

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA**

**“ANTONIO NARRO”**

**DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL**



***Estudio comparativo de 3 diluyentes (Tris, Citrato de sodio y Triladyl) en el procesamiento de semen bovino.***

**Por:**

**DIEGO CRUZ SOLÍS**

**TESIS**

Presentada como requisito para

Obtener el título de:

**Ingeniero Agrónomo Zootecnista**

**Buenvista Saltillo, Coahuila, México.**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**

***DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL***

***DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL***

**ESTUDIO COMPARATIVO DE 3 DILUYENTES (TRIS, CITRATO DE SODIO Y TRILADYL) EN EL PROCESAMIENTO DE SEMEN BOVINO.**

**POR:**

**DIEGO CRUZ SOLÍS**

**TESIS**

Que se somete a consideración del H. Jurado Examinador y aprobado como requisito parcial para obtener el título de:

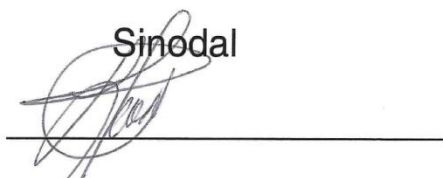
**INGENIERO AGRÓNOMO ZOOTECNISTA**

Presidente del jurado



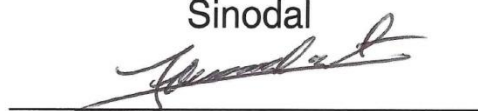
M.C. Laura E. Padilla González

Sinodal



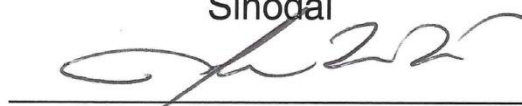
M.C. Laura Maricela Lara López

Sinodal



M.C. Sergio Sánchez Martínez

Sinodal



M.C. Pedro Carillo López

Coordinador de la División de Ciencia Animal



Dr. Ramiro López Trujillo



BuenavistaSaltillo, Coahuila, México. Noviembre 2014

- **DEDICATORIA**

**A DIOS**

Por darme la vida, por estar siempre a mi lado y por darme una gran familia.

**A MIS PADRES**

*Segundo Cruz Tapia*

*Estela Solís Barrios*

Por ser siempre un apoyo moral, espiritual, por la confianza que pusieron en mí, por conducirme al mejor camino, por haberme dado la oportunidad de terminar mis estudios y por su dedicación a mi educación; a ustedes les dedico este trabajo como un pequeño fruto de todo su esfuerzo que han hecho por mí y mis hermanos, agradezco a Dios por haberlos elegido como mis padres.

**A MIS HERMANOS**

*Sergio Cruz Solís*

*Brenda Abigail Cruz Solís*

Por su afecto, cariño, por ser mis amigos durante toda mi vida, por estar hay en los buenos y malos momentos, gracias por toda la alegría que desde niños compartimos y muchas gracias por toda la paciencia y comprensión que siempre me han tenido.

- **AGRADECIMIENTOS**

**A la M.C. Laura E. Padilla González** por darme la oportunidad y toda la ayuda brindada en la realización de este trabajo de investigación, por su confianza y paciencia, gracias por sus sabios consejos que me ayudaron a culminar este trabajo y sobre todo por su gran amistad.

**A la M.C. Laura Maricela Lara López** por toda su ayuda en el laboratorio, por su tiempo y sus consejos que me fueron de gran ayuda.

**Al M.C. Sergio Sánchez Martínez** por su gran apoyo en el diseño experimental utilizado, por la paciencia, por su gran amabilidad y disposición que siempre mostro.

**Al M.C. Pedro Carillo López** por su apoyo brindado durante el trabajo de investigación como apoyo en la práctica del proceso de extracción y evaluación de semen bovino.

**Al T.A. Agustín Carlos Zavala Rodríguez** por su apoyo incondicional en las instalaciones de pie de cría de la universidad, por su disponibilidad y gran sabiduría transmitida.

A mis compañeros y amigos de la generación CXVI por su gran compañía y amistad.

Agradezco a mis profesores que tuve durante mi formación por transmitirme su conocimiento.

Con mucho orgullo a mi “**alma mater**”.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

	<b>Página</b>
INDICE DE CUADROS.....	XI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XII
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
• Objetivos.....	3
• Hipótesis.....	3
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>	<b>4</b>
• Historia de la congelación de semen.....	4
• Características generales del semen.....	5
- Espermatozoides.....	5
- Plasma seminal.....	6
• Extracción y recolección del semen.....	7
• Evaluación de semen bovino.....	9
- Volumen.....	9
- Apariencia.....	9
- Motilidad.....	11
- Concentración.....	12
- Morfología.....	13
• Principios de la conservación del semen.....	15
- Temperatura.....	15

- Nutrientes (fuentes de energía).....	16
- Presión osmótica.....	17
- PH.....	18
- Condiciones de oxígeno y CO <sub>2</sub> .....	19
• Procesamiento y conservación de semen bovino.....	20
- Generalidades de diluyentes para semen bovino.....	20
- Principales diluyentes utilizados para semen bovino.....	22
✓ Triladyl.....	22
✓ Citrato – yema.....	22
✓ Tris.....	23
✓ Universal de IMV.....	23
✓ Andromed.....	23
- Sustancias buffer.....	24
- Efecto biológico de la yema.....	25
- Antibióticos.....	25
- Gliceralización.....	26
• Condiciones necesarias en el procesamiento de semen.....	28
- Tiempo de equilibración.....	28
- Congelación.....	28
- Almacenamiento.....	30
• Evaluación post – descongelación de semen procesado.....	30

<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
• Localización del área de estudio.....	31
• Materiales.....	31
• Sementales utilizados.....	32
• Método de obtención de la muestra de semen.....	33
• Evaluación de la muestra de semen.....	34
• Preparación de diluyentes.....	37
- Preparación de Citrato de sodio.....	37
- Preparación de Tris.....	39
- Preparación de Triladyl.....	41
• Dilución del semen.....	42
• Cálculos de dilución.....	42
• Gliceralización y equilibración.....	43
• Envasado de semen.....	44
• Congelamiento y almacenamiento de pajillas.....	45
• Evaluación post-descongelación.....	45
• Diseño experimental.....	45
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>47</b>
<b>V. CONCLUSIONES.....</b>	<b>59</b>
<b>VI. RESUMEN.....</b>	<b>60</b>
<b>VII. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>62</b>

## XI. ÍNDICE DE CUADROS

	<b>Pagina</b>
<b>Cuadro 1.</b> Componentes y proporciones utilizadas en el diluyente Citato – yema.....	38
<b>Cuadro 2.</b> Componentes y proporciones utilizadas en el diluyenteTris.....	40
<b>Cuadro 3.</b> Componentes y proporciones utilizados en el diluyenteTriladyl.....	41
<b>Cuadro 4.</b> Evaluación del semen de los toros utilizados.....	47
<b>Cuadro 5.</b> Recuperación espermática post – descongelación.....	49
<b>Cuadro 6.</b> Análisis de varianza.....	51
<b>Cuadro 7.</b> Resumen estadístico de los tratamientos.....	52
<b>Cuadro 8.</b> Comparación de medias de Tukey.....	54



## XII. ÍNDICE DE GRAFICAS

	<b>Pagina</b>
<b>Grafica 1.</b> Normalidad de los datos.....	50
<b>Grafica 2.</b> Intervalos de confianza.....	53
<b>Grafica 3.</b> Medias de los tratamientos.....	55
<b>Grafica 4.</b> Efecto del tiempo de almacenamiento en los diluyentes utilizados.....	56
<b>Grafica 5.</b> Motilidad inicial y motilidad post-descongelación de semen procesado.....	57

## **I. INTRODUCCION**

La Inseminación Artificial (IA) es un procedimiento biotecnológico reproductivo, que implica la maximización de la capacidad reproductiva de los toros como reproductores élitos y que han demostrado ampliamente un gran aporte al mejoramiento genético del ganado bovino en diferentes partes del mundo. Sin embargo, uno de los factores que influyen en esta técnica es la calidad de semen relacionado con la capacidad reproductiva del macho, manejo del semen y los métodos de criopreservación (Lozano, 2009).

Hace aproximadamente 50 años la tecnología para la conservación del semen ha revolucionado, esto con la finalidad de que se obtenga un semen de mejor calidad y al menor precio posible (Holt, 2000).

Los espermatozoides sometidos a criopreservación están sujetos a una serie de alteraciones morfológicas como dilatación, ruptura de la membrana plasmática, degeneración acrosomal y lesiones en las mitocondrias. El éxito en la criopreservación depende del mantenimiento del potencial fertilizante de los espermatozoides, que deben ofrecer la integridad y funcionalidad de las diferentes estructuras celulares (Hummersted *et al.*, 1990).

Sin embargo, la congelación y descongelación de semen de toro conduce al daño o la muerte hasta del 30% de los espermatozoides, reduciendo el porcentaje de espermatozoides móviles aproximadamente en un 50% (Chaveiro *et al.*, 2006).

Con fundamento en lo anterior es indispensable tener los conocimientos teóricos y prácticos sobre la metodología de procesamiento de semen congelado lo cual contribuya a ser más eficiente y de menor inversión la técnica de Inseminación Artificial.

El complemento relevante incluido en la conservación del semen procesado es el tipo de diluyente utilizado ya que de él depende la supervivencia del espermatozoide y por lo tanto el mantener la capacidad de fecundación, el medio debe reunir ciertas características que permitan ofrecer una respuesta favorable, tener capacidad amortiguadora, el permitir la resistencia a la congelación y descongelación, entre otras; de ahí la necesidad de conjugar estas características en el medio nutritivo que permitan una mayor viabilidad de los espermatozoides.

Dada la importancia de lo anteriormente expuesto para esta tesis se plantearon los siguientes objetivos:

- **OBJETIVO GENERAL**

Estudio de 3 diluyentes para la conservación de semen bovino (Tris, Citrato de sodio y Triladyl).

- **OBJETIVO ESPECÍFICO**

Evaluar la motilidad post-descongelación de cada diluyente.

- **HIPOTESIS**

Se plantean dos hipótesis para este experimento.

$$H_0: \tau_i = \tau_j \text{ ( todos los tratamientos son iguales)}$$

$$H_1: \tau_i \neq \tau_j \text{ ( al menos un tratamiento es diferente)}$$

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

- **HISTORIA DE LA CONGELACIÓN DE SEMEN**

El primer reporte de criopreservación de semen, fue realizado por Spallanzani en el año de 1776, quien observó que cuando los espermatozoides de humano, gata y rana eran enfriados en nieve hasta 30 minutos se volvían inactivos pero podían ser reactivados; la reducción de la temperatura fue empleada para deprimir la actividad metabólica y prolongar la vida activa del espermatozoide. Un siglo después Mantegazza (1866), observó que el espermatozoide de humano sobrevivió en semen congelado a  $-17^{\circ}\text{C}$ , éste fue uno de los primeros reportes de recuperación de células de mamíferos después de haber sido expuestas a bajas temperaturas en un punto de congelación (Bwanga, 1991).

La primera vez que se realizó con éxito la congelación de material seminal fue cuando Polge *et al.* (1949) demostraron el poder crioprotector del glicerol. Estos investigadores lograron recuperar espermatozoides de varias especies después de congelarlos en solución con este agente crioprotector. El gran descubrimiento de la acción crioprotectora del glicerol abrió una era exitosa en la criopreservación no solo de gametos de varias especies, sino también de otras células y tejidos. Los reportes de fertilidad con espermatozoides congelados de toro condujeron a un intenso desarrollo en la siguiente década de métodos de criopreservación que pudiera ser aplicado en programas de

inseminación. Stewar (1951) guío un intenso desarrollo de métodos de criopreservación que pudieran ser aplicables para los propósitos en práctica de inseminación (Bwanga, 1991).

- **CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL SEMEN**

- ESPERMATOZOIDES

Graham (1996) menciona que las cualidades que deben tener los espermatozoides de un eyaculado fecundante son: motilidad progresiva, morfología normal, metabolismo energético activo, capacidad para desarrollar una motilidad hiperactiva, integridad estructural y funcionalidad de la membrana, integridad de las enzimas asociadas con la fecundación, capacidad de penetración y transferencia óptima del material genético.

Holy (1983) define que los nemaspermos representan la parte principal del eyaculado transportando el material genético en forma de ácido desoxirribonucleico (DNA) como fuente de información genética.

Según Hafez (1968) el espermatozoide es una célula altamente especializada y condensada que no crece ni se divide. Está constituida esencialmente por una cabeza que contiene el material hereditario de los progenitores, y una cola que le proporciona el medio de locomoción. No desempeña papel alguno en la fisiología del animal que lo produce, y solamente se ocupa de fecundar al ovulo para así producir nuevos individuos.

Hafez y Hafez (2000) mencionan que los espermatozoides se forman en los túbulos seminíferos de los testículos. Los espermatozoides maduros son células alargadas consistentes en una cabeza aplanada portadora del núcleo y una cola que contiene el aparato necesario para la movilidad celular. El espermatozoide entero está cubierto por el plasmolema o membrana plasmática. El acrosoma, o casquete acrosómico, es una estructura de doble pared situada entre la membrana plasmática y la porción anterior de la cabeza del espermatozoide.

#### - PLASMA SEMINAL

Hafez (1968) señala que el plasma seminal es una mezcla de las secreciones de las glándulas sexuales accesorias (epidídimo, glándulas vesiculares y próstata), puede contener mucoproteínas, péptidos, aminoácidos libres, lípidos, ácidos grasos, vitaminas y enzimas. Además menciona que el plasma seminal contiene algunos compuestos orgánicos (fructosa, ácido cítrico, sorbitol, inositol glicerilfosforilcolina y ergotioneína), estas sustancias son producidas por las distintas glándulas accesorias, en respuesta al efecto de la testosterona procedente de los testículos; La función primordial del plasma seminal es transportar los espermatozoides al aparato reproductor femenino.

Por su parte Holy (1983) menciona que el plasma seminal es la parte líquida del eyaculado y sirve como vehículo, estimulante y diluyente de energía y protección, asegurándoles así la sobrevivencia y fertilidad fuera del

organismo. Además menciona que el plasma seminal es producido por el sistema de glándulas accesorias, depende cualitativa y cuantitativamente de la función endocrina de los testículos.

Es la suspensión celular líquida que contiene a los gametos masculinos (espermatozoides) y las secreciones de los órganos sexuales del aparato reproductor masculino y que se mezclan en el momento de la eyaculación, además facilita un medio nutritivo de osmolaridad y volumen adecuados para vehicular los espermatozoides hacia el moco endocervical, donde termina su contribución al proceso de fertilización (Aisén, 2004).

De Alba (1964) indica que el plasma seminal sirve como medio de suspensión a los espermatozoides, y asimismo proporciona a ellos materias metabólicas alimenticias y electrolitos. Los principales componentes del plasma seminal son: cloruros de potasio, sustancias nitrogenadas, ácido cítrico, fructosa, ácido ascórbico, inositol, fosfatos, ácido láctico y componentes de colina.

- **EXTRACCIÓN Y RECOLECCIÓN DEL SEMEN**

La obtención del semen, es el primer paso dentro de un programa de inseminación artificial, 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, 1995).



Salisbury y Vandemark(1961) mencionan que los métodos más utilizados para la colección del semen bovino son la vagina artificial y la electroeyaculación. El procedimiento primitivo de colección del esperma de la misma vagina después de una copula natural se usa raramente, ya que dicho semen resulta contaminado por las secreciones genitales de la vaca. La colección seminal mediante amasamiento de las ampollas deferenciales y de las glándulas accesorias, por vía rectal, ha caído en desuso, ya que el semen recogido de esta manera aparece frecuentemente mezclado con orina y gran cantidad de bacterias.

Hafez (1968) señala que el mejor procedimiento para la recolección del semen es el uso de la vagina artificial. Esta es de simple construcción y simula una copula natural. Aunque hay variedad de vaginas artificiales que difieren en tamaño y figura para especies distintas. Esta unidad proporciona la temperatura, presión y lubricación adecuada para provocar la eyaculación, y lleva adherido un tubo para recoger el semen.

La recolección de semen con electroeyaculador produce un volumen y concentración menor, este tiene ventajas cuando se trabaja con toros que no están acostumbrados al manejo, cuando son muchos sementales o bien, cuando estos presentan defectos físicos no hereditarios sobre todo en las patas, lo que les impide efectuar una monta natural y dificultan la colección de semen con vagina artificial, este método consiste en provocar la eyaculación por medio de estímulos eléctricos de menor a mayor intensidad,

el aparato contiene un electrodo que se introduce en el recto y a un transformador que manda la corriente eléctrica (Instituto Nacional de Capacitación del Sector Agropecuario, 1983).

- **EVALUACIÓN DE SEMEN BOVINO**

- VOLUMEN

Bonadonna (1989) indica que la cantidad de semen varía entre los individuos, pero a veces también varía en el mismo individuo, por el conjunto de factores que pueden actuar sobre la sexualidad masculina: especie, raza, edad, estación del año, alimentación. Además relaciona la cantidad de semen eyaculado con el peso vivo, y da los siguientes datos, por 100 kg de peso vivo: toro 0,6 ml, carnero 1,6 ml, verraco 200 ml.

El volumen del eyaculado varia de un toro a otro y dentro del mismo animal, en general, el volumen espermático aumenta con la edad y el tamaño corporal del toro y cambia según su estado higiénico reproductor, su vigor sexual y la frecuencia de su uso (Salisbury y Vandemark, 1961).

- APARIENCIA

Bonadonna (1989) menciona que en general el semen es de color blanco cremoso, que más o menos tiende al tono marfil, en relación con la cantidad de espermatozoides contenidos. Se vuelve color amarillo cuando se mezcla con orina, a veces es color verdoso, lo cual indica la existencia de procesos necrotizantes, de carácter purulento causados por algún órgano del aparato

genital masculino, puede estar coloreado de rojo vivo por la presencia de sangre cuando hay heridas recientes en el prepucio, el glande o la uretra, a menudo producidas durante la recolección artificial.

Salisbury y Vandemark (1961) definen que el semen bovino es blanco lechoso, no obstante, un cierto número de toros (hasta un 10%) produce un esperma normalmente amarillo, este tono amarillento es un carácter normal del semen bovino y es inocuo para las células espermáticas, esto no influye en modo alguno sobre la fertilidad masculina.

El semen debe presentar una apariencia opaca, relativamente uniforme, lo que indica alta concentración de espermatozoides. Una muestra que parezca traslucida, contiene pocas células espermáticas. Dicha muestra debe estar libre de pelos, suciedad u otros materiales contaminantes. El semen que contenga materiales extraños u apariencia grumosa no debe ser usado, porque esto indica procesos inflamatorios. Algunos toros producen semen de color amarillento, lo cual se debe a la presencia de riboflavina. Esto no es perjudicial y no debe confundirse con la orina que tiene un olor diferente (Hafez1968).

Por su parte Holy (1983) dice que el color del semen bovino depende de la concentración de nemaspermos, el semen de buena calidad tiene un color blanco lechoso, grisáceo lechoso o amarillo cremoso. En toros alimentados con yerba verde el semen puede poseer un color amarillento por el aumento de algunos colorantes naturales (riboflavina o carotenos).

## - MOTILIDAD

Se considera un 70% como recomendable para lograr buenas tasas de fertilidad, siendo esta observación subjetiva (Hafez y Hafez, 2000).

Este parámetro ha sido y sigue siendo el más utilizado para valorar la calidad de un eyaculado o de una dosis seminal, la motilidad es una manifestación de viabilidad espermática y de integridad celular. Un eyaculado con un porcentaje bajo de espermatozoides móviles, o ausencia de motilidad, automáticamente será descartado para su conservación (Den Daas, 1992; Holt y Van Look, 2004).

La motilidad del espermatozoide se caracteriza por breves impulsos de progresión, determinados por el movimiento de látigo de la cola, combinados con un cambio de dirección de derecha e izquierda por un simple movimiento de rotación de la cabeza en torno a su eje longitudinal (Salisbury y Vandemark, 1961).

Bonadonna (1989) indica que los espermatozoides pueden presentar normocinesis, hipocinesis, o hipercinesis, en relación con el grado de su motilidad. Además menciona que los movimientos de los espermatozoides que normalmente se tienen en cuenta son los siguientes; progresivo, ondulatorio, rotatorio y de retroceso.

Según Holy (1983) El movimiento del nemaspermio se orienta rectilíneamente en dirección craneal siguiendo la dirección del eje longitudinal, además

menciona que los nemaspermos vivos en condiciones de la temperatura corporal se mueven muy intensamente y con la disminución de la temperatura el movimiento rectilíneo poco a poco pierde su intensidad y velocidad.

El Instituto Nacional de Capacitación del Sector Agropecuario (1983) define que la estimación del movimiento se hace por medio de la observación al microscopio de una gota de semen sin diluir, el vigor estará dado por el movimiento individual de las células espermáticas y la concentración de estas. Si la mayoría de las células se encuentran en movimiento rápido y buena concentración, se producirá lo que se le conoce con el nombre de "olas". Este movimiento en masa se clasifica de la siguiente manera:

Muy bueno= ondas oscuras en rápido movimiento

Bueno = ondas aparentes, movimientos moderados

Regular = ondas en movimiento apenas perceptible

Pobre = no hay ondas, células espermáticas móviles

Muy pobre= no hay células móviles

#### - CONCENTRACIÓN

Según Hafez (1968) es muy importante la determinación exacta de la concentración, o número de espermatozoides por mililitro de semen, ya que esto es una de sus características más variables que se usan para juzgar la

calidad del mismo. La concentración, cuando esta combinada con el volumen y el porcentaje de espermatozoides móviles, da el número de espermatozoides móviles por eyaculación: cantidad que determina cuantas hembras pueden ser inseminadas.

Salisbury y Vandemark (1961) indican que la concentración depende del desarrollo y de la madurez sexual del toro, del régimen dietético, del estado de salud y del tamaño testicular. Señalan que hay verdaderas diferencias de concentración seminal entre toros, entre edades, en las épocas del año y en las diferentes áreas geográficas. Además mencionan que el número de zoospermios por unidad de volumen del semen bovino varía desde cero, en caso de azoospermia completa, a más de 3 billones ( $3.000 \times 10^6$ ) por ml en algunas muestras de extraordinaria densidad.

La densidad o concentración del semen expresa el contenido de espermios en una unidad de volumen ( $\text{mm}^3$  o  $\text{cm}^3$ ) y su apreciación tiene gran significado no solo para la clasificación sino para la dilución del semen. La concentración del semen bovino varía en amplios límites, oscilando entre 0,2 hasta 3,2 millones de espermatozoides por ml cúbico con un promedio entre 1,2 y 1,5 millones (Holy, 1983).

#### - MORFOLOGÍA

Si la proporción de anomalías es más del 20%, entonces nos encontramos ante un semen de baja fertilidad y entre las anomalías más frecuentes se encuentran espermatozoides sin cola, cabeza grande, cabeza

pequeña, cola reducida, cabeza adelgazada, rotura de cuello y acrosoma anormal (Hafez & Hafez, 2000).

De Alba (1964) menciona que los espermatozoides de diversas especies exhiben una extraordinaria similitud tanto en tamaño como en forma. Se divide en tres partes: cabeza, cuello y cola. La cabeza mide de 5 a 12 micras de largo y 2.5 a 4.25 de ancho. Es aplanada, o con una cara más ancha que la otra. El cuello es sumamente corto y le sigue una cola de 40 a 150 micras de largo dividida en una parte media llamada cuerpo por algunos autores, una parte principal y una final. El tamaño total del espermatozoide no guarda ninguna relación con el peso del animal que lo produce.

Holy (1983) señala que la estructura morfológica de un nemaspermo es una característica vital y su evaluación crítica indica de modo extraordinario la capacidad de fecundación del nemaspermo y por último la calidad total del semen. Además menciona que el nemaspermo puede realizar sus funciones biológicas fundamentales solo cuando esta cualitativamente y morfológicamente bien constituido, es decir, cuando posee la estructura típica de la cabeza, cuello, parte intermedia y cola.

Según Salisbury y Vandemark (1961) los espermatozoos afectados por anomalías morfológicas no son probablemente fértiles. La fertilidad del toro que los produce depende de la proporción existente entre este tipo de células espermáticas y los zoospermios normales del semen. Sin embargo, algunos

espermatozoos morfológicamente normales son deficientes en DNA, lo que se refleja en su escasa fertilidad.

El semen de la mayoría de los animales contiene algunos espermatozoides anormales, por lo general esto no va asociado con la fecundidad baja, siempre y cuando la proporción de espermatozoides anormales exceda el 20%, y aun así algunos tipos no están asociados con la infecundidad (Hafez, 1968).

- **PRINCIPIOS DE LA CONSERVACIÓN DEL SEMEN**

- TEMPERATURA

Salisbury y Vandemark (1961) mencionan que los límites térmicos fisiológicos para los espermatozoides de bovinos o bien los márgenes de oscilación de temperatura en que se mantiene la vida de los mismos, varía desde niveles muy bajos (todavía no bien definidos) de  $-196^{\circ}\text{C}$  como mínimo (temperatura del nitrógeno líquido) hasta un nivel superior de  $50^{\circ}\text{C}$ .

Tanto el cociente del metabolismo como la movilidad de los espermatozoides varían con la temperatura. Un aumento de  $10^{\circ}\text{C}$  por arriba de la temperatura ambiente hará que el índice metabólico suba más del doble, con un descenso correspondiente en la duración de la vida. Por arriba de  $50^{\circ}\text{C}$ , los espermatozoides, a los 5 minutos sufren una pérdida irreversible de su movilidad, y la mayoría de las células se tiñen de rojo (Hafez, 1968).



## - NUTRIENTES (FUENTES DE ENERGÍA)

Viswanath y Shannon (2000) mencionan que el principal efecto de los azúcares es su habilidad de reemplazar el agua molecular, normalmente hidratando los grupos polares, estas propiedades ayudan a estabilizar la membrana durante la transición crítica de temperatura, los azúcares son semejantes al glicerol, fijan las propiedades mecánicas del diluyente para incrementar su viscosidad y prevenir la cristalización de solutos.

Hafez (1968) indica que en el semen hay por lo menos cuatro sustancias que los espermatozoides pueden utilizar directa o indirectamente como fuente de energía para el sostenimiento de la movilidad. Estas sustancias son: fructosa, sorbitol, GPC y el plasmalogeno; las tres primeras son constituyentes del plasma seminal, pero el plasmalogeno se encuentra presente en los propios espermatozoides.

La fructosa es el principal azúcar del semen, permite a los gametos sobrevivir en las condiciones anaerobias, característica que es importante de considerar durante el almacenamiento de espermatozoides para fines de inseminación artificial (Garner y Hafez, 2000).

Watson (1990) indica que la inclusión de azúcares en los diluyentes para semen puede desempeñar diferentes funciones, se emplean como fuente de energía, ya que las células espermáticas la requieren para su motilidad y conservación y aunque los espermatozoides presentan metabolismo propio, lo que se intenta es proteger sus reservas intracelulares. Además,

contribuyen a la osmolaridad del diluyente, ejerciendo una fuerza osmótica sobre la membrana celular del espermatozoide, dependiendo de su permeabilidad.

La adición de glucosa o fructosa a un medio de dilución, parece constituir un elemento que favorece a la vitalidad de los zoospermios, sin embargo estos azúcares intervendrían más por su acción física al mantener la presión osmótica y un balance electrolítico conveniente para el medio, que por la energía metabólica que pudiesen proporcionar a los espermatozoides (Derivaux, 1982).

Por otra parte, Bonadonna (1989) indica que la fructosa es el hidrato de carbono cuya ruptura produce la energía cinética necesaria para la actividad de los espermatozoides.

La energía requerida para la movilidad proviene de reservas intracelulares de ATP (trifosfato de adenosina). Posiblemente el empleo de ATP es regulado por la concentración endógena de cAMP. El cAMP no solo regula la hidrólisis del ATP, sino que también tiene un efecto directo sobre la motilidad de los espermatozoides (Hafez y Hafez 2000).

#### - PRESIÓN OSMÓTICA

Fraser (2001) menciona que el espermatozoide de toro presenta una presión osmótica de 220-345 mOsm y es capaz de tolerar un rango de presiones osmóticas bastante amplio. Diversos estudios han evaluado la tolerancia a

diversas presiones osmóticas, llegando a la conclusión que ni la motilidad ni la viabilidad espermática se ve afectada por la presión osmótica en rangos comprendidos entre 250 y 290mOsm), mientras que cuando se reduce por debajo de 200mOsm se detecta una reducción significativa de la motilidad

Según Holy (1983) la vitalidad y sobrevivencia de los nemaspermos dependen de la presión osmótica, que está indicada por la disminución del punto de congelación, el valor de la presión osmótica del semen bovino es de 0,609 (0,53-0,65) o 0.54-0,73.

#### - PH

El pH de semen tiene un valor normalmente entre 6 y 7, cualquier elevación es un indicio de contaminación con orina o de afecciones inflamatorias del aparato genital. (Hernández y Zavala, 2007).

Holy (1983) define que el nivel del pH varía normalmente entre 6,2 y 6,9 manteniéndose el semen más denso en los niveles más bajos y por el contrario los eyaculados de menor concentración en los niveles más altos.

Por otra parte Salisbury y Vandemark (1961) definen que el pH del semen de toro recién eyaculado depende en grado variable de las distintas secreciones que lo integran. La mayoría de las muestras normales tienen carácter ácido oscilando su pH entre 6'5 y 6'9, con una media de 6'75 aproximadamente, pero el pH fluctúa entre márgenes amplios desde 6'0 o menos a 8'0 o ligeramente superior.

En general, los espermatozoides se encuentran más activos y sobreviven por un periodo mayor si el pH es aproximadamente 7.0. Variantes hacia arriba o hacia abajo del pH óptimo provocan una reducción rápida de la motilidad, pero entre 5 y 10 se observa, al menos, una motilidad parcial (Hafez, 1968).

#### - CONDICIONES DE OXÍGENO Y CO<sub>2</sub>

La respiración de los nemaspermoses muy intensa, calculado el consumo de aire, un milímetro cubico del semen bovino necesita 0,9 ml de aire a 20°C durante 4 horas. Con la disminución de la temperatura desaparece también la intensidad de la respiración de la actividad fermentativa (Holy, 1983).

Salisbury y Vandemark(1961) mencionan que las células espermáticas pueden hacer uso del oxígeno en el proceso metabólico de la respiración, para la combustión de los correspondientes substratos, con el fin de reponer los radicales fosfóricos ricos en energía del ATP.

Los espermatozoides utilizan una variedad de sustratos en presencia de oxígeno. Su actividad respiratoria es la que permite emplear el lactato o pirubato resultante del desdoblamiento de la fructosa, para la producción de dióxido de carbono y agua. Esta vía oxidativa, que se localiza en las mitocondrias, es mucho más eficiente que la fructólisis para producir energía. (Hafez y Hafez, 2000).

- **PROCESAMIENTO Y CONSERVACIÓN DE SEMEN BOVINO**

- GENERALIDADES DE DILUYENTES PARA SEMEN BOVINO

Viswanat y Shannon (2000) mencionan que los diluyentes seminales tienen como principal función la protección de la integridad y funcionalidad de la membrana plasmática de los espermatozoides, así mismo los diluyentes son la parte más importante de la criopreservación, ya que prolonga la sobrevivencia y motilidad de los espermatozoides, para que un diluyente sea efectivo debe contener sustancias lo más parecido al plasma seminal ya que este lo deberá proteger durante un determinado tiempo, por ello un diluyente debe tener ciertos compuestos básicos como son: Una fuente de energía (azúcares); un buffer para mantener el balance de pH (Tris o citrato de sodio); osmolaridad de la solución (sustancias iónicas o no iónicas), una fuente de lipoproteínas o material con alto peso molecular para prevenir el choque térmico, tal como la yema de huevo o leche y un crioprotector (glicerol o DMSO); así como aditivos (enzimas y antibióticos).

Salisbury y Vandemark (1961) indican que el empleo de diluyentes apropiados ha permitido la explotación al máximo de las posibilidades potenciales favorables de la inseminación artificial. Hoy se pueden inseminar varios centenares de vacas con un eyaculado de toro, transportar de forma sistemática el semen diluido a grandes distancias y (sobre todo, gracias a la congelación del espermatozoides diluido) conservar su capacidad fecundante durante periodos muy largos.

Hafez (1968) indica que los espermatozoides no sobreviven durante periodos largos de tiempo a menos que se les agregue sustancias nutritivas. Estas sustancias, que son en sí buenos diluyentes, ejercen las funciones siguientes: a) proporcionar nutrientes que sean fuente de energía; b) protegen contra los efectos nocivos del enfriamiento rápido; c) proporcionar un tampón para evitar los cambios nocivos del pH en cuanto se forma el ácido láctico; d) mantienen la presión osmótica y el equilibrio electrolítico; f) inhiben el crecimiento bacteriano y g) incrementa el volumen de semen puro, de tal manera que se puedan usar para múltiples inseminaciones. Varios glúcidos simples como la glucosa, pueden servir como fuente de energía para los espermatozoides. Tanto la yema de huevo como la leche protegen contra el shock por frío.

Por otro lado Bearden (1982) indica que los diluyentes deben de reunir ciertas características como son:

- Deben ser isotónicos al semen (tener la misma concentración de iones libres).
- Capacidad amortiguadora (evitar cambios de pH al neutralizar los ácidos producidos por el metabolismo de los espermatozoides).
- Proteger a los espermatozoides de las lesiones producidas por el choque térmico.
- Proporcionar nutrientes para el metabolismo de los espermatozoides.
- Controlar contaminaciones microbianas.

- Los espermatozoides deben estar protegidos contra daños durante la congelación y descongelación.
- Debe preservar la vida de los espermatozoides con un mínimo efecto de la fertilidad.

#### - PRINCIPALES DILUYENTES UTILIZADOS PARA SEMEN BOVINO

##### ✓ TRILADYL

Fabricado en Alemania, por el laboratorio Minitube; este es un concentrado para la preparación de un diluyente listo para el uso de un solo paso, que está basado en Tris (hidroximetil amino metano un amortiguador sintético) y además contiene agua bidestilada, glicerol, ácido cítrico, fructosa y por cada 100 ml contiene los siguientes antibióticos: tilosina 5 mg, gentamicina 25 mg, espectinomicina 30 mg y lincomicina 15 mg (Manual de Triladyl, IMV).

##### ✓ CITRATO – YEMA

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 (Salisbury y Vandemark, 1961).

### ✓ TRIS

La solución Tris (hidroximetil amino metano), es una solución buffer biológica común que se utiliza en todo el proceso de extracción de ADN ya que este es 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.

### ✓ UNIVERSAL DE IMV

Fabricado en Francia, por la compañía IMV. Este es un concentrado a dos pasos en el cual hay que preparar la porción glicerada y la no glicerada, el concentrado es llamado “concentrado buffer EUROPHOS bovino” y contiene buffer de iones hidrogenados, ácido cítrico y carbohidratos. Además de un frasco con antibióticos llamada “antibióticos CSS” equivalente a 60 mg de tilosina, 300 mg de gentamicina y 180/360 mg de lincospectina; y una botella con glicerol (Manual Universal de IMV).

### ✓ ANDROMED

Es un diluyente a base de lecitina de soya, es de la nueva generación de medio andrológico libre de ingredientes de origen animal, para la congelación de semen bovino. Este medio tiene ventaja sobre sus antecesores ya que ha logrado tasas de no retorno hasta de 2.6% mayores que los diluyentes convencionales preparados a base de yema de huevo, (del 67.85% con los preparados a base de yema de huevo contra un 70.45% con diluyente sin



yema de huevo) esto se demostró en un estudio de campo realizado por el centro de dermatología y andrología de la UNIVERSIDAD JUSTIN-LEIBIG de Giessen, Alemania. En este estudio se compararon los porcentajes de no retorno al celo de 20,000 vacas (10,000 por grupo) inseminadas con eyaculados divididos y diluidos ya sea en diluyentes convencionales de tris-yema de huevo o en andromed (Aires, 2003).

#### - SUSTANCIAS BUFFER

Las sustancias buffer o amortiguadores actúan dando estabilidad a la membrana, ya que mantienen la tonicidad total del diluyente, lo cual es importante cuando el semen es almacenado por largos periodos de tiempo. El Tris (hidroximetil amino metano) es usado como el principal componente en el diluyente para la congelación de semen de toro, siendo predominante una buena capacidad buffer, diurética y actividad osmótica; así como una baja toxicidad a una alta concentración (Merino, 2003).

Fraser (2001) define que las sustancias buffer o amortiguadores actúan dando estabilidad a la membrana, ya que mantienen la tonicidad total del diluyente, lo cual es importante cuando el semen es almacenado por largos periodos de tiempo. El Tris es usado como el principal componente en el diluyente para la congelación de semen de toro, siendo predominante una buena capacidad buffer, diurética y actividad osmótica; así como una baja toxicidad a una alta concentración. A pesar de que el tris es el compuesto

más utilizado como buffer existen otras sustancias con el mismo objetivo como el ácido cítrico.

#### - EFECTO BIOLÓGICO DE LA YEMA

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 (Viswanath y Shannon, 2000).

Holt (2000) señala que se ha notado que la yema de huevo protege durante la congelación; ya que se adhiere a la membrana y la recubre, esta facultad de protección se adjudica a la gran densidad de la fracción de lipoproteínas.

Según Salisbury y Vandemark (1961) la yema contiene glucosa, que es utilizada por los espermatozoos del toro con preferencia a la fructosa del propio semen, diversas proteínas, vitaminas hidro- y liposolubles y un índice de viscosidad que puede ser ventajoso para las células espermáticas. Contiene asimismo los aminoácidos L-tirosina, L-triptófano y L-fenilalanina, que dejan en libertad peróxido de hidrógeno tóxico en el proceso de su desaminación oxidativa.

#### - ANTIBIOTICOS

Althouse y Lu (2005) mencionan que el semen y la yema de huevo están propensos a contaminación bacteriana, los diluyentes tienen antibióticos

(penicilina, procaína, ampicilina, sulfato de gentamicina y lincomicina) para prevenir más crecimiento bacteriano.

Debido a tantos agentes patógenos exógenos, así como la microflora propia del divertículo prepucial, la uretra y pene pueden afectar negativamente la fertilidad del semen, es necesaria la inclusión de antibióticos en los diluyentes. La flora bacteriana produce toxinas y estas a su vez, putrefacción de los componentes de origen biológico del diluyente. Algunos de los antibióticos más utilizados son: penicilina, estreptomicina, lincomicina, espectinomicina, gentamicina y polimixina B. también se han incluido modernos antibióticos como la amikacina y la dibekacina, este último se ha señalado como de mayor efectividad en la inhibición del crecimiento bacteriano, sin afectar la motilidad y morfología acrosomal. Recientemente se ha admitido que el ceftiofur sódico además de suprimir el crecimiento bacteriano, no posee efectos espermicidas (Gadea, 2003).

#### - GLICERALIZACIÓN

Los agentes crioprotectores son los que tienen la finalidad de proteger a los espermatozoides durante la fase de cristalización debido a las bajas temperaturas, el glicerol es la sustancia más empleada debido a los resultados obtenidos. La eficiencia protectora del glicerol ha sido atribuida a su capacidad de “atrapar” el agua y ayuda a que solo se lleguen a formar pequeños cristales de hielo (Morrier, 2002).

No se sabe exactamente de qué forma actúa la glicerina cuando ejerce su función protectora en el espermatozoide. En un principio se pensó que tal efecto se debería a alguna modificación del tipo de cristales de hielo formado en el medio al congelarse, que evitaría la producción de lesiones mecánicas en las células, pero se han comprobado otros efectos. La glicerina penetra en las células espermáticas con la misma facilidad que lo hace la fructosa y puede ser utilizada por ellas en su actividad metabólica oxidativa (Salisbury y Vandemark, 1961).

Ávila, Portillo y col., (2006) indican que los crioprotectores pueden clasificarse en agentes penetrantes (glicerol, dimetilsulfoxido, propanediol), que son bajos en peso molecular y permeables a través de la membrana celular; también en agentes no penetrantes (sacarosa, glucosa, dextrosa y dextrano) que son de alto peso molecular, efectivas a velocidades altas de congelación, promueven la rápida deshidratación celular y suelen usarse asociados a los agentes penetrantes.

El glicerol también disminuye el estrés osmótico intracelular resultante de la deshidratación que se produce por la sustitución del agua intra-celular, necesaria para el mantenimiento del volumen celular, por la interacción con iones y macromoléculas e incluso por la depresión del punto de congelación del agua (Medeiros y col., 2002).

- **CONDICIONES NECESARIA EN EL PROCESAMIENTO DE SEMEN**

- TIEMPO DE EQUILIBRACIÓN

Según Salisbury y Vandemark (1961) algunos estudios sobre supervivencia espermática han permitido llegar a la conclusión de que una estabilización de los zoospermios en diluyentes glicerinados, durante media hora a 4–5<sup>0</sup>C, ya es suficiente si el diluyente es citrato–yema o leche desnatada. En otros experimentos, efectuados con citrato-yema, un plazo de estabilización algo mayor ha dado los resultados más provechosos y hasta que no existan pruebas en contra, es mejor recurrir a plazos largos de equilibración.

- CONGELACIÓN

Stornelli (2005) menciona que la criopreservación del semen y la utilización del semen congelado mediante inseminación artificial han causado un gran impacto sobre la reproducción animal. Innumerables crías de diferentes especies han nacido a partir del uso de semen congelado. Sin embargo constantemente se modifican los protocolos de descongelación a fin de obtener mejores resultados en relación a la supervivencia espermática y fertilidad del semen al descongelado aunque es necesario comprender a qué tipo de estrés se ven sometidos los espermatozoides durante los procesos de congelación y descongelación, así como la manera en que las células responden a las agresiones fisicoquímicas medioambientales.

El congelamiento puede preservar una célula a temperaturas extremadamente bajas, permitiendo que el metabolismo se reduzca absolutamente sin que pierda su potencial vital. A temperaturas de  $-196^{\circ}\text{C}$  no hay reacciones bioquímicas ni energía térmica dentro de la célula (Palacios, 1994).

Según Salisbury y Vandemark, (1961) cuando el descenso térmico se produce con lentitud, los cambios internos y externos subsiguientes pueden desarrollarse asimismo lentamente, al menos lo bastante como para permitir el reajuste necesario de las funciones vitales, y los efectos resultantes pueden no ser perjudiciales. En cambio, si la temperatura baja con rapidez, las mutaciones intracelulares no son sincronizadas y el daño resultante es irreparable. Además mencionan que el mantenimiento permanente del esperma una vez congelado a temperaturas de  $-23^{\circ}\text{C}$ ,  $-51^{\circ}\text{C}$  y  $-65^{\circ}\text{C}$  no ha dado resultados tan convincentes como la conservación a  $-79^{\circ}\text{C}$  o incluso a temperaturas más bajas, ya se utiliza el nitrógeno líquido como refrigerante (temperatura de  $-196^{\circ}\text{C}$ ).

La velocidad de congelamiento es un factor importante en la criopreservación. Cuando la velocidad de congelamiento es muy rápida, la célula no es capaz de deshidratarse lo suficiente, por el contrario, si la velocidad es demasiado lenta, la deshidratación será extrema pudiendo llegar al colapso celular (Boiso, 2001).

## - ALMACENAMIENTO

El Instituto Nacional de Capacitación del Sector Agropecuario, (1983) señala que el semen congelado conserva y protege sus propiedades fecundantes durante varios años, por lo que se almacena en recipientes que soporten bajas temperaturas ( $-196^{\circ}\text{C}$  bajo cero), se encuentra envasado en varias formas, pero siempre en una dosis individual por envase, con la suficiente cantidad de espermatozoides para fecundar el ovulo en el aparato genital de la hembra.

- **EVALUACIÓN POST-DESCONGELACIÓN DE SEMEN**

### **PROCESADO**

Durante el proceso de congelación-descongelación, el punto de cambio de sólido a líquido es un factor importante en la recuperación espermática. El espermatozoide que sobrevivió a la congelación hasta  $-196^{\circ}\text{C}$  (nitrógeno líquido) debe atravesar un ascenso de temperatura y una descongelación, pasando dos veces por la temperatura crítica (Aisen, 2004).

La mayoría de los investigadores utilizan para el semen congelado en pajillas, el método de inmersión directa en agua a  $35^{\circ}\text{C}$  durante 30 segundos, también puede realizarse a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 10 segundos.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

- **LOCALIZACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO**

El trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Reproducción Animal así como en la Unidad bovina de pie de cría de la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro” en Buenavista, Saltillo, Coahuila, la cual se ubica aproximadamente a 8 km al sur de la ciudad de Saltillo, en las coordenadas terrestres 25° 22' latitud norte y 101° 01' longitud oeste, con una altura de 1743 msnm. (INEGI, s/f).

- **MATERIALES**

En campo:

- Sementales
- Prensa
- Electroeyaculador
- Camioneta (batería)
- Tijeras
- Agua
- Cinta métrica
- Guantes para palpar
- Lubricante
- Toallas sanitas
- Tubo de ensayo graduado
- Protector para tubo de ensayo



- Cono de latex

En laboratorio:

- Microscopio
- Baño maría
- Hemocitometro
- Balanza analítica
- Envasadora de semen automática "MRS 1
- Lámpara de luz ultravioleta
- Papel filtro
- Huevos de gallina frescos
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Matraz Erlenmeyer
- Probeta graduada
- Pipetas
- Espátula

- **SEMENTALES UTILIZADOS**

Para realizar este trabajo de investigación se utilizaron cinco sementales de la raza Charoláis identificados con los aretes # 1981(APDELEUTHERA124), 7626, 7595, 0880 (LR TWENTY X 7020) y 206, este trabajo estuvo más enfocado al toro #1981(APDELEUTHERA124) por su alto valor genético, este toro cuenta con una edad de 13 años y con un peso entre 1200 y 1400

kg propiedad de la universidad antes mencionada. El trabajo experimental tuvo una duración de 11 meses (agosto 2013 – julio 2014).

- **MÉTODO DE OBTENCIÓN DE LA MUESTRA**

La obtención de la muestra de semen se realizó con el método del electroeyaculador descrita por Salisbury y Vandemark (1961), donde mencionan que este método resulta especialmente valioso en aquellos toros que son incapaces de montar y en los que, por consiguiente, no puede aplicarse la vagina artificial.

Se precedió a inmovilizar al semental en una prensa ya que se le pasan impulsos eléctricos vía rectal, una vez en la prensa se realizó una limpieza del prepucio donde se cortaron los excedentes de pelos, se lavó con agua destilada y se secó con toallas sanitas, posteriormente se tomó la medida de la circunferencia escrotal. Se estimuló al animal con un masaje vía rectal utilizando un guante lubricado, se introdujo el electroeyaculador previamente lubricado, pasando impulsos eléctricos en aumento hasta provocar la eyaculación, cuando esto sucede se neutralizan los impulsos para que no sigan en aumento, el semen colectado fue llevado inmediatamente al laboratorio para su estudio y saber si es apto para su procesamiento.

- **EVALUACIÓN DE LA MUESTRA**

Se procedió a hacer la evaluación de la muestra de semen, los parámetros a considerar son: apariencia, volumen, motilidad, morfología y concentración siendo estos los que tienen mayor influencia en la calidad del semen y así determinar si es óptima su calidad para ser procesado, posteriormente la muestra de semen es mantenida en condiciones adecuadas a 35 °C y con una cantidad de diluyente (previamente preparado) igual al volumen de la muestra (fracción A) para posteriormente proceder a hacer los cálculos de dilución.

### **Apariencia**

Esta se determina cuando eyacula el animal, se observa en el colector una masa cremosa, muy densa, rica en espermatozoides y de color blanquecino con tendencia a mate.

### **Volumen**

Se mide directamente en el tubo colector, la cantidad varía dentro de una misma especie y dentro de un mismo animal; se obtuvo un promedio de 7.6 ml de eyaculado en las muestras obtenidas.

### **Motilidad**

La motilidad espermática normalmente se valora de forma subjetiva, mediante la observación visual de una muestra de semen con un

microscopio y platina a 35°C. En el eyaculado de los rumiantes, dada su elevada concentración espermática, se puede valorar la motilidad masal. Tras la dilución del eyaculado fresco, o tras la descongelación de dosis de semen congelado, se estima el porcentaje de espermatozoides individuales que están en movimiento y el tipo de movimiento que realizan (progresivos o no progresivos).

Movimiento masal.- se coloca una gota de semen en un portaobjetos limpio, seco y templado a 35°C se estima visualmente por medio del microscopio, la estimación de la motilidad de los espermatozoides se hace sobre la base del vigor o potencial de la onda según si está o no presente dicho movimiento.

Movimiento individual.- se deposita una gota de semen diluido con citrato de sodio al 2.9% sobre un portaobjetos limpio y templado a 35°C y se coloca un cubreobjetos y se observa por medio del microscopio en el cual se debe valorar el porcentaje de espermatozoides que son móviles, es decir un movimiento progresivo del espermatozoide.

La valoración visual de la motilidad espermática es el método más simple, rápido y barato. Sin embargo, es altamente subjetivo, puesto que los resultados obtenidos dependen en gran parte de la habilidad y experiencia del técnico que evalúa la muestra (Rodríguez y Martínez, 2000; Phillips y col., 2004).

## **Concentración**

Es el número de espermatozoides por ml, ésta determinación se realiza por medio de un hemocitometro o cámara de Neubauer y una pipeta para glóbulos rojos con una dilución 1:200.

Se realizó el siguiente procedimiento, se montó la pipeta y la boquilla y se aspiró una muestra de semen hasta la marca 0.5 y luego el diluyente que en este caso se usó el colorante eosina amarilla para así facilitar su conteo hasta la marca de 101. Mezclado perfectamente el semen con el diluyente, las primeras 4 o 5 gotas del extremo de la pipeta se descartan, posteriormente se contacta la punta de la pipeta con el borde de la cámara permitiendo que se deslice, por debajo del cubreobjetos una gota de muestra se deja en reposo por dos minutos el cual permite que los espermatozoides se sedimenten, posteriormente se colocó el hemocitometro al microscopio localizando el área de una de las cuadrículas bajo aumento de 10 X para posteriormente realizar el conteo de espermatozoides en 5 cuadros grandes donde cada uno contiene 16 cuadros pequeños, se deben contar los cuadros de los extremos y uno central, se repite lo mismo en la cámara adyacente se promedian las dos lecturas y se multiplican por 10 millones y de esta manera se determina el número de espermatozoides por mililitro.

## **Morfología**

La estructura básica del espermatozoide consta de dos partes claramente diferenciadas: la cabeza, que contiene la información genética y el mecanismo necesario para la penetración del ovocito, y la cola, que representa el medio de locomoción del espermatozoide.

En esta prueba se determinaron las anormalidades primarias (cabezas) y secundarias (colas) de los espermatozoides mediante una tinción de contraste, donde se colocó en un portaobjetos limpio y seco una gota del colorante eosina-negrosina y una gota de semen y se dispersó por todo el campo del portaobjetos, se dejó secar y se observó en el microscopio.

- **PREPARACIÓN DE DILUYENTES**

La preparación de los diluyentes debe hacerse en un medio aséptico; así como el material utilizado debe estar previamente esterilizado.

- **PREPARACIÓN DE CITRATO DE SODIO**

La preparación consistió en agregar 2.9 gr de citrato de sodio en 100 ml de agua bidestilada de esta solución se tomó el 80% y se le agregó 20% de yema de huevo fresco, la yema de huevo debe de estar desprovista de residuos de albumina y membrana ya que estos resultan tóxicos para el espermatozoide, la forma más sencilla se logró separando la clara fuera de la mitad del cascaron y poniendo la yema sola sobre un papel filtro esterilizado, se dobló por la mitad y se dejó escurrir la yema por la ranura del dobles

hasta el recipiente, se mezcló perfectamente con la solución y posteriormente se agregaron los antibióticos, penicilina 1000 unidades internacionales y estreptomina 1000 mg, después de prepararlo se dividió en dos fracciones (A y B) y a la fracción B se le agrego un 7% de glicerol.

**CUADRO 1. COMPONENTES Y PROPORCIONES UTILIZADAS EN EL DILUYENTE CITRATO-YEMA**

<b>COMPONENTE</b>	<b>PROPORCIÓN</b>
Citrato de sodio al 2.9%	80%
Yema de huevo	20%
Glicerol	5 – 7%
Penicilina	1000 UI
Estreptomina	1000 mg

Se forman dos fracciones A y B del diluyente antes de la colección de semen.

Fracción A (35<sup>0</sup>C): buffer de citrato de sodio 80%

	Yema de huevo	20%
Fracción B (5 <sup>0</sup> C):	buffer de citrato de sodio	80%
	Yema de huevo	20%
	Glicerol	7%

Ya se incluyen los antibióticos.

#### - PREPARACIÓN DE TRIS

Para la preparación del diluyente TRIS consistió en agregar 3.319 gr del componente tris además de ácido cítrico 1.8210 gr y fructosa 1.000 gr en 100 ml de agua bidestilada, de esta solución se tomó un 80% y se adicionó un 20% de yema de huevo fresco, esta debe estar libre de clara de huevo, ya que los componentes de esta resultan tóxicos para los espermatozoides, para la separación de la yema de huevo se hizo de la misma forma que en diluyente descrito anteriormente, posteriormente se agregaron los antibióticos, ya mezclado perfectamente todo se dividió en dos fracciones A y B y a la fracción B se le agrego un 7% de glicerol.



**CUADRO 2. COMPONENTES Y PROPORCIONES UTILIZADAS EN EL  
DILUYENTE TRIS.**

<b>COMPONENTE</b>	<b>PROPORCIÓN</b>
Tris	3.319 gr
Ácido cítrico	1.821 gr
Fructosa	1.000 gr
Glicerol	7%
Penicilina	1000 UI
Estreptomicina	1000 mg

En 100 ml de agua bidestilada, se forman dos fracciones A y B del diluyente antes de la colección de semen.

Fracción A (35<sup>0</sup>C):     buffer de tris-ácido cítrico     80%

Yema de huevo                     20%

Fracción B (5<sup>0</sup>C):     buffer de tris-ácido cítrico     80%

Yema de huevo                     20%

Glicerol                             7%

La yema de huevo deberá ser de huevos frescos (menos de 24 horas) y sin residuos de albumina y membrana.

#### - PREPARACIÓN DE TRILADYL

La preparación del diluyente comercial Triladyl consistió en agregar 75 ml de agua bidestilada, 25 ml de concentrado Triladyl y 25 ml de yema de huevo fresco, por las mismas razones y de la misma manera que en los diluyentes anteriores, se hizo la separación de la yema de huevo, este diluyente ya contiene glicerol, ácido cítrico y fructosa.

#### **CUADRO 3. COMPONENTES Y PROPORCIONES UTILIZADOS EN EL DILUYENTE TRILADYL**

<b>Componente</b>	<b>Proporción</b>
Agua bidestilada	75 ml.
Triladyl	25 ml.
Yema de huevo fresco	25 ml.
Tilosina	5 mg/100 ml.
Gentamicina	25 mg/100 ml.
Espectinomomicina	30 mg/100 ml.
Lincomomicina	15 mg/100 ml.

Cabe mencionar que este diluyente ya contiene antibióticos antes mencionados por lo que su preparación es muy simple.

Una vez preparados los diluyentes la fracción A se mantiene a 35<sup>0</sup>C; mientras que la fracción B se mantendría a 5<sup>0</sup>C.

- **DILUCIÓN DEL SEMEN**

Se agrega al semen una cantidad igual de diluyente (fracción A) y se mantiene a 35<sup>0</sup>C con el fin de que no se vea afectada la supervivencia de los espermatozoides, de acuerdo a los resultados se procederá a hacer los cálculos de dilución para lo cual se consideran los siguientes parámetros: volumen, concentración y motilidad para determinar el número de células vivas y a la vez determinar el número de pajillas para así definir la cantidad de diluyente necesario para cada una de las muestras a procesar.

- **CÁLCULOS DE DILUCIÓN**

Los cálculos de dilución se realizaron de la siguiente manera:

Para la determinación de células vivas se utilizó la siguiente fórmula.

$$CELULAS VIVAS = VOLUMEN \times CONCENTRACION \times \% DE MOTILIDAD$$

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

$$\# DE PAJILLAS = \frac{\# DE CELULAS VIVAS}{MILLONES DE ESPERMATOZOIDES DESEADOS POR DOSIS}$$

La determinación de la cantidad de diluyente necesario para el procesamiento de semen se utilizó la siguiente fórmula:

$$CANTIDAD DE DILUYENTE = NUMERO DE PAJILLAS \times 0.5 ML$$

Dónde:

0.5 = volumen de la pajilla en ml.

Los medios nutritivos a probar en este ensayo son los siguientes:

- Citrato de sodio al 2.9% con yema de huevo.
- Tris (hidroximetil amino metano) con yema de huevo, ácido cítrico y fructosa.
- Triladyl con yema de huevo.

#### • GLICERALIZACIÓN Y EQUILIBRACIÓN

Posterior a los cálculos de dilución se procede a hacer la mezcla de semen – diluyente de la siguiente manera:

El diluyente total calculado se divide en dos partes iguales las cuales corresponden a las fracciones A y B.

Fracción A: Se adiciona el semen a la misma temperatura del diluyente (35 °C) Posteriormente a esta mezcla, se procede a bajar la temperatura gradualmente a 5°C en un tiempo aproximado de 1.5 horas.

Fracción B: Contiene el total del glicerol (7%), la cual se mezcla con el semen diluido (fracción A), ambas a 5°C para así iniciar el tiempo de equilibración.

Así mezclado el semen con el diluyente (fracción A y B) a 5°C se mantendrán por 4 horas como mínimo para que el espermatozoide haga contacto efectivo con el diluyente (glicerol) y de esta forma quede protegido para el proceso de congelación.

De esta manera, los espermatozoides responderán al diluyente de la mejor forma manteniéndose vivos y realizando su metabolismo bajo condiciones adecuadas.

- **ENVASADO DE SEMEN**

Posteriormente al tiempo de equilibración se procede a envasar el semen diluido en pajillas francesas de 0.5 ml; mediante una maquina envasadora de semen automática "MRS 1 (I.M.V. 1980)" todo esto a una temperatura constante de 5°C. De igual manera el material requerido para este procedimiento debe mantenerse a esa temperatura.

- **CONGELAMIENTO Y ALMACENAMIENTO DE PAJILLAS**

Al llenar las pajillas mediante el envasado automático a 5°C, se procede a colocar las pajillas en una rejilla para congelar a vapores de nitrógeno líquido

(-80°C) por 9 minutos para posteriormente pasarlas a termos de nitrógeno líquido a -196°C donde se identifican en bastones dentro de las canastillas del termo para ser almacenadas.

- **EVALUACIÓN POST-DESCONGELACIÓN**

Se procedió a descongelar aproximadamente 4 horas en adelante posteriores al almacenamiento del semen diluido, se descongeló en agua destilada a temperatura de 35°C por 30 segundos para posteriormente observar las muestras de semen procesado al microscopio donde se evaluó la motilidad recuperada post-descongelación y de esta manera evaluar el efecto del diluyente empleado.

Molinia (1994) menciona que la motilidad post-descongelamiento se reduce a valores entre 40 a 50%.

- **DISEÑO EXPERIMENTAL**

El diseño que se utilizó fue un Diseño Completamente al Azar, dado que las muestras fueron tomadas en condiciones debidamente controladas y no dieron lugar a la intromisión de variables no conocidas dentro del experimento.

Los datos obtenidos fueron dados en porcentajes (%), por lo cual se hizo una transformación de datos [Sin (% de motilidad post-descongelación/100)] con el fin de reducir el error de las medias.

Para que el diseño se pueda llevar a cabo se requiere que los datos se comporten con valores normales, es decir que estos sean homogéneos, para lo cual se hizo una gráfica de normalidad con el fin de mostrar y comparar los valores obtenidos.

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el cuadro 4 se puede apreciar la evaluación de cada una de las muestras obtenidas en esta investigación, por consecuencia también se puede observar y comparar a los toros utilizados, aunque este factor no sea de interés en esta investigación.

**CUADRO 4. EVALUACIÓN DE SEMEN DE LOS TOROS UTILIZADOS**

# de toro	C.E. (cm)	Volumen eyaculado (ml)	Concentración (millones/militro)	Motilidad (%)	Vivos (%)	Muertos (%)	Normales (%)	Anormales primarios (%)	Anormales secundarios (%)
1981	43	8.5	2,160	70	85	15	93	4	3
206	35	2.5	890	70	89	11	95	3	2
1981	41	7.5	440	70	84	16	95	1	4
206	36	4.5	1,430	80	89	11	96	2	2
1981	42.5	5	430	70	80	20	95	3	2
1981	43	16	240	80	87	13	92	5	3
7626	36.5	.8	640	65	70	30	97	2	1
7525	35	8.4	500	70	80	11	89	1	10
0880	43	7	2,180	70	91	9	92	3	5
1981	42	9.5	80	70	60	40	60	8	32*

C.E.= Circunferencia Escrotal.

\* Gota citoplasmática.



En este cuadro (cuadro 4) se muestra la diferencia que existen entre cada una de las muestras obtenidas, corroborando lo mencionado por Bonadonna (1989) donde señala que la cantidad de semen varía entre los individuos, pero también varía en el mismo individuo.

Por otro lado, en los datos obtenidos el % de motilidad varia de 65 – 80%, (Hafez y Hafez, 2000) mencionan que lo recomendable para lograr buenas tasas de fertilidad es de 70%, siendo esta observación subjetiva, por lo cual se necesita de experiencia para dicha evaluación, cabe mencionar que los datos obtenidos son muy similares a el rango establecido y recomendado por los autores antes mencionados.

La transformación de datos del cuadro 5 se hizo dado que los datos originales provienen de una distribución binomial expresados en porcentaje y se requiere que los datos tengan normalidad y varianzas homogéneas para que el análisis de varianza se pueda llevar a cabo.

A todos los datos se les aplicó la transformación seno inverso con la finalidad antes mencionada.

En el cuadro 5 se ilustra la recuperación espermática post-descongelado, los diluyentes utilizados y los tiempos de almacenamiento, durante el desarrollo del experimento.

### CUADRO 5. RECUPERACIÓN ESPERMÁTICA POST-DESCONGELACIÓN

# de toro	Diluyente	Tiempo de almacenamiento	Motilidad inicial (%)	Motilidad post-descongelación (%)	* Valores Transformados
1981	Triladyl	4 horas	70	40	26.197
1981	c. de sodio	4 horas	70	35	22.763
206	Triladyl	4 horas	70	40	26.197
206	c. de sodio	4 horas	70	35	22.763
1981	Triladyl	12 días	70	40	26.197
1981	c. de sodio	12 días	70	35	22.763
206	Triladyl	12 días	70	40	26.197
1981	Triladyl	6 días	70	30	19.397
1981	c. de sodio	6 días	70	3	1.910
1981	Triladyl	321 días	70	40	26.197
206	Triladyl	321 días	70	30	19.397
1981	Triladyl	238 días	70	35	22.763
1981	Triladyl	207 días	80	40	26.197
1981	c. de sodio	207 días	80	20	12.818
7626	Triladyl	86 días	65	35	22.763
7525	c. de sodio	86 días	70	25	16.086
0880	Tris	90 días	70	30	19.397
1981	Tris	1 día	70	20	12.818
1981	Tris	4 días	70	10	6.376

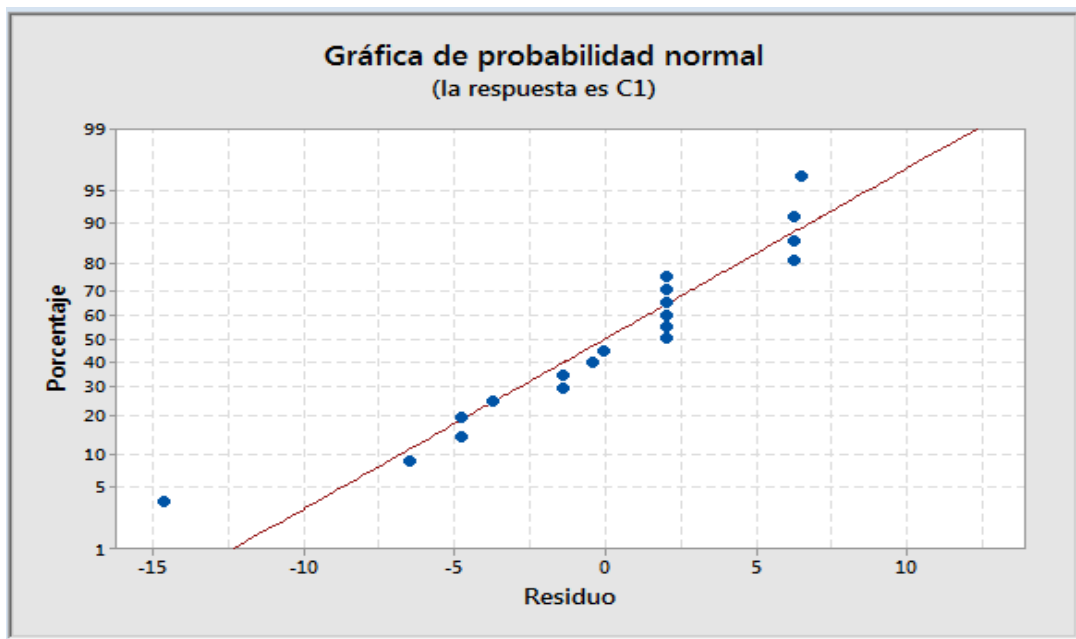
\* Sin (% de motilidad post-descongelación/100)

En el cuadro 5 se muestra claramente la recuperación espermática post-descongelación donde los datos muestran un rango normal señalado por (Silva y Gadella, 2006) donde mencionan que en el congelado y descongelado de las pajillas se pierden alrededor de 30%.

Por otro lado, Molina, (1994) menciona que la motilidad post-descongelamiento se reduce a valores entre 40 a 50%.

En la gráfica 1 se muestra una prueba de Normalidad de los datos.

### GRAFICA 1. NORMALIDAD DE LOS DATOS



Nótese que en la gráfica 1 los datos una vez transformados se comportan como una distribución normal y se comportan homogéneamente.

Se usó un nivel de significancia de  $\alpha = 0.01$  es decir se tiene un nivel de confianza de 99 % de que lo que se concluya es significativo.

Se hizo un análisis de varianza para los datos transformados, con el fin de conocer cuál de los tres tratamientos da los resultados más favorables.

### CUADRO 6. ANALISIS DE VARIANZA

<i>Fuente</i>	<i>GL</i>	<i>SC Ajust.</i>	<i>MC Ajust.</i>	<i>Valor F</i>	<i>Valor p</i>
<i>C2</i>	<i>2</i>	<i>397.8</i>	<i>198.89</i>	<i>6.32</i>	<i>0.009</i>
<i>Error</i>	<i>16</i>	<i>503.2</i>	<i>31.45</i>		
<i>Total</i>	<i>18</i>	<i>901.0</i>			

En el cuadro 6 se observa claramente que al menos uno de los tratamientos se comporta diferente en relación a los demás tratamientos, por lo cual con este cuadro se plantea no rechazar la hipótesis (**H1**) establecida en esta investigación.

Con el fin de saber cuál o cuáles tratamientos son diferentes, se procede a hacer una prueba de comparación múltiple de medias, para lo cual utilizamos el método de Tukey al 95% de confianza. Cabe señalar que esta metodología es una de las más usadas, dada su confiabilidad tan alta.

En el cuadro 7 se muestra un resumen estadístico de cada uno de los tratamientos, en él se pueden ver las medias y las desviaciones estándar por tratamiento, nótese el hecho de que el tratamiento Triladyl es el que arroja una media mayor y una desviación estándar mucho más pequeña, esto es

señal de que el tratamiento conserva a simple vista las mejores características.

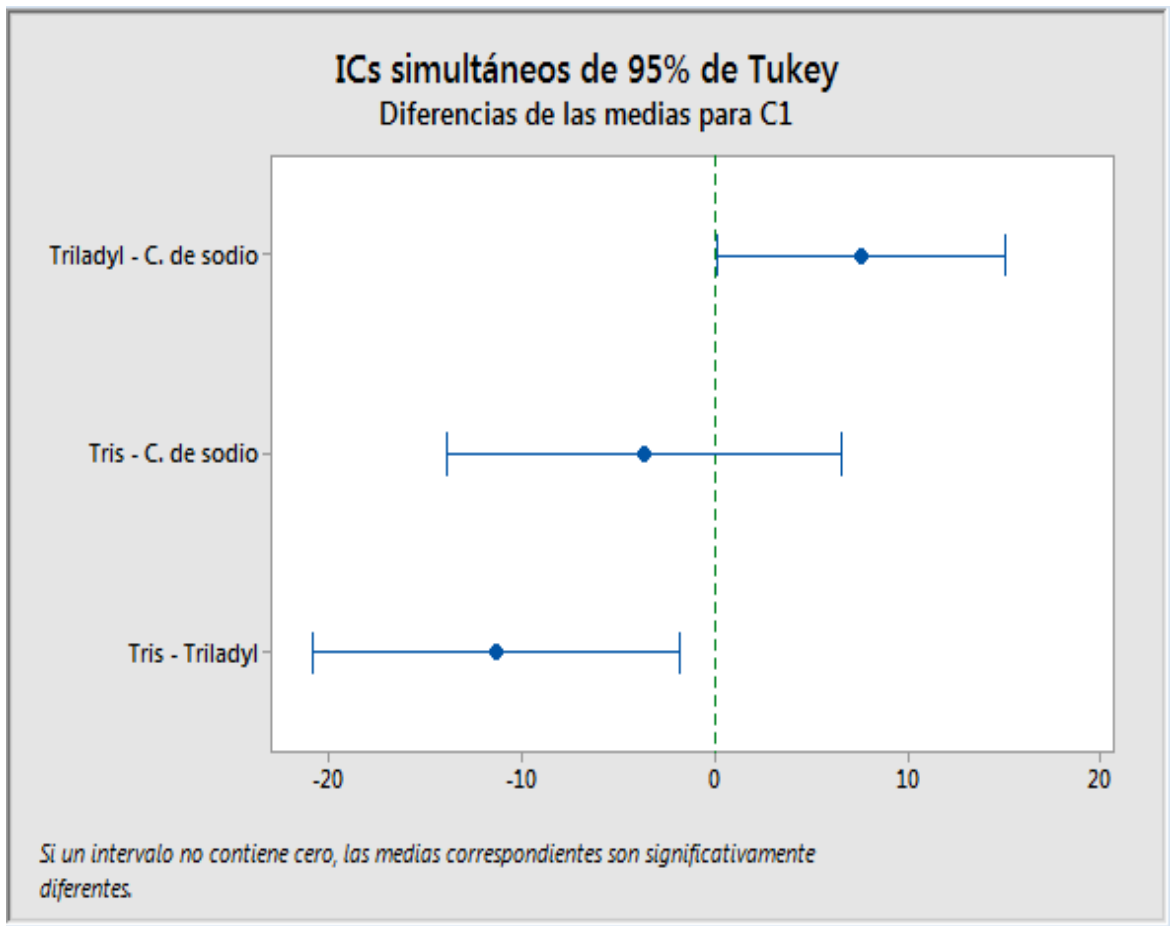
#### CUADRO 7. RESUMEN ESTADÍSTICO DE LOS TRATAMIENTOS

	<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Desv.Est.</i>	<i>IC de 95%</i>
<i>C. de sodio</i>	6	16.52	8.30	(9.83, 23.20)
<i>Triladyl</i>	10	24.150	2.871	(18.970, 29.330)
<i>Tris</i>	3	12.86	6.51	(3.41, 22.32)

En el resumen estadístico de los tratamientos (cuadro 7) podemos observar que el diluyente Triladyl muestra una media mayor y una desviación estándar mucho más pequeña, lo cual nos indica que este diluyente es más constante en sus resultados y no tiene tanta variabilidad en comparación con el Citrato de sodio y el Tris.

Esto se corrobora en la gráfica 2 de los intervalos de confianza para cada uno de los tratamientos.

## GRAFICA 2. INTERVALOS DE CONFIANZA



En la gráfica 2 de intervalos de confianza, se puede observar que el diluyente Triladyl marca una diferencia significativa en relación al Citrato de sodio y el Tris.

Por otro lado se ilustra que en la comparación de los diluyentes tris – citrato de sodio, no existe una diferencia significativa.

La prueba de comparación de medias de Tukey arroja los siguientes resultados (Cuadro 8).

#### CUADRO 8. COMPARACIÓN DE MEDIAS DE TUKEY

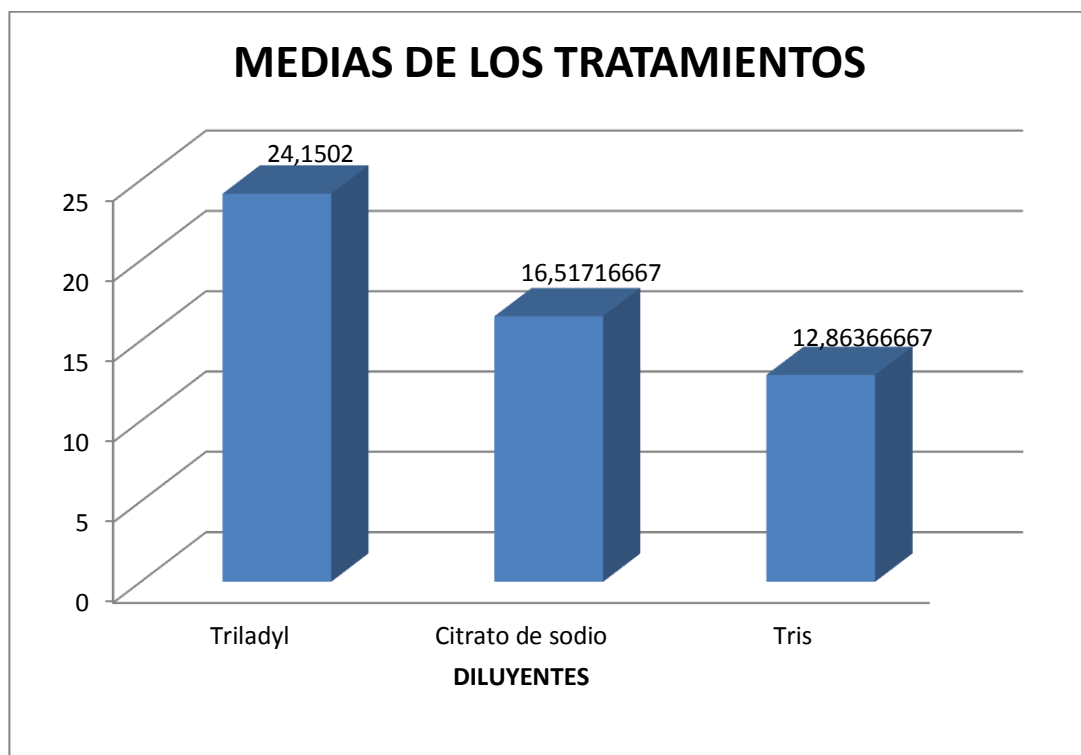
	<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Agrupación</i>
<i>Triladyl</i>	<i>10</i>	<i>24.150</i>	<i>A</i>
<i>C. de sodio</i>	<i>6</i>	<i>16.52</i>	<i>B</i>
<i>TriS</i>	<i>3</i>	<i>12.86</i>	<i>B</i>

Nótese que en el caso del diluyente Triladyl, la agrupación marcada es muy diferente a la de los demás diluyentes, es decir existe una gran diferencia.

Así mismo, la agrupación marcada para los diluyentes Tris y Citrato de sodio es igual, esto quiere decir que entre estos dos diluyentes no existe una diferencia muy amplia.

En la gráfica 3 se puede corroborar los resultados de las medias obtenidas para cada uno de los tratamientos.

**GRAFICA 3. MEDIAS DE LOS TRATAMIENTOS**

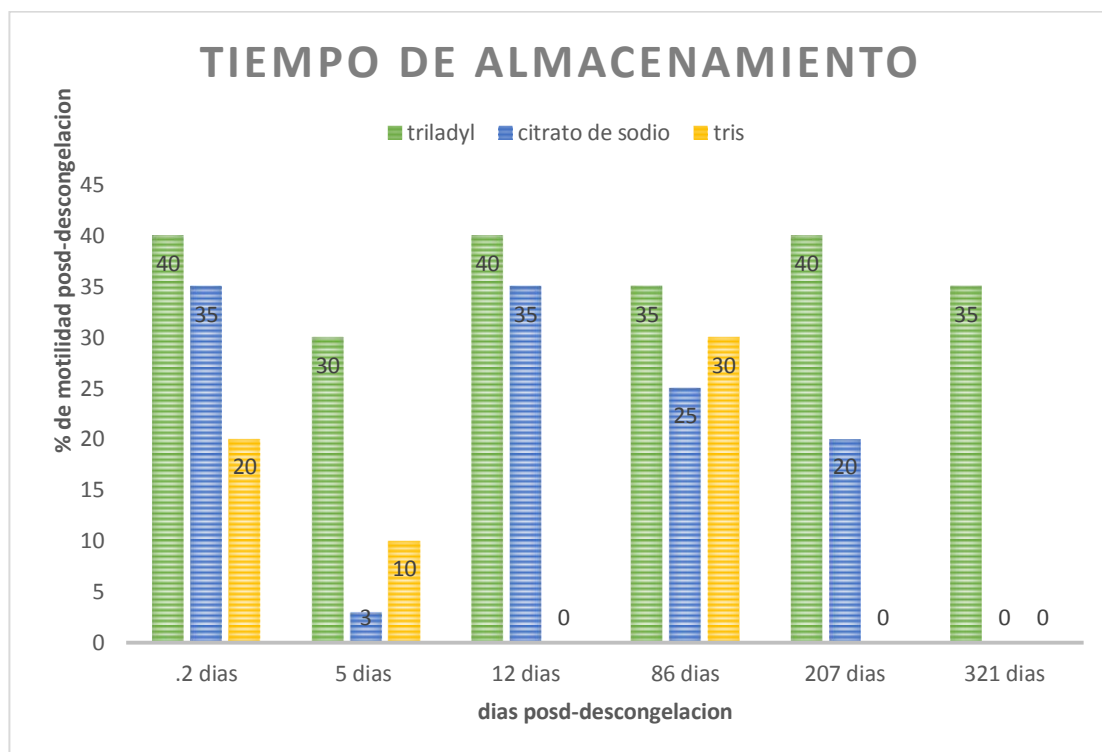


En esta gráfica se ilustra claramente la diferencia entre los tratamientos (diluyentes), nótese que el tratamiento 1 (Triladyl) muestra una media mucho mayor, es decir en los resultados obtenidos mostro mejores características (motilidad post-descongelación).



En la gráfica 4 se puede observar el tiempo de almacenamiento y su comportamiento en la motilidad post-descongelación para cada uno de los tratamientos.

#### GRAFICA 4. EFECTO DEL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO EN LOS DILUYENTES UTILIZADOS

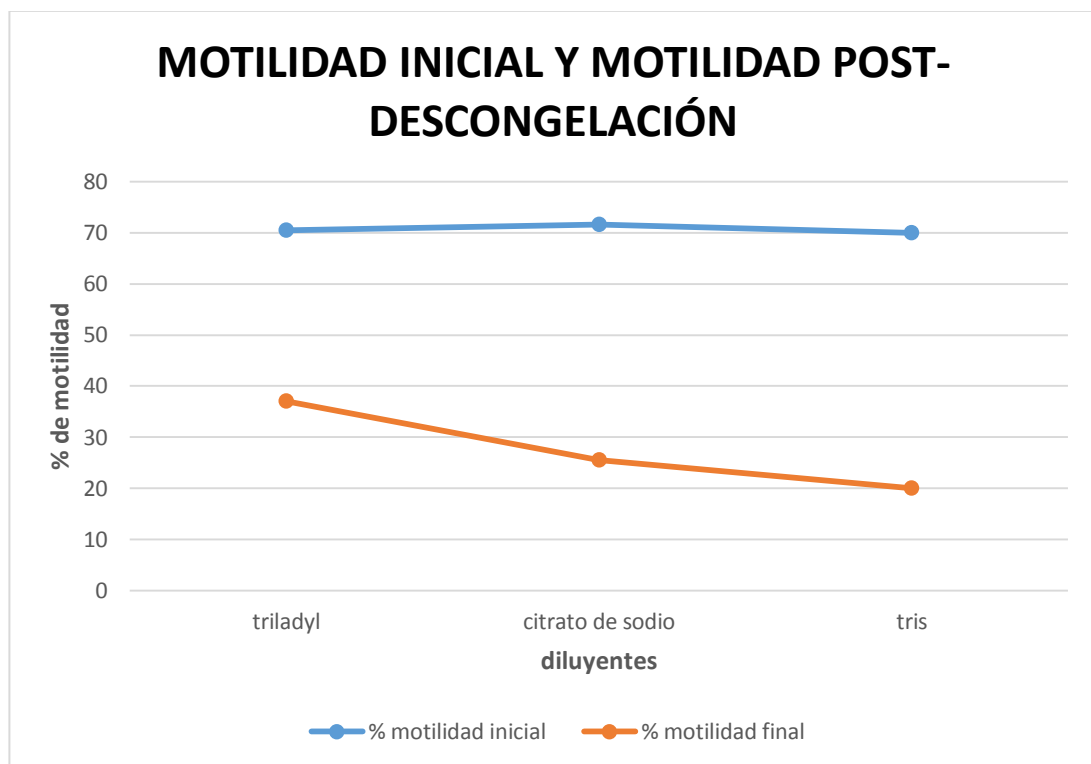


En la gráfica anterior (Gráfica 4) se muestra claramente que el tratamiento Triladyl no es afectado por el tiempo de almacenamiento, siendo muy constante su recuperación espermática post-descongelación, de igual forma el Tris y el Citrato de sodio se comportan similares, así mismo Carballo,

(2005) obtuvo resultados semejantes mencionando que el tiempo de almacenamiento no afecta considerablemente a la recuperación espermática.

En la gráfica 5 se muestra la motilidad del semen en fresco y la motilidad post-descongelación evaluada con cada uno de los diluyentes.

**GRAFICA 5. MOTILIDAD INICIAL Y MOTILIDAD POST-DESCONGELACIÓN DE SEMEN PROCESADO**



En la gráfica 5 se ilustra claramente que el diluyente Triladyl es el que responde favorablemente a la descongelación (37%) en comparación con los diluyentes Citrato de sodio y Tris (25 y 20% respectivamente).

Esto coincide con Carballo, (2005) quien obtuvo una media de 30.97% donde el Triladyl fue superior a otros diluyentes.

Por otro lado, Stradaioli y col. (2007), realizaron una investigación y al evaluar motilidad individual progresiva post-descongelación obtuvieron 46,4% con el diluyente Bioxcell® y 41,8% con Triladyl.

Por lo que se puede apreciar que los datos obtenidos en esta investigación se encuentran en un rango normal comparándolos con otras investigaciones.

## V. CONCLUSIONES

- En los resultados obtenidos el diluyente Triladyl es el que marca una diferencia significativa en relación al Citrato de sodio y al Tris, por lo tanto se concluye que éste es el mejor de los tratamientos.
- Aunque los diluyentes Tris y Citrato de sodio fueron inferiores al Triladyl, esto no quiere decir que no sean buenos en el procesamiento de semen bovino, ya que entre ambos no hubo una diferencia significativa.
- De igual manera el diluyente Triladyl marco la mejor recuperación espermática post-descongelación.
- El tiempo de almacenamiento no afecto en la recuperación espermática post-descongelación en ninguno de los tratamientos.

## VI. RESUMEN

Tesis profesional por Diego Cruz Solís “estudio comparativo de 3 diluyentes (Tris, Citrato de sodio y Triladyl) en el procesamiento de semen bovino.”

Asesora principal: M.C. Laura E. Padilla González

Sinodales: M.C. Laura Maricela Lara López, M.C. Sergio Sánchez Martínez y M.C. Pedro Carillo López

Con el fin de evaluar la diferencia entre tres diluyentes Triladyl, Tris (hidroximetil amino metano) y Citrato de sodio para la criopreservación de semen bovino.

El trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Reproducción Animal así como en la unidad bovina de pie de cría de la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro” en Buenavista Saltillo, Coahuila, México.

Se utilizaron cinco sementales de registro de la raza charoláis identificados con los aretes # 1981(APDELEUTHERA124), 7626, 7595, 0880 (LR TWENTY X 7020) y 206, este trabajo estuvo más enfocado al toro #1981(APDELEUTHERA124) por su alto valor genético, a los cuales se les colecto semen por medio de electroeyaculación.

Se utilizaron tres diluyentes de los cuales a dos de ellos (Tris y Citrato de sodio) se tomó un 80% de diluyente preparado el cual contiene 7% de glicerol, 1000 UI de penicilina y 1000 mg de sulfato de estreptomicina y un 20% de yema de huevo fresco. En el caso de Triladyl se adicionaron 3 partes de agua bidestilada, una parte de yema de huevo fresco y una parte del concentrado comercial; se envaso a una temperatura de 5°C en pajillas

francesas de 0.5 ml., posteriormente se congelo a vapores de nitrógeno a -80°C por 9 minutos y por último se almaceno en un termo con nitrógeno líquido a -196°C.

Después de congelado se procedió a descongelarse a temperatura de 35°C por 30 segundos en diferentes tiempos de almacenamiento que van desde 4 horas hasta 321 días, donde se evaluó la recuperación espermática post-descongelado.

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar, dado que las muestras fueron tomadas en condiciones debidamente controladas y no dieron lugar a la intromisión de variables no conocidas dentro de nuestro experimento.

De acuerdo con los resultados se concluyó lo siguiente:

En los resultados obtenidos el diluyente Triladyl es el que marca una diferencia significativa en relación al Citrato de sodio y al Tris, por lo tanto se concluye que éste es el mejor de los tratamientos.

Aunque los diluyentes Tris y Citrato de sodio fueron inferiores al Triladyl, esto no quiere decir que no sean buenos en el procesamiento de semen bovino, ya que entre ambos no hubo una diferencia significativa.

De igual manera el diluyente Triladyl marco la mejor recuperación espermática post-descongelación.

El tiempo de almacenamiento no afecto en la recuperación espermática post-descongelación en ninguno de los tratamientos.

PALABRAS CLAVE: Semen, Diluyente, Motilidad.

## VII. LITERATURA CITADA

- Aires, V.A. (2003). In vitro and vivo comparasion of egg youlk-based and soybean lecithin-based extender for cryopreservation of bovine semen theriogenology.
- Aisen, E. G. (2004). Reproducción ovina y caprina. Editorial inter-medica. Buenos Aires, Republica de Argentina.
- Althouse, G., y Lu, (2005). Bacteriospermia in extended porcinemsemen. Obtenido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15626417>
- Ávila, L. M. Portillo, J. I.Madero, C.López, M. F.León, L.Acosta, y C., Gómez, (2006). Fundamentos de criopreservación / Basic points in cryopreservation. Obtenido de <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?!sisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=Ink&exprSearch=441219&indexSearch=ID>.
- Bearden, H. J. (1982). Reproducción Animal aplicada. Editorial manual moderno. D.F. México.
- Boiso, I. (2001). Principios básicos de criobiología. Revistalberoamericana de Fertilidad. 18, 127-131.
- Bonadonna, T.(1989). Reproducción animal e inseminación artificial (tomo II). Editorial hemisferio sur. Buenos Aires, Argentina.
- .Bwanga, C.O. (1991). Cryopreservation of boar semen. IA literatura review, department of Obstretics and Gynecology. Swedish University

of Agricultural Sciences Uppsala, Sweden. *Acta Vet Scand.* 32, 4:431-453. Obtenida de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1818503>.

- Carballo, G. D. M. (2005). "Comparación de dos diluyentes comerciales para crioconservar semen de bovino bajo condiciones de campo en el trópico húmedo". Tesis. Univ. Veracruzana, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. México.
- Chaveiro A, L., A. Machado, B. Frijters, H. Engel, Woelders. (2006). Improvement of parameters of freezing medium and freezing protocol for bull sperm using two osmotic supports. *Theriogenology* 65. 1875-1890. <http://www.angra.uac.pt/MPA/MPA/P%C3%A1ginas%20do%20Mestrado/Mestrado/Reprodu%C3%A7%C3%A3o/Antonio%20Chaveiro/Improvement.pdf>
- Den Daas, N., (1992). Laboratory assessment of semen characteristics. *Anim. Reprod. Sci.* 28, 87-94.
- Derivaux J. (1982). Reproducción de los animales domésticos, 2da edición. Editorial acribia. Zaragoza España.
- Fraser, L.; K. Gorszczaru, Y J. Strzezek, (2001). Relationship between motility and membrane integrity of boar spermatozoa in media varying in osmolality. *Reprod. Domest. Anim.* 36:325-329. Obtenida de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.14390531.2001.00310.x/>



- Gadea, J. (2003). Factores que afectan a la capacidad de congelación del semen porcino ITEA. 24: 330-332. Obtenida de <http://www.vet-uy.com/articulos/cerdos/050/0007/porc007.htm>.
- Garde, L.B.(1995). Congelación de semen en la especie ovina: características biológicas de las dosis descongeladas. Tesis. Univ. Complutense de Madrid. España.
- Garner, D.L. y E.S.E Háfiez(2000). Spermatozoa and Seminal Plasma. En: Háfiez, E.S.E. and Háfiez. B (eds). Reproduction in farm animals, 7th edition. Lippincott Williams & Wilkins Company, Philadelphia,
- Graham, J. (1996). Cryopreservation in stallion spermatozoa. Vet. Clin. North. Ame. 12:131-147.
- Hafez E.S.E., (1968). Reproducción de los animales de granja, editorial hemisferio, S.A. Filadelfia, Pensilvania E.U.A.
- Hafez E.S.E. y B. Hafez, (2000). Reproducción e inseminación artificial en animales, séptima edición. Kiawah Island, South Carolina
- Hernández, J. y J. Zavala (2007). Reproducción Bovina. Primera. México DF: Universidad Nacional Autónoma de México,
- Holt, S. S. (2000). Cellular and molecular biology of capacitation and acrosome reaction in spermatozoa. International Review of Cytology, Academic Press. 199: 1-64.
- Holt, W.V. y J.W. Van Look, 2004. Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory test of semen quality. Reproduction. 127, 527-535.

- Holy L. (1983). Bases biológicas de la reproducción bovina. Editorial Diana, México.
- <http://www.inegi.org.mx/>
- Hummersted, R. H., J. K. Graham, y J. P. Nolan, (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. Recuperado el 21 de Abril de 2012, de <http://www.andrologyjournal.org/cgi/content/abstract/11/1/73>.
- Instituto Nacional de Capacitación del Sector Agropecuario, (1983). Inseminación artificial en ganado bovino, segunda parte. México D. F.
- De Alba, J. (1964). Reproducción y genética animal. Primera edición 1964, editorial sic, Turrialba, Costa Rica.
- Lozano, H. (2009). Factores que afectan la calidad seminal en toros. Obtenido de:  
<http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/remevez/.../14753>
- Manual de uso y preparación del diluyente Triladyl, de laboratorios minutube. (1993).
- Manual de uso y preparación del diluyente universal IMV, de laboratorios universal de IMV. (1995).
- Medeiros, C., F. Forell, A. Oliveira, y J. Rodríguez, (2002). Current status of cryopreservation: why isn't it better. Obtenido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11775978>.

- Merino, R. A. (2003). Estudios preliminares en capacitación in-vitro de espermatozoides ovinos frescos y congelados. Facultad de Ciencias Veterinarias. Valdivia, Chile, Universidad Austral de Chile.
- Molinia, F.C. G. Evans, y M.L, W.M. (1994) Incorporation of penetrating cryoprotectants in diluents for pellet-freezing ram spermatozoa. *Theriogenology*. 42, 849-858. Obtenida de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0093691X9490453P>.
- Morrier, A., F. Castonguay, J.L. Bailey, (2002). Glycerol addition and conservation of fresh and cryopreserved ram spermatozoa. *Can. J. Anim.Sci.* 347-356.
- Phillips, N. J., G. Evans, McGowan, M. R., (2004). Measures used to assess frozen-thawed semen in Australian livestock semen processing centres. *Aust Vet J.* 82 (5), 309-310.
- Palacios, A. (1994). Aspectos fisiológicos acerca del congelamiento del semen. *Revista veterinaria México*.
- Rodríguez, Martínez, (2000). Evaluación del semen congelado: Métodos tradicionales y de actualidad. *Topics in Bull Fertility*. Chenoweth P.J. International Veterinary Information Service. Ithaca, New York. USA.
- Salisbury G. W. y N. L. Vandemark (1964). Fisiología de la reproducción e inseminación artificial de los bovinos. Editorial Acribia. Zaragoza, España.

- Silva, P., yB. Gadella, (2006). Detection of damage in mammalian sperm cells. Obtenido de Theriogenology: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16242762>
- Stewart, D. (1951). Store of bull spermatozoa at low temperatures. *VetRec*; 63: 65-66.
- Stornelli, M. C., C. M., Tittarelli, C. A. Savignone, y, M. A. Stornelli(2005). "Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal".  
67Facultad de Ciencias Veterinaria. Universidad Nacional de La Plata. CC296, (B1900AVW) La Plata, Argentina.
- Stradaioli, G., T. Noro, L. Sylla, yM. Monaci, (2007). Decrease in comparison between two extenders. Obtenido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17337045>.
- Vishwanath, R. y P.Shannon, (2000). Storage of bovine semen in liquidand frozen state. *Animal Reproduction Science* 62 23-53.
- Watson, PF. (1990). Artificial insemination and the preservation ofsemen. En: Lamming GE. (ed). *Marshals Physiology of Reproduction 2.Reproduction in the male*. Churchil Livingstone. Edinburgo.747-869. Obtenida de<http://europepmc.org/abstract/MED/1576550/reload=0;jsessionid=E8BUz3KdyYVhBfYHNuUZ8>.