

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”**

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL



**“EFECTO DE LOS DILUYENTES TRIS Y AGUA DE COCO
EN EL PROCESAMIENTO DE SEMEN CONGELADO DE
OVINOS”**

Por:

HERNÁN VILLATORO MORENO

TESIS

**Presentada como Requisito Parcial para
Obtener el Título de:**

INGENIERO AGRONOMO ZOOTECNISTA

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

Marzo del 2006

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA “ANTONIO
NARRO”**

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

**“EFECTO DE LOS DILUYENTES TRIS Y AGUA DE COCO EN EL
PROCESAMIENTO DE SEMEN CONGELADO DE OVINOS”**

TESIS

Por:

HERNÁN VILLATORO MORENO

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

INGENIERO AGRONOMO ZOOTECNISTA

Aprobado por:

**Ing. José Rodolfo Peña Oranday
PRESIDENTE**

**Ing. Eduardo Ramos Galindo
SINODAL**

**M.C. Enrique Esquivel Gutiérrez
SINODAL**

DR. Ramón F. García Castillo

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Marzo del 2006.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro” (UAAAN) por ser una institución popular y por darme la oportunidad de estudiar en sus instalaciones y forjarme como Ing. Agrónomo Zootecnista además por proporcionarme los servicios indispensables para cumplir mis objetivos y metas como estudiante y como persona.

Al comité de asesoría:

Al Ing. Rodolfo Peña Oranday, por su apoyo y revisión de este trabajo además por ser un gran amigo, por sus enseñanzas y por compartir días magníficos.

Al M.C. Enrique Esquivel Gutiérrez, por su gran ayuda en la revisión de este documento.

Al Ing. Eduardo Ramos Galindo, por su apoyo en la revisión de este escrito.

A la Lic. Laura Marisela Lara López por la asesoría y apoyo en la realización de esta tesis.

Al Ing. Antonio Navarrete Alfonso

Al Ing. Juan Vicente Navarrete Mendoza

Lic. Rene Arellano Solís

Al Ing. Rodolfo Antonio Vicenté Cid De León

Al Ing. Luís Eder Hernández Vásquez

Al Ing. Edwing Portillo Vega

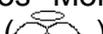
A todos mis amigos y compañeros universitarios, por brindarme su amistad, su cariño, por apoyarme en los buenos y en los malos momentos, por darme sus consejos, y por estar unidos todos estos años.

DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico a las personas que me han dado su amor incondicional, a las que me guiaron por la senda del estudio, la justicia y el trabajo, a aquellas que me han apoyado a superarme día con día como un hombre de bien.

A mis padres: Hernán Villatoro Barrios
 Rosalba Moreno González

A mi bisabuelo Regino Barrios Girón, por transmitirme su experiencia empírica, por darme su cariño y enseñarme a trabajar las labores del campo con paciencia ().

A mi abuela Leandra Barrios Morales, por haberme cuidado durante muchos años y por darme su amor ().

A mis hermanos:

Sandino Villatoro Moreno.
Sendic Villatoro Moreno.
Libia Yunuen Villatoro Moreno.

A Jessica y a mi hija Regina Osiris por ser la inspiración que me impulso a finalizar este trabajo y por llenar de una alegría inefable mi vida.

A mi familia: tíos, tías, primos, primas y abuela del edo. De Michoacán, por ser parte de mi y por ser siempre tan calidos y amorosos conmigo.

“Sentir cualquier injusticia cometida contra cualquiera en cualquier parte del mundo, esa es la cualidad más linda de un revolucionario”

Ernesto Guevara de la Serna

INDICE DE CONTENIDO

	Pagina
RESUMEN.....	I
I. INTRODUCCION.....	1
1.1 Hipótesis.....	4
1.2 Objetivos.....	5
II. REVISION DE LITERATURA.....	6
2.1 Selección del semental.....	6
2.2 Características del semen.....	8
2.2.1 Plasma seminal.....	8
2.2.2 Espermatozoides.....	10
2.3 Extracción y recolección de semen.....	12
2.4 Evaluación de semen.....	13
2.4.1 Volumen.....	14
2.4.2 Apariencia.....	15
2.4.3 Motilidad de los espermatozoides.....	16
2.4.4 Concentración.....	17
2.4.5 Morfología.....	19
2.5 Principios de la conservación del espermatozoide.....	20
2.5.1 Temperatura.....	20
2.5.2 Nutrientes (Fuente de Energía).....	21
2.5.3 Presión osmótica.....	23
2.5.4 Acción tamponante y Ph.....	23
2.6 Procesamiento del semen.....	24
2.6.1 Diluyentes del semen.....	24

2.6.2 TRIS (hidroximetil amino metano).....	26
2.6.3 Agua de Coco <i>In natura</i>	27
2.6.4 Antibióticos.....	28
2.6.5 Efecto biológico de la yema de huevo.....	30
2.6.6 Glicerolización.....	31
2.6.7 Equilibración.....	32
2.6.8 Envasado.....	33
2.6.9 Congelamiento y almacenamiento.....	34
2.6.10 Evaluación post-descongelación.....	36
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
3.1 Localización.....	37
3.2 Carneros utilizados.....	37
3.3 Obtención de la muestra.....	38
3.4 Evaluación de la muestra.....	39
3.5 Preparación de los diluyentes.....	41
3.6 Preparación del diluyente TRIS (hidroximetil amino metano)....	42
3.7 Preparación del diluyente agua de coco.....	43
3.7.1 Primera dilución.....	44
3.7.2 Enfriamiento del semen.....	44
3.7.3 Dilución del semen.....	45
3.8 Glicerolización y equilibración.....	46
3.9 Envasado de semen.....	46
3.10 Congelamiento y almacenamiento de pajillas.....	47
3.11 Evaluación post-descongelación.....	47
3.12 Diseño experimental.....	48

IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	49
V CONCLUSIONES.....	53
VI LITERATURA CITADA.....	55

INDICE DE CUADROS

Página

CUADRO 1. COMPONENTES Y PROPORCIONES UTILIZADAS EN EL DILUYENTE TRIS.....	42
CUADRO 2. COMPONENTES Y PROPORCIONES UTILIZADAS EN EL DILUYENTE AGUA DE COCO.....	44
CUADRO 3. ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA RECUPERCIÓN ESPERMÁTICA.....	49
CUADRO 4. MEDIAS DE LA RECUPEACIÓN ESPERMÁTICA.....	49
CUADRO 5. RESULTADO DE LA COMPARACIÓN DE MEDIAS.....	51
CUADRO 6. DIFERENCIA MÍNIMA SIGNIFICATIVA (DMS).....	51

INDICE DE FIGURAS

	Pagina
FIGURA 1. SEMENTAL DE LA RAZA DORPER.....	6
FIGURA 2. PAJILLA CON REGISTRO IMPRESO.....	34
FIGURA 3. ALMACENAMIENTO DE PAJILLAS.....	35
FIGURA 4. RECUPERACIÓN ESPERMÁTICA POST-DESCONGELACIÓN.....	50

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de reproducción animal y en la unidad ovina de la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”, en Buenavista, Saltillo, Coahuila.

El objetivo de este trabajo fue establecer el tipo de diluyente al que se adapte de mejor manera el semen ovino y de esta forma realizar su procesamiento y posteriormente su uso en la inseminación artificial ayudando así a eficientar la producción ovina en el manejo del área reproductiva tomando en cuenta que no hay que descuidar la alimentación, la sanidad y todos los elementos involucrados para obtener mejores resultados en la producción.

En este trabajo se utilizaron 4 sementales que fueron donadores de semen el cual fue evaluado y procesado bajo condiciones idénticas. Se efectuó un enfriamiento gradual hasta alcanzar 5°C y 6 horas para su equilibración en dos diferentes tratamientos:

- TRIS (hidroximetil amino metano)
- Agua de coco *In natura*

El semen diluido se envasó en pajillas francesas de 0.5 ml., que se mantuvieron durante 9 minutos en vapor de nitrógeno a una temperatura aproximada de -80°C, para su almacenamiento se utilizó un termo contenedor de

nitrógeno líquido en el que se sumergieron las pajillas a una temperatura de -196°C, y se descongeló a 37°C durante 30 segundos para su evaluación post-descongelación.

El experimento constó de dos tratamientos con 20 repeticiones cada uno dando un total de 40 unidades experimentales.

Se utilizó un diseño estadístico completamente al azar con igual número de repeticiones para analizar los datos obtenidos. El parámetro evaluado fue la recuperación espermática post-descongelación.

El programa utilizado para el análisis de los datos fue el de Diseño Experimental FAUANL. Versión 2.5

De acuerdo con los resultados obtenidos en este experimento se concluyó lo siguiente:

Conforme al análisis estadístico se encontró diferencias entre el diluyente TRIS y el Agua de coco, siendo el diluyente TRIS superior que el Agua de coco con una ($P > 0.000$). Este medio proporcionó las mejores condiciones de supervivencia espermática a la descongelación.

El tratamiento TRIS (hidroximetil amino metano) resultó ser el mejor diluyente ya que proporcionó la mayor recuperación espermática, que equivale a una media

de 64.5% de recuperación espermática favoreciendo la respuesta de motilidad post-descongelación y a las características particulares del semen ovino.

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad los pocos o ausentes conocimientos e información con la que disponen tanto los productores como estudiantes, son algunos de los muchos factores que mantiene estático el desarrollo de la producción ovina en México.

Debido a esta problemática, se debe considerar la necesidad de realizar trabajos de investigación que contribuyan a realizar un manejo más efectivo de la producción y de los sistemas de mejoramiento de la misma.

El caótico crecimiento de la población humana y como consecuencia la demanda de alimentos impulsa a eficientar el nivel tecnológico en la producción animal, y en este caso específico en la especie ovina, por lo que la aplicación de la inseminación artificial a través de la conservación "In Vitro" de semen congelado permite utilizar la genética más sobresaliente de los sementales y transmitirla a sus progenies.

El procesamiento de semen es parte fundamental de la técnica de la inseminación artificial en ovinos y otras especies, esta metodología no ha sido confiable en México, entre otras causas a la falta de investigación consistente en esta especie.

El elemento más relevante para la conservación del semen procesado es el tipo de diluyente utilizado ya que de él depende la supervivencia y capacidad fecundante de los espermatozoides, este diluyente debe reunir características como: tener capacidad tamponante, ofrecer nutrientes necesarios para el metabolismo espermático, antibacterianos y fuentes de energía que permita la resistencia a la congelación y a su almacenamiento.

Es por esto la necesidad de conjugar estas características en el diluyente como medio nutritivo para la preservación y viabilidad de los espermatozoides realizando así su factible aplicación en la inseminación artificial como biotécnica que nos permite mejorar la producción ovina entre otras.

Aunque el volumen de un solo eyaculado de carnero es suficiente para la inseminación de más de una hembra el empleo de diluyentes apropiados ha permitido la exploración al máximo de las posibilidades favorables de la inseminación artificial como un medio reproductivo exitoso en la producción animal.

El semen se diluye para permitir la inseminación de muchas hembras, para transmitir características genéticas de los mejores sementales como medio para mejorar nuestros hatos y para conservar su capacidad fecundante a lo largo de todas las fases de procedimiento que es preciso atravesar, antes de que este en condiciones adecuadas para su introducción en el aparato genital de una hembra en celo natural o inducido por métodos de sincronización.

Durante el proceso de congelación del semen y su descongelación se pueden lesionar los espermatozoides si estos procedimientos no se llevan a cabo de una forma adecuada, es por eso que se debe tener sumo cuidado en el manejo de los diluyentes y sus aditivos crioprotectores.

Mediante el estudio comparativo de dos diluyentes, Tris y Agua de coco y la evaluación espermática post-descongelación que se realizó en este trabajo se determina cual de los medios nutritivos utilizados como medio de dilución es el más adecuado para la supervivencia, conservación y viabilidad de los espermatozoides de la especie ovina.

No hay duda de que el descubrimiento efectuado en 1939, por Philips del valor de la yema de huevo de gallina como medio de dilución, ha desempeñado un papel trascendental en el rápido desarrollo que la inseminación artificial ha mostrado en todo el mundo, en los últimos años (Salisbury, 1964).

1.1 HIPOTESIS

- H_0 .- No existen diferencias en la recuperación espermática post-descongelación de los espermatozoides en su motilidad masal y progresiva con la utilización de los tratamientos: Agua de Coco y TRIS (hidroximetil amino metano) como diluyentes para el semen ovino.
- H_1 .- Existen diferencias en la evaluación post-descongelación de los espermatozoides en su motilidad masal y progresiva con la utilización de los tratamientos: Agua de coco y el TRIS (hidroxmetil amino metano) como diluyentes para el semen ovino en base a la diferencia que existe entre estos.

1.2 OBJETIVOS

- Realizar la comparación de dos diluyentes TRIS (hidroximetil amino metano) y Agua de coco mediante la evaluación post-descongelación y la recuperación espermática para el procesamiento de semen ovino.
- Identificar el diluyente que se adapte a las características propias del semen de ovino para su procesamiento y utilización en la biotécnica de la inseminación artificial mediante su evaluación post-congelación.

II REVICION DE LITERATURA

2.1 Selección del semental

Herman (1965) menciona que la selección es un método zootécnico que utiliza a la herencia para lograr el perfeccionamiento de los rebaños de razas puras, mejorando las cualidades de los animales y rectificando defectos de los antecesores.



Figura 1. Semental de la raza Dorper. <http://www.nzsheep.co.nz/dorper/>

Padilla (1997) señala que el principio de un programa de inseminación artificial en ovinos es mejorar las características de producción, lo cual depende en gran medida del semental a utilizar. Una estimación de su propio valor genético depende de su producción así como del valor de su progenie. Existen otros criterios a considerar en la selección de sementales, como pueden ser salud y condición corporal. Los órganos reproductores deben ser examinados con particular atención al tamaño, forma y textura testicular, así como el prepucio, pene y uretra no presenten alteraciones.

Evans y Maxwell (1990) mencionan que en la selección del semental se deben examinar los órganos reproductores poniendo especial atención en el tamaño y forma de los testículos y epidídimos, órganos que pueden ser palpados a través del escroto. Los testículos deben ser firmes y elásticos, carentes de lesiones o deformidades y moverse libremente dentro del saco escrotal, también inspeccionar anomalías en prepucio, pene y conducto eyaculatorio.

Ferreira y Pérez (2001) establecen que los machos ovinos son animales precoces que a los cuatro meses de edad pueden entrar en pubertad, alcanzando la madurez sexual entre seis y siete meses después del nacimiento. Aunque sexualmente maduros ellos tienen producción de semen inferior a la de los animales adultos, solamente son considerados animales adultos cuando alcancen el peso, el desenvolvimiento corporal y la producción espermática ideal a la de su raza. Generalmente, esto sucede alrededor de los dos años de edad.

En la selección de un reproductor deben de ser observadas algunas características tales como:

- Testículos simétricos, ovoides, firmes y presentes en la bolsa testicular. Animales con problemas de criptorquidismo, orquitis e hipoplasia deben de ser descartados como reproductores, pues esas alteraciones comprometen la fertilidad.
- El animal debe ser exento de alteraciones penianas o prepuciales.
- Debe presentar buen líbido (interés sexual por la hembra).

- Debe tener integridad testicular (ausencia de miasis, garrapatas, gusaneras, micosis u otras lesiones corporales).
- Debe ser exento de enfermedades.
- No debe presentar hernia umbilical, tetas supranuméricas o tetas bipartidas.
- Presentar aspecto masculino: porte, cuello, voz, líbido, desenvolvimiento testicular y peniano.
- No ser retrognata ni prognata.
- Tener buenos cascos y aplomos.
- Presentar espermograma dentro de los límites de normalidad.

2.2 Características del Semen

2.2.1 Plasma seminal

Evans y Maxwell (1990) se trata de una mezcla de líquidos secretados por las glándulas vesiculares, los epidídimos, conductos deferentes y otras glándulas accesorias. Este plasma tiene tres funciones principales: actúa como vehículo para los espermatozoides, transportándolos desde el sistema reproductor del macho, durante el eyaculado, sirve de activador a los espermatozoides, previamente no móviles, y proporciona un medio rico en nutrientes, tamponado, que colabora en mantener la supervivencia de los espermatozoides después de depositarse estos en el aparato genital de la hembra.

El principal componente del plasma seminal del carnero, es el agua (75%), aunque también aparecen sustancias orgánicas e inorgánicas que sirven de protectores y nutrientes de los espermatozoides.

Helman (1965) señala que el líquido seminal, constituye un fluido normal que los machos eyaculan como producto de las secreciones de los órganos y glándulas que integran su aparato genésico, y que además posee características físicas, químicas y biológicas sumamente peculiares, por tratarse de puntos esenciales de la fisiología de la reproducción.

Bitsh (1975) expresa que el plasma seminal, es el resultado de la secreción de las glándulas anexas, cuya función es primordialmente vehiculizar y tonificar los espermatozoides en el momento de su salida al exterior, por efecto de la eyaculación.

Salisbury y VanDemark (1964) mencionan que el plasma seminal contiene hialurodinasa, de origen testicular aportada probablemente por los espermatozoos e igualmente xantinoxidasa, procedente de las secreciones de vesículas seminales también glucosidasas y acetilcolinesterasa.

Holy (1983) menciona que las glándulas sexuales accesorias producen una secreción típica, plasma seminal, que expulsan durante la eyaculación para diluir el producto seminal de los testículos y de este modo, forman importante fracción del eyaculado.

La fracción líquida del eyaculado (plasma) representa un líquido neutro casi isotónico y contiene una serie de macro y micro elementos, es rica en elementos inorgánicos como son por ejemplo: la fructosa, ácido cítrico, proteínas, etc.

2.2.2 Espermatozoide

Helman (1965) los espermatozoides son elementos fundamentales de la fecundación, que poseen vida y actividad propia, y en este sentido se pueden considerar como las células más completas y diferenciadas que produce el organismo animal.

Evans y Maxwell (1990) mencionan que los espermatozoides son los gametos masculinos que se producen en los tubulos seminíferos de los testículos.

Un espermatozoide es una célula altamente especializada. Cada célula espermática esta formada por dos partes principales: cabeza y cola. La cabeza es plana y ovoide y ocupada, en casi su totalidad, Por el núcleo. Este esta formado por los cromosomas, responsable de portar la información genética paterna.

La cola, semejante a un flagelo, es el órgano locomotor de los espermatozoides. El movimiento de la cola es el responsable de la propulsión de los espermatozoides en los líquidos.

La largura total de los espermatozoides del carnero es de unos 60 micrones ($60\mu\text{m}$). Es relativamente pequeño comparado con el Oocito que tiene un volumen diez y seis mil veces mayor que el del espermatozoide.

En el semen normal el espermatozoide tiene carga eléctrica negativa con lo que se repelen entre sí. Si los espermatozoides pierden su carga negativa tienden a agruparse.

Salisbury y Vandemark (1964) mencionan que el zoospermio normal posee una cabeza, un cuello, una pieza intermedia y una cola. La superficie anterior de la cabeza contiene los ácidos desoxirribonucleicos de los cromosomas y aparece cubierta en sus dos tercios aproximadamente por el acrosoma. Entre la cabeza y la pieza intermedia hay una corta conexión, el cuello que contiene el centríolo proximal, al que se atribuye a veces la función de centro cinético de la actividad espermática.

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

Ferreira y Pérez (2001) mencionan que los espermatozoides son las células responsables por la fecundación de los óvulos liberados por las hembras, dando origen a nuevos seres.

2.3 Extracción y recolección de semen

Bonadonna (1989) el primero que probó el método de la electroeyaculación para obtener el material seminal en carneros y machos cabrios fue, R.M.G. Gunn en Sydney, Australia.

Gunn (1932) inicio sus investigaciones y en el mismo año publicó sus primeras observaciones experimentales. Podemos considerar al proceso de la electroeyaculación como resultado de una serie de contracciones rítmicas de orden expulsivo, que afectan a los diversos segmentos de las vías urogenitales de emisión del semen, desde los epidídimos hasta los conductos deferentes, las ampollas seminales, los conductos eyaculatorios, y la uretra peniana.

De esta manera –demostraron Gunn y otros autores- , las corrientes eléctricas fuertes de 30 voltios, a 160mA, aplicadas en la porción caudal de la región lumbar, son suficientes para contraer la musculatura propia del epidídimo, del conducto deferente y de las glándulas accesorias, y provocar la emisión de material seminal con erección parcial.

Evans y Maxwell (1990) existen dos métodos para recoger el semen, denominados como el de la vagina artificial y el de la estimulación eléctrica; este método tiene el inconveniente de producir malestar en el macho, no se pueden hacer frecuentes colectas de semen y se contamina fácilmente con orina durante la recolección.

Sorensen (1982) menciona que el semen obtenido por electroeyaculación, es de igual calidad al que se colecta con la vagina artificial; así mismo, el procesamiento, almacenamiento y uso posterior, son compatibles.

Pérez (1966) expresa que los métodos de recolección de semen deben reunir las siguientes condiciones:

- Obtención del máximo volumen del eyaculado.
- No debe constituir un peligro para el animal.
- No debe significar riesgo durante su ejecución al operador.
- Obtener el material seminal en estado de absoluta pureza, por lo que se refiere a la contaminación externa.
- El método no debe desencadenar en los sementales reflejos inhibitorios, capaces de alterar el deseo sexual y en consecuencia el rendimiento eyaculatorio.

Ferreira y Pérez (2001) señalan que después de la eyaculación, el material colectado debe ser protegido de la luz solar directa, del polvo, de la agitación y de cambios bruscos de temperatura.

2.4 Evaluación de semen

2.4.1 Volumen

Evans y Maxwell (1990) el volumen no solo varía entre especies sino dentro de la

misma especie. Independientemente de las variaciones individuales existen otros factores como la edad, las condiciones climáticas, el estado nutricional y la frecuencia de las eyaculaciones, además, establece que el volumen promedio por eyaculado es de 1 a 1.5 ml; también menciona que el volumen óptimo para utilizar tanto en inseminación cervical, como intrauterina es de 0.05 a 0.20 ml, para la inseminación vaginal se debe utilizar un volumen mayor.

Bonadonna (1989) menciona que el volumen se expresa en mililitros y generalmente se establece con graduación decimal que se encuentra en los recolectores, de vidrio o no, comúnmente usados. La cantidad de semen varía por el conjunto de factores que pueden actuar sobre la sexualidad masculina: especie, raza, edad, estación del año, etc.

Sorensen (1982) expresa que la eyaculación del carnero es de escaso volumen pero de muy alta concentración 0.8 a 1.2 ml. Y 2 mil a 3 mil millones de espermatozoides por mililitro.

Helman (1965) señala que el volumen de eyaculación es de algo menos de un centímetro cúbico, aunque en casos de excepción puede llegar hasta dos c.c.

Holy (1983) menciona que el volumen del eyaculado disminuye después de extracciones muy frecuentes (agotamiento sexual), y también durante las enfermedades del testículo.

Pérez (1966) establece que la alimentación influye de forma notable en el volumen eyaculatorio, en primavera y cuando los sementales se encuentran sometidos a régimen verde, se obtienen los mayores volúmenes de eyaculación, las copulas reiteradas a intervalos demasiado cortos, disminuye el volumen colectado de esperma y por el contrario, la excitación sexual acentuada les aumenta, de aquí la conveniencia de mantener al semental a excitación sexual ante la presencia de las hembras en celo aumentando de este modo el volumen del eyaculado.

2.4.2 Apariencia

Bonadonna (1989) menciona que el aspecto del material seminal puede adquirir un notable significado indicativo. En general, el material rico en espermatozoides móviles tiene un aspecto relativamente homogéneo. En cambio si los espermatozoides son poco móviles, el aspecto se vuelve más granuloso.

Helman (1965) señala que el semen del ovino se presenta a la vista con un aspecto cremoso y mucho más denso que el de bovino.

Evans y Maxwell (1990) mencionan que el semen de carnero normalmente es de color blanco lechoso o crema pálido, la presencia de sangre dará al semen una coloración rosácea, si hay presencia de orina, existirá un olor característico además de que la coloración será menos intensa.

2.4.3 Motilidad de los espermatozoides

Derivaux (1976) señala que los espermatozoides se desplazan gracias a los movimientos de la cola al mismo tiempo que experimentan un movimiento de rotación alrededor de su eje longitudinal, de tal forma que, su progresión es rectilínea.

Cancellón (1981) menciona que el porcentaje de espermatozoides dotados de motilidad pueden determinarse empleando un microscopio con portaobjetos calentado y la platina a 37°C. La motilidad se registra a base de porcentaje a intervalos de 10, de 0 a 100.

Raras veces se observa un porcentaje superior a 80 %, pero alguna que otra vez una muestra puede presentar solamente espermatozoides dotados de motilidad.

Sorensen (1982) menciona que la motilidad se expresa como el porcentaje de células móviles o vivas, dichas células pueden deslizarse en cualquier dirección y no importa la velocidad con que lo hagan.

Mellado (1999) señala que la motilidad es una apariencia visual del porcentaje de células espermáticas que presentan movimiento, independientemente de la velocidad y dirección de los espermatozoides. La motilidad de los espermatozoides puedes expresarse también, como tasa de movimiento progresivo. En este caso solo se consideran aquellos

espermatozoides que avanzan hacia adelante y la velocidad de su desplazamiento.

Ferreira y Pérez (2001) mencionan que la motilidad se evalúa en el microscopio, presenta dos tipos: motilidad masal y motilidad individual progresiva. La motilidad masal es el movimiento de más de los espermatozoides en el plasma seminal. Es semejante a las olas del mar y puede recibir una evaluación de 0 (sin movimiento) a 5 (movimientos muy fuertes), siendo utilizadas muestras con valores mayores que 3. La motilidad individual progresiva (MIP) es el movimiento individual en flecha de cada espermatozoide. También varía de 0 a 5 y deben ser utilizadas las muestras con valores mayores que 3.

Agraz (1989) la estimación de la motilidad es subjetiva y se necesita hacer una observación minuciosa en infinidad de muestras con objeto de afinar esta apreciación.

2.4.4 Concentración

Evans y Maxwell (1990) mencionan que la concentración es el número de espermatozoides por unidad de volumen normalmente expresado en mililitros, es muy importante ya que la relación de dilución depende de ella. El semen de carnero de buena calidad contiene 3.5 a 6.0 mil millones ($3.5 - 6.0 \times 10^9$ de espermatozoides por ml).

Holy (1983) expresa que la concentración del semen expresa el contenido de nemaspermos en una unidad de volumen y su apreciación tiene gran significado no solo para la clasificación sino para la dilución de semen.

Sorensen (1982) es necesario determinar el número de espermatozoides por unidad de volumen, ya que estos, multiplicados por el volumen, permiten conocer el número total de espermatozoides por eyaculado. La concentración óptima del semen de carnero por inseminación y cifra más aceptada es 50×10^6 células vivas.

Merck (1993) menciona que el número de espermatozoides motiles y el volumen a inseminar para la oveja depende del sitio de inseminación. Para la inseminación vaginal se usan 0.3 a 0.5 ml con 300 millones o más de espermatozoides motiles; para inseminación cervical, 0.05 a 0.2 ml con 180 millones para semen congelado; la inseminación intrauterina por laparoscopia necesita 0.05 a 0.1 ml por cuerno uterino y un total de 20 millones de espermatozoides motiles.

Helman (1965) menciona que la concentración normal de espermatozoides en el semen ovino, varía entre 2.500.000 y 3.000.000 por milímetro cúbico, aunque a veces llega hasta 5.000.000 y 6.000.000. La cantidad total en una eyaculación es de unos 2.000.000.000 aunque puede superar los 4.000.000.000.

2.4.5 Morfología

Holy (1983) menciona que la estructura morfológica de un nemaspermo es una característica vital y su evaluación crítica indican de modo extraordinario la capacidad de fecundación del nemaspermo y por último la calidad total del semen al evaluar morfológicamente un eyaculado es necesario tener en cuenta que cada eyaculado contiene un número extraordinario de nemaspermos y que también entre éstos, algunos se encuentran anormales y cuando pasan del 5 al 10% pueden considerarse como desperdicio fisiológico.

Helman (1965) establece que se debe tener presente que siempre se puede observar formas anormales, pero su proporción no debe pasar del 15%, pues si superan el 20 a 25%, la fertilidad está afectada.

Sorensen (1982) menciona que existen dos formas de anormalidades en los espermatozoides:

Anormalidades primarias: estas son de origen testicular. Según se piensa, ocurrió durante el proceso espermatogénico y ésta no se corrigió mientras el espermatozoide pasaba por el sistema de conductos. Estas anormalidades ocurren en la cabeza, segmento intermedio y cola.

Anormalidades secundarias: las anormalidades secundarias aparecen durante el paso de los espermatozoides por el sistema de conductos, después de

salir de los tubulos seminíferos y el testículo en sí. Conviene hacer hincapié en que estas anormalidades son de índole degradativa.

- Cabezas desprendidas.
- Gota citoplasmática en cuello o la cola.
- Cola en gancho.
- Cápsula desprendida de la cabeza.

Evans y Maxwell (1990) expresan que el examen morfológico del semen es una prueba de control de calidad. Cada eyaculado contiene una serie de espermatozoides anormales, pero si la proporción de éstos es muy alta entonces nos encontraremos ante un semen de baja fertilidad.

Valencia y col. (1986) señala que para observar la cantidad de espermatozoides vivos y anormalidades, generalmente, el semen se mezcla con colorantes y se realiza un frotis.

2.5 Principios de conservación del espermatozoide

2.5.1 Temperatura

Evans y Maxwell (1990) la temperatura del semen en el momento de la eyaculación, es próximo a la del cuerpo 37°C.

Holy (1983) manifiesta que la velocidad de los nemaspermos dependen del medio ambiente y sobre todo de la temperatura de él, el movimiento óptimo de los nemaspermos se encuentra alrededor de 41 a 42°C brevemente es posible decir que las temperaturas del cuerpo o un poco mas aumentadas estimulan el metabolismo al máximo, provocando un brusco agotamiento y la muerte de los nemaspermos. Desde un punto de vista práctico se recomienda evitar todas las variaciones bruscas de temperaturas, evitando especialmente las diluciones por debajo de 18°C, por lo cual significa que hace falta proteger los eyaculados y trabajar con el semen bajo una temperatura constante y conveniente.

Derivaux (1976) señala que el examen del esperma debe ser practicado lo más inmediatamente posible después de la recolección, a una temperatura próxima a la corporal, y es aconsejable, con el fin de evitar el choque térmico perjudicial a los espermatozoides.

Yeates (1967) establece que a 5-10°C, que es la temperatura a la que se acostumbra a conservar por poco tiempo las muestras de semen, queda aún una cantidad apreciable de fructosa seminal al cabo de 2-4 días. A 30-37 °C, por el contrario, desaparece totalmente la fructosa del medio en solo unas pocas horas.

2.5.2 Nutrientes (Fuentes de Energía)

Holy (1983) menciona que la fructosa que es típica en el semen, representa la fuente, aunque no única de energía de los nemaspermos y se produce generalmente en las vesículas seminales, donde se transforma de la glucosa

sanguínea. La cantidad de fructosa que se consume en condiciones anaerobias está en correlación positiva con la concentración y vitalidad de los nemaspermios. Estas relaciones son tan estrechas que el consumo de fructosa caracteriza la intensidad de la motilidad o vitalidad de los nemaspermios.

Evans y Maxwell (1990) señalan que la fructosa es el azúcar más fácilmente metabolizable y proporciona la mayor fuente de energía a los espermatozoides del semen, cuando los azúcares son metabolizados por los espermatozoides.

Derivaux (1976) señala que la adición de glucosa o fructosa a un medio de dilución, parece constituir un elemento que favorece a los zoospermios. Parece, sin embargo, que estos azúcares intervendrían más por su acción física al mantener una presión osmótica y un balance electrolítico conveniente para el medio, que por la energía metabólica que pudiesen proporcionar a los espermatozoides.

Bitsh (1975) las células espermáticas, inmediatamente después de ser eyaculadas, desarrollan una gran actividad, para lo que utilizan como combustible la energía liberada a partir de los hidratos de carbono, que, como la fructosa, se encuentran almacenados en sus cabezas.

Yeates (1967) menciona que la función de la fructosa consiste en suministrar a los espermatozoos una fuente de energía rápidamente utilizable

para la motilidad, lo que se logra a través de un ciclo glicolítico cuyo producto final es el ácido láctico.

2.5.3 Presión osmótica

Salisbury y VanDemark (1964) la presión osmótica es aquella presión que debe ejercer una solución para mantenerse en equilibrio con agua pura, cuando esta solución y el agua están separadas por una membrana semipermeable que permite el paso del agua, pero no de los solutos; esta presión viene expresada en atmósferas. La presión osmótica que un fluido ejerce depende de su concentración en partículas, es decir, en iones, en moléculas pequeñas no electrolíticas y en micelas coloidales.

Evans y Maxwell (1990) al contrario que otros fluidos, la presión osmótica del semen se mantiene más por los componentes orgánicos que por los iones inorgánicos, aunque existen grandes cantidades considerables de sodio, potasio, y cloro. Las principales sustancias orgánicas presente en el semen de carnero son fructosa, sorbitol, inositol, ácido cítrico, glicerolfosforilcolina, fosfolípidos, prostanglandinas y proteínas.

Holy (1983) menciona que cualquier desviación de la presión osmótica, tanto en el plasma seminal como en los diluyentes deprime el metabolismo. Las variaciones osmóticas provocan en los nemaspermos cambios de forma, especialmente a nivel de cola.

2.5.4 Capacidad tampón y pH

Salisbury y VanDemark (1964) mencionan que el poder tampón es la capacidad química que posee un fluido y le permite absorber ácidos o álcalis, con un cambio mínimo de su pH.

Evans y Maxwell (1990) señala que el plasma seminal tamponado protege a los espermatozoides de los cambios bruscos de pH que deteriorarían la supervivencia de las células espermáticas. Los diluyentes de semen, más recomendados, contienen tampones; esto es, sustancias capaces de mantener el medio cercano al pH óptimo de los espermatozoides.

Holy (1983) menciona que los tampones más poderosos en el semen son los carbonatos y citratos que neutralizan sobre todo el ácido láctico, además de las proteínas anfóteras que se encuentran en el plasma seminal.

Bonadonna (1989) señala que en todo caso, la modificación del pH tiene gran significado respecto de las manifestaciones vitales, metabólicas y cinéticas, así como respecto de la fertilidad del semen, ya sea que las variaciones reactivas se produzcan en el medio ambiente, o que ya estén predeterminadas en los genitales masculinos, por conjunto patológico y funcional.

2.6 Procesamiento del semen

2.6.1 Diluyentes del semen

Agraz (1989) en cuanto al grado de dilución recomendable no pueden darse normas generales, esto dependerá de la calidad del semen obtenido.

Evans y Maxwell (1990) los diluyentes apropiados proporcionan a los espermatozoides nutrientes, sistema amortiguador a los cambios de pH y un ambiente isotónico. Además, protegen a los espermatozoides del shock del frío cuando se enfrían y conservan así o contra las injurias de la congelación cuando se congela el semen.

Ferreira y Pérez (2001) mencionan que un buen diluyente no debe ser tóxico para los espermatozoides, tener pH y presión osmótica compatibles con la sobrevivencia espermática; ser de bajo costo y de fácil preparación.

Salisbury y Vandemark (1964) señalan que un diluyente debe cumplir los siguientes requisitos:

- Poseer una presión osmótica y ser capaz de conservarla durante el almacenamiento.
- Proporcionar un equilibrio adecuado de elementos minerales, esenciales y para la vida de las células espermáticas.
- Aportar los nutrientes que precisan los zoospermios, para su metabolismo aerobio y anaerobio.
- Suministrar lipoproteínas y/o lecitinas que protejan a los zoospermios del choque a frígore.

- Proveer de sustancias químicas que tengan poder tampón sobre los productos finales del metabolismo cito espermático.
- Estar libres de sustancias, productos bacterianos o gérmenes infecciosos que sean nocivos para los zoospermios, el aparato genital femenino, el proceso de la fecundación y la implantación y desarrollo del huevo fecundado.

Bonadonna (1986) expresa que en términos científicos y prácticos, se pueden definir mejor los fines de la dilución, que la posibilidad de crear las condiciones de equilibrio osmótico y fisiológico adecuadas: lograr el óptimo de supervivencia de los espermatozoides "*In Vitro*", asegurar una prolongada capacidad de fecundación o un número elevado de espermatozoides presentes; mantener integras las estructuras morfológicas y en particular las protoplasmáticas de superficie que envuelve el espermatozoide, sobre todo su proporción apical.

2.6.2 TRIS (hidroximetil amino metano)

Bonadonna (1986) el empleo de buffer Tris parece representar un nuevo cambio en la preparación de los diluyentes, y su futuro parece prometedor, si no revolucionario. El Tris es una abreviatura del compuesto orgánico cristalino 2-amino 2-hidroximetil-1,3 propanodiol. El Tris es soluble en agua y en los alcoholes, y tiene reacción alcalina.

Merk (1993) menciona que como extensores se usan medios a base de Tris o lactosa, ligeramente hipertónicos. Además que el uso de semen descongelado puede resultar en un índice de pariciones mayor del 50%.

Amoah (2001) señala que el uso de Tris, del ácido láctico, de la fructosa, de la yema de huevo, y del suplemento del glicerol ha permitido a la esperma del macho cabrio y morueco ser almacenado con éxito por varios años antes de ser utilizado en la inseminación cervical o laparoscopia.

2.6.3 Agua de coco

Ferreira y Pérez (2001) Entre las alternativas de los diluyentes pobres en fosfolípidos debe ser considerado el agua de coco, el cual mostró un excelente comportamiento del semen tanto *In Vitro* como, en la fertilidad. La motilidad y el porcentaje de espermatozoides vivos a 4°C, son significativamente superiores en el semen diluido en el agua de coco, en relación al diluyente leche.

Freitas (1992) demostraron un buen desempeño del agua de coco como diluyente del semen ovino. La congelación *In Vitro* del semen ovino, mostró después del congelamiento, una posibilidad de mayor supervivencia de los espermatozoides por largos periodos de conservación.

Sorensen (1982) menciona que existen diluyentes a base de agua de coco, desarrollados para el almacenamiento sin refrigeración. Malberg e Israelsson utilizaron un diluyente compuesto (CEW, del ingles Cocount Water Extender) y

obtuvieron mejores tasa de concepción con el semen almacenado de 1 a 4 días a una temperatura de 15 a 25°C.

Bonadonna (1986) señala que en 1959, Ch. Normann y col. Publicaron los primeros resultados interesantes acerca de la supervivencia de los espermatozoides bovinos diluidos (1:1 en volumen), con este diluyente (CME, cocount milk extender), utilizando una mezcla de Agua de Coco hervido, con 4.32 % de Citrato de Sodio o con el agregado de 100mg % de CO₂Ca.

Derivaux (1976) señala que un medio a base de leche de coco más yema de huevo, asegura una mayor supervivencia a 2-3°C que el medio de citrato-yema de huevo.

Ferreira y Pérez (2001) mencionan resultados superiores para el Agua de coco como diluyente, en relación con leche, fueron encontrados en las evaluaciones de porcentaje de espermatozoides móviles y la motilidad progresiva del semen ovino incubado a 15°C, durante 24 horas.

2.6.4 Antibióticos

Salisbury y VanDemark (1964) mencionan que en medios de gran densidad microbiana, la estreptomicina es eficaz contra el *Vibrio fetus*, pero no lo son la penicilina ni la sulfanilamida. En cambio, a las concentraciones que se encuentran en el semen diluido infectado, tanto la estreptomicina como la penicilina destruyen los microorganismos; Almquist y col. Fueron los primeros en informar acerca de

los efectos de la adición de antibióticos al diluyente sobre la vitalidad y la capacidad fecundante del esperma.

Bonadonna (1986) menciona que la finalidad fundamental en el agregado de antimicrobianos al semen es la de disponer de material seminal libre de gérmenes, de patógenos específicos o comunes, cuya presencia impide o por lo menos limita la supervivencia “*In Vitro*” de los espermatozoides; Saacke (1966) mencionado por Bonadonna, 1986. Demuestra que la acción de la penicilina y de la estreptomicina agregadas al semen para su conservación “*in Vitro*” es, en todo caso, ventajosa para la fecundidad, por cuanto inhibe el desarrollo de la flora contaminante y por lo tanto la mas dañina.

Derivaux (1976) señala que a pesar de todas las precauciones higiénicas tomadas durante la recolección y las manipulaciones que acompañan a la adición, las muestras espermáticas contienen siempre un tanto por ciento viable de gérmenes contaminantes capaces de tener una participación desfavorable, bien sobre la conservación del esperma o bien sobre la fertilidad.

La estreptomicina aparece como el antibiótico más activo frente al *Vibrio fetus*, ya se utilice separadamente o asociada con la penicilina.

Sorensen (1982) señala que los agentes antibacterianos tienen una doble función: destruir los organismos patógenos y reducir el metabolismo de los espermatozoides. Como resultado de tantos experimentos, se aceptó que los agentes estándar fueran la penicilina y la estreptomicina. En la mayoría de los

casos, una combinación de ambas previene eficazmente el desarrollo de las bacterias.

2.6.5 Efecto biológico de la yema de huevo

Ferreira y Pérez (2001) mencionan que la yema de huevo, por ser rica en fosfolípidos, protege los espermatozoides del choque térmico en temperatura arriba de 0°C, (Mies Filho, 1982). Se justifica, por lo tanto, la adición de una pequeña proporción de yema de huevo al agua de coco, que podrá habilitar y simplificar la inseminación artificial.

Salisbury y VanDemak (1964) mencionan que los medios más eficaces para proteger los espermatozoides frente a los efectos del enfriamiento es que dispongan de lecitina, proteínas, lipoproteínas y complejos similares que se encuentran en la yema de huevo y en la leche. Cuando se descubrieron los valores de la yema de huevo se presento un diluyente conservador que reunía las ventajas de disminuir la actividad metabólica de los espermatozoides y prolongar su fertilidad conservándolos aproximadamente a 5°C.

Derivaux (1976) señala que la yema de huevo parece tener un papel protector y conservador de los espermatozoides asegurando así una supervivencia más prolongada, esta acción protectora y conservadora esta ligada a los compuestos lípido-proteicos y lípidicos del huevo. La yema contiene igualmente glucosa que puede ser metabolizada por los espermatozoides, y posee cierto grado de viscosidad que puede beneficiar a las células espermáticas.

Las variaciones en la composición de la yema de huevo puede alterar la naturaleza del diluyente y ser responsables de la aglutinación de los espermatozoides; esto ocurre especialmente en el caso de utilizar huevos que provienen de gallinas que recibieron una alimentación deficiente en caroteno.

Pérez (1966) señala que la yema de huevo, esta integrada por sucesivos estratos de sustancias de color blanco y amarillo alternadamente, de modo que al alterar las capas intensamente amarillentas con las pálidas, la pigmentación final dependerá del dominio o extensión de los estratos respectivos. Esta circunstancia es particularmente interesante pensando que los estratos de mayor pigmentación amarilla son así mismo, los mas ricos en carotenoides, sustancias directamente relacionadas con el efecto protector de la yema de huevo sobre los espermatozoides.

2.6.6 Glicerolización

Sorensen (1982) señala que la incorporación de glicerol a los diluyentes, mejora las tasas de concepción. Si la esperma se congela en ausencia de un anticongelante, las células se lisan y mueren, ya que las formaciones cristalinas del hielo son como agujas que punzan al espermatozoide. El anticongelante más común es el glicerol, cuya concentración, en el semen diluido, varía de 6 a 12%.

Derivaux (1976) menciona que el mecanismo protector de la glicerina se basa, sin duda, en varias circunstancias: la glicerina suprime la fase peligrosa durante la cual los espermatozoides se encuentran en presencia de solución

salina demasiado concentrada; reduce el choque osmótico disminuyendo la concentración salina e impidiendo la salida del agua celular; dificulta la formación de hielo intracelular.

Ferreira y Pérez (2001) señalan que la adición de agentes crioprotectores como el glicerol es fundamental en la protección de células espermáticas contra los choques térmicos en fase de estabilización a 4°C.

Pérez (1966) menciona que hay que tener en cuenta que la adición de glicerina al semen plantea un problema delicado, ya que dicha sustancia es francamente tóxica para los espermatozoides cuando se administra a mayores concentraciones que la indicada.

2.6.7 Equilibración

Sorensen (1982) expresa que una vez que se mezclaron el semen y el diluyente, es necesario permitir que una vez diluido se estabilice, de modo que los espermatozoides estén bien protegidos en el momento de congelar, este periodo varía desde 2 a 6 horas.

Helman (1965) establece que el semen recogido a una temperatura de 25 a 30°C, debe ser descendido a 20°C en una media hora; luego el descenso debe ser más lento, de manera que cada dos horas disminuya alrededor de 5 grados, hasta llegar a los 2 a 3°C.

Pérez (1966) El tiempo de Equilibrio tiene como finalidad que la glicerina se ponga en perfecto contacto con los espermatozoides y que en ellos se verifiquen los reajustes biológicos más adecuados en función de lo cual los espermatozoides adquieren capacidad de resistencia a la congelación.

Deka y Rao (2003) probaron tiempos de estabilización en 20 eyaculados de sementales cabrios, los tiempos fueron 1, 3 y 5 horas, el semen fue diluido en Tris-yema-fructosa-ácido cítrico, con la presencia de glicerol al 6.4 %, se congelaron las pajuelas sometidas a vapores de nitrógeno líquido a 5 cm. Sobre el nivel. Los resultados observados sugieren que el periodo de estabilización de tres horas fue el más apropiado para la penetración del glicerol en la célula, como consecuencia menor índice de daños al espermatozoide y mayor recuperación espermática.

Herman (1993) señala que el periodo de Equilibración (normalmente 4 a 6 horas) protege a la membrana de las células espermáticas durante el proceso de congelación y deshielo manteniendo la viabilidad de los espermatozoides.

2.6.8 Envasado

Mellado (1999) el proceso del envasado del semen se lleva acabo en un cuarto frío o en una cámara de procesamiento de semen, a 5°C. Por lo anterior, todo el material que entra en contacto con el semen tiene la misma temperatura que éste.

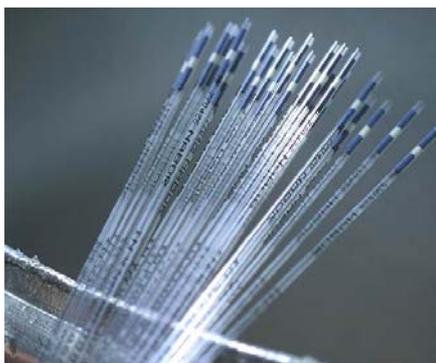


Figura 2. Pajilla con registro impreso. <http://www.koepon.com/espanol/alta/>

Ferreira y Pérez (2001) menciona que el procedimiento es simple, se asegura la pajilla por la parte superior (extremidad cerrada), colocando la opuesta en el semen diluido y llenarla por aspiración. En seguida se golpea suavemente en la punta con el objeto de que quede una pequeña parte sin semen en la extremidad, para poder taparla posteriormente con polvo de alcohol polivinílico.

2.6.9 Congelamiento y almacenamiento

Una vez que se ha envasado el semen se procede a congelar las pajillas en vapor de nitrógeno a -80°C durante 9 minutos y posteriormente se introducen en nitrógeno líquido a una temperatura aproximadamente de -196°C , es entonces cuando el metabolismo de los espermatozoides se detiene y hace que estos se puedan conservar durante mucho tiempo teniendo así la disponibilidad de semen de buena calidad genética de un semental en particular. El semen congelado facilita su transporte y su utilización en cualquier lugar y época del año.

Brackett (1988) menciona que los estudios realizados sobre congelación del semen de toro dieron como resultado el descubrimiento de cómo conservar

las células de los mamíferos congelándolas con un agente crioprotector, como la glicerina. La congelación es operación esencial que permite utilizar prácticamente en cualquier lugar y tiempo el semen recogido en diversos puntos y momentos.

La congelación del semen destruye hasta la mitad de las células espermáticas. Por consiguiente, deben asignarse más espermatozoides por dosis fecundante, si se quiere disponer de células sobrevivientes bastantes para proporcionar una buena fertilidad.

Gall (1977) señala que la congelación en nitrógeno líquido resulta una reanimación de 63% y fertilización de 70%.

Evans y Maxwell (1990) menciona que cuando se almacene semen congelado es importante que las pajuelas se mantengan en nitrógeno líquido por encima de su nivel en todo momento, a excepción de cuando se tenga que manejar una dosis.

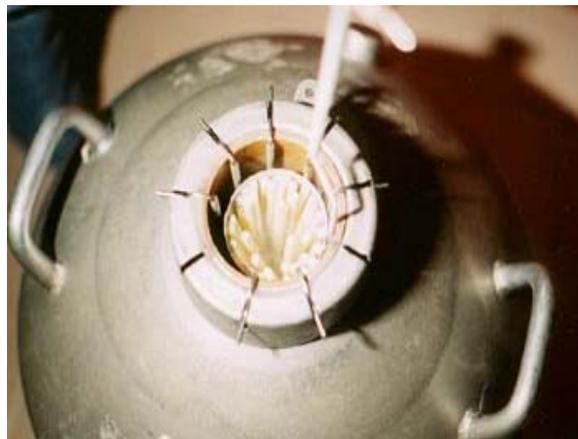


Figura 2. Almacenamiento de Pajillas. <http://www.equine-reproduction.com/articles/images/tank.jpg>

2.6.10 Evaluación post-descongelación

Padilla (1997) menciona que las pruebas de calidad de semen después de descongelar son el principio de predicción de su posible fertilidad. Se han establecido varias pruebas prácticas para predecir dicha fertilidad como pueden ser: motilidad, viabilidad, cambios ultra estructurales y bioquímicas del espermatozoide. Sin embargo, la prueba de rutina sigue siendo la motilidad recuperada, la cual se recomienda sea no menos de 40 por ciento de espermatozoides motiles.

Ferreira y Pérez (2001) establecen que después de la congelación, se retiran del tanque con nitrógeno, muestras aleatorias de pajillas para descongelarlas. Las pajillas son sumergidas en “baño Maria” a una temperatura de 37°C, durante 30 segundos. Las muestras descongeladas son evaluadas nuevamente de acuerdo con su motilidad individual progresiva, el porcentaje de espermatozoides vivos.

Derivaux (1976) en el momento del empleo para su evaluación, el semen debe ser calentado: este calentamiento debe realizarse lo más rápidamente posible y el método habitual consiste en introducir la pajuela en agua a 38-40°C. La descongelación se consigue en 30 segundos.

III MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Localización

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de producción animal y en los establecimientos de la unidad ovina de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. En Buenavista, al sur de la ciudad de Saltillo, Coahuila, la cual se ubica aproximadamente a 8 km. Al sur de la ciudad de Saltillo, en las coordenadas terrestres 25°22' 44" latitud norte y 101° 00' 00" longitud oeste, a una altura de 1743 msnm, con una temperatura media anual de 17.9°C y una precipitación media anual de 303.9mm.

3.2 Ovinos utilizados

Para realizar este trabajo de investigación se utilizaron 4 ovinos de la raza Dorper con una edad promedio de 1.5 a 2 años, estos animales fueron utilizados en base a su condición corporal, calidad espermática y su viabilidad de semen para el experimento. El trabajo tuvo una duración del 11 de septiembre al 12 de diciembre del año 2006. En el cual se realizaron 4 muestreos de semen para su procesamiento, almacenamiento, envasado, descongelación y evaluación.

3.3 Obtención de la muestra

La obtención de la muestra de semen (eyaculado) se realizó por estímulo eléctrico a través de la técnica de la electroeyaculación. Utilizando un Electroeyaculador de corriente alterna que va conectado a una batería que transmite corriente eléctrica la cual estimula los diversos segmentos de las vías urogenitales del semental. El ovino se inmovilizo en una jaula el lugar donde se realizó la extracción debe estar limpio.

Se cortaron los pelos y el vellón largo que rodee la vaina del prepucio, se limpió correctamente. El electroeyaculador se lubricó y se insertó en el recto a una profundidad de 15 centímetros, procurando no lastimar la mucosa y paredes.

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

Para la recepción del eyaculado se utilizó un colector el cual estaba provisto de un embudo colector de hule látex, que lleva conectado un tubo de ensaye graduado y protegido para evitar la luz y temperaturas que dañen a los espermatozoides con un aislante térmico. Una vez obtenida la muestra se procedió a realizar la evaluación al microscopio en los próximos 10 minutos.

Cabe mencionar que todo el material utilizado para la colección del semen estaba previamente limpio y esterilizado.

3.4 Evaluación de la muestra

Sorensen (1982) Se evalúa el semen para determinar la utilidad del eyaculado en particular. También se emplea la evaluación para anticipar el valor de un semental como pío de cría, bajo condiciones de pastoreo, monta controlada o inseminación artificial.

Después de recogido el semen y antes de usarlo se determinó, la calidad y cantidad del eyaculado. Teniendo mucho cuidado de no exponer a los espermatozoides a factores que afecten su viabilidad. Estos factores pueden ser: cambios bruscos de temperatura, exposición prolongada a la luz solar, material de vidrio o plástico sucios, agitación brusca, ect.

Para determinar la cantidad óptima del semen y su procesamiento se incluyeron varios parámetros a considerar como:

- Apariencia: Se utilizó solo semen de aspecto cremoso y de color blanquecino, despreciando el semen con coloraciones rojizas ya que son indicativos de presencia de sangre o pus.
- Volumen: Se utilizaron muestra con volúmenes superiores a 1 ml.
- Motilidad: se aceptó semen con 50 por ciento de movimiento masal como mínimo.
- Concertación: se utilizó una densidad aproximada de 600 millones de espermatozoides por ml.

Estos parámetros son los que tienen mayor influencia en la calidad del semen, para poder realizar su procesamiento.

Apariencia

Se determinó cuando en el tubo colector se observa un eyaculado que varía de lechoso a cremoso, muy denso, rico en espermatozoides y de color blanquecino, despreciando semen acuoso y contaminado, este examen visual nos da una idea inmediata sobre la calidad del semen.

Volumen

El volumen del eyaculado se midió directamente desde el tubo colector graduado, la cantidad varió entre individuos así que se obtuvo un promedio de 1.25 ml.

Motilidad

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

Movimiento masal.- se colocó una gota de semen sobre un portaobjetos limpio, seco y templado a 37 °C, se cubre y se observa la onda de movimiento con el objetivo de 40x. La estimación de la motilidad de los espermatozoides se hace

sobre la base de vigor o potencia de la onda según si está o no presente dicho movimiento.

Movimiento Individual Progresivo (MIP).- se depositó una gota de semen diluida con citrato de sodio al 2.9% sobre un portaobjetos limpio, templado a 37°C y se colocó un cubreobjetos. Se observó en el objetivo 10x y se debe visualizar y valorar el porcentaje de espermatozoides que se mueven hacia delante con intensidad.

Concentración

Se determinó por medio de un hemocitometro o cámara de Spencer y una micro pipeta utilizando una dilución de 1:400.

3.5 Preparación de los diluyentes

Después de la etapa de evaluación, considerando tener la muestra de semen de buena calidad, se pasó a la fase de dilución, la cual tubo una concentración final para cada dosis, de aproximadamente 200 millones de espermatozoides por 0.5 mililitros, el cual es volumen de la pajilla francesa.

Al principio de la preparación de los diluyentes se hizo en un medio aséptico; así como el material a utilizarse estaba previamente esterilizado.

3.6 Preparación del TRIS (hidroximetilo amino metano)

La preparación del diluyente TRIS consistió en agregar 3.3190 gramos de el componente TRIS además 1.8210 gr. De ácido cítrico y 1.000gr de fructosa en 100 ml de agua bidestilada, de esta solución se tomo un 80% y se adiciono un 20% de yema de huevo a esta solución totalmente desprovista de la clara de huevo ya que los componentes de ésta resultan tóxicos para los espermatozoides, la forma más sencilla se logró separando la clara fuera de la mitad del cascarón y poniendo la yema sola sobre un papel filtro esterilizado doblando por la mitad y se deja escurrir la yema por la ranura del dobles hasta un recipiente, se mezcla perfectamente con la solución del TRIS y posteriormente se agregan los antibióticos; penicilina 1000 UI y estreptomycinina 1000 mg. Ya mezclados perfectamente todo se divide en dos fracciones A y B y a la fracción B se le añade un 5 % de glicerol.

Cuadro 1. Componentes y proporciones utilizadas en el diluyente TRIS

COMPONENTE	
	3.319 gr
Ácido cítrico	1.821 gr
Fructosa	1.000 gr
Penicilina	1000 UI
Estreptomycinina	1000 mg

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

Fracción A:	buffer de TRIS-ácido cítrico	80%
	Yema de huevo	20%
Fracción B:	buffer de Tris-ácido cítrico	80%
	Yema de huevo	20%
	Glicerol	5%

La yema de huevo debe ser de huevos frescos con menos de 24 horas y sin residuos de albúmina y membrana.

Una vez preparadas ambas fracciones del diluyente se mantiene la fracción A a 35°C; mientras que la fracción B se mantendría a una temperatura de +5°C.

3.7 Preparación del diluyente Agua de Coco

Después de la colecta, el semen se evalúa y enseguida se lava el material espermático con 50 ml de agua de coco natural y filtrada, con osmolaridad y pH corregidos, 25 ml de citrato de sodio a 5 % y 25 ml de agua destilada (**solución A**), en proporción de un volumen de semen por nueve de la solución, procesándose la centrifugación del material durante 20 minutos, a una velocidad de 550 rotaciones por minuto. Después de la centrifugación, se pipeta el sobrenadante añadiendo un nuevo volumen de la solución de agua de coco, en la misma proporción y se efectúa la segunda lavada, pipetando nuevamente el sobrenadante.

Cuadro 2. Componentes y proporciones utilizadas en el diluyente Agua de Coco.

COMPONENTE	PROPORCIÓN
Agua de coco	50 ml.
Glicerol	7%

3.7.1 Primera dilución

Después de la segunda lavada, se efectúa la primera dilución, añadiendo el diluyente agua de coco in natura, con 10 % de yema de huevo a 0 % de glicerol, en la proporción de un volumen de semen para 10 del diluyente.

3.7.2 Enfriamiento de semen

El enfriamiento del semen ocurrió de forma progresiva durante 6 horas hasta alcanzar una temperatura de 5°C. Alcanzada esta temperatura, se procede con la segunda dilución o glicerolización que consiste en:

- La adición de Agua de coco *In natura* más 10 % de yema de huevo y a 7 % de glicerol.
- tres etapas que cuentan con la adición a cada 5 minutos de una fracción del diluyente a 5°C, doblando el volumen y reduciendo la concentración de la primera dilución por la mitad (**solución B**).

3.7.3 Dilución del semen

Una vez que se evaluó las muestras de semen, se les agregó una cantidad igual de diluyente con la finalidad de que no decline rápidamente la capacidad de fertilización después de su colección y de acuerdo a los resultados se procede a hacer los cálculos de dilución para lo cual se considera los siguientes parámetros: volumen, concentración y motilidad para determinar el número de células vivas y a la vez determinar el número de pajillas para así definir la cantidad de cada diluyente necesario para cada una de las muestras a procesar.

Los diluyentes se prepararon con anticipación a la extracción de semen en cantidades suficientes con la finalidad de que no falte.

Los cálculos se realizaron de la siguiente manera:

- Para la determinación del número de células vivas se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Células Vivas} = \text{Volumen} \times \text{Concentración} \times \% \text{ de Motilidad}$$

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

$$\text{No. de pajillas} = \frac{\text{No. de células vivas}}{\text{Millones de espermatozoides deseados / dosis}}$$

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

Cantidad de diluyente = número de pajillas x (0.5 ml)

Donde:

0.5ml = es el volumen de una pajilla en mililitros.

Los medios nutritivos probados en este ensayo son los siguientes:

- TRIS (hidroximetil amino metano) con yema de huevo, ácido cítrico, fructosa.
- Agua de Coco *In natura* con yema de huevo.

3.8 Glicerolización y equilibración

Después de la determinación de la cantidad de diluyente necesario se agregó la fracción A a la muestra de semen a 35°C, luego se procede a bajar la temperatura a 5°C de manera gradual, para posteriormente agregar la fracción B, a esta temperatura en dos fases con un intervalo de 15 minutos para el TRIS (hidroximetil amino metano). Adicionadas las dos fracciones de diluyente al semen mantenido a una temperatura de 5°C, se lleva a cabo el tiempo de Equilibración por 6 horas, con el fin de que el semen se mezcle perfectamente con el diluyente y quede protegido para su posterior congelación.

3.9 Envasado de semen

Posteriormente a la glicerolización y al tiempo de Equilibración se procedió a envasar el semen diluido en pajuelas francesas con un volumen de 0.5 ml; mediante la maquina automática envasadora de semen de origen francés

(**MRS 1**). El procedimiento se lleva a cabo con una temperatura constante de 5°C que la maquina regula.

Cabe mencionar que entre un diluyente y otro, se remplazó material limpio por otro con la finalidad de evitar contaminación entre ellos.

3.10 Congelamiento y almacenamiento de las pajillas

Después de llenar las pajuelas mediante el envasado automático a una temperatura constante de 5 °C, se procedió a congelar en vapores de nitrógeno (-80 a -100°C) por nueve minutos a excepción del agua de coco que fue durante 5 minutos, ya que de esta manera los espermatozoides reducen su metabolismo gradualmente y no sufren un daño tan grave por el cambio brusco de temperatura. Después se almacena en termos contenedores de nitrógeno líquido a una temperatura de -196 °C, las pajuelas se colocaron dentro de gobelets de plástico y se identificaron dentro de las canastillas del termo donde son almacenadas. Debe de asegurarse que el nivel de nitrógeno este siempre por encima del nivel de las pajillas durante su almacenamiento para evitar alteraciones de temperatura.

3.11 Evaluación post-congelación

Aproximadamente 48 horas posteriores al congelamiento, se procedió a descongelar las pajillas en baño Maria a 37 °C durante 30 segundos. Se cortó el extremo sellado de la pajilla con unas tijeras limpias, posteriormente se coloca

una gota de semen diluido y descongelado sobre el portaobjetos previamente templado sobre la platina a una temperatura de 37°C y se coloca sobre la gota un cubreobjetos, se observó al microscopio donde se evaluó la motilidad recuperada post-descongelación y de esta manera evaluar el efecto de los diluyentes empleados.

3.12 Diseño experimental

El experimento consto de dos tratamientos con 20 repeticiones cada uno dando un total de 40 unidades experimentales.

Se utilizó un diseño estadístico completamente al azar para analizar los datos obtenidos.

El programa utilizado para el análisis de los datos fue el de Diseño Experimental FAUANL. Versión 2.5

Tratamientos:

- ✓ **1. TRIS**
- ✓ **2. Agua de Coco**

Repeticiones:

- ✓ **Pajillas (40)**

IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuadro 3. Análisis de varianza de la recuperación espermática

FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTO	1	28090.00	28090.00	2134.8398	0.000
ERROR	38	500.00	13.1578		
TOTAL	39	28590.00			

C.V. = 9.55%

Cuadro 4. Medias de la recuperación espermática

TRATAMIENTO	REPETICIONES	MEDIAS
TRIS	20	64.50
AGUA DE COCO	20	11.50

Recuperación espermática post-descongelación

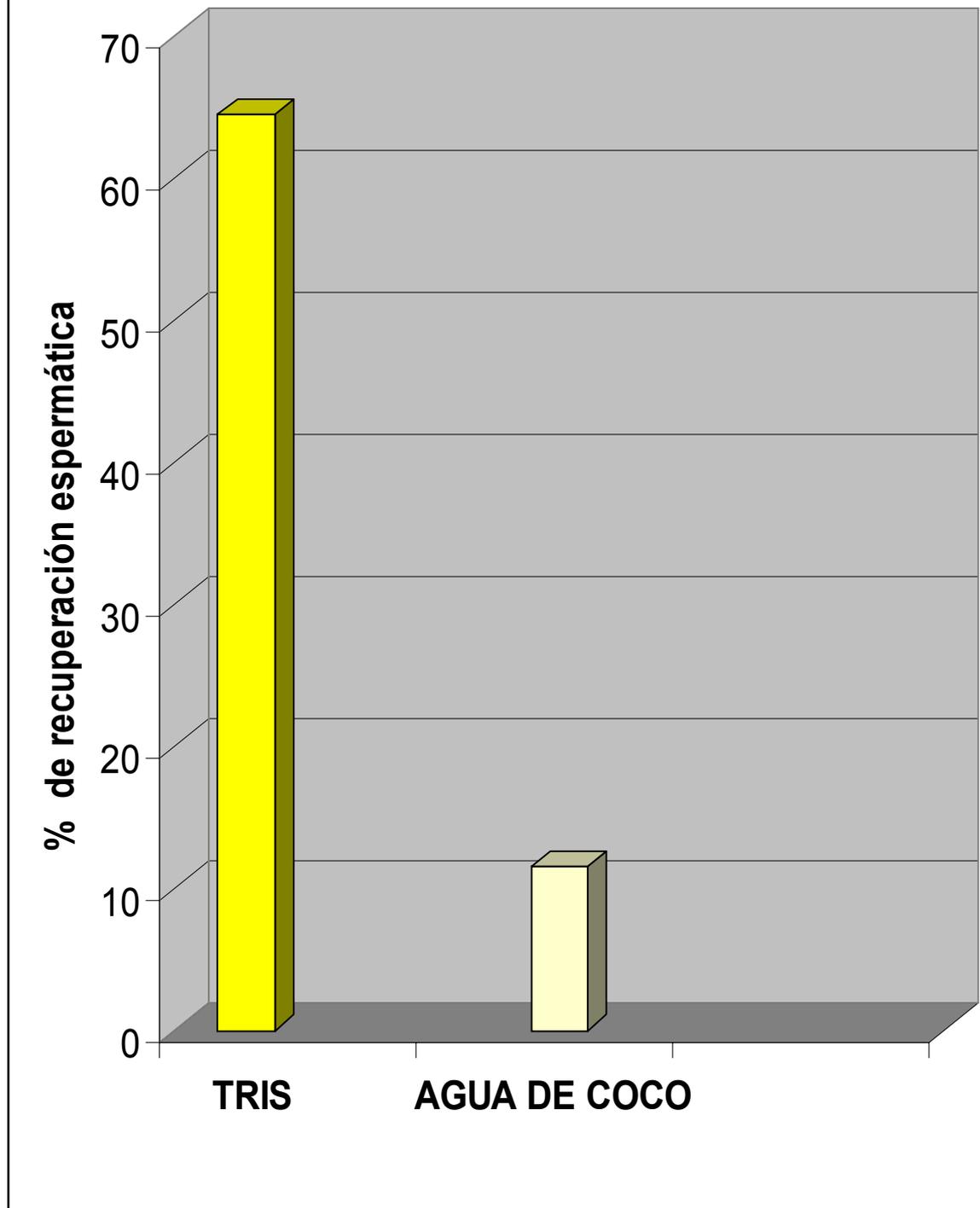


Figura 4. Recuperación Espermática Post-descongelación

Cuadro 5. Resultado de la comparación de medias

TRATAMIENTO	MEDIA
TRIS	64.50 ^a
AGUA DE COCO	11.50 ^b

Nivel de significancia: 0.01

En los resultados de comparación de medias hay diferencia altamente significativa entre ambos tratamientos siendo el tratamiento TRIS mejor diluyente para el procesamiento de semen ovino (Cuadro 5).

Cuadro 6. Diferencia mínima significativa (DMS)

VALORES DE DMS
DMS (1 2) = 3.1173
DMS (2 1) = 3.1173

El mejor diluyente para promover una recuperación más apropiada de la motilidad post-descongelación es aquel hecho a base de tris ya que se presentan menos pérdidas de espermatozoides.

Conforme al análisis estadístico se encontró diferencias altamente significativas entre los diluyentes TRIS y Agua de coco, siendo el diluyente TRIS

superior. Este medio proporciono las mejores condiciones de supervivencia a la descongelación activando el metabolismo de las células espermáticas. A la vez que el agua de coco es obtenido en forma natural sin ningún proceso de purificación mientras que el tris se elabora con estándares de calidad y en medio estéril (Cuadro 3).

Por otra parte el diluyente TRIS tiene una recuperación espermática post-descongelación de 64.5% (Figura 4). Este resultado da factibilidad al uso práctico del diluyente en su utilización para el procesamiento de semen ovino.

Amoah señala que el uso de Tris, del ácido láctico, de la fructosa, de la yema de huevo, y del suplemento del glicerol ha permitido a la esperma del macho cabrio y morueco ser almacenado con éxito por varios años antes de ser utilizado en la inseminación cervical o laparoscopia.

V CONCLUSIONES

De acuerdo al análisis de los resultados obtenidos en este trabajo llevaron a las siguientes conclusiones:

- El tratamiento en el que se utilizó TRIS (hidroximetil amino metano) con yema de huevo y glucosa resulto ser el mejor diluyente ya que proporciono la mayor recuperación espermática 64.5%, favoreciendo a las características particulares del semen ovino, por lo tanto puede ser empleado en la practica.
- La recuperación espermática post-descongelación con el tratamiento Agua de coco fue demasiado baja 11.5%.
- Conforme al análisis estadístico se encontró diferencias altamente significativas entre los diluyentes TRIS y Agua de coco, siendo el diluyente TRIS superior que el Agua de coco con una ($P > 0.000$).
- Se acepta la H_1 ya que existen diferencias altamente significativas en la evaluación post-descongelación de los espermatozoides en su motilidad masal y progresiva (recuperación espermática) con la utilización de los tratamientos: Agua de coco y el TRIS (hidroximetil amino metano) como diluyentes para el procesamiento de semen ovino en base a la diferencia que existe entre estos.

- Los resultados obtenidos con el diluyente Agua de coco muestran una recuperación espermática post-descongelación del 11.5% (Figura 4) lo que indica que la concentración y viabilidad de los espermatozoides está muy por debajo de lo aceptable. En tanto que el diluyente TRIS la recuperación espermática post-descongelación es de 64.5% (Figura 4). Es entonces importante considerar que es preferible usar productos específicos para evitar la pérdida de esperma y por ende evitar hacer trabajos que no nos arrojen los resultados esperados en un programa de inseminación artificial de ovinos.

LITERATURA CITADA

- Agraz, G. A. A. 1989. Caprinotecnia 2. Ed. Limusa. México.
- Amoah, E. A. and Gelaye, S. sin fecha. Biotechnological Advances in Goat Reproduction Agricultural Research Station. Fort Valley State University, GA 31030 – 3298, USA. Journal, animal science.
- Bitsch, A. 1975. Ovinotecnia: Manejo Intensivo del Lanar. Escuela Agrotécnica Salesiana de Río grande, Tierra de fuego, Argentina.
- Bonadonna, T. 1986. Reproducción Animal e Inseminación Artificial. Tomo I. Primera edición. Ed. Hemisferio sur S. A.
- Bonadonna, T. 1989. Reproducción Animal e Inseminación Artificial. Tomo II. Primera edición. Ed. Hemisferio sur S. A.
- Brackett, G. B; Seidel, E. G. Jr; Seidel, M. S. 1988. Avances en Zootecnia. Nuevas técnicas de reproducción animal. Ed. Acriba, S. A. Zaragoza, España.
- Cancellón M. A; Valle A. J.1981. Ganadería Práctica. Ed. Ramón Sopena, S. A. Barcelona, España.
- Deka, B. C. y Rao, A. R. 2003. Effect of Glycerol Level in Tris-Basek Extender and Equilibration Periodo Quality of Frozen Goat Semen. College of veterinary science. Tirupati, Andhra, India.
- Derivaux, J. 1976. Reproducción de los Animales Domésticos. 2ª Edición. Ed. Acriba, Zaragoza, España.

- Ensminger, M. E. 1973. Manual del Ganadero. Cuarta edición. Ed. El ateneo. Buenos aires, Argentina.
- Evans, G. y WMC. Maxwell. 1990. Inseminación Artificial de Ovejas y Cabras. Ed. Acriba, Zaragoza, España.
- Ferreira, N. J., Pérez, F.D. R. 2001. Biotécnicas de la Reproducción Caprina y Ovina. 1ª edición. Fortaleza, Ceara, Brasil.
- Galina, H. C; Saltiel, C. A; Valencia, M. J; Becerril, J. A, Bustamante, C. G; Calderón, Y. A, Duchateou, B. A., Fernández, B. S., Olguín, B. A., Páramo, R. R. y Zarco, Q. L. 1986. Reproducción de Animales Domésticos. Ed. Limusa, México.
- Gall, Ch. 1977. Producción Caprina y Ovina. ITESM. Monterrey, N. L.
- Guevara, J. E. 1994. Estudio Comparativo de 2 Diluyentes (Tris y Citrato de Sodio) en el Procesamiento de Semen de Carnero y su Efecto en la Temperatura y Tiempo de Descongelación. Tesis. U. A. A. A. N. Buenavista, Saltillo, Coahuila. México.
- Helman, M. B. 1965. Ovinotecnia. Ed. El Ateneo. Buenos Aires, Argentina.
- Herman, H. A., Mitchell, J. R., Doak, G. A. 1994. The Artificial Insemination and Embryon Transfer. Eighth edition. Interstate, Inc, Danville, Illinois.
- Holy, L. 1983. Bases Biológicas de la Reproducción Bovina. Ed. Diana, México.
- <http://www.nzsheep.co.nz/dorper/>
- <http://www.koepon.com/espanol/alta/>

- <http://www.equine-reproduction.com/articles/images/tank.jpg>
- Mellado, B. M. 1999. Apuntes de Fisiología de la Reproducción.
- Merk & Co., Inc. 1993. Manual Merk de Veterinaria. Cuarta edición en español. Rahway, N. J., E.U.A.
- Olivares Sáenz, Emilio. 1994. Paquete de Diseño Experimental FAUANL. Versión 2.5. Facultad de Agronomía UANL. Marín, N.L.
- Padilla, G. L. E. 1997. Efecto del Tipo de Diluyente y Temperatura de Descongelamiento Sobre la Calidad de Semen Ovino Congelado. Tesis maestría. U.A.A.A.N. Saltillo, Coahuila.
- Pérez, P. F. 1966. Reproducción e Inseminación Artificial Ganadera. Ed. Científico Médica. España.
- Rice, U. A. y Newcomb, A. F. 1956. Cría y Manejo del Ganado. Ed. Hispano-America. Mexico.
- Roca, J., Carrizasa, J. A., Campos, I., Lafuente, A., Vazquez, J. M. y Martinez, e. 1997. Viability and Fertility of Unwashed Murciano-Granadina Goat Spermatozoa Diluted in Tris-Egg Yolk Extender and Stored at 5 °c. Veterinary Science. University of Murcia E- 30071. Murcia, Spain.
- Salisbury, G. W., N. L. VanDermark. 1964. Fisiología de la Reproducción e inseminación Artificial de los Bóvidos. Ed. Acriba, Zaragoza, España.
- Yeates, N. T. M. 1967. Avances en Zootecnia. Ed. Acriba. Zaragoza, España.

