



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**  
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS  
AGRÍCOLAS

CAMPUS TABASCO

PROGRAMA PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

EVALUACIÓN DE DOS DILUYENTES PARA LA CONSERVACIÓN DE  
SEMEN BOVINO EN EL TRÓPICO

**Brenda Beatriz Domínguez Coutiño**

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS**

H. CÁRDENAS, TABASCO,

MÉXICO 2015

La presente tesis titulada “**EVALUACIÓN DE DOS DILUYENTES PARA LA CONSERVACIÓN DE SEMEN BOVINO EN EL TRÓPICO**”. Realizada por la alumna Brenda Beatriz Domínguez Coutiño, 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**

**EN PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO.**

**CONSEJO PARTICULAR:**

Consejero: \_\_\_\_\_

  
**Dr. Mario Manuel Osorio Arce**

Asesor: \_\_\_\_\_

  
**Dr. Víctor Córdova Avalos**

Asesor: \_\_\_\_\_

  
**Dra. María Teresa Sánchez - Torres Esqueda**

Asesor: \_\_\_\_\_

  
**Dr. Miguel Ángel Orantes Zebadúa**

**H. Cárdenas Tabasco, México, 23 de octubre de 2015.**

# **EVALUACIÓN DE DOS DILUYENTES PARA LA CONSERVACIÓN DE SEMEN BOVINO EN EL TRÓPICO**

Brenda Beatriz Domínguez Coutiño, MC.

Colegio de Postgraduados, 2015

El presente estudio tuvo como objetivo comparar dos diluyentes para la conservación de semen, los tratamientos fueron Tris-Yema de huevo (Tris) y Lactosa-Yema de huevo (Lactosa), sobre la motilidad espermática, en semen congelado de bovinos. La investigación se llevó a cabo en el Estado de Veracruz, México, empleando 6 sementales de la raza Suiz-Bu, de 2 años de edad. Se empleó un diseño completamente al azar, con un análisis de varianza para analizar Motilidad Masal (MoM), sobrevivencia, anormalidades, pH, vigor, esto con el fin de determinar el efecto de los dilutores. Para el congelamiento del semen se utilizó hielo seco y el descongelamiento de las pajillas se realizó a 38°C durante 1 minuto a baño María. En este estudio realizado, los resultados nos arrojan que existen diferencias altamente significativas ( $P < 0.001$ ) entre el semen fresco y los tratamientos con Tris y Lactosa, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) para las variables Motilidad Masal, sobrevivencia, anormalidades, con excepción para la variable vigor, que presenta valores de 2.70 y 3.29 ( $P \leq 0.05$ ) para los tratamientos Tris y Lactosa, respectivamente. Se concluye que los dos dilutores mantuvieron la sobrevivencia de los espermatozoides del semen, las variables motilidad masal espermática, sobrevivencia, anormalidades nos demostraron que ambos dilutores tuvieron similar efecto, sin diferencia significativa, sin embargo para la variable vigor, el diluyente Lactosa se comportó mejor a diferencia del Tris con valores de 2.70 y 3.29 respectivamente.

**Palabras clave:** Semen congelado, motilidad masal, vigor.

# EVALUATION OF TWO DILUENTS FOR THE CONSERVATION OF BOVINE SEMEN IN THE TROPICS

Brenda Beatriz Domínguez Coutiño, MC.

Colegio de Postgraduados, 2015

This study aimed to evaluate the effect of two diluents for semen conservation, Tris-egg yolk (Tris) and lactose-egg yolk (lactose) on sperm motility in frozen bovine semen. The investigation was carried out in the State of Veracruz, Mexico, Using 6 mature males sexually A Design was used completely at random, an analysis of variance to analyze Motility Masal (MoM), survival, abnormalities, pH, vigor, this in order to measure the effect of the dilutores. For the freezing of the semen, dry ice was in use and the, to defrost of the straws carried out to 38°C during 1 minute to bain-marie. In this realized study, the results throw us that highly significant differences exist ( $P < 0.001$ ) between the fresh semen and the treatments with Tris and Lactose, nevertheless, they did not find statistically significant differences ( $P > 0.05$ ) for the variables Motility Masal, survival, abnormalities, with exception for variable vigor that there present values of 2.70 and 3.29 ( $P \leq 0.05$ ) for the treatments Tris and Lactose, respectively. One concludes that the two dilutores they supported the conservation of the semen, the variables motility masal spermatic, survival, abnormalities we demonstrated that both dilutores had similar effect, without it differs statistically significantly, nevertheless for variable vigor, the thinner lactose behaved better unlike the Tris with values of 2.70 and 3.29 respectively.

**Key words:** frozen semen, mass motility, vigor.

## **AGRADECIMIENTOS**

Gracias a ese ser superior **DIOS**, como yo lo concibo por darme salud y permitirme realizar un objetivo más en mi vida profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**) por el apoyo al proporcionarme la beca para continuar mis estudios de postgrado.

Al Colegio de Postgraduados **CAMPUS TABASCO** por albergarme, brindarme los conocimientos y ser parte muy importante en mi formación.

A cada uno de los integrantes de mi **Consejo particular** por su apoyo en la realización de este trabajo, muchas gracias.

Al **Dr. Mario Manuel Osorio Arce**, por su apoyo e importantes comentarios.

Al **Dr. Víctor Córdova Avalos**, gracias infinitamente por su apoyo irrestricto y estar al pendiente en esta investigación.

A la **Dra. María Teresa Sánchez - Torres Esqueda**, por su valiosa experiencia aplicada en este trabajo de investigación pieza fundamental para la culminación de esta tesis.

Al **Dr. Jesús Alberto Ramos Juárez**, por haberme proporcionado su tiempo y el apoyo para poder realizar este trabajo de investigación en verdad muchas gracias.

A todas las personas que de alguna manera influyeron en la culminación de esta tesis, un especial agradecimiento a mi AMIGO Sergio Alexander por brindarme su apoyo.

## DEDICATORIAS

A mis padres y hermanos, quienes son el regalo más maravilloso que Dios me ha dado y los cuales a pesar de todo han sabido estar siempre a mi lado apoyándome en todo momento, por nunca perder las esperanzas en mí y alentarme cotidianamente a superarme en la vida.

A mí amado novio **Luis Humberto**, motor y fuente de inspiración que me alienta a ser mejor cada día.

## CONTENIDO

	Página
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	3
<b>III. OBJETIVOS</b> .....	4
3.1. Objetivo General.....	4
3.2. Objetivos Específicos .....	4
3.3. Hipótesis .....	4
<b>IV. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	5
4.1. Tecnología del semen .....	5
4.2. Semen y sus características.....	5
4.3. Anatomía del aparato reproductor del macho bovino .....	6
4.4. Valoración de la calidad seminal.....	8
4.4.1 Forma tradicional.....	8
4.5. Examen macroscópico del semen.....	8
4.5.1. Volumen .....	8
4.5.2. Color .....	8
4.6. Examen microscópico.....	8
4.6.1. Motilidad masal .....	9
4.6.2. Motilidad individual .....	9
4.6.3. Concentración Espermática .....	11
4.6.4. Morfología Espermática .....	12
4.7. Colección de semen con electro eyaculador.....	14
4.8. Diluyentes .....	14
4.9. Factores que afectan la calidad seminal .....	17
4.9.1. La temperatura.....	17
4.9.2. El estrés .....	18
4.9.3. Los factores nutricionales.....	18
4.9.4. Efecto de la edad.....	19
4.9.5. Genes recesivos .....	19

4.10. Alteraciones técnicas o defectos del manejo de semen .....	19
4.11. Malformaciones congénitas .....	20
4.12. Costos .....	22
4.12.1. Costo fijo .....	22
4.12.2. Costo Variable .....	22
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
5.1. Localización del área de estudio.....	23
5.2. Animales, manejo e instalaciones.....	24
5.3. Tratamientos .....	24
5.4. Colecta de semen.....	24
5.5. Evaluación macroscópica y microscópica del semen.....	24
5.5.1. Motilidad masal .....	24
5.5.2. Concentración espermática.....	25
5.6. Método a vapor de nitrógeno.....	26
5.7. Evaluación del semen congelado.....	27
5.8. Viabilidad post- Descongelación.....	27
5.9. Análisis Estadístico .....	27
<b>VI.RESULTADOS</b> .....	<b>28</b>
<b>VII. DISCUSIÓN</b> .....	<b>32</b>
<b>VIII .CONCLUSIÓN</b> .....	<b>34</b>
<b>IX. LITERATURA CITADA</b> .....	<b>35</b>
<b>X. ANEXOS</b> .....	<b>43</b>



## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Escala basada en el porcentaje de células móviles y criterio evaluativo. ....	9
Cuadro 2. Escala basada en el porcentaje de células individuales. ....	10
Cuadro 3. Escala basada en la velocidad de movimiento de las células móviles. ....	10
Cuadro 4. Porcentaje de cada diluyente (Tris) (lactosa).....	26
Cuadro 5. Descripción de las características seminales, volumen seminal y concentración espermática en los eyaculados de los bovinos en fresco .....	28
Cuadro 6. Características seminales ( $X \pm E.E.$ ) de los 6 sementales con fines de congelación de semen.....	29
Cuadro 7. Estimación de costos de los materiales utilizados en la investigación. ....	31

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía del aparato reproductor del macho. ....	6
Figura 2. Cámara de Newbauer. ....	11
Figura 3. Partes de un espermatozoide. ....	21
Figura 4. Ubicación del área de estudio municipio las Choapas del Estado de Veracruz, México. ....	23
Figura 5. Composición y porcentaje de cada diluyente (Tris) (Lactosa). ....	25
Figura 6. Comparación para la variable vigor de cada tratamiento. ....	30
Figura 7. Porcentaje de pajillas viables ....	30

## I. INTRODUCCIÓN

Las biotecnologías reproductivas han permitido incrementar la eficiencia de la reproducción y las tasas de mejoramiento genético, contribuyendo a incrementar la producción del sector ganadero (Duarte *et al.*, 2010). Dentro de estas se encuentra la inseminación artificial (IA), la cual podría definirse como una técnica para la aplicación de semen en el tracto genital de una hembra en el momento efectivo para la fecundación (Giraldo, 2007). Esta técnica se ha mantenido como el principal vehículo para la rápida difusión de genes valiosos y ha sido el método de elección de los productores para mejorar la calidad genética de su ganado (Vishwanath y Shannon, 2000). Sin embargo, el éxito de ésta depende de que el semen utilizado mantenga su poder fecundante tras ser diluido y congelado. En este sentido, la dilución del semen tiene por objetivos: 1) incrementar el volumen del eyaculado para facilitar su fraccionamiento en un mayor número de dosis, 2) crear un medio favorable para la supervivencia de los espermatozoides, 3) preservar los espermatozoides de ciertos agentes externos que le son desfavorables y 4) transportar de forma sistemática el semen diluido a grandes distancias una vez congelado (Salomón y Maxwell, 1995; Méndez *et al.*, 2007). No obstante, la capacidad de supervivencia y el potencial de fertilización de los espermatozoides pueden verse afectada durante el proceso de congelación (Hu *et al.*, 2010). Al respecto Vishwanath y Shannon (2000) mencionan que incluso con las mejores técnicas de conservación y de todos los acontecimientos que se han producido en los últimos años, la mejor recuperación de las células después de la descongelación es de poco más del 50% de espermatozoides viables. Por lo tanto la predicción de la capacidad fecundante del semen es de suma importancia, existiendo diferentes métodos de diagnóstico que van desde la evaluación de la motilidad, volumen, concentración y morfología espermática, (Muiño *et al.*, 2005).

El diluyente para la congelación de semen bovino de uso universal y ampliamente probado es el elaborado a base de Tris-yema de huevo, debido a los buenos resultados obtenidos con éste (Vishwanath y Shannon, 2000). Sin embargo, existen diluyentes más económicos que pueden ser preparados de manera casera como el elaborado a base de lactosa-yema de huevo. La lactosa es un disacárido (glucosa y galactosa) presente en la leche de los mamíferos, estos

azúcares realizan varias funciones en el diluyente, añaden presión osmótica al medio y actúan como crioprotectores (Vishwanath y Shannon, 2000). En un estudio realizado por Bravo (1972) obtuvo buenos resultados al utilizar lactosa como diluyente de semen bovino y la fertilidad fue 10% mayor que la obtenida con citrato-yema de huevo y leche-yema de huevo como diluyentes. En otro estudio Brito *et al.* (2004) compararon los diluyentes Tris-glucosa yema de huevo y lactosa-yema de huevo en la congelación de semen de carnero en pellets, encontrando una mayor motilidad del semen con el segundo diluyente.

Sin embargo, existe poca información acerca del congelamiento de semen bovino utilizando lactosa-yema de huevo como diluyente, encontrándose más información de su uso en otras especies (ovinos, cerdos, perros y gatos).

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La importancia de las pruebas de fertilidad y productos para conservar el semen, se deben a la necesidad de poder preservar la calidad genética del animal conservando las características viables del semen. En la ganadería tropical entre 3 y 25 % de los sementales no son aptos para la reproducción lo que conlleva un bajo porcentaje de gestación; y por consiguiente, producción de carne (becerros) y leche que repercute en la economía del productor, ya que sus ingresos provienen de la venta de estos productos. Así, el ganadero trata de solucionar la baja fertilidad del hato aumentando el número de toros para obtener al menos un becerro por vaca al año (Medeiros *et al.*, 2002).

Uno de los retos que enfrenta la ganadería en México, es lograr que un número mayor de vacas paran cada año; en ese sentido, los esfuerzos se encaminan en mejorar la eficiencia reproductora de las hembras, dando por hecho que los sementales son aptos para la monta y para la colecta de semen. La realidad es muy diferente; en estudios realizados en varias partes de nuestro País, se indica que del 10 al 20% de los toros utilizados como sementales en los hatos productores, no son aptos para tal fin y el problema es que por lo general, de ello se da cuenta el productor al menos un año después de haberlo introducido al hato. De lo anterior se desprende, que el utilizar un toro como semental, sin haber comprobado antes su capacidad de servicio, conlleva el riesgo de tener en el hato, toros no aptos y con ello reducir sustancialmente la eficiencia reproductora en la explotación, Teniendo en cuenta lo enunciado, es muy importante realizar pruebas de laboratorio para evaluar la calidad del semen fresco/descongelado previo la implementación al desarrollo de la IA y así verificar que el semen utilizado mantenga su capacidad fecundante luego de haber sido criopreservado (Medeiros *et al.*, 2002).

Por tal motivo, el objetivo de investigación tiene como finalidad de evaluar la calidad seminal en fresco y postcongelación y conocer la eficacia de los dos diluyentes para la conservación de la calidad del semen.

### **III. OBJETIVOS**

#### 3.1. Objetivo General

Evaluación de dos diluyentes para conservación de semen bovino en el trópico.

#### 3.2. Objetivos Específicos

- Evaluar las características macroscópicas y microscópicas del semen fresco y postcongelación.
- Evaluar el porcentaje de pajillas viables
- Estimar costos de los materiales utilizados para la conservación del semen.

#### 3.3. Hipótesis

El diluyente a base de lactosa tiene la misma eficacia que el diluyente comercial a base de tris.

## IV. REVISIÓN DE LITERATURA

### 4.1. Tecnología del semen

El semen puede ser procesado de diferentes maneras pudiendo ser usado: fresco (puro o diluido), refrigerado y congelado. El semen fresco y el refrigerado presentan fertilidad más elevada, debido a que no ha sido sometido a procesos de crio conservación y mantiene mayor número de espermatozoides vivos. El semen congelado se preserva por un período de tiempo indefinido si es mantenido en nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$  y es de mayor viabilidad, comparado al semen refrigerado a  $4^{\circ}\text{C}$ , cuya viabilidad máxima es de 48 horas. El semen es un producto de la eyaculación, de un reproductor normal y está compuesto de espermatozoides producidos en los testículos y una fracción líquida producida por las glándulas sexuales accesorias (De Abreu *et al.*, 1979).

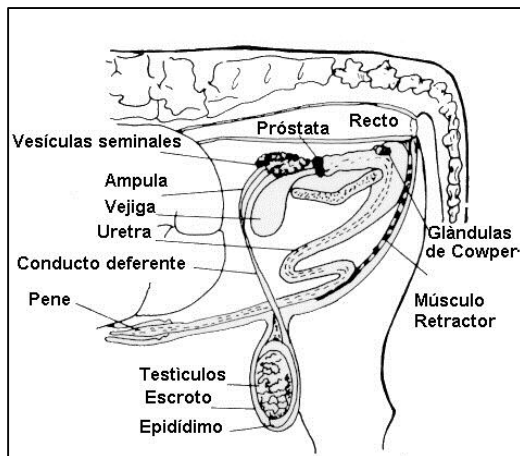
### 4.2. Semen y sus características

El semen es el líquido generativo del macho ya que contiene los gametos masculinos (espermatozoides), se deposita en la vagina de la hembra durante la cópula o puede recogerse por medios artificiales para su estudio, almacenamiento y/o uso en inseminación artificial (Holt, 2000).

El semen lo forman dos principales constituyentes: el plasma seminal y los espermatozoides. Las principales sustancias orgánicas presentes en el semen de bovino son fructosa, sorbitol, inositol, ácido cítrico, glicerilfosforilcolina, fosfolípidos, prostaglandinas y proteínas. La fructosa es el azúcar más fácilmente metabolizable y proporciona la mayor fuente de energía a los espermatozoides del semen (Evans y Maxwell, 1990).

### 4.3. Anatomía del aparato reproductor del macho bovino

Los órganos reproductivos del macho se dividen en primarios y secundarios. Los testículos son los órganos sexuales primarios localizados en el escroto y suspendidos externamente en la región inguinal. Los órganos sexuales secundarios están compuestos por un sistema de conductos que permiten el transporte de los espermatozoides al exterior e incluyen los conductos deferentes de los testículos, los epidídimos, los vasos deferentes, la uretra y el pene. Los órganos sexuales accesorios están constituidos por la próstata, las glándulas o vesículas seminales y las glándulas bulbouretrales, (Hafez, 2002). La relación anatómica de estos órganos se muestra en la (figura, 1).



FUENTE: (Hafez, 2000).

Figura 1. Anatomía del aparato reproductor del macho.

El escroto es una cubierta protectora de la piel altamente vascular, el escroto cubre a los testículos. Debajo de la piel se encuentra la túnica dartos, una capa fibroelástica íntimamente asociada con la túnica vaginal común y con el ligamento escrotal. Un tabique intermedio o septo, que es extensión de la túnica dardos, divide en dos el escroto. El escroto forma parte del mecanismo termorregulador que permite mantener los testículos a una temperatura óptima (alrededor de 5 °C por debajo de la temperatura corporal) para la espermatogénesis (Hafez, 2002).



Testículos, los testículos son de forma ovoide con su eje longitudinal generalmente en dirección dorso ventral. El tamaño de los testículos varia, aunque usualmente tienen una longitud de 8 a 16 cm y un diámetro de 5 a 10 cm. En forma practica el tamaño testicular se estima a través de la circunferencia escrotal. El tamaño testicular depende de la edad, raza y estado nutricional, los testículos o gónadas masculinas son glándulas endocrinas y citógenas (Hafez, 2002).

Cordón espermático, esta es una estructura similar a un cordón se encuentra por encima del testículo y se compone de varios elementos: fibras musculares, la arteria y venas testiculares, nervios, conductos linfáticos y el conducto deferente. El cordón espermático pasa a través del anillo inguinal superficial y penetra a la cavidad abdominal a través del anillo inguinal (Hafez, 2002).

Cremaster, este es el musculo continuación de la musculatura abdominal y se fija en la túnica vaginal parietal. Además de envolver al cordón espermático, su función es elevar los testículos y junto con el dartos, ayuda a mantener una temperatura testicular constante (Hafez, 2002).

Plexo pampiniforme, esta es la red de vasos sanguíneos se localiza en el cordón espermático, entre el testículo y el anillo inguinal superficial.

Glándulas sexuales accesorias, la función de estas glándulas es la de producir el líquido seminal donde se conservan los espermatozoides y les sirve a su vez de vehículo para su salida a través de la uretra. Estos líquidos le dan volumen al semen y además le aportan nutrientes y protección. Próstata esta glándula está ubicada cerca del cuello de la vejiga, y su función consiste en producir líquidos alcalinos con el fin de neutralizar la condición ácida de la uretra y de la vagina. Glándulas bulbo uretrales o de cowper. Están situadas a lado y lado de la uretra; su función es similar a la de la próstata y los líquidos secretados por ellas sirven de vehículo al esperma. Vesículas seminales son dos y están situadas a ambos lados del cuello de la vejiga, sobre la próstata y dirigidas hacia adelante. Tienen una longitud aproximada de 8 a 10 centímetros, son de forma lobulada y secretan un líquido rico en azúcares como fructuosa y ácido cítrico (Hafez, 2002).

#### **4.4. Valoración de la calidad seminal**

##### 4.4.1 Forma tradicional

Hafez (1989), reporta que al evaluar la calidad seminal en el laboratorio los resultados pueden ser parámetros objetivos y subjetivos, estos resultados permiten predecir la fertilidad de una muestra de semen. Una valoración objetiva de la calidad seminal, debe enfocarse hacia el aspecto total de la muestra. Spitzar (2000), define como aspectos inmediatos después de colectada la muestra, la revisión de la motilidad, volumen, aspecto, pH, concentración. Igualmente Barth (2003), señala que exámenes más detallados implican determinación de células anormales, tinción de vivos y muertos, actividad metabólica y resistencia a condiciones medioambientales.

#### **4.5. Examen macroscópico del semen**

##### 4.5.1. Volumen

La calidad del semen varía según las especies, el estado fisiológico, individuo, raza, edad, tamaño, número de saltos, métodos de recolección, factores alimentarios, sanitarios y medio ambientales. Hafez (1989), reportó en bovinos que la eyaculación media es de 4 a 6 cm<sup>3</sup> y varía entre 1–12 cm<sup>3</sup>, los toros jóvenes pueden producir 1 a 3 cm<sup>3</sup> de semen, mientras que los adultos pueden eyacular de 10 a 15 cm<sup>3</sup>.

##### 4.5.2. Color

Según Barth (2003), el semen posee una coloración blanquecina o ligeramente amarillenta y su opacidad se halla en función de la concentración espermática. Los eyaculados muy buenos tienen apariencia granulosa con una concentración de 750 a 1.000 millones o más de espermatozoides por mililitro, y los clasifican como:

Bueno, semen opaco, lechoso con 400 a 750 millones de espermatozoides por ml;

Regular, semen con aspecto de leche aguada con 250 a 400 millones de espermatozoides por ml; Malo, semen translúcido y acuoso con menos de 250 millones de espermatozoides por ml.

Coloraciones anormales indicaran contaminante: Orina, sangre, etc.

#### **4.6. Examen microscópico-**

Barth (2003), menciona que para evitar las alteraciones técnicas por choque de frío, al momento de evaluar la muestra microscópicamente, deben mantenerse las láminas sobre las cuales se coloca la muestra a 37 °C ya que de no hacerlos así, se afecta la observación.

#### 4.6.1. Motilidad masal

Barth (2003), reporta que la motilidad masal es el resultado de la concentración espermática, el porcentaje de células con movimiento progresivo y velocidad de movimiento de los espermatozoides lo cual si hay una baja concentración de espermatozoides, provocan una disminución de motilidad masal. Palacios (2005), indica que la observación se hace sobre una gota de semen de 5 a 10 mm de diámetro, colocada sobre un porta objetos tibio y sin cubre objetos. La observación se realiza con semen sin diluir y bajo un campo luminoso y con un aumento de 40–125 x observando varios campos microscópicos. Según Morrow (1986), la calificación se realiza bajo los parámetros que se muestran en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Escala basada en el porcentaje de células móviles y criterio evaluativo.

<b>Valor descriptivo</b>	<b>Aspecto del modelo</b>	<b>%células móviles</b>	<b>Criterio evaluativo</b>
Muy buena	Movimiento en ondas vigorosas y en remolinos rápidos	80-90%	++++
Buena	Remolinos y ondas más lentas	60-80%	+++
Regular	Sin remolinos, pero oscilantes generalizadas	40-60%	++
Mala	Escasa o ninguna motilidad	0-40%	+0+

Fuente: (Morrow, 1986).

#### 4.6.2. Motilidad individual

La motilidad individual según Bravo *et al.* (2000), es el resultado de la evaluación del movimiento progresivo de los espermatozoides y de los cambios en su motilidad. Igualmente, la motilidad progresiva, según Palacios (2005), debe ser observada en un aumento de 200 x

– 500 x, preferentemente bajo contraste de fase, y los resultados se expresan en porcentaje o en una escala de 1 a 5. Según Salisbury (1978), la clasificación se muestra bajo parámetros de motilidad que se muestran en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Escala basada en el porcentaje de células individuales.

<b>Valor descriptivo</b>	<b>% células móviles</b>
Muy buena	80–100% de células móviles
Buena	60–79% de células móviles
Regular	40–59% de células móviles
Mala	Menos de 40% de células móviles

Fuente: Salisbury, 1978.

La motilidad según Echeverry (2005) permite predecir la fertilidad o habilidad para congelar, ya que la motilidad post – descongelación es frecuentemente usada para ajustar la concentración de espermatozoides por pajilla, cuando el semen se designa para I. A. La motilidad progresiva también puede ser evaluada siguiendo la velocidad de movimiento o grado de movimiento y se hace bajo la siguiente escala, Cuadro 3. (Barth, 2001).

Cuadro 3. Escala basada en la velocidad de movimiento de las células móviles.

<b>Valor descriptivo</b>	<b>Velocidad del movimiento</b>
0	* Sin movimiento
1	* Leve movimiento de cola sin desplazamiento progresivo
2	* Lento movimiento de cola con algo de movimiento progresivo
3	* Movimiento progresivo a velocidad lenta
4	* Movimiento progresivo rápido
5	* Movimiento progresivo rápido donde es difícil de seguir la célula determinada

Fuente: Barth, 2001

El movimiento progresivo de los espermatozoides después de descongelado, se debe evaluar inmediatamente después de descongelado y luego de 2 horas de incubación a 37° C. El mínimo aceptable de motilidad es del 25% de células motiles con una velocidad tipo 3 inmediatamente después de descongelado y un 15% de células motiles con una velocidad tipo 2 luego de 2 horas de incubación a 37° C, para ser considerada viable.

#### 4.6.3. Concentración Espermática

Según Barth (2003), permite evaluar la capacidad de producción de espermatozoides del seminal y calcular el número de dosis a producir por eyaculado. El número de espermatozoides se expresa por milímetro cúbico, para la determinación se usan métodos tales como la cámara de Neubauer (Figura 2).

La **nefelometría** es un procedimiento analítico que se basa en la dispersión de la radiación que atraviesan las partículas de materia. Cuando la luz atraviesa un medio transparente en el que existe una suspensión de partículas sólidas, se dispersa en todas direcciones y como consecuencia se observa turbia. La **espectrofotometría** es la medición de la cantidad de energía radiante que absorbe o transmite un sistema químico en función de la longitud de onda; es el método de análisis óptico más usado en las investigaciones químicas y bioquímicas. El espectrofotómetro es un instrumento que permite comparar la radiación absorbida o transmitida por una solución que contiene una cantidad desconocida de soluto, y una que contiene una cantidad conocida de la misma sustancia.

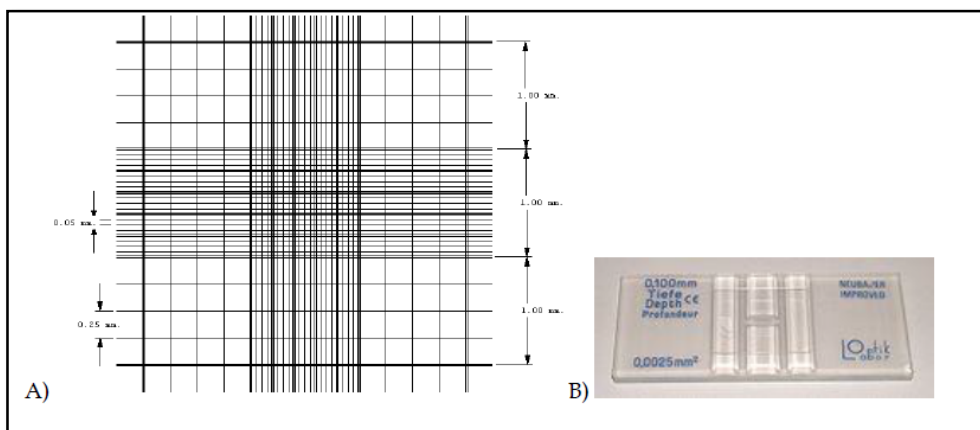


Figura 2. Cámara de Neubauer.

La cámara de Newbauer es utilizada para determinar el número de espermatozoides por ml cúbico. El recuento se realiza con cámara de Newbauer contando las cabezas de los espermatozoides (EPZ) y observados en 5 cuadros tomados en diagonal, del cuadro central grande y se aplica la siguiente fórmula (Bacaraldo *et al.*, 2007):

$$\text{EPZ/ml} = n \times 200 \times 10 \times 5000$$

Donde:

n = Número de células contadas

200 = Factor de dilución en la pipeta

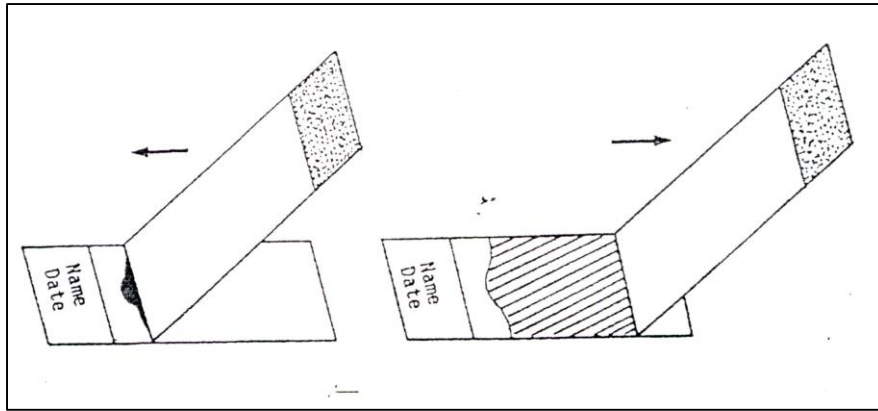
10 = Por ser la altura de la cámara de 0.1

5 000 = Cuadros pequeños contados en mm<sup>3</sup>

#### **4.6.4. Morfología Espermática**

La morfología espermática es un factor determinante en la capacidad de fertilización del semen, existe una correlación entre defectos espermáticos e infertilidad. Los espermatozoides son traslucidos y virtualmente invisibles al microscopio de luz directa por lo tanto, Barth (2003), reporta que se requiere el uso de colorantes que provean de un fondo oscuro para visualizarlos. Lo más recomendable es la técnica en un solo paso en donde se mezcla el colorante (eosina/nigrosina) con el espermatozoide sobre el porta objetos, porque todo lo que se encuentra en el semen puede ser observado, algunas de estas tinciones son: rosa de bengala, tinta china, la tinción de eosina/nigrosina o llamada vital (Vivos/muertos).

La coloración vital (eosina, azul de anilina, o eosina/nigrosina) es la más comúnmente usada en la examinación morfológica de esperma, el azul de anilina y nigrosina, proveen un fondo oscuro, sobre el cual resaltan los espermatozoides, la eosina por su parte tiñe las células, penetrando la membrana de las células dañadas, tiñendo las lesiones y espermatozoides no viables o muertos de rosa (Palacios, 2005).



Fuente: (Barth, 2003).

Figura 3. Método de coloración de una muestra de semen usando eosina/nigrosina.

Según Barth (2003), para la preparación del extendido, se coloca una gota de tinción eosina nigrosina en un extremo de porta objetos tibio 36 °C, y seguido se coloca una gota de semen de 3 a 5 mm de diámetro cerca de la tintura, luego de haber mezclado la tintura con el semen, y dejar actuar un minuto, la mezcla es extendida de un lado hasta el otro con otro portaobjetos tibio, formando una película delgada en la cual después de seca a temperatura ambiente durante 1 minuto se puede hacer la evaluación con un objeto de aceite de inmersión a 100 x. Aumentos menores no revelan la mayoría de los defectos que existen. Cuando existen pocas anomalías es suficiente contar 100 espermatozoides y cuando encontramos gran cantidad de anomalías es recomendado contar 200 o más (Figura 3).

Junto con la valoración de la motilidad, el estudio de la morfología espermática es la otra prueba determinante de la calidad de un eyaculado; permitiendo además detectar alteraciones en la espermatogénesis y en la maduración epididimaria, lo cual, puede resultar muy útil a la hora de eliminar reproductores con baja calidad seminal, cuando estas anomalías indiquen patologías genitales mayores. Al igual que en la valoración subjetiva de la motilidad, la correlación de los resultados obtenidos en la valoración morfológica del semen con la fertilidad varía ampliamente en función del estudio que tomemos en cuenta, describiéndose valores entre  $r = 0,06$  a  $r = 0,86$  (Rodríguez-Martínez, 2003).

El espermatozoide morfológicamente normal responde a lo representado en la Figura 4. Los espermatozoides morfológicamente anormales, presentan malformaciones de distintos tipos, González-Urdiales (2006), las clasifican en:

- Primarias: Aquellas anomalías que se producen por alguna deficiencia producida en la espermatogénesis. Se dividen en específicas o no específicas, siendo las primeras de origen genético.
- Secundarias: Aquellas que se producen a nivel del epidídimo, se suelen manifestar o bien por alteraciones a nivel de la cola (colas enrolladas o en “látigo”) o incluso por la falta de ésta.
- Terciarias: Aquellas que se originan por mal manejo del semen en el laboratorio. Pueden ser mecánicas (aparición de cabezas desprendidas de la cola por mala realización de extensiones sobre portaobjetos) o físicas/químicas (por descenso brusco de la temperatura, variaciones de pH, composición del diluyente o por variación de la presión osmótica).

#### **4.7. Colección de semen con electro eyaculador**

El electro eyaculador es un aparato eléctrico que provee una estimulación rectal que desencadena la erección y eyaculación. Está formado esencialmente por: transformador, reóstato electrodo bipolar, voltímetro. Su manejo consiste en aumentar gradualmente el voltaje desde cero hasta 10–15 voltios, con incrementos de 2 voltios e intervalos de 5–10 segundos, volviendo a cero. Según Sánchez y Tsutsui (2002), el electro eyaculador permite extraer semen a todos los toros sin previo acostumbramiento especialmente en animales indómitos, con libido pobre o ausente, con afecciones de los miembros posteriores que le impiden cubrir la hembra o en el caso de examen de infertilidad de varios animales.

#### **4.8. Diluyentes**

La viabilidad del semen descongelado es influenciada por la composición de los diluyentes que se utilizan durante el proceso de congelación. Los diluyentes cumplen las siguientes funciones: aportar nutrientes como una fuente de energía, protegen contra el efecto nocivo del enfriamiento, congelado y descongelado, son amortiguadores que impiden cambios perjudiciales en el pH, mantienen la presión osmótica y el balance electrolítico, inhiben la proliferación bacteriana e incrementan el volumen del semen (Hafez y Hafez, 2002).

Los diluyentes deben tener un pH de 6.8 a 7.4 (Salomón y Maxwell, 2000) y contener sustancias crioprotectoras (penetrantes y no penetrantes), carbohidratos (glucosa, lactosa,



sacarosa, trehalosa), sales (citrato de sodio, ácido cítrico) y antibióticos (penicilina, estreptomicina, gentamicina (Carvajal *et al.*, 2004; Barbas y Mascarenhas, 2009; Bathgate, 2011).

Los crioprotectores se incluyen en el diluyente de criopreservación para reducir el estrés fisiológico y químico que deriva del proceso de congelar y descongelar la célula espermática y son clasificados en penetrantes y no penetrantes (Purdy, 2006). Los crioprotectores penetrantes (glicerol, dimetil sulfóxido) causan un re arreglo en los lípidos y proteínas de la membrana plasmática, que resulta en un incremento en la fluidez de la membrana, deshidratando la célula y reduce así la formación de hielos intracelulares e incrementa la supervivencia del espermatozoide después del proceso de criopreservación (Holt, 2000; Purdy, 2006). Los crioprotectores no penetrantes (leche, yema de huevo), como su nombre lo dice no atraviesan la membrana plasmática, sino que actúan de manera extracelular, disminuyendo la formación de hielo extracelular (Aisén *et al.*, 2000).

Estudios recientes han utilizado la adición de trehalosa en bovinos, caprinos y porcinos, ejerciendo un efecto protector en la célula espermática al choque frío y el estrés oxidativo durante el proceso de congelado y descongelado (Aboagla y Terada, 2003; Hu *et al.*, 2009; 2010). Para la criopreservación de espermatozoides de bovino, el glicerol y la yema de huevo son utilizados de manera simultánea en los diluyentes de congelación para una mayor protección; pero a pesar de que el glicerol protege a la célula espermática también induce efectos tóxicos y estrés osmótico, por lo cual debe ser utilizado en la concentración adecuada según la especie (Purdy, 2006) y debe ser adicionado en una segunda fracción de diluyente después de la fase de refrigeración del semen (Medeiros *et al.*, 2002). La yema de huevo protege la célula espermática y la integridad de su membrana plasmática del daño ocasionado por el choque frío durante el proceso de congelado y descongelado, este mecanismo de protección está determinado por los fosfolípidos (lecitina) y la baja densidad de lipoproteínas (Medeiros *et al.*, 2002; Purdy, 2006). Los carbohidratos utilizados son glucosa, lactosa, dextrosa o sacarosa, los cuales no atraviesan la membrana plasmática e inducen la deshidratación de la célula, logrando así disminuir la formación de cristales de hielo intracelulares. Los azúcares interactúan con los fosfolípidos de la membrana plasmática,

incrementando la supervivencia del gameto masculino al proceso de criopreservación (Kundu *et al.*, 2002).

El Triladyl® fue introducido al mercado en el año 1974, y se ha convertido en un diluyente clásico para la crio conservación de semen bovino. También se han podido congelar una serie de eyaculados de otros mamíferos, como ovinos, caprinos, camélidos y caninos, e igualmente semen de diversas especies exóticas. El crioprotector de este diluyente es el glicerol, el cual entra en el grupo de crioprotectores que penetran la membrana de la célula deshidratándola y evitando la formación de cristales durante su congelamiento y descongelación, de esta manera evita la ruptura de las estructuras del espermatozoide. Para evaluar semen resulta esencial contar con un microscopio de calidad, preferentemente con adaptación para contraste de fase, una platina térmica o un baño María. Según Barth (2003), en la evaluación del semen congelado se deben tener en cuenta al menos 2 parámetros básicos. Estos son, viabilidad post-descongelación, número de espermatozoides con motilidad progresiva por dosis inseminante. Algunos investigadores consideran conveniente realizar controles bacteriológicos y/o virológicos a espacios de tiempo variables según el caso Barth (2003), recomienda determinar la presencia de microorganismos patógenos únicamente cuando hembras fértiles fracasan en ser preñadas con semen de buena viabilidad y morfología, en dosis adecuada o cuando una historia de infertilidad implica una posible causa infecciosa. Diversos métodos pueden ser utilizados para determinar motilidad. Cuando se cuenta con experiencia, generalmente se realizan estimaciones visuales rápidas, sin efectivamente contar células. Procedimiento a evaluar a 100 aumentos el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva y luego, la tasa de progresión (vigor).

Esta puede ser cuantificada utilizando la siguiente escala:

0= sin movimiento.

1= ligera ondulación o vibración de cola, sin progresión

2= progresión lenta, incluyendo detención y comienzo de movimiento.

3= movimiento progresivo continuo y moderada velocidad.

4= movimiento progresivo, rápido.

5= movimiento progresivo muy rápido, en el cual las células son difíciles de seguir visualmente

El semen de buena calidad, que ha sido recientemente descongelado, normalmente tiene 40-50% de espermatozoides con motilidad progresiva y un vigor de 3-4. Después de 2 horas de incubación, estos valores generalmente disminuyen un 10-15% y 1 punto, respectivamente.

#### **4.9. Factores que afectan la calidad seminal**

Barth *et al.* (2000), citan que el proceso de evaluación la calidad seminal de un toro, puede verse afectado por efectos directos, que evidencian alteraciones en la espermatogénesis o por defectos del manejo del semen.

Además Spitzar (2000), coincide en opinar que las causas que podrían producir una espermatogénesis anormal, son clasificadas como relacionadas con elevadas temperaturas, el estrés o con la edad, otras causas menos comunes son clasificadas como genéticas, tóxicas o tal vez deficiencias en la nutrición.

##### **4.9.1. La temperatura**

Es uno de los factores ambientales más importantes que modifican la espermatogénesis. Echeverría (2003), reporta que la temperatura corporal puede verse afectada por periodos de temperatura ambiental alta 50°C al igual que extremadamente bajas 20°C por cuadros de pirexia ocasionado por enfermedades y/o heridas. Spitzar (2000) argumenta que el mecanismo de daño por temperatura, es la hipoxia testicular, esto se debe a que los testículos operan normalmente en un punto muy cercano a la hipoxia y al ser activados los mecanismos de pérdida de calor, hay vasodilatación y aumento de la actividad metabólica con una necesidad directa de incrementar el oxígeno, este incremento de oxígeno es una tasa mayor que la del flujo sanguíneo por tanto los testículos se tornan hipóxicos. Además, Parks *et al.* (2003) reportan que el calentamiento de los testículos ocasiona que los espermatozoides en la fase meiótica sean destruidos y se presenten alteraciones en la transformación de espermatozoides a espermatozoides, principalmente cambios en la condensación de la cromatina nuclear, formación de la cola y desarrollo del casquete acrosómico de los espermatozoides. Al igual se ve afectado el epidídimo y sus funciones normales absorbentes y secretoras que ocasionan cambios en la composición de los fluidos, e incrementan la tasa de paso espermático que conlleva a una prematura maduración espermática.

Mediante un seguimiento riguroso en varios trabajos Kastelic *et al.* (2002) evaluaron lo reportado por Salisbury (1974) y Hafez (1989), y establecieron que para que se produzcan espermatozoides fértiles, los toros deben contar con una temperatura testicular de 2 a 6 grados centígrados menor que la temperatura corporal central y presentar en promedio temperatura de 35.5, 34.6, 33.1C° respectivamente en la cabeza, cuerpo y cola del epidídimo.

Las altas temperaturas provocan una disminución en la liberación del LH. Johnson *et al.* (1981) evidenciaron que al verse disminuida la producción de LH, provocada por altas temperaturas, consecuentemente se presentan bajos niveles de testosterona disponible para las células germinales en crecimiento, la secreción de las células de Sertoli y para el normal funcionamiento del epidídimo, lo cual es agravado aún más por la hipoxia testicular.

#### **4.9.2. El estrés**

Aun cuando se tienen diferentes interpretaciones de estrés, Echeverría (2003), lo define como aquel estado generado por toda situación interna o externa que perturbe el equilibrio físico y social del animal, creando tensión y tendiendo a colocar los mecanismos de defensas del mismo en un estado de alerta y actividad que le permitan responder ante situaciones adversas. El organismo responde, según Berdugo y Avella (1994), mediante la producción excesiva de cortisol por parte de las glándulas adrenales lo cual reduce la producción de LH, por la pituitaria, lo que conduce a una disminución en la producción de testosterona por las células de Leydig, Barth *et al.* (2000) reportan, que el estrés prolongado provoca cuadros de degeneración testicular, que pueden variar de ligera hasta aplasia completa del epitelio seminífero, según la intensidad y el tiempo de acción del estímulo. Además, según Spitzar (2000), se provoca un aumento de espermatozoides con anomalías de cabeza, periforme, alargadas y estrechas. En casos severos podría provocar una azoospermia.

#### **4.9.3. Los factores nutricionales**

La nutrición, tiene mayor impacto sobre las funciones endocrinas más que las espermatogénicas (Chacón *et al.*, 2002), debido a que el estrés nutricional provoca retardo en el crecimiento de los testículos y supresión de la actividad endocrina la cual tiene un mayor impacto en animales jóvenes en crecimiento, ya que retarda la pubertad y deprime la producción y características del semen.

Barth *et al.* (2000), reportan que entre los factores nutricionales más comunes que afectan la calidad seminal incluyen la obesidad y sobrealimentación, las diferencias calóricas (raciones bajas en energía disminuyen la libido y la producción de testosterona), proteínicas (especialmente en machos jóvenes), vitaminas y de minerales (deficiencias de yodo, cobre, cobalto, zinc y magnesio afectan la producción de semen y la fertilidad, igualmente es causa de baja de libido) y agentes tóxicos (los estrógenos vegetales, además las tierras raras y radiaciones ionizantes. Las dietas ricas en energía permiten a animales jóvenes de 12 meses tener una circunferencia escrotal mayor, pero por el contrario en animales mayores se ve transformado en grasa lo que conlleva a una mala termorregulación de los testículos (Coe, 1999).

#### **4.9.4. Efecto de la edad**

La producción de espermatozoides está asociada en forma directa con la pubertad, Berdugo y Avella (1994), sostienen que la edad de pubertad depende de variaciones propias que hay entre las razas de leche y carne, y que las razas históricamente seleccionadas por su producción de leche, tienen un inicio de la pubertad más temprano y un mayor desarrollo testicular a menor edad y madurez que las razas que producen poca cantidad de leche. Además, para el caso de razas de doble músculo poseen un comienzo de la pubertad más lento y poseen un tamaño testicular más pequeño a la pubertad y a la madurez.

#### **4.9.5. Genes recesivos**

Cardellino (1999) cita que las razas bovinas al igual que cualquier especie tienen caracteres deseables e indeseables y en sus cromosomas hay genes recesivos indeseables, algunos letales o altamente deletéreos que se encuentran en forma heterocigótica y que tienen mayor oportunidad de manifestarse en los casos de consanguinidad.

#### **4.10. Alteraciones técnicas o defectos del manejo de semen**

Según Paparella (2001) una muestra de semen refleja la capacidad de fecundación y las condiciones generales de salud y del aparato reproductor, y a su vez sirve de elemento de juicio para aceptación o descarte de un toro para servicio, e incluso su destino para sacrificio. Esto significa que al evaluar la calidad de un semen, según Echeverry (2003) se debe tener muy claro las condiciones de manipulación y los posibles defectos en lo que se puede incurrir

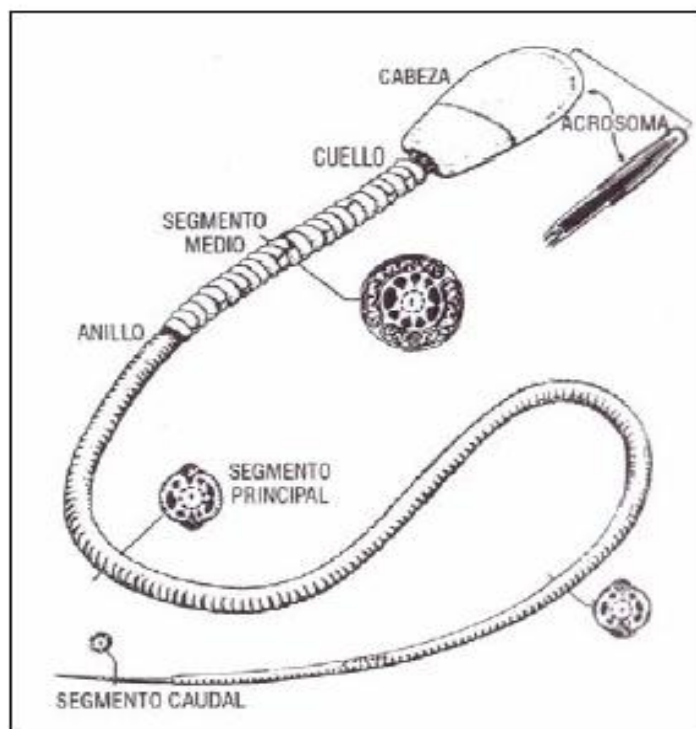
y que generan errores al momento de emitir un concepto que juzgue la calidad seminal del toro.

Las alteraciones técnicas, generalmente son de orden involuntario o por desconocimiento de los posibles efectos al momento de manipular la muestra y /o evacuarla. Las alteraciones pueden deberse a shock hipotónico por exposición al frío, por contaminación con orina, lo cual genera cambios bruscos, que ocasionan daños en la membrana mitocondrial lo que conlleva a afectar la movilidad principalmente por flexión de cola (Barth, *et al.*, 2000). La muestra a evaluar puede verse afectada, por contaminación de agua, con venenos (garrapaticidas, mata malezas, etc.), por estiércol e instalaciones descuidadas y pozos sépticos. A su vez también por largos intervalos de tiempo entre la toma de la muestra seminal y la evaluación de la misma (Barth, 2003).

De igual manera, Sánchez y Tsutsiu (2002), reportan que factores mecánicos como la mala estimulación del toro o fallas en el equipo de electro eyaculación, conducen a una baja concentración de espermatozoides y/o azoospermia en el eyaculado, esta baja concentración constituye una alteración para medir la motilidad masal.

#### **4.11. Malformaciones congénitas**

La producción y fertilidad de los espermatozoides, se ve afectada por malformaciones congénitas que van, según Hafez (1989), desde la ausencia del epitelio seminífero y segmentos de los conductos wolffanes hasta el criptorquidismo y testículos ectópicos, entre otros. Barth *et al.* (2000), mencionan que hay malformaciones congénitas que con llevan a inhabilidades copulativas, como es el caso de la espondilosis lumbar, músculo retractor del pene, frenulos peneanos, desviación espiral del pene, etc.



Fuente: (Hafez, 2000).

Figura 3. Partes de un espermatozoide.

Además de las lesiones anteriores presentan gotas citoplasmáticas, es una alteración frecuente en los espermatozoides de mamíferos; se tratan de residuos de la espermatogénesis que aparecen en la zona de conexión entre la cabeza y la pieza intermedia (gota citoplasmática proximal) y que van deslizándose hacia el anillo de Jensen (zona de unión de la pieza intermedia con la sección principal de la cola), denominándose entonces gotas citoplasmáticas distales, donde se acaban desprendiendo. Es importante hacer una diferenciación en el análisis entre gotas proximales y distales por su distinta correlación con la fertilidad, se ha determinado que eyaculados con más de un 5% de gotas citoplasmáticas proximales producen un descenso de la fertilidad, y en cambio, no se ha obtenido una correlación directa entre el porcentaje de gotas citoplasmáticas distales y ese mismo parámetro.

Existen diversos métodos para realizar el análisis de la morfología espermática. El más sencillo es el uso de tinciones de extensiones espermáticas y su posterior observación en un microscopio óptico, para lo que disponemos de un amplio abanico de opciones así, diferenciar el contorno de la misma. Al tener un buen contraste con el fondo del campo de

visión del microscopio, las tinciones dobles (Giemsa, William, Papanicolau) lo que buscan es visualizar las partes específicas del espermatozoide (García-Artiga *et al.*, 1994).

Tanto el uso de microscopía de contraste de fase, como de contraste diferencial de interferencia, previa fijación de la muestra, nos permiten igualmente realizar el análisis morfológico de los espermatozoides. También es posible realizar un análisis ultra estructural utilizando el microscopio electrónico de barrido o transmisión, aunque su uso es solamente experimental (Bonet *et al.*, 2006).

## **4.12. Costos**

### **4.12.1. Costo fijo**

Costo Fijo, se define como aquel que no cambia cuando existen variaciones en el nivel de producción. No debe entenderse el término fijo como un importe monetario invariable de un ejercicio a otro. El costo fijo es constante, los costos fijos o cargas de estructura son generalmente costos indirectos, y entre ellos podemos mencionar: alquileres, gastos de mantenimiento, seguros, amortizaciones. Algunos autores distinguen entre costos fijos de estado parado, de inactividad o de estructura, que existen siempre aunque la inactividad sea total (amortizaciones de edificios) y costos fijos de puesta en marcha o de preparación de la producción, estos últimos serían los necesarios para comenzar a fabricar aunque sólo sea una unidad, siendo característicos sólo para algunos tipos de empresas (Corcoran, 2012).

### **4.12.2. Costo Variable**

Es aquel que varía, ante cambios en el volumen de producción. Los Costos variables son generalmente directos y algunos ejemplos podrían ser: la mano de obra directa, consumo de materias primas. Los costes variables, dependiendo del factor que se esté analizando, podrán fluctuar de diversa manera por lo que se clasificarán en:

- Costos variables proporcionales: aquellos que varían en la misma proporción que el nivel de producción el coste variable unitario es constante.
- Costos variables progresivos: aquellos que varían más que proporcionalmente ante Variaciones del nivel de producción el coste variable unitario es creciente.
- Costos variables regresivos: aquellos que varían menos que proporcionalmente ante Variaciones en el nivel de producción. (Sapag y Sapag, 2103).



## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Localización del área de estudio

El presente trabajo de investigación se realizó en el rancho Cordobesa que se localiza en el municipio las Choapas del Estado de Veracruz, México, 19° 11' latitud norte, 96° 08' longitud oeste, a una altitud de 16 msnm. Con un clima cálido húmedo Aw2, con lluvias en verano y un índice de humedad de 75%, con temperatura media anual de 25°C, precipitación pluvial de 1400 mm, (Figura 4).



(INEGI 2007).

Figura 4. Ubicación del área de estudio municipio las Choapas del Estado de Veracruz, México.

## **5.2. Animales, manejo e instalaciones**

Para el presente trabajo de investigación, se evaluaron 6 toros de la raza Suiz-Bú con una edad aproximadamente 2 años, teniendo estos un peso aproximadamente de 230 kg, los animales fueron alimentados *ad libitum* a base de concentrado, pasto y agua. Los toros se encontraban reproductivamente maduros, para el estudio se eligieron completamente al azar, este trabajo de investigación estuvo dividido en dos etapas.

## **5.3. Tratamientos**

Los tratamientos se distribuyeron de la siguiente manera: de los 6 eyaculados obtenidos por toro se realizaron 8 repeticiones por diluyente Tris y Lactosa ( $8 \times 2 = 16$  muestras en total para congelar) por eyaculado, utilizando como variable independiente el tratamiento.

## **5.4. Colecta de semen**

En la etapa número 1, se preparó el material a utilizar para la recolección del semen, que fue un embudo recolector que conducía el semen a un tubo de ensayo estéril, con capacidad de 15 ml. Posteriormente, se procedió a extraer la muestra de semen mediante la metodología propuesta por Herrick y Self (1959), con el electroeyaculador, el cual es un dispositivo que sirve para estimular eléctricamente determinados nervios del aparato reproductor del macho. El electroeyaculador fue introducido en el recto del toro y el propósito fue estimular las glándulas anexas del aparato reproductor del toro para facilitar el eyaculado. Se evaluó el semen en fresco y se registraron las características microscópicas y macroscópicas.

## **5.5. Evaluación macroscópica y microscópica del semen**

En la evaluación macroscópica se determinó el volumen, color, consistencia y olor. En la microscópica se evaluó, la motilidad masal, mortalidad, concentración espermática y anomalías morfológicas, Barth *et al.* (2000),

### **5.5.1. Motilidad masal**

Inmediatamente después de que se obtuvo el semen, fue evaluado en un microscopio compuesto con el objetivo de 10 X, manteniendo el semen y el material para evaluación a una temperatura de 35-38°C, para no provocar un choque frío.

### 5.5.2. Concentración espermática

Se determinó con una cámara de Neubauer, se realizó la dilución del semen; en una parte de semen por 200 partes de agua común en una pipeta de toma. Se retiraron 3 a 4 gotas de agua de la pipeta de toma y finalmente se agregó una gota con el semen diluido, en cada uno de los surcos de la cámara de Neubauer, después se procedió a diluir el semen de los 6 animales, a un factor de dilución 1:200 tal como indicada la casa comercial, se utilizaron los siguientes diluyentes: Triladyl® es un diluyente buffer que contiene TRIS, ácido cítrico, azúcar, glicerina, agua de ionizada y antibióticos. Lactosa para preparar 100 ml de Diluyente (para procesar en promedio de 180 a 220 pajillas de semen de 0,5 ml), 11g de Lactosa en 100 ml de agua biodestilada y calentar a 55 grados centígrados.

Solución madre: 74 ml de solución madre de Lactosa, 16 ml de Glicerol, 20 ml de yema de huevo filtrada. Total 100 ml de diluidos. Antibiótico para semen fresco. Tilosina. 0.3 ml, Gentamicina 0.4 ml Linco Spectin 0.3 ml, Amilasa 0.2 ml. Posteriormente el semen recolectado fue manipulado para congelarlo a una temperatura de 196°C, para congelar se utilizó el procedimiento de congelación a vapor de Nitrógeno.



Figura 5. Composición y porcentaje de cada diluyente (Tris) (Lactosa).

Cuadro 4. Porcentaje de cada diluyente (Tris) (lactosa).

Lactosa		Tris	
Lactosa	74 ml	Triladyl	20 ml
Glicerol	6 ml	Agua	60 ml
Huevo	20 ml	Huevo	20 ml
Total	100 ml	Total	100 ml

### 5.6. Método a vapor de nitrógeno

El proceso de congelación de las pajillas se realizó de la siguiente manera: Primero se identificó cada pajilla con el número de toro y diluyente (tris) se le asignó la letra A (lactosa) letra B (Lactosa), por ejemplo toro #1 trata (tratamiento) A (Tris) número de repetición se identificó la repetición por diluyente y por toro así sucesivamente para cada pajilla, primero se colocaron todas las pajillas en refrigeración durante 180 minutos para preparar antes de congelar, a una temperatura de 25°C para poder equilibrar y evitar el shock frio al momento de agregarle el nitrógeno líquido, después de los 90 min, se procedió a llenar las pajillas de 0.5 ml, con semen con el peine de aspiración, todas las pajillas se trabajaron en la charola de envasamiento. Para el congelamiento con nitrógeno líquido se utilizó una caja de telgopor, con tapa, de aproximadamente 39 cm de largo por 34 cm de ancho por 25 cm de altura. Se colocó una gradilla y las pajillas en un marco de aluminio, de 11 cm, 7 cm y 2 cm de altura, respectivamente. La gradilla alcanzaría 20 cm de altura con respecto al fondo de la caja, se dejó caer el nitrógeno líquido en la caja de telgopor con 6 cm de fondo. Se tapó por unos minutos hasta que cesó la ebullición y se congelaron las pajillas en el interior. Se tapó la caja por 2 minutos, rápidamente se le destapó y se sacaron las pajillas para ponerlas en las canastillas y finalmente las pajillas se almacenaron en un termo criogénico con nitrógeno líquido, durante 1 mes.

En la etapa número 2 se analizó el semen al descongelarlo, para evaluar en cada pajilla la eficacia de cada uno de los dos diluyentes utilizados. Se evaluaron las siguientes características:

La motilidad masal, es el resultado de la concentración espermática, el porcentaje de células con movimiento progresivo y velocidad de movimiento de los espermatozoides. Lo cual provoca movimientos de flujo y la existencia de verdaderas “olas” de zoospermios, que al estar en baja concentración provocan disminución en la motilidad.

Vigor: Es la fuerza con la que se mueve el espermatozoide.

Sobrevivencia: esto son los espermatozoides vivos/muertos de cada pajilla.

Anormalidades: los espermatozoides morfológicamente anormales son categorizados por la porción de la célula afectada y/o el tipo de origen. Las anomalías según este criterio se clasifican en primarias y secundarias. Se consideran anomalías primarias, aquellas que ocurren o tienen su origen durante la espermatogénesis dentro del testículo, mientras que las anomalías secundarias, se originan dentro del epidídimo o en el laboratorio.

### **5.7. Evaluación del semen congelado**

Descongelamiento del Semen: las pajillas se descongelaron en baño María a una temperatura de 38°C por 1 min, para su posterior evaluación microscópica (Etches, 1996).

### **5.8. Viabilidad post- Descongelación**

Se determinó mediante el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva y el vigor espermático, inmediatamente después de descongelado el semen.

### **5.9. Análisis Estadístico**

Se realizó un diseño completamente al azar, se realizó un ANVA con procedimiento GLM sobre la variable de respuesta del semen para antes y después de congelar, con el propósito de conocer el efecto del diluyente. Simultáneamente se realizó la prueba rango de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) para seleccionar de ser el caso cual es mejor diluyente. El análisis estadístico se realizó empleando el paquete SAS (v 9.1.3).

## VI. RESULTADOS

En el Cuadro 5, se muestra el volumen inicial de los eyaculados usados en el estudio, así como los resultados obtenidos en fresco para cada variable estudiada, obteniendo así un promedio del volumen de eyaculado de 6 ml, el color del semen predominante fue verde cremoso, así como el pH que se obtuvo osciló entre 6 y 7, el porcentaje de motilidad masal fue entre el 60 y 70 % y el vigor o la fuerza con que el espermatozoide se mueve fue de una escala 0 -5 con un promedio de 3 y 4.

Cuadro 5. Descripción de las características seminales, volumen seminal y concentración espermática en los eyaculados de los bovinos en fresco

Toro/Núm.	Volumen Seminal (ml)	Motilidad masal %	vigor	color	Concentración en millones	pH
1	5	60	4	Verde cremoso	.15	6
2	3	60	3	Verde cremoso	.25	7
3	10	70	4	Verde cremoso	.15	6
4	5	70	3	Verde cremoso	.20	7
5	3	60	4	Verde cremoso	.15	7
6	10	70	4	Verde cremoso	0.15	6

Los resultados de cuadro 6 muestra que existen diferencias altamente significativas ( $P > 0.001$ ) entre el semen fresco y los tratamientos con Tris y Lactosa, sin embargo, no se encontraron diferencias ( $P < 0.05$ ) para las variables MoM, sobrevivencia, anormalidades, excepto para la variable vigor donde los resultados demuestran diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) para los tratamientos Tris y Lactosa con valores de 2.70 y 3.29, respectivamente ver Figura 7.

Cuadro 6. Características seminales ( $X \pm E.E.$ ) de los 6 sementales con fines de congelación de semen

Variables	Fresco	*Tris	Lactosa	EEM <sup>1</sup>
Vigor	3.6667 <sup>a</sup>	2.7083 <sup>b</sup>	3.29179 <sup>a</sup>	0.0759839**
Motilidad Masal (%)	65.000 <sup>a</sup>	44.792 <sup>b</sup>	46.042 <sup>b</sup>	1.0672683**
Sobrevivencia (%)	100 <sup>a</sup>	73.208 <sup>b</sup>	71.042 <sup>b</sup>	0.7870086**
Anormalidades (%)	0 <sup>b</sup>	19.5000 <sup>a</sup>	18.8542 <sup>a</sup>	2.9930718**

<sup>ab</sup> Medias con diferentes literales en la misma fila indican diferencia estadística ( $P < 0.05$ ); \*\* ( $P < 0.001$ ); <sup>1</sup>EEM: Error estándar de la media. \* (Tris) (hidroximetilaminometano).

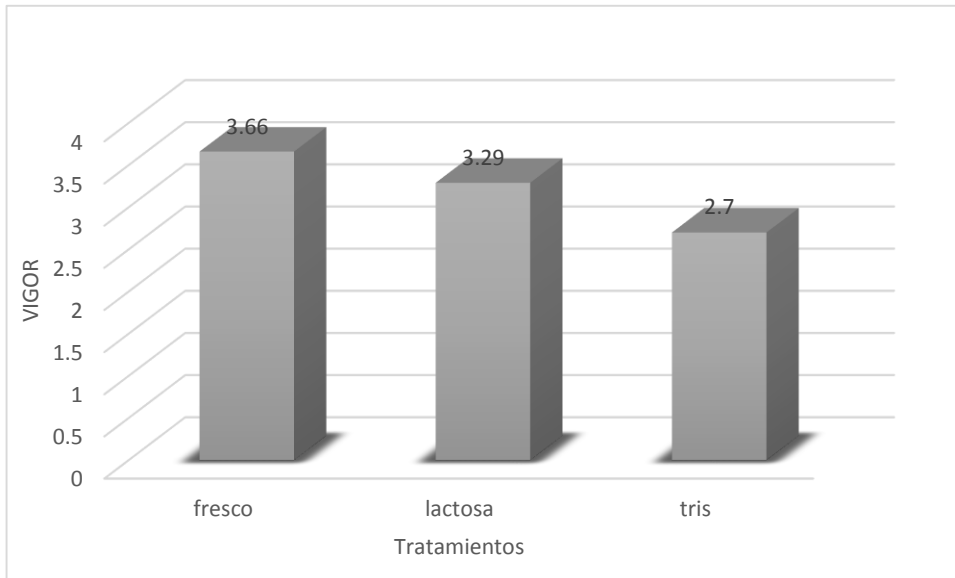


Figura 6. Comparación para la variable vigor de cada tratamiento.

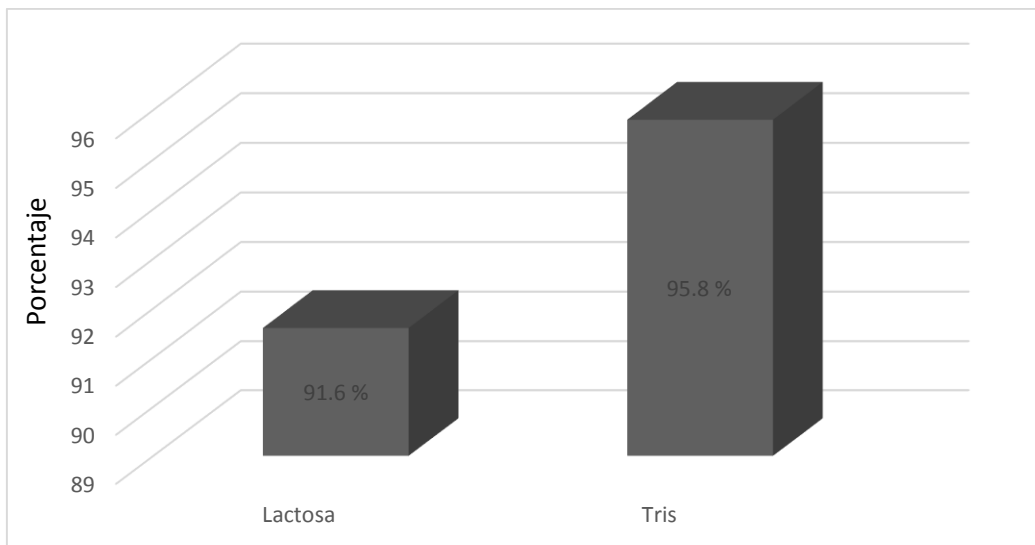


Figura 7. Porcentaje de pajillas viables

Se observó que el porcentaje de pajillas viables fue de 91.6 para tratamiento con Lactosa y 95.8 para el tratamiento con Tris (hidroximetilaminometano).



Cuadro 7. Estimación de costos de los materiales utilizados en la investigación.

	<b>Costo unitario 1</b>	<b>Costo unitario 2</b>	<b>Presentación</b>
<b>Costos fijos</b>			
Diluyentes	Tris (comercial) \$795	Base de lactosa (casero) \$2000	
Microscopio	5000	5000	X
Electro eyaculador	5000	3500	X
Termo/nitrógeno 20 lts.	6000	6000	X
Tinción eosina /nigrosina	\$120	\$120	Frasco/20 ml
Lamina Porta objetos	\$47	\$47	Caja/50 unidades
Semen	\$ 25 pesos pajilla c/u. 48	\$ 25 pesos pajilla c/u. 48	Unidad pajilla
<b>Costos variables</b>			
Mano de obra	120 pesos /día	120 pesos /día	X
Material para el de las muestras (guantes, jeringas, capuchones etc.)	\$300	\$300	Caja 30 unidades
<b>TOTAL</b>	<b>\$ 17,380.<sup>00</sup></b>	<b>\$17,087.<sup>00</sup></b>	

## VII.DISCUSIÓN

En los resultados previos a la congelación se muestra los resultados postcongelación y a la congelación en estos se obtuvieron eyaculados de 3 a 10 ml, no obstante fue mayor que los resultados obtenidos por Ramírez (2002) y Guillen (2001) ellos obtuvieron resultados menores a estos 2.2 y 3.0 respectivamente. En ambos diluyentes (tris y lactosa) ocurrió una reducción similar del porcentaje de motilidad espermática a la descongelación en comparación al semen fresco. Esta disminución y deterioro de la motilidad de los espermatozoides después del proceso de congelación y descongelación se considera normal debido a los cambios que tiene que atravesar el espermatozoide durante el enfriamiento y la descongelación (Palacios *et al.*, 1992; Maxwell y Watson, 1996; Aké-López y Sánchez-Encalada, 1997; Gillan *et al.*, 2004). El proceso de congelación/descongelación del semen causa alteraciones bioquímicas y funcionales a los espermatozoides, lo que resulta en una reducción de la motilidad y la viabilidad. Durante los cambios de estado en el proceso el espermatozoide se debe enfrentar al choque térmico, aumento de la concentración de sales, y formación de cristales de hielo en el exterior del espermatozoide, lo que sugiere que los dos diluyentes tienen posibilidad de desnaturalización de una proporción adecuada de nutrientes, proteínas y ruptura mecánica de buffers y crio protectores, de vital importancia para los elementos estructurales del espermatozoide (Salamon y Maxwell, 2000; Watson, 2000; Palacios, 2005; Evans 1994).

Estudios realizados por Cabrera *et al.* (2008) reportan un 80 % de motilidad con el diluyente tris en fresco, y previo a la descongelación un 62%, estos resultados contrastan con lo obtenido en esta investigación que fue en fresco de 60 y 70% y previo a la descongelación fue de 44.79%. Según Watson (1995) esta diferencia se debe posiblemente a que durante la congelación se pierde generalmente entre 40 y el 50% de la motilidad inicial de los espermatozoides.

La motilidad espermática de las muestras aptas a la descongelación en ambos diluyentes en la presente investigación se encuentra dentro del rango de motilidad que se logra a la descongelación reportado por Salamon y Maxwell (2000), que es entre 40 y 60 %. La motilidad a la descongelación con ambos diluyentes en el presente estudio fue muy similar a

lo reportado por González; (1990) con un diluyente a base de leche descremada, con 12 % de yema de huevo y 7% de glicerol, que fue de 6.3.

Aisén *et al.*; (2000) encontraron un 70.5 % de motilidad a la descongelación al usar un diluyente a base de tris-ácido cítrico-fructosa-Trealosa- EDTA, con 10 % de yema de huevo y 6 % de glicerol. Estos resultados podrían ser explicados por diferencias entre los diluyentes, las líneas de animales, las condiciones y características de las técnicas usadas para el procesamiento del semen.

En cuanto a la morfología/anormalidades espermáticas en el semen descongelado, los resultados de esta investigación son semejantes a los reportados por Palacios *et al.* (1992), quienes observaron que el porcentaje de anormalidades no varió significativamente ( $P>0.05$ ) después del proceso de descongelación del semen.

Esto nos puede indicar que la disminución de la motilidad ocurre sin que se produzcan cambios estructurales visibles al microscopio. Según Palacios *et al.*; (1992), la presencia de espermatozoides con cola doblada, con pérdida de motilidad por la disminución de energía o realizando movimientos en círculo, se debe a la permeabilidad de la membrana plasmática y a la salinidad de iones y moléculas, tris y lactosa ambos ofrecen buena protección durante la congelación, y posterior a esta.

Según Cabrera (2008), los resultados obtenidos por ellos, previo a la congelación y conservando con el dilutor tris fue de 82.3% de motilidad, después de la descongelación la motilidad fue de 62.0 y 56.8% para el dilutor tris, se encontró diferencia estadística entre dilutores ( $p<0.05$ ). Cabrera (2011) reporta un 82.3% de motilidad previo a la congelación utilizando el dilutor tris, y después de la descongelación presenta un 62.0 % de motilidad, existiendo diferencias ( $p<0.05$ ).

## VIII . CONCLUSIÓN

- Los resultados de este trabajo muestran que el semen de bovinos se pueden congelar satisfactoriamente con los dos diluyentes y que la calidad de la dosis que se obtienen es buena y similar con diluyentes, sin diferencia estadística, aunque aparece una ligera tendencia a favor de lactosa para la variable vigor.
- El uso de lactosa puede considerarse como un diluyente apto para congelar semen bovino, pero requiere más estudios que puedan estandarizar su forma de uso.
- El uso de los diluyentes lactosa y Tris (hidroximetilaminometano) no afecta los parámetros a la motilidad masal, vigor, sobrevivencia y anormalidades no tuvieron diferencias significativas y el porcentaje de dosis inseminantes fue mayor para Tris (hidroximetilaminometano).

## IX. LITERATURA CITADA

- Aboagla, E. M. Terada T. 2003. Trehalose enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. *Biol Reprod*; 69: 1245-1250.
- Aisén, E. G., Álvarez, H. L., Venturio, A. and Garde, J. J. 2000. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology*. 53:1053-1061.
- Aké-Lopez, R. y S.W. Encalada. 1997. Efecto de la remoción parcial plasma seminal sobre el semen bovino. *Revista Biomédica*. 8: 21-26.
- Bacaraldo, M. I., A. D. Barth y W. Bertrand. 2007. Pasos para el congelamiento de semen bovino: desde la colección del semen hasta el almacenamiento en el tanque de nitrógeno líquido. *IVIS Reviews in Veterinary Medicine*, I.V.S. (Ed.). International Veterinary Information Service, Ithaca NY ([www.ivis.org](http://www.ivis.org)).
- Barbas, J. P., Mascarenhas RD. 2009. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue*; 231: 259-275.
- Barth, A. D. 2001. Evaluation of sperm motility in bull breeding soundness evaluations society for theriogenology. p. 4-5.
- Barth, A., Gabriel, B., Tribulo, H. 2000. Memorias de evaluación de toros y control de la calidad del semen. 1 ed. Córdoba (Argentina). Universidad Católica de Córdoba. 55 p.
- Barth, A.D. 2003. Importancia de la calidad seminal y de FIV para el estudio de efectos espermáticos. Memorias V Simposio Internacional de Reproducción Animal. INRA. 205-221p.
- Bathgate, R., 2011. Antioxidant mechanisms and their benefit on post-thaw boar sperm quality. *Reprod Dom Anim*; 46: 23-25.

- Berdugo, J., A. Avella, F., 1994. Producción espermática de toros en el trópico. *Revista El Cebú. Colombia*.50:20-25.
- Bonet, S.B., M, Pinart, E, Sancho S, García – Gil, B. E. 2006. Morfología espermática en porcino. España: Instituto de Estudios Catalans.
- Bravo, W. J. A., Sidkmore, X, Zhao., 2000. Reproductive aspects and storage of semen camelids. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 173-193.
- Cabodevila, J.C., L.R. Catalano., L.R., Echeverría, H., Callejas, S., Soto, P., y Monteavaro, C. 2005. Evaluación de semen bovino congelado/descongelado. *In: Memoria del 12° Simposio Internacional de la Asociación Mundial de Laboratorios de Diagnóstico Veterinario*. Montevideo, Uruguay.
- Cabrera, V.P., y C Pantoja A. 2008. Influencia de los dilutores Tris y Ovine Freezing sobre la integridad de la membrana citoplasmática durante la congelación de semen de ovinos en pajillas de 0.5 ml. *Rev Inv Vet Peru.* 19(2):152-159.
- Cardellino, R.A.1999. Mejora genética de bovinos de carne en condiciones extensivas. *Acric, Zoo, tec*, 44: pp: 123-136.
- Carvajal, G. Cuello C, Ruiz M, Vázquez JM, Martínez EA, Roca J., 2004. Effects of centrifugation before freezing on boar sperm cryosurvival. *J Androl*; 25: 389-396.
- Catena, M. J. Cabodevila., 1999. Evaluación del semen bovino congelado. *Revista Taurus.* 1(3): 18–31.
- Chacón, J., Pérez E. and Rodríguez-Martinez, H. 2002., Seasonal variations in testicular consistency, scrotal circumference and spermogramme parameters of extensively reared Brahman (*Bos Indicus*) bulls in the tropics. *Theriogenology* 58(1):41-50
- Chenowethl P. J., C.C. Chase., C.A. Risco. and R.E. Larse. 2006. Characterization of gossypal induced sperm anomalies. *Theriogenology.* 53: 1193–1203.

- Coe, P. H., 1999. Association Among age, scrotal circumference and proportion of morphologically normal spermatozoa in young beef bull during and initial breeding soundness examination. JAVMA 214(11):18.
- Cole, H. H. and Cupps, P. T. 1989. Reproduction in Domestic Animals. 1. Ed. Academic Press, New York. 1:539-59
- Corcoran, W. 2012. Costos contabilidad, análisis y control. 4 ed. Limusa. México. 200 p.
- De Abreu, R.M., W.E. Berndtson., R.L. Smith., and Pickett, B.W. 1979. Effect of post thaw warming on viability of bovine spermatozoa thawed at different rates on French straws. Journal of Dairy Science. 62:1449-54.
- Echeverria, P. J. 2003. Las situaciones de estrés en toros: efectos en la reproducción. El cebu N. 331.pp 52-57.
- Echeverry, J. 2003. Evaluación morfológica seminal de toros. Crianza ganadería taurina. Consultado: 10 de septiembre de 2014.
- Etches, R. J. 1996. Reproducción bovina 2<sup>a</sup>. Ed. Madrid, España pp .249-276.
- Evans, G. 1994. Inseminación artificial en ovejas y cabras. Ed. Acribia S. A. Zaragoza, the quality of frozen-thawed epididymis España. 95-123.
- Evans, G., and Maxwell, W. M. C. 1990. Salamon Artificial Insemination of Sheep and Goats. Butterworths, Sydney, Australia.
- Fiser, P., Fairfull, R. 1986. The effects of rapid cooling (Cold shock) of ram semen, photoperiod and egg yolk in diluents on the survival of spermatozoa before and after freezing. Cryobiology 23:518-524
- García - Artiga, Domínguez V, Gonzales Bulnes A, Veiga López A, Cocero MJ. 1992. Efecto de la concentración de sacarosa sobre la supervivencia post-descongelación de embriones ovinos en distintos estadios del desarrollo preimplantacional. ITEA 24: 229-281.

- Gillan, J. L.; Quintero, A.A.; González, D.M. 2004. Effect of cryopreservation on integrity of plasmatic and acrosomal membrane of bulls sperm. *Reproduction in Domestic Animals* 19(4):382-389.
- Gonzales-Urdiales R. 2006. Contrastación seminal. *Cunicultura*, 160: 394-399.
- González, H. G., 1990. Memorias. Congelación de semen caprino en pajillas francesas de 0.5 ml evaluando diferentes ritmos de congelación. *Fmvz - UNAM*
- Guillén H. 2001. Evaluación de las características seminales en carneros Blackbelly. Tesis de Ing. Zootecnista. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina. 68 p.
- Hafez, E.S.E. 1989. Reproducción e inseminación artificial en animales. 5 ed. Interamericana Mc Graw-Hill, México. 513 p.
- Hafez, E.S.E.1985. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales 4ta edición McGraw-Hill. México. 513 p.
- Hafez, E.S.E.1996. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales 4ta edición McGraw-Hill. México. 513 p.
- Hafez, ESE.B Hafez. 2002. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. 7a Ed. McGraw Hill Interamericana. México. Pp 375-387.
- Herrick, J .B. Self, H. L. 1959.Evaluación de la fertilidad del toro y del verraco. *Acribia*, Zaragoza España, 135 p.
- Holt, W. V. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal reproduction Science* 62:3-22.
- Hu, J.H. Li QW, Li G, Jiang Z L, Bu SH, Yang H, Wang LQ. 2009. The cryoprotective effect of trehalose supplementation on boar spermatozoa quality. *Anim Reprod Sc*; 112: 107-118.



- Johnson, K. R., Dewey, C. E., Bobo, J. K., Kelling, C. L. and Lunstra, D. D. 1998. Prevalence of morphologic defects in spermatozoa from beef bulls. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 213(10):1468-1471.
- Kastelic, J. P., Cook, R. B., Coulter G. H. 2002. Insulating the scrotal neck affects semen quality and scrotal/testicular temperatures in the bull. *Theriogenology*; 45:935-942.
- Kundu, C.N. Chakraborty J, Dutta P, Bhattacharyya D, Ghosh A, Majumder GC. 2002. Effects of dextrans on cryopreservation of goat cauda epididymal spermatozoa using a chemically defined medium. *Reproduction*; 123: 907-913.
- Maxwell W, Watson P. 1996. Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim.Repro. Sci* 42: 55-65.
- Medeiros, C.M., O.F. Forell., A.T.D. Oliveira., and Rodríguez, J.L. 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better. *Theriogenology*. 57(1): 327-344.
- Morrow, D., and A. Current. 1986. *Therapy in theriogenology diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in small and large animals.* Saunders company – Philadelphia, 132-136 p.
- Muller-Schlosser, F. (1989). *Minitub Manual 13500/0004.* Trialdyl. [www.minitube.com](http://www.minitube.com). Fecha de consulta en octubre 2014.
- Palacios, A. A., Valencia, M. J. y Zarco, Q. L. 1992. Efecto del sistema de envasado y la concentración espermática sobre el daño acrosomal y la motilidad postcongelación del semen de equino. *Vet. Méx.* 23:315-318.
- Palacios, C.J. 2005. Técnicas para la evaluación de la capacidad fecundante de espermatozoides. *In: Memorias del posgrado de reproducción bovina, Colombia.*
- Palma, G. 2008. *Biología de la Reproducción.* 2da edición. Ed. Reprobitec. Mar Del Plata. Argentina. 58, 154-158 p.

- Paparella, G. 2001. *In: Memorias del V Seminario Internacional de practitioners.* Departamento Herd Medicine and Theriogenology, University of Saskatchewan, Saskatoon, Reproduction Bovina.
- Parks, J. E., D. R. Lee., Huang, S., Kaproth, M. T. 2003. Prospects for spermatogenesis *in vitro*. Theriogenology. Vol.39, 86 p.
- Purdy, P. 2006. Goat sperm cryopreservation Small Ruminant.Vol.63: 215-225.
- Ramírez CA. 2002. Efecto de tres dilutores y tres tiempos de refrigeración en la motilidad individual del semen refrigerado de carneros Black Belly. Tesis de Ing. Zootecnista. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina. 93 p.
- Rodríguez-Martínez H, 2003. Evaluación del semen congelado: Métodos tradicionales y de actualidad. Topics in Bull Fertility. Chenoweth P.J. International Veterinary Information Service. Ithaca, New York. USA.
- Salamon, S. y W.M.C. Maxwell. 1995. Frozen storage of ram semen. Processing, freeing, thawing and fertility after the cervical insemination. Journal of Dairy Science: 37:185-249.
- Salisbury, G. W., Van Demark, N. L. and Lodge, J. R. 1978. Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle. 2 Ed. W. H. Freeman Co., San Francisco. 200p.
- Salisbury, G.W., V Dermark N. L. and, Lodget, J. 1974. Fisiología de la Reproducción e inseminación artificial de los bovinos. Ed. W.H Freeman and Company (USA). 283 p.
- Sánchez, A.R., Cartagena, A.P., y Berland O.M. 2006.Comparacion del efecto de dos diluyentes sobre la fertilidad potencial de semen canino regrigerado. Rev. Inv. Vet. Peru.17 (1):1-7.
- Sánchez, A., T. Tsutsui. 2002. Evaluación de dos diluyente seminales para la preservación refrigerada de espermatozoides de gato (*Felis Catus*).Revista científica. FCV-LUZ. 12: 249-253.

- Sapag, C, N., and R.C.Sapag. 2013. Preparación y evaluación de proyectos.4 ed. Mac graw-hill 250 p.
- Spitzar, J. C., 2000. Evaluación de salud reproductiva del toro. International Veterinary Information Service. 20-25p.
- Watson, P. F., 1995. Recent developments and concepts and in the cryopreserved semen. Animal Reproduction Science. Vol.61: (2)481-492.
- Watson, P., 1981.The role of lipid and protein in the protection of ram spermatozoon at 5°C by egg-yolk lipoprotein. Revista. Reprod. Fert. 62:483-492.
- Yoshida, M., 2000.Conservation of sperms: current status and new trends. Animal reproduction Science .Vol.61:349-355.
- Duarte O, A., R.A González., F.L. Magaña .2010. Aplicación de la biotecnología para incrementar la productividad ganadera en América Latina. Archivos Latinoamericanos de Producción Animal. 18 (3-4):123-132.
- Giraldo G, J. 2007. Una mirada al uso de la inseminación artificial en bovinos. Revista Lasallista de Investigación. 4 (1): 51-57.
- Vishwanath R., P. Shannon. 2000. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. Animal Reproduction Science. 62: 23-53.
- Méndez M, M., J. Leon., R. Huerta. 2007. Algunos diluyentes utilizados para conservar o congelar semen en diferentes especies domésticas. *In*: Bioquímica del semen y de la fecundación: animales domésticos. Benemérita Universidad de Puebla. Puebla, Puebla, México. pp: 47-65.
- Hu J-H., Q-W. Li., L-S. Zan., Z-L. Jiang., J-H. An. 2010. The cryoprotective effect of low density lipoproteins in extenders on bull spermatozoa following freezing–thawing. Animal Reproduction Science. 117:11-17.
- 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. Información Técnica Económica Agraria. Revisita de la Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario. 101 (3):175-191.

Bravo, D.C. 1972. Freezing of bull semen in sugary solutions in plastic straws. *In: VII Inter. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem.* 11:1368.

Brito, F.I., M.J. Valencia., S.A. Balcázar., M.R. Angulo., V.O. Mejía. 2004. Congelacion de semen de carnero en pellets con diluyentes Tris-glucosa yema de huevo o lactosa-yema de huevo. *Avances en Investigación Agropecuaria.* 8 (002): 1-9.

## X. ANEXOS

Sistema SAS

11:59 Thursday, May 13, 2015 64

Obs	TORO	TRATAM	REP	VIGOR	MOTMASAL	ANORMA	SOBREVIVE
1	1	Tris	1	3	50	25	80
2	1	Tris	2	4	50	19	78
3	1	Tris	3	4	50	20	79
4	1	Tris	4	3	50	21	69
5	1	Tris	5	2	50	21	70
6	1	Tris	6	3	50	22	70
7	1	Tris	7	0	0	0	0
8	1	Tris	8	3	50	18	69
9	1	Lactosa	1	3	40	18	69
10	1	Lactosa	2	4	50	20	60
11	1	Lactosa	3	4	50	21	56
12	1	Lactosa	4	3	50	22	57
13	1	Lactosa	5	2	40	18	54
14	1	Lactosa	6	2	40	19	56
15	1	Lactosa	7	3	40	18	67
16	1	Lactosa	8	3	40	19	78
17	1	Fresco	1	4	60	0	0
18	1	Fresco	2	4	60	0	0
19	1	Fresco	3	4	60	0	0
20	1	Fresco	4	4	60	0	0
21	1	Fresco	5	4	60	0	0
22	1	Fresco	6	4	60	0	0
23	1	Fresco	7	4	60	0	0
24	1	Fresco	8	4	60	0	0
25	2	Tris	1	2	40	20	58
26	2	Tris	2	3	50	20	56
27	2	Tris	3	2	40	20	78
28	2	Tris	4	2	40	20	89
29	2	Tris	5	2	40	20	67
30	2	Tris	6	2	40	20	76
31	2	Tris	7	2	40	20	65
32	2	Tris	8	3	50	20	78
33	2	Lactosa	1	5	60	20	78
34	2	Lactosa	2	5	60	20	87
35	2	Lactosa	3	5	60	20	86
36	2	Lactosa	4	5	60	20	83
37	2	Lactosa	5	5	60	20	81
38	2	Lactosa	6	5	60	20	65
39	2	Lactosa	7	5	60	20	71
40	2	Lactosa	8	5	60	20	85
41	2	Fresco	1	3	60	0	0
42	2	Fresco	2	3	60	0	0
43	2	Fresco	3	3	60	0	0
44	2	Fresco	4	3	60	0	0
45	2	Fresco	5	3	60	0	0
46	2	Fresco	6	3	60	0	0
47	2	Fresco	7	3	60	0	0
48	2	Fresco	8	3	60	0	0
49	3	Tris	1	3	50	20	76
50	3	Tris	2	3	50	19	65

Obs	TORO	TRATAM	REP	VIGOR	MOTMASAL	ANORMA	SOBREVIVE
51	3	Tris	3	2	40	20	76
52	3	Tris	4	3	50	18	70
53	3	Tris	5	2	50	20	70
54	3	Tris	6	2	40	20	70
55	3	Tris	7	3	50	20	70
56	3	Tris	8	2	50	19	70
57	3	Lactosa	1	3	40	20	65
58	3	Lactosa	2	4	50	20	66
59	3	Lactosa	3	4	50	19	64
60	3	Lactosa	4	3	40	20	76
61	3	Lactosa	5	4	50	19	87
62	3	Lactosa	6	4	50	20	67
63	3	Lactosa	7	3	40	20	78
64	3	Lactosa	8	3	40	20	79
65	3	Fresco	1	4	70	0	0
66	3	Fresco	2	4	70	0	0
67	3	Fresco	3	4	70	0	0
68	3	Fresco	4	4	70	0	0
69	3	Fresco	5	4	70	0	0
70	3	Fresco	6	4	70	0	0
71	3	Fresco	7	4	70	0	0
72	3	Fresco	8	4	70	0	0
73	4	Tris	1	3	40	20	80
74	4	Tris	2	4	50	19	85
75	4	Tris	3	3	40	20	87
76	4	Tris	4	3	40	20	76
77	4	Tris	5	4	50	20	76
78	4	Tris	6	3	40	18	83
79	4	Tris	7	4	50	18	70
80	4	Tris	8	4	50	29	84
81	4	Lactosa	1	3	40	19	86
82	4	Lactosa	2	4	50	20	78
83	4	Lactosa	3	4	50	20	76
84	4	Lactosa	4	3	40	20	65
85	4	Lactosa	5	3	40	19	67
86	4	Lactosa	6	3	40	16	67
87	4	Lactosa	7	3	40	18	65
88	4	Lactosa	8	3	40	20	89
89	4	Fresco	1	4	70	0	0
90	4	Fresco	2	4	70	0	0
91	4	Fresco	3	4	70	0	0
92	4	Fresco	4	4	70	0	0
93	4	Fresco	5	4	70	0	0
94	4	Fresco	6	4	70	0	0
95	4	Fresco	7	4	70	0	0
96	4	Fresco	8	4	70	0	0
97	5	Tris	1	3	50	18	78
98	5	Tris	2	3	50	19	78
99	5	Tris	3	3	50	16	70
100	5	Tris	4	3	50	20	89

Obs	TORO	TRATAM	REP	VIGOR	MOTMASAL	ANORMA	SOBREVIVE
101	5	Tris	5	3	50	20	87
102	5	Tris	6	3	50	20	88
103	5	Tris	7	3	50	20	77
104	5	Tris	8	3	50	20	78
105	5	Lactosa	1	3	50	20	67
106	5	Lactosa	2	2	40	18	69
107	5	Lactosa	3	3	40	17	63
108	5	Lactosa	4	3	40	20	65
109	5	Lactosa	5	2	40	19	79
110	5	Lactosa	6	3	50	17	83
111	5	Lactosa	7	3	50	20	76
112	5	Lactosa	8	2	40	20	65
113	5	Fresco	1	3	60	0	0
114	5	Fresco	2	3	60	0	0
115	5	Fresco	3	3	60	0	0
116	5	Fresco	4	3	60	0	0
117	5	Fresco	5	3	60	0	0
118	5	Fresco	6	3	60	0	0
119	5	Fresco	7	3	60	0	0
120	5	Fresco	8	3	60	0	0
121	6	Tris	1	3	50	20	81
122	6	Tris	2	2	40	20	67
123	6	Tris	3	3	50	19	76
124	6	Tris	4	3	50	18	87
125	6	Tris	5	3	50	20	65
126	6	Tris	6	0	0	20	62
127	6	Tris	7	2	40	20	76
128	6	Tris	8	2	40	20	65
129	6	Lactosa	1	0	0	0	0
130	6	Lactosa	2	3	50	17	67
131	6	Lactosa	3	3	50	18	86
132	6	Lactosa	4	3	50	20	67
133	6	Lactosa	5	3	50	20	74
134	6	Lactosa	6	2	40	19	76
135	6	Lactosa	7	3	50	18	80
136	6	Lactosa	8	2	40	17	85
137	6	Fresco	1	4	70	0	0
138	6	Fresco	2	4	70	0	0
139	6	Fresco	3	4	70	0	0
140	6	Fresco	4	4	70	0	0
141	6	Fresco	5	4	70	0	0
142	6	Fresco	6	4	70	0	0
143	6	Fresco	7	4	70	0	0
144	6	Fresco	8	4	70	0	0

## Procedimiento GLM

## Información del nivel de clase

Clase	Niveles	Valores
TRATAM	3	Fresco Lactosa Tris

Número de observaciones 144

## Procedimiento GLM

Variable dependiente: VIGOR

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	2	22.3888889	11.1944444	16.36	<.0001
Error	141	96.5000000	0.6843972		
Total correcto	143	118.8888889			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	VIGOR Media
0.188318	25.67430	0.827283	3.222222

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
TRATAM	2	22.3888889	11.1944444	16.36	<.0001

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
TRATAM	2	22.3888889	11.1944444	16.36	<.0001



## Procedimiento GLM

Variable dependiente: MOTMASAL

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	2	12309.72222	6154.86111	77.86	<.0001
Error	141	11145.83333	79.04846		
Total correcto	143	23455.55556			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	MOTMASAL Media
0.524811	17.11621	8.890920	51.94444

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
TRATAM	2	12309.72222	6154.86111	77.86	<.0001

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
TRATAM	2	12309.72222	6154.86111	77.86	<.0001

## Procedimiento GLM

Variable dependiente: ANORMA

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	2	11778.34722	5889.17361	850.81	<.0001
Error	141	975.97917	6.92184		
Total correcto	143	12754.32639			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	ANORMA Media
0.923479	20.57877	2.630939	12.78472

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
TRATAM	2	11778.34722	5889.17361	850.81	<.0001

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
TRATAM	2	11778.34722	5889.17361	850.81	<.0001

## Procedimiento GLM

Variable dependiente: SOBREVIVE

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	2	166577.1667	83288.5833	656.22	<.0001
Error	141	17895.8333	126.9208		
Total correcto	143	184473.0000			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	SOBREVIVE Media
0.902989	23.42998	11.26591	48.08333

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
TRATAM	2	166577.1667	83288.5833	656.22	<.0001

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
TRATAM	2	166577.1667	83288.5833	656.22	<.0001

## Procedimiento GLM

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para VIGOR

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	141
Error de cuadrado medio	0.684397
Valor crítico del rango estudentizado	3.34993
Diferencia significativa mínima	0.4

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	TRATAM
A	3.6667	48	Fresco
A			
A	3.2917	48	Lactosa
B	2.7083	48	Tris

## Procedimiento GLM

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para MOTMASAL

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	141
Error de cuadrado medio	79.04846
Valor crítico del rango estudentizado	3.34993
Diferencia significativa mínima	4.2989

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	TRATAM
A	65.000	48	Fresco
B	46.042	48	Lactosa
B			
B	44.792	48	Tris

## Procedimiento GLM

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para ANORMA

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	141
Error de cuadrado medio	6.921838
Valor crítico del rango estudentizado	3.34993
Diferencia significativa mínima	1.2721

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	TRATAM
A	19.5000	48	Tris
A			
A	18.8542	48	Lactosa
B	0.0000	48	Fresco

## Procedimiento GLM

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para SOBREVIVE

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	141
Error de cuadrado medio	126.9208
Valor crítico del rango estudentizado	3.34993
Diferencia significativa mínima	5.4473

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	TRATAM
A	73.208	48	Tris
A			
A	71.042	48	Lactosa
B	0.000	48	Fresco



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas  
Campeche-Córdoba-Montecillo-Puebla-San Luis Potosí-Tabasco-Veracruz

*"2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón"*

H. Cárdenas, Tabasco A 21 de Agosto del 2015

A quien corresponda:

Por este conducto, el que suscribe **Dr. Jesús Alberto Ramos Juárez**, doy fe que la **Mvz. Brenda Beatriz Domínguez Coutiño**, utilizo 6 toros de la raza Suiz – Bú del rancho Cordobesa ubicado en el municipio de las Choapas del Estado de Veracruz , yo la apoye para poder realizar su trabajo de campo.

ATENTAMENTE TESTIMONIO

---

**Dr. Jesús Alberto Ramos Juárez**



