



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GANADERÍA

Diluyentes y curvas de congelamiento para conservar semen de venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*)

VICTORIA CESSA REYES

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2014

La presente tesis titulada: **Diluyentes y curvas de congelamiento para conservar semen de venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*)** realizada por la alumna **Victoria Cessa Reyes** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



Dr. Fernando Clemente Sánchez

ASESOR



Dr. Cesar Cortez Romero

ASESOR



Dr. Luis Antonio Tarango Arámbula

Montecillo, Texcoco, Estado de México, junio de 2014

DILUYENTES Y CURVAS DE CONGELAMIENTO PARA CONSERVAR SEMEN DE VENADO COLA BLANCA (*Odocoileus virginianus*)

Victoria Cessa Reyes, MC
Colegio de Postgraduados, 2014

El venado cola blanca es considerada la especie de fauna más importante en México por su valor económico, su tolerancia a las actividades humanas y adaptabilidad a gran variedad de ecosistemas. Su rentabilidad por el turismo cinegético ha motivado a dueños de tierras a implementar en sus sistemas de producción técnicas que mejoren la calidad de los venados como trofeo. Tal es el caso del mejoramiento genético que en la actualidad se lleva a cabo en la región noreste de México, a través de la introducción de sementales sobresalientes y la aplicación de técnicas de reproducción asistida como la crioconservación de semen para la inseminación artificial. Actualmente, existen en el mercado diversas sustancias comerciales utilizadas para la dilución y congelación de semen. Existe especial interés de los ganaderos diversificados por la evaluación de diluyentes comerciales que les proporcione información para la compra del mejor producto, con el propósito de conservar en buen estado el semen de venado que están produciendo. Por tal motivo, la presente investigación se realizó para estudiar el comportamiento de tres diluyentes comerciales empleados en la crioconservación de semen de venado cola blanca, aplicando dos curvas de congelamiento que permita su conservación y uso futuro. Se utilizaron tres venados machos de 3.5 años de edad; los diluyentes comerciales fueron Biladyl[®], Triladyl[®] y Bioxcell[®]; y las curvas de congelamiento evaluadas fueron la recomendada para semen de ovino-caprino y la curva recomendada para venado. Las evaluaciones de semen se realizaron teniendo como referencia el Índice de Calidad de Semen de Venado (ICSV). Los resultados mostraron diferencia entre los diluyentes ($p= 0.0301$), no así para las dos curvas evaluadas ($p= 0.3684$). El diluyente más conveniente a usar en la crioconservación de semen de venado resultó ser el Bioxcell[®], mientras que tanto la curva que se usa en la crioconservación de semen de ovino-caprino como la curva recomendada para semen de venado, ambas pueden ser utilizadas para conservar semen de venado, sin afectar el ICSV.

Palabras clave: venado cola blanca, semen, diluyentes, curva de congelamiento.

ABSTRACT

DILUTERS AND CURVES OF FREEZING TO CONSERVE SEMEN OF WHITE-TAILED DEER (*Odocoileus virginianus*)

Victoria Cessa Reyes, MC

Colegio de Postgraduados, 2014

The white-tailed deer is considered the most important wildlife species in Mexico for its economic value, tolerance to human activities and adaptability to great variety of ecosystems. Its profitability as a game species has motivated landowners to implement techniques in the production systems that improve the quality of deer as a trophy. Such is the case of the genetic improvement that currently takes place in the northeast region of Mexico, through the introduction of outstanding stallions and the application of assisted reproduction techniques such as the crioconservation of semen for artificial insemination. Currently, there are various commercial substances in the market used for semen dilution and freezing. There is special interest of game ranch owners by the evaluation of commercial diluents that provide them information for choosing the best product, with the purpose of conserving deer semen in good condition that they produce. Therefore, the present investigation was conducted to study the behavior of three commercial diluters used in the crioconservation of White-tailed deer semen under two curves of freezing for its preservation and future use. Three male deer 3.5 years old were used. The commercial diluters were Biladyl[®], Triladyl[®] and Bioxcell[®], and the evaluated curves of freezing were the recommended for sheep and goat semen and the curve recommended for deer. Semen evaluations were performed having as reference the Index of Quality of Semen of Deer (IQSD). The results showed difference among diluters ($p= 0.0301$), but not for both evaluated curves ($p= 0.3684$). The most convenient diluter to use in the crioconservation of deer semen was Bioxcell[®], while so much the curve that is used in the crioconservation of sheep and goat semen as the recommended curve for deer semen, can be used to freeze deer semen, without affecting the ICSV.

Keywords: White-tailed deer, semen, diluters, curves of freezing.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT por el financiamiento al proyecto SEP-CONACYT 166903 “Conservación de la Diversidad Genética y Mejora del venado cola blanca en México” de donde deriva la presente investigación.

Al Colegio de Postgraduados campus Montecillo a través de CONACYT por la beca otorgada para la realización del posgrado dentro del programa Recursos Genéticos y Productividad-Ganadería.

A los integrantes del consejo particular quienes revisaron esta tesis: Dr. Fernando Clemente Sánchez por su dirección y asesoría en la conducción de esta investigación. Gracias por su tiempo y consejos al Dr. César Cortez Romero y al Dr. Luis Antonio Tarango Arámbula.

Al Dr. Humberto Vaquera Huerta por su apoyo en el análisis estadístico de los datos de la investigación realizada.

Al personal del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo y Campus San Luis Potosí por las facilidades prestadas en la estancia de formación y estancia de investigación en las instalaciones de la institución. Especialmente a la Lic. Ma. Del Carmen Padilla Pastrana, C. Ana Luisa Espinosa Portillo, Lidia López Monsiváis, Luis Jesús Gutiérrez de la Rosa y Christian E. Aceves Ruiz por la confianza y apoyo moral brindado a mi persona durante el tiempo que nos conocimos.

A los compañeros integrantes del equipo de trabajo en el laboratorio de reproducción animal “La Huerta” del Campus San Luis Potosí, por su amistad y apoyo en el manejo y contención de los animales: Dania Melissa Vega Hernández, Alán Roberto Hernández Llamas, Héctor Ortiz Contla y especialmente a Pablo Arenas Baéz por su amistad, comprensión y apoyo en la enseñanza de las técnicas de evaluación de semen así como su aporte en el análisis de datos.

A Marianela Fallas López y Gerardo Pilonni por su apoyo en la enseñanza de las técnicas de evaluación seminal en sus respectivos laboratorios de trabajo.

A mi familia sobre todo por el apoyo moral a Estela Cessa Flores y Damián Arenas Norman.

Familia Viveros Colorado, Gil Viveros Jiménez, Hilda Colorado Romero y Sarita Viveros Colorado porque cuando estuve por claudicar en este paso profesional me motivaron para volver con ustedes.

A los amigos de antaño en general: Santiago Cuixtla Monraga por su inseparable amistad y sin su apoyo en el inicio de este paso me hubiese sido mucho más difícil terminar; Carlos Antonio Flores Martínez que siempre está en la punta del cañón; y de postgrado a Miguel Conde Hinojosa gracias por su paciencia, experiencias compartidas y sonrisas acompañadas.

CONTENIDO

INDICE DE CUADROS	viii
INDICE DE FIGURAS	viii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Objetivo General	2
1.2. Objetivos Particulares	2
1.3. Hipótesis	3
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1. Importancia del venado cola blanca	4
2.2. Biología de la especie	6
2.3. Temporada reproductiva del venado	8
2.3.1. Anatomía y fisiología reproductiva del macho	9
2.4. Espermatogénesis	11
2.5. Colecta de semen	13
2.6. Evaluación del semen	14
2.7. Calidad del semen	15
2.8. Crioconservación de espermias	16
2.9. Tipos de diluyentes	19
2.9.1. Diluyente Biladyl®	19
2.9.2. Diluyente Triladyl®	20
2.9.3. Diluyente Bioxcell®	21
2.10. Daños al espermia por congelamiento	22
2.11. Curvas de congelamiento de semen	24
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	27
IV. MATERIALES Y METODOS	28
4.1. Localización del área de estudio	28
4.2. Animales, manejo e instalaciones	29
4.3. Colecta de semen	29
4.4. Preparación de los diluyentes	30
4.4.1. Preparación de Biladyl®	30
4.4.2. Preparación de Triladyl®	32
4.4.3. Preparación de Bioxcell®	32
4.5. Evaluación del semen	32
4.6. Estimación de las variables empleadas en el modelo del ICSV	33
4.7. Envasado y preparación de las muestras	34
4.8. Curvas de congelamiento	35
4.9. Evaluación de las curvas de congelamiento	36
4.10. Tratamientos	37
4.11. Análisis estadístico	37
V. RESULTADOS	38
5.1. Estimación del Índice de Calidad de Semen para Venado (ICSV)	38
5.2. Respuesta de los diluyentes	39
5.3. Respuesta de las curvas de congelamiento	41
VI. DISCUSION.....	43
VII. CONCLUSIONES	46
VIII. LITERATURA CITADA.....	47

INDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Cálculo del Índice de Calidad de Semen para Venado diluido antes de congelar y al momento de descongelar.....	38
Cuadro 2. Separación de Medias con prueba de rango múltiple de Tukey para el efecto entre diluyentes ($p = 0.0301$) empleados en la crioconservación de semen de venado cola blanca.....	40
Cuadro 3. Valores promedio del ICSV estimado sobre las muestras de semen de venado cola blanca al tiempo de descongelar.....	42

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Número de unidades (UMA) registradas en México al 31 de julio de 2013. Datos tomados de la Dirección General de Vida Silvestre en la página oficial de SEMARNAT (2013).....	6
Figura 2. Glándulas externas presentes en el venado cola blanca. Tomado de Halls (1984).....	8
Figura 3. Representación esquemática del proceso de espermatogénesis.....	12
Figura 4. Localización del laboratorio de Reproducción Asistida “La Huerta” en el municipio Salinas de Hidalgo, San Luis Potosí.....	28
Figura 5. Letrero de identificación de registro ante SEMARNAT del módulo de producción de venados “La Huerta”.....	28
Figura 6. Curvas de congelamiento para la crioconservación de espermatozoides de venado cola blanca usadas para determinar su efecto sobre la calidad de semen al descongelar.....	36
Figura 7. Dendograma de agrupación del comportamiento de diluyentes empleados en la crioconservación de semen de venado, al momento de diluir, antes de congelar.....	40
Figura 8. Dendograma de agrupación de las curvas empleadas para ovinos y caprinos y la curva para venados en la crioconservación de semen de venado al momento de descongelar.....	41

I. INTRODUCCIÓN

Los productos animales son un lujo inalcanzable para buena parte de la población en los países subdesarrollados. A medida que la capacidad para adquirirlos se reduce, la fauna silvestre cobra importancia como una alternativa para satisfacer los requerimientos proteicos de los sectores poblacionales marginales (Pérez y Ojasti, 1996), de ahí que se lleve a la práctica la cacería de subsistencia. Galindo-Leal y Weber (1998) mencionan que la cacería de subsistencia se practica en cualquier pueblo, ejido, ranchería, campamento o villa indígena al menos en la Sierra Madre, pues la venta de carne y pieles también representa una fuente de ingresos económicos. Por su parte, Aranda *et al.* (1999) también mencionan que en el sur de la Cuenca de México este tipo de cacería representa una importante fuente de alimento para la población rural, pero también de ingresos dado el comercio y remedios tradicionales. De la misma forma y más recientemente, Naranjo *et al.* (2010) en estudios realizados en el sur del país reportan la misma importancia de la fauna silvestre. Así, se tiene que a lo largo y ancho del país la necesidad del aprovechamiento de la fauna silvestre por los pobladores depende de las propias necesidades de estos.

La importancia de la vida silvestre en general y la fauna en particular varía de acuerdo al nivel de desarrollo de las comunidades. Por ejemplo, en las comunidades rurales, la vida silvestre es aún una fuente importante de alimento para los pobladores. Es innumerable la lista de especies animales y vegetales colectadas directamente por las comunidades rurales para complementar su dieta alimenticia. Pero, la fauna silvestre también es aprovechada para usos diferentes a los alimenticios. Hasta nuestros días sigue siendo fuente importante de pieles, plumas, huesos, pigmentos, productos medicinales, grasas y aceites (López, 2009; Guerra *et al.*, 2010; Naranjo *et al.*, 2010). Son utilizados como mascotas, como animales para domesticación, para fines de turismo y para la cacería deportiva (López, 2009).

Entre las especies de mayor importancia como fuente de carne, piel y recreación, se cuenta al venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*), ya que desde mediados del siglo pasado se ha considerado como la especie de fauna silvestre mexicana más importante desde el punto de vista económico, dada su adaptabilidad y tolerancia, tanto a las actividades humanas como a la enorme variedad de ecosistemas, y es la

especie con más amplia distribución en México (Galindo-Leal y Weber, 1998). Pérez y Ojasti (1996) reportan que las especies de mayor importancia cinegética tienden a ser las mismas en toda la América Tropical, así el venado cola blanca es el mamífero de caza más cotizado en México, toda América Central, Colombia, Venezuela y Perú.

Por todas las bondades que el venado cola blanca representa como especie, el estudio de su biología, comportamiento y hábitos es indispensable para poder llevar a cabo su conservación y mejoramiento.

La importancia económica que tiene el venado cola blanca en México es considerable. La rentabilidad adquirida por el turismo cinegético ha motivado a los dueños de las tierras a implementar técnicas que mejoren la calidad de los organismos como trofeo. Tal es el caso del mejoramiento genético que en la actualidad se lleva a cabo en la región noreste de México a través de la introducción de sementales sobresalientes y la aplicación de técnicas de reproducción asistida como la crioconservación y la inseminación artificial.

1.1. Objetivo General

Estudiar el comportamiento de tres diluyentes comerciales empleados en la crioconservación del semen de venado cola blanca, aplicando dos curvas de congelamiento para su conservación y uso futuro.

1.2. Objetivos Particulares

- a) Estimar las variables de respuesta empleadas en la obtención del Índice de Calidad de Semen para Venado (ICSV): motilidad masal, motilidad individual, concentración espermática, porcentaje de espermias vivos y porcentaje de espermias normales.
- b) Estimar el ICSV de electroeyaculados obtenidos de venados cola blanca durante su periodo reproductivo.
- c) Evaluar tres diluyentes comerciales (Biladyl[®], Triladyl[®], Bioxcell[®]) con dos curvas de congelamiento (para ovinos y para venados) teniendo al ICSV como la variable de respuesta.

1.3. Hipótesis

H₀: La calidad de semen del venado cola blanca es similar al diluirse con los diluyentes Biladyl[®], Triladyl[®] y Bioxcell[®].

H_a: Entre los diluyentes Biladyl[®], Triladyl[®] y Bioxcell[®], al menos uno es diferente en cuanto a la calidad de semen.

H₀: La curva de congelamiento en el proceso de crioconservación de semen de venado cola blanca empleada para ovinos y caprinos produce la misma calidad de semen a la curva recomendada para venado.

H_a: La curva de congelamiento para ovinos y caprinos difiere en la calidad de semen a la curva recomendada para venados.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Importancia del venado cola blanca

Las especies silvestres forman parte esencial de la identidad cultural de una región y representan múltiples valores como los ecológicos, culturales, científicos, recreativos, educativos y estéticos (Aranda *et al.*, 1999). El recurso fauna ha formado parte de la herencia cultural y social como resultado de una constante interacción que se fue transformando en una visión y apreciación mágica y religiosa. Estos animales pasaron de ser una fuente de alimento y uso, a ser percibidos como deidades y una manifestación del mundo humano. Por ejemplo, los venados machos al estar dotados de una cornamenta, que se renueva o muda anualmente, han significado el crecimiento, el renacimiento, la fecundidad y la renovación del mundo que persiste hasta la actualidad (Guerra *et al.*, 2010; Mandujano, 2010). Así mismo, Mandujano (2010) menciona ejemplos del uso e importancia del venado en forma cultural o religiosa en muchos pueblos indígenas de México, como los huicholes, mazahuas, mexicas, kikapus, tarahumaras, tepehuanos, yaquis, coras y seris, donde los venados han sido representados como un hermano, un animal totémico o un dios-héroe, motivo de reverencia, fiestas, bailes, leyendas o tradiciones religiosas. La cultura ancestral de los yaquis está enriquecida con ritos y tradiciones, entre las que sobresale la Danza del venado, ejecución simbólica de la caza de este animal. El venado era para los aztecas y mayas el símbolo de la criatura cazada por la muerte, según como se presenta en el código Borgia de origen azteca y en el código Tro-Cortesiano maya.

A nivel económico, Leopold en 1965 mencionó que el venado cola blanca es la especie cinegética por excelencia. En México, esta especie tiene valor económico, estético y cultural, presenta una amplia distribución y también es altamente apreciada por su valor cinegético, tiene una imagen carismática y contribuye como fuente alimenticia de las poblaciones rurales (Galindo-Leal y Weber, 1998; Ortiz *et al.*, 2005). Actualmente la cacería deportiva se ha extendido a muchas regiones del país, produciendo importantes beneficios económicos. La cinegética en México es una actividad nueva al amparo de la Ley General de Vida Silvestre, es creciente y cada vez más importante, ya que genera empleos e ingresos económicos a quienes se dedican a ello (Mandujano, 2010).

Estudios recientes sobre el uso de la fauna en el sur de México registraron que seis especies de mamíferos, donde se incluye al venado cola blanca, contribuyeron con 87% del total de la fauna aprovechada en las comunidades de estudio. En el altiplano y las serranías del norte y centro de México, a diferencia del sur, la cacería deportiva es una actividad económica importante y se centra en un número reducido de especies nativas entre las que está en primer lugar el venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*), seguido del venado bura (*Odocoileus hemionus*), el borrego cimarrón (*Ovis canadensis*) y el pecarí de collar (*Tayassu tajacu*), entre otras especies (Naranjo *et al.*, 2010).

A mediados de la década de los 60's algunos ganaderos de Nuevo Laredo, Tamaulipas, iniciaron la renta de sus predios para la cacería de venado cola blanca como una actividad complementaria para la obtención de ingresos. Lo anterior propició que otros ganaderos del Noreste de México se sumaran a las actividades para un mejor manejo de la flora y fauna silvestre, generándose la ganadería diversificada, lo cual permitió la recuperación de los recursos naturales, entre ellos la población de venado cola blanca (Villarreal, 1999). A 35 años de su inicio, la ganadería diversificada ha incrementado la productividad y rentabilidad de las tierras hasta en un 80%. Como ejemplo, durante 1999 la derrama económica de la explotación cinegética de venado cola blanca incluyendo las subespecies *O. v. texanus*, *O. v. carminis* y *O. v. miquihuanensis*, se estimó en 7.5 millones de dólares (López y Baddi, 2000).

En el año 1997 se estableció el Sistema de Unidades de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (SUMA) (SEMARNAT, 2013), con lo que principalmente en la región noreste de México se establecieron ranchos bajo la denominación Unidad de Manejo para la Conservación de Vida Silvestre (UMA), en forma de esfuerzos comunitarios, civiles y particulares para buscar el aprovechamiento sustentable de los venados, para obtener carne, pieles, cornamentas, pies de cría, semen para inseminación artificial y crías para repoblación. Desde su inicio, la creación del Sistema UMA en México ha tenido un fuerte impacto en la economía de la región. Un considerable número de ganaderos involucra con bastante éxito el manejo y administración de las poblaciones de venado

cola blanca como una alternativa complementaria a las actividades ganaderas en sus ranchos, ya que se ha estimado que en promedio cada cazador paga alrededor de 1,500 dólares por el permiso de entrada a un rancho y los servicios de alojamiento, sin la garantía del éxito de cacería (Velarde, 2004). A la fecha se tienen registrados 11,975 predios con la designación de UMA en México (Figura 1) (SEMARNAT, 2013).

Hernández (2010) menciona que en la actualidad, la cacería y la comercialización de ejemplares trofeo, es una industria bien desarrollada en muchos países del mundo, además de que ha ganado gran interés como estrategia de conservación. Siendo también fuente de cerca de 30,000 empleos en el sector rural y deja una derrama económica de casi 5 mil millones de pesos anuales en la región noreste de México.

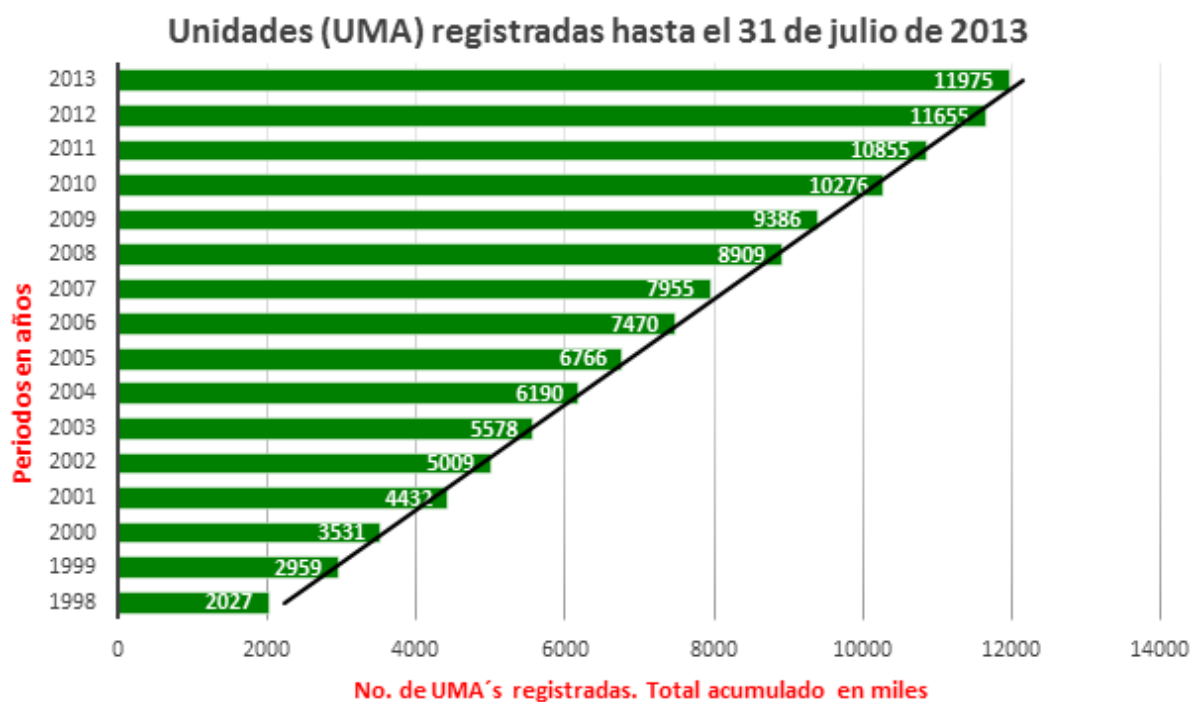


Figura 1. Número de unidades (UMA) registradas en México al 31 de julio de 2013. Datos tomados de la Dirección General de Vida Silvestre en la página oficial de SEMARNAT (2013).

2.2. Biología de la especie

Para México se reportan cuatro especies de cérvidos en vida silvestre: el venado cola blanca, el venado bura, el temazate rojo y el temazate gris yucateco, para el caso del wapití se reporta como extinto del norte del país (Villarreal, 1999; Gallina y Escobedo-Morales, 2009; Mandujano, 2010).

Actualmente, la taxonomía del venado cola blanca en México está basada principalmente en aspectos morfológicos y de distribución geográfica; existen pocos estudios genéticos que sustenten la variación subespecífica dentro de esta especie (Logan, 2004).

En México existen 14 subespecies, las cuales habitan desde las selvas de Chiapas y Yucatán hasta los matorrales de Nuevo León. La coloración varía de café rojizo a café grisáceo dependiendo de la región en donde habita y la época del año, generalmente las formas norteñas son de talla más grande y de coloración grisácea, y en los climas tropicales son más pequeños y de color rojizo; la región ventral del cuerpo y de la cola son blancas (Galindo-Leal y Weber, 1998; Mandujano, 2010). Varias de estas subespecies podrían ser consideradas como ecotipos más que como subespecies geográficas bien definidas (Galindo-Leal y Weber, 1998).

Entre los cérvidos, el venado cola blanca es un mamífero herbívoro de tamaño medio, cuello largo, patas largas y fuertes, y pezuñas en sus dedos adaptadas para moverse por terrenos boscosos y accidentados, mudan cada año de astas, la forma de sus dientes les permite triturar una gran variedad de vegetales, su pelo es liso o moteado, con hábitos diurnos, es una especie adaptable, que habita desde tierras bajas hasta sistemas montañosos por encima de los 3,000 m de altitud. En México, abarca toda la República a excepción de Baja California, desde las regiones subtropicales del sur hasta el norte semiárido, ocupando una enorme variedad de ecosistemas (González *et al.*, 2003; Mandujano, 2010). La disponibilidad de los componentes necesarios para su existencia (alimento, agua, cobertura, espacio), las condiciones climáticas y presencia de depredadores y competidores (ganado) influyen sobre la actividad y tamaño de las poblaciones de esta especie (Ortiz *et al.*, 2005).

Starker (1977) describió al venado cola blanca en México de forma general con una longitud total de 1000 a 1300 mm; cola de 180 a 270mm. Peso de los machos entre 36 a 57 kg y en hembras de 27 a 45 kg. González *et al.* (2003) reportan que la longitud total es de 850 a 1500mm, cola de 100 y 150mm; los machos son aproximadamente 20 a 30% más grandes que las hembras y presentan astas con un eje principal del que salen varias puntas.

El período de gestación es de 196 a 205 días y su reproducción es poliéstrica estacional. Debido a su amplio margen de distribución, su estacionalidad es sumamente flexible estando relacionada por completo a la latitud geográfica y al fotoperiodo (Galindo-Leal y Weber, 1998; Arenas, 2011). Produce de 1 a 3 crías por parto, aunque se tiene reportado que los partos en hembras primerizas resultan en la producción de solo una cría, los partos gemelares se dan a partir de la segunda gestación y las gestaciones de trillizos son raras (Galindo-Leal y Weber, 1998; Drew y Amass, 2004). Las crías recién nacidas presentan una coloración café oscura con manchas blancas a los costados y en la espalda (Galindo-Leal y Weber, 1998).

Los ciervos de cola blanca tienen cuatro conjuntos de glándulas externas (Figura 2): glándulas del tarso en las superficies interiores de las patas traseras; glándulas metatarsianas sobre las superficies exteriores de las patas traseras; glándulas interdigitales entre las pezuñas y las glándulas pre orbitales en los vértices de los ojos. Cada glándula segrega un olor diferente, llamada "feromona", y estos aromas son parte de un sistema de comunicación que identifica a los animales individualmente (Halls, 1984).

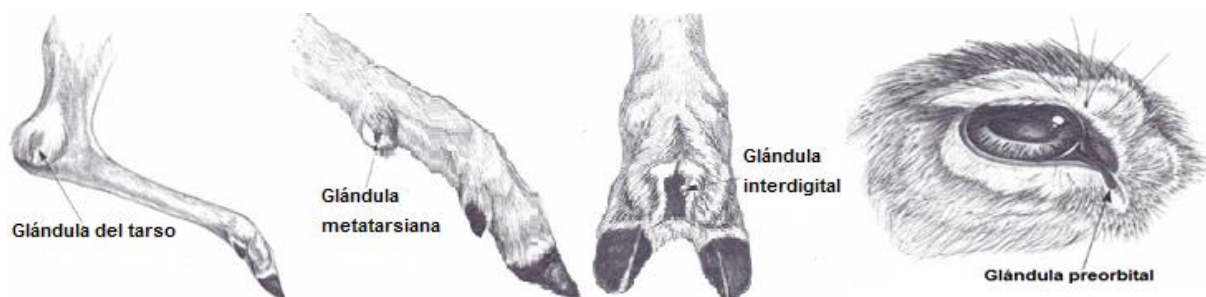


Figura 2. Glándulas externas presentes en el venado cola blanca. Tomado de Halls (1984).

2.3. Temporada reproductiva del venado

El inicio de la actividad reproductiva del venado cola blanca, se rige por el fotoperiodo, la latitud, la genética y la nutrición. La reproducción es directamente controlada por el sistema endócrino y, depende de hormonas producidas por la pituitaria anterior. Las hormonas son moléculas de proteínas que son producidas por diversos órganos y estructuras en el cuerpo, por lo general, en respuesta a un estímulo externo (como la luz o el olor). En los animales que se reproducen sólo

durante ciertas épocas del año, los ciclos reproductivos hormonales se activan o desactivan en consecuencia (Halls, 1984; Drew y Amass, 2004; Arenas, 2011).

Asher (2011) considera al venado cola blanca como una de las especies más fecundas entre las especies de cérvidos existentes. Para especies templadas y árticas en general, la presencia de los ciclos reproductivos estacionales se da mediante el reconocimiento de los cambios del fotoperiodo, con el inicio de la actividad de apareamiento por la disminución de la luz del día, disparando el inicio de la temporada reproductiva (Halls, 1984; Arenas, 2011; Asher, 2011).

Una de las hormonas más importantes en la fisiología reproductiva de las especies estacionales es la melatonina. Esta hormona, secretada por la glándula pineal en el cerebro, retransmite los mensajes del fotoperiodo, influenciando el tiempo de reproducción, participando en la liberación de hormonas sexuales de la hipófisis (Halls, 1984). Es secretada durante la noche y la duración de los pulsos de secreción varía en relación con la duración de la noche, constituyendo de esta manera un índice endócrino del fotoperiodo prevalente (Galindo-Leal y Weber, 1998). Se ha reportado que la administración de melatonina en forma oral o por vía intramuscular adelanta la época de celo en el venado cola blanca (Ryg, 1986).

2.3.1. Anatomía y fisiología reproductiva del macho

La anatomía reproductiva externa del venado macho la conforman el pene, prepucio y escroto. El prepucio es la piel que cubre el extremo o glande del pene. Su función es proteger al pene de lesiones. El pene se erecta durante la estimulación sexual resultando en su protrusión a través de la abertura del prepucio. El escroto es la cubierta de piel en forma de saco que contiene los dos testículos. El escroto cambia de tamaño y posición en relación con la actividad física y la temperatura. La función más importante del escroto es mantener la termorregulación de los testículos para asegurar que la temperatura testicular sea 4°C por debajo de la temperatura corporal. Si aumenta la temperatura del testículo, la producción de espermatozoides se verá afectada o inhibida. La anatomía interna del aparato reproductor masculino está formada por los testículos y las glándulas deferentes que producen el líquido seminal en el que nadan los espermatozoides (Drew y Amass, 2004).

Una serie de glándulas situadas cerca de la unión de la ampolla y la uretra pélvica son importantes para la producción de diversos componentes del fluido seminal. Estas glándulas secretan proteínas y fructosa en el líquido seminal y aportan aproximadamente el 30-50% del volumen del líquido seminal. La próstata es una glándula grande localizada alrededor de la uretra pélvica cerca de la abertura de la vejiga a la uretra pélvica. La próstata segrega aproximadamente el 25-40% del volumen de líquido seminal. Las glándulas bulbouretrales se encuentran en la misma área y contribuyen a la porción final del fluido seminal. Los espermatozoides y el líquido seminal constituyen el semen que se impulsa por contracciones rítmicas de los vasos deferentes y la uretra en el pene. La calidad y cantidad del semen es dependiente de la especie y de diversos factores como la alimentación, el estado de salud, la época del año y la edad, entre otros (Drew y Amass, 2004).

Los machos de venado cola blanca alcanzan la pubertad y son fisiológicamente capaces de reproducirse a los 8 meses de edad. Los indicadores más importantes para notar el inicio de la pubertad de los venados juveniles, son la formación y pulimiento de las astas y un moderado engrosamiento de los músculos del cuello. Cuando los machos se encuentran en el punto óptimo de sus condiciones físicas y reproductivas, presentan el máximo grosor del cuello, el pelo es lustroso y graso, manifiestan un comportamiento agresivo hacia otros machos y de deseo sexual con las hembras. Sin embargo, la monta y cópula por parte del macho es permitida únicamente en el momento del estro. Existen varias pautas de comportamiento que marcan el inicio de la estación reproductiva en los machos. Una de estas pautas es el tallado de las astas contra árboles y arbustos. Estos cambios corporales, así como el ciclo de las astas, están correlacionados con los pulsos de secreción de testosterona en los testículos y de la hormona luteinizante (LH) en la hipófisis (Halls, 1984; Galindo-Leal y Weber, 1998).

Drew y Amass (2004) describen la fisiología reproductiva del venado cola blanca mencionando que la principal hormona sexual masculina es la testosterona. La testosterona es secretada por los testículos, y responsable de la conducta sexual del macho (Halls, 1984). En zonas templadas, la producción de testosterona es estacional y se relaciona con la duración del día. Con la disminución de las horas luz en el otoño, el hipotálamo segrega GnRH, que estimula la producción de FSH y LH en

la pituitaria anterior, al igual que en las hembras. Sin embargo, en el macho, el sitio de acción de la FSH y LH son las células dentro del testículo. La LH actúa sobre las células de Leydig en el testículo iniciándose la producción de testosterona. La FSH actúa sobre las células de Sertoli en el testículo y estimula la conversión de la testosterona en estradiol con un resultante ciclo negativo de retroalimentación en hipotálamo y la glándula pituitaria anterior. La hormona estimulante del folículo proporciona el estímulo para la producción de espermatozoides (Halls, 1984).

Halls (1984) menciona que Robinson y colaboradores en 1965 describieron un ciclo testicular de tres fases en machos cola blanca de Texas, que consiste en (1) el desarrollo principal, (2) la producción total y (3) etapa de reposo. Estas fases se asociaron con la aparición de crecimiento de las astas, el desprendimiento del terciopelo y la caída de la cornamenta, respectivamente.

En el macho la fertilidad también es estacional y, en general sincronizada con los ciclos de crecimiento de las astas. Los machos de climas templados son infértiles sin producción de espermatozoides durante los meses de verano. En respuesta a la disminución de la duración del día en el otoño, aumenta la producción de testosterona que da inicio a la espermatogénesis. En general, los venados machos son fértiles la mayor parte del tiempo en que las astas duras están presentes. El pico de la temporada de apareamiento coincide con el tiempo en que la mayoría de las hembras exhiben el primer celo, que es cuando se produce la mayor parte de la actividad de apareamiento (Drew y Amass, 2004).

2.4. Espermatogénesis

La espermatogénesis es la suma de una serie de eventos que ocurren en el interior de los testículos de los mamíferos cuya finalidad es la producción de espermatozoides. Este proceso ocurre en los tubos seminíferos de las gónadas del macho, resultado de una serie de eventos cronológicos mediante los cuales las células germinales o espermatogonias, se dividen mitóticamente en varias ocasiones hasta dar origen a los espermatoцитos, los cuales a su vez se dividen mediante meiosis lo cual hace que se reduzca a la mitad el número de cromosomas, dando

como resultado final la formación del espermatozoide (Johnson *et al.*, 2000; De Jonge y Barratt, 2006).

La espermatogénesis puede ser dividida en tres estadios de desarrollo a) la espermatocitogénesis, la cual es considerada la fase proliferativa, b) la meiosis o fase de producción de las células haploides y c) la espermiogénesis que es la última fase del proceso en la cual se da origen a una serie de transformaciones morfológicas de espermátida a espermatozoide (Amann *et al.*, 1976) (Figura 3).

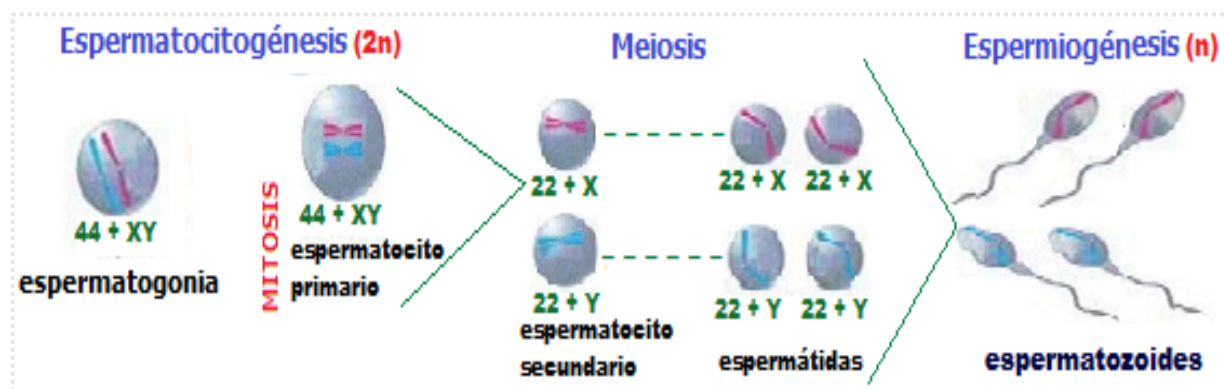


Figura 3. Representación esquemática del proceso de espermatogénesis.

La función reproductiva de los ungulados está influenciada por diversos factores ambientales relacionados con el manejo, la nutrición y la sanidad principalmente. En el macho, estos factores pueden actuar negativamente en la espermatogénesis, ocasionando alteraciones que repercuten a corto plazo en la calidad y cantidad de semen. Esto se reflejará en problemas de fertilidad que ocasionarán disminución en la tasa de parición por fallas en la fertilización y por consecuencia en la repetición de celos (Hafez y Hafez, 2002). El inicio de la espermatogénesis en la pubertad depende del peso corporal (Drew y Amass, 2004).

Mirarchi *et al.* (1977) estudiando los cambios anuales y los órganos asociados en la producción de espermatozoides específicamente en el venado cola blanca, mencionan que los números de espermatozoides en el testículo aumentaron significativamente de junio a julio, lo que indica que en estos meses había iniciado la espermatogénesis. El número de espermatozoides en el epidídimo no aumentó significativamente hasta un mes después, por lo que concluyeron que los productos de la espermatogénesis estaban siendo almacenados con anticipación a la

producción de los espermatozoides. Esto se fundamentó por la presencia de espermatozoides en el conducto deferente de los venados muestreados durante agosto.

2.5. Colecta de semen

Debido al desconocimiento de muchos aspectos del comportamiento reproductivo de los cérvidos, la colecta de semen para su evaluación puede ser problemática (Martínez-Pastor *et al.*, 2006). Sin embargo, Drew y Amass (2004) reportan que el uso de técnicas para ganado doméstico ha sido adaptado para su uso en venados con varias modificaciones, con el propósito de adaptarse a la estación reproductiva de la mayoría de los cérvidos. De esta manera la recolección de semen en varias de estas especies se ha realizado con éxito. Asher *et al.* (2000) mencionan tres métodos para la colección de semen: servicio natural utilizando vagina artificial, recuperación post-mortem del epidídimo y la electroeyaculación. Esta última es una técnica eficiente y de uso común en animales domésticos, la cual ha sido adaptada para su uso en venados (Mendoza, 2008).

Asher *et al.* (2000) reportan que la mayoría de las colecciones de semen en venados son realizadas por electroeyaculación en donantes anestesiados o sedados. Al usar esta técnica existen riesgos para los animales por el uso de los anestésicos, en comparación con los métodos de monta natural con vagina artificial. Sin embargo, la electroeyaculación tiene la ventaja de ser generalmente más segura para el personal que maneja al animal; puede ser utilizada en todos los individuos, a diferencia de las colectas realizadas solo en aquellos animales entrenados, y a menudo es menor el tiempo empleado en la colecta. A su vez, el argumento de que los eyaculados naturales son generalmente de mejor calidad que los electroeyaculados, no ha sido aún demostrado en venados. Hasta la fecha, el semen se ha recogido satisfactoriamente por electroeyaculación en una amplia gama de especies de cérvidos, sin ninguna diferencia notable en la calidad o cantidad de la eyaculación, en comparación con colecta de monta natural. Por otra parte, Holt (2000a) hace referencia que el uso de la electroeyaculación bajo anestesia general con los animales silvestres da como resultado una calidad variable de semen y no está exenta de ser contaminada con orina o secreciones de las glándulas vesiculares.

Martínez-Pastor *et al.* (2009) observaron que los espermatozoides obtenidos por electroeyaculación, incluso desde la fracción del eyaculado rica en espermatozoides, pareció perder calidad de manera rápida cuando fueron incubados en medios sin yema de huevo.

En el venado cola blanca, la colecta de semen por esta técnica se ha llevado a cabo con éxito y a su vez, se han obtenido gestaciones con inseminación artificial, empleando semen fresco (Asher *et al.*, 2000).

El venado cola blanca responde bien a suaves impulsos eléctricos repetidos que aumentan gradualmente en intensidad. La sobre estimulación eléctrica estresa al macho, dado que se aumenta la tensión hasta el punto de que el venado pase a contracciones musculares muy violentas. El volumen de semen colectado por electroeyaculación en el venado cola blanca generalmente va de 1 a 2 mL, aunque hay reportes que puede llegar a ser de entre 3 y 5 mL. La colecta de semen en cérvidos en clima templado generalmente se produce durante el otoño y el invierno (Drew y Amass, 2004).

2.6. Evaluación del semen

El éxito reproductivo masculino se determina en parte por el número de hembras a las que tenga acceso y por su capacidad de fertilizar los óvulos disponibles. Los machos pueden mostrar diferentes grados de fertilidad como resultado de su genética como es el caso de la endogamia, o pueden ser temporalmente infértiles debido a las causas ambientales como la escasez de alimentos, el estrés y el estado de salud. Por ello, algunas de las características del semen que se sabe influyen en la fertilidad deben ser analizadas. Entre estas están la concentración de los espermatozoides, la motilidad, la morfología espermática, y el estado acrosomal (Malo *et al.*, 2005). Drew y Amass (2004) incluyen en sus criterios de evaluación de semen el volumen, motilidad masal, motilidad individual, concentración de espermatozoides y porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales. Por otro lado, Martínez-Pastor *et al.* (2009) estudiando la crioconservación de espermatozoides en el ciervo ibérico (*Cervus elaphus hispanicus*), consideran como características de evaluación, la motilidad masal, motilidad individual, estado acrosomal y actividad mitocondrial de los espermatozoides.

Existen diversos métodos y técnicas para realizar la valoración seminal, de acuerdo a los intereses que se persiguen y los recursos disponibles. Para la evaluación de muestras de semen recogidos de epidídimo en ciervo ibérico, Malo *et al.* (2005) usaron tubos de ensayo graduados para medir el volumen de semen que se colectó, para calcular la concentración de espermatozoides utilizaron un hemocitómetro y la motilidad se determinó subjetivamente a 37°C utilizando una escala de cero a cinco. Para la viabilidad espermática, morfología y la integridad del acrosoma se evaluó en frotis teñidos con eosina-nigrosina y, posteriormente, con Giemsa.

2.7. Calidad del semen

En la mayoría de los estudios para evaluar el semen de rumiantes, se considera a la motilidad masal como la principal variable para determinar su calidad. Sin embargo, la valoración de la motilidad como único parámetro de calidad seminal no es suficiente para predecir la capacidad fecundante del semen (Muiño *et al.*, 2005). Clemente-Sánchez *et al.* (2012) desarrolla un modelo lineal para determinar la calidad de semen en venado cola blanca expresado como el Índice de Calidad de Semen para Venado (ICSV), considerando las variables de respuesta motilidad masal (MoM), motilidad individual (MoI), concentración espermática (CoE), porcentaje de espermatozoides vivos (EsV) y porcentaje de espermatozoides normales (EsN).

El modelo ajustado está expresado en porcentaje y es definido como: $ICSV = (MoM/98)(0.8038) + (MoI/98)(0.0176) + (CoE/9315)(0.0957) + (EsV/98)(0.0827) + (EsN/99)(0.0002) \times 100$. El ICSV es empleado en la valoración de semen de venado bajo los criterios de: a) regular, entre 52-62%; b) bueno, entre 63-77%; c) muy bueno, entre 78-91%; d) excelente, entre 92-100% y e) malo, por debajo de 51%. El resultado de este modelo proporciona un criterio de la calidad del semen más apegada a la realidad y se recomienda su uso como una herramienta para la estandarización del proceso de valoración del semen de venados, y como una herramienta útil en la conducción de investigaciones donde sea necesario la valoración del semen.

2.8. Crioconservación de espermias

El objetivo de la crioconservación de células espermáticas es la preservación de éstas para su uso posterior en programas de reproducción asistida. El momento más crítico de la crioconservación de las células espermáticas es al inicio de la congelación y al momento del descongelado, puesto que es aquí donde se presentan procesos físico-químicos regidos por las diferencias de temperatura y transporte de agua entre las células y el medio, provocando que los espermatozoides que sobreviven al congelado y descongelado, se vean alterados en sus propiedades estructurales de la membrana plasmática (García, 2002).

Los primeros estudios realizados para conservar los espermatozoides mediante bajas temperaturas fueron realizados por Spallanzani en 1776, quien observó motilidad al conservar espermatozoides de mamíferos en frascos pequeños de vidrio mantenidos a temperaturas bajo cero, para posteriormente exponerlos a temperaturas ambientales (García, 2002).

Salamon y Maxwell (1995) realizaron una amplia revisión donde aportan datos históricos sobre el proceso de la crioconservación de células vivas. En los inicios del siglo XX (1907) Ivanov conservó espermatozoides de caballo por una semana congelados a -15°C , pero no encontró motilidad después del descongelado. Jahnel en 1938, demostró la posibilidad de congelar semen humano en hielo seco (-79°C), nitrógeno líquido (-196°C) o helio líquido (-296°C).

El uso de algunos agentes o sustancias que ayudan al proceso de congelación fue investigado por varios autores. Los primeros reportes sobre el uso de alguna de estas sustancias crioprotectoras data de 1908, cuando Maximov observó que tanto tejidos como células vegetales sobrevivieron al someterse a congelación a -22°C cuando se encontraban en una solución con pequeñas cantidades de glicerol. Posteriormente Later *et al.* (1937) utilizando una solución de glicerol 1M (9.2%), pudieron congelar semen de conejo, cerdo, toro y carnero, con poca sobrevivencia, lo cual fue atribuido a un efecto tóxico de las altas concentraciones de glicerol (García, 2002).

También fueron realizadas otras investigaciones respecto al uso de algunas otras sustancias crioprotectoras. Hadapp (1938) vitrificó esperma de rana en una solución con alta concentración de azúcar (40%). Parkes en 1945 al utilizar concentraciones moderadas de azúcar obtuvo una buena proporción de espermatozoides móviles de humano después del descongelado. Polge (1949) reportó las propiedades protectoras del glicerol, lo cual dio un gran impulso a la crío-preservación del semen de mamíferos. En 1950 Polge y Smith, perfeccionaron la metodología para el congelamiento del semen de bovinos, la cual, generalmente es utilizada para el congelamiento de semen de otras especies, con algunas modificaciones. Así, en 1955 Emmens y Blackshaw, al inseminar 679 borregas, solo obtuvieron un 5% de gestaciones al utilizar semen congelado a -79°C . Golkin (1954) utilizando semen diluido en solución a base de yema de huevo, citrato de sodio, glucosa y glicerol, lo conservaron por 30-50 días y obtuvieron 19 y 43% de fertilidad. De igual manera, el descubrimiento del glicerol como un excelente agente crioprotector marcó un gran avance en el proceso de congelamiento del semen de muchas especies, lo anterior se realizó a finales de la década de los 40's (Holt, 2000; Holt, 2000a).

La mayoría de los diluyentes utilizados con éxito en cérvidos han sido adaptados de los de a base de azúcar tris y/o buffer-citrato desarrollados para otros pequeños rumiantes, usando la yema de huevo para la protección contra descargas por frío y glicerol como crioprotector. Así, dos de los diluyentes más comúnmente utilizados para la congelación de semen de cérvidos, son: citrato de sodio-yema de huevo-glicerol y tris-glucosa-citrato-yema de huevo-glicerol. En el venado cola blanca, la congelación de semen usando un diluyente a base de yema de huevo-tris, lactosa-yema-glicerol o tris-fructosa-yema-glicerol ha resultado aceptable con supervivencia de más del 50% de motilidad espermática después de la descongelación de pellets o pajillas (Asher *et al.*, 2000). Los medios de congelación empleados para el semen de ciervo ibérico poseen los mismos componentes que los usados en el resto de rumiantes (Garde *et al.*, 2005).

Holt (2000a) advierte que existen diferencias entre especies respecto a la susceptibilidad de los espermatozoides al proceso de congelamiento. Así, por ejemplo menciona que los espermatozoides de aves y humanos son más resistentes al choque por frío que los espermatozoides del toro y el carnero.

Las sustancias que en mamíferos protegen a los espermatozoides durante los procesos de congelación y descongelación se denominan sustancias crioprotectoras (Salamon y Maxwell, 1995). Sin embargo, es conocido que dichas sustancias pueden tener efectos negativos sobre las células espermáticas. Tomando en consideración su viabilidad y fertilidad, las sustancias crioprotectoras se pueden clasificar en dos grupos, las de rápida penetración al interior de la célula (dimetil-sulfoxido), etilenglicol y propilenglicol y las sustancias de lenta penetración celular las cuales presentan mayor peso molecular como el glicerol (Molina *et al.*, 1994b).

Holt (2000), menciona que las sustancias crioprotectoras pueden clasificarse de acuerdo a su sitio de acción en sustancias que son capaces de penetrar al interior del citoplasma celular, dentro de las cuales encontramos al glicerol, metanol, etilenglicol, propilenglicol y dimetil-sulfóxido entre otras, y todas aquellas sustancias que no pueden penetrar al interior del citoplasma celular, debido a su alto peso molecular y gran tamaño. En este grupo se encuentran los disacáridos, trisacáridos y goma arábica, además de la yema de huevo.

Generalmente el crioprotector más utilizado es el glicerol, cuyas concentraciones han sido muy estudiadas (Salamon y Maxwell, 1995). La concentración del crioprotector depende del dilutor y especialmente de la presión osmótica. Los daños causados por la formación y disolución de cristales de hielo durante el congelamiento y descongelamiento del semen son acompañados por cambios en la presión osmótica de la fracción de congelamiento. Cuando la fracción de congelamiento es enfriada cerca del punto de congelación, los cristales de hielo se forman debido a la cristalización del agua presente dentro y fuera de la célula (Watson, 2000). La proporción de agua que se cristaliza y se convierte en hielo depende de la presión osmótica de la solución y de la temperatura (Holt, 2000). La concentración del crioprotector en altos o bajos niveles, afecta en gran medida la sobrevivencia de los espermatozoides, los cuales a su vez son muy susceptibles a los efectos tóxicos de los crioprotectores en altas concentraciones (Watson, 2000).

Los diluyentes utilizados para la conservación de semen, por lo general deben poseer características tales como tener un pH adecuado y capacidad amortiguadora (evitar

cambios de pH al neutralizar los ácidos producidos por el metabolismo de los espermatozoides); adecuada osmolaridad, deben ser isotónicos al semen (tener la misma concentración de iones libres); deben proteger a los espermatozoides de una lesión criogénica (lesiones producidas por el choque térmico) (Salamon y Maxwell, 2000; Carballo, 2005); proporcionar nutrientes para el metabolismo de los espermatozoides, controlar contaminantes microbianos, ser de fácil preparación, estables y económicos (Carballo, 2005).

Asher *et al.* (2000) reportó que existían pocas investigaciones originales en formulación de diluyentes específicamente para semen de cérvidos, probablemente porque los diluyentes existentes habían dado resultados aceptables. Sin embargo, algunos investigadores han comparado varios diluyentes de semen desarrollados para otros rumiantes con el fin de encontrar el más adecuado para una especie en particular.

2.9. Tipos de diluyentes

En la actualidad, existen en el mercado varias marcas comerciales de sustancias utilizadas convencionalmente para la congelación y preservación de semen. Algunos de estos productos con amplio rango de experiencia por su estabilidad tanto en su uso como en el mercado, así como productos de nuevo ingreso han sido probados con muestras de semen de diferentes especies. Hay un especial interés en la evaluación de los extensores comerciales para cérvidos, ya que los ganaderos y los proveedores de servicios podrían preferir la adquisición de los extensores de empresas especializadas en lugar de elaborarlos ellos mismos (Martínez-Pastor, 2009).

2.9.1. Diluyente Biladyl®

Es un concentrado estéril para su preparación en dos fases y se emplea en la congelación de semen bovino de acuerdo a las normas de CSS (Certified Semen Services). Se presta también para la congelación de semen de otros rumiantes por ejemplo ovino, caprino, venado, etc. Se compone de concentrados para la preparación de la fracción A (sin Glicerina) que contiene 49g; la fracción B (con Glicerina) cuyo contenido es de 250g y una mezcla de antibióticos en polvo para la

preparación de un coctel de antibióticos AB consistente de un polvo fino y blanco. La fracción Biladyl[®] A se presta para la preparación de diluyente para semen fresco (Müller-Schlösser, 2012). Roldán *et al.* (2009) reporta el uso de este diluyente a base de Tris comparado con otro diluyente a base de TES-Tris (TEST) ambos con 20% de yema de huevo y 4% de glicerol, para la crioconservación de semen de lince ibérico (*Lynx pardinus*), una especie gravemente amenazada. El semen fue enfriado a 5°C empleando un sistema programable automático y congelado con vapor de nitrógeno. Se obtuvo que tras la descongelación del semen hubo un mayor porcentaje de espermatozoides móviles en la dilución del TEST que en la de Biladyl[®]; sin embargo, no encontraron diferencias en el porcentaje de acrosomas intactos entre ambos diluyentes.

García-Álvarez *et al.* (2007) reporta el uso del diluyente Biladyl[®] en la evaluación de semen ovino colectado por electroeyaculación y postmortem, congelado por medio de un biocongelador programable a una velocidad de enfriamiento de 20°C/minuto hasta alcanzar los -100°C y posteriormente con una velocidad de 10°C/minuto hasta alcanzar los -140°C, mantenido a esta temperatura durante 10 minutos para finalmente introducir las pajillas en nitrógeno líquido. La descongelación se realizó en un baño de agua a 37°C sumergiendo las pajuelas durante 20 segundos, obteniendo que tras la descongelación el porcentaje de espermatozoides motiles fue menor para las muestras obtenidas por electroeyaculación, no encontrándose diferencias significativas entre los métodos de colecta para el resto de los parámetros espermáticos rutinarios evaluados con el uso de Biladyl[®].

2.9.2. Diluyente Triladyl[®]

Desde su lanzamiento al mercado en 1974, este diluyente se ha establecido como un medio para la congelación de semen de bovino. Es un buffer que contiene TRIS, Ácido cítrico, azúcar, Glicerina, agua superpurificada y antibióticos, de acuerdo a la Directiva 88/407 de la UE (Tilosina, Gentamicina, Espectinomicina, Lincomicina). Con Triladyl[®] también se han podido congelar una serie de eyaculados de otros mamíferos, como ovinos, caprinos, camélidos y caninos, como igualmente de diversas especies exóticas (Müller-Schlösser, 2012).

Asher *et al.* (2000) reporta el uso exitoso de este diluyente comercial en la congelación en pellets de esperma colectado por electroeyaculación del venado chital (*Axis axis*). Carballo (2005) comparando Triladyl[®] y Andromed[®] como diluyentes comerciales en la crioconservación de semen bovino bajo condiciones de trópico húmedo al sur de México, encontró que el diluyente Triladyl[®] fue mejor que Andromed[®] debido a que la motilidad espermática pos-descongelado fue mayor bajo las condiciones del estudio. Así mismo, Verberckmoes *et al.*, 2005 comparando los diluyentes CEP-2, Caprogen[®] y Triladyl[®] para almacenamiento de semen bovino fresco durante 6 días a 5°C obtuvieron que los espermatozoides almacenados en el diluyente CEP-2 se movieron más rápido y más rectos que los espermatozoides almacenados en Triladyl[®] o Caprogen[®]. Las tasas de fertilización in vitro y poliespermáticas no difirieron significativamente entre los espermatozoides almacenados en el CEP-2 y Caprogen[®], pero fueron significativamente menores en los espermatozoides almacenados en Triladyl[®]. Por lo que con base en los resultados in vitro, el diluyente CEP-2 fue mejor diluyente que Triladyl[®] para el almacenamiento a largo plazo de semen fresco de bovino a 5°C.

Martínez-Pastor *et al.* (2009) mencionan que el extensor comercial Triladyl[®] ha sido utilizado con anterioridad para la crioconservación de semen de rumiantes salvajes, tal es el caso del semen de gacela, semen de ciervo *Axis axis* y gamo paleta *Dama dama*. Estudiando la crioconservación de espermatozoides en el ciervo ibérico desarrollaron un protocolo de crioconservación comparando tres diluyentes comerciales Triladyl[®], Andromed[®] (Minitüb, Tiefenbach, Alemania) y Bioxcell[®] (IMV, L'Aigle Cedex, Francia), con semen obtenido por electroeyaculación. Ya que Andromed[®] y Bioxcell[®] son extensores libres de proteínas de origen animal (yema de huevo), se creía podrían ser los más adecuados para la conservación de semen de esta especie, sin embargo, obtuvieron que los extensores Triladyl[®] (con 20% yema de huevo) y Andromed[®] mostraron mejores resultados que Bioxcell[®] en cuanto a la motilidad espermática al tiempo de descongelación.

2.9.3. Diluyente Bioxcell[®]

Es una fórmula innovadora, libre de proteínas de origen animal que elimina los riesgos sanitarios y metabólicos derivados del uso de leche y/o yema de huevo para la dilución final del semen bovino. Puede usarse para el almacenamiento del semen

en nitrógeno líquido a -196°C o a temperatura de $+4^{\circ}\text{C}$. El semen diluido en Bioxcell[®] puede procesarse a $+4^{\circ}\text{C}$ o a temperatura ambiente ($+20^{\circ}\text{C}$). Se ha probado que este diluyente puede mantener una buena capacidad fertilizante en dosis de semen con bajas concentraciones de espermatozoides. Contiene una mezcla antibiótica de Lincomicina, Espectinomomicina, Gentamicina y Tilosina. Es un líquido estéril concentrado de color ocre que se presenta en frascos de 100 mL de PET y puede ser congelado a -20°C tras su dilución (IMV Technologies, 2012).

Gil *et al.* (2003) comparando el diluyente comercial Bioxcell[®] contra el diluyente de uso convencional yema de huevo-leche en la congelación de semen de carnero para inseminación artificial cervical, encontró que éste diluyente es una alternativa viable superior al uso del extensor a base de yema de huevo-leche.

Por su parte, Sariözkan *et al.* (2010) también realizó una evaluación del uso de Bioxcell[®] y otro extensor a base de Tris centrifugando y lavando el esperma de macho cabrío de raza Angora para eliminar el plasma del semen y así evitar la peroxidación lipídica la cual daña los lípidos, proteínas y ADN, que por consecuencia conduce a la muerte del esperma. Los autores reportaron que el esperma congelado con Bioxcell[®] centrifugado demostró una tasa de motilidad más alta, en comparación con el dilutor a base de Tris. El uso de Bioxcell[®] con o sin la centrifugación y lavado de espermatozoides, facilita la crioconservación de semen en la industria caprina.

2.10. Daños al esperma por congelamiento

El proceso de la crioconservación acarrea consigo daños al esperma, tanto de tipo estructural (alteraciones morfológicas), como bioquímico y funcional, debido a cambios bruscos de temperatura, cambios en la presión osmótica, a la formación y disolución de cristales de hielo dentro y fuera de la célula (García, 2002).

Los daños estructurales generalmente ocurren en la membrana celular, mitocondria y acrosoma. También pueden presentarse alteraciones en los filamentos de la cola del espermatozoide, aunque por lo regular son poco perceptibles después del congelado (Salamon y Maxwell, 2000).

Los cambios en la temperatura, ya sean lentos o rápidos a los que son sometidos los espermatozoides de mamíferos entre los 30 y 0°C, provocan daños letales a la célula, los cuales son influenciados por la tasa de enfriamiento, intervalos de temperatura y rangos de temperatura (Watson, 1995).

El enfriamiento causa una serie de trastornos en la capa lipídica de la mitocondria y membrana celular, al parecer dichos disturbios ocurren en el rango de 15 a 5°C (Watson, 2000). Sin embargo, autores como Robertson y Watson (1986); Parks y Graham (1992); Holt (1994); y Curry *et al.* (1994) mencionan que este rango va de los -4 a -30°C (García, 2002). Por otra parte, Byrne *et al.* (2000) reportan que el rango es más amplio y va de los -15°C a -60°C, por el efecto de los crioprotectores.

La sensibilidad de los espermatozoides al “shock” por frío está determinado por la especie, características del individuo y las características propias del eyaculado (Byrne *et al.*, 2000; Yoshida, 2000). En este sentido, los espermatozoides de conejo, cerdo, borrego y macho cabrío son más sensibles a los daños por enfriamiento que los espermatozoides de toro. Salamon y Maxwell (2000) mencionan que de la gran proporción (40-60%) de espermatozoides que presentan motilidad después del descongelado, solo un 20 a 30% no presenta ninguna alteración de cualquier tipo, aunque un espermatozoide puede presentar motilidad y estar dañado (Salamon y Maxwell, 1995).

Los daños estructurales más comunes ocurren en las membranas del citoplasma y del acrosoma, los cuales son más sensibles que las membranas del núcleo y del sistema locomotor (Yoshida, 2000). El acrosoma, es una estructura en forma de “gorra” que recubre la parte anterior de la cabeza en el espermatozoide. Esta estructura contiene una serie de enzimas líticas necesarias para la fertilización, las cuales son, la acrosina y la hialuronidasa (De las Heras *et al.*, 1996). Estas enzimas son liberadas mediante un proceso de fusión y vesiculación de las dos membranas más externas de la cabeza del espermatozoide (membrana plasmática y membrana acrosómica externa), lo cual es conocido como “reacción acrosómica” (Buxadé, 1994). La reacción acrosómica se presenta inmediatamente después de la capacitación del espermatozoide, la cual consiste en la remoción de los componentes

de las membranas originales del epidídimo por parte del espermatozoide (Steinholt *et al.*, 1991).

Una serie de técnicas han sido desarrolladas para determinar la integridad del acrosoma, directamente con el uso de un microscopio de contraste de fases (Watson *et al.*, 1991) o mediante la tinción de un frotis con diversos colorantes (Valcárcel *et al.*, 1997).

Es claro que los daños ocasionados por el enfriamiento, afectan de sobremanera la bicapa lipídica de la membrana celular del espermatozoide, pero también pueden afectarse las estructuras proteicas de los acarreadores de la membrana, los cuales sufren alteraciones de tipo funcional en el transporte de iones hacia el interior o exterior de la misma membrana (Watson, 2000).

Los lípidos son uno de los constituyentes más importantes de la membrana celular, dentro de los cuales un 65-70% son fosfolípidos, los cuales tienen una estructura muy especial determinada por un éter unido a un ácido graso insaturado. Las características de los fosfolípidos le confieren a la membrana propiedades de gran estabilidad y fluidez. Se considera que los efectos adversos del enfriamiento al cual se someten los espermatozoides antes y durante el congelamiento tienen un efecto desestabilizador en los fosfolípidos, cambiando su fluidez natural y causando una condensación en forma de gel (fase de transición), lo que ocasiona una mala permeabilidad (Holt, 2000).

2.11. Curvas de congelamiento de semen

El proceso de congelación de semen expone a las células espermáticas a una pérdida de agua y a un incremento de la concentración de solutos dentro y fuera de la célula, de lo que deriva la búsqueda de una velocidad y tiempo óptimo de congelación para prevenir la formación de cristales intracelulares y minimizar el tiempo de exposición a la concentración de solutos. No obstante, el enfriamiento debe realizarse de forma lenta, con el fin de mantener las características de las proteínas del plasma seminal que interaccionarán con las del núcleo espermático (Dorado, 2003).

Cuando se congelan las células, se les somete a tensiones que resultan de las interacciones soluto-agua que surgen a través de la cristalización del hielo. Estudios microscópicos de la congelación en la sustitución de electrones de espermatozoides congelados dentro de diluyentes han demostrado que algunas células se excluyen del espacio ocupado por los cristales de hielo, y están por lo tanto, expuestos al medio ambiente anisomótico. Esto se traduce en la captación de agua intracelular, la consiguiente contracción de la célula y posible afluencia de iones. Por otro lado, descongelar implica una reversión de estos efectos, y el consiguiente flujo de agua hacia el interior que puede causar alteración de la membrana celular. Una congelación excesivamente rápida provoca la formación de hielo intracelular letal, se cree que la velocidad de enfriamiento óptima debe ser lo suficientemente lenta para evitar este efecto letal, pero lo suficientemente rápida como para reducir al mínimo los efectos nocivos de la exposición prolongada a altas concentraciones de sal (Holt, 2000a).

En el campo de la investigación de la crioconservación de semen, se han publicado muchos trabajos en los que se han examinado los efectos al variar algunos parámetros técnicos tales como la concentración de los crioprotectores y otros aditivos o las tasas de enfriamiento y calentamiento en el proceso de descongelación (Holt, 2000a). Debido principalmente a las diferencias observadas entre especies como respuesta a las tasas de congelación y descongelación empleadas, las técnicas y procedimientos actuales deben ser validados empleando el semen de la especie de interés, para de esta forma lograr su conservación a largo plazo sin afectar significativamente su capacidad fecundante (Medina-Robles *et al.*, 2007). Salamon y Maxwell (2000) mencionan que la forma de la curva de congelamiento de los espermatozoides tanto en pajillas como en pellets es importante, por lo tanto, es mejor formar una parábola en lugar de hacer la disminución de la temperatura en forma lineal.

Dorado (2003) por ejemplo, evaluando la crioconservación del semen de macho cabrío utilizó un periodo de equilibrio en un lapso de 5 a 10 minutos como adaptación de la dilución a la temperatura ambiente para posteriormente entrar a refrigeración a 5°C por un lapso de 5 horas. Para la congelación se colocaron las pajillas a 4-5 cm sobre el nitrógeno líquido para utilizar los vapores durante 20 minutos. La

descongelación se realizó sumergiendo las pajillas seleccionadas al azar en baño María a 39°C durante 30s, donde se observaron diferencias estadísticamente significativas entre individuos, tanto en la motilidad masal como en la motilidad individual progresiva.

Carballo (2005), evaluando la interacción de dos diluyentes comerciales de semen para la crioconservación de semen bovino en el trópico húmedo mexicano, usó tres tiempos de equilibrio del semen, los cuales varían en un amplio rango, de 2 a 3 horas, de 4 a 5 horas, y de 8 a 9 horas, obteniendo una diferencia significativa en el tiempo de equilibrio con cada uno de los diluyentes empleados, siendo el mejor tiempo de equilibrio el de 8 a 9 horas para los dos diluyentes.

En cambio, Martínez-Pastor *et al.* (2009) trabajando con semen de ciervo ibérico con diferentes concentraciones espermáticas (baja y alta) realizaron un proceso diferente en donde tubos que contenían el semen diluido los pusieron en vasos de precipitado con 100 mL de agua a temperatura ambiente dejándolos a 5°C durante 2 horas, las muestras se diluyeron de nuevo con un volumen igual de diluyente (1:1) y se dejaron durante una hora más. El semen fue envasado en pajillas de 0.25 mL y congelado con vapores de nitrógeno a 4 cm por encima del nitrógeno líquido durante 10 minutos, posteriormente se transfirieron al nitrógeno líquido, donde se mantuvieron durante un año. La descongelación se llevó a cabo en agua a 65°C durante 6s y obtuvieron mejores resultados en aquellas muestras con menor concentración espermática que en las muestras de eyaculados ricas en espermas.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La crioconservación de espermatozoides juega un papel muy importante tanto en la mejora genética de los hatos como en la conservación de recursos genéticos de especies en peligro de extinción, ya que permite mantener espermatozoides por periodos de tiempo prolongados y el intercambio de material genético entre poblaciones. En la actualidad, si los espermatozoides no están disponibles, no se emplean otras opciones para el almacenamiento de germoplasma de individuos genéticamente valiosos (Holt, 2000a).

Dada la importancia del venado cola blanca como especie, y dado que el macho proporciona la mitad del patrimonio genético de su descendencia, es fundamental estudiar la calidad de su semen para garantizar el éxito reproductivo y la transferencia de sus características genéticas a las siguientes generaciones. Por ello, se plantea analizar los diluyentes comerciales más empleados en la crioconservación de semen de venado, y evaluar las curvas de congelamiento recomendadas para la conservación de espermatozoides, teniendo como base las hipótesis de que la calidad de semen de venado cola blanca no se ve afectada al emplear los medios de dilución Biladyl[®], Triladyl[®] y Bioxcell[®]; y que la curva de congelamiento empleada para ovinos produce la misma calidad de semen que la curva específica para venados tras la descongelación.

IV. MATERIALES Y METODOS

4.1. Localización del área de estudio

La presente investigación se llevó a cabo entre los meses de enero a diciembre del año 2013, en el Laboratorio de Reproducción Asistida ubicado en calle Santos Degollado No. 40, Colonia Centro, en la ciudad y municipio de Salinas de Hidalgo, en el estado de San Luis Potosí, C.P. 78620, (Figura 4); dentro del “módulo de producción de venados La Huerta” con clave de registro como Unidad para la Conservación y Manejo Sustentable de la Vida Silvestre (UMA) ante la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT): DGVS-CR-IN-1305-SLP/11 propiedad del Colegio de Postgraduados, Campus San Luis Potosí (Figura 5). El laboratorio cuenta con la autorización para llevar a cabo la presente investigación dirigida a la reproducción del venado cola blanca.



Figura 4. Localización del laboratorio de Reproducción Asistida “La Huerta” en el municipio Salinas de Hidalgo, San Luis Potosí.



Figura 5. Letrero de identificación de registro ante SEMARNAT del módulo de producción de venados “La Huerta”.

4.2. Animales, manejo e instalaciones

Las colectas seminales para la presente investigación se llevaron a cabo en los meses de febrero, marzo, octubre, noviembre y diciembre de 2013. Para ello se utilizaron tres venados machos (*Odocoileus virginianus mexicanus*) de 3.5 años de edad, provenientes del Parque Nacional Ecológico “El Cimatario” del estado de Querétaro, México. Estos venados se adaptaron al encierro durante 6 meses antes de iniciar la investigación. Los animales fueron alimentados *ad libitum* durante todo el estudio a base de una dieta mediana en fibra, consistente en 30% de alfalfa deshidratada molida y 70% de concentrado comercial para venados con 18% de proteína, marca Trophy Maker-18[®] y agua limpia *ad libitum*.

Los venados estuvieron confinados en corrales por separado para facilitar su manejo, los corrales estaban circundados con malla venadera de 2.30m de alto, en una superficie total de 1,800m² acondicionados con sombras, comederos y bebederos. Protegidos en su periferia con malla-sombra color verde sobre la malla venadera para evitar el estrés debido al movimiento de personas fuera de los corrales.

4.3. Colecta de semen

Se colectaron un total de nueve electroeyaculados, provenientes de tres venados de los cuales se obtuvieron tres eyaculados por venado (3 x 3 = 9 eyaculados). Los venados fueron contenidos químicamente utilizando una mezcla de Zoletil[®] a razón de 4 mg kg⁻¹ más Xilazina en dosis de 2.2 mg kg⁻¹, aplicada por vía remota intramuscular empleando dardos de 2 mL y un rifle de CO₂ marca Dan-Inject[®] modelo JM. Una vez inmovilizados los venados se les cubrieron los ojos con una máscara y se trasladaron al laboratorio donde se les limpió el área del prepucio. En seguida, se contuvieron físicamente a una camilla y empleando guantes de vinil se procedió a extraer las heces del recto. Para lograr desenvainar el pene se siguió el procedimiento descrito por Drew y Amass (2004), donde desde la parte baja y posterior a los testículos se presionó y empujó el pene con un ligero masaje hacia el frente, al mismo tiempo que se hizo la retracción del prepucio para exponer el glande. Una vez que el glande del pene estuvo expuesto, con ayuda de un guante de algodón se sostuvo el glande y se sujetó con una tira de gaza de algodón. En seguida se procedió a introducir en el recto un electroeyaculador Bailey Mod2 de 4 V lubricado con gel dirigiéndolo hacia la

pared ventral del mismo, lo más cercano al pene. Se dieron estímulos eléctricos de 4s de duración con intervalos de 3s de descanso hasta completar 15 estímulos. Generalmente solo fueron necesarios 6 estímulos para lograr el eyaculado que se colectó en un tubo plástico cónico graduado de 15 mL, atemperado a 35°C.

Una vez obtenido el semen, el venado se transportó a su corral y ahí se le aplicó por vía endovenosa el antagonista Tolazine[®] en dosis de 2 mg kg⁻¹ para revertir el efecto de la anestesia, simultáneamente el tubo de colecta se colocó dentro de un baño maría a 35°C e inmediatamente se procedió a su preparación para la valoración y obtención del índice de calidad de semen para venado (ICSV).

4.4. Preparación de los diluyentes

La preparación de cada uno de los diluyentes se llevó a cabo de acuerdo a las indicaciones recomendadas por el fabricante. Drew y Amass (2004) reportan que el volumen de semen en el venado cola blanca va de 2 a 6 mL. Por su parte, Arenas (2011) reportó haber obtenido en promedio 1.5 mL de semen en cada electroeyaculado, por lo que la preparación de los diluyentes para la presente investigación se realizó con base en un máximo de 2 mL de eyaculado para diluirse en proporción de 1:5; de esta manera, para cada eyaculado se preparó una cantidad total de 10 mL de diluyente. De los 10 mL de diluyente, solo se empleó la cantidad necesaria para disolver el volumen total de semen puro obtenido por eyaculado en una proporción de 1:5 (semen:dilutor).

4.4.1. Preparación de Biladyl[®]

El diluyente Biladyl[®] se presenta con tres concentrados. El primero es un coctel de antibióticos AB, el segundo corresponde a la fracción A (sin glicerol) y el tercero a la fracción B (con glicerol). Con estos tres concentrados se puede preparar hasta 1,000 mL (1 L) de diluyente para usarse en la congelación de semen de venado. Para preparar el diluyente total necesario para un eyaculado siempre estará compuesto del 50% de diluyente sin glicerol (fracción A) y 50% de diluyente con glicerol (fracción B).

La mezcla de antibióticos se preparó tomando con una jeringa estéril 12 mL de agua bidestilada estéril, añadiéndola al concentrado AB y agitándola hasta su dilución

completa. La fracción A de diluyente sin glicerol se prepara con 78% (390 mL) de solución madre A, 20% de yema de huevo y 2% del coctel AB. Para ello se vierte todo el contenido del frasco con el concentrado A (49 g) en una probeta graduada y se afora lentamente a 390 mL con agua bidestilada estéril. Luego se adiciona la yema de huevo requerida que se obtiene de huevos frescos y limpios, colocando la yema sobre una hoja de papel filtro estéril rodándola de un lado a otro hasta separar los restos de la clara, en seguida se revienta la membrana de la yema con una presión suave, dejando fluir libremente la yema en un recipiente, mientras que la membrana y restos de clara quedan retenidos en el papel. El volumen de la yema (20%) se obtuvo con una jeringa estéril y luego se le agregó a la solución madre A, homogenizando la mezcla con una varilla de vidrio estéril. Finalmente, se agrega el 2% (10 mL) del coctel AB. La fracción A se atemperó entre 30°C y 35°C en baño maría, quedando lista para ser usada.

La fracción B de diluyente con glicerol (500 mL) se prepara con 80% de solución madre B y 20% de yema de huevo. Para preparar la solución madre B, se toma todo el concentrado de la fracción B y se afora a 400 mL con agua bidestilada. Enseguida se toman 100 mL (20%) de yema de huevo y a estos se le añaden los 400 mL de solución madre B y se agitan para su dilución. Antes de usar la fracción B fue refrigerada a 5°C.

Para realizar la dilución de semen en esta investigación empleando el diluyente Biladyl[®], solo se usaron 0.49 g de concentrado fracción A y 3.9 mL de agua bidestilada para preparar la solución madre y 1 mL de yema de huevo, y 0.1 mL (100 µL) de coctel AB, así se creó un volumen de 5 mL de la fracción sin glicerina. Para la segunda fracción, se emplearon 1 mL de yema de huevo más 4 mL de solución madre B, consistente de 2.5 mL del concentrado fracción B y 1.5 mL de agua bidestilada para obtener un total de 5 mL de la fracción B con glicerina, y así preparar un total de 10 mL para diluir el volumen de semen obtenido a razón de 1 parte de semen por 5 partes de diluyente.

4.4.2. Preparación de Triladyl®

Para la preparación total (1,250 L) del diluyente Triladyl® se agregan los 250 g del concentrado, 750 mL (60%) de agua destilada y 250 mL (20%) de yema de huevo fresca. Para esta investigación, el diluyente Triladyl® se preparó usando 2 mL del concentrado Triladyl®, 6 mL de agua bidestilada y 2 mL de yema de huevo para obtener así, un total de diluyente de 10 mL a fin de diluir el volumen de semen obtenido a razón de 1 parte de semen por 5 partes de diluyente.

4.4.3. Preparación de Bioxcell®

Para la preparación total del contenido de una botella (100 mL) de diluyente Bioxcell®, IMV-Technologies se usan 400 mL de agua estéril para obtener una solución final de 500 mL. Sin embargo, para realizar la dilución de semen de venado cola blanca en esta investigación, se usaron solo 2 mL de concentrado Bioxcell® y 8 mL de agua bidestilada para obtener un concentrado total de 10 mL para diluir el volumen de semen obtenido a razón de 1 parte de semen por 5 partes de diluyente.

4.5. Evaluación del semen

La evaluación del semen se hizo a partir de la estimación de las variables motilidad masal, motilidad individual, concentración espermática, porcentaje de espermatozoides vivos y porcentaje de espermatozoides normales. Los valores de estas variables fueron empleados para calcular el índice de calidad de semen para venado (ICSV) de acuerdo al modelo construido por Clemente-Sánchez *et al.* (2012):
$$ICSV = (MoM/98)(0.8038) + (MoI/98)(0.0176) + (CoE/9315)(0.0957) + (EsV/98)(0.0827) + (EsN/99)(0.0002) \times 100$$

Dónde: ICSV= índice de calidad de semen para venado

MoM= porcentaje de motilidad masal

MoI= porcentaje de motilidad individual

CoE= total de espermias por eyaculado (concentración espermática)

EsV= porcentaje de espermatozoides vivos

EsN= porcentaje de espermatozoides normales

4.6. Estimación de las variables empleadas en el modelo del ICSV

De acuerdo a los procedimientos descritos por Arenas (2011), las variables fueron estimadas una vez conocido el volumen del eyaculado, considerando solo aquel semen que mostró un color blanco-nacarado o amarillo-cremoso, con ausencia de agentes extraños como pelo, polvo, orina o sangre. Con el propósito de conocer el efecto de los diluyentes sobre la calidad del semen, los nueve eyaculados obtenidos fueron diluidos con los tres diluyentes a probar, mismos que fueron evaluados inmediatamente de haber sido diluidos.

La motilidad masal (MoM) fue estimada colocando 10 μ L de semen diluido, con cada uno de los diluyentes a evaluar, sobre un portaobjetos atemperado a 35°C sobre una platina térmica. Se observó al microscopio con objetivo de 10x, evaluando la presencia de ondas o remolinos formados por el movimiento de las células espermáticas dentro de un campo de visión, ubicando dicho campo en el borde o límite de la gota de semen. La evaluación se hizo de forma subjetiva y se calificó en porcentaje de acuerdo al criterio asignado por el observador quien siempre fue la misma persona.

La motilidad individual (Mol) se calculó depositando una gota de 10 μ L de semen diluido sobre un portaobjetos atemperado a 35°C con una gota de citrato de sodio al 2.9%, colocando sobre éste un cubreobjetos también atemperado. Se observó un campo microscópico con un objetivo de 40x y se estimó del total de espermatozoides observados el porcentaje de espermatozoides que se movían en forma progresiva rectilínea (hacia adelante) y que atravesaron el campo de observación.

La concentración espermática (CoE) fue estimada colocando previamente en un tubo Vacutainer® 2 mL de solución de Hayem a la cual se le agregaron 10 μ L de semen diluido para obtener una relación 1:200, esta mezcla se homogenizó invirtiendo el tubo lentamente varias veces. Una vez homogenizado, se dejó reposar durante 5 minutos, y se tomaron 10 μ L de la mezcla para cargar una cámara Neubauer depositándolos sobre cada retículo de la cámara. Posteriormente se colocó el cubreobjetos de la cámara sobre la muestra y se dejó reposar otros 5 minutos para sedimentar las células y permitir su conteo. El conteo se realizó en 5 cuadrantes de la cámara usando solo los cuadrantes de las esquinas y el del centro. Para el conteo se

utilizó el microscopio con un objetivo de 40x. Dentro de cada cuadrante se contaron los espermatozoides presentes. Una vez contados los espermatozoides en los cinco cuadrantes a cada lado de la cámara, se promedió el número de espermatozoides por lado y se multiplicó por 10×10^6 para así determinar el número total de espermatozoides por mililitro de eyaculado diluido, y multiplicarlo por el total del volumen del eyaculado diluido para obtener la CoE.

Para determinar el porcentaje de espermatozoides vivos (EsV) se colocaron 10 μ L de semen diluido sobre un extremo de un portaobjetos atemperado a 35°C a los cuales se le agregó 30 μ L de tinción eosina-nigrosina también atemperada. Se mezclaron ambos componentes con la punta de una micropipeta por 20 segundos extendiendo la mezcla a todo lo ancho del portaobjetos. Posteriormente, con ayuda de otro portaobjetos apoyado sobre el borde de la mezcla se extendió ésta a lo largo del portaobjetos. Se dejó secar por un minuto y se procedió a su evaluación. Para sacar el porcentaje de espermatozoides vivos se observó el frotis con un objetivo de 40x contando todos los espermatozoides en un campo visual que estaban teñidos, considerando los no teñidos como vivos.

La determinación del porcentaje de espermatozoides normales (EsN) se realizó tomando el mismo frotis para la determinación del porcentaje de espermatozoides vivos. Se observó dentro de un campo de observación a 40x todas las células que mostraban tener una forma anormal a lo que es la forma original de un espermatozoide de venado (cabeza ovalada, cuello recto, cola larga, delgada, sin pliegues o curvaturas). De igual forma, todas las células espermáticas que se encontraron incompletas como cabezas o colas desprendidas y de acuerdo al total de células observadas constituyeron el porcentaje de espermatozoides anormales.

4.7. Envasado y preparación de las muestras

Para el envasado del semen se utilizaron tubos Eppendorf Easypet[®] de 2 mL, los cuales fueron identificados de acuerdo al diluyente y curva de congelamiento empleados. El envasado se hizo a temperatura ambiente depositando 0.5 mL dentro de los tubos, procedimiento que se hizo en un lapso de tiempo de 10 minutos. De cada eyaculado se envasaron cuatro tubos ($9 \times 4 = 36$ en total), de los cuales se

hicieron por duplicado las estimaciones de las variables de respuesta. De los 36 tubos (muestras), 18 fueron empleadas para conocer el efecto de los diluyentes antes de congelar, y las 18 restantes fueron empleadas para conocer el efecto de las curvas de congelamiento al tiempo de descongelar. El arreglo matricial de los tratamientos y muestras para antes de congelar y al tiempo de descongelar fue el siguiente:

Tratamiento	Repeticiones (muestras) Eyaculado / Venado		
	Bil Ov	EY ₁ V ₁	EY ₁ V ₂
Bil Ve	EY ₁ V ₁	EY ₁ V ₂	EY ₁ V ₃
Tri Ov	EY ₂ V ₁	EY ₂ V ₂	EY ₂ V ₃
Tri Ve	EY ₂ V ₁	EY ₂ V ₂	EY ₂ V ₃
Bio Ov	EY ₃ V ₁	EY ₃ V ₂	EY ₃ V ₃
Bio Ve	EY ₃ V ₁	EY ₃ V ₂	EY ₃ V ₃

Bil= Biladyl[®], Tri= Triladyl[®], Bio= Bioxcell[®]

Ov= curva de congelación para ovino-caprino, Ve= curva de congelación para venado

EY_(n)= número de eyaculado, V_(n)= número de venado

4.8. Curvas de congelamiento

Las curvas de congelamiento tanto la de ovino-caprino como la de venado fueron aplicadas de forma manual. Para la curva de congelamiento recomendada para semen de ovino y caprino, inmediatamente después de haber envasado el semen, los tubos fueron colocados en bastones de aluminio y a su vez, puestos dentro de un frasco de cristal con algodón y expuestos a refrigeración (5°C) durante una hora. Enseguida, los bastones con los tubos se expusieron a vapores de nitrógeno líquido sobre un bastidor separado 5cm del nivel de nitrógeno por un lapso de 15 min; pasados estos 15 min, los bastones se sumergieron en el nitrógeno por otros 15 min y finalmente, se colocaron dentro de un termo (-196°C) para su almacenamiento (Figura 6).

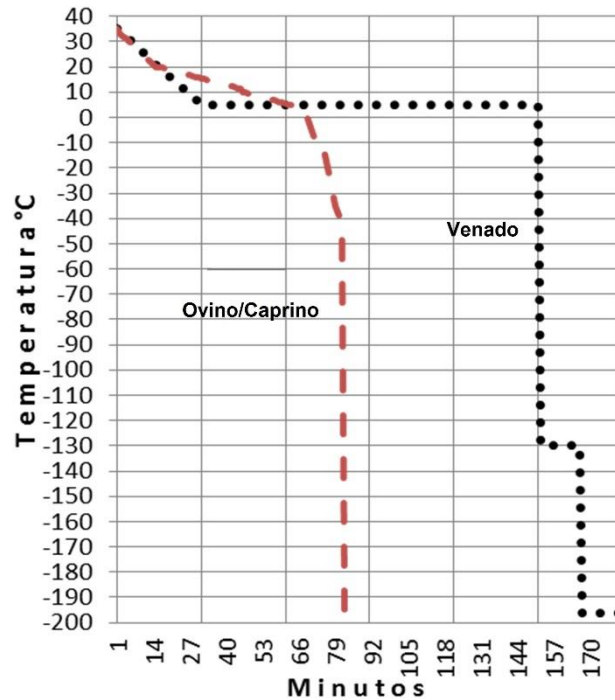


Figura 6. Curvas de congelamiento para la crioconservación de espermatozoides de venado cola blanca usadas para determinar su efecto sobre la calidad de semen al descongelar.

Para aplicar la curva de congelamiento propuesta para venado, los tubos también fueron colocados en bastones de aluminio y puestos dentro de un frasco de vidrio con algodón para ser llevados a refrigeración (5°C), pero ahora durante tres horas según lo recomendado por Drew y Amass (2004). Inmediatamente después, en un recipiente térmico que contenía un espesor de 10cm de nitrógeno líquido, se colocaron los bastones de aluminio sobre un bastidor a 5cm de distancia del nivel de nitrógeno para que los tubos recibieran los vapores de nitrógeno por un lapso de 15 min; pasado este tiempo, los bastones se sumergieron en el nitrógeno por otros 15 min y finalmente se pasaron al termo de almacenamiento (Figura 6).

4.9. Evaluación de las curvas de congelamiento

Una vez realizado el congelamiento de las 18 muestras seminales con cada una de las curvas a probar, se procedió a descongelar el semen por un lapso de 60 segundos en baño maría a 36°C. Enseguida, se estimaron las cinco variables consideradas en el ICSV, tal y como se mencionó en el apartado 4.6 de esta tesis. Con estos datos se calculó nuevamente el ICSV, ahora sobre las muestras que recibieron la curva de congelamiento respectiva y posterior a su descongelamiento.

4.10. Tratamientos

Los tratamientos estuvieron formados por la combinación de los tres diluyentes con las dos curvas de congelamiento ($3 \times 2 = 6$ tratamientos), y a cada tratamiento se le asignaron tres repeticiones ($6 \times 3 = 18$ muestras en total para antes de congelar y 18 para el tiempo de descongelar), como ya se mencionó anteriormente, las repeticiones fueron las 4 muestras de semen que se obtuvieron de cada eyaculado ($4 \times 9 = 36$ muestras), a fin de que cada venado participara de forma proporcional en cada tratamiento.

4.11. Análisis estadístico

Para conocer la tendencia en la aplicación de los diluyentes empleados, primeramente se corrió un análisis multivariado (cluster) como técnica exploratoria mediante el cálculo del Índice Euclidiano que agrupa los diluyentes por su semejanza al considerar las cinco variables de respuesta empleadas en el modelo del ICSV. De igual manera, se hizo para conocer la tendencia de las dos curvas de congelamiento empleadas, utilizando para ello el programa Statistica (v 7.0).

Conocidas las tendencias del comportamiento de los diluyentes y de las curvas de congelamiento, se realizó un ANVA con procedimiento GLM sobre la variable de respuesta ICSV del semen diluido para antes y después de congelar, con el propósito de conocer el efecto del diluyente y la curva de congelamiento. Simultáneamente se realizó una prueba de rango múltiple de Tukey ($p < 0.05$) para seleccionar, de ser el caso, el mejor de los diluyentes y curva de congelamiento. El análisis estadístico se hizo empleando el programa SAS (v 9.1.3).

V. RESULTADOS

5.1. Estimación del Índice de Calidad de Semen para Venado (ICSV)

Como resultado del análisis del semen, en el Cuadro 1 se muestran los valores obtenidos con el modelo al estimar el Índice de Calidad de Semen para Venado (ICSV) que agrupa como criterio de valoración a los cinco componentes del modelo: motilidad masal (MoM), motilidad individual (Mol), concentración espermática (CoE), espermias vivos (EsV), y espermias normales (EsN).

Al obtener el ICSV puro (antes de la dilución y congelamiento), este fue en un rango de 15.53 a 89.46% con promedio de 56.55%, lo que lo clasifica en un rango de malo a muy bueno, con promedio de regular, considerando el criterio de clasificación del modelo.

Todas las muestras de semen al ser sometidas al tratamiento de los diluyentes y las curvas de congelamiento, sufrieron reducción en su índice de calidad por efecto de los tratamientos. De esta manera, el ICSV con semen diluido antes de congelar varió en un rango de 10.37 a 66.02%, con promedio de 47.38% (± 19.12); lo que indica que de acuerdo a los criterios de clasificación del modelo, el semen diluido resultó de malo a bueno. De la misma manera, el ICSV al momento de descongelar resultó con otra disminución, mostrando una variación de 7.09 a 59.39%, con promedio de 33.64% (± 19.43), obteniéndose así semen que fue de malo a regular, de acuerdo al criterio de clasificación del modelo.

El fenómeno gradual de descenso en las variables de movilidad, concentración y espermias vivos-muertos en la evaluación del semen, desde su estado fresco, hasta descongelado, presentó 30% de reducción.

Cuadro 1. Cálculo del Índice de Calidad de Semen para Venado diluido antes de congelar y al momento de descongelar.

Diluyente / Curva de congelamiento (tratamiento)	Repetición	ICSV % Antes de congelar	ICSV % Al descongelar
Triladyl® / Ovino	Venado 1	49.51	47.10
	Venado 2	61.74	58.17
	Venado 3	52.81	9.39
Triladyl® / Venado	Venado 1	49.51	39.37
	Venado 2	61.74	55.27
	Venado 3	15.04	12.00
Bioxcell® / Ovino	Venado 1	66.02	52.25
	Venado 2	56.21	44.62
	Venado 3	59.98	12.70
Bioxcell® / Venado	Venado 1	66.02	59.39
	Venado 2	56.21	47.25
	Venado 3	60.16	21.97
Biladyl® / Ovino	Venado 1	59.06	32.97
	Venado 2	10.37	7.09
	Venado 3	15.30	12.87
Biladyl® / Venado	Venado 1	59.06	56.73
	Venado 2	32.44	23.05
	Venado 3	21.80	13.41

5.2. Respuesta de los diluyentes

El resultado del análisis exploratorio de agrupamiento multivariado (cluster), mostrado por el Índice Euclidiano, sobre el ICSV al momento de aplicar los diluyentes (antes de congelar), hubo semejanza entre Bioxcell® y Triladyl®, pero Biladyl® se separó considerablemente ($p < 0.05$) de los dos restantes. El dendograma que muestra los resultados de este análisis se presenta en la Figura 7.

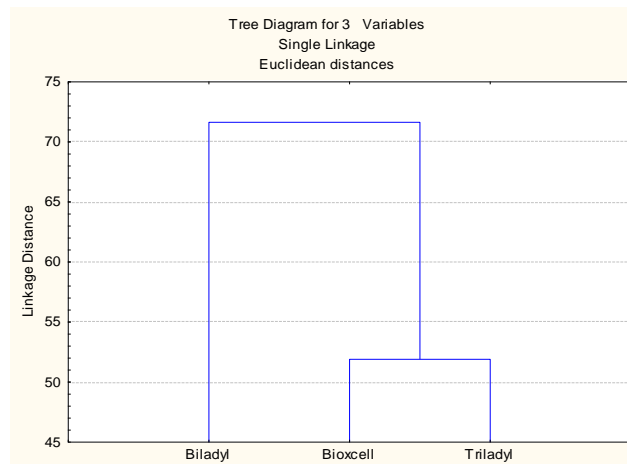


Figura 7. Dendrograma de agrupación del comportamiento de diluyentes empleados en la crioconservación de semen de venado, al momento de diluir, antes de congelar.

Esta tendencia fue confirmada con los resultados del ANVA que mostró que existe diferencia ($p = 0.0301$) entre los diluyentes Biladyl[®], Triladyl[®] y Bioxcell[®]. Los valores del ICSV diluido antes de congelar, mostraron promedios de 60.77% para el diluyente Bioxcell[®], mientras que para Triladyl[®] fue de 48.39% y para Biladyl[®] de 33.01%. La prueba de Tukey mostró que entre los diluyentes Bioxcell[®] y Triladyl[®] (60.77 y 48.39%) no hay diferencia ($p > 0.05$). Comportamiento similar entre los diluyentes Biladyl[®] y Triladyl[®] (33.01 y 48.39%; $p > 0.05$); en cambio el diluyente Bioxcell[®] se mantuvo diferente a Biladyl[®], por lo que Bioxcell[®] podría sugerirse como el mejor diluyente (60.77%) para conservar semen fresco de venado cola blanca. Sin embargo, el ANVA no mostró diferencias ($p = 0.3684$) entre diluyentes cuando se analizaron las muestras al tiempo de descongelar debido a que el ICSV diluido con Bioxcell[®] disminuyó al punto de no manifestar diferencia alguna con los otros diluyentes (Cuadro 2).

Cuadro 2. Separación de Medias con prueba de rango múltiple de Tukey para el efecto entre diluyentes ($p = 0.0301$) empleados en la crioconservación de semen de venado cola blanca.

Diluyentes evaluados	Media (ICSV %)	Tukey ($p < 0.05$)
Con efecto del diluyente ($p = 0.0301$) antes de congelar:		
Bioxcell®	60.77	A
Triladyl®	48.39	A B
Biladyl®	33.01	B
Sin efecto del diluyente ($p = 0.3684$) al tiempo de descongelar:		
Bioxcell®	39.70	
Triladyl®	36.89	
Biladyl®	24.36	

5.3. Respuesta de las curvas de congelamiento

El resultado del análisis exploratorio se muestra en la Figura 8, donde la curva de congelamiento empleada para ovinos y caprinos presenta semejanza con la curva de congelamiento recomendada para venados, de acuerdo a las distancias Euclidianas encontradas en el análisis. Cuando estas distancias son convertidas a porcentaje de similitud, el comportamiento de las curvas mostró un porcentaje del 50% de semejanza.

Es importante mencionar que la diferencia en el procedimiento llevado a cabo entre las curvas de congelamiento probadas, consistió solo en la variación del tiempo de enfriamiento (5°C) que permanece el semen diluido antes de comenzar la reducción de temperatura hasta los -196°C . En la curva de ovinos y caprinos el tiempo de permanencia a los 5°C fue de una hora, mientras que para la curva de venado fue de tres horas. A partir de estos tiempos, el procedimiento de ambas curvas fue el mismo.

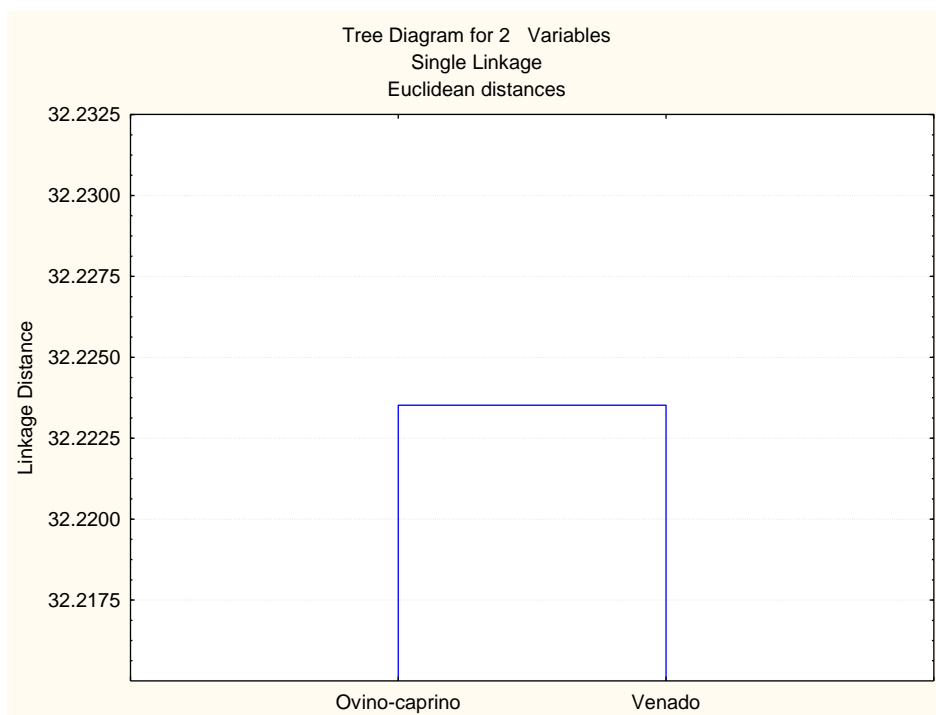


Figura 8. Dendrograma de agrupación de las curvas empleadas para ovinos y caprinos y la curva para venados en la crioconservación de semen de venado al momento de descongelar.

El resultado del análisis exploratorio fue confirmado al conocer el efecto de las curvas de congelamiento sobre el ICSV, donde el ANVA no mostró diferencias ($p = 0.5502$) al aplicar las curvas de congelamiento recomendadas para ovino y caprino y la curva recomendada para venado. Los valores promedio del ICSV estimado para cada curva sobre las muestras de semen al momento de descongelar, se muestran en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Valores promedio del ICSV estimado sobre las muestras de semen de venado cola blanca diluidas al tiempo de descongelar de acuerdo a las curvas de congelamiento probadas.

Curvas de congelamiento evaluadas	Media (ICSV %)
Sin efecto de la curva de congelamiento ($p = 0.5502$):	
Curva recomendada para venado	36.50
Curva recomendada para ovino y caprino	30.80

VI. DISCUSION

El argumento de que los eyaculados naturales son generalmente de mejor calidad que los electroeyaculados, no ha sido aún bien demostrado al menos en venados. Si bien la calidad de semen puro colectado de acuerdo al ICSV fue en promedio de regular, esto se puede explicar por el error experimental que se presentó al asignar la MoM a las muestras, dado que en ocasiones esta fue inclusive inferior a la Mol, casos que no pueden presentarse, ya que la MoM debe ser por lo menos igual o mayor que la Mol. El uso de técnicas de colecta de semen para ganado doméstico han sido adaptadas para su uso en venados con varias modificaciones, de esta manera la recolección de semen por electroeyaculación se ha realizado con éxito en ciervos y se han obtenido gestaciones empleando tanto semen fresco como congelado, convirtiéndose en una técnica eficiente (Asher *et al.*, 2000; Holt, 2000a; Drew y Amass, 2004 y Mendoza, 2008). Aunque las colectas de semen por electroeyaculación deben realizarse bajo el efecto de anestesia o tranquilizantes, Holt (2000) hace referencia que la electroeyaculación bajo anestesia da como resultado una calidad variable de semen, debido al menor tiempo empleado en la colecta, pues en la presente investigación el tiempo promedio fue de 5 min, y el volumen promedio fue de 1.3 mL, estando este volumen dentro del rango reportado por Drew y Amass (2004). Sin embargo, la calidad del semen obtenida en el presente estudio es muy contrastante al comparar los resultados con los reportados por Arenas (2011), quién reporta ICSV obtenidos en un rango de bueno a excelente.

Las características del semen que se sabe influyen en la fertilidad del semen siguen siendo de utilidad en la actualidad para la valoración del semen de muchas especies (Drew y Amass, 2004; Malo *et al.*, 2005; Martínez-Pastor *et al.*, 2009; Arenas, 2011), y al ser éstas consideradas en el modelo desarrollado por Clemente-Sánchez *et al.* (2012) se convierten en una herramienta que estandariza su valor en un índice para calificar el semen de venado, criterio que coincide con Muiño *et al.* (2005), quién menciona que la valoración de la motilidad como único parámetro de calidad seminal no es suficiente para predecir la capacidad fecundante del semen, dado que la función reproductiva de los ungulados está influenciada por diversos factores ambientales relacionados con el manejo, la nutrición y la sanidad, principalmente (Hafez y Hafez, 2002), ocasionando alteraciones que repercuten en la calidad y cantidad de semen, aún más en el caso de los cérvidos silvestres, donde las

condiciones ambientales y nutricionales pueden no estar controladas, por lo que los autores del ICSV recomiendan el uso de este índice como una herramienta para la estandarización del proceso en la valoración del semen.

Respecto a los resultados del ICSV con semen antes de congelar y diluido con Biladyl[®] el cual se observó separado de Bioxcell[®] y Triladyl[®], coincide con Roldán *et al.* (2009), quienes obtuvieron que en el semen de lince ibérico hubo mayor porcentaje de MoM en la dilución con diluyente a base de Tes–Tris (TEST) que en la del diluyente a base de Tris (Biladyl[®]). Este efecto podría darse como menciona García (2002), respecto a los trabajos de Later *et al.* (1937), donde el tiempo de sobrevivencia de espermatozoides de conejo, cerdo, toro y carnero, se atribuyó a un efecto tóxico de las altas concentraciones de glicerol, debido a que este diluyente se adhiere al semen en dos fracciones, la primera sin glicerol y la segunda con glicerol. Existen pocas referencias de investigación respecto al uso de este diluyente y el efecto de la utilización por separado de las fracciones que lo constituyen, aunque de acuerdo con Salamon y Maxwell (1995), el crioprotector más utilizado es el glicerol y sus concentraciones han sido muy estudiadas. La concentración del crioprotector depende del dilutor y especialmente de la presión osmótica (Watson, 2000).

En cuanto al uso de Triladyl[®], Martínez-Pastor *et al.* (2009) mencionan que este extensor ha sido utilizado para la conservación de semen de rumiantes salvajes. En la presente investigación se tiene a Triladyl[®] como el segundo mejor antes de congelar, lo que coincide con Asher *et al.* (2000), quienes reportan su uso en semen de venado chital colectado por electroeyaculación, y lo reportado por Carballo (2005) en la conservación de semen de bovino, donde la motilidad espermática fue superior con Triladyl[®], pudiendo presentarse esta diferencia por las condiciones ambientales y la especie en que se desarrolló el experimento.

El uso de Bioxcell[®] en las muestras de semen de venado cola blanca presentó gran semejanza con el diluyente Triladyl[®]; pero no con el diluyente Biladyl[®], por lo que el Bioxcell[®] se presenta como el mejor diluyente para conservar semen fresco, comparado con los otros dos, situación que coincide con Gil *et al.* (2003), donde reportan que el Bioxcell[®] es una alternativa para la conservación de semen de carnero. De igual forma, Sariözkan *et al.* (2010), demostraron que el uso de Bioxcell[®]

con o sin la centrifugación y lavado de espermatozoides, facilita la conservación de semen en caprinos. Con lo anterior, se rechaza la hipótesis nula establecida en esta investigación, en el sentido que no hay diferencia alguna entre los diluyentes analizados, con respecto al ICSV antes de su congelamiento.

Dado que entre las dos curvas de congelamiento probadas (una hora de refrigeración a 5°C “curva ovino y caprino” y 3 horas de refrigeración 5°C “curva de venado”) para congelar semen de venado cola blanca no se encontró diferencia significativa, se considera a los espermatozoides de venado como una especie que soportan una velocidad de enfriamiento rápida, puesto que Holt (2000a) recomienda que la velocidad de enfriamiento óptima deba ser lo suficientemente lenta para evitar un efecto letal a la célula, pero lo suficientemente rápida como para reducir al mínimo los efectos nocivos de la exposición prolongada a altas concentraciones de sal.

De acuerdo a los resultados obtenidos con las curvas usadas para congelar semen de ovinos y caprinos y la de venado, se coincide con Salamon y Maxwell (2000), en que la forma de la curva deba ser de una parábola, en lugar de hacer la disminución de temperatura en forma lineal.

Respecto a que los cambios en la tasa de enfriamiento, intervalos de temperatura y rangos de temperatura provocan daños letales a la célula, el enfriamiento de semen debe realizarse de forma lenta, con el fin de mantener las características de las proteínas del plasma seminal que interaccionan con las del núcleo espermático, y que según la sensibilidad de los espermatozoides al “shock” por frío está determinado por la especie, características del individuo y las características propias del eyaculado (Watson 1995; Byrne *et al.* 2000; Yoshida, 2000; Dorado 2003).

Finalmente, se propone darle seguimiento a investigaciones con el semen de venado, probando nuevas alternativas de diluyentes de reciente ingreso en el mercado como el AndroMed[®], así como probar diversas temperaturas y tiempo de descongelación como lo reporta Dorado (2003), donde la descongelación del semen se realizó sumergiendo las pajillas en baño María a 39°C durante 30s, mientras que Martínez-Pastor *et al.* (2009) realizaron la descongelación de semen de ciervo ibérico en agua a 65°C durante 6s.

VII. CONCLUSIONES

Considerando el desarrollo de la presente investigación y con base en sus resultados, se concluye lo siguiente:

De los diluyentes Biladyl[®], Triladyl[®] y Bioxcell[®], se recomienda emplear Bioxcell[®] para la conservación de semen fresco de venado cola blanca.

El diluyente Bioxcell[®] resulta más conveniente usarlo en semen fresco de venado, dado que no está elaborado a base de proteínas de origen animal que pudieran reducir la fertilidad de las células espermáticas.

Tanto la curva que se usa en la crioconservación de semen de ovino y caprino y la curva recomendada para semen de venado, pueden ser utilizadas sin afectar el Índice de Calidad de Semen para Venado.

La curva de congelamiento para semen de ovino y caprino sería recomendada, dada la reducción en el tiempo empleado en el procedimiento de congelación dado que se ahorran tres horas en el proceso.

Finalmente, el ICSV empleado como variable de respuesta fue una herramienta útil en la valoración de los diluyentes y curvas de congelamiento probadas en la presente investigación.

VIII. LITERATURA CITADA

Amann, R.P., L. Johnson, D.I. Thompson., B.W. Pickett. 1976. Dairy spermatozoa production, epididymal spermatozoa reserves and transit time of spermatozoa through the epididymis of the Rhesus Monkey. *Biol. Reprod.* 15:586-592.

Aranda, M., M.Gual-Díaz, O. Monroy-Vilchis, L.C. Silva, A. Velázquez. 1999. Aspectos etnoecológicos: aprovechamiento de la flora y fauna silvestres en el sur de la Cuenca de México. www.ciga.unam.mx/investigadores/zacatucho/PDF/.../6131-14.pdf

Arenas, B.P. 2011. El fotoperiodo y su relación con la reproducción del venado cola blanca (*Odocoileus virginianus miquihuanensis*) en el altiplano potosino. Tesis MC. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México. 44 p.

Asher, G.W., D.K. Berg, G. Evans. 2000. Storage of semen and artificial insemination in deer. *Animal Reproduction Science* (62): 195-211.

Asher, G.W. 2011. Reproductive cycles of deer. *Animal Reproduction Science* 124: 170-175.

Byrne, G.P., P. Lonergan, M. Wade, P. Duffy, A. Donovan, J.P. Hanrahan, M.P. Boland. 2000. Effect of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility in vivo and in vitro. *Animal Reproduction Science* 62:265–275.

Buxadé, C. 1994. Zootecnia. Bases de producción animal. Tomo II. Reproducción y Alimentación. Grupo Mundi-Prensa. P 51.

Carballo, G.D.M. 2005. Comparación de dos diluyentes comerciales para criopreservar semen de bovino bajo condiciones de campo en el trópico húmedo. Tesis profesional. Universidad Veracruzana, Facultad de medicina veterinaria y zootecnia. Veracruz, Ver. 42 p.

Clemente-Sánchez, F., P. Arenas-Baéz, J. Gallegos-Sánchez, G. Mendoza-Martínez, O.C. Rosas-Rosas. 2012. Índice de calidad de semen fresco de venado cola blanca aplicado a la selección de reproductores. En *Memorias del XIII Simposio sobre venados de México*. Toluca, Estado de México. P 57–61.

De Jonge, J.C. y L.R.C. Barratt. 2006. *The Sperm Cell Production, Maturation, Fertilization, Regeneration*. Cambridge University Press. P. 7 359pp.

De las Heras, M.A., A. Valcárcel, C. Furnus, L. Pérez, D. Moses, H. Baldasarre. 1996. Changes in sperm-bound amidase activity suggest subtle damage to ram sperm acrosome by freezing/thawing, not detected by light microscopy. *Animal Reproduction Science* 45:81-89.

Dorado, J.M.M. 2003. Respuesta a la congelación-descongelación del esperma de macho cabrío. Tesis doctoral. Universidad de Cordoba, España. 203pp.

Drew, M. y K. Amass. 2004. Semen production and artificial insemination of white-tailed deer. Safe-Capture International Inc.

Galindo-Leal, C. y M. Weber. 1998. El venado de la Sierra Madre Occidental. Ecología, Manejo y Conservación. EDICUSA-CONABIO. 272pp.

Gallina, S. y L.A. Escobedo-Morales. 2009. Análisis sobre las Unidades de Manejo (UMAs) de ciervo rojo (*Cervus elaphus* Linnaeus, 1758) y wapití (*Cervus canadensis* Erxleben, 1777) en México: problemática para la conservación de los ungulados nativos. Mongabay.com Open Access Journal - Tropical Conservation Science. Vol.2 (2):251-265.

García-Álvarez, O., A. Maroto-Morales, M.D. Pérez-Guzmán, R. Arias, A.J. Soler. 2007. Efecto del método de recogida (Electroeyaculación y Postmortem) sobre la calidad seminal en semen fresco y descongelado de ovino de la variedad negra de la raza manchega. SEOC. P324-327. <http://www.exopol.com/seoc/docs/brnqx1d0.pdf> Consultado agosto 2013.

García, B.D. 2002. Influencia del dilutor, raza y mes en la crioconservación del semen ovino. Tesis MC. Universidad Autónoma Chapingo, México. 82pp.

Garde, J.J., M.C. Estes, M.R. Fernández-Santos, A.J. Soler, V. Montoro. 2005. Biotecnologías reproductivas aplicadas a la conservación y manejo de especies silvestres. <http://www.racve.es/actividades/detalle/id/332> Real academia de ciencias veterinarias.

Gil, J., M. Rodríguez-Iraoqui, N. Lundeheim, L. Soderquist, H. Rodríguez-Martínez. 2003. Fertility of ram semen frozen in Bioexcell[®] and used for cervical artificial insemination. Theriogenology 59:1157-1170

González, A., J. Lobato, A. Velázquez, A. Torres. 2003. El manejo del venado cola blanca: la experiencia de una comunidad indígena para el manejo y uso sustentable de la vida silvestre. Pp. 531-547, in: A. Velázquez, A. Torres y G. Bocco (compiladores): Las Enseñanzas de San Juan: Investigación Participativa para el Manejo Integral de Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología (INE-SEMARNAT), México, D. F.

Guerra, R.M.M., S. Calme, T.S. Gallina, P.E.J. Naranjo. 2010. Uso y Manejo de Fauna Silvestre en el norte de Mesoamérica. Secretaria de Educación de Veracruz. INECOL. ECOSUR.

Hafez E.S.E. y B. Hafez. 2002. Reproducción e inseminación artificial en animales. Séptima edición. McGraw-Hill Interamericana. 694p.

Halls, L.K. 1984. White-tailed deer. Ecology and Management "A Wildlife Management Institute book." Stackpole books. Harrisburg, PA. 870p.

Hernández, M.P.M. 2010. Dinámica espacio-temporal del venado cola blanca (*Odocoileus virginianus texanus*) en el norte de México. Tesis MC. Instituto Politécnico Nacional. Centro de Biotecnología Genómica. Reynosa, Tamaulipas, México. Pp. 8-9.

Holt, W.V. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. Animal Reproduction Science 62:3-22.

Holt, W.V. 2000a. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. Theriogenology 53:47-58.

IMV Technologies. 2012. Biotecnologías de la reproducción bovina. www.imv-technologies.com

Johnson, A.L., F.K. Weitze, P. Fiser, C.M.W. Maxwell.2000. Storage of boar semen. Animal Reproduction Science 62:143-172.

Logan, L.K.G. 2004. Caracterización genética y morfométrica de cuatro subespecies de venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*) en la zona Centro-Norte del Noreste de México. Tesis MC. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México. Pp 4, 6,7.

López, G.M. 2009. Conocimiento y aprovechamiento local del venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*) en Iliatenco, Guerrero. Tesis MT. Colegio de Postgraduados. Puebla, Puebla. 69pp.

López, S.J.H. y M.H. Baddi. 2000. Depredación en crías de venado cola blanca (*Odocoileus virginianus texanus*) por coyote (*Canis latrans*) en una unidad de manejo y aprovechamiento del norte de nuevo Leon, México. Nota Científica. Acta Zool. Mex. (n.s.) 81: 135-138.

Malo, A.F., J.J. Garde. A.J. Soler, A.J. García, M. Gomendio, E.R.S. Roldan. 2005. Male fertility in natural populations of red deer is determined by sperm velocity and the proportion of normal spermatozoa. Biology of Reproduction 72(4):822-829.

Mandujano, R.S. 2010. Venados: animales de los dioses. Secretaria de Educación de Veracruz - INECOL A.C. 53pp.

Martínez-Pastor, F., L. Anel, C. Guerra, M. Álvarez, A.J. Soler, J.J. Garde, C. Chamorro, P. de Paz. 2006. Seminal plasma improves cryopreservation of Iberian red deer epididymal sperm. *Theriogenology* 66:1847-1856.

Martínez-Pastor, F., F. Martínez, M. Álvarez, A. Maroto-Morales, O. García-Álvarez, A.J. Soler, J.J. Garde, P. de Paz, L. Anel. 2009. Cryopreservation of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) spermatozoa obtained by electroejaculation. *Theriogenology* 71:628–638

Medina-Robles, V.M., E. Sánchez-Carvajal, Y.M. Velasco-Santamaria, P.E. Cruz-Casallas. 2007. Crioconservación de semen bovino usando un congelador programable (CL-8800) y determinación de su calidad postdescongelación por medio un sistema de análisis espermático asistido por computador (CASA). *Orinoquia*, vol. 11, núm. 1, pp. 75-86, Universidad de Los Llanos Colombia.

Mendoza, N.P. 2008. Efecto de la metionina protegida en el crecimiento de astas y evaluación del semen de ciervo rojo (*Cervus elaphus*) en el trópico. Tesis DC. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México. 103 p.

Mirarchi, R.E., P.F. Scanlon, R.L. Kirkpatrick. 1977. Annual changes in spermatozoan production and associated organs of white-tailed deer. *J. WILDL. MANAGE.* 41(1):92-99.

Molina, F.C., G. Evans, W.M.C. Maxwell. 1994b. Incorporation of penetrating cryoprotectants in diluents for pellet-freezing ram spermatozoa. *Theriogenology* 42:849-858.

Muiño, R., M. Fernández, H. Areán, J.L. Viana, M. López, A. Fernández, A.I. Peña. 2005. Nuevas tecnologías aplicadas al procesado y evaluación del semen bovino en centros de inseminación artificial. *ITEA*. Vol. 101(3): 175-191.

Müller-Schlösser, F., Minitüb Manual 13500/0004. Biladyl, Triladyl. www.minitube.com Consultado abril 2012.

Naranjo, E.J., J.C. López-Acosta, R. Dirzo. 2010. La cacería en México. *Biodiversitas*. 91:6-10. CONABIO. México.

Ortiz, M.T., S. Gallina, S.M. Briones, G. González. 2005. Densidad poblacional y caracterización del hábitat del venado cola blanca (*Odocoileus virginianus oaxacensis*, Goldman y Kellog, 1940) en un bosque templado de la sierra norte de Oaxaca, México. *Acta Zoológica Mexicana* (nueva serie), año/vol. 21, numero 003. Instituto de Ecología A.C. Xalapa, México. Pp. 65-78.

Pérez, E.M. y J. Ojasti. 1996. La utilización de la fauna silvestre en la América Tropical y recomendaciones para su manejo sustentable en las sabanas. Sociedad Venezolana de Ecología. ECOTROPICOS 9(2): 71-82

Roldán, E.R.S., N. Ganan, R. González, J.J. Garde, F. Martínez, A. Vargas, M. Gomendio. 2009. Evaluación de la calidad del semen, crioconservación del esperma y fecundación in vitro en el lince ibérico (*Lynx pardinus*), una especie gravemente amenazada. *Reproduction fertility and development* 21(7): 848-859.

Ryg, M. 1986. Physiological control of growth, reproduction and lactation in deer. *Rangifer, Special Issue No. 1*: 261-266.

Salamon, S. y W.M.C. Maxwell. 1995. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science* 37:185-249.

Salamon, S. y W.M.C. Maxwell. 2000. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science* 62:77-111.

Sariözkan, S., M.N. Bucak, P.B. Tuncer, U. Tasdemir, H. Kinet, P.A. Ulutas. 2010. Effects of different extenders and centrifugation/washing on postthaw microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of Angora buck sperm. *Theriogenology* 73:316-323

SEMARNAT página oficial
<http://www.semarnat.gob.mx/temas/gestionambiental/vidasilvestre/Paginas/sistemavs.aspx>
[Sistema de Unidades de Manejo](#) Consultado el 18 de agosto de 2013.

Starker, L.A. 1977. FAUNA SILVESTRE DE MÉXICO Aves y mamíferos de caza. Instituto Mexicano de Recursos Naturales Renovables. Impresora GALVE, S. A. Pp. 577

Steinholt, C.H., E.J. Chandler, V. Tirado. 1991. Evaluating acrosome reaction steps with brightfield and differential interference contrast microscopy technique. *Journal Dairy Science* 74:3822-3826

Yoshida, M. 2000. Conservation of sperms: current status and new trends. *Animal reproduction Science* 60–61: 349–355

Valcársel, A., M.A. De las Heras, L. Pérez, D. Moses, H. Baldassarre. 1997. Assessment of the acrosomal status of membrane-intact ram spermatozoa after freezing and thawing, by simultaneous lectin/Hoechst 33258 staining. *Animal Reproduction Science* 45:299-309

Velarde, P.B. 2004. Aprovechamiento sustentable del venado cola blanca *Odocoileus virginianus*. Manual del participante. Colegio de Postgraduados. Secretaria de la Reforma Agraria. Pág. 15-17.

Verberckmoes, S., S.A. Van, J. Dewulf, A. De Kruif. 2005. Comparison of three diluents for the storage of fresh bovine semen. *Theriogenology* 63:912–922.

Villarreal, G.J.G. 1999. Venado cola blanca; manejo y aprovechamiento cinegético. Unión Ganadera Regional de Nuevo León. 401p.

Watson, P.F., S.P. Jones, M.J. Plummer. 1991. A quantitative comparison of the spontaneous and ionophore-induced acrosome reaction in ejaculated ram spermatozoa: the effects of temperature, time and individual. *Animal Reproduction Science* 24:93-108.

Watson, P.F. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development* 7(4):871- 891.

Watson, P.F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*. Volúmenes 60–61:2, Paginas 481-492.