

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



Evaluación de un diluyente sobre la motilidad y sobrevivencia espermática en semen congelado bovino.

Por:

ABIMAEEL RAMÍREZ LÓPEZ

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN, COAHUILA.

Noviembre 2019.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL

Evaluación de un diluyente sobre la motilidad y sobrevivencia espermática en semen congelado bovino.

Por:

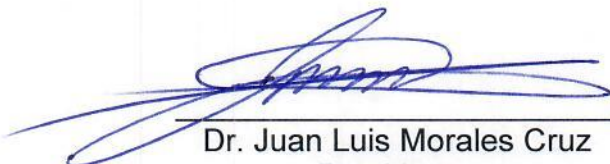
ABIMAELO RAMIREZ LOPEZ

TESIS

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


MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA


Aprobada por:


Dr. Juan Luis Morales Cruz
Presidente


Dr. Carlos Leyva Orasma
Vocal


Dr. Oscar Angel García
Vocal


M.C. Javier Hernández Ignacio
Vocal Suplente


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



Torreón, Coahuila, México
Noviembre 2019

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL

Evaluación de un diluyente sobre la motilidad y sobrevivencia espermática en semen congelado bovino.

Por:

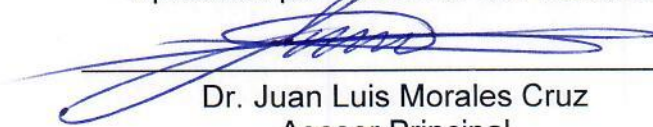
ABIMAE L RAMIREZ LOPEZ

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Aprobada por el Comité de Asesoría:



Dr. Juan Luis Morales Cruz
Asesor Principal



Dr. Carlos Leyva Orasma
Coasesor



Dr. Oscar Ángel García
Coasesor


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



Torreón, Coahuila, México
Noviembre 2019

AGRADECIMIENTOS

A mi Alma Terra Mater por abrirme sus puertas y cobijarme durante cinco años, por formar en mí una persona capaz y brindarme la preparación oportuna para luchar por un mejor futuro.

Al M.C Javier Hernández Ignacio y al Doctor. Juan Luis Morales Cruz por el tiempo que dedican a esta hermosa profesión, por todo el apoyo que me brindaron para llevar a cabo esta investigación y por todos los conocimientos que me transmitieron, por aportar un granito de arena en esta labor social tan noble que realiza en el campo, por sus esfuerzos, por su dedicación, por su compromiso, pero sobre todo por su paciencia es y será un soporte fundamental para mi desarrollo como persona y ahora como profesionalista.

A todos los Médicos, Maestros y Doctores que a lo largo de esta trayectoria fueron parte de mi formación, por ese gran esfuerzo por orientarnos a todos por el buen camino, por enseñarnos cada rama de la medicina veterinaria sin importar cual pequeño fuera, porque bien sabían que hoy nosotros seríamos el fruto de su esfuerzo y dedicación. Gracias a ustedes ahora nosotros somos personas preparadas y con deseos de seguir siempre hacia adelante, llenos de valentía y optimismo, con educación, mucho conocimiento adquirido.

A mis amigos: Luis Ángel pliego, Luis Francisco Núñez, Guadalupe, Melisa Silva, Ingrid González ya que en medio de todas las dificultades que se me presentaron he contado con el gran apoyo de todos ustedes. Muchísimas gracias de corazón ya que me han demostrado en todo momento cuánto valoran nuestra amistad.

DEDICATORIA

A Dios, por darme esta oportunidad de cumplir con una de mis grandes metas, darme toda la fuerza y por ser mi motor día a día, el valor y la perseverancia para salir saber salir adelante ante cualquier circunstancia.

A mi Sra. Madre Francisca López Mendoza y mi padre Sr. Tolentino Ramírez Chávez, por todo el apoyo incondicional que me brindaron más en los momentos difíciles, por todos los valores que me han inculcado, por cuidarme y dar todo por mí. Mis logros, mis triunfos mi camino al éxito se lo debo a ustedes y no hay otra manera más perfecta de agradecerles más que dando lo mejor de mí en la universidad y regresar con ustedes con un título profesional que seguro estoy que estarán muy orgullosos.

A mis hermanas Elida y Dania Kelly y mis hermanos Leo, Gustavo, Jersain, Bernardo Fer y Ángel, Agradezco la confianza que me han brindado, por acompañarme en mis logros y tropiezos sin pedir nada cambio y el esfuerzo que han realizado durante toda mi vida para que por fin llegara este momento gracias a Dios y a ustedes, ahora soy lo que soy y sé que puedo continuar por la vida.

A mis tíos y mis primos, que siempre han estado al pendiente de mí a pesar de la distancia, gracias por todo el apoyo he logrado cumplir con mi meta que desde pequeño tenía en mente.

A mi abuela Serafina Chávez y mi abuelo Jesús Ramírez por todos los consejos y regaños que por experiencia que de alguna manera tuvieron y deseando que yo no los tuviera me ha impulsado a luchar y tener un gran futuro.

RESUMEN

El presente trabajo se realizó con el fin de analizar semen criopreservado bovino. Para llevar a cabo este trabajo se utilizó un toro adulto de la raza Holstein, al cual se le recolectó semen mediante vaginal artificial. Como experimento (S2) se usó un medio de enjuague de embriones, Triladyl y yema de huevo para diluir y criopreservar el semen, para su evaluación se comparó con un diluyente comercial agua bidestilada, Triladyl® y yema de huevo (S1). Para llevar a cabo el análisis se utilizaron 3 muestras de semen obtenidos en distintos días, diluidos con las soluciones mencionadas las cuales fueron empacadas y criopreservadas en nitrógeno líquido a -196°C . Se procede a descongelar las pajuelas rotuladas con cada tratamiento, siendo 18 pajuelas por tratamiento, dando un total de 36 pajuelas. Después de haber sido descongeladas se realizó el análisis microscópico de motilidad individual y de espermatozoides vivos y muertos siendo estas las variables analizadas. Los resultados obtenidos se analizaron con una *t* de student. Según la *t* de student para los espermatozoides vivos y muertos T1 tuvo un valor mayor de espermatozoide vivos y menos muertos en comparación de T2 donde se observó diferencia significativa con mayor número de muertos y menos vivos. En tanto para motilidad no se observó diferencia significativa.

Palabras clave: Criopreservacion, Semen, Diluyente, Motilidad, Viabilidad.

Índice de contenido

AGRADECIMIENTOS	I
DEDICATORIA	II
RESUMEN	III
INDICE DE CUADROS Y FIGURAS	VIII
1.- INTRODUCCION	1
OBJETIVO GENERAL	4
OBJETIVO ESPECÍFICO	4
HIPÓTESIS	4
2.- REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1 Historia de la congelación de semen.....	5
2.2 Principios de la criopreservacion.	6
2.2.1 PH.	6
2.2.2 Temperatura	7
2.2.3 Fuentes de energía (nutrientes).....	7
2.2.4 Presión osmótica.....	8
2.2.5 Condiciones de oxígeno y CO2	9
2.3 Procesamiento y conservación de semen.....	9
2.3.1 Generalidades de diluyentes usados en semen bovino.	9
2.4 Principales medios de congelación	11
2.4.1 Triladyl®.....	11
2.4.2 ANDROMED.....	12
2.5 Componentes de los medios comerciales para congelar.	12
2.5.1 Agua bidestilada.	12
2.5.2 Azucares.....	12

2.5.3 Sustancias buffer o amortiguadores	13
2.5.4 Yema de huevo	13
2.5.5 Leche descremada.....	13
2.5.6 Glicerol.....	14
2.6 Condiciones necesarias en el procesamiento de semen.....	14
2.6.1 Dilución	14
2.6.2 Enfriamiento.....	16
2.6.3 Periodo de equilibrio.....	16
2.6.4 Envasado.....	16
2.6.5 Estabilización.....	17
2.6.6 Congelación.....	17
2.7 Evaluación del semen post - congelación.....	17
2.7.1 Evaluación de la Calidad del Semen	18
2.8 Características generales del semen	20
2.8.1 Definición de Semen	20
2.8.2 Plasma seminal.....	20
2.8.3 Definición de espermatozoide.....	21
2.8.4 Vagina artificial	21
2.8.4 Recolección del Semen.....	21
2.9 Evaluación macroscópica y microscópica.....	22
2.9.1 Volumen del Eyaculado.....	22
2.9.2 Color y Olor.....	22
2.9.3 Motilidad Espermática.....	23
2.9.4 Motilidad Masal.....	23
2.9.5 Motilidad individual	24

2.9.6 Concentración.....	24
2.9.7 Morfología.....	25
3.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
3.1 Lugar de Investigación.....	27
3.2 Materiales.....	27
3.2.1 Materiales de oficina.....	27
3.2.2 Materiales de campo.....	28
3.2.3 Equipos e instrumentos de laboratorio.....	28
3.2.4 Reactivos.....	29
3.3 Caracterización de la unidad de análisis.....	30
3.4 Método.....	30
3.4.1 Selección del toro donante.....	30
3.4.2 Preparación del toro donante.....	30
3.4.3 Excitación pre-coital.....	31
3.4.4 Colección del semen.....	31
3.5 Análisis microscópico del semen.....	32
3.5.1 Motilidad masal.....	32
3.5.2 Concentración del semen.....	32
3.5.3 Dilución del semen.....	33
3.5.4 Preparación de pajuelas.....	34
3.5.5 Envasado del semen.....	34
3.5.6 Periodo de equilibrio.....	34
3.6 Criopreservación del semen.....	35
3.7 Descongelamiento.....	35
3.8 Evaluación del semen descongelado.....	35

3.8.1 Motilidad individual	35
3.8.2 Viabilidad espermática post-descongelado.	36
3.9 Análisis estadístico.....	36
3.9.1 Variables analizados	37
4.- RESULTADOS	38
5.- DISCUSIÓN.....	39
6.- CONCLUSIONES.....	41
7. RECOMENDACIONES.	41
8. –BIBLIOGRAFÍAS	42

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Número de figura	Descripción	Número de página
1	Excitación pre-coital	31
2	Volumen del eyaculado	32
3	Monitoreo de temperatura	34
4	Análisis de semen post-congelado	36

1.- INTRODUCCION

La criopreservación de semen es una importante biotecnología reproductiva, pero cuando esta se asocia con la inseminación artificial, representa un mecanismo eficiente para la promoción y difusión de material genético de excelente calidad, al mismo tiempo proporciona una economía para el productor al reducir los costos de alimentación y transporte de los reproductores, así como los riesgos de transmisión de enfermedades sexualmente transmisibles (Castelo *et al.*, 2008). En la actualidad existen biotecnologías dedicadas a la reproducción, entre ellos la inseminación artificial (IA) la biotecnología reproductiva más empleada en la industria animal. En la ganadería bovina, su implementación se consolidó a partir del establecimiento del método de fijación cervical, de la aplicación de pequeñas dosis de semen diluido en el cuerpo del útero mediante instrumentación específica, y de la utilización de semen congelado-descongelado (Foote, 2002).

Sin embargo, de acuerdo con González (2004). El proceso de criopreservación propicia una disminución de la fertilidad cuando se compara con semen fresco. Existen factores que influyen en esta técnica relacionado con, la capacidad reproductiva del macho, manejo del semen, calidad del semen y especialmente los métodos de criopreservación (Lozano, 2009). Ya que dentro de este proceso los espermatozoides sometidos a criopreservación están sujetos a una serie de alteraciones morfológicas (Stornelli *et.al.*, 2005). También al shock térmico, composición de los diluyentes, estrés osmótico, concentración espermática en el diluyente, envasado y metodología principalmente la velocidad de congelación y descongelación. El éxito de la criopreservación va depender del mantenimiento del potencial de los espermatozoides, es decir la integridad y funcionalidad de

las estructuras celulares. (Hummersted *et.al.*, 1990). Existen básicamente dos métodos de congelación de semen, el convencional y el automatizado (Vasconcelos-Filho 2010).

Con base en lo anterior, los trabajos para conservar semen consideran que, los espermatozoides son muy susceptibles a bajas temperaturas, las cuales provocan cambios en la estructura y función celular relacionada con el choque térmico, incluyendo cambios en el acrosoma, mitocondrias y membrana celular; funciones importantes para las sobrevivencia y funcionalidad, después de la descongelación (Ollero *et al.*, 1998). Con el tiempo (Moradi *et al.*, 2013). Se han desarrollado gran variedad de diluyentes para semen algunos emplean yema de huevo, leche y lecitina de soya (*Glycine max*), con la finalidad de evitar los daños causados durante el proceso de congelación (agua bidestilada, glicerol, amortiguador de PH TRIS, polivinilpirrolidona).

Durante el proceso de congelación y descongelación del semen bovino propicia una baja de hasta el 30% o más sobre los espermatozoides vivos lo que conlleva a reducir el porcentaje de espermatozoides móviles en un 50% aproximadamente (Chaveiro *et. al.*, 2006). Buscando reducir estos efectos favoreciendo la viabilidad de los espermatozoides, el propósito de este trabajo es comparar un diluyente a base de agua bidestilada contra un medio empleado para el mantenimiento de embriones. Sabiendo que dicha solución contiene fuentes de energía, estabilizadores de membrana y amortiguador HEPES.

Para ello es importante realizar pruebas de laboratorio para evaluar la calidad (motilidad y sobrevivencia) del semen descongelado previamente al desarrollo de la IA y así verificar que el semen utilizado mantenga su capacidad fecundante luego de haber sido criopreservado en dicho medio. Los medios de colección para embriones se han utilizado

poco como medios para diluir semen fresco y para congelación, hasta la fecha no se cuenta con información disponible, sin embargo, estos medios tienen sustancias que podrían mejorar la calidad del semen al descongelado.

OBJETIVO GENERAL.

Evaluar el medio vigro para embriones como componente de un diluyente para congelar semen de bovino.

OBJETIVO ESPECÍFICO.

Valorar el efecto sobre la motilidad y sobrevivencia espermática del medio vigro como diluyente en el medio de congelación de semen en bovinos.

HIPÓTESIS.

El medio Vigro como diluyente mejorará la motilidad y sobrevivencia espermática del semen de bovino congelado.

2.- REVISIÓN DE LITERATURA

Para la congelación de semen bovino incluye una serie de pasos tales como: colección, evaluación del semen, cálculo del número de pajillas posibles, dilución del semen al volumen requerido y finalmente el proceso de criopreservación. Teniendo en cuenta que el proceso de colecta debe ser lo más higiénico posible.

2.1 Historia de la congelación de semen.

Antoni Van Leeuwenhoek, (1677). Un fabricante de lentes holandés descubrió espermatozoides vivos en el líquido seminal de humano y de varios animales.

Lauro Spallanzani, (1776). Observó que cuando los espermatozoides congelados en nieve durante 30 minutos se inactivan, pero estos se podían reactivar con calor.

Mantegazza (1866). Observó que el espermatozoide sobrevivió a una temperatura de congelación de -17°C .

Philips y lardy, (1940). Descubrieron un medio nutritivo para la dilución de semen. En este mismo año Chang Walton afirmaban que la congelación de los espermatozoides alarga su vida, ya que reduce su actividad metabólica.

Salisbury, (1942). Diseñó un diluyente el cual lo preparo a base de yema de huevo y citrato de sodio.

Polge et.al., (1949). Afirmaron la capacidad crioprotectora del glicerol ya que tuvieron éxito en la congelación de material seminal.

Stewar, 1951. Guio métodos de crio preservación que pudieran ser aplicados para los propósitos en la inseminación artificial.

2.2 Principios de la criopreservacion.

El principio de la criopreservacion del semen bovino es primordialmente para el mantenimiento de las funciones vitales para sobrevivir, incluyendo energía para su motilidad. Para ello se debe propiciar una deshidratación de la célula y mantenga la integridad del espermatozoide en el proceso de congelación y descongelación para propiciar estas condiciones celulares se requiere controlar factores importantes como lo es el PH, Temperatura, Presión osmótica, fuentes de energía, condiciones de oxígeno y CO₂ y antibióticos.

El glicerol se une a la molécula de agua y baja el punto de congelación de las soluciones, por lo que en su presencia se forma menos hielo a cualquier temperatura dada. De esta manera, se reduce la concentración de solutos en el líquido residual. La influencia dañina de la concentración de solutos depende, aparentemente, de la temperatura. Por lo tanto, el glicerol, al reducir la temperatura a la cual se llega a una determinada concentración de solutos, reduce estos efectos dañinos.

El glicerol deshidrata las células y forma complejos con los iones metálicos. Penetra rápidamente el espermatozoo vivo en suspensión, siendo oxidado por éste y se concentra en la parte posterior de la cabeza. Para ser más efectivo, el glicerol requiere una tasa de congelación relativamente baja (Javier López, 2015).

2.2.1 PH.

En condiciones apropiadas el semen bovino recientemente colectado tiene un pH que oscila entre 6.5 a 6.9 con una media pH 6.7. El pH del semen de toro también puede variar dependiendo de las condiciones del tiempo de colecta hasta su determinación en laboratorio (Moussa *et al.*, 2002). El pH del semen está por lo general se relaciona con el método de

colecta, así como de los atenciones y cuidados en el momento de ejecutar la técnica de colección del material seminal (Sesma *et al.*, 2010).

Hoy en día, la mayor parte de los diluyentes utilizados para la congelación del semen bovino incluyen Tris y ácido cítrico como principales sustancias tampón.

2.2.2 Temperatura

Los márgenes de oscilación de temperatura en que se mantiene la vida de los espermatozoides, varían desde niveles muy bajos, temperatura del nitrógeno líquido -196°C como mínimo, hasta un nivel superior de 50°C (Salisbury y Vandemark 1961).

Hafez (1968) indica que temperatura por arriba de los 50°C a los 5 minutos los espermatozoides sufren una pérdida irreversible de su motilidad por ende la mayoría de las células se tiñen de rojo.

2.2.3 Fuentes de energía (nutrientes)

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

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

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

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

Watson (1990) indica que la inclusión de azúcares en los diluyentes para semen puede desempeñar diferentes funciones, se emplean como fuente de energía, ya que las células espermáticas la requieren para su motilidad y conservación y aunque los espermatozoides presentan metabolismo propio, lo que se intenta es proteger sus reservas intracelulares. Además, contribuye a la osmolaridad del diluyente, ejerciendo una fuerza osmótica sobre la membrana celular del espermatozoide, dependiendo de su permeabilidad.

2.2.4 Presión osmótica

El espermatozoide de toro presenta una presión osmótica de 220-345 y es capaz de tolerar un amplio rango de presiones osmóticas. Mas sin embargo de acuerdo a varios estudios que evaluaron la tolerancia a diversas presiones osmóticas, concluyen que no se ven afectados ni la motilidad ni la viabilidad espermática por la presión osmótica en rangos comprendidos entre 250 y 290mOsm.

Según Holy (1983) el valor de la presión osmótica del semen bovino es de 0,609(0,53-0,65) o 0.54-0.73.

2.2.5 Condiciones de oxígeno y CO₂

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

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

Calculando el consumo de aire un milímetro cubico del semen bovino necesita 0,9 ml de aire a 20°C durante 4 horas. A medida que baja la temperatura desaparece también la intensidad de las respiraciones de la actividad fermentativa (Holy, 1983).

2.3 Procesamiento y conservación de semen

2.3.1 Generalidades de diluyentes usados en semen bovino.

Los diluyentes son la parte más importante de la crio preservación seminal, ya que tienen como principal función la protección de la integridad y funcionalidad de la membrana plasmática de los espermatozoides prolongando la sobrevivencia y motilidad de los mismos (Viswanat y Shannon, 2000).

De acuerdo con la publicación de Carballo Guerrero (2005) un diluyente para conservación de semen debe reunir una serie de propiedades básicas como:

- ❖ Proteger a los espermatozoides de las lesiones producidas por el choque térmico mediante una fuente de lipoproteínas o material con alto peso molecular.
- ❖ Ser isotónico al semen, es decir, tener la misma concentración de iones libres para mantener la osmolaridad del medio.
- ❖ Proporcionar nutrientes para el metabolismo de los espermatozoides como pueden ser azúcares.
- ❖ Contar con capacidad amortiguadora para evitar cambios de pH al neutralizar los ácidos producidos por el metabolismo de los espermatozoides Tris o citrato de sodio.
- ❖ Controlar el crecimiento bacteriano, antibióticos.
- ❖ Capaz de preservar la vida de los espermatozoides sin modificar la fertilidad
- ❖ No deteriorarse durante el almacenamiento previo a su uso

Los diluyentes utilizados para el congelamiento de semen son esencialmente los mismos que los que se utilizan para almacenar semen en estado líquido, todos estos componentes también son básicos.

La composición del diluyente es igual para semen congelado tanto como para refrigerado-fresco de acuerdo a Muiño-Otero (2008) e incluye:

- ❖ Materiales orgánicos tales como yema de huevo o leche, que cuentan con capacidad de disminuir o evitar el efecto del shock de frío.
- ❖ Agua bidestilada o ultrapura, como disolvente del resto de los componentes.

- ❖ Crioprotectores, siendo el más utilizado el glicerol.
- ❖ Sustancias iónicas y no iónicas para mantener la osmolaridad y el pH del medio.

- ❖ Azúcares simples como fuente energética y trisacáridos como crioprotectores adicionales
- ❖ Antibióticos para controlar el crecimiento bacteriano
- ❖ Algunos otros aditivos que pueden servir, aunque esto ya es opcional, como enzimas, detergentes o aminoácidos que pueden mejorar la fertilidad.

2.4 Principales medios de congelación

2.4.1 Triladyl®

Es una concentración estéril para la preparación de un diluyente con yema de huevo para la congelación de semen bovino en un solo paso. Cada frasco de Triladyl® contiene 250g de concentrado para la preparación de 1250g de diluyente listo para su utilización. Su contenido en antibióticos es a partir de una dilución de 1:8 (1 parte de semen a 8 partes de diluyente) al estándar de la UE: EC norma 88/407. Está compuesto por: TRIS, ácido cítrico, azúcar, tampones, glicerina, antibióticos y agua de extrema pureza. Cada 100 ml del diluyente preparado contienen (unidades activas): Tilosina 5,7mg, Gentamicina 28,6mg, Espectinomicina 34,3mg y Lincomicina 17,2mg. Con ello 100 ml de semen diluido contienen a partir de una dilución de 1:8, la siguiente concentración antibiótica:

Tilosina 5,0mg, Gentamicina 25,0mg, Espectinomicina 30,0mg y Lincomicina 15,0mg (25).
(Manual de Triladyl, IMV).

2.4.2 ANDROMED

Es un diluyente sin yema de huevo para congelación de semen bovino.

Sus beneficios son: sin ingredientes de origen animal, sin riesgo de contaminación microbiológica, protocolos de producción eficiente, altas en las tasas de fertilidad, amplio rango de aplicación, estándar GMP de producción (MINITUBE, 2014).

Además contiene fosfolípidos, TRIS, ácido cítrico, azúcares, antioxidantes, tampones, glicerina, agua de altísima pureza y antibióticos como: gentamicina, espectinomicina, lincomicina).

2.5 Componentes de los medios comerciales para congelar.

2.5.1 Agua bidestilada.

Generalmente se le llama así también al agua químicamente pura, aunque también se le llama a esta tridestilada, que solo es agua que se ha procesado tres veces por desmineralización por intercambio iónico, electrodesionización, destilación por temperatura, o algún proceso que la lleve a químicamente pura, generalmente en este tipo de agua es más importante los pirógenos que la calidad que se da por sentada.

2.5.2 Azúcares

Son componentes importantes en los diluyentes, ya que pueden actuar como fuente de energía para los espermatozoides durante su almacenamiento, como es el caso de la glucosa y de la fructosa, o bien como crioprotector ya que también actúan manteniendo o incrementando la presión osmótica de manera extracelular en el espermatozoide, lo que

permite mantener la integridad de la membrana espermática al almacenamiento por tiempo prolongado (FERNANDEZ, 2013).

2.5.3 Sustancias buffer o amortiguadores.

Actúan dando estabilidad a la membrana, ya que mantienen la tonicidad total del diluyente, lo cual es importante cuando el semen es almacenado por largos periodos de tiempo. El TRIS (Hidroximetil Amino Metano) es usado como el principal componente en el diluyente para la congelación de semen bovino, siendo predominante una buena capacidad buffer, diurética y actividad osmótica; así como una baja toxicidad a una alta concentración (Fernández, 2013).

2.5.4 Yema de huevo

La yema de huevo contiene glucosa, que es usada por los espermatozoides del toro con preferencia a la fructosa del propio semen, diversas proteínas, hidro-y liposolubles y un índice de viscosidad que puede ser ventajoso para las células. También contiene aminoácidos L-tirosina, L-triptófano y L-fenilalanina, que dejan en libertad peróxido de hidrogeno toxico en el proceso de su desaminacion oxidativa (Salisbury y Vandemark 1961).

De acuerdo con Viswanath y Shannon (2000) comúnmente la yema de huevo es un ingrediente utilizado para la congelación de semen ya que preserva la motilidad e integridad de las membranas del acrosoma y mitocondrias del espermatozoide, además es un buffer osmótico.

2.5.5 Leche descremada.

La caseína y la lactosa presentes en la leche descremada, son las principales responsables de disminuir los daños por enfriamiento y congelación ya que secuestran

proteínas (BPS) presentes en el plasma seminal que tras la eyaculación inducen la pérdida de colesterol y fosfolípidos de las membranas plasmáticas (ALMENAR, 2007).

2.5.6 Glicerol

Los agentes crioprotectores protegen a los espermias durante la fase de cristalización, debido a los resultados obtenidos esta sustancia es la más empleada. La eficiencia protectora del glicerol ha sido atribuida a su capacidad de absorber el agua y esto favorece a que se lleguen a formar pequeños cristales de hielo (Morrier, 2002).

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

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

2.6 Condiciones necesarias en el procesamiento de semen.

2.6.1 Dilución

En la criopreservación de semen bovino el éxito va depender de factores interrelacionados tales como, la calidad inicial del semen, crioprotectores, composición del diluyente, protocolo de enfriamiento, envasado, velocidad de descongelamiento y la

interacción de estos componentes, como también la variación animal individual (Andrabi, 2007; Layek *et al.*, 2016). Sabemos que es inevitable tener cierta pérdida de viabilidad de los espermatozoides porque debido a los efectos acumulativos de los procesos de tratamiento de semen antes y durante el proceso de congelación. En la criopreservación del espermatozoide es posible la reducción de la fertilidad aun en la subpoblación de espermatozoides viables luego de la descongelación. (Watson, 2000; Layek *et al.*, 2016).

Para que una fecundación resulte exitosa, el semen debe mantener una motilidad progresiva, y con capacidad de producir energía en la forma de ATP para surtir procesos celulares, mantener la membrana plasmática, la integridad acrosomal y guardar las enzimas necesarias para la introducción del ovocito. La ruptura de cualquiera de estas características durante el procesamiento del semen y la criopreservación comprometerá la habilidad de fecundación. Un efecto bien establecido en la integridad de la membrana espermática y la función es a través del destino del agua intracelular durante la congelación de semen. Conforme a que la temperatura del semen diluido se pasa por debajo de 0 °C, el diluyente se somete a un enfriamiento rápido, cuando la temperatura se reduce aún más es cuando comienza la formación de cristales de hielo extracelular de agua en el medio circundante por lo tanto la formación de hielo aumenta la concentración de solutos en el diluyente generando un gradiente osmótico a través de la membrana y por lo tanto se produce la deshidratación de los espermatozoides. El grado de flujo de agua desde el espermatozoide depende de la velocidad de enfriamiento. Cuanto mayor será el flujo de salida de agua más lenta sea la velocidad, y por lo tanto la deshidratación celular. A tasas de congelación más rápidas, la probabilidad de formación de hielo intracelular aumenta, causando daño físico que generalmente es letal (Watson, 2000; Andrabi, 2007; Layek *et al.*, 2016).

Entonces para evitar algún tipo de ruptura celular por deshidratación se exige una óptima velocidad de enfriamiento que equilibra los efectos causados tanto por una velocidad lenta, como por una velocidad rápida, también se encuentran los cambios que producen la fosforilación de la tirosina, la formación de especies reactivas de oxígenos (anión superóxido O₂⁻), peróxido de hidrogeno (H₂O₂) y la producción de óxido nítrico (NO), y una desestabilización de la membrana lipídica que puede llevar a la pérdida de la integridad de membrana y una reacción acrosomal prematura (Layek *et al.*, 2016).

2.6.2 Enfriamiento

Una vez que se obtiene el eyaculado, pocas son los métodos que permiten mejorar la calidad del semen a la descongelación. El semen bovino se colecta sobre tubo seco y estéril sin diluyente y debe enfriarse a 4-5 °C en forma gradual (1,5-2 h mínimo) (Hansen, 2012).

2.6.3 Periodo de equilibrio.

El semen completamente diluido debe tener un período de equilibrio a 4°C por un mínimo de 4 horas. Este tiempo puede ser usado para llenar y sellar las pajillas y ubicarlas sobre las gradillas de congelación y conteo e iniciar la curva de frío lenta (Hansen, 2012).

2.6.4 Envasado

Una vez obtenida la dilución se procese con la identificación, el llenado y sellado de las pajuelas. En la actualidad se utilizan pajuelas de 0,25 y 0,5 mL. Una vez llenado las pajuelas se sellan manualmente con polvo de polivinilo, selladores térmicos o por ultrasonido, esferas metálicas o de vidrio, dependiendo del equipo empleado, esta etapa puede efectuarse a temperatura ambiente, después de estar la dilución del semen, a 4 °C, de manera manual o computarizada (Rivera Gaona, 2016).

2.6.5 Estabilización

Una vez empacado el semen, se debe llevar a cabo una curva de enfriamiento lenta, la cual se inicia con la refrigeración de equilibrio a 4 °C en un período de 4 horas. Luego se procede a la congelación del semen (Serrano, 2016).

Después de este paso el semen puede seguir el camino de la congelación, o mantenerse a 4 °C (refrigerado) hasta el momento de la inseminación en el cual se debe volver a atemperar a unos 37 °C en el momento del depósito en el útero del animal.

2.6.6 Congelación

Una vez 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 a 15 minutos. A continuación, las gradillas se introducen directamente en el nitrógeno líquido para ser conservadas a -180 °C o 196 °C. (Rivera Gaona, 2016)

2.7 Evaluación del semen post - congelación.

La evaluación adecuada de la calidad después de la descongelación de espermatozoides es de gran interés para la industria de la IA, ya que puede proporcionar información sobre la capacidad fecundante de los espermatozoides crio preservados.

Según Gómez & Migliorisi (2007). La evaluación del semen post – descongelado se mide con los siguientes parámetros:

- A. Motilidad individual: Los valores son: 0 horas el 25% y a las 2 horas de 15% de espermatozoides motiles; indicado por medio del Departamento de Medicina del

Rodeo y Teriogenología de la Universidad de Saskatchewan, Canadá y que se corresponden con las normas ISO 9002,

- B. Concentración: La concentración de una pajuela de 0,25ml, es de 20 millones, pero a la descongelación deberá haber por pajuela un mínimo de 10 millones de espermatozoides móviles.

Luego a esta se la multiplica el resultado por 5 millones y después por el porcentaje de espermatozoides móviles obteniendo la fracción total de espermatozoides móviles por dosis inseminante.

Propiedades de los medios para mantenimiento de embriones

Solución de enjuague de embriones vigro contiene fuentes de energía, estabilizadores de membrana y amortiguador HEPES. El surfactante propiedades de las proteínas son proporcionadas por 1mg/ml de polivinilo alcohol (PV-OH) debido a las proteínas también actúan como quelantes de metales no pesados, antibióticos que contiene Kanamicina y Gentamicina.

2.7.1 Evaluación de la Calidad del Semen

La fertilidad potencial de una muestra de semen probablemente va a depender de que contenga un número suficiente de espermatozoides viables, morfológicamente normales y funcionalmente competentes, capaces de alcanzar el oviducto y de establecer un reservorio oviductal, de llevar a cabo la fecundación del ovocito, y de contribuir al desarrollo embrionario. Los nuevos sistemas computarizados para el análisis de la motilidad y de la morfometría espermática, junto con las tecnologías de fluorescencia, permiten adquirir, de forma rápida y objetiva, datos precisos sobre múltiples parámetros relativos a características

estructurales y funcionales de los espermatozoides. Aunque no existe ningún método que por sí mismo sea capaz predecir la capacidad fecundante del semen (Rodríguez-Martínez *et al.*, 1997).

La fertilidad de un semental que ya ha sido utilizado para IA, entre otras razones, va depender básicamente de la cantidad de espermatozoides normales que se utilicen al inseminar (Hidalgo, 2005 citado por Triana Leal, 2015). La concentración se llega a expresar como el número de espermatozoides por ml por eso existe una gran variabilidad en la concentración de un eyaculado y otro por eso la determinación exacta de la concentración en una prueba es suma importancia ya que a partir esto se puede definir el potencial de fertilidad del animal colectado esto puede calcularse por varios métodos a partir de la muestra de semen. La presencia de un mayor número de espermatozoides con características normales incrementa la posibilidad de fecundación. Una vez encontrado el volumen y la concentración del semen eyaculado se podrá encontrar el valor de dilución y el número de dosis inseminante y así obtener mejores grados de fertilidad. Generalmente la concentración que se obtiene en el eyaculado de bovino es de 20×10^6 de espermatozoides /ml. La concentración se puede obtener mediante la colocación de una alícuota de semen fresco en la cámara de Neubauer, para luego realizar el conteo (Cabrera & Pantoja, 2012). Existe una correlación significativa entre el número de espermatozoides inseminados y la fertilidad del toro. La fertilidad de un toro usado en IA dependerá básicamente del número de espermatozoides normales que se utilicen al inseminar (Hidalgo, 2005 citado por Triana Leal, 2015).

2.8 Características generales del semen

2.8.1 Definición de Semen

Es un contenido celular líquido el cual contiene los espermatozoides (gametos masculinos) y las secreciones de los órganos accesorios sexuales del aparato reproductor masculino que al momento de eyacular se mezclan (CRUZ Valenzuela, 2009)

El semen lo forman dos principales constituyentes: los espermatozoides y el plasma seminal.

2.8.2 Plasma seminal.

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

Según PEÑA *et al.* (2008). Es el medio líquido del eyaculado, este medio tiene tres funciones principales:

- A)** Actúa como vehículo para los espermatozoides, transportándolos desde el sistema reproductor del macho durante la eyaculación.
- B)** Proporciona un medio rico en nutrientes que colaboran en la supervivencia de los espermatozoides después de depositarse estos en el aparato genital de la hembra.
- C)** Sirve de activador a los espermatozoides previamente no móviles.

2.8.3 Definición de espermatozoide.

Célula reproductora sexual masculina que se forman en los tubos seminíferos de los testículos. Son células alargadas consistentes con cabeza portadora de núcleo y una cola que es parte esencial para la motilidad celular (CRUZ Valenzuela, 2009). Op.Cit.p.21

El espermatozoide es una célula altamente especializada y condensada que no crece ni se divide, no tiene ningún desempeño en la fisiología del animal que lo produce, este solamente se ocupa de fecundar el ovulo para así producir nuevos individuos (Hafez, 1968).

2.8.4 Vagina artificial

Es el método más parecido a la vagina natural, aunque para usarla es necesario que el toro haya sido entrenado previamente; este es un método fisiológico, ya que imita la monta natural. Debemos tener en cuenta que las vaginas artificiales tienen que estar en muy buen estado de higiene y conservación, lo cual garantiza por una parte la calidad de la muestra colectada, y por otra parte que el toro no rechace este método (Billanova et al., 2010 citado por Triana Leal, 2015).

2.8.4 Recolección del Semen

La colecta del semen es el primer paso dentro de un programa de inseminación artificial, este proceso resulta de gran importancia para la obtención de los eyaculados de buena calidad y para la adecuada utilización de los sementales, consiguiendo así una vida prolongada de los espermatozoides (Garde, 1995).

Actualmente en el mundo existen dos técnicas muy reconocidas para la extracción de semen, la más usada y recomendada es la vagina artificial, que consiste en proporcionar un objeto que simule las características del aparato reproductor de la hembra bovina y el electroyaculador, este está diseñado para estimular los nervios pélvicos simpáticos y

parasimpáticos con impulsos de bajo voltaje para inducir la erección peneana y conseguir que el semental eyacule. (Morillo *et al.*, 2012).

2.9 Evaluación macroscópica y microscópica

2.9.1 Volumen del Eyaculado

Las características del material eyaculado y el volumen tienen relación con el medio ambiente y edad para la producción y calidad del semen (Brito *et al.*, 2002). El volumen del eyaculado es medido por observación directa del tubo colector graduado en ml. Generalmente los tubos colectores están protegidos con la finalidad de evitar el efecto de los rayos solares y cambios bruscos de temperatura en la muestra obtenida. La mayoría de los toros proveen de 4 a 7 ml de eyaculado por monta (Muiño *et al.*, 2005).

2.9.2 Color y Olor.

El color del semen bovino normalmente es blanco cremoso, que a su vez está asociado con la cantidad y la concentración de espermatozoides contenidos en el eyaculado. Es importante tener en cuenta que la coloración estará variando de acuerdo al estado del animal, puede variar de un color amarillento por la presencia de riboflavina que se puede confundir con la presencia de orina; o de color rojizo a causa de una lesión existente. La riboflavina se presenta más en toros alimentados con hierbas verdes (Bonadonna, 1989).

El olor del semen va variar dependiendo del estado y condición del animal, o bien como cuando se mezcla con orina o ya sea tal vez por procesos purulentos y por la falta de protocolo de limpieza. Generalmente el olor se determina olfateando el tubo colector donde contiene la muestra seminal, olores extraños diferente al característico indica que puede existir una contaminación ya sea con orina o alguna otra secreción derivada de una patología genito-urinaria (Crespo & Moreno, 2014).

2.9.3 Motilidad Espermática

Hafez, Hafez (2000) considera un 70 % como recomendable para lograr buenas tasas de fertilidad.

La motilidad es una manifestación de viabilidad espermática y de integridad celular. Para que un espermatozoide sea capaz de fecundar a un ovocito debe reunir una serie de requisitos, entre ellos, tener motilidad progresiva. Entonces si un eyaculado con un porcentaje bajo de espermatozoides móviles, o ausencia de motilidad, automáticamente será descartado para su conservación (Den Daas, 1992; Holt y Van Look, 2004).

Según Salisbury y Vandemark, (1961). La motilidad del espermatozoide se caracteriza por pequeños impulsos de progresión, movimiento que se da por el látigo de la cola combinados con un cambio de dirección por movimientos de rotación de la cabeza en torno a su eje longitudinal.

La estimación del movimiento se hace por medio de la observación al microscopio de una gota de semen sin diluir, el vigor estará dado por el movimiento individual de las células espermáticas y la concentración de estas. Instituto Nacional de Capacitación del Sector Agropecuario (1983).

2.9.4 Motilidad Masal

La motilidad masal del semen bovino se valora de acuerdo a la concentración espermática, la velocidad y el movimiento progresivo de los espermatozoides. La observación de la misma se evalúa con una pequeña gota de semen sobre un portaobjetos atemperado a 37°C y se observa al microscopio con objetivo 40X. La escala se clasifica de 1

a 5, donde 1 corresponde al semen que no tiene ondas y 5 cuando las ondas se mueven formados remolinos (Yildiz *et al.*, 2000).

2.9.5 Motilidad individual

La estimación de la motilidad individual de los espermatozoides es con el propósito de identificar las células con movimiento flagelar del total de espermatozoides del eyaculado obtenido, observados en diferentes campos de placa puesta en el microscopio (Curbelo & Rodríguez, 2013). Para ello se sirve una pequeña gota de semen diluido en un portaobjetos y se agrega una pequeña gota de solución de citrato de sodio al 2,9%. Se coloca un cubreobjetos y se observa al microscopio con objetivo 40X, ahí se observan los espermatozoides que se mueven en forma rectilínea a los cuales se los considera normales, caso contrario los que se mueven en círculo se consideran anormales. (Billanova *et al.*, 2010 citado por Triana Leal, 2015).

2.9.6 Concentración

Generalmente la concentración que se obtiene en el eyaculado de toro es de 20×10^6 de espermatozoides /ml. La determinación precisa del parámetro de la concentración de espermatozoides es una prueba importante de la calidad del semen ya que es una de las características que define el potencial de fertilidad del toro colectado. Una vez encontrada el volumen y la concentración en el semen del eyaculado, se podrá obtener el valor de dilución y el número de dosis inseminante para lograr grados adecuados de fertilidad. La concentración puede ser obtenida mediante la colocación de una alícuota de semen fresco en la cámara de Neubauer, para luego realizar el conteo. En la actualidad se puede obtener la concentración de espermatozoides con la utilización de un fotómetro calibrado para bovinos (Cabrera & Pantoja, 2012).

La concentración depende del desarrollo y de la madurez sexual del toro, del estado de salud, tamaño testicular y de la dieta que lleva. Existen marcadas diferencias de concentración seminal entre toros, entre edades, ubicación geográfica y épocas del año (Salisbury y Vandemark, 1961).

2.9.7 Morfología

La morfología espermática es un factor determinante en la capacidad de fertilización del semen, ya que existe una correlación entre defectos espermáticos e infertilidad (Palacios, C.J. 2005).

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

Atendiendo a una clasificación estrictamente morfológica, las anomalías que pudieran presentarse se clasifican en anomalías en la cabeza, en el tracto intermedio y en la cola ya que cualquier anomalía que afecte a algún atributo del espermatozoide puede dificultar su migración en el tracto genital de la hembra, impidiendo la unión con el ovocito. Según el órgano donde pueden haberse generado, se diferencian las anomalías en primarias y secundarias.

Esta evaluación de la morfología espermática puede ser utilizada para desechar toros con baja calidad seminal y refleja la funcionalidad de los testículos, epidídimos y glándulas

accesorias, por lo que siempre deben estar incluidas en las pruebas de evaluación espermática (Evans, 2010 citado por Triana Leal, 2015).

3.- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de Investigación.

La investigación se realizó en las instalaciones y laboratorio de biotecnología del Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal, CEPIPSA, Topilejo, Tlalpan, CDMX.



3.2 Materiales

3.2.1 Materiales de oficina

1 Cuaderno para apunte de datos.

1 Marcador permanente

1 Cámara digital o celular

1 Bolígrafo

3.2.2 Materiales de campo

1 Vagina artificial

1 Overol

3 Tubos colectores graduados

3 Mangas

1 par de botas

1 balde Agua limpia

1 Detergente

1 Termómetro

1 paquete de guantes de examinación

1 Balde

1 balde con agua caliente

1 paquete de papel o sanitas.

1 Tijera

3.2.3 Equipos e instrumentos de laboratorio.

✚ microscopio electrónico

✚ placa térmica

✚ baño maría

- ✚ porta y cubreobjetos
- ✚ pipetas automáticas de 10 μ l, 20 μ l
- ✚ tijeras
- ✚ toallas desechables
- ✚ pinzas de disección
- ✚ pajuelas de 0,25 ml de capacidad
- ✚ goblets de 10mm y 35 mm para almacenar pajuelas
- ✚ refrigeradora
- ✚ rampa para congelación (gradillas)
- ✚ tanque criogénico
- ✚ nitrógeno líquido.

3.2.4 Reactivos.

- ✚ Solución de enjuague de embriones (ViGro Complete Flush Solution).
- ✚ Triladyl
- ✚ Alcohol Polivinílico
- ✚ Eosina (5%) y Nigrosina (10%)
- ✚ Agua bidestilada.
- ✚ Yema de huevo fresco
- ✚ Semen fresco

3.3 Caracterización de la unidad de análisis.

Las unidades experimentales y de análisis fue el semen de bovino raza Holstein, colectados mediante vagina artificial, envasado en pajuelas, criopreservado y posteriormente descongelado. Las muestras de semen se obtuvieron del mismo toro, los cuales fueron colectados 3 veces, una colecta por día dando descanso de dos días para la próxima extracción los cuales fueron procesados con un diluyente que es usual en el enjuague de embriones.

3.4 Método

3.4.1 Selección del toro donante.

Para llevar a cabo este trabajo de investigación se utilizó 1 toro de la raza Holstein de 4 años de edad, con una condición corporal de 3, apto para la reproducción y libre de toda enfermedad infecto contagiosa.

Vacas pertenecientes al Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal, CEIPSA, Topilejo, Tlalpan, CDMX.

3.4.2 Preparación del toro donante

Previo al proceso de colecta se realizó la limpieza de la parte ventro abdominal de manera descendente, utilizando detergente y abundante agua, realizando una serie de masajes para remover cualquier tipo de suciedad presente y realizar el secado con papel o toalla. Posteriormente con una tijera se corta el exceso de pelo del ostio prepucial a una altura de 2-3 cm de la base, siempre cuidando de no causar alguna irritación en el área. Finalizando con un lavado interno del prepucio con una infusión de solución salina, el propósito de estas medidas son evitar la contaminación del semen con algún tipo de agente externo o por propias secreciones del toro.

3.4.3 Excitación pre-coital.

Antes de la colecta se realizó un proceso entrenamiento y dando oportunidad de una o dos montas falsas para la excitación pre coital del toro. Para esta etapa la vagina artificial ya estaba preparada.



Figura 1 Excitación pre-coital

3.4.4 Colección del semen.

La colecta se realizó mediante V.A. la cual consta de un tubo rígido cilíndrico de 30 cm de longitud, con una manga de goma en su interior y una válvula ubicada en un extremo donde se agrega agua a una temperatura de 40 a 42°C aproximadamente; en un extremo estaba conectado a un embudo donde se colocó el tubo colector. Todas las colectas tomadas fueron trabajadas por el mismo asesor, y a la misma hora por la mañana, cada tercer día es decir 3 veces en una semana, siempre evitando posible contaminaciones, cambios violentos de temperatura, contacto con el agua y que la radiación solar no le diera directamente a la muestra y de esta manera completar las colectas deseadas.

3.5 Análisis microscópico del semen.

Una vez que se obtuvo el eyaculado se determinó el volumen obtenido directamente en el tubo colector graduado en ml. Al mismo tiempo se valoró el color y olor del semen. En cuanto al PH se utilizaron tiras de papel tornasol. El volumen del eyaculado del toro fue de entre 6-7 ml por colecta.

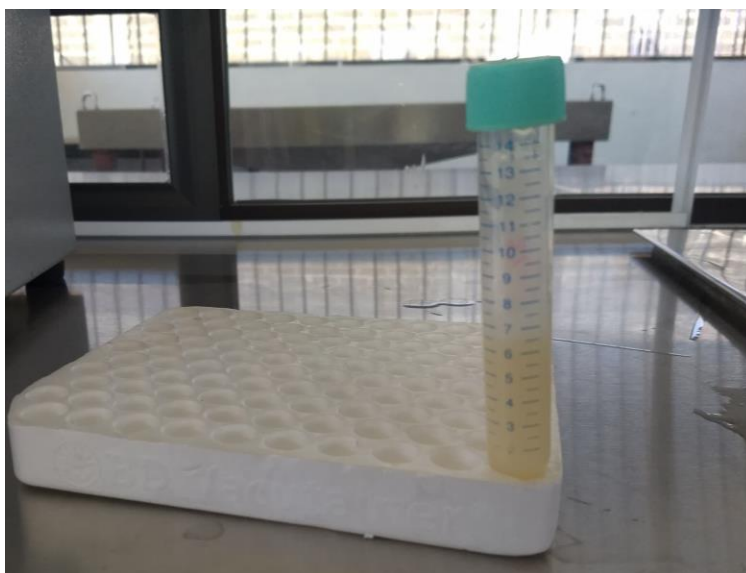


Figura 2 Volumen del eyaculado

3.5.1 Motilidad masal

Es la evaluación que se efectúa inmediatamente después de la colecta, tal proceso se lleva a cabo tomando una pequeña gota del semen colectado, la cual se coloca sobre un portaobjeto que se encuentra sobre una placa térmica atemperada a 37°C. Posteriormente se lleva a vista al microscopio y se evalúan de acuerdo a los movimientos que se observan.

3.5.2 Concentración del semen.

Para determinar la concentración espermática se realizó una dilución 1:200. Posteriormente se procedió a colocar 10 µl de la dilución en la cámara de Neubauer; a continuación, se llevó la cámara al microscopio donde se observó con el lente de 40X. Para

llevar a cabo el conteo se procedió a contar las cabezas de los espermatozoides observados en 5 cuadros, del cuadro central grande y el resultado obtenido de la concentración espermática fue en millones/ml.

3.5.3 Dilución del semen.

Para cada muestra de semen colectado se dividió en 2 partes iguales y se preparó la solución a base de diluyente 60 % de agua bidestilada, 20% de yema de huevo y 20% de triladyl como testigo y 60% de medio Vigro, 20 % de yema de huevo y 20% de tryladil como experimento el mismo que contiene fuentes de energía, estabilizadores de membrana y amortiguador HEPES. El surfactante propiedades de las proteínas son proporcionadas por 1mg/ml de polivinilo alcohol (PV-OH) debido a las proteínas también actúan como quelantes de metales no pesados, antibióticos que contiene Kanamicina y Gentamicina.

Una vez hecha la dilución esperamos a que la temperatura fuera descendiendo gradualmente y así poder someter las muestras a temperaturas bajas.



Figura 3 Monitoreo de temperatura

3.5.4 Preparación de pajuelas.

Con un marcador permanente se rotularon las pajuelas siendo S1 la solución testigo y S2 la solución experimental.

3.5.5 Envasado del semen.

Se envasaron manualmente pajuelas de 0.25 ml, que fueron selladas con el alcohol polivinílico, se colocaron sobre una gradilla para luego ser colocadas en refrigeración.

3.5.6 Periodo de equilibrio.

Una vez colocadas las pajuelas en refrigeración, se controló con un termómetro el descenso de la temperatura hasta 4°C, luego las pajuelas se colocaron en una rampa durante 4 horas, tiempo durante el cual se logró el equilibrio.

3.6 Criopreservación del semen.

Una vez empaquetadas las pajuelas se colocan sobre la rampa, fueron ubicadas en una caja a una altura de 4 cm sobre el nivel de nitrógeno líquido (NL) para ser sometidas a sus vapores por un tiempo de 15 minutos y de esta manera estabilizar la temperatura, luego se dejaron caer en el NL para su crio preservación a -196°C y se almacenaron en un termo criogénico.

3.7 Descongelamiento.

Las pajuelas al estar sometidas a bajas temperaturas pueden pasar tiempo indefinido en el nitrógeno líquido, pero en este trabajo de investigación se requiere evaluar motilidad y sobrevivencia espermática post congelación entonces se procedió a descongelar dichas pajuelas y así poder obtener el análisis microscópico deseado como son la motilidad y la sobrevivencia espermática

Se tomaron 3 pajuelas de cada colecta, por fecha de extracción, sometiéndolas al proceso de descongelación en baño María a una temperatura de 37°C por 30 -40 segundos para su respectiva evaluación.

3.8 Evaluación del semen descongelado.

3.8.1 Motilidad individual

Para poder determinar este punto se toma una gota de la muestra ya descongelada y atemperada y se coloca sobre un portaobjeto que se encuentra sobre una placa térmica a una temperatura de 37°C . Se coloca un cubre objeto y se lleva la muestra al microscopio con vista a 10X y 40X, de esta manera se observa y determina la motilidad expresada en porcentaje de acuerdo al avance que tengan los espermatozoides tomando en cuenta también en qué dirección se mueven.



Figura 4 Análisis de semen post-congelado.

3.8.2 Viabilidad espermática post-descongelado.

La determinación de espermatozoides vivos y muertos fue necesario tomar una gota de la muestra descongelada colocarlo sobre un porta objeto y agregar una gota de eosina-nigrosina, luego se hizo un frotis con una lámina porta objeto y se deja secar por unos segundos para posteriormente llevar la muestra al microscopio y el resultado es: los que están vivos no se colorean y los espermatozoides muertos si se colorean, teniendo en cuenta estos datos se procede a realizar un conteo de 100 espermatozoides identificando vivos de muertos.

3.9 Análisis estadístico

La motilidad y sobrevivencia espermática post-descongelación en el grupo testigo S1 y experimental S2 se comparó entre grupos mediante una prueba de t de Student.

3.9.1 Variables analizados

Viabilidad. Esta variable hace referencia al porcentaje de espermatozoides viables que se encuentran en la muestra, expresado como el porcentaje del cociente de los espermatozoides viables obtenido mediante el test de la eosina-nigrosina respecto del total.

Motilidad progresiva. Esta variable continua solamente tiene en cuenta el movimiento de los espermatozoides que da lugar a avance, ya sea un movimiento rectilíneo y rápido o un movimiento más enlentecido que describe una trayectoria más sinuosa.

4.- RESULTADOS

Cuadro 1. Porcentaje promedio de espermatozoides vivos y muertos Post-descongelación entre S1 y S2.

Tratamiento	Muestra	vivos	muertos
S1	18	58.44 ^a	41.56 ^a
S2	18	38.61 ^b	61.39 ^b

Columna con distinta literal establece diferencia significativa (P <0.05)

Cuadro 2. Porcentaje de motilidad post-descongelación

Tratamiento	muestra	porcentaje
S1	18	70 %
S2	18	65%

No mostro diferencia significativa (P >0.05).

5.- DISCUSIÓN

El propósito de esta investigación fue evaluar la motilidad, espermatozoides vivos y muertos descongelados entre dos soluciones, S1 agua bidestilada, triladyl, yema de huevo y para S2 medio vigro, triladyl, yema de huevo.

La viabilidad de los espermatozoides post descongelamiento son parámetros que se ven afectados, esto se debe a los cambios de temperatura, formación de hielo intracelular, estrés osmótico y toxicidad, reduciéndose hasta un 40-50 % (Ramonez, 2013).

El porcentaje de espermatozoides vivos determinado fue de 58.44 % (S1) y 38.61% (S2); datos que no se relacionan a los obtenidos por Chávez, M.(2008) que en su estudio determinó 70% y 80%; valores similares encontrados por Morillo *et al.*,(2012) quien comenta que el porcentaje mínimo aceptable para espermatozoides vivos debe alcanzar el 70%.

La motilidad espermática uno de los criterios importantes en la evaluación de las células espermáticas antes y después a la criopreservación ya que es fundamental para que los espermatozoides alcancen el medio uterino y el punto de fertilización (Siqueira *et al.*, 2007).

En la motilidad, la reducción espermática puede estar relacionada a la lesión mitocondrial, ya que se requiere energía tanto para la motilidad como para la fertilización. La mitocondria es la principal fuente de energía para el espermatozoide por su producción de ATP (Connell *et al.*, 2002).

En los datos obtenidos el porcentaje de motilidad post-descongelación entre S1 y S2 (65 % Vs 70 %). De acuerdo a Hafez y Hafez (2000) para lograr buenas tasas de fertilidad es de 70 %, con esto podemos decir que, la muestra colectada fue apta para su análisis.

Los daños sufridos durante el proceso de criopreservación afectó en el descenso significativo de viabilidad espermática, por lo que se le atribuye dicho resultado al estrés osmótico causando daño en la membrana espermática debido a alguno/s componentes que contiene el medio vigro. Actualmente no se han publicado estudios donde se haya utilizado este medio como componente para diluir semen, por lo que se puede realizar una prueba hiposmótica en este trabajo de investigación.

En resumen se observó en los porcentajes de sobrevivencia espermática existe diferencia significativa entre los tratamientos, siendo así, se rechaza la hipótesis de esta investigación a pesar de que en el medio vigro se encuentran presentes sustancias muy parecidas a las que comúnmente se utilizan en la criopreservación a esto se le atribuye que haya buena viabilidad, pero existe una mayor cantidad de espermatozoides muertos al descongelar mientras que para motilidad post-descongelación no hubo diferencia significativa entre ambos grupos.

6.- CONCLUSIONES

Después de realizar la evaluación correspondiente de las muestras podemos concluir que la solución 1 agua bidestilada, triladyl y yema de huevo (S1) fue la que marcó diferencia significativa sobre espermatozoides vivos, posiblemente algunos componentes del medio Vigro afecto al grupo 2. Para la evaluación de motilidad no se observó diferencia marcada.

7. RECOMENDACIONES.

Se sugiere realizar pruebas de viabilidad espermática inseminando vacas de cada grupo a nivel campo.

8. –BIBLIOGRAFIAS

Amirat L, D Tainturier, LT Jeanneau, C Thotin, O Gérard, JL Courtens, M Anton. 2004. Bull semen *in vitro* fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl® a commercial egg yolk extender. *Theriogenology* 61, 895-907.

Andrabi, S.M.H. 2007. Fundamental principles of cryopreservation of *Bos taurus* and *Bos indicus* bull spermatozoa: mini review. *Int. J. Agric. Biol.* 9: 367–369.

assessment of viability and fertilizing capacity of bull spermatozoa. *J. Reprod.*

Ávila-Portillo, L. M., Madero, J. I., López, C., León, M. F., Acosta, L., Gómez, C., . . . Gómez, C. (2006). Fundamentos de criopreservación. *Revista colombiana de obstetricia y ginecología*, 57(4), 291-300.

Barth, A.D., Oko, R.J., 1989. *Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa*. Iowa State University Press.

Bonadonna, T., Succi, G.W., 1980. Artificial insemination in the world. *Proc. 9th Int. Congr. Anim. Artif. Insem.* Madrid, Spain, vol.5, pp. 655-657.

Brito, L. F., Silva, A. E., Rodrigues, L. H., Vieira, F. V., Deragon, L. A., & Kastelic, J. P. (2002). Effects of environmental factors, age and genotype on sperm production and semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* AI bulls in Brazil. *Animal reproduction science*, 70(3), 181-190.

Cabrera, P., & Pantoja, C. (2012). VIABILIDAD ESPERMÁTICA E INTEGRIDAD DEL ACROSOMA EN SEMEN CONGELADO DE TOROS NACIONALES. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 23(2), 192-200.

Carballo Guerrero, D.M. (2005). Comparación de dos diluyentes comerciales para criopreservar semen de bovino bajo condiciones de campo en el trópico húmedo. Tesis profesional para obtener el título de Médico Veterinario Zootecnista. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Veracruzana, México.

Castelo TS, TR Frota, AR Silva. 2008. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. Acta Vet Bras 2, 67-75.

Chaveiro A, L., A.Machado, B.Frijters, H.Engel, Woelders, (2006).Improvement of parameterrs of freezing médium and freezing protocol for bull sperm using two osmotic supports.Theriogenology 65.1875-1890.

<http://www.angra.uac.pt/MPA/MPA/P/%C3%A1ginas%20do%20Mestrado/Mestrado/Reprodu%C3%A7%C3%A30/Antonio%20chaveiro/improvent.pdf>

Connell MO, N Mcclure, SEM Lewis. 2002. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. Hum Reprod 17, 704-709.

Cooter, P.Z.; Goolsby, H.A.; Prien, S.D. 2005. Preliminary evaluation of a unique freezingtechnology for bovine spermatozoa cryopreservation. Reprod. Domest. Anim. 40: 98–99.

Crespo, E., & Moreno, A. Q. (2014). Calidad seminal de toros criollo limonero. Revista Científica, 24(6), 518-525.

Cruz Valenzuela, Jose Luis. (2009). Manual de Evaluación de Semen en Bovinos. Recuperado de

<http://cdigital.uv.mx/bitstream/12345678/147/1/JOSe%20NICOLaS%20ANGELIN>

Curbelo Curbelo, M., & Rodríguez Rodríguez, Z. (2013). Relevamiento de laboratorios de procesamiento de semen bovino en Uruguay. Recuperado el 26 de 06 de 2016, de <https://www.colibri.udelar.edu.uy/handle/123456789/2730>

Decuadro Hansen (2012). Factores que influyen en la congelación de semen de toros. Argentina livestock. Disponible en: <http://www.argentinallivestock.com.ar/factores-que-influyen-en-la-congelacion-del-semen-de-toros> Consultado el 15/09/2016.Dev. 43, 1-11.

Foote RH. The history of artificial insemination: Selected notes and notables. J Anim Sci. 2002; 80:1-10.

Gómez, M., & Migliorisi, A. L. (2007). Protocolo para la evaluación de semen en rumiantes. *Cátedra Reproducción Animal Facultad de Cs. Veterinarias-UNLP. Buenos Aires, Argentina.*

Gonzalez RA. 2004. Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelação e crioprotectores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membrana dos espermatozoides bovino. Tesis doctoral, Faculdade de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, Brasil.

Holt, W.V., Van Look, J.W., 2004. Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory test of semen quality. *Reproduction.* 127, 527-535.

<https://www.reproduccionveterinaria.com/tecnologias-y-biotecnologias-de-la-reproduccion/colecta-y-criopreservacion-de-semen/criopreservacion-de-semen/>

Hummersted, R.H., JK.Graham y J.P.Nolan, (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. Recuperado el 21 de abril de 2012, de <http://www.andrologyjournal.org/cgi/content/abstract/11/1/73>

Layek S.S.; T.K. Mohantya, A.; Kumaresana, J.E.; Parks, .2016. Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders. Review article. *Animal Reproduction Science* 172 (2016) 1-9.

Lozano, H., factores que afectan la calidad seminal en toros. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*. 2009. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=407639221010>

Medeiros C.M.O., Forell F., Oliveira A.T.D., Rodrigues J.L., 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology* 57, 327-344.

Moradi A.R., Malekinejad H., Farrokhi-Ardabili F., Bernousi I. 2013. Royal Jelly improves the sperm parameters of ram semen during liquid storage and serves as an antioxidant source. *Small Ruminant Research* 113:346–352.

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

Morrier, A. & Castonguay, François & Bailey, J.L. (2002). Glycerol addition and conservation of fresh and cryopreserved ram spermatozoa. *Canadian Journal of Animal Science*. 82. 347-356. 10.4141/A01-045.

Moussa, M., Martinet, V., Trimeche, A., Tainturier, D., & Anton, M. (2002). Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, 57(6), 1695-1706.

Muiño- Otero, R. 2008. Evaluación de la motilidad y viabilidad del semen bovino mediante el uso de sistemas CASA y citometría de flujo: identificación de subpoblaciones espermáticas. Tesis presentada para la obtención de grado de Doctor, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, España.

Muiño, R., Fernández, M., Areán, H., Viana, J. L., López, M., Fernández, A., & Peña, A. I. (2005). Nuevas tecnologías aplicadas al procesado y evaluación del semen bovino en centros de inseminación artificial. *Rev ITEA*, 101, 175-191.

Ollero M., Perez-Pe R., Muiño-Blanco T., Cebrian-Perez J.A.1998. Improvement of ram sperm cryopreservation protocols assessed by sperm quality parameters and heterogeneity analysis. *Cryobiology* 37: 1–12.

Palacios, C.J. 2005. Técnicas para la evaluación de la capacidad fecundante de espermatozoides. Memorias Posgrado de Reproducción Bovina. CGR. Colombia 235-242.

PEÑA, JOHANNA MARCELA BUITRAGO y SÁNCHEZ, LUZ MARINA PÉREZ. 2008. Comparación de dos diluyentes para la crio preservación de semen ovino. [En línea] 22 de noviembre de 2008.

<http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/10185/5987/1/T14.08%20B868c.pdf>

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

Rivera Gaona, M., G., (2016). Congelación de semen bovino. Disponible en: <http://jairoserrano.com/2016/06/congelacion-de-semen-bovino/> 2016 Información proveniente del Dr Miguel Germán Rivera Gaona.

Rodríguez-Martínez, H., Larsson, B., Zhang, B.R., Söderquist, L., 1997. In vitro

Salisbury, G. W., VanDemark, N.L., 1961. Diluents and extension and extension of semen. In: Salisbury, G.W., Van Denmark, N.L. (Eds.), Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of cattle. Freeman, San Francisco, pp. 412-435.

Sesma, B. R., Hernández, H. R., Nazar, P. M., Llaven, M. Á., Miceli, F. A., Martínez, R. I., . . . Trujillo, G. U. (2010). Caracterización reproductiva de toros *Bos taurus* y *Bos indicus* y sus cruza en un sistema de monta natural y sin reposo sexual en el trópico Mexicano. Revista Científica UDO Agrícola, 10(1), 94-102.

Siqueira JB, JD Guimarães, EP Costa, M Henry, CAA Torres, MVGB Silva. 2007. Relação da taxa de gestação com sêmen bovino congelado e testes de avaliação espermática in vivo. Rev Bras Zootec 36, 387-395.

Stornelli, M.C., C.M., Tittarelli, C.A. Savignone, y, M.A. Stornelli. (2005) "efecto de los procesos de crío preservación sobre la fertilidad seminal" Facultad de ciencias veterinarias. Universidad nacional de la plata. CC296, (B1900AVW) la plata, Argentina.

Triana Leal, C.C. 2015. Comparación de dos métodos de obtención de eyaculado sobre la calidad seminal, en toros *Bos Taurus* en el sudeste de la provincia de Buenos Aires, Argentina. Informe Pasantía Internacional. Universidad del Tolima, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Ibagué, Colombia.

Vasconcelos-Filho WF. 2010. Eficiência da congelação automatizada na viabilidade de sêmen bovino. 2010. Tesis máster, Instituto de Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Brasil.

Watson, P. (1990). Artificial insemination and the preservation of semen. Marshall's Physiology of Reproduction. 2: Reproduction in the male.

Watson, P.F. 2000. The causes of reduce fertility with cryopreserved semen. Anim. Reprod. Sci. 60: 481–492.

Yildiz, C., Kaya, A., Aksoy, M., & Tekeli, T. (2000). Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology*, 54(4), 579-585.