Se observa al microscopio con el objeto 40 x. Un espermatozoide con motilidad progresiva, es aquel que se mueve de un punto a otro, en una línea más o menos recta (López *et al.*, 2012).

López *et al.* (2012), describen la movilidad como uno de los parámetros más importantes en la evaluación de una muestra de semen. Un espermatozoide inmóvil es incapaz de atravesar el moco cervical y mucho menos las envolturas del ovocito.

Para Madrid (2005), es importante resaltar que al determinar la motilidad, no se toma en consideración, la habilidad de las células espermáticas para desarrollar ciertos procesos importantes para la fertilización in vivo, como son la capacitación, la reacción del acrosoma y la fertilización.

La valoración de la motilidad como único parámetro de calidad seminal no es suficiente para predecir la capacidad fecundante del semen, es sólo uno de los requisitos que ha de cumplirse, de ahí que la correlación existente entre la motilidad de una muestra de semen y su fertilidad real, aunque significativa, sea baja (Veloz, 2017).

2.7.2 Motilidad masal

La motilidad de los espermatozoides es un elemento importante para determinar la calidad del esperma. Los espermatozoides se mueven gracias a la contracción del filamento axial de la cola. La motilidad masal (MM) se define como la proporción de espermatozoides que presentan algún tipo de movimiento y a los que se les concede un % estimado (Diaz *et al.*, 1989).

Según Birogliatt (2013), al evaluar la motilidad espermática lo hacemos de dos maneras: La examinación de gota gruesa o MM y la evaluación individual de motilidad progresiva. Ambas deben ser realizadas inmediatamente luego de la colecta con platina térmica y materiales atemperados. El movimiento de masa depende de tres factores: Concentración, % de células con movimiento progresivo, y la velocidad de movimiento de los espermatozoides o también llamado vigor. Cuando uno de estos factores se encuentra disminuido, las ondas rápidas en remolinos esperadas son severamente deprimidas o eliminadas.

La MM se puede observar colocando una pequeña gota de semen sobre una placa portaobjetos a temperatura de 37 °C y observándola en el microscopio en aumento de 10X o 40X; allí se observa el movimiento en masa o la denominada formación de “olas”.

Esta MM está directamente relacionada con la concentración espermática, el movimiento progresivo y el vigor de ese movimiento; así, a mayor cantidad de espermatozoides se formará una mayor cantidad de olas; se expresa en una escala de calificación subjetiva de 1 a 5 (Páez y Corredor, 2014).

2.7.3 Motilidad Individual

Para Hafez y Hafez (2000), esta variable evalúa el % de células móviles en semen diluido. Para la evaluación se usa una escala de 0 a 100 %, considerando que motilidades >70% son excelentes, entre 50 a 70% buenas, 30 a 50% regulares y < a 30% malas (Cuadro 3).

Para la evaluación de motilidad individual se debe colocar una gota de 3 μ l directamente sobre el porta y cubre objeto nuevos, perfectamente limpios y templados. Se debe preparar la primera muestra con semen sin diluir y posteriormente si es necesario se puede diluir con extender de congelación. Para la motilidad progresiva individual, la siguiente descripción es usada:

- Muy Buena cuando tenemos un 80 - 100% de células móviles,
- Buena cuando tenemos 60 - 79% de células móviles,
- Regular cuando el 40 - 59% de células móviles
- y finalmente Pobre cuando menos de 40% de células móviles.

En la observación de la motilidad individual nos proveen información de la integridad de membrana y de la morfología espermática (Birogliatt, 2013).

Cuadro 3. Escala de evaluación de la motilidad individual de los espermatozoides.
Fuente (Rutter y Russo, 2006).

Escala	Características
0	Inmóviles o muertos
1	Girando entre sí, sin movimiento progresivo
2	Movimientos anormales, en ocasiones progresivo.
3	Con movimiento progresivo lento y ondulatorio.
4	Con movimiento progresivo rápido.
5	Con movimiento progresivo rectilíneo muy rápido.

Para la motilidad individual se han podido observar diferentes tipos de patrones en movimiento. La motilidad se puede alterar un poco con el diluyente empleado, teniendo como respuesta, incrementar la velocidad de la medición. Después de la dilución inicial, un porcentaje elevado de los espermatozoides puede mostrar un patrón de movimiento circular, que por lo general se resuelve después de 5 a 10 minutos en el diluyente (Veloz, 2017).

Si los espermatozoides nadan en movimiento circular estrecho, ello significa que tal vez sufrieron choque por frío. El movimiento oscilatorio podría definirse como células envejecidas o en proceso de secarse. Los patrones de motilidad también se correlacionan con la fertilidad o subfertilidad en machos. La motilidad es rutinariamente evaluada por estimación visual del % de células móviles, por lo cual el resultado es subjetivo (Curbelo y Rodríguez, 2013).

2.7.4 Vigor

Rutter y Russo (2006), describen el vigor como la medida del grado de intensidad del movimiento progresivo rectilíneo. Este se evalúa sobre la misma preparación utilizada para estudiar el movimiento individual. Se mide en una escala subjetiva de 0 a 5.

2.8. Morfología Espermática

Hace referencia al estudio de la forma del espermatozoide que permite determinar las posibilidades de fertilización de la célula. Aquellos eyaculados con una gran cantidad de células anormales tendrán menos posibilidades de ser fértiles (Gualancañay, 2012).

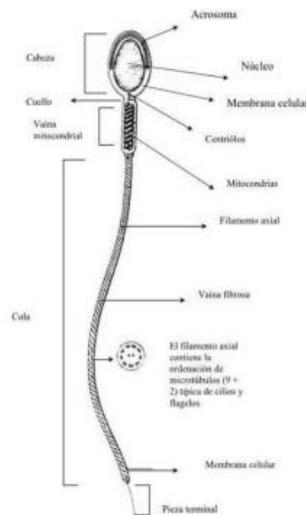


Figura 2. Esquema de un espermatozoide.

Fuente: (Hidalgo, Tamargo y Diez, 2005)

Los espermatozoides del toro, miden de longitud entre 68 a 74 micras, y están constituidos por cabeza, cuello, pieza intermedia y cola.

Para Vilanova y Ballarales (2005), consideran que un buen productor de semen no debe de presentar más del 30 % de anomalías espermáticas totales en el eyaculado recolectado. Hafez y Hafez (2000), mencionan que, en los toros cuando las células espermáticas exceden el 20% es característico que la fertilidad disminuirá. Cada muestra de semen contiene algunas células espermáticas anormales.

-

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 anomalías; se acepta un máximo de 30% de espermatozoides anormales (Páez y Corredor, 2014).

En estudios realizados por Muíño (2008), establecido distintas clasificaciones de las anomalías espermáticas atendiendo a distintos criterios:

- Dependiendo de si se originan en el testículo (anomalías mayores) o a lo largo del tránsito epididimal o tras la eyaculación (anomalías menores).
- De si están asociadas a infertilidad o no (primarias o secundarias, respectivamente).
- De la región espermática implicada (anomalías de la cabeza, de la pieza intermedia o de la pieza principal).

También se describe que cualquier anomalía, ya sea primaria o secundaria, si afecta a un número elevado de células espermáticas, y por consecuencia repercutir directamente en la fertilidad del semen.

2.7.5 Malformaciones primarias y secundarias

Es de las clasificaciones más usadas en la bibliografía, pero no por ello la más exacta. Las malformaciones primarias por definición, son aquellas que se originan dentro del testículo durante la espermatogénesis y malformaciones secundarias son aquellas que se originan dentro del epidídimo; cabe destacar que por definición se denota el origen y no la severidad del defecto (Fig. 3) (Gómez y Migliorisi, 2015).

Buzón (2013), menciona que los defectos primarios que se presentan son considerados más severos y se cree que su origen es durante la espermatogénesis dentro del epitelio seminífero testicular. Las alteraciones que se presentan de este tipo, se detectan fácilmente gracias al estudios de evaluación morfológica, además aporta información sumamente valiosa e importante ya que estas anomalías se consideran que están entre moderada y altamente relacionadas con la fertilidad de sementales. Los defectos mayores están relacionados con las alteraciones de la fertilidad, mientras que los menores no producen trastornos de consideración en este aspecto (Rutter y Russo, 2006) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Esquema de composición de los sistemas de clasificación de algunos defectos morfológicos.

Fuente: (Rutter y Ruso, 2006)

Defecto	Clasificación primaria secundaria	Clasificación mayores- menores
Gota protoplasmática		
Proximal	Primaria	Mayor
Distal	Secundaria	Menor
Anormalidades de cola		
Enrollada compacta	Primaria	Mayor
Enrollada alrededor de la cabeza	Primaria	Mayor
Colas dobladas	Secundaria	Menor
Defectos de pieza intermedia	Primaria	Mayor
Defectos de la cabeza		
Piriforme	Primaria	Mayor
Estrecha	Primaria	Mayor
Pequeña	Primaria	Mayor
Larga	Primaria	Mayor

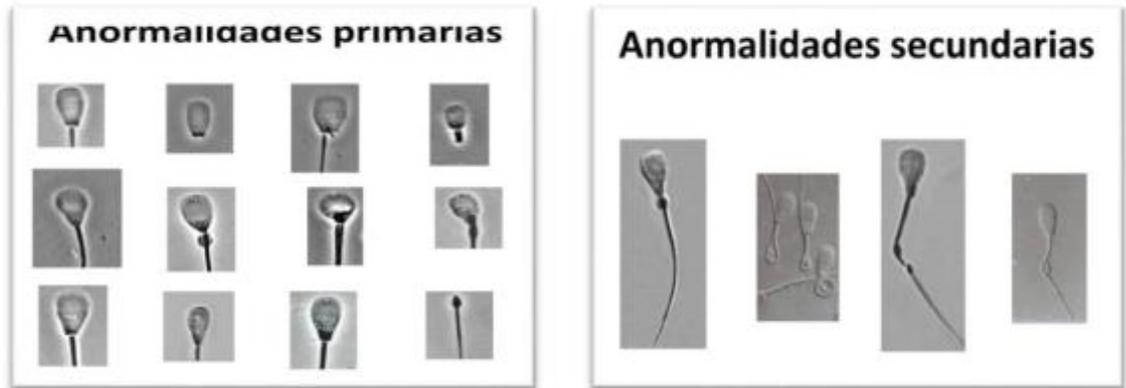


Figura 3. Evaluación microscópica, anomalías primarias y secundarias.

Fuente: (Hincapie, 2015).

2.9. Conservación de Semen Bovino

Según Holt (2000), cuando se descubrió el glicerol como agente crioprotector efectivo y del establecimiento de las técnicas básicas de criopreservación, el semen de una variedad de especies se congela y utiliza con éxito en la IATF.

Cuando se hace una reducción de la T por debajo de los 37°C y, principalmente, de los 20 °C induce una serie de alteraciones de naturaleza biofísica en el espermatozoide. El mayor desafío para las células en el proceso de congelación no es resistir a las bajas T del nitrógeno líquido, sino mantener la viabilidad en un rango de T, entre los -15 y -60 °C (Amann y Pickett, 1987; Mazur, 1984).

En sus investigaciones Rodríguez *et al.* (1975), mencionan que para las células espermáticas, la tasa óptima de descenso de la T oscila entre 10-100 °C/minuto, ya que velocidades superiores o inferiores provocan una disminución de la supervivencia.

Hafez y Hafez (2000); Parks y Graham, (1992), en sus estudios demostraron que si se agregan crioprotectores como glicerol o dimetil sulfóxido al medio de congelación, es posible que retarde la deshidratación de las células, y el consecuente daño por el efecto de disolución. Por tanto, la deshidratación osmótica, más que la formación de hielo intracelular, es la principal causa de las alteraciones ultraestructurales de la membrana, y una de sus consecuencias es la pérdida de la selectividad de la membrana .

El proceso de criopreservación incluye cinco etapas: dilución, refrigeración, adición del crioprotector, congelación y descongelación. Mientras que algunas fases son relativamente inocuas, otras son muy estresantes, como es el caso de la refrigeración y la congelación. Cada etapa del protocolo ejerce una interacción especial con la estructura, la función de la membrana y con el metabolismo celular (Watso, 1955; Hammerstedt *et al.*, 1990).

2.10. Refrigeración de Semen

La conservación de semen en fresco es utilizada con gran éxito en ovinos, porcinos y camellos y para ella, son utilizados principalmente los diluyentes de corta duración; la muestra seminal se almacena a una temperatura de 15-17°C (temperatura ambiente), con el objetivo de poderse emplear inmediatamente después de su recolección o, en tal caso, transportar la muestra a cortas distancias para su uso (Pérez, 2008; Tejo *et al.*, 2013).

La metodología más utilizada cuando se desea conservar semen en forma líquida por periodos no mayores de 24 h es mediante la refrigeración a 5°C, proceso con el cual se obtiene una reducción en la motilidad y actividad metabólica. Esta reducción en la motilidad puede restablecerse a niveles casi normales cuando los daños producidos por el choque térmico sean mínimos (Vivanco, 1998).

La Conservación en estado refrigerado (en estado líquido, fresco): su conservación puede ser entre 15-20°C o entre 4-5°C. Mediante la conservación a 5°C, se disminuye la actividad metabólica de los espermatozoides y se produce una reducción en el crecimiento bacteriano, llevando al eyaculado a extender su supervivencia. Es posible la implementación de semen refrigerado a 5°C en un programa de IATF, ya que se estima una vida útil de entre 2 y 4 d, facilitando su transporte e implementación (Vishwanath y Shannon, 2000).

La refrigeración implica un riesgo en la sobrevivencia de los espermatozoides; para preservarlos durante períodos prolongados, su actividad metabólica debe ser reducida mediante la dilución en un medio apropiado y la reducción de la temperatura (Hynes et al., 2014).

Según Lemma (2011), el semen almacenado entre 5-8°C sobrevive entre 24-48 h sin una disminución significativa en la motilidad y hasta 96 h sin un marcado descenso en el % de fertilidad.

Dentro de las biotecnologías se debe resaltar la importancia de la refrigeración de semen. Las células espermáticas de los ovinos pueden ser conservadas por largos períodos a temperatura ambiente, no obstante la conservación entre 10 a 15°C o 0 a 5°C, con disminución gradual de la temperatura es más apropiado para conservar la integridad celular (Simplicio et al., 2007; Bicudo et al., 2003).

La refrigeración es una alternativa a él semen congelado, cuando la inseminación es hecha dentro de un corto espacio de tiempo después de la colecta, Salomon et al. (2007) y Salomon y Maxwell (2000) reportaron una buena cualidad de semen de carneros, mantenidos a 5°C por 6 días, sin embargo la tasa de fertilización después del día 6 y 8 cayó drásticamente.

England y Ponzio (1996) demuestran en sus estudios, alteraciones en la integridad acrosomal capacitación espermática y motilidad durante la refrigeración por períodos variables. A pesar de eso, la refrigeración posee ventajas sobre la congelación por tener una alta cualidad seminal y un menor precio, viabilizando la técnica para períodos de almacenamiento cortos.

Independiente del diluyente, tasa de dilución, temperatura o condiciones de refrigeración, cuanto mayor el tiempo de refrigeración, mayor tasa de deterioro de la célula, la cual es acompañada por un declino en el transporte y sobrevivencia del espermatozoide en el tracto reproductivo de la hembra y, consecuentemente, reducción de la fertilidad (Vishwanath y Shannon, 2000).

Rodriguez y Valenzuela (2019) realizaron un estudio donde utilizaron muestras seminales de 5 ovinos, mantenidas en contenedores de transporte de semen, refrigeradas en diluyentes a base de yema de huevo y lecitina de soja, en temperatura de 15 °C, durante 12, 24 y 48 horas, y evaluadas según su motilidad, vigor, integridad de membranas plasmática y acrosomal, morfología y actividad citoquímica mitocondrial y obtuvieron los siguientes resultados: demostraron que el diluyente a base de lecitina de soja, por un lado, pudo mantener mejor la integridad de membrana acrosomal (92.37 ± 0.90 ; 89.54 ± 1.07 ; $p=0.04$), pero, por otro lado, presentó mayor cantidad defectos espermáticos totales (10.92 ± 0.97 ; 6.62 ± 0.83 ; $p=0.0008$), el tiempo de refrigeración que más causó daño a las células espermáticas fue de 48 horas, donde hubo significativo descenso en la motilidad, vigor, integridad de membranas y actividad mitocondrial.

2.10.1 Ventajas del semen refrigerado

Para Vishwanath y Shannon (2000), el semen refrigerado presenta las siguientes:

Ventajas

- Bajo número de células espermáticas por pajilla.
- Se puede almacenar a bajos precios.
- Se puede emplear o implementar de una manera fácil y eficiente en el campo.
- Se obtiene mayor cantidad de dosis.

2.10.2 Desventajas del semen refrigerado

- Vida útil limitada, con la imposibilidad de almacenar las muestras por largos periodos.

2.11. 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 (Cavestany, 1994).

2.11.1 Funciones de un diluyente:

- Proveer nutrientes a los espermatozoides, como fuente de energía.
- Proteger los espermatozoides contra los efectos dañinos de un enfriado rápido.
- Proveer un buffer para prevenir efectos nocivos de cambios de pH al formarse ácido láctico, resultante del metabolismo de la glucosa por los espermatozoides.

- Mantener una presión osmótica y un balance electrolítico adecuado.
- Inhibir el crecimiento bacteriano.
- Aumentar el volumen de semen de modo que pueda ser utilizado para múltiples inseminaciones.
- Proteger los espermatozoides del congelado (Cavestany, 1994).

2.12. Componentes de los Diluyentes

2.12.1. Azúcares

Reyes, (2005), dice que uno de los principales componentes sumamente importante en los diluyentes, son los azúcares, ya que actúan como fuente de energía para los espermatozoides durante el almacenamiento, tal como la glucosa y fructosa. Estas mismas también tienen función crioprotectora, de tal forma que mantienen e incrementan la presión osmótica de manera extracelular en el espermatozoide, permitiéndole mantener la integridad de la membrana espermática al ser almacenada por un largo periodo.

2.12.2. Sustancias tampón

Los diluyentes deben incluir compuestos que tengan la capacidad tamponante, ya que existen grandes cambios en el pH del semen, causando daños en los espermatozoides, bien infertilidad o mortalidad espermática (Rasul, 2000).

Purdy (2006), menciona en sus trabajos de investigación, que con el propósito de mantener la viabilidad y la capacidad fecundante de las células espermáticas es relativamente importante conservar un ambiente adecuado, mediante el control de las variaciones del pH en todos los medios de crioconservación. El plasma seminal, una de sus principales funciones es precisamente la de amortiguar los cambios en el pH en condiciones naturales (in vivo). Por esta razón, las sustancias que amortiguan los cambios de pH son incluidas de manera rutinaria en la crioconservación, para reducir los cambios al mínimo.

2.12.3. Sustancias orgánicas

Las sustancias orgánicas son las que previenen el choque por enfriamiento, por ejemplo la yema de huevo por medio de sus lipoproteínas, fosfolípidos y lecitinas.

La yema de huevo es un ingrediente comúnmente utilizado para la congelación ya que preserva la motilidad e integridad de las membranas del acrosoma y mitocondrias del espermatozoide, además es un buffer osmótico (Reyes, 2005).

2.12.4. Crioprotectores

Los diluyentes seminales deben cumplir con ciertos requisitos, tal es pH, capacidad tampón, osmolaridad y fuerza iónica. Además, deben de contener una fuente de energía para el espermatozoide, no deben deteriorarse durante el almacenamiento previo a su uso y sobre todo deben de proporcionar a los espermatozoides protección en cuanto a la bajada de temperatura, ya sea refrigeración, congelación, y descongelación (Watson, 1979).

Ha pesar de su importancia, han sufrido pocas modificaciones en las última décadas en general, los medios de crioprotección, se incluyen como principal componente los agentes crioprotectores, tanto penetrantes, como no penetrantes, azúcares, lipoproteínas, detergentes, aditivos y finalmente antibióticos (Watson, 1979).

2.13. Principales Diluyentes Utilizados para Semen Bovino

2.14.1 Triladyl®

El trilady®l es un concentrado estéril que se utiliza en la preparación de un diluyente que contenga yema de huevo, esto para la congelación de semen de toros en un solo paso, además es ideal en la congelación de semen en otros rumiantes tal es el caso de ovinos, caprino y ciervo. Su contenido en antibióticos corresponde al estándar de la UE: EC norma 88/407. Está compuesto principalmente de TRIS (Hidroximetil amino metano, funciona como amortiguador sintético), Ácido cítrico, Azúcar, Tampones, Glicerina, Antibióticos y Agua de extrema pureza. Un preparado de 100 ml del diluyente contiene (unidades activas) Tilosina 5,7 mg, Gentamicina 28,6 mg, Espectinomicina 34,3 mg y Lincomicina 17,2 mg. (Manual de Triladyl, s/f)

2.14.2 Citrato de Na - Yema de huevo

El Citrato de sodio es un agente quelante, que fija sólidamente el calcio y otros iones metálicos y dispersa los glóbulos grasos de la yema de huevo, hasta el punto que pueden verse aisladamente los espermatozoides mediante un examen microscópico. Un tampón citratado isotónico con el esperma del toro está formado por 2'9 g de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ por 100 ml de agua destilada. Es sumamente importante resaltar que los dilutores conteniendo yema de huevo son beneficiosos en la preservación de la fertilidad de espermatozoides, en la protección contra el shock por frío y variaciones de temperatura de conservación, por las lipoproteínas y lecitinas contenidas en la yema de huevo (Palomino *et al.*, 2001; Salisbury y Vandermark, 1964).

Cuevas (2018), realizo un estudio comparativo de tres diluyentes, en donde evaluó citrato de sodio con yema de huevo, en la preservación de semen caprino, estimando la respuesta de cada diluyente en la fase de pre-congelación, y otro en la post-descongelación. Los resultados obtenidos en la primer fase el Citrato de sodio, obtuvo valores promedio del 60% de motilidad y en la segunda fase valores promedio de 22% respectivamente.

2.14.3 TRIS

Según la página Contexto Ganadero (2019), el Tris (hidroximetil) es usado como el principal componente en el diluyente para la congelación del semen de toro, por su predominante capacidad buffer, diurética y actividad osmótica, así como una baja toxicidad a alta concentración.

Solis (2014), menciona en su trabajo de investigación que la solución Tris contiene una solución buffer biológica común que utilizada principalmente en el proceso de extracción de ADN ya que es altamente sensible al pH de cualquier tipo de fuente durante dicho proceso. La solución Tris se utiliza durante la lisis celular, la eliminación y la precipitación de componentes celulares no deseados para mantener un pH estable.

2.14.4 Andromed®

Para Salisbury *et al.* (1978), mencionan que este diluyente está compuesto a base de lecitina de soya libre de compuesto de origen animal, principalmente para dilución y congelación de semen de bovinos. También ha logrado tasas de no retorno has 2,6 mayores en comparación con diluyentes preparados a base de yema de huevo.

Las ventajas que presenta el diluyente andromed es que carece de yema de huevo, por lo tanto no tiene ingredientes de origen animal, por lo cual no existe riesgo que se contamine por carga bacteriana, contiene una formula antibiótica estandarizada, tiene altas tasas de concepción, aumenta la tasa de no retorno, facilidad de uso y preparado (Salisbury, 1982).

2.14.5 Optidyl®

Elaborado por Cryo Vet S.A.S. Es un concentrado para diluyente con fórmula tris, yema de huevo ionizada, glicerol, antibiótico (penicilina, estreptomomicina, espectinomomicina, lincomicina). Ofrece buenos % en la movilidad, fácil uso, ya que se puede hacer usando solamente agua, esta esterilizado por irradiación, además sus resultados están 100 % probados (Garcia, 2016).

Sánchez (2018) en su tesis de licenciatura, realizó evaluaciones de respuesta de tres diluyentes de semen de 5 bovinos del establo lechero, donde se les extrajo semen por el método de electroeyaculación; entre los diluyentes evaluados precisamente uno es optidyl, siendo el segundo mejor diluyente en la preservación de la motilidad espermática, se evaluó en dos etapas, pre-congelación y post-congelación, presentando 70 y 45% de motilidad respectivamente para cada etapa.

2.14.6 Optixcell 2®

Este diluyente se fabrica en una planta que cumple los requisitos de buenas prácticas de fabricación CGMP y la normativa ISO9001:V2008. Todos los lotes se prueban con semen vivo. Los antibióticos incluidos en este dilutor cumplen con la Directiva UE 88/407/CEE, modificada por la 2003/43/CE (IMV, s/f).

Evita el transporte de microorganismos patógenos. Producción de metabolitos y toxinas nocivos. Cuenta con un equilibrio seguro las 24 h por lo cual permite una mejor organización del trabajo, haciéndolo más flexible. La motilidad posterior a la descongelación mejorada en concentraciones subóptimas.

Optixcell® funciona significativamente mejor que la yema de huevo Tris con un bajo número de espermatozoides por dosis. Los parámetros de motilidad son significativamente más altos en éste, que en los diluyentes de yema de huevo Tris o lecitina de soya.

Un estudio ejecutado por Crespo (2020), en el cual seleccionaron 7 toros, a los que utilizando vaginas artificiales se les extrajo el semen para evaluarlo en fresco y medir variables de interés reproductivo; una vez calificado el semen, se procedió a congelarlos utilizando medios comerciales como el Two Step, Triladyl, Andromed y Optixcell, para posteriormente evaluarlos post-descongelación donde se obtuvieron los siguientes resultados: se observó mayor viabilidad a la hora cero y a las dos horas con el medio Optixcell presentando valores medios de % de motilidad de 45% y 40% respectivamente para cada tiempo, lo cual indica en este estudio, que Optixcell es superior a los otros diluyentes a la hora de compararlos.

III MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Localización del Área de Estudio

El presente trabajo de investigación, las extracciones con el posterior procesamiento del material seminal y el primer monitoreo del eyaculado (tiempo 0 h) se realizó, en el rancho experimental Los Lngeles, propiedad de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, cuya superficie es de 7,000 ha y se ubica a 34 km al sur de la cabecera municipal de Saltillo, entre los 25° 04' 12" y 25° 08' 51" latitud norte y 100° 58' 07" y 101° 03' 12" longitud oeste, con una altitud de 2 150, así como en el laboratorio ubicado en la Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro" en la Exhacienda de Buenavista, sus coordenadas geográficas son: 100° 59' 5 7" longitud oeste y 250° 23 ' 42" longitud norte, 7 kilómetros al sur de la ciudad de Saltillo, capital del estado de Coahuila.(Serrato, 1982; Narro, 1998).

3.2. Materiales

Extracción

- Sementales
- Tijeras
- Agua destilada
- Cinta para medicion de circunferencia escrtal
- Protector para tubo de ensayo
- Tubo de ensayo graduado
- Toallas de papel higiénicas
- Lubricante

- Extención eléctrica
- Guantes para palpar
- Cono de látex
- Electroeyaculador automático (Electrojac)
- Prensa para sujetar sementales

Evaluación

- Gradilla
- Termómetro
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Microscopio
- Pipetas serológicas
- Colorante Eosina-nigrosina
- Frascos de vidrio
- Tiras para medir pH

Procesamiento

- Etiquetas para marcar tubos de ensayo
- Agitadores
- Diluyentes
- Yema de huevo
- Agua biodestillada
- Matraz Earlen-meyer
- Pipetas Pasteur
- Autoclave para esterilizar material

- Papel aluminio
- Cinta
- Papel filtro
- Gasa estéril
- Refrigerador
- Hielera
- Hielos
- Refrigerantes

3.3. Sementales Utilizados

Para llevar a cabo la ejecución de este trabajo se utilizaron 6 toros de diferentes edades (entre 2 y 6 años) de la raza Charoláis que contaban con el número de identificación propio del Rancho Experimental Los Ángeles y Santa Teresa la Rueda (052, 040, 016, 019, 706 y 911), ambos propiedad de la UAAAN, presentando variabilidad referente a peso, circunferencia escrotal y alzada.

3.4. Método de Obtención de la Muestra de Semen

Para obtener las muestras de semen para el presente estudio, se realizó a través de la técnica del electroeyaculador (automático) descrita por Escamilla, (2005), Mejía et al. (2008), Duarte, (2012), que consiste en que dicho equipo trasmite impulsos eléctricos programados vía rectal.

Para realizar la extracción de semen, primeramente, se inmovilizaron los sementales con ayuda de la prensa, para de esa manera, evitar exponer la integridad de los mismos y del personal. Posteriormente realizado este procedimiento, con ayuda de las tijeras, se procedió a recortar cuidadosamente el vellón que rodea la vaina del prepucio, para después lavar con agua destilada y secar con una toalla de papel higiénico para evitar contaminar la muestra de semen que se obtuviera.

Con el guante de palpación colocado en la mano y totalmente lubricado, se introdujo la mano por el recto, para poder despejar el excremento de cierta área y poder trabajar de una manera más higiénica y eficiente; al mismo tiempo de realizar esto se daban leves masajes sobre la pared proximal de la próstata para comenzar con la estimulación y un poco de relajación del pene. Terminados estos procedimientos se preparó el electreyaculador (Electrojac), lubricado y con las placas pegados a la pared proximal siendo la orientación adecuada, se introdujo vía rectal con movimientos suaves y girando levemente hacia los lados evitando lastimar las mucosas internas y paredes del recto.

Una vez instalado el electrodo dentro del recto del animal, se procedió a encender el equipo para así hacer pasar los impulsos eléctricos hasta lograr la eyaculación.

Para hacer la colecta del semen se empleó un colector, el cual estaba provisto de un embudo de tubo látex, que llevaba conectado en la parte inferior un tubo de ensayo graduado y protegido con un aislante térmico, para evitar que la luz solar y los cambios bruscos de temperatura que puedan dañar las células espermáticas.

3.5. Evaluación de la Muestra de Semen

La muestra obtenida de semen se mantuvo en condiciones adecuadas de T (30-35°C), para ello se realizó un manejo y cuidados con la muestra tal como: evitar agitación brusca, exposición prolongada a la luz solar y utilizar el material adecuado y limpio.

Para determinar si la calidad óptima para procesar semen bajo condiciones de refrigeración, existen diversos parámetros que se emplean dentro de una evaluación tales como: Apariencia, volumen, concentración y motilidad.

3.5.1 Apariencia

Cuando se tiene el eyaculado dentro del tubo colector, se determina la apariencia, donde se observa una masa de aspecto cremoso, muy densa, color blanquecino con tendencia a mate y rica en células espermáticas.

3.5.2 Volumen

Para la colecta se usa el tubo colector graduado, para lo cual la lectura se hace directa, como se sabe existe variación dentro de la misma especie, esto debido a la edad, peso, circunferencia escrotal, así como método de extracción, entre otras.

3.5.3 Motilidad

La motilidad se determinó con la ayuda del microscopio óptico, donde se evaluó lo siguiente.

Movimiento masal: para ello, en un portaobjetos limpio, seco y templado a 35-37 °C se coloca una gota de la muestra de semen, se cubre con el cubreobjetos, colocándolo en el microscopio para observar la onda de movimiento, esto con el objetivo en 10x. La estimación de la motilidad espermática se determina en base del vigor y a los movimientos de las ondas, ya que este presente o no dicho movimiento.

Movimiento individual: para poder determinarlo, se coloca una gota de la muestra de semen diluido, acompañado de una gota de citrato de sodio al 2.9 %, sobre el portaobjeto limpio y a una T templada que oscila entre los 35-37 °C, luego se cubre con el portaobjetos y se observa a través del microscopio, donde se llevará a cabo el análisis, y se determinará el % de espermatozoides móviles, teniendo en cuenta que el movimiento debe ser rectilíneo progresivo.

3.5.4 Morfología espermática

Para Vilanova y Ballarales (2005), consideran que un buen productor de semen no debe de presentar más del 30% de anomalías espermáticas totales en el eyaculado recolectado, por tal razón se realiza un frotis sobre un portaobjetos con semen, agregando colorante de eosina-nigrosina para poder calcular el % de espermatozoides normales y de esa manera poder determinar si el semen es apto para un procesado, ya sea en refrigeración o congelación.

3.6. Preparación de los Diluyentes

Para realizar la preparación de los tres diluyentes es sumamente importante realizarlo con la mayor limpieza posible, por lo tanto, el material utilizado fue esterilizado previamente.

3.6.1 Preparación del Optixcell 2®

Para la preparación, el procedimiento consistió en agregar en un matraz Erlenmeyer el doble de cantidad de agua bidestilada en relación a la del diluyente, y posteriormente se agitó cuidadosamente quedando una solución homogénea. El diluyente quedó listo para su uso.

Se tomaron las siguientes recomendaciones:

Para una dilución en una etapa (o si el proceso dura < de 6 h) el vol. total necesario se colocaría a baño María a 32/34 °C.

Asegurarse de que se haya alcanzado la T adecuada antes de iniciar la dilución del semen.

Para la predilución del semen, se maneja a temperatura ambiente o baño María (32/34 °C.) a razón de un volumen de semen por volumen del medio (1:1), directamente en el tubo de recogida. Se incorpora el medio de conservación lentamente para evitar que se produzcan choques osmóticos y para homogenizar la muestra se mueve suavemente.

3.6.2 Preparación del Optidyl®

El principal componente del optidyl®, se basa en un 40 % de concentrado (Diluyente optidyl®) y 60 % de agua bidestilada, dado que este es un concentrado para diluyente con fórmula tris, yema de huevo ionizada, glicerol (penicilina, estreptomicina, espectinomicina, lincomicina) de conformidad con la directiva europea 2003/43/CE que modifica la directiva CEE88/407.

Para poder realizar la preparación de este diluyente se considera un 40 % de concentrado de optidyl® y 60% de agua bidestilada para preparar el volumen requerido de diluyente. Para ello el procedimiento fue el siguiente, se midieron 24 ml de concentrado de diluyente y 36 ml de agua bidestilada, el agua bidestilada de coloco en un matraz Erlenmeyer al igual que la cantidad de concentrado de optidyl®, a T de 32-35°C. y con movimientos suaves y ondulatorios se homogenizo la solución, dando un volumen final de 60 ml.

3.6.3 Preparacion del Citrato de sodio con yema de huevo

La preparación del citrato de sodio consistió en agregar 2.9 g de citrato de sodio en 100 ml de agua destilada, de esta solución se tomó el 80% del vol. y se complementó el otro 20% con yema de huevo fresco, para ello se partieron dos huevos frescos, con el mayor cuidado posible, para poder separar la clara de la yema. Una vez hecho esto, en un papel filtro se colocó la yema, haciéndola rodar cuidadosamente sobre él, para eliminar lo más posible, los restos de clara y de la membrana. Cuando se obtuvo la yema filtrada se colocó en una probeta graduada para poder agregar la cantidad correspondiente de yema a la solución madre a base de citrato de sodio, con movimientos suaves y uniformes se mezcló. Para garantizar el 100 % de efectividad de este diluyente es importante respetar este orden.

3.7. Evaluación y Dilución de la Muestra de Semen

Al arribar la muestra de semen puro al lugar de trabajo, lo primero a realizarse era una evaluación macroscópica del eyaculado. Se registraba el número de toro y características del eyaculado como el volumen color, densidad y presencia de cuerpos extraños.

Los tubos que se utilizaron se identificaron con el número de toro y diluyente utilizado, para facilitar el trabajo y después poder tener los datos para cada semental. Una vez evaluada cada muestra, se les colocó la cantidad de semen que correspondía de acuerdo a cada uno de los tres diluyentes de prueba (D1, D2, D3).

Como se hizo a razón de un vol. de semen por vol. de medio (1:1), para la cantidad de semen puesto en los tubos, se le agregaba lentamente por las paredes del mismo la misma cantidad de diluyente, repitiendo el mismo procedimiento para los toros restantes.

Se realizó una evaluación microscópica de cada muestra de semen la cual consistía en la observación del % de motilidad espermática, haciendo una estimación del % de vivos, con el fin de evaluar que toro en particular no presente problemas en su eyaculado que pueda afectar la muestra a procesar, también en ese momento se aprovechaba para realizar el frotis con colorante de eosina-nigrosina para posteriormente evaluar espermatozoides normales, anomalías primarias y secundarias que pudiera presentar.

Al alcanzar los 5°C, se procedía a realizar el monitoreo de la h 0 para los tubos (D1, D2 Y D3). Se evaluaba motilidad individual y se regresaban las muestras a la hielera.

Aplicando hielo o agregando agua, se mantenía la temperatura a 5°C durante el trayecto de regreso a la Universidad y una vez en la misma se colocarón las muestras en el refrigerador del Laboratorio de Producción Animal, en donde se conservaban y se sacaban exclusivamente al momento de realizar la evaluación (3, 6, 12, 24 y 48 h).

3.8. Variables a Evaluar

3.8.1 Motilidad

Para determinar la viabilidad de una muestra de semen en bovinos se evalúa la motilidad espermática, esta variable se determinó de acuerdo a la escala propuesta por Hafez y Hafez (2000), donde evalúa el % de células móviles en semen diluido, para la evaluación se usa una escala de 0 a 100 %, considerando que motilidades >70% son excelentes, entre 50 a 70% buenas, 30 a 50% regulares y < a 30% malas.

- **Diluyente**

Para determinar el efecto del diluyente, se eligió aquel que fuera capaz de mantener los mejores % motilidad espermática.

- **Tiempo**

Para determinar el efecto del tiempo, se eligió el que fuera capaz de mantener los mejores porcentajes de motilidad espermática.

3.9. Diseño Experimental

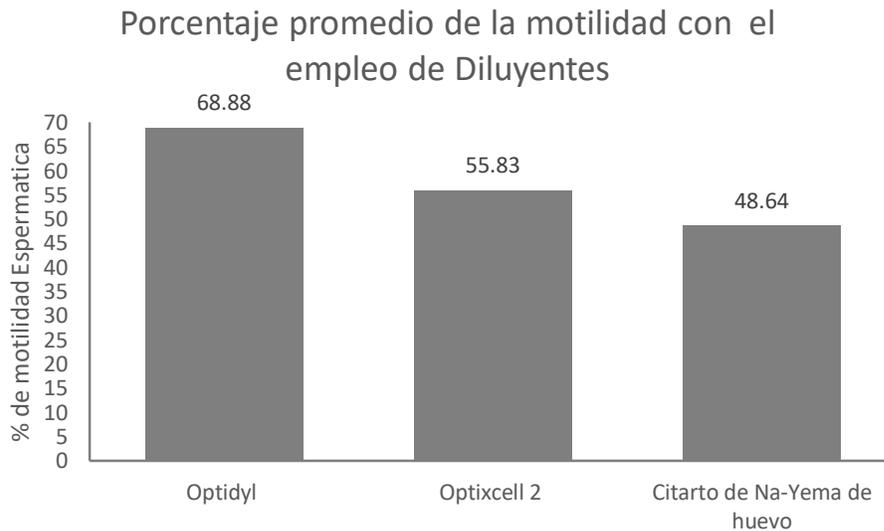
El experimento fue establecido bajo un diseño completamente al azar con 7 repeticiones, en un arreglo factorial de AxB donde A= Diluyente y B= Periodo (tiempo) de evaluación. Los datos fueron analizados con el programa SAS (Statistical Analysis System) versión 9.4.

IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una vez obtenida y analizada la información generada del presente estudio de investigación se exponen los siguientes resultados:

4.1. Evaluación de la Motilidad por Diluyente

En la gráfica 1 se presentan los valores obtenidos del efecto de los tres diluyentes sobre la motilidad del semen, siendo el Optidyl® el que presentó los mejores resultados (68.88%) en comparación con los otros dos diluyentes, ya que con el Optixcell 2® y Citrato de sodio con yema de huevo, los valores fueron de 55.83% y 48.64% respectivamente, en forma general podemos apreciar que estos porcentajes son muy distintos entre sí, de ahí que al ejecutar el análisis estadístico se observan diferencias significativas entre diluyentes ($p < 0,05$). Esto puede deberse a la composición y contenido de nutrientes esenciales para la supervivencia del espermatozoide, así como los demás elementos contenidos en los diferentes diluyentes, sin embargo, por su parte el Optidyl® es un diluyente que además de su composición y contenidos nutricionales tiene un efecto protector de las células espermáticas frente a un shock por los cambios de temperatura, y por lo tanto ayuda a mantener vivas estas células por periodos de tiempo más prolongados, de ahí la diferencia marcada de su efecto en los resultados.



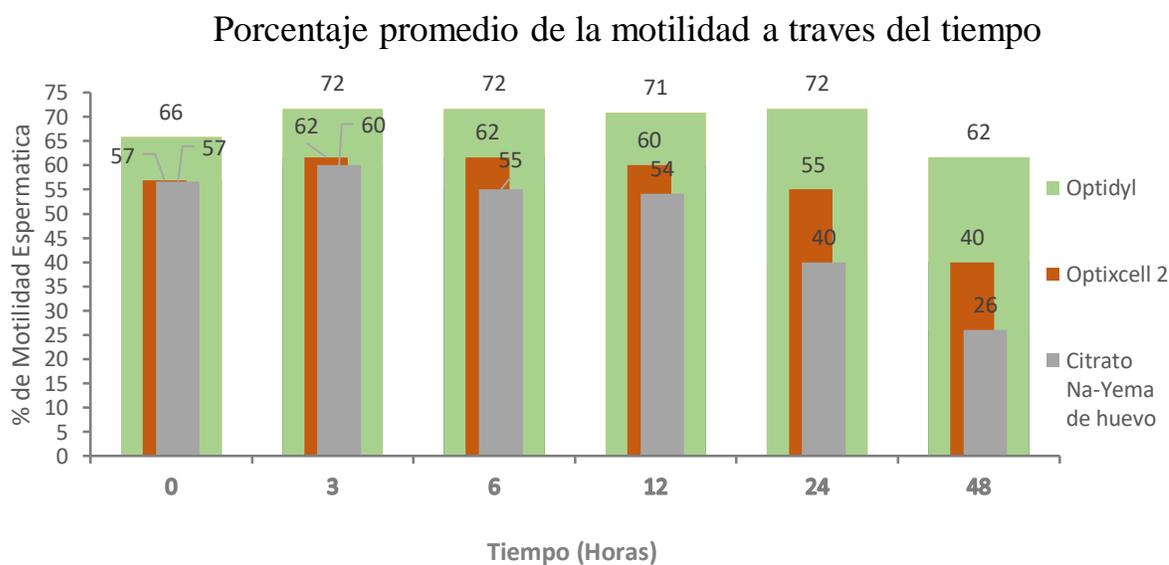
Grafica 1. Porcentaje promedio de la motilidad con el empleo de Diluyentes.

Un estudio realizado por Angeles (2019), donde se compararon dos diluyentes, que de igual manera son dos de los tres que se emplearon en este trabajo, es decir Optidyl® y Optixcell®, pero en la especie caprina, el semen en este caso se sometió a refrigeración únicamente por dos horas pero no hallaron diferencias significativas ($p > 0,05$), ya que el Optidyl® (63.3%) presentó valores inferiores sobre el optixcell® (66.7%), estos valores al compararlos con los obtenidos en el presente trabajo de investigación en el rango de las 3 h fueron de 65.83% y 56.67% respectivamente y se aprecia cierta similitud en cuanto al mantenimiento de los % de motilidad por efecto de los diluyentes. De antemano se tiene el antecedente de que cuando se agrega una solución de nutrientes a los espermatozoides como lo es un diluyente, después de un periodo de tiempo, estos recuperan su motilidad, entonces al someter las muestras a más horas de refrigeración se podría esperar que estos % de motilidad puedan mantenerse por cierto tiempo.

Pytlík *et al.* (2022) realizaron un estudio donde utilizaron Optidyl®, AndroMed® y BullXcell® para realizar las comparaciones con semen criopreservado, por lo tanto el Optidyl® presentó mejores valores de motilidad (>50%) post descongelación que los otros diluyentes, esto permite respaldar los resultados presentados, aclarando que en el presente trabajo solo se llegó hasta la refrigeración, pero esto garantiza que si Optidyl® es eficiente hasta descongelación, por efecto presentara resultados competentes en semen bovino durante los periodos de tiempo sometido a refrigeración, además los % obtenidos de alguna manera presentan congruencia y similitud en ambos trabajos.

4.2. Evaluacion de la Motilidad en Tiempo

En la gráfica 2 se muestra el comportamiento de la motilidad a través de los diferentes tiempos establecidos en este trabajo, donde se presentan los valores obtenidos, encontrándose diferencias significativas por efecto del tiempo ($p < 0,05$) a partir de las 6 h en refrigeración.



Grafica 2. Porcentaje promedio de la motilidad a traves del tiempo.

Nótese que específica y estadísticamente hablando, de la h 0 a la h 3 no existe diferencia significativa, esto debido a que cuando se agregaron los diluyentes, el % de motilidad se incrementó, ahora, a medida que sigue transcurriendo el tiempo después de la h 6 los valores de la motilidad van disminuyendo gradualmente. Cuando se evalúa el comportamiento de la motilidad de la h 6 hasta la h 48, entre el Optidyl® y Citrato de sodio con yema de huevo, si existe diferencia significativa, en cambio el Optidyl® en comparación con el Optixcell 2® hay una diferencia poco marcada en el rango de h 6 hasta la h 12 es decir que en estos tiempos da igual usar cualquier diluyente, sin embargo, en el rango de h 24 y h 48 Optixcell 2® Optidyl®, si presentan diferencia significativa.

En el cuadro 5 se representa el nivel de significancia a través del tiempo. Medias con la misma letra, no son significativamente diferentes y medias con distinta letra si presentan diferencias significativas.

Cuadro 5. Valores promedios de la viabilidad del semen a través del tiempo.

Diluyente	Tiempos de evaluación					
	0	3	6	12	24	48
D1	56.833(A)	61.667(A)	61.667(AB)	60.000(AB)	55.000(B)	40.000(B)
D2	65.833(A)	71.667(A)	71.667(A)	70.883(A)	71.667(A)	61.667(A)
D3	56.667(A)	60.000(A)	55.000(B)	54.167(B)	40.000(B)	26.000(B)

D1;Optixcell 2®;D2;Optidyl®;D3;Citrato de sodio con yema de huevo

Con respecto a los resultados, obtenidos de las 0 a las 48 hrs, bajo refrigeración se logra mantener la motilidad espermática debido a que las bajas temperaturas de almacenamiento (4-6°C) reducen la actividad metabólica de los espermatozoides, prolongando su vida útil, mientras que el semen almacenado a temperatura ambiente sus parámetros de motilidad decaen rápidamente (Vishwanath y Shannon, 2000).

Según estos autores, los motivos por el cual se observa este rápido descenso en la motilidad del semen almacenado a temperatura ambiente se deben principalmente a 3 factores: uno es el estrés oxidativo extracelular que sufren los espermatozoides a temperatura ambiente; otro factor de estrés es debido al plasma seminal y por último, otro causante de la baja en la fertilidad es la producción de radicales libres endógenos. Según Vishwanath y Shannon (2000), la combinación de estos 3 factores puede verse en un importante daño sobre los espermatozoides y ser una de las razones por las cuales el semen almacenado a temperatura ambiente tiene una vida útil tan corta.

Para este trabajo, Optidyl® expone los mejores % de motilidad conservados a través del tiempo. Cuando un semen sufre el proceso de criopreservación se enfrenta a cinco etapas: dilución, refrigeración, adición del crioprotector, congelación y descongelación, pero las últimas dos etapas, es donde las células espermáticas sufren cambios bruscos de T y se presenta un alto índice de mortandad, al realizar una evaluación al momento de descongelar una pajilla, el % de motilidad tiende a decaer, pero aun así tiene la capacidad de poder fecundar a un ovulo, Ribeiro *et al.* (2014) realizaron un estudio de criopreservación de espermatozoides bovinos extraídos de la cola del epidídimo utilizando los métodos convencional y automatizado, logrando % de 29.5 y 25.5 respectivamente para cada método.

El semen diluido en Citrato de sodio con yema de huevo presenta motilidad de 26% a las 48 h, exhibe efecto similar al estudio ejecutado por Ribeiro *et al.* (2014), enfatizando que es posible fecundar un ovulo con este tratamiento. Y de antemano usando Optixcell 2® con 40% de motilidad las posibilidades tienden a incrementar.

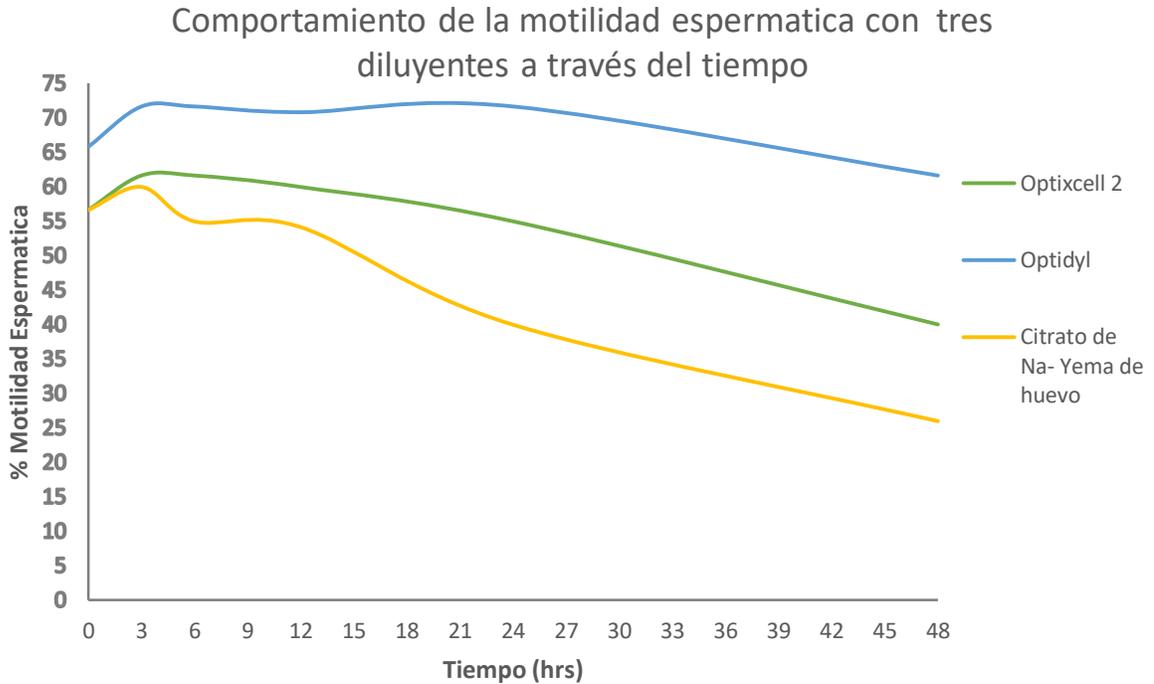
Es importante mencionar que en el presente trabajo se hicieron evaluaciones hasta las 72 horas, donde se presentaron valores considerables e inclusive en algunos superiores al 40% para ciertas muestras de semen de los toros con Optidyl®, el detalle surgió cuando las evaluaciones se hacían en el resto de los diluyentes e inclusive de la resistencia propia del semen de los toros que presentan a través del tiempo, como algunos valores tiende a caer hasta 10% incluso hasta 0%; al ejecutar los datos en el programa estadístico SAS, como los valores eran muy diferentes, estadísticamente el error experimental era exagerado, lo cual no daba congruencia a dicho estudio, por tal razón los datos de analizaron hasta las 48 h.

4.3. Evaluacion de la Motilidad por Diluyente-Tiempo

Al adicionar los diluyentes al semen y realizar la evaluación correspondiente entre la h 0 y la h 3 se notó un efecto positivo y marcado sobre la motilidad, como se muestra en la gráfica 3, donde el Optidyl®, Optixcell 2® y Citrato de sodio con yema de huevo, presentan incrementos en el % de motilidad entre los dos periodos de tiempo, 65.83% a 71.87%, 56.67% a 61.67% y 56.67% a 60% respectivamente, proyectándose dicho efecto.

Cundo se hace uso de diluyentes para la conservación de la motilidad en una muestra de semen, se está adicionando todos los nutrientes necesarios para que los espermatozoides puedan mantenerse vivos, inclusive recuperar sus movimientos perdidos.

Al hacer la comparación de los diluyentes durante la h 6 a la h 12, el Optidyl® y Optixcell 2® presentan una mejor estabilidad en cuanto respuesta al % de motilidad (71.67%-70.83%) y (61.67% - 60%), en cambio el Citrato de sodio con yema de huevo nota valores de motilidad estables, pero más bajos en comparación con el resto de los diluyentes (55% - 54.17%).



Grafica 3. Comportamiento de la motilidad espermática con 3 diluyentes a través del tiempo.

De las 24 h en adelante la motilidad presentó un descenso considerable para los tres diluyentes, siendo el Optixcell 2® y Citrato de sodio con yema de huevo donde se refleja más dicho efecto. cuando transcurren las 48 h los % de motilidad caen muy marcadamente los % de motilidad para Optixcell 2 y Citrato de sodio con yema de huevo, mientras que Optidyl presenta cierta estabilidad, manteniendo el % de motilidad por encima del 60%.

V CONCLUSIONES

- En base al antecedente del uso de semen congelado se considera que la modalidad del semen en refrigeración podría ser una alternativa para su uso en la IA por sus mayores porcentajes de motilidad.
- Los resultados obtenidos del presente estudio, podrían lograr que Optidyl®, Optixcell 2® y Citrato de sodio con yema de huevo ofrezcan buenos resultados de la h 0 a al h 24 en modalidad de refrigeración para para IA.
- El optidyl®, por su destacado efecto en el comportamiento de la motilidad espermática en la modalidad de semen refrigerado, es la mejor opción para su empleo en IA y uso hasta los rangos de las 48 h en comparación con los otros dos diluyentes de este estudio.
- Se sugiere realizar plantear nuevos estudios para corroborar y encontrar nuevos datos al respecto.

VI LITERATURA CITADA

Angeles, N. Ramirez. (2019). Efecto de diluyentes a base de liposomas y yema de huevo en la criopreservación del semen caprino.

Augusto, G. P. N. G., y Ozanam, P. F. (2012). Componentes do plasma seminal e sua influência sobre a criopreservação e fertilidade de espermatozoides equinos (pp. 169–180). <http://hdl.handle.net/11449/141249>

Barrios, D. R. (2005). Consideraciones básicas acerca de la extracción de semen de toros mediante electroeyaculador (pp.1–3).

Bicudo, S.D.; Sousa, D.B.; Takada, L (2003). Possibilidades e limitações da inseminação com sêmen ovino refrigerado. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 27, (pp. 120-127)

Birogliatt, G. M. (2013). Evaluación de la capacidad reproductiva del toro y su impacto de calidad seminal. *XLI Jornadas Uruguayas de Buiatría* (pp.120–124).

Buzón, C. A. (2013). Análisis cinético y morfométrico del espermatozoide del caballo empleando el sistema Sperm Class Analyzer. Universidad de Córdoba Facultad de Veterinaria.

Contexto Ganadero (2019). Características que debe tener un diluyente de semen bovino. <https://www.contextoganadero.com/ganaderia-sostenible/estas-son-las-caracteristicas-que-debe-tener-un-diluyente-de-semen-bovino> (20 de Marzo 2019)

Cortes, E. S. A. C. (2017). Table of contents I - Physiology and anatomy of reproduction (pp.3–13).

Cortes, S., Santiago-Moreno J., Gonzalez-Bulnes A., 1996. Recogida de semen de muflón (*Ovis gmelini musimon*) mediante vagina artificial. Trofeo 1317, (pp.34-36).

Crespo, C. C. (2020). Evaluación de semen bovino utilizando medios comerciales de criopreservación, Provincia de Morona Santiago, Ecuador. Universidad Nacional de Córdoba.

Cuevas, A. K. M. (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.

Curbelo, C. M., y Rodríguez, R. Z. (2013). Relevamiento de laboratorios de procesamiento de semen bovino en Uruguay. Tesis de grado. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Veterinaria.

Diaz, D. N. A., & López, C. P. A. (2018). Protocolos de criopreservación de semen bovino (pp. 2–15).

Diaz, T. M., Garcia, R. P., y Rodriguez, A. M. (1989). Técnica de inseminación artificial en el conejo. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, Madrid.

Duarte, E. C. C. (2012). Efecto de la aplicación de oxitocina sobre la calidad seminal en bovinos en el trópico húmedo. <https://repositorio.leon.uia.mx/xmlui/12345678/90>

- England, G.C.W.;** Ponzio, P (1996). Comparision of the quality of frozen-thawed an cooled-rewarmed dog semen. *Theriogenology*, v. 46, (pp. 165-171).
- Escamilla, A. R.** (2005). Aplicación de clorhidrato de xilacina (0.05 mg/kg) en toros como facilitador de la colecta de semen con el método de electroeyaculador. Licenciatura tesis, Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Espitia, A.,** Prieto, E., y Cardozo, J. (2006). Pubertad y circunferencia escrotal en toros puberty and scrotal circumference in holstein x zebu , zebu and romosinuano bulls.
- Evans, A. C. O.,** y Rawlings, Y. (2010). Fisiología de la pubertad de terneros y terneras. *Taurus*, Bs. As, 12(45), (pp.11-23). www.produccion-animal.com.ar
- Garde, J.** (1993). Universidad Computense de Madrid Facultad de Veterinaria Departamento de Patología Animal II congelación de semen de la especie ovina : Julián Garde López-Brea Isabel Vázquez González.
- Giulini, S.,** Pesce, F., Madgar, I., Marsella, T., Volpe, A., de Aloysio, D., y Battaglia, C. (2004). Influence of multiple transrectal electroejaculations on semen parameters and intracytoplasmic sperm injection outcome - PubMed (pp. 200–204). <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2003.11.052>
- Gómez, V.,** y Migliorisi, A. L. (2015). Protocolo para la evaluación de semen en rumiantes, Sitio Argentino de Producción Animal. (pp.1-9).

Griswold, M. D. (2016). Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis. *Physiological reviews*. 1–17. <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2015>

Gualancañay, G. B. V. (2012). Manejo de toros donadores de semen.

Guevara, J. A. (2019). Universidad San Francisco de Quito (USFQ) Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales Espermatogénesis in vitro en bovinos.

Hafez, E., y Hafez, B. (2000). Reproducción e inseminación artificial en animales. Kiawah Island, South Carolina USA: McGraw-Hill Interamericana.

Hafez, E. S. E. (2002). Anatomía del aparato reproductor del macho. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7a Ed. México: McGraw-Hill. (pp. 3–12).

Hammerstedt, R. H., Graham, J. K., y Nolan, J. P. (1990). Cryopreservation of mammalian sperm_ what we ask them to survive - PubMed (pp. 73–88).

Holt, W. V. (2000a). Basic aspects of frozen storage of semen - ScienceDirect (pp. 3–22).

Holt, W. V. (2000b). Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1–3), 3–22. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00152-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00152-4)

Hynes, V., Cruciani, O., Morgui, G., y Gorla, N. B. (2014). Evaluación de semen equino refrigerado con 3 diluyentes alternativos.

IMV, T. (S/f). OptiXcell. <https://doi.org/https://www.imv-technologies.com/>

Lemma, A. (2011). Effect of Cryopreservation on Sperm Quality and Fertility.

López, G. M. J., Urbano, F. A., y Cárdenas, P. M. (2012). Manual de laboratorio para el análisis del semen.

Macías, G. B., González Fernández, L., Ortega Ferrusola, C., Salazar-Sandoval, C., Morillo Rodríguez, A., Rodríguez Martínez, H., Tapia, J. A., Morcuende, D., y Peña, F. J. (2011). Membrane Lipids of the Stallion Spermatozoon in Relation to Sperm Quality and Susceptibility to Lipid Peroxidation. In *Reproduction in Domestic Animals* (Vol. 46, Issue 1, pp. 141–148). <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01609.x>

Madrid, B. N. (2005). Manual de Ganadería Doble Propósito (Issue November).

Manual de Triladyl. (n.d.). Manual Triladyl ® Verdünner für Bullensamen Culture Medium for Bull Semen Diluyente de Semen Bovino. 49(0). (pp. 0-3).

Martínez, E.J.; López A. Inseminación Artificial a Tiempo Fijo en rodeos de cría utilizando semen fresco. Proyectos de investigación y experimentación, Centro de Altos Estudios Jorge Gándara, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Católica Argentina.

Mazur, P. (1984). Freezing of living cells: mechanisms and implications. *The American journal of physiology* (pp. 125–142). <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1984.247.3.C125>

- Mejía, O., Ramos-Contla, D., Rivera-Rebolledo, J., Ordáz-López, R., y M., P.-I. (2008).** Congelación de semen de borregos Cimarrón (*Ovis canadensis mexicana*) obtenido mediante electroeyaculación o post-mortem.
- Moncayo, P. S. A. (2016).** Evaluación de la calidad seminal de reproductores bovinos antes y después del proceso de crioprese.
- Morillo, M., Salazar, S., y Castillo, E. (2012).** Evaluación potencial reproductivo macho bovino (ven).
- Muñoz, B. T., Pérez-Pé, R., y Cebrián-Pérez, J. A. (2008).** Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. In *Reproduction in Domestic Animals* (Vol. 43, Issue SUPPL.4, pp. 18–31). <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01228.x>
- Muñoz, O. R. (2008).** Evaluación de la motilidad y viabilidad del semen bovino mediante el uso de sistemas casa y citometría de flujo: identificación de subpoblaciones espermáticas . Universidad de Santiago de Compostela.
- Narro, A. (1998).** Sesión Solemne ~ V Aniversario Universidad Autónoma Agraria ' Antonio Narro " Universidad Autónoma Agraria · Antonio Narro ". http://biblioteca.diputados.gob.mx/janium/bv/dp/lvii/sesol_lxxv_uniautag_antnarro.pdf
- Olivares, R. ., y Urdaneta, R. (1985).** Colección, evaluación y procesamiento del semen de toros(pp.2932).<http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=UCC.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=078921%0Ahttp://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=catalco.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=049605>

- Olivera, M., Agr, S., Ruiz, T., Tarazona, A., & Giraldo, C. (2006).** El espermatozoide , desde la eyaculación hasta la fertilización. 19, (pp. 426-436).
- Padrón, D. R. S., Fernández, L. G. M., y Gallardo, R. M. (1998).** Interpretación del análisis seminal.
- Páez, B. E. M., y Corredor, C. E. S. (2014).** Evaluación de la aptitud reproductiva del toro Breeding soundness Evaluation of the Bull July. <https://doi.org/10.19053/01228420.3837>
- Palacios, J. R. (2014).** Sistema reproductor masculino: Anatomía Sistema (pp. 1-12).
- Palomino, L. T., Camacho, J. S., Huanca, W. L., y Falcón, N. P. (2001).** Conservación de semen caprino en los dilutores citrato-yema y leche-descremada yema. 12(1), (pp. 1-7).
- Parks, J. ., y Graham, J. K. (1992).** Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes (pp. 209–222).
- Pérez, S, L. M. (2008).** Comparación de dos diluyentes para la criopreservación de semen ovino. Tesis de Licenciatura, Universidad de la Salle.
- Pytlík, J., Savvulidi, F. G., Duchajek, J., Nagy, S., y Stádník, L. (2022).** Efecto del diluyente sobre la calidad y resiliencia a la incubación del semen crioconservado de toros Holstein. 2022(3), (pp. 75-86).
- Reyes, F. F. (2005).** Evaluación de dos diluyentes para la conservación de semen ovino: Yema de Huevo comparado con Lecitina de Soya.

Ribeiro, P. A., Munita-Barbosa, L., Yumi-Kanazawa, M., Mello-Martins, M. I., y Ferreira De Souza, F. (2014). Criopreservación de espermatozoides bovinos extraídos de la cola del epidídimo utilizando los métodos convencional y automatizado. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 46(1), 31–38. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2014000100005>

Rodríguez, A. Á., Ibarra, A. K. V., Santos, J. A. G., y Barragán, J. A. H. (2018). Recolección y manipulación seminal in vitro.

Rodrigues, M. D. P., & Valenzuela, M. S. (2019). Efecto del semen refrigerado sobre la calidad espermática y tasa de preñez en ovinos. (pp.205–206). <https://doi.org/10.26885/rcei.foro.2019.205>

Rodriguez, O. L., Berndtson, W. E., Ennen, B. D., y Pickett, B. W. (1975). Effect of Rates of Freezing, Thawing and Level of Glycerol on the Survival of Bovine Spermatozoa in Straws *Journal of Animal Science Oxford Academic* (pp. 129–136). <https://doi.org/10.2527/jas1975.411129x>

Rooij, D. G. DE, y Griswold, M. D. (2012). Questions About Spermatogonia Posed and Answered Since 2000. *Andrology*, (p. 33).

Rutter, B., y Russo., A. (2006). Bases para la evaluación de la aptitud reproductiva del toro. <https://buiatriaecuador.org/bases-para-la-evaluacion-de-la-aptitud-reproductiva-del-toro/>

Sánchez, I. J. P. (2019). Estudio Comparativo de Tres Diluyentes de Semen Bovino (Triladyl,

Andromed Y Optidyl) para su Criopreservación. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Santiago, j., Bulnes, A. G. de, Brunet, Sebastián, A. G., y López, A. (1996). Técnicas de manejo reproductivo en muflones (II) (*Ovis gmelini musimon*)_ Inseminación artificial y transferencia de embriones (pp. 33–38).

Sarabia, V. L. (2015). Espermiograma Según Los Criterios de La OMS 5 Edición. <https://es.scribd.com/doc/98228428/Espermiograma-Segun-los-criterios-de-la-OMS-5ª-Edicion>

Sequeira, L. T. (2005). Andrologia e inseminacion artificial.

Serrato, S. R. (1982). Respuesta de pastizal mediano abierto a diferentes sistemas de pastoreo.

Sharma, R., y Agarwal, A. (2011). Sperm Chromatin. Sperm Chromatin. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6857-9>

Simplício, A.A.; Freitas, V.J.F.; Fonseca, J.F (2007). Biotécnicas da reprodução como técnicas de manejo reproductivo em ovinos. Revista Brasileira de Reprodução Animal, v. 31, (pp. 234-246).

Solis, D. C. (2014). Estudio comparativo de 3 diluyentes (Tris, Citrato de sodio y Triladyl) en el procesamiento de semen bovino (p.76).

Souza, F. (2014). Criopreservación de espermatozoides bovinos extraídos de la cola del

epidídimo utilizando los métodos convencional y automatizado. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 46(1), 31–38. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2014000100005>

Staub, C., y Johnson, L. (2018). Review: Spermatogenesis in the bull. *Animal*, 12(s1), s27–s35. <https://doi.org/10.1017/S1751731118000435>

Töpfer, E., E.-H., M., K., C., L., y T., & Sieme, H. (2005). The role of stallion seminal proteins in fertilisation. *PubMed* (pp. 89(1-4), 159–170.). <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.06.018>

Trejo, C. A., Meza, V. V. M., Antonio, E. C., Cotera, R. J., y Antonio, C. C. M. (2013). Agua de coco (*Cocos nucifera*) como diluyente para semen fresco de conejo en la inseminación artificial. *Arch. Zootec*, 62 (238), 299-302. <https://dx.doi.org/10.4321/S0004-05922013000200017>

Troedsson, M. H. T., Desvougues, A., Alghamdi, A. S., Dahms, B., Dow, C. A., Hayna, J., Valesco, R., Collahan, P. T., Macpherson, M. L., Pozor, M., y Buhi, W. C. (2005). Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. In *Animal Reproduction Science* (Vol. 89, Issues 1-4 SPEC. ISS., pp. 171–186). <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.07.005>

Turman, E. J., y Rich, T. . (2010). *Reproductive Tract Anatomy and Physiology of the Bull* (pp. 1-4).

Veloz, D. M. V. (2017). sistema CASA (análisis seminal asistido por computadora) y su respuesta con la fertilidad por inseminación artificial (pp. 1-75).

- Vera, C. C. A.** (2011). Evaluación de la validez de la cría y análisis de semen para predecir la fertilidad del toro (pp. 1-73).
- Vilanova, F. L. T., y Ballarales, B. P. P.** (2005). La evaluación andrológica: justificación y métodos.
- Vishwanath, R.** (2003). Artificial insemination: the state of the art. *Theriogenology*, (pp.571-584).
- Vishwanath, R., y Shannon, P.** (2000). Storage of bovine semen in liquid and frozen state (pp. 23-53).
- vivanco, M. H. W.** 1998. Inseminación artificial en ovinos. Memorias del Seminario Internacional: Aplicaciones de Técnicas Biotecnológicas en la Reproducción de Ovinos y Caprinos. Universidad Autónoma Chapingo, México, (pp.135-194).
- Watso, P. F.** (1955). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function (pp. 871–891).
- Watson, P. F., y Holt, W. V.** (1997). Cryopreservation of Semen from Domestic Livestock _ SpringerLink (pp. 189–197).
- Whittier, J.** (2010). Reproductive Anatomy and Physiology of the Bull Jack.