

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MÉDICO VETERINARIAS



Procesamiento de semen bovino

Por:

DAVID ALONSO BACA DE LA FUENTE

MONOGRAFÍA

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Torreón, Coahuila, México
Febrero 2019

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MÉDICO VETERINARIAS

Procesamiento de semen bovino

Por:

DAVID ALONSO BACA DE LA FUENTE

MONOGRAFÍA

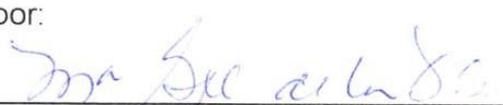
Que se somete a la consideración del H. Jurado Examinador como requisito parcial para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Aprobada por:



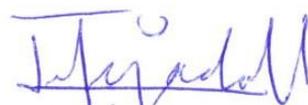
M.C. J. Guadalupe Rodríguez Martínez
Presidente



Dra. Ma. Guadalupe De La Fuente Salcido
Vocal



M.V.Z. Rodrigo Isidro Simón Alonso
Vocal



Dra. Luz María Tejada Ugarte
Vocal Suplente



M.C. J. GUADALUPE RODRÍGUEZ MARTÍNEZ
Coordinador de la División Regional de Ciencia Animal


Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal

Torreón, Coahuila, México
Febrero 2019

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MÉDICO VETERINARIAS

Procesamiento de semen bovino

Por:

DAVID ALONSO BACA DE LA FUENTE

MONOGRAFIA

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Aprobada por el Comité de Asesoría:

M.C. J. Guadalupe Rodríguez Martínez
Asesor Principal

Ma. Guadalupe De La Fuente Salcido

Dra. Ma. Guadalupe De La Fuente Salcido
Coasesor

Rodrigo Isidro Simon Alonso

M.V.Z. Rodrigo Isidro Simon Alonso
Coasesor

M.C. J. GUADALUPE RODRÍGUEZ MARTÍNEZ
Coordinador de la División Regional de Ciencia Animal



Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal

Torreón, Coahuila, México
Febrero 2019

AGRADECIMIENTOS

A DIOS

Por haberme permitido vivir esta etapa de mi vida y ahora me ayuda a finalizar una de mis metas.

A MIS PADRES

Con su ejemplo me han forjado como la persona que soy en la actualidad; muchos de mis logros se los debo a ustedes a mi madre por darme esa fortaleza y templanza para nunca rendirme en todos mis proyectos y así llegar a concluir mi carrera. A mi padre por toda esa confianza apoyo y dedicación incondicional que me ha brindado sin titubear en ningún momento.

A MIS HERMANOS

Les agradezco por siempre estar presentes aportando buenas cosas en mi vida y también por toda esa alegría, felicidad y emociones que siempre me han causado.

A MIS ASERORES

Por su apoyo y dedicación en cada una de las etapas de mi formación como Médico Veterinario Zootecnista

RESUMEN

De las tecnologías aplicadas a la reproducción animal, sin duda alguna, la Inseminación Artificial ha sido la que más ha contribuido al desarrollo genético de los animales domésticos; entre ellos los bovinos quizá sean los que más avances han obtenido, la técnica de inseminación artificial, la transferencia de embriones e incluso la inseminación in vitro no habrían alcanzado tal éxito si no fuese por el manejo adecuado del semen, en el que se ha logrado avances significativos en la extracción de semen, manipulación (sexado por poner un ejemplo) y conservación en la que se han empleado conocimientos de fisiología reproductiva, salud entre muchos otros.

El presente documento tiene como objetivo sentar las bases para la criopreservación correcta de semen así como aquellos puntos para la realización correcta una buena inseminación artificial, abordados de una manera sencilla cada uno de los puntos que a nuestro parecer no deberían ser olvidados por su aparente simpleza, pero planteados de una manera clara y precisa.

Palabras clave

Inseminación artificial, Semen, Extracción de semen, Fisiología reproductiva, Dilución del semen

INDICÉ

AGRADECIMIENTOS.....	<i>i</i>
RESUMEN	<i>ii</i>
INTRODUCCIÓN.....	1
I.- INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN BOVINOS	2
II.- DEFINICIÓN, OBJETIVOS, VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL	3
2.1. Definición.....	3
2.2. Objetivos.....	4
2.3. Ventajas	4
2.4. Desventajas:.....	5
III.- ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DEL TORO.....	6
3.1. Escroto	6
3.2. Testículo.....	6
3.3. Epidídimo.....	8
3.4. Conducto deferente.....	9
3.5. Cordón espermático.....	9
3.6. Próstata.....	10
3.7. Vesículas seminales	11
3.8. Glándulas bulbouretrales (de cowper).....	11
3.9. Pene.....	12

3.10. Músculos del pene	12
3.11. Prepucio	13
3.12. Uretra masculina	13
IV.- ESPERMATOGÉNESIS.....	16
V.- DEFINICIÓN DE ESPERMATOZOIDE.....	21
VI.- MORFOLOGIA.....	21
VII.- DILUYENTES.....	22
7.1 Citrato-Yema:	25
7.2 Tris-Yema	25
7.3 Leche en polvo.....	26
VIII.- TÉCNICAS DE RECOLECCIÓN DE SEMEN	27
8.1. Método de la vagina artificial:.....	28
8.2. Método con electroeyaculador:	29
8.3. Masaje transrectal (MTR):.....	31
IX.- PREDILUCIÓN.....	32
X.- EVALUACIÓN.....	32
10.1. Evaluación macroscópicas.-	33
10.2. Evaluación Microscópica.-	33
XI.- CALCULO DE NÚMERO DE DOSIS	37

XII.- DILUCIÓN Y GLICEROLIZACIÓN (ADICIÓN DE GLICEROL)	38
12.1. Dilución.....	38
12.2. La glicerolización.-	39
XIII.- EQUILIBRAMIENTO.	39
XIV.- SEGUNDA EVALUACIÓN	40
XV.- ETIQUETADO DE LA PAJILLA	40
XVI.- SELLADO DE LA PAJILLA	41
XVII.- CONGELADO	41
XVIII.- ALMACENAMIENTO	42
XIX.- DESCONGELADO	42
XX.- CONTROL DE CALIDAD	43
XXI.- MANEJO DEL TERMO O CONSERVADORA A NITRÓGENO LÍQUIDO	44
XXII.- QUE ES LA CITOMETRÍA DE FLUJO Y PARA QUÉ SIRVE	45
XXIII.- EQUIPO PARA LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL	49
XXIV.- MOMENTO DE LA INSEMINACIÓN	50
XXV.- VIDA ÚTIL DEL SEMEN	52
XXVI.- MANEJO DEL SEMEN PARA SU DESCONGELACIÓN Y PREPARACIÓN DE LA PISTOLA DE INSEMINACIÓN	52
XXVII.- TÉCNICA DE INSEMINACIÓN RECTO CERVICAL	54

XXVIII. INFERTILIDAD EN EL MACHO.....	55
<i>Alteraciones en el cuadro espermático del toro.....</i>	55
28.1. Degeneración testicular progresiva	55
28.2 Degeneración testicular reversible	56
28.3 Criptorquidia	56
28.4 Vesiculitis.....	56
28.5 Espermatogénesis imperfecta	56
28.6 Hipoplasia testicular	57
28.7 Subalimentación.....	57
XXIX. ENFERMEDADES VENÉREAS.....	58
29.1 Campylobacter	58
29.2 Brucelosis.....	59
29.3 Leptospirosis	60
29.4 Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR)	60
29.5 Neosporosis.....	61
29.6 Diarrea viral bovina (BVD)	61
29.7 Tricomoniasis	62
CONCLUSIÓN.....	63
BIBLIOGRAFÍA	64

INDICÉ DE FIGURAS

Imagen 1: se observan las tres fases de la espermatogenesis desde el inicio con las células tronco (A0) hasta los espermatozoides ya formados (obtenido de Galina y Valencia, 2012).....	18
Imagen 4: Composición del diluyente tris-yema (Obtenido de Medina, y Col., 2007). ...	26
Imagen 5: Se Observa la extracción de semen con el método de vagina artificial (obtenido de Arieta, y Col., 2014)	29
Imagen 6: Introducción de electrodo para el método de la electroeyaculación (Obtenido de Arieta, y Col., 2014)	31
Imagen 7: Forma de calificar la actividad masal (Obtenido de Brito, y Reinoso, 2017) .	34
Imagen 8: Diferentes anomalías del espermatozoide (Obtenido de Brito, y Reinoso, 2017).....	36
Imagen 9: Método de descongelación de semen utilizando termo de regulación automática (Obtenido de Hernández, y Ortega, 2009).....	43
Imagen 10: De las cómo está compuesto un termo de nitrógeno (Montero, 2013)	44
Imagen 11: Registro o inventario en cabras (Obtenido de Cárdenas, 2008)	45
Imagen 12: Explicación de la separación de las cargas positivas y negativas de la citometría de flujo (Obtenido de Arroyo, 2008).....	48
Imagen 13: Se Observa un Kit de inseminación artificial (1: termo; 2: corta pajillas; 3: pinzas; 4: aplicadores; 5: fundas para aplicador; 6: guante; 7: toallas) (Montero, 2013)	50
Imagen 14: Explicación del momento idóneo cuando se debe inseminar una vaca (Obtenido de Ruiz, y Col., 2006).....	52

Imagen15: Muestra el sitio correcto donde se debe depositar el semen (Obtenido Hernández, y Ortega, 2009) 55

Imagen 16: de las diferentes causas de infertilidad reproductiva en machos (Obtenido de Hafez y Hafez, 2000)..... 58

INTRODUCCIÓN

El procesamiento de semen y el uso de la inseminación artificial (IA) en especies como la bovina y principalmente en la industria lechera es una actividad ampliamente extendida y con buenos resultados biológicos y económicos. Los avances genéticos logrados en las diferentes especies, han obedecido principalmente a los procesos de selección de animales con mérito genético superior y la IA, ha permanecido como el principal vehículo para la diseminación de genes deseables y el consiguiente mejoramiento en la producción.

La IA constituye una técnica que ha permitido el avance acelerado de los programas de reproducción y mejoramiento genético, a la vez ayuda a eliminar ciertas limitantes, por ser una herramienta eficaz que tiene un papel relevante en la planeación y control reproductivo dentro de los sistemas de producción, facilitando la adaptación de dichos sistemas a las exigencias cambiantes del mercado.

En los sistemas de producción, la necesidad de fertilizar grandes números de hembras con semen de animales genéticamente superiores y distantes, por largos períodos, o en diferentes momentos a través del año, estimula la investigación del almacenamiento de espermatozoides bajo condiciones artificiales.

El presente trabajo de investigación informará acerca del procesamiento de semen en ganado bovino, actividad que consiste en la extracción y elaboración de pajillas de semen para utilizarlas en IA (INSEMINACION ARTIFICIAL), donde la participación del macho queda limitada al aporte del semen obtenido por algunas de las técnicas de extracción del semen.

Asimismo, en este trabajo se contemplan los temas de manera breve acerca de la historia sobre los primeros estudios y experimentos que se tienen registrados

sobre la IA, tanto en México como en el mundo.

También aborda las ventajas y desventajas, tanto en lo económico como en lo genético, etc. que se tienen sobre la práctica de esta actividad.

Y de igual manera estudia temas como la anatomía y fisiología del toro, el manejo adecuado del semen, el equipo para la inseminación artificial, manejo del termo o conservadora de nitrógeno líquido, algunas generalidades sobre la fertilidad y esterilidad en el ganado y el ejemplo sobre la técnica de inseminación recto cervical.

Por lo que el lector al concluir el estudio del texto contará con los conocimientos básicos sobre esta técnica de procesamiento de semen en bovinos y que con la guía de un experto es posible que lo lleve a la práctica.

I.- INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN BOVINOS

Historia

Mientras que la historia de la Inseminación Artificial en México data solamente desde finales de los años 50's. Las primeras investigaciones o comunicaciones del uso de la IA. Fue en el año de 1780, por el fisiólogo italiano Lázaro Spallanzani, realizado en perras. Existen reportes de que los árabes utilizaban la inseminación siglos antes (año 1300 d.C.) para la fecundar yeguas con semen robado de garañones.

En 1782, P. Rossi y Branchi, repitieron con éxito el experimento de Spallanzani. En 1803, el mismo L. Spallanzani informó que los espermatozoides enfriados con nieve no morían, sino que solo se tornaban inmóviles y que exponerlos al calor recuperaban la motilidad por varias horas.

A partir de esta última fecha no hubo informes adicionales sobre la inseminación artificial a finales del siglo, entre 1884 y 1887 Everett Milais inseminó 19 perras de las cuales; quedaron gestantes.

En 1897, Wealter Heape, en Inglaterra, trabajó sobre la Inseminación Artificial en perras y concluyó que un solo eyaculado podría servir para varias perras y que la inseminación podría ser una herramienta valiosa para estudiar los factores genéticos.

Pero corresponde a Rusia el hecho de haber difundido la inseminación artificial; en 1949 existían en ese país 4 mil 638 centros de inseminación artificial y se inseminaron 825 mil vacas y 15 millones de ovejas.

En 1936, Sorensen y Glylling-Holm organizaron la primera cooperativa de IA. En Dinamarca y en el año de 1952 alrededor del 55% de las vacas de ese país Eran inseminadas artificialmente. En Estados Unidos de Norteamérica, la primera cooperativa de IA. Se estableció en el año de 1938, siendo uno de los pioneros el profesor E. J. Peny.

En Japón, Nishikawa, realizó inseminación en vacas, ovejas, cabras, cerdos y pollos. En Rusia, Milovanov. Diseñó e hicieron prácticas las vaginas artificiales para recolección de semen.

Cassou, produjo las pajillas comerciales utilizadas mundialmente, con un método de sellado de pajillas plásticas y una pistola para inseminación. Originalmente se usaron solo las pajillas para 0,5ml de semen, pero las pajillas para 0,25ml de semen se hicieron populares al requerir menos espacio para el almacenamiento.

En México se inicia la inseminación artificial a mediados de 1960 por el Instituto Nacional de Inseminación Artificial y Reproducción Animal, dependiente de la Secretaría de Agricultura y Ganadería. En el 2000 se estimó que sólo se inseminó 4.3% de las hembras en México (SAGARPA, 2018) y (Giraldo, 2007).

II.- DEFINICIÓN, OBJETIVOS, VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

2.1. Definición

La inseminación artificial (IA) en el ganado bovino se define como una técnica para la reproducción que consiste en colocar semen procesado, procedente de un toro

sano, en el útero de una vaca en celo, utilizando instrumental destinado para tal fin (Hoyos, 2009).

2.2. Objetivos

Control de enfermedades venéreas. El hecho de eliminar el contacto entre macho y hembra, ha demostrado ser un arma eficaz en el control de enfermedades transmisibles por el coito. A medida que esto se fue cumpliendo, el objetivo fue ir mejorando en ganado paulatinamente en sus aspectos productivos.

Mejoramiento genético del rebaño. La inseminación artificial permite evaluar los toros a usar en su descendencia. Cada año y cada generación de toros es mejor que otra que la antecede, de modo que el uso de ellos redundará en una mejora del rebaño en general (Díaz, y Col., 2003).

2.3. Ventajas

- 1) El uso de sementales sobresalientes ofrece la oportunidad de mejorar genéticamente los animales del hato.
- 2) Potencial reproductivo de un semental se incrementa, es decir, si un toro por monta natural puede cubrir entre 49 y 70 vacas por año, a través de la IA y con el uso de semen congelado se pueden servir miles de vacas por año.
- 3) Con uso de la IA se puede probar rápidamente el potencial productivo y reproductivo de un semental. Este se puede evaluar sobre un grupo de vacas en una sola generación, mientras que por monta natural se utilizara demasiado tiempo incluso toda la vida del semental.
- 4) Se reducen los riesgos de transmitir enfermedades de dos formas: a) las organizaciones de IA llevan un control estricto de enfermedades no procesando el semen de animales enfermos y se usa a través del uso de antibióticos que se incorporan durante el proceso del semen.
- 5) Se pueden utilizar sementales valiosos que debido a una lesión física no pueden copular. Se ha observado que algunos toros quedan incapaces para

copular después del transporte, peleas con otros toros o por algún accidente.

6) Pueden ser servidas hembras jóvenes o de talla pequeña por toros grandes o pesados sin temor de lastimarlas o por el contrario, en ocasiones se pueden emplear sementales jóvenes o pequeños de talla para realizar la cópula.

7) Se puede mejorar el control de registros, cubriciones y nacimientos. Así mismo se mejora el nivel de manejo, ya que para garantizar el éxito de la IA es necesario llevar un buen sistema de registro lo que permite mejorar la selección de los animales que van a participar en la IA ya que no deben entrar animales mal nutridos ni enfermos.

2.4. Desventajas:

- 1) La utilización de un toro no probado ni estudiado en cuanto a sus características genéticas, puede traer como consecuencias pérdidas en la producción genética de cualquier explotación.
- 2) Se necesita personal capacitado para el manejo del semen, la inseminación y además para una adecuada detección de los animales en celo.
- 3) Al iniciar un programa de IA en una explotación la inversión monetaria es alta (compra de equipo, instalaciones, etc.).
- 4) Las enfermedades pueden propagarse con gran rapidez de toros que no se les lleva un control sanitario estricto. La adición de antibióticos en el diluyente, no es suficiente para controlar todas las enfermedades que pueden ser transmitidas por el semen.
- 5) Si no se tiene un buen manejo del termo de nitrógeno y el nivel baja demasiado; y el mal descongelamiento del semen puede reducir capacidad fecundante del espermatozoide incluso llegar a cero, afectando porcentaje de concepción del hato.
- 6) Dificultades y deficiencias en la detección de celos
(Huanca, 2001), (Robson, y Col., 2004) y (Díaz, y Col., 2003).

III.- ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DEL TORO

El aparato reproductor del macho consiste en varios órganos individuales que actúan de manera coordinada para producir espermatozoides y transportarlos al tracto reproductor femenino.

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

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

3.1. Escroto

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

3.2. Testículo

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

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

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

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

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

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

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

Caballo: a los 9 -11 meses de gestación

Toro: a los 3.5 a 4 meses de gestación

Oveja: a los 80 días de gestación

Cerdo: a los 90 días de gestación

Perro: 5 días después del nacimiento

Gato: 2 a 5 días después del nacimiento

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

3.3. Epidídimo

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

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

El epidídimo no solo es un conducto para los espermatozoides, sino que aporta un medio adecuado en el que estos se concentran, maduran y adquieren la capacidad de fecundación. Los espermatozoides que entran en la cabeza del epidídimo, desde la rete testis son inmóviles e inviábiles y solo alcanzan la motilidad y la capacidad para fecundar tras experimentar el proceso de migración y maduración a lo largo de la cabeza y del cuerpo del epidídimo. La cola de este y el conducto deferente donde desemboca, constituyen un punto de almacenamiento de espermatozoides maduros y se conocen como reservas extragonadales de esperma. El tiempo de tránsito de los espermatozoides a través de la cabeza y el cuerpo no se altera con la eyaculación y es similar en todas las especies domésticas (2 a 5 días). La duración del almacenamiento en la cola del epidídimo es más variable entre especies (3 a 13 días) y puede reducirse en

varios días en machos sexualmente activos. Los animales en reposo sexual durante 7-10 días tienen una reserva máxima de espermatozoides en dicha cola que se reduce al menos un 25% con eyaculaciones diarias o alternas (Cunningham, 2003).

3.4. Conducto deferente

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

3.5. Cordón espermático

Se extiende desde el anillo inguinal profundo donde las estructuras que lo forman se unen, se extiende oblicua y ventralmente a través del canal inguinal, pasa al lado del pene y termina en el borde de inserción del testículo. Está formado por las siguientes estructuras

- 1.- Arteria testicular

2.- Venas testiculares que forman el plexo pampiniforme alrededor de la arteria

3.- Linfáticos

4.- Plexo testicular de nervios autónomos

5.- Conducto deferente, arteria y vena deferente

6.- músculo cremáster

7.- Capa visceral de la túnica vaginal

Las primeras 4 estructuras forman una masa redonda que forma la parte craneal del cordón, unidos por tejido conectivo mezclado con el músculo cremáster. (Sisson y Grossman, 1982).

La ampolla es una reserva adicional de espermatozoides y, en algunas especies como en el caballo, el toro y el perro, el contenido de las glándulas se añade al eyaculado. Junto con los espermatozoides, el semen eyaculado está compuesto por secreciones de las glándulas accesorias, que añaden volumen, nutrientes, tampons y un número de sustancias cuyas funciones todavía se desconocen. En el toro, el carnero y el conejo estos órganos son firmes lobulados y con una luz estrecha mientras que en el caballo y verraco tienen forma de saco (Cunningham, 2003).

3.6. Próstata

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

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

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

3.7. Vesículas seminales

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

3.8. Glándulas bulbouretrales (de Cowper)

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

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

3.9. Pene

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

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

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

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

3.10. Músculos del pene

1.- Músculo isquiocavernoso (erector del pene), es un músculo impar, corto y fuerte, se origina en la tuberosidad isquiática y porción adyacente del ligamento sacrotuberal ancho, se inserta en el pilar y parte adyacente del cuerpo del pene. Su acción es tirar del pene hacia la pelvis y contribuye así a mantener la erección por la compresión de las venas dorsales del pene.

2.- Retractor del pene, se origina en la superficie ventral de la I y II vértebras coccígeas, pasa a los lados del recto y se encuentra ventral al ano. Pasa a corta

distancia entre las capas superficial y profunda de los músculos bulboesponjosos y posteriormente en la superficie ventral del pene. Se inserta en la túnica albugínea, su acción es retraer el pene al interior de la vaina (Sisson y Grossman, 1982).

3.11. Prepucio

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

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

3.12. Uretra masculina

Sirve al mismo tiempo de vía espermática y urinaria, denominándose canal urogenital. La uretra es un tubo membranoso que sale del cuello de la vejiga por el orificio uretral interno y que llega hasta el vértice del pene, desembocando en este al exterior por el orificio uretral externo. Se distingue: parte pelviana, parte peneana, porción bulbar

1.- Músculo uretral, está formado por fibras longitudinales y transversas que comprime la parte pelviana de la uretra y las glándulas bulbouretrales. Interviene durante la eyaculación y la micción.

2.- Músculo bulboesponjoso, es la continuación del músculo bulbouretral sobre la parte pelviana de la uretra. Se extiende del arco isquiático al glande. La raíz es la parte más gruesa. Su acción es vaciar la parte esponjosa de la uretra.

Presenta glándulas mucosas tubuloalveolares ramificadas. La uretra pélvica está cubierta por epitelio de transición, la lámina propia submucosa es de tejido colágeno laxo (Sisson y Grossman, 1982).

La erección es un fenómeno psicossomático que implica la acción simultánea del sistema vascular, neurológico y endocrino. La contracción del músculo isquiocavernoso durante la misma produce la oclusión del retorno venoso, al tiempo que la relajación de los cuerpos cavernoso y esponjoso mediada por el sistema parasimpático provoca que los espacios cavernosos se llenen de sangre y que el pene aumente de tamaño y turgencia.

La emisión es la liberación de espermatozoides y líquidos de las glándulas accesorias dentro de la uretra pélvica como resultado de un reflejo toracolumbar mediado por el sistema simpático que induce la contracción del músculo liso del conducto deferente y de las glándulas accesorias. La eyaculación es la expulsión energética de semen de la uretra producida por un reflejo parasimpático sacro que induce contracciones rítmicas de los músculos bulboesponjoso, isquiocavernoso y uretral.

En los mamíferos el aparato reproductor del macho está regulado por los intrincados sistemas de retroalimentación en los que participan el hipotálamo, el lóbulo anterior de la hipófisis y los testículos. El hipotálamo sintetiza y secreta de forma pulsátil el decapeptido gonadoliverina (GnRH), que actúa sobre las células gonadotropas de la adenohipofisis. Estas, estimuladas por la GnRH, sintetizan y secretan dos gonadotropinas: el folículo estimulante (FSH) y la luteinizante (LH). Ambas son unas glucoproteínas formadas por dos péptidos unidos mediante enlaces no covalentes. Cada célula gonadotropa tiene la capacidad para sintetizar FSH y LH o ambas, su liberación depende de los patrones pulsátiles de secreción de la GnRH. Pulsos irregulares y de pequeña amplitud resultan en la liberación de FSH mientras que pulsos de alta frecuencia inducen la liberación de LH.

Dentro del testículo la LH se une a los receptores de membrana de las células de Leydig y estimula en ellos la conversión del colesterol en testosterona. Una vez sintetizados los andrógenos se difunden en sangre y en linfa donde se unen a las proteínas transportadoras y andrógenos, que se producen en las células de Sertoli. Altas concentraciones locales de andrógenos dentro del testículo se consideran esenciales para que la espermatogénesis pueda llevarse a cabo con normalidad. Las proteínas transportadoras de andrógenos potencian la acumulación de altas concentraciones de testosterona y dihidrotestosterona dentro de los túbulos seminíferos y en el intersticio de los testículos (Cunningham, 2003).

Se ha demostrado que la FSH tiene receptores específicos en las células de Sertoli dentro de los túbulos seminíferos. La FSH y la testosterona estimulan ciertas funciones de dichas células, incluidas la síntesis y liberación de las proteínas transportadoras de andrógenos, inhibina, activina, estrógenos y de varios productos como la transferrina, que están implicadas en la transferencia de nutrientes a las células germinales, la meiosis, la maduración de los espermatocitos, la espermiación y la función de las células de Leydig

Las células de Sertoli y de Leydig parecen interactuar de forma paracrina. La producción de esteroides por las segundas puede estimularse por un producto liberado por las células de Sertoli, cuya secreción aumenta por la acción de la FSH. Es posible que esta sustancia sea la inhibina, que se produce en las células de Sertoli en respuesta a la FSH y estimula la esteroidogénesis en las células de Leydig. La inhibina junto con la testosterona, está implicada en el complejo sistema de retroalimentación de las funciones de la hipófisis. Se sabe que los esteroides gonadales suprimen la liberación de FSH; sin embargo, la inhibina es el inhibidor más potente de la secreción de esta hormona. La testosterona, la dihidrotestosterona y los estrógenos regulan la síntesis de LH a través de una retroalimentación negativa ejercida a nivel del hipotálamo o el lóbulo anterior de la hipófisis. Debido a que tanto la FSH como la LH son necesarias para la existencia en los testículos de una alta concentración de sustancias responsables de una espermatogénesis normal, la administración exógena de testosterona o inhibina

para aumentar la fertilidad podría estar contraindicada ya que impediría la secreción de estos factores responsables del mantenimiento de un entorno espermatogénico adecuado (Cunningham, 2003)

IV.- ESPERMATOGÉNESIS

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

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

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

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

Generalidades sobre la producción y anatomía espermática en mamíferos

La célula germinal masculina se produce en la gónada (testículo) mediante un proceso permanente de división de las células germinales o espermatogonias. El proceso de división meiótica denominado espermatogénesis está controlado hormonalmente por el eje hipófisis-hipotálamo- gónada. A partir de cada espermatogonia se producen cuatro espermatocitos haploides que permanecen unidos entre sí por puentes citoplasmáticos y a la vez están en comunicación con la célula nutricia o de Sertoli; estas últimas, a partir de moléculas señalizadoras, inducen el proceso denominado espermiogénesis o metamorfosis que convierte las espermátides en espermatozoides.

La espermatogénesis se divide en tres fases: la fase proliferativa, fase meiotica y la fase de diferenciación.

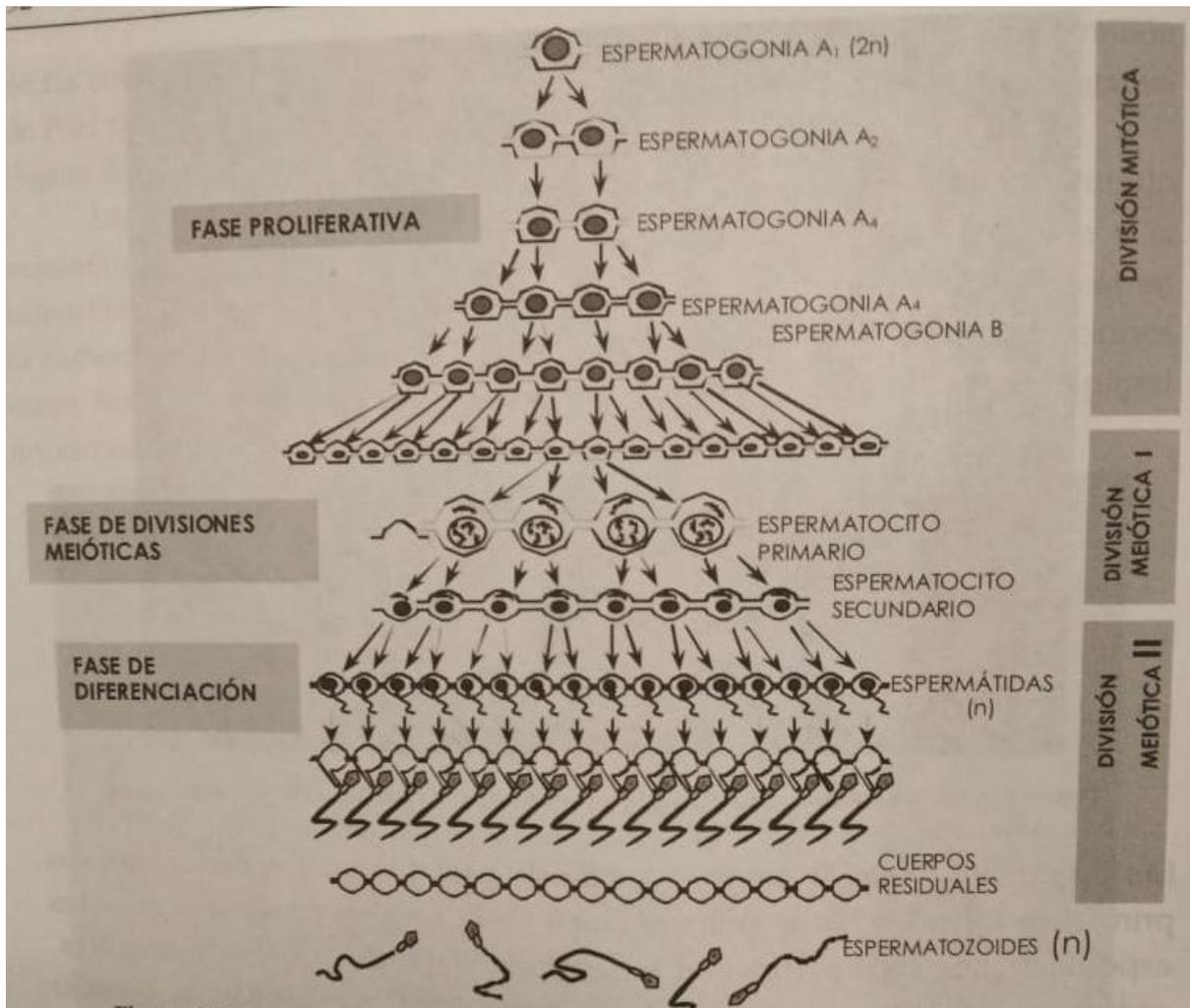


Imagen 1: se observan las tres fases de la espermatogénesis desde el inicio con las células tronco (A₀) hasta los espermatozoides ya formados (obtenido de Galina y Valencia, 2012).

La fase proliferativa: después de la pubertad y la vida reproductiva del macho, las espermatogonias se dividen de una manera rápida y sucesiva por mitosis de tipo A₀ (células tronco), las A₁-A₄, las intermedias y las de tipo B. Todas ellas representan estadios sucesivos del desarrollo de la espermatogonia (Galina y Valencia, 2012).

La fase meiotica: cada espermatocito entra en meiosis (una división de ADN seguida de dos divisiones secuenciales), al final de la misma se habrán generado cuatro espermátidas haploides. La primera meiosis es lenta y da lugar a los espermatocitos secundarios. La segunda meiosis es más rápida y da lugar a espermátidas haploides.

Diferenciación: las células haploides recién formadas ahora sufren una larga diferenciación final, que lleva implícita una serie de importantes cambios y finaliza con la formación del espermatozoide (Dunlop y malbert, 2004).

En la fase de Golgi, la organela del mismo nombre se acerca al núcleo, desprende vesículas que se le sobreponen y poco a poco se unen para convertirse en la vesícula acrosomal que se localiza en la parte apical del núcleo. Los centríolos situados en forma de T, muy cercanos al aparato de Golgi, van migrando hacia lo que será la base del núcleo. El centríolo proximal se sitúa en la parte basal del núcleo y, a partir del centríolo distal crece el axonema conformado por dos microtúbulos centrales y 9 pares de microtúbulos periféricos.

En la fase de capuchón, la vesícula acrosomal se aplana formando una verdadera capucha sobre el núcleo. El núcleo se compacta mucho más al cambiar las histonas por protaminas, de tal forma que no puede haber ni replicación ni transcripción (Fase G₀ del ciclo celular). La inactividad transcripcional del núcleo hace que el espermatozoide sea dependiente de modificaciones postranscripcionales como la fosforilación de proteínas necesarias para adaptar su función de acuerdo a las necesidades. Las fosforilaciones ocurren desde las células germinales, casi siempre en los residuos de tirosina, distinto a otras células eucarióticas en las que la mayoría de las fosforilaciones ocurren en residuos de serina y treonina (Olivera, y Col., 2006).

En la fase acrosomal la espermátide gira de tal forma que el acrosoma queda en dirección de la membrana basal; 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; las mitocondrias se agrupan alrededor de este último en su parte cercana al núcleo, formando la pieza media.

En esta fase el espermatozoide adquiere su morfología definitiva. Finalmente se sucede la fase de maduración, donde se observan las características finales de los espermatozoides: forma de la cabeza característica de cada especie (oval y plana), cubierta en sus dos terceras partes por el acrosoma; y la cola compuesta por las piezas media, principal y terminal, en la pieza media se encuentran las mitocondrias en forma de hélice. En esta fase se elimina gran parte del citoplasma por desplazamiento del mismo hacia la pieza terminal de la cola originando la llamada gota citoplasmática. El proceso de maduración termina con la espermiación, o liberación de los espermatozoides a la luz del túbulo seminífero. Mediante movimientos peristálticos los espermias son transportados de la rete testis a los ductos eferentes y de allí al epidídimo en cuya cola se almacenan.

Durante la eyaculación los espermatozoides junto con el plasma seminal pasan por la uretra y a través de movimientos peristálticos se liberan en el tracto genital femenino. La eyaculación es el reflejo de expulsión de los espermatozoides y el plasma seminal fuera del tracto reproductivo. El reflejo eyaculatorio es el resultado de la estimulación sensorial especialmente en el glándulo, lo que causa contracciones musculares coordinadas. Una vez se introduce el pene en la vagina se inicia el reflejo por impulsos que se transmiten del glándulo a través del nervio púdico hasta la región lumbosacra de la médula espinal. Así el semen es forzado a pasar a la uretra lo que induce la contracción de los músculos uretrales, isquicavernosos y bulboespongiosos. El eyaculado contiene, además, las secreciones de las glándulas anexas (vesículas seminales, próstata, glándulas bulbouretrales (Olivera, y Col., 2006)).

Hombre	72
Toro	61
Perro	61
Caballo	57
Morueco	47
Cerdo	39

Imagen 2: de duración de la espermatogénesis en las diferentes especies (obtenido de Dunlop y Malbert, 2004).

V.- DEFINICIÓN DE ESPERMATOZOIDE.

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

VI.- MORFOLOGIA

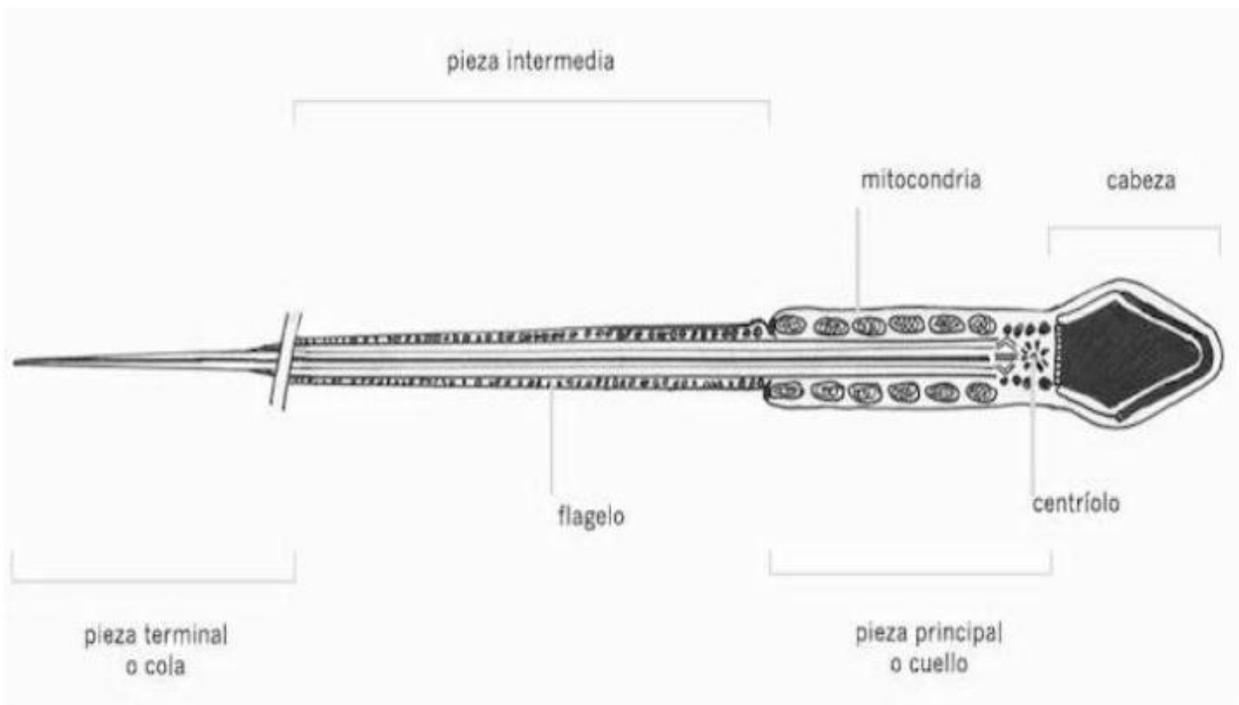


Imagen 3: Morfología del espermatozoide (obtenido de Angelino, 2009)

Para una interacción normal del espermatozoide con el microambiente del tracto genital femenino y con las envolturas del ovocito, además de tener motilidad progresiva, los espermatozoides han de ser morfológicamente normales. Cualquier anomalía que afecte algún atributo de espermatozoide puede dificultar su migración en el tracto genital de la hembra impidiendo la unión con el ovocito. A medida que aumenta la proporción de espermatozoides anormales en el eyaculado, desciende la capacidad fecundante del mismo, por tanto es muy importante tener presente que las muestras de semen con un porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales inferior al 70% han de descartarse para el proceso de congelado (Muiño, y Col., 2005).

VII.- DILUYENTES

El término diluyente se refiere a una solución acuosa que permite aumentar el volumen del eyaculado, hasta conseguir las dosis necesarias, preservar las características funcionales de las células espermáticas y mantener el nivel de fertilidad adecuado, los diluyentes deben requerir ciertas características. Debe ser isotónico al semen, debe tener capacidad amortiguadora para evitar cambios de pH al neutralizar los ácidos producidos por el metabolismo del espermatozoide, proteger los espermatozoides del choque térmico durante la congelación y descongelación, proporcionar nutrientes para el metabolismo de los espermatozoides con un mínimo efecto sobre la fertilidad, además, los diluyentes deben de ser fáciles de preparar, estables y económicos.

La mayoría de los diluyentes que se han desarrollado contienen yema de huevo, pero se han desarrollado algunos que no contienen yema de huevo (Carballo y Col., 2009).

Amortiguación del pH. Los Buffer se adicionan con la finalidad de neutralizar los productos de desecho del metabolismo espermático, principalmente el ácido láctico. Un diluyente debe ser isotónico al semen (tener la misma concentración de

iones libres, debe tener capacidad amortiguadora (evitar cambios en el pH al neutralizar los productos del metabolismo) Un buffer común es el citrato de sodio, aunque también se han usado otros como el Tris (hidroximetil-amino-metano) con buenos resultados, proporcionando un pH adecuado (6.5 – 7.2) (Perez, 2005).

Protección contra el choque térmico. La yema de huevo es un constituyente común en los diluyentes para congelamiento de semen de los animales domésticos y muchas especies exóticas, cuya función es proteger a los espermatozoides contra el choque térmico, que es un efecto de transición de fases en la bicapa lipídica y proporcionando protección durante el congelado y descongelado. Los componentes lipoproteicos de la leche son también capaces de protección contra el frío aún en ausencia de yema de huevo; por lo que la leche y la yema de huevo es un ingrediente del diluyente utilizado como protector del choque térmico y como fuente de nutrientes (Perez, 2005).

Sustancias crioprotectores. Son las sustancias que protegen a los espermatozoides durante el proceso de congelación y descongelación, se pueden clasificar en dos grupos: las de rápida penetración a la célula como son, DMSO, etilenglicol (EG) y propilenglicol y las de lenta penetración que presentan mayor peso molecular como el glicerol. El más usado es el glicerol, ya que al igual que otras sustancias son capaces de penetrar la barrera de la membrana celular, reduciendo los daños causados por la formación de cristales de hielo en el citoplasma celular del espermatozoide; provoca la salida de líquido intracelular deshidratando parcialmente la célula y reduciendo el riesgo de cristalización intracelular.

Fuentes de energía. Los más comunes agregados son la fructosa y la glucosa, siendo esta última la más utilizada, estas pueden desempeñar diferentes funciones. Los emplean como fuente de energía ya que las células espermáticas lo requieren para su motilidad y conservación, aunque los espermatozoides presentan metabolismo propio, lo que se intenta es proteger las reservas

intracelulares, además contribuyen a la osmoralidad del diluyente (Ramones, 2013).

Antibióticos: Generalmente los testículos y las glándulas sexuales accesorias se encuentran libres de bacterias, la contaminación bacteriana del semen ocurre al momento de la recolección o de la manipulación del semen con instrumentos del laboratorio. La importancia de la contaminación bacteriana del eyaculado no está dada solamente por la patogenicidad de los gérmenes presentes sino también por el grado de contaminación. Por estas razones es importante en la práctica disminuir la multiplicación de las bacterias que pueden llegar a contaminar el semen estableciendo normas higiénico-sanitarias durante la recolección y la manipulación que la acompañan. (Silveira, y Col., 2005).

Hay evidencias de que ciertas bacterias pueden producir toxinas y productos metabólicos nocivos para la viabilidad del semen (Trujillo, y Rivera, 2002)

Se conoce además que a pesar de todas las precauciones higiénicas tomadas durante la recolección y manipulación, las muestras espermáticas contienen siempre una cantidad variable de gérmenes contaminantes, capaces de tener una participación desfavorable sobre la conservación del semen o eventualmente sobre la fertilidad. La combinación de penicilina (1000 UI/ml) y estreptomicina (1 mg/ml) son ingredientes estándares en los diluyentes utilizados para semen de rumiantes. La bacteriología general del semen fresco y después de la congelación de 50 toros para inseminación artificial, se efectuó el conteo total de unidades formadoras de colonias (UFC). A 15 de los toros se les realizó el examen bacteriológico de sus lavados prepuciales. En todas las muestras de semen fresco se obtuvo crecimiento bacteriano y los gérmenes más frecuentemente aislados fueron: *Escherichia coli* (50,0%), *Staphylococcus aureus* (36,0%) y *Staphylococcus coagulasa negativa* (28,0%). En el semen congelado solamente se obtuvo crecimiento en el 20,0%. El 74,0% del semen fresco alcanzó conteos $\leq 1 \times 10^4$ UFC/mL antes de ser procesado; después de la congelación el 80,0% fue estéril, razón importante para la adición de antibióticos y se ha demostrado que la penicilina disminuye notablemente el consumo de glucosa y de oxígeno por parte

del nemaspermo y reduce el crecimiento bacteriano y la utilización simultánea de penicilina y estreptomina, tenían una actividad antibacteriana más eficaz con disminución del efecto tóxico (Alba, y Silveira, 2005).

Preparación de los diluyentes más utilizados:

7.1 Citrato-Yema:

- * 80% de solución de citrato de sodio al 2.9%
- * 20% de yema de huevo fresco
- * 1 mg/ml de D-fructosa (PM 180.16 gr/mol)
- * 1000 UI/ml de penicilina g sódica cristalina
- * 1 mg/ml de estreptomina monaxin

Preparación: Se diluyen 2.9 g de citrato de sodio en 100 ml de agua desionizada (conductividad 2-3 ppm). Se toman 80 ml de la solución de citrato de sodio y se agregan 20 ml de yema de huevo, así como la fructosa y los antibióticos. Se agita la mezcla hasta homogeneizar perfectamente. (Pérez, 2005).

7.2 Tris-Yema

Tabla 1. Composición de las fracciones A y B del diluyente para la crioconservación de semen de toros Sanmartinero, utilizando un equipo de congelación programable CL-8800.

Componente	Fración A	Fración B	Concentración Final
Tris (hidroximetil- aminometano)	1.21 g	1.21 g	2.42%
Acido cítrico Monohidratado	0.69 g	0.69 g	1.8%
Fructosa	0.5 g	0.5 g	1.0%
Yema de huevo	10 mL	10 mL	20%
Glicerol	—	7 ml	7%
Agua destilada estéril c.s.p	50 mL	50 mL	—

Imagen 4: Composición del diluyente tris-yema (Obtenido de Medina, y Col., 2007).

Preparación: Se diluyen perfectamente bien las sustancias químicas en 80 ml de agua desionizada (conductividad 2-3 ppm) y posteriormente se adiciona la yema de huevo y los antibióticos. Se agita la mezcla hasta homogeneizar perfectamente. (Medina, y Col., 2007).

7.3 Leche en polvo

- * 10 gr de leche en polvo (1% de grasa)
- * 1mg/ml de D-fructosa
- * 1000 UI/ml de penicilina g sódica cristalina
- * 1 mg/ml de estreptomycin monaxin

Preparación: Se diluye la leche perfectamente bien en 100 ml de agua desionizada (conductividad 2-3 ppm), se coloca en baño María, se calienta a 95°C por 10 min. Se enfría a 30°C y se agregan la fructosa y los antibióticos.

Una vez preparado el diluyente se divide en dos partes iguales, una para la predilución y la primera dilución (Diluyente A), y a la otra se le agrega la cantidad correspondiente de glicerol según el diluyente usado (Diluyente B). La cantidad de glicerol (C₃H₈O₃) que se agrega a los diluyentes en el procesamiento de semen bovino varía de acuerdo al diluyente utilizado, y éste va de 10 a 14%. Cuando se utiliza leche se recomienda el 10%, Tris-yema 12% y Citrato-yema 14% (Pérez, 2005) y (Medina, y Col., 2007).

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. 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 (Cruz, D., 2014).

VIII.- TÉCNICAS DE RECOLECCIÓN DE SEMEN

Una vez que los animales de granja llegan a la madurez, la producción de esperma continúa a lo largo de su vida reproductiva. Durante los períodos de descanso sexual, los espermatozoides viejos que quedan en el epidídimo mueren, degeneran y son absorbidos. Por esta razón, la primera muestra que se obtiene después de un largo período de inactividad sexual puede contener un alto porcentaje de espermatozoides muertos y anormales, por lo tanto la evaluación del semen no debe hacerse con una única colecta.

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

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

Los métodos utilizados para la extracción son los siguientes:

8.1. Método de la vagina artificial:

La vagina artificial consiste en un tubo cilíndrico de plástico rígido y resistente, de siete centímetros de diámetro y 35–40 centímetros 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 temperatura y presión, lográndose así la eyaculación. El producto recogido se halla libre de contaminación y es netamente representativo de la eyaculación normal. La recolecta en vagina artificial requiere la presencia de una vaca o de un falso animal que sirva de estimulante. Esta le ofrece al macho condiciones parecidas a la vagina (Arieta, y Col., 2014) y (Escamilla, 2005).

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.

En este sentido, se apoya con el método más efectivo para estimular al toro, la monta falsa, que consiste en permitir al semental montar sobre el señuelo y desviar el pene tomando con la palma de la mano la piel del prepucio sin ofrecerle la vagina. Después 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, concentración espermática y motilidad. El método de la vagina artificial tiene como principal desventaja de requerir el uso de animales dóciles y entrenados. La universalidad del uso de esta técnica responde al hecho de que se obtienen eyaculados muy limpios y con una baja contaminación cuando se realiza correctamente. El equipamiento base es de muy bajo costo (Arieta, y Col., 2014).



Imagen 5: Se Observa la extracción de semen con el método de vagina artificial (obtenido de Arieta, y Col., 2014)

8.2. Método con electroeyaculador:

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

Los electroeyaculadores están diseñados para estimular los nervios pélvicos simpáticos y parasimpáticos con impulsos de bajo voltaje y amperaje y de esta forma pueden inducir erección peneana y eyaculación. Un sistema de electroeyaculación está constituido por los siguientes componentes: la caja de transporte, la sonda rectal, la unidad de control, el cargador de batería, el cable de energía, el cable de conexión de la sonda, el mango, el cono y el envase de colección (Curbelo y Rodríguez, 2012).

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.

Primero se asegura que las tres líneas metálicas o electrodos ubicados ventralmente, estén limpios y libres de corrosión, posteriormente se retira el exceso de heces del recto, se levanta la cola del toro hasta hacerla horizontal, se lubrica el electrodo y se introduce en el recto, dirigiéndolo ligeramente hacia abajo y haciendo movimientos rotatorios. Una vez insertado completamente el electrodo, se coloca la cola en el medio del mango (en forma de “U”) de este y se sujeta con la misma mano que sujetaba la cola cuando se utiliza la electroeyaculación se inician los estímulos a mínima intensidad y rítmicamente se incrementa, de acuerdo con la reacción del animal, cada estímulo debe durar menos de un segundo y se deben aplicar entre cinco y 10 estímulos por cada grado de intensidad. Las reacciones son muy variables entre animales y aun en el mismo animal (Arieta, y Col., 2014).

Ventajas:

- No es necesaria la voluntad del animal en el momento de la colecta seminal.
- No se necesita una vaca en celo
- Es muy útil en toros que padecen de enfermedades que les impide la monta

Desventajas:

- Se considera que es doloroso. Este método aplicado sin anestesia ha sido desaprobado en el Reino Unido y prohibido en varios países europeos.
- Es necesario que el operador tenga experiencia para coleccionar el semen, ya que es posible que se genere dolor e incomodidad del animal al momento de la estimulación eléctrica.

- El equipo necesario es costoso

(Brito & Reinoso, 2017).



Imagen 6: Introducción de electrodo para el método de la electroeyaculación

(Obtenido de Arieta, y Col., 2014)

8.3. Masaje transrectal (MTR):

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

Ventajas

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

Desventajas

- Irritación de la mucosa rectal
- Falta de protrusión del pene que resulta en muestras contaminadas.
- Se necesita de una segunda persona para colectar la muestra.
- Dificulta la estimulación de machos excitados o de mal carácter
- Se requiere de un operador con mucha destreza

(Brito & Reinoso, 2017).

IX.- PREDILUCIÓN

Luego de la preparación del diluyente, la fracción A (sin glicerol) fue colocada en baño María a 36°C; por su parte, la fracción B (glicerolada) fue mantenida a 20° C. El semen mantenido a 36°C fue diluido en proporción 1:1 con la fracción A mantenida a igual temperatura. Inmediatamente después el semen diluido fue trasladado a un baño de agua a 36°C, en donde fue disminuida lentamente la temperatura (1°C.*min) hasta alcanzar los 20°C (Medina, y Col., 2007).

X.- EVALUACIÓN

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

- Viabilidad post-descongelación.
- Morfología.
- Número de espermatozoides con motilidad

(Catena, y Cabodevila, 1999).

La valoración o evaluación seminal bovina se realiza mediante características macroscópicas y microscópicas:

10.1. Evaluación macroscópicas.-

Volumen: Este se expresa en mililitros (ml), se realiza directamente en el tubo colector de semen. Normalmente el volumen del eyaculado de los toros es de aproximadamente 2 ml en los jóvenes y ≥ 4 ml en animales adultos, pudiendo llegar hasta 12 ml.

Color: Las muestras más densas son las mejores, estas son de color y aspecto cremoso. Mientras más diluidas su color varía desde el aspecto lechoso hasta completamente claro, como por ejemplo en animales con oligospermia o azoospermia (Morillo, y Col. 2012).

Se debe considerar que colores rojizos o amarillentos son anormales indicando contaminación de la muestra (Brito, y Reinoso, 2017) y (Cabrera, y Pantoja, 2012).

PH: Se utilizó papel indicador de ph (Cabrera, y Pantoja, 2012). 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. (Cruz, D, 2014) y (Tamayo, 2013).

Circunferencia escrotal (CE): se midió con una cinta métrica (testímetro) tomando la lectura en la parte más ancha del escroto, ejerciendo una leve presión para el descenso de los testículos (Ruíz, y Col., 2010). La circunferencia escrotal es una medida de gran importancia, para determinar la fertilidad de toros, ya que es una medida altamente correlacionada con calidad y cantidad de semen (Batista, 2011).

10.2. Evaluación Microscópica.-

Actividad masal: Se colocó una gota de semen puro (20 μ l) sobre una lámina portaobjetos en el microscopio óptico con objetivo de 10x y con platina temperada a 32.5 °C. Se estimó mediante una valoración subjetiva del movimiento masivo de

los espermatozoides, Se observa la velocidad del torbellino (ondas) y se valora subjetivamente en una escala de 0 al 5 (0= inmóvil o sin torbellino; 5 máximo) (Cabrera, y Pantoja, 2012).

0= nulo

1= escaso

2=regular

3= bueno

4= muy bueno

5= excelente

Imagen 7: Forma de calificar la actividad masal (Obtenido de Brito, y Reinoso, 2017)

Motilidad. Se determina en base a la proporción de espermatozoides progresivamente móviles, expresado en porcentaje. Para ello, se coloca una gota de semen sobre una lámina portaobjetos y cubierta con una laminilla. Se observa al microscopio con objetivo de 40x. Un espermatozoide con motilidad progresiva individual es aquel que se mueve de un punto a otro en una línea más o menos recta.

Concentración espermática. El conteo de espermatozoides se realiza en la cámara de Neubauer, está se carga con un hemocitómetro, con la variante del uso de agua bidestilada para inmovilizar a los espermatozoides. El conteo de los espermatozoides se realiza en cinco cuadrantes al azar y se saca un promedio, este se multiplica por 10^7 para obtener una concentración por cm^3 . La concentración normal de semen bovino puede variar entre 800 y 1200 millones de espermatozoides por cm^3 o ml (Cabrera, y Pantoja, 2012).

La medición de la concentración espermática se realiza comúnmente a través de un conteo de células por medio de cámaras de conteo (Neubauer o hematocitómetro) (Rodríguez, y Col., 2008).

Porcentaje de espermatozoides vivos y muertos. Se coloca una gota de semen y dos gotas de eosina y de nigrosina. Se mezcla en una lámina portaobjetos y se realiza un frotis. Se deja secar por 20 segundos y se observa al microscopio con objetivo de 40x. Se cuentan las células espermáticas con ayuda de dos contómetros, y la frecuencia de vivos (espermatozoides blancos) y muertos (espermatozoides rojos) se expresa en porcentaje.

Morfología espermática. Se realizan frotis de espermatozoides teñidos con eosina-nigrosina y se observa al microscopio usando un objetivo de 40x. Se observan 100 células espermáticas en tres campos, considerando anormales todos los espermatozoides que presentan irregularidad en su forma. El resultado es el promedio de los tres campos evaluados. Las muestras para ser criopreservadas deben tener una morfología normal mínima del 70% (Cabrera, y Pantoja, 2012) y (Ruíz, y Col., 2010).

Viabilidad espermática. El estudio de la viabilidad espermática se basa en el análisis de la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides, mediante el uso de dos fluorocromos combinados, uno de ellos solo es capaz de atravesar las membranas plasmáticas dañadas o degeneradas, y por tanto permite identificar las células muertas o en proceso de degeneración, mientras que el otro es capaz de atravesar membranas celulares intactas por lo tanto permite identificar la población de células viables. Uno de los fluorocromos más utilizados para identificar células muertas es el ioduro de propidio, penetra espermatozoides con la membrana plasmática dañada y se une al núcleo, y emite una fluorescencia roja. De los fluorocromos más utilizados para la identificación de células vivas se encuentra el grupo de las carboxifluorescencias que son compuestos no fluorescentes estas penetra las células con membranas intactas debido a la acción

de las esteras intracelulares, y emite una fluorescencia de color verde (Muiño, y Col., 2005).

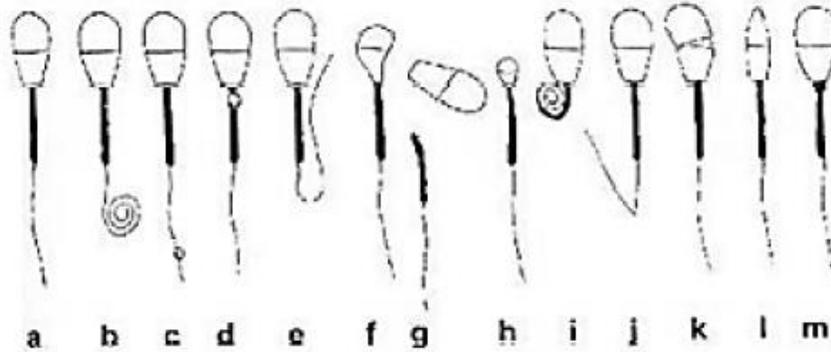


Imagen 8: Diferentes anomalías del espermatozoide (Obtenido de Brito, y Reinoso, 2017)

Satisfactorios: Tienen como mínimo 60% de espermatozoides con motilidad progresiva y 70% de espermatozoides morfológicamente normales. Las anomalías de núcleo no superan el 20% y las acrosomales y de cola el 25%.

Cuestionables: Tienen entre 40 y 59% de espermatozoides con motilidad progresiva o entre 50 y 69% de espermatozoides normales.

Insatisfactorios: La calidad seminal es inferior a aquella establecida para una clasificación cuestionable. Para determinar el grado de maduración de la cromatina espermática se clasifican los espermatozoides como maduros (células no coloreadas) e inmaduros (células coloreadas en cualquiera grado). La presencia de coloración positiva implica falta de maduración o maduración incompleta de la cromatina (Acuña, y Col., 2001).

Existen múltiples factores que intervienen en cada prueba, por ejemplo, el examen de motilidad puede estar influenciado por los procedimientos a los que es

sometido el semen, desde su recolección, edad del animal, tipo de diluyente utilizado, y tiempo de equilibrio previo a la congelación, referencian que éste método es de tipo subjetivo y depende más de la experiencia y habilidad de quien realiza la prueba, por lo que se puede subestimar el verdadero potencial de un animal o raza, y además no es un método que permita predecir la capacidad fecundante del semen (Salamanca, y Crosby , 2013)

XI.- CALCULO DE NÚMERO DE DOSIS

Los cálculos de dilución se realizan de la siguiente manera:

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

CÉLULAS VIVAS= VOLUMEN X CONCENTRACIÓN X % DE MOTILIDAD

La determinación del número de pajillas se obtiene de la siguiente manera

#No. De pajillas= No. De células vivas / millones de espermatozoides deseados por dosis

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

CANTIDAD DE DILUYENTE = NÚMERO DE PAJILLAS X 0.5 ML

Dónde:

0.5 = volumen de la pajilla en ml (Cruz Solís, 2014) y (Carballo, y Col., 2009).

(VE X CE X %MP X %N) / CDP

Donde:

VE = Volumen de eyaculado

CE = Concentración espermática

MP = Motilidad Progresiva (expresada en porcentaje)

%N = Porcentaje de células normales.

CDP = Concentración deseada por pajilla.

A continuación se presenta un ejemplo: Datos: VE = 5 ml, CE = 1800 millones de espermatozoides/ml, MP = 75%, Anormalidades = 10% y queremos una concentración por pajilla de 50 millones: $(5 \times 1800 \times .75 \times .90) / 50 = 121.5$ dosis o pajillas. (Pérez, 2005).

XII.- DILUCIÓN Y GLICEROLIZACIÓN (ADICIÓN DE GLICEROL)

12.1. Dilución.

Recién colectado el semen se realiza una predilución de 2:1 (diluyente: semen) directamente al semen recolectado y se transfiere a un matraz. Ya en el laboratorio se realiza el agregado de diluyente necesario para completar el volumen obtenido según la fórmula descrita. Durante la colección o la dilución inicial, el semen debe mantenerse a 35-37°C. El diluyente también debe mantenerse a la misma temperatura. Luego de la primera dilución, el semen se enfría lentamente, durante 3-4 horas hasta llegar a 5° C (la primera dilución consiste en agregar la mitad del diluyente necesario usualmente "fracción A", o fracción sin glicerol). El enfriado lento se puede conseguir colocando el tubo o frasco de semen dentro de un recipiente con agua a 37° C. y añadir hielo a esta agua (Carballo, y Col., 2009).

12.2. La glicerolización.-

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. El glicerol también disminuye el estrés osmótico intracelular resultante de la deshidratación que se produce por la sustitución del agua intracelular, necesaria para el mantenimiento del volumen celular (Cruz Solís, 2014).

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 El glicerol se agrega cuando el semen llega a 5° C.

La adición de glicerol se puede realizar de varias maneras:

- A) agregando esta fracción de una vez.
- B) separado en 3 o 4 etapas cada 15-20 minutos.
- C) agregándole por goteo lentamente

(Curbelo, y Rodríguez, 2012) y (Cruz Solís, 2014).

XIII.- EQUILIBRAMIENTO.

El semen de toro diluido es enfriado a 5 °C, se le agrega glicerol y luego se deja un intervalo de 1-10 horas para “equilibración”, es decir que es el intervalo entre la adición de la fracción de diluyente con glicerol y el congelado. En un comienzo se

pensó que esta etapa era necesaria para permitir la entrada de glicerol a la célula, y completar así su acción protectora (Curbelo, y Rodríguez, 2012)

El proceso que consiste en mantener a 5 °C por un período de tres a seis horas para acondicionar los espermatozoides a la congelación posterior, durante este período se procede a efectuar la identificación, llenado y sellado de las pajuelas (Morillo, y Col., 2012).

XIV.- SEGUNDA EVALUACIÓN

El semen en esta etapa se evalúa por motilidad progresiva con la finalidad de obtener la calidad y saber si tiene probabilidad de congelar (Pérez, 2005).

XV.- ETIQUETADO DE LA PAJILLA

Durante el tiempo en que el semen es preparado para su envasado y congelado, las pajillas son debidamente etiquetadas con la siguiente información:

- a) Nombre y registro del toro
- b) Clave del toro
- c) Raza
- d) Registro
- e) Institución que procesa el semen

Métodos de envasado para semen

El tamaño y forma de envasado tiene una importancia práctica dado que determina tanto el medio de identificación de cada dosis de semen y como ésta

será acomodada para su almacenamiento en el contenedor de nitrógeno. Los métodos más comunes de envasado para semen bovino son las pajillas francesas de .5 ml, y mini pajillas de .25 ml. Las pajillas necesitan poco espacio de almacenaje, son de bajo costo, su manejo es sencillo y se identifican fácilmente (Pérez, 2005) y (Morillo, y Col., 2012).

XVI.- SELLADO DE LA PAJILLA

Existen varias formas de sellar las pajillas, una máquina especial de vacío que va llenando y al mismo tiempo sellando automáticamente otras como alcohol polivinílico, esferas de plástico y esferas metálicas (Pérez, 2005) y (Morillo, y Col., 2012).

XVII.- CONGELADO

Las pajillas son colocadas a vapor del nitrógeno líquido a -70°C durante 15 minutos después procede la Introducción de las pajillas dentro de nitrógeno líquido (N_2) a -190°C durante 5 minutos (Ramónez, 2013)

Luego de que las pajuelas sean estabilizadas, se proceda a la congelación mediante el sistema de vapor de nitrógeno líquido a -120°C , colocando las gradillas con las pajuelas a 4 cm sobre el nivel de nitrógeno, contenido en el recipiente para tal efecto, manteniéndose por al menos 10 minutos. Enseguida las gradillas se introducen directamente en el nitrógeno líquido para ser conservadas a -180°C a -196°C . En centros de inseminación artificial, el proceso de congelación se efectúa utilizando equipos computarizados. Con este sistema existe la opción de congelar desde un número mínimo, hasta miles de pajuelas en un solo paso, en forma confiable y exacta (Ibáñez, y Col., 2016).

XVIII.- ALMACENAMIENTO

Luego del trabajo de congelación se procede a la colocación de las pajillas en los gobelet, luego en los bastones y posteriormente en las canastillas. Introducción de las canastillas al tanque que contiene nitrógeno líquido, usados para distribución y comercialización del semen congelado (Ramónez, 2013) y (Ibáñez, y Col., 2016).

Dentro del tanque se colocan 5 o 6 canastillas de metal “canisters”, las cuales cuelgan de un anillo o plato ubicado en la boca del termo por medio de un gancho. Además de sujetar los ganchos de la canastilla, el anillo o plato sirve para identificar el semen (razas o machos) que se encuentra en cada canastilla. Dentro de cada canastilla de metal se colocan tubos de plástico “globelets”, de un centímetro de diámetro, cerrados en el fondo. Dentro de estos contenedores se colocan las pajillas o pajuelas de semen, en grupos de 5 a 10 pajillas por contenedor. Cada pajilla de semen tiene la correspondiente identificación (Cárdenas, 2008).

XIX.- DESCONGELADO

La descongelación se realizó utilizando un baño María que estuvo a una temperatura entre 35-37 °C y se dejó durante 20 a 30 segundos (Ramónez, 2013)

El semen está a -196 °C cuando está en el termo de nitrógeno y se debe descongelar antes de depositarlo en el útero. El proceso de descongelación debe ser rápido para evitar daños en los espermatozoides. La técnica recomendada consiste en retirar la pajilla del termo e introducirla en agua a 35-37 °C durante 20 a 30 segundos. De ninguna manera se recomienda la descongelación en la axila, overol o entre las manos. Se aconseja tener un termo que mantenga el agua con pocas variaciones de temperatura. Existen en el mercado termos que en forma automática regulan la temperatura del agua (Hernández, y Ortega, 2009).



Imagen 9: Método descongelación de semen utilizando termo de regulación automática (Obtenido de Hernández, y Ortega, 2009).

XX.- CONTROL DE CALIDAD

Por último, es importante tomar un número de pajuelas representativo, proceder a su descongelación y evaluar los resultados de todo el proceso, requisito imprescindible para dar el visto bueno a la partida o en su defecto rechazarla. Esta se lleva a cabo 48 horas después del congelado, mediante una evaluación microscópica con la finalidad de conocer si se tuvo éxito (Ibáñez, y Col., 2016).

La regularización de la temperatura es el factor más importante a considerar cuando maneje el semen. Las fluctuaciones en la temperatura van a ocasionar que la calidad del semen se deteriore rápidamente. El semen almacenado en una unidad o termo de nitrógeno líquido de manera adecuada mantendrá su calidad original (Sumba, 2012)

XXI.- MANEJO DEL TERMO O CONSERVADORA A NITRÓGENO LÍQUIDO

El tanque de nitrógeno es un termo conservador de frío, en forma de botella, tiene dos cubiertas de aluminio o acero inoxidable: una externa y otra interna, separadas por un material aislante, El depósito interno del tanque contiene el refrigerante (nitrógeno líquido) (Montero, 2013).

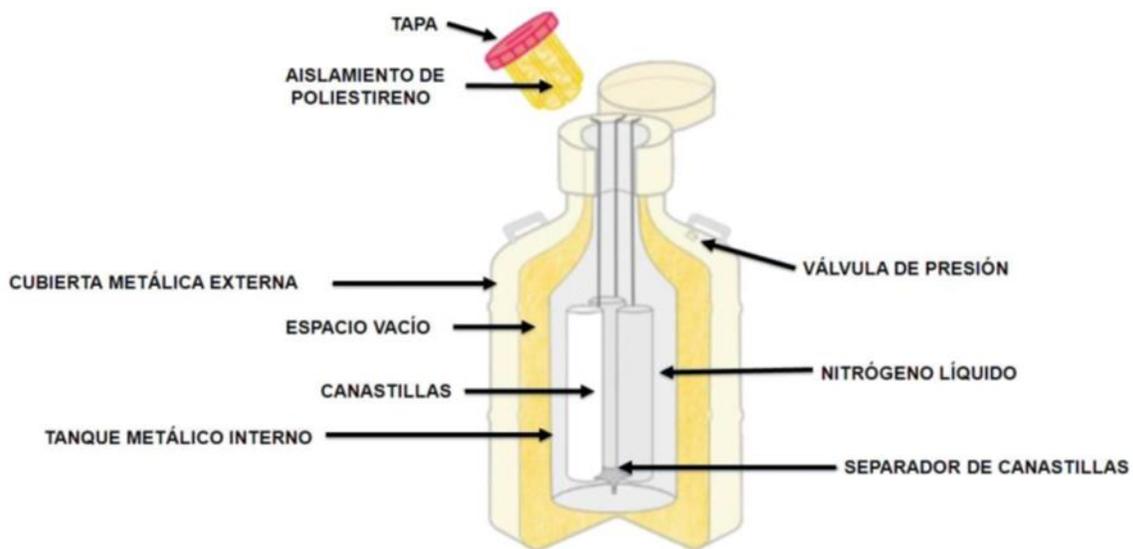


Imagen 10: De las cómo está compuesto un termo de nitrógeno (Montero, 2013)

El nitrógeno líquido tiene una temperatura de -196°C y el espacio vacío por encima del refrigerante. Se recomienda revisar el nivel de nitrógeno al menos una vez por mes. El refrigerante evaporado debe ser repuesto antes de que el nivel baje a 10 cm por encima del fondo, para que se mantenga la temperatura deseada en forma constante. El nivel de nitrógeno líquido se mide introduciendo en el tanque una regla de madera, durante 10 a 15 segundos. La regla se extrae y se agita vigorosamente por 5 segundos para que se forme una escarcha en la porción que tuvo contacto con el nitrógeno. La introducción de la regla dentro del tanque provocará la evaporación de nitrógeno en forma abrupta (se forma una nube densa blanquecina), debido al intercambio de calor con la regla. El tanque debe mantenerse en posición vertical, boca arriba, y ser protegido de daños externos, ocasionados por golpes con objetos contundentes o punzo cortantes. Un tanque averiado podría secarse en menos de 24 horas y el semen almacenado se

perdería. Si en alguna parte externa del tanque se encontrará un área cubierta de escarcha, señala la zona de evaporación e indica que aún hay nitrógeno dentro del termo y que está en ebullición. En estos casos se recomienda trasladar el semen a otro tanque, lo más pronto posible. Estos tanques pueden empezar a perder la capacidad de conservación de frío por deterioro. Para proteger el tanque se recomienda colocarlo dentro de un cajón de madera, ajustado a sus dimensiones. En la tapa del cajón, debe llevarse un registro de control del nivel de nitrógeno y el llenado del tanque (Cárdenas, 2008).

Nombre del cabro:			
Raza:		No. Identificación:	
Fecha	Unidades compradas	Unidades usadas	Unidades que quedan

Imagen 11: Registro o inventario en cabras (Obtenido de Cárdenas, 2008)

XXII.- QUE ES LA CITOMETRÍA DE FLUJO Y PARA QUÉ SIRVE

Los científicos han intentado afanosamente preseleccionar, con seguridad, sexo de la progenie de sus animales. Sin embargo ningún método ha sido tan exitoso como el desarrollado por el Dr. Lawrence Jonson, denominado Citometría, Método éste que fue patentado por el departamento de agricultura de los EE.UU. en el año de 1992 (ABS, 2007).

En los vacunos, el espermatozoide "X" tiene 3.8 % más ADN (ácido desoxirribonucleico) que el espermatozoide "Y", y que la mitad de los espermatozoides producidos portan el cromosoma "X"; la otra mitad él "y". Así entonces podrá comprenderse el por qué en un lote de vacas las cifras de sus nacimientos de machos y de hembras se distribuirá, aproximadamente, en un 50% de cada sexo.

Para arrancar en el proceso en cuestión (citometría), el semen tiene que ser teñido con un colorante fluorescente, el cual se unirá a cada espermatozoide individual según su contenido de ADN. Se hacen pasar luego los espermatozoides a la manera de una corriente o flujo muy delgado a través de la máquina separadora, la misma utiliza un rayo láser, que lo que esencialmente hace es iluminar el colorante. Ahora bien, como el espermatozoide "X" contiene 3.8 % más de ADN, éste atrapa más colorante y hace que resplandezca más brillantemente (ABS, 2007).

Desafortunadamente, la separación del esperma que porta el cromosoma X y Y por medio del citómetro de flujo (clasificación de células) es un proceso ineficiente ya que aproximadamente 75 por ciento del esperma en una eyaculación se desecha (o se pierde) durante el procedimiento. Además, para lograr una pureza de 90 por ciento de un sexo específico, los índices de clasificación típica para el esperma de toro son entre 3,000 y 6,000 espermatozoides por segundo. Por lo tanto, el proceso se considera muy lento ya que tomaría aproximadamente 1 a 2 horas clasificar el número de espermatozoides en una dosis típica de I.A. (20 millones). Ya que no es posible económicamente producir sólo 1 pajilla de semen sexado (con 20 millones de espermatozoides) por hora, la investigación se ha concentrado en maximizar la fertilidad de los números bajos de semen sexado que se ha congelado y descongelado (ABS, 2018).

La citometría de flujo es una técnica que permite identificar, cuantificar, y separar las distintas subpoblaciones celulares presentes en una muestra de células en suspensión (Muiño, y Col., 2005).

Aproximadamente del 100% de los espermatozoides, un 20% termina colectado en la fracción X, y un 20% en la fracción Y; el 60% restante lo constituyen espermatozoides que no pudieron ser detectados por la técnica, espermatozoides muertos y gotas sin esperma. El semen sexado se presenta comercialmente congelado, en pajuelas de 0,25 ml. Las mismas contienen 2×10^6 espermatozoides (Oses, y Col., 2009).

La computadora en realidad clasifica los espermatozoides en tres grupos: los que portan el cromosoma "X", los que portan el cromosoma "Y", y una población mixta de portadores de los dos tipos de cromosomas, que no han podido ser clasificados con claridad. Después, mediante un vibrador los distintos grupos se fraccionan en micro-gotas (a razón de 70/80 mil por segundo) portadoras de un espermatozoide en cada una, que pasan por un dispositivo que les asigna una carga eléctrica positiva ó negativa, según la clasificación hecha por la computadora; finalmente, se las hace pasar por un campo magnético donde aquellas con carga positiva son atraídas hacia el lado negativo, y viceversa.

Así se forman tres corrientes de gotas, que se pueden colectar en tres tubos de ensayo diferentes para separar los espermatozoides X e Y (Arrollo , 2008).

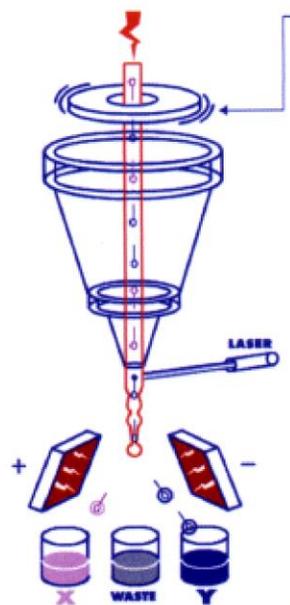


Imagen 12: Explicación de la separación de las cargas positivas y negativas de la citometría de flujo (Obtenido de Arroyo, 2008).

La separación de espermatozoides X e Y se lleva a cabo normalmente en eyaculados con más del 50% de espermatozoides con motilidad progresiva y 75% de espermatozoides normales.

Una dosis de semen congelado convencional para ser empleado en inseminación artificial generalmente tiene unos 20 millones de espermatozoides, a pesar de que la mitad es suficiente para lograr una fertilidad satisfactoria en condiciones normales un citómetro produce unos 10 millones de espermatozoides sexados por hora, por lo que sería muy costoso mantener aquella concentración. Para controlar la calidad del semen, se descongela una pajuela por partida y se evalúa la motilidad progresiva y la pureza (proporción del sexo deseado) de las dosis producidas. Las mismas deben tener un mínimo de 35% de espermatozoides con motilidad progresiva y 85% de certeza del sexo para alcanzar los estándares de aprobación (Oses, y Col., 2009).

Aplicaciones:

- En unos sistemas de cruzamiento rotacional, el semen sexado será útil en los lotes de vientres que se reservan para producir las hembras de reposición, dado que permitirá reducir casi a la mitad la cantidad de madres a inseminar para conseguir la cantidad necesaria de terneras.
- Al disponer de mayor proporción de vaquillonas para reposición se podría aumentar la presión de selección, con el objeto de aumentar el progreso genético en la siguiente generación.
- Las vacas inferiores, en ambos casos, se podrían destinar a producir terneros machos con destino a producir novillos para consumo.
- Podría conseguirse que los toros jóvenes de razas lecheras sometidos a pruebas de progenie produzcan una mayor cantidad de hijas hembra, acelerando ó mejorando la confiabilidad de los resultados (Arrollo, 2008).

XXIII.- EQUIPO PARA LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

Para llevar a cabo la inseminación de manera correcta se requiere el equipo adecuado, un buen kit de inseminación debe contener:

- Un termo de agua caliente para descongelamiento
- Tijeras o corta pajillas
- Pinzas para pajillas
- Aplicadores
- Fundas plásticas para los aplicadores.
- Guantes de plástico hasta los hombros
- Toallas de papel
- Termómetro
- Reloj
- Lubricante no espermicida
- Alcohol
- Termo de nitrógeno
- Papel
- lápiz para llevar registro de las inseminaciones

(Montero, 2013)

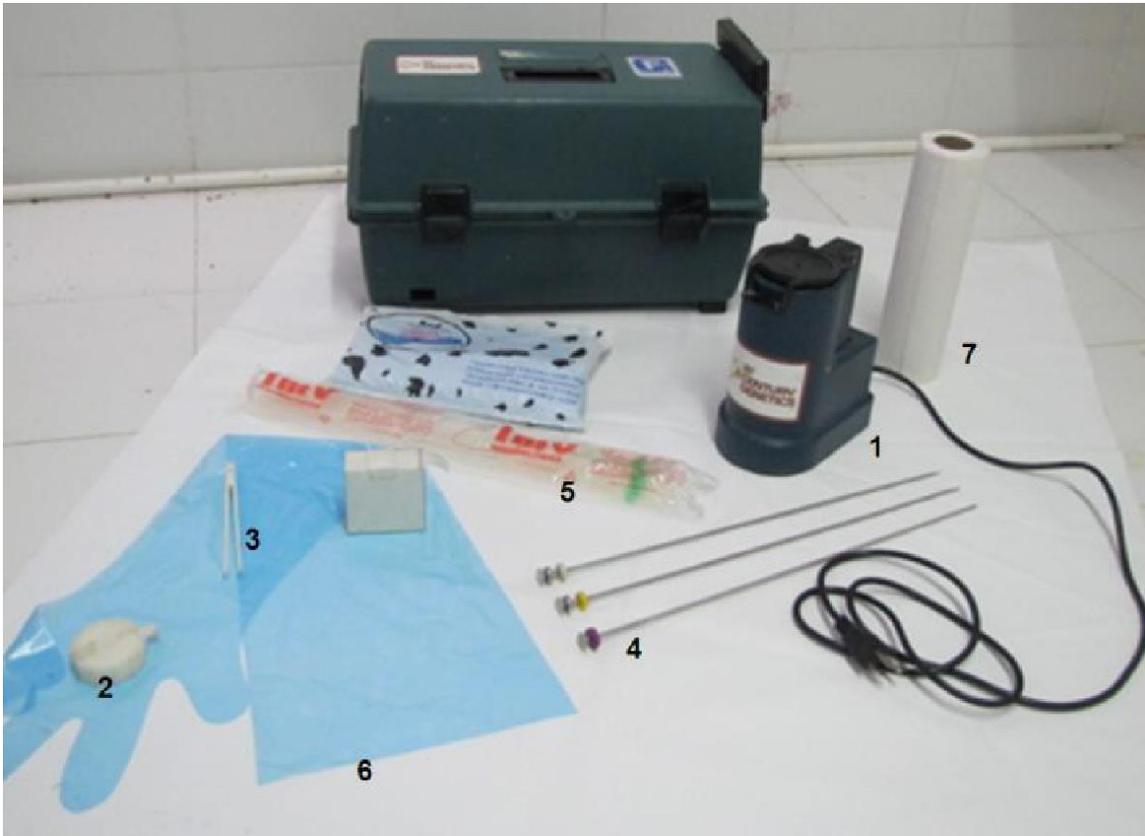


Imagen 13: Se Observa un Kit de inseminación artificial (1: termo; 2: corta pajillas; 3: pinzas; 4: aplicadores; 5: fundas para aplicador; 6: guante; 7: toallas) (Montero, 2013)

XXIV.- MOMENTO DE LA INSEMINACIÓN

El tiempo al cual se realiza la IA es un factor crítico para garantizar que un programa de reproducción tenga éxito, el cual debe combinarse con un programa de detección de calores que sea efectivo, consistente y confiable. Debido a la corta duración del celo, la detección debe hacerse por lo menos 4 veces al día en vacas altas productoras para poder tener una aceptable de tasa de inseminación. El mejor tiempo de inseminación se ha estimado en 12 h después del celo, de modo que es un balance entre la baja fertilidad y la alta calidad del embrión durante una inseminación temprana, y la alta fertilidad con baja viabilidad del embrión (pobre calidad) en la inseminación tardía (Rivera, 2009).

El momento de la IA es un factor clave en las tasas de gestación, ya que ni el óvulo ni los espermatozoides tienen vidas indefinidas dentro del aparato reproductivo de la hembra; el óvulo se libera aproximadamente 30 horas después del inicio del celo y sobrevive de 6 a 12 horas mientras que los espermatozoides permanecen viables hasta 24 horas una vez realizada la IA, por lo tanto, si ésta se realiza al principio del celo no quedarán espermatozoides para fecundar al óvulo y si se realiza muy tarde, el óvulo será el que haya envejecido (Montero , 2013)

Es preciso mencionar que para obtener buenos resultados en la I.A., es necesario considerar el inicio del celo ya que generalmente esta se realiza entre las 8 y las 24 horas después de iniciado el celo, pero el mejor momento se encuentra entre las 12 y las 16 horas. El sistema que se emplea universalmente es la regla AM-PM, es decir, que las vacas que son detectadas en estro por la mañana se inseminan en la tarde del mismo día y las que son detectadas en celo por la tarde son inseminadas por la mañana del día siguiente (Sumba, 2012).

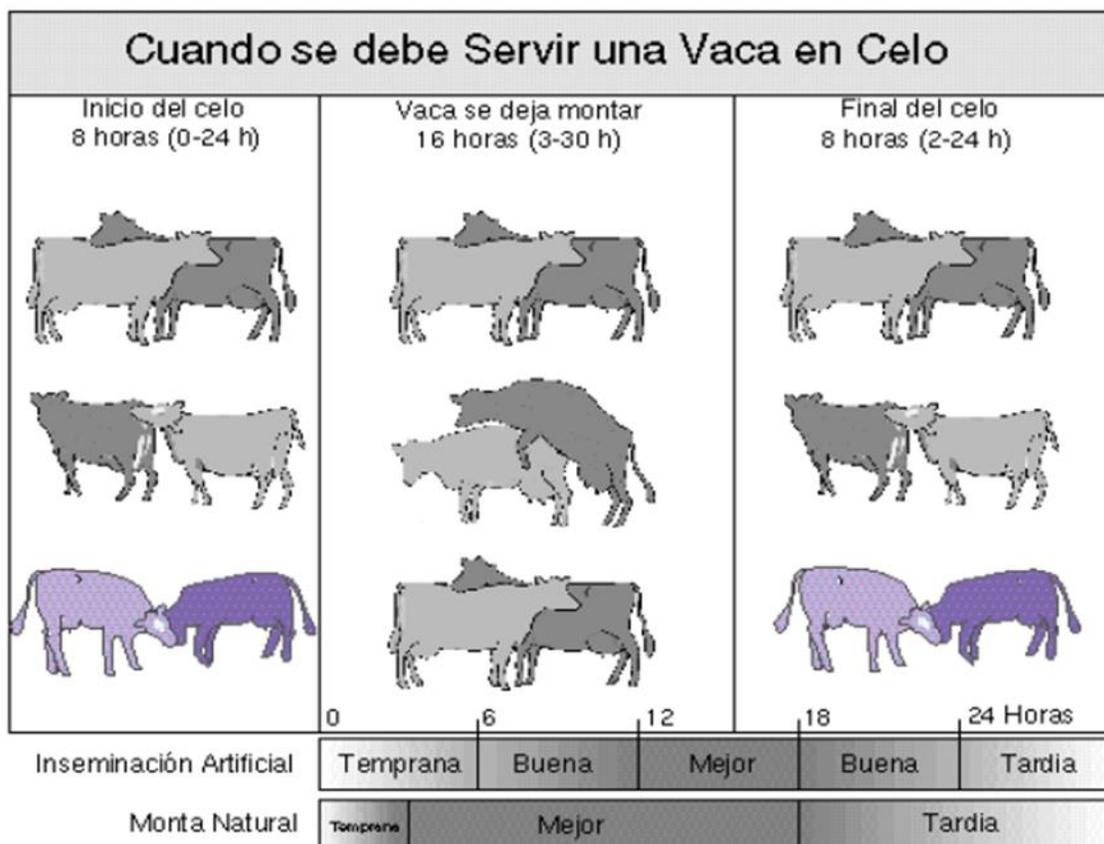


Imagen 14: Explicación del momento idóneo cuando se debe inseminar una vaca (Obtenido de Ruiz, y Col., 2006).

XXV.- VIDA ÚTIL DEL SEMEN

El semen (espermatozoides) puede tener una vida moderadamente larga en el laboratorio bajo condiciones de ambiente controlado. Contrariamente, el útero contiene un ambiente adverso para los espermatozoides que hace que se reduzca su vida útil. Se ha estimado que en general el semen vive por 24- 30 h aproximadamente en el ambiente uterino. Es muy importante recordar que los espermatozoides requieren de 8h de residencia en el útero para terminar con el proceso de capacitación y adquirir la capacidad de fecundar. Una vez adquirida la capacidad de fecundar el óvulo debe estar en la ampolla para maximizar las oportunidades de una fertilización satisfactoria y saludable de los dos gametos. Si el óvulo o el espermatozoide están viejos al momento de la fertilización, se reduce la calidad del embrión y por ende se reduce la fertilización (Rivera, 2009).

XXVI.- MANEJO DEL SEMEN PARA SU DESCONGELACIÓN Y PREPARACIÓN DE LA PISTOLA DE INSEMINACIÓN

- levante la canastilla correcta hasta el cuello del termo para poder sacar el bastón deseado
- Para remover una pajilla, doble la parte superior del bastón un poco. Utilice unas pinzas para remover la pajilla del gobelet. Una pajilla congelada se puede romper así que no trate de doblarla.
- Rápidamente devuelva el bastón a la canastilla y bájelo colocándolo en la posición adecuada en el termo. Nunca se debe tener la canastilla o el bastón en el cuello del termo por más de 10 segundos. Después de este tiempo vuelva a sumergir la canastilla para que se enfríe de nuevo.

- Descongele las pajillas en agua a (36°C) en el termo de descongelación con termómetro que se encuentra a su disposición.
- La pajilla debe ser descongelada un mínimo de 45 segundos en el agua a 36°C. Esta puede mantenerse en perfectas condiciones en el agua mientras que usted llega al área en donde va a colocarla en la pistola y a realizar la inseminación. Utilice el semen inmediatamente después de sacarlo del agua.
- Bajo ninguna circunstancia se debe utilizar semen que ha sido descongelado por más de 15 minutos fuera del agua tibia.
- Preparación para La Inseminación. Si la temperatura exterior es menor a 21°C (70°F) la preparación de la pistola se debe de hacer en un sitio protegido, puede ser en la sala de ordeño, en un almacén o en el carro.
- Remueva la pajilla descongelada del agua. Agítese una o dos veces para que la burbuja suba a la punta que está sellada. Con una toalla de papel séquese muy bien.
- Precaliente la pistola frotando vigorosamente con una toalla de papel.
- Saque un poco el aplicador de la pistola y coloque la pajilla dentro de la cámara
- Utilice unas tijeras para cortar el extremo que está sellado, sin que este corte se haga más abajo del nivel del semen y que el ángulo no sea mayor de 45 grados o use un corta pajillas.
- Coloque la funda sobre la pajilla y jale ligeramente hacia abajo el aplicador hasta que el semen llegue a la punta de la pistola y se pueda asegurar con el aro de plástico. Luego empuje la funda con suavidad pasándola a lo largo del cilindro de la pistola. Empuje el émbolo con suavidad hasta que el semen llegue a la punta de la funda. La pistola está lista para la inseminación.
- Envuelva en una toalla de papel o dentro de la camisa o chamarra para mantenerla a temperatura constante. Todo semen descongelado debe ser protegido contra un choque térmico (Sumba, 2012)

XXVII.- TÉCNICA DE INSEMINACIÓN RECTO CERVICAL

La técnica recto-vaginal es la más comúnmente utilizada para inseminar vacas.

En el proceso de inseminación lo primero es inmovilizar a la vaca que se va a inseminar. Cuando se escoge un lugar para inseminar una vaca, se debe tener en cuenta: La seguridad del animal y del inseminador, la facilidad de su uso, protección contra clima adverso (Hoyos, 2009).

El cérvix se manipula a través del recto y con la otra mano introducimos la pistola por la vagina. Antes de introducir la pistola de inseminación por la vulva, esta se debe lavar con agua y secar con una toalla de papel. En ocasiones la rutina no permite lavar la vulva, en estos casos no se debe olvidar limpiarla con una toalla de papel. Para introducir la pistola, se deben abrir los labios vulvares, para evitar que la pistola de inseminación entre en contacto con ellos y así impedir la introducción de agentes infecciosos. La introducción de la pistola de inseminación en la abertura externa del cérvix se facilita cuando los dedos dirigen la pistola a la abertura externa. Una vez dentro del cérvix, éste se manipula para que la pistola vaya pasando los tres anillos cervicales. Se debe evitar mover la pistola y empujarla, ya que el cérvix es el que se debe manipular para que el dispositivo vaya pasando los anillos; cuando se empuja o se mueve en exceso se puede lastimar la mucosa, y en casos extremos se llegan a producir perforaciones con la subsiguiente formación de abscesos. Una vez que se ha pasado el último anillo cervical, ya se puede depositar el semen. Una forma de saber que ya estamos en el cuerpo del útero, es sintiendo con la mano la punta de la pistola de inseminación inmediatamente después del cérvix. El semen se debe depositar en el útero. Uno de los errores más frecuentes es el depósito del semen en la vagina o en el cérvix (Ruiz, y Col., 2006) y (Hernández, y Ortega, 2009).

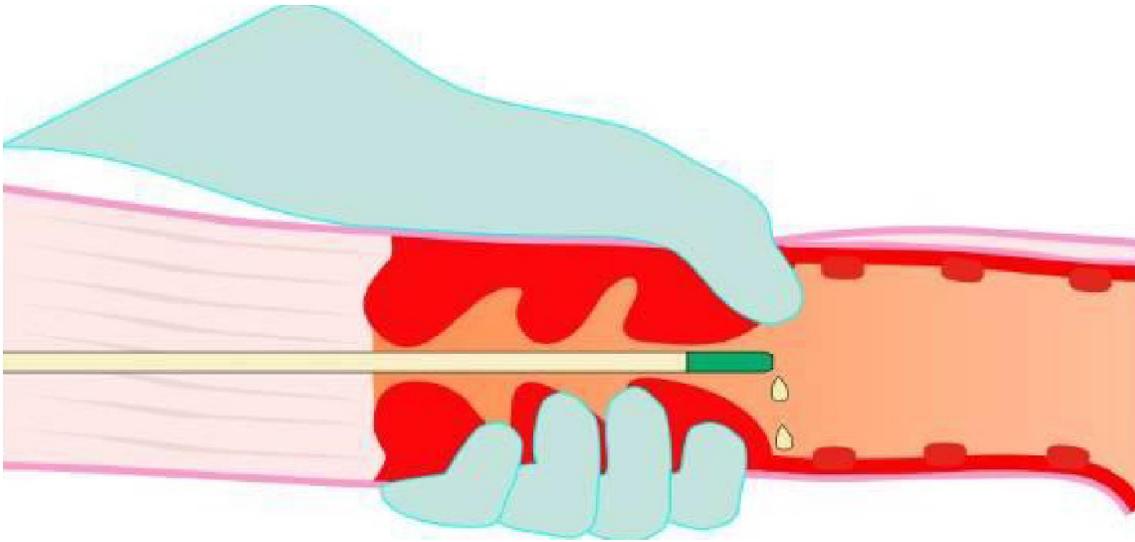


Imagen15: Muestra el sitio correcto donde se debe depositar el semen (Obtenido Hernández, y Ortega, 2009)

XXVIII. INFERTILIDAD EN EL MACHO

Alteraciones en el cuadro espermático del toro

28.1. Degeneración testicular progresiva

Las causas pueden ser diversas, pero siempre aquellas que afectan el equilibrio homeostático en el animal son las que más comúnmente producen espermograma alterado. Pueden ser causas de degeneración testicular: trastornos hormonales, térmicos, desequilibrios nutricionales, traumatismo, agentes infecciosos. Las principales características del espermograma son la disminución de la motilidad y concentración, aumento de las anomalías espermáticas y progresivo deterioro de la calidad de semen (Galina y Valencia, 2012).

Degeneración inducida por pérdida del apoyo de hormonas tróficas

Debido a que la espermatogénesis depende de altas concentraciones de testosterona en el interior de los testículos, la disminución en su producción puede tener consecuencias fatales en la fertilidad. (Troedsson, y Madill, 2007)

28.2 Degeneración testicular reversible

Es el proceso patológico en que la causa de degeneración testicular incide por un periodo corto (como un proceso febril) y desaparece, permitiendo que el cuadro espermático vuelva a su normalidad en un periodo de 7 a 12 semanas (Galina, y Valencia , 2012).

28.3 Criptorquidia

El descenso de los testículos consiste en la migración abdominal de estos organos hacia el anillo inguinal interno. La criptorquidia puede ocurrir en uno o ambos testiculos que permanecen sin descender de la cavidad abdominal al escroto. Se trata de un factor hereditario; los animales con criptorquidia bilateral son estériles debido a su presión térmica de la espermatogénesis, mientras que en los casos de criptorquidia unilateral ocurre la espermatogénesis de manera normal en el testiculo escrotal. (Hafez & Hafez , 2000).

28.4 Vesiculitis

Clínicamente se define a la seminovesiculitis como una situación en la cual a la exploración rectal se encuentran alteraciones palpables para ambas vesículas acompañadas de alteraciones en el semen. El funcionamiento normal de estas contribuye a una óptima fertilidad (Capandeguy y Mattos , 2014).

28.5 Espermatogénesis imperfecta

Es el padecimiento que se caracteriza por una hipoespermatogénesis de naturaleza congénita que se acompaña en algunas ocasiones de testículos pequeños. Es un padecimiento hereditario y se difiere de la hipoplasia testicular por que en estos casos ocurre una falla congenita en la espermatogenesis

generando defectos en el eyaculado o eyaculados de baja calidad. (Galina y Valencia , 2012).

28.6 Hipoplasia testicular

Es el desarrollo incompleto o defectuoso de los testículos, pudiendo ser unilateral o bilateral. Cuando la anomalía es unilateral, el testículo izquierdo es el más afectado. La hipoplasia testicular puede ser congénita o adquirida. Cuando es congénita se debe a un gen recesivo, si es adquirida se debe a su aparición después de mala alimentación en el período de crecimiento, estado de subnutrición, enfermedades que lleguen a afectar a animales jóvenes (Capandeguy, y Mattos , 2014).

28.7 Subalimentación

El macho maduro puede mantener la producción de espermatozoides y secreción de testosterona aunque los niveles de nutrición sean bajos, pero el macho joven presenta retraso en el desarrollo sexual y pubertad, esto se debe a la supresión de la actividad endocrina de los testículos y en consecuencia, retraso del crecimiento y el funcionamiento secretorio de los órganos reproductivos masculinos. Los toros jóvenes alimentados con dietas faltas de proteína causa en ellos descenso en la libido. La deficiencia de Vit A. o carotenos en la dieta causa degeneración testicular en todas las especies. La deficiencia de yodo causa baja de libido y calidad espermática pobre (Hafez y Hafez , 2000).

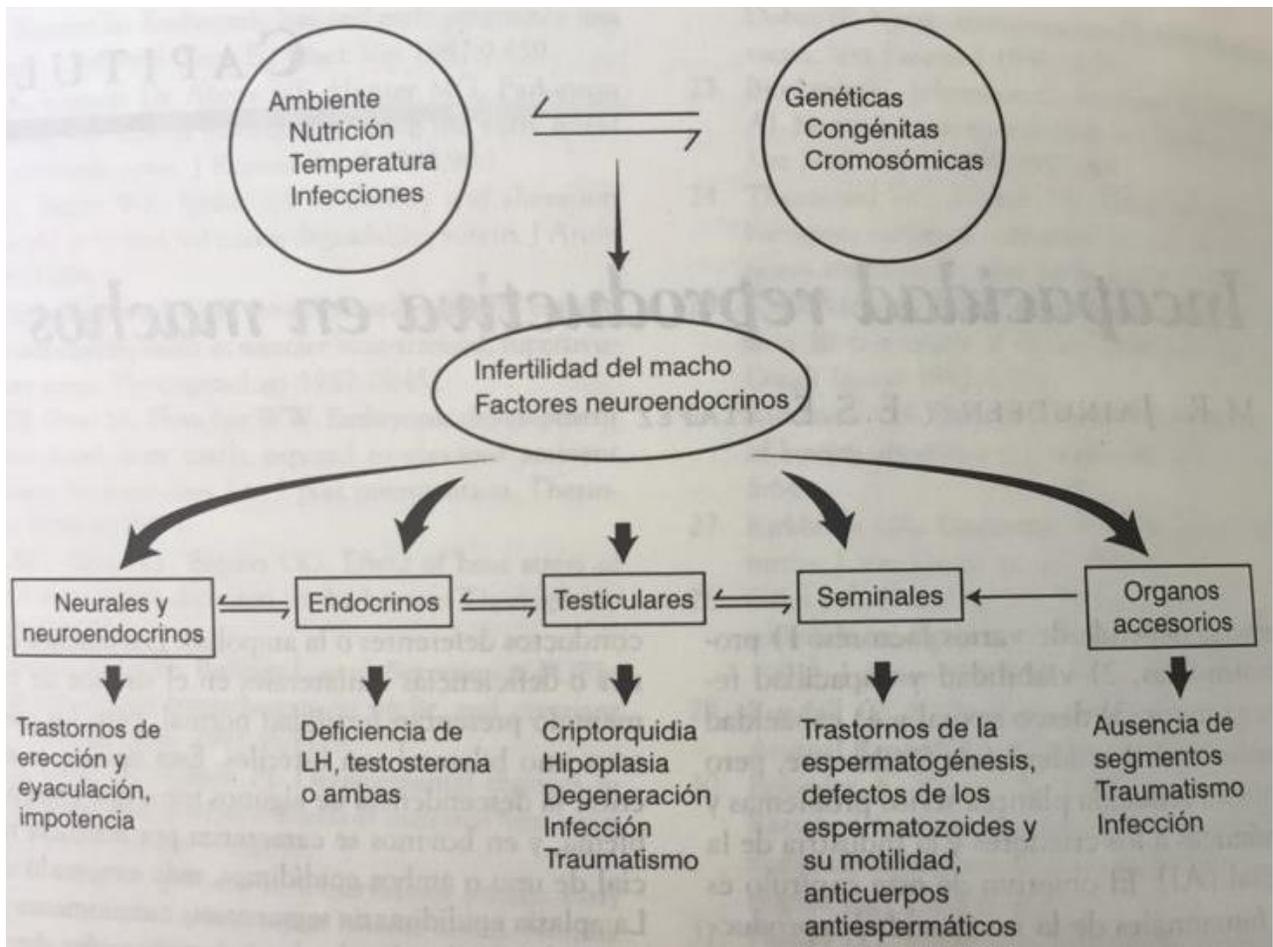


Imagen 16: de las diferentes causas de infertilidad reproductiva en machos

(Obtenido de Hafez y Hafez, 2000).

XXIX. ENFERMEDADES VENÉREAS

29.1 Campylobacter

Su agente causal es el *Campylobacter fetus*, y tiene a su vez dos subespecies conocidas, *C. fetus* subsp. *Venerealis*, con tropismo genital exclusivo y que sólo se transmite por vía venérea y *C. fetus* subsp. *Fetus*. El macho se comporta como portador durante toda su vida. En los toros no existe manifestación clínica y son los transmisores de la enfermedad a las hembras en época de servicio. En las hembras produce muerte embrionaria temprana o abortos esporádicos repetición de celos, piómetras e infertilidad. (Campero, 2002)

Anteriormente se creía que estas dos subespecies producían dos enfermedades diferentes: la subsp fetus el aborto esporádico y la subsp. Venerealis la infertilidad enzootica. Actualmente se sabe que estas dos subespecies, son muy similares y genéticamente indistinguibles, son ambas capaces de producir en forma indistinta cualquiera de estas dos presentaciones clínicas de una misma enfermedad.

En el macho *Campylobacter fetus* se localiza en las criptas prepuciales y el glande del pene mientras que en la hembra coloniza principalmente en el área cervico-vaginal. El toro es un portador asintomático que transmite y difunde la enfermedad durante la monta natural o bien indirectamente mediante inseminación artificial (Terzolo y Catena, 2015)

29.2 Brucelosis

La brucelosis bovina es una enfermedad infectocontagiosa conocida como aborto infeccioso. Afecta a bovinos de todas las edades, principalmente y con mayor frecuencia en animales adultos, en las ganaderías de cría y leche. Es producida por la bacteria *Brucella abortus*, microorganismo que puede ser eliminado en la leche, heces, descargas vaginales, orina, fetos abortados, placentas y terneros aparentemente sanos de vacas infectadas (Solano, 2014).

En los animales, *B. abortus* se suele transmitir por contacto con la placenta, el feto, los líquidos fetales y las descargas vaginales de los animales infectados. Los animales se encuentran en estado infeccioso después de un aborto o parto a término. También se puede encontrar *B. abortus* en la leche, la orina, el semen, las heces y el líquido de los higromas. La liberación del organismo en la leche puede ser intermitente, prolongada o permanente (Ospina, 2016).

29.3 Leptospirosis

La leptospirosis es una enfermedad infecciosa causada por una espiroqueta patógena, género *Leptospira*, especie *L. interrogans* de la cual se ha identificado alrededor de 200 variantes serológicas, denominadas serotipos o serovares. En México los serotipos más comunes en bovinos son: *L. Pomona*, *L. tarassovi* y *L. Hardjo*. La leptospirosis tiene como reservorio a los animales de vida libre (ratas, comadreja, reptiles etc.). Éstos actúan como portadores y eliminadores constantes por intermedio de la orina, contaminando el medio. La enfermedad se transmite vía transplacentaria, digestiva, mamaria, cutánea, por contacto con el suelo o los alimentos contaminados, siendo el periodo de incubación variable entre 5 y 14 días como máximo de 21 días. Las principales manifestaciones son trastornos reproductivos como infertilidad, aborto, nacimiento de crías débiles y disminución temporal de la producción láctea. Ingresa por piel o mucosas, se distribuye por todo el organismo incluyendo el SNC (Solano 2014).

29.4 Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR)

La infección por el HVB-1, se ha asociado con diferentes presentaciones clínicas; la principal es un síndrome respiratorio conocido como RIB, el cual se asocia a “tormentas de abortos”, nombre que se le da a la inducción de abortos en masa cuando se presenta la infección por primera vez en animales gestantes. Existen también formas genitales conocidas como VPI y BPI asociadas a infertilidad temporal en vacas. Además, este agente puede producir conjuntivitis, metritis, mastitis y formas diseminadas en terneros. La vía natural de infección es a través del contacto directo con las mucosas. El virus entra al tracto respiratorio por medio de aerosoles o por contacto directo por secreciones nasales; la transmisión genital ocurre por contacto directo de las secreciones infectadas o a través de semen contaminado. En los toros el virus contamina el semen y la balanopostitis presenta

lesiones similares a la vulvovaginitis en las hembras, pero en casos graves se pueden encontrar diversas adherencias y fimosis (Arboleda, y Col., 1996).

29.5 Neosporosis

La Neosporosis bovina es una de las enfermedades que ocasionan abortos en bovinos mediante la transmisión del parásito *N. caninum* presente en los caninos como huésped definitivo, haciendo que se desarrolle la infección y provoque alteraciones reproductivas tales como infertilidad, vacas repetidoras, muerte embrionaria, pérdidas tempranas de la gestación, momificaciones, abortos por necrosis de tejidos fetales y nacimiento de terneros con ataxia y parálisis. La transmisión por monta natural o inseminación artificial en semen de toros seropositivos no tienen relevancia desde el punto de vista epidemiológico aunque se ha detectado ADN del agente en semen congelado o en fresco. Según algunos autores, hay evidencia inicial limitada que sugiere que el semen de toros infectados puede ser un vector potencial de transmisión venérea de la *N. caninum* (Rubiano y Murcia 2015)

29.6 Diarrea viral bovina (BVD)

Enfermedad infecciosa, que cursa con diferentes manifestaciones clínicas. Es responsable de severos cuadros entéricos y tiene dos presentaciones: 1.- enfermedad de las mucosas 2.- diarrea viral. El virus provoca lesiones agudas, inflamatorias y necróticas en las mucosas del aparato digestivo, causando trastornos entéricos y reproductivos. Los bovinos persistentemente infectados se originan a consecuencia del contacto viral con el feto durante el primer tercio de la gestación, vía placentaria (Solano, 2014).

La DVB afecta al Ganado bovino y fue descrita por primera vez como una gastroenteritis acompañada de diarrea leve, úlceras en mucosa oral y nasal y abortos en hembras gestantes. Los animales persistentemente infectados, juegan un rol importante como la fuente principal de diseminación del VDVB. Los

animales persistentemente infectados eliminan grandes cantidades de virus durante toda su vida a través de secreciones y excreciones tales como descarga nasal, saliva, semen, orina, heces, lágrimas y leche (González, 2015).

29.7 Tricomoniasis

(*Trichomonas foetus*) Enfermedad venérea de carácter agudo o sub-agudo que afecta a los bovinos, principalmente los órganos genitales de las vacas y toros, puede ser transmitido por la cópula o por IA de semen contaminado. El parásito se encuentra en la vagina y en el útero, abundan en las secreciones de las piómetras y en las secreciones que acompañan al aborto (Solano, 2014)

T. foetus se transmite, bajo condiciones naturales, exclusivamente por vía sexual. La transmisión mecánica o por vía pasiva, por la cual un toro libre de la infección sirve en un corto tiempo a una hembra infectada en primera instancia y luego a una segunda hembra, infectándolo pasivamente a ésta última, es poco probable en condiciones naturales. Sin embargo, trabajos realizados en el INTA Balcarce Argentina al evaluar toros sanos mediante la prueba de capacidad de servicio efectuada sobre hembras bovinas conocidas de estar infectadas con *T. foetus*, se pudo comprobar con qué facilidad algunos toros lograban infectarse al estar en contacto con la hembra durante no más de 20 min. De servicio. En condiciones artificiales, *T. foetus* puede difundirse por inseminación artificial ya que el protozoo permanece viable en el semen congelado infectado. (Gaytán, 2011).

CONCLUSIÓN

Al termino de este trabajo podemos concluir que si bien es cierto el Médico Veterinario Zootecnista es un profesional que está involucrado en diversas áreas de la salud, reproducción y manejo de los animales domésticos, en muchas ocasiones deja en manos de personal no capacitado muchas de las actividades que son de su competencia y que merman su eficiencia pues están íntimamente ligadas todas las áreas inmersas en los sistemas de producción, este es al caso de la Inseminación Artificial, pues al ser considerarse como una “técnica” se deja en manos de personal que solamente realiza la actividad en muchos casos sin el conocimiento de todo el proceso (recolección, criopreservación, descongelamiento etc.), no digamos de otras áreas tales como la salud, la alimentación etc.

Por esta razón consideramos que este documento puede aportar en gran medida el conocimiento para valorar el trabajo de aquellos que se dedican a la reproducción en especial a aquellos que realizan la Inseminación Artificial y que el conocimiento detrás las actividades cotidianas es una parte fundamental para el éxito de estas.

BIBLIOGRAFÍA

- Rodríguez, P., Franco, E., & Jiménez, C. (2008). Estandarización de la prueba para espectrofotometría en la medición de concentración espermática de semen bovino, equino, porcino, ovino, canino. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 22- 28 Pp.
- ABS. (2007). *El sexado de semen bovino*. Obtenido de www.absmexico.com.mx:
<http://absmexico.com.mx/docs/comoafec.pdf>
- ABS; Dalton, J. (s.f). *Semen sexado: ¿Cómo afecta la fertilidad un aumento en el numero de espermatozoides?*
- Acuña, C., de Dominicis , O., Narbaitz, M., de Apellániz , A., Cabodevila, J., Callejas, S., & Cisale , H. (2001). *Evaluación de toros en rodeos de crías: ¿es necesario el examen de semen?* Obtenido de Sitio Argentino de Producción Animal : www.producción-animal.com.ar
- Alba, L., & Silveira, E. (2005). Perdurabilidad de la efectividad de la combinación penicilinaestreptomicina en la reducción de la carga bacteriana del semen de toro congelado en pajillas. *Revista Electronica de Veterinaria*, 6(10), 1-7 Pp.
- Angelino , J. (2009). Manual de evaluación de semen en bovinos . tesis para obtener el grado de medico veterinario zootecnista , Veracruz, Veracruz, Mexico : Universidad Veracruzana Facultad de medicina veterinaria y zootecnia .

- Arboleda, J., Rodas, J., Ossa , J., & Zuluaga , F. (1996). Espectro clínico y Epidemiológico de la rinotraqueítis infecciosa bovina. *Revista colombiana de ciencias pecuarias*, 1 , 3- 13 Pp.
- Arieta, R., Fernandez, J., & Menchaca, J. (2014). Métodos de extracción de semen bovino. *revista electronica veterinaria*, 1-8 Pp.
- Arrollo , A. (consulta: 25 de octubre de 2008). *Sexado de semen una nueva herramienta para la producción de carne*. Obtenido de Sitio Argentino de Producción Animal: www.producción-animal.com.ar
- Batista , J. (2011). relación y correlación existente entre las circunferencia escrotal, pero corporal y edad, en toros Brahman de 18 a 60 meses de edad en la provincia de Chiriquí. *Revista electronica de veterinaria*, 12(1), 1 - 9 Pp.
- Brito , D., & Reinoso, N. (2017). Evaluación cuali-cuantitativa de semen colectado con electroeyaculador (EE) de toros tratados con y sin tranquilizante. tesis de licenciatura, Cuenca Ecuador: Universidad de Cuenca.
- Cabrera, P., & Pantoja, C. (2012). Viabilidad espermatica e integridad del acrosoma en semen congelado de toros nacionales. *Revista de Investigación Veterinaria de Perú*, 192-200Pp.
- Campero , C. (2002). Pérdidas ocasionadas por las efermedades venéreas de los bovinos. *Rev. Idia*, 21(2), 127 - 131 Pp. .
- Capandeguy, J., & Mattos , B. (2014). Principales hallazgos en la evaluacion andrologica en toros de campo . Tesis para obtener el titulo de Doctor en

ciencias veterinarias, Montevideo, Uruguay, Universidad de la república
facultad de veterinaria .

Carballo , D., Canseco, R., García , R., & Montiel, f. (2009). Comparación de dos diluyentes para comerciales para criopreservar semen bovino bajo condiciones de campo en el tropico humedo . En INIFAP, *Avancez de la investigación agricola, pecuaría, forestal y acuicola en el trópico Mexicano* (págs. 355 - 360 Pp.). Veracruz, Veracruz: litografia alfa y omega.

Cárdenas, R. (2008). desarrollo de un centro de procesamiento y criopreservación de semen caprino en la estación experimental "Alfredo Volio Mata".
Universidad de Costa Rica Facultad de ciencias agroalimentarias escuela de zootecnia , tesis para obtener el grado de Ingenieria agronomica con énfasis en zootecnia.

Catena, M., & Cabodevila, j. (1999). *Evaluacion de semen bovino congelado*.
Obtenido de sitio argentino de produccion animal : www.produccion-animal.com.ar

Cruz Solis , D. (2014). Estudio comparativo de tres diluyentes (tris, citrato de sodio y triladyl) en el procesamiento de semen bovino (tesis de licenciatura).
Universidad Autonoma Agraria Antonio Narro . Saltillo, Coahuila, Mexico.

Cunningham, J. (2003). *Fisiología veterinaria* (3 ed.). Madrid, España : Gráficas muriel, S.A.

Curbelo , M., & Rodriguez, Z. (2012). Relevamiento de laboratorios de procesamiento de semen bovino en Uruguay. tesis para obtener grado de

doctor de ciencias veterinarias, Universidad De La República Facultad de veterinaria .

Díaz , P., Fonseca, V., Martínez, P., & Rey , A. (2003). Inseminación artificial en bovinos. *biblioteca virtual universal* .

Escamilla, A. (noviembre de 2005). Aplicación de clorhidrato de xilacina (.05 mg/kg) en toros como facilitador de la colecta de semen con el metodo de electroeyaculador (tesis de licenciatura). . universidad de San Carlos de Guatemala, guatemala.

Galina , C., & Valencia , J. (2012). Reproducción de los animales domesticos . México : Limusa.

García, A., Castejón, F., De La Cruz, L., Gonzalez, J., Murillo, M., & Salido , G. (1995). *Fisiología veterinaria*. Madrid, España: McGRAW-HILL.

Gaytan , P. (2011). Situación actual de la trichomoniasis bovina . Monografía para obtener el grado de médico veterinario zootecnista, Torreón, Coahuila México , Universidad autónoma agraria Antonio Narro.

Giraldo, j. (2007). Una mirada al uso de inseminación artificial en bovinos. *Revista Lasallista de Investigación* , 51-57Pp.

González, L. (2015). Prevalencia en diarrea viral bovina en ganaderías del cantón gonzamá. tesis paara obtener el grado de médico veterinario zootecnista , Loja, Ecuador , Universida nacional de Loja .

- Hafez , E., & Hafez , B. (2000). Reproducción e inseminación artificial en animales. McGraw-Hill.
- Hernández, j., & Ortega, A. (2009). Manual de inseminación artificial en bovinos . Universidad Nacional Autónoma de México .
- Hoyos, A. (2009). Comparacion de la eficiencia de los tratamientos de inseminacion a tiempo fijo (IATF) con dispositivos intravaginales nuevos frente a los reutilizados en los índices de preñez en vacas de cruce cebú paridas y secas. Bogotá , Colombia: tesis para obtener el grado de Medico Veterinario Zootecnista.
- Huanca, W. (2001). inseminación artificial a tiempo fijo en vacas lecheras. *Revista de Investigacion veterinaria de Perú*, 161-163Pp.
- Ibañez , F., Lisarrague, C., Callejas , S., & Cabodevila , J. (2016). Inseminación artificial o a tiempo fijo ¿Conviene utilizar semen "fresco" en lugar de congelado? UNCPBA facultad de ciencias veterinarias, Tesis para obtener el grado de veterinario, Tandil Argentina.
- König, H., & Liebich, H.-G. (2005). *Anatomía de los animales domésticos* (2 ed.). Buenos Aires, Bogotá, Caracas, Madrid, México, Porto Alegre, Órganos genitales masculinos: Editorial médica panamericana.
- Machado Pérez, r., & Silveira Prado, E. (2005). Flora bacteriana del semen de toro antes y después de la congelación. *Revista electronica de veterinaria*, 3-9 pp.

- Medina, v., Sanches, E., Velasco, Y., & Cruz, P. (2007). criopreservacion del semen bovino usando un congelador programable (CL-8800) y determinacion de su calidad postdescongelación por medio de un sistema de analisis espermático asistido por computador (CASA). *Orinoquia*, 11(1), 75 - 86 Pp.
- Montero , j. (2013). Manual de inseminación artificial en bovinos. tesis para obtener grado de Medico Veterinario Zootecnista , Veracruz, Veracruz México : Universidad Veracruzana facultad de medicina veterinaria y zootecnia .
- Morillo , M., Salazar , S., & Castillo , E. (2012). Evaluación del potencial reproductivo del macho bovino. 5 - 63 Pp.
- Muiño, R., Fernández, M., Viana , J., López, M., Fernández , A., & Peña, A. (2005). Nuevas tecnologías aplicadas al procesado y evaluacion del semen bovino en centros de inseminación artificial. *ITEA*, 101(3), 175-191 Pp.
- Olivera, M., Ruíz, T., Tarazona , A., & Giraldo , C. (2006). El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Revista colombiana de ciencias Pecuarias*, 19(4), 426-435 Pp.
- Oses, M., Teruel, M., & Cabodevila, J. (2009). Utilización de semen bovino sexado en inseminacion artificial, transferencia embrionaria y fertilización in vitro. *revista veterinaria*, 138-145 Pp.
- Ospina , J. (2012). Aborto: causa, diagnostico y consecuencias . Ibaguè, Colombia , tesis para obtener el grado de médico veterinario : Universidad cooperativa de colombia carrera de medicina veterinaria y zootecnia.

- Parez, M. (1985). Las mas importantes enfermedades genitales de los bovinos (profilaxis, tratamiento, higiene de la recogida del esperma). *Revue scientifique et technique (international office of epizootics)*, 4(1), 89 - 109 Pp.
- Perez, M. (2005). Manual practico de "Procesamiento de semen". *Universidad Autonoma de chihuahua Facultad de Zootecnia*.
- Ramónez, J. (2013). Evaluación de dos agentes crioprotectores no permeables y un diluyente comercial (TRYLADYL) en la congelación de semen bovino . tesis para obtención de titulo de Magister en reproducción animal , Universidad de cuenca Facultad de ciencias agropecuarias centro de postgrado , Cuenca Ecuador .
- Rivera, H. (2009). Tiempo para hacer la inseminacion artificial en vacas lecheras. *Dairy Reproduction Conference* (págs. 1 - 6 Pp.). Mineapolis: Accelerated Genetics .
- Robson, C., Aguilar, D., Lopez, S., Calvi, M., Celser, R., Flores, f., & Gómez, M. (2004). *Inseminación artificial en bovinos*. Obtenido de Sitio Argentino de producción animal: http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/inseminacion_artificial/188-Inseminacion_2004.pdf
- Rubiano , O., & Murcia, J. (2015). Neosporosis bovina como causa de falla reproductiva en hatos del cordon lechero de Ubate y Chinquinira. Bogotá , Universidad lasalle.

- Ruíz, B., Ruíz , H., Mendoza, P., Olivia, M., Gutiérrez, F., Rojas, R., . . . Villalobos, A. (2010). Caracterización reproductiva de toros bos taurus y bos indicus y sus cruzas en un sistema de monta natural y sin reposo sexual en el trópico mexicano. *Revista científica UDO agrícola*, 94-102Pp.
- Ruiz, H., León , H., Ruiz , A., & Villalobos , A. (2006). Manual de inseminacion Artificial en Bovinos .
- SAGARPA. (Consulta:12 de de noviembre de 2018). *Inseminación artificial en ganado bovino*. Obtenido de www.fps.org.mx/.../32-pecuaria?...137:inseminacion-artificial...ganado-bovino
- salamanca, a., & Crosby , R. (2013). Estudios andrológicos básicos como apoyo para el examen de toros criollos. *revista electronica veterinaria*, 2-7 pp.
- Shively, M. (1993). *Anatomía veterinaria Básica, comparativa y clínica*. México, D.F.: El manual moderno, S.A de C.V.
- Silveira, e., González, O., & Espinosa, L. (2005). Conservación del semen bovino con 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)furano. *Revista Electronica Veterinaria*, 1- 9 Pp.
- Sisson, S., & Grossman, j. (1982). *Anatomía de los animales domésticos* (5 ed., Vol. 1). Salvat editores, S.A.
- Solano , R. (2015). Comparación de cuatro protocolos para el tratamiento de retención placentaria y el efecto de esta condición sobre la producción de leche en vacas Holstein . tesis para obtener el grado de maestro en

ciencias en producción agropecuaria , Torreón Coahuila México ,
Universidad Autonoma Agraria Antonio Narro .

Sumba, J. (2012). Inseminación artificial con celo natural en vacas productoras de leche con semen sin el proceso de descongelado en el cantón paute. 5- 79 Pp. . tesis para obtener titulo de Médico Veterinario Zootecnista , Cuenca Ecuador : Universidad Politécnica Salesiana Sede Cuenca.

Tamayo , M. (2013). La selección de sementales bovinos en cuba. 3. Calidad de la producción seminal en futuros sementales Holstein, relacion con el desarrollo testicular. *Revista electronica de veterinaria*, 4(1), 1-22Pp.

Terzolo, H., & Catena, M. (2007). *Microbiología veterinaria* (2 ed.). Inter-médica.

Troedsson , M., & Madill, S. (2007). Fisiopatología veterinaria. En R. Dunlop , & C. Malbert. Zaragoza, España : Acribia S.A.

Trujillo, L. E., & Rivera, M. (2002). Estudio comparativo de dos tratamientos con antibióticos sobre la calidad bacteriológica y espermática de semen bovino. *Facultad Nacional de Agronomia*, 55(1), 1457-1472 pp.