



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN.**

**CONGELACIÓN DE SEMEN BOVINO,
UTILIZANDO EL DILUYENTE TRILADYL.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA.**

PRESENTA:

LUIS ALBERTO PÉREZ QUIROZ.

**ASESOR: DR. ARMANDO ENRIQUE ESPERÓN
SUMANO.**

COASESOR: DR. BENITO LÓPEZ BAÑOS.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS:

Quiero darle gracias a dios por la vida y por todas las cosas que he vivido.

Quiero darles las gracias a todas aquellas personas que me ayudaron en el recorrido de este camino, que me dieron la mano cuando más lo necesite:

- A una persona muy importante en mi vida que aunque ya no esta presente físicamente sigue siendo el motivo mas grande de inspiración para salir adelante, y que desde donde esta me manda su bendición (Mamá) “La inmortalidad no existe, solo existe el recuerdo que dejamos en la memoria de los hombres”.
- A la familia Sánchez Cruz por todo el apoyo incondicional, y que me brindaron su confianza y me han ayudado a recorrer el camino que a veces ha sido difícil.
- A la familia Cruz Lovera gracias por todas las cosas que han hecho por mi, la verdad no tengo palabras para agradecerse los.
- A la familia Pérez Reyes gracias por todo.
- A la Universidad Nacional Autónoma de México UNAM, FES Cuautitlán, me siento orgulloso de ser un egresado de esta escuela que es la mejor de México.
- A mis profesores que me han enseñado el camino de la superación y que me ayudaron en mi formación profesional por citar algunos: Dr. Enrique Esperón, Dr. Benito López, MVZ Víctor Pérez, MVZ Carlos García, MC. Alfredo Cuellar, Dr. Guillermo Oviedo, MVZ Rafael Ordóñez, MVZ Irma Tovar, MVZ Rigoberto Hernández, Dra. Lucia Angélica Camacho, Dr. Francisco Morales... y a todos los demás que fueron mis maestros y dieron lo mejor de si para enseñarme y orientarme.
- A el jurado de mi tesis: Dr. Fernando Osnaya, Dr. Enrique Esperón, Dr. Angel Trejo, MC. Rafael Pérez, Dr. José Alfredo Medrano, por la disposición que tuvieron y por sus consejos.
- A todos mis amigos con los que compartí momentos inolvidables (Brenda, Amado, Fabiola, Sac Nictec, David, Rosaura, Daniela) y a todos los demás que no menciono pero que compartieron muchas cosas conmigo, además de mis amigos y la gente que ha confiado en mi de El Saltillo, Jilotepec, México.

Bueno en si quiero agradecer en general a todas las personas que me han ayudado y comprendido en muchas cosas, a todos los que mencione y a los que no, saben que de todo corazón les agradezco todo lo que han hecho por mí.....

“Por mi raza hablara el espíritu”

DEDICATORIA:

Sin lugar a dudas es un apartado donde no quisiera dejar fuera absolutamente a nadie, puesto que para mí todas las personas presentes en mi vida son muy importantes y citarlas a todas sería difícil por lo que traté de decir lo que siento con estas palabras:

Quiero dedicarles la realización de este trabajo a todas las personas que me ayudaron y otros tantos que sin participar han sido motivo de alegría y orgullo en mi vida.

Esta dedicado a toda mi luchadora e infatigable familia que merece cabalmente esos calificativos, ya que han sido el motor de mis inspiraciones y anhelos profesionales y personales y que me han acompañado en todos los momentos de mi vida; el ejemplo que tengo de mi familia es el trabajo, el esfuerzo, el sacrificio y la responsabilidad. A ellos les debo mucho de lo que soy y definitivamente debo de reconocer que este logro ha sido posible por ese trabajo en equipo que hemos realizado, por eso les dedico nuestro logro.

DEDICADO PARA TODOS USTEDES.

ÍNDICE

	Paginas
1.-RESUMEN.....	1
2.-INTRODUCCIÓN.....	2
3.-OBJETIVOS.....	8
4.-MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
5.-RESULTADOS.....	27
6.-DISCUSIÓN.....	31
7.-CONCLUSIONES.....	33
8.-BIBLIOGRAFÍA.....	34

1.-RESUMEN

Con el objetivo de evaluar un método manual para preservar semen bovino se llevó a cabo el presente trabajo en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, se manejaron 4 toros de los cuales se recolectaron 20, 10, 10 y 7 eyaculados. Se siguió un protocolo de congelación utilizando el diluyente comercial (Triladyl®). Iniciando con la preparación del diluyente, recolección del semen, adición de antimicrobianos y primodilución 1:1 (semen-diluyente), evaluación de cada uno de los eyaculados, número de dosis, adaptación al glicerol, empaquetado, congelación y evaluación de la motilidad posdescongelado. Se realiza una prueba final de decisión, donde al azar de 3 a 5 pajillas de cada eyaculado, se califica la motilidad del semen al momento de descongelarse (30 segundos en baño maría a una temperatura de 35° C). El protocolo de congelación se repitió 47 veces donde se obtuvo un rango de motilidad posdescongelado entre 50 y 53.5 % de espermatozoides móviles, con una desviación estándar entre 5.95 para el toro más homogéneo y 7.16 para el toro con mayor variación. Los datos en porcentaje de motilidad posdescongelado del semen fueron transformados a valores arcoseno para su análisis estadístico (análisis de varianza) bajo un arreglo totalmente aleatorizado desbalanceado. Se utilizó un diseño completamente al azar para comparar el comportamiento entre los toros, no observando diferencias significativas en el porcentaje de motilidad final posdescongelado. Se concluye que la congelación de semen por medio de éste protocolo permite obtener semen de calidad suficiente para su utilización en programas de inseminación artificial.

2.-INTRODUCCIÓN

Los métodos de congelación de semen surgen debido a la necesidad que se tiene para poder conservar la viabilidad de los espermatozoides por un tiempo prolongado o indefinido, comodidad en la manipulación del paquete espermático y facilidad de transporte cuyo objetivo contempla la mejora genética de los hatos en base a la utilización de toros de excelencia para la Inseminación Artificial (IA) (Sorensen, 1982).

En 1803, L. Spallanzani informó que los espermatozoides enfriados con nieve no morían, sino que solo se tornaban inmóviles y que al exponerlos al calor recuperaban la motilidad por varias horas (Sorensen, 1982; Derivaux, 1982).

Al principio del siglo XX (1900) en Rusia se empezó a aplicar la IA en los animales de granja, siendo E.J. Ivanoff el que empezó a trabajar con caballos, bovinos y ovinos obteniendo mejores resultados en las dos últimas especies. En 1936 en Dinamarca se funda el primer centro de IA. en el mundo (Pérez y Pérez, 1966; Sorensen, 1982).

En 1939 Lardy y Phillips descubren el poder conservador para el esperma de la yema de huevo. En 1940 Salisbury idea el diluyente citrato-yema que todavía se emplea como líquido de dilución del semen bovino. La congelación del semen se debe a los trabajos de Polge y Rowson (1950-52), que experimentaron incorporando glicerina al medio en concentración de 5 a 10 %. Diluyeron material seminal inicialmente con diluyente citrato- yema, añadieron a continuación glicerina y se mantuvo en inmersión de hielo seco y etanol a temperatura de -79° C, comprobaron que se podía conservar la vitalidad y el poder fecundante de los espermatozoides. El descubrimiento de antibióticos como la penicilina, estreptomycin y sulfanilamida, mejoró los resultados en la conservación del semen (Bonadonna, 1962).

Debe recordarse que el semen congelado apenas comenzó a utilizarse a principios de la década de 1950; antes de estas fechas, se procesaba y empleaba tal y como se recolectaba, pero como los espermatozoides viven fuera del organismo solamente durante un tiempo limitado; fue lo que obligó a los investigadores a idear un método para poder conservar la viabilidad y motilidad de los espermatozoides (De Alba, 1986; Galina y Valencia, 2006).

El procedimiento de congelación requiere que el semen sea diluido en un medio especial que contenga: una fuente de energía (Ej.: fructosa), capacidad buffer (Ej.: citrato de sodio, hidroximetil aminometano (Tris)) y pH neutro, que sea isosmótico y que proteja a los espermatozoides de la congelación al incorporar el glicerol como agente crioprotector, además de antibióticos que inhiban el crecimiento de posibles elementos bacterianos contaminantes (Galina y Valencia, 2006).

El semen congelado es aquel que diluido puede almacenarse por tiempo indeterminado y constituye un medio muy eficiente de conservación del semen. Este semen se conserva a temperaturas muy bajas; en la actualidad el medio más común de almacenamiento es nitrógeno líquido el cual tiene una temperatura de -196° C. (Sorensen, 1982; Ramírez y Ríos, 1997).

El semen congelado ayuda a llevar a cabo el método de Inseminación Artificial definiéndose ésta como: el depósito mediante manipulación instrumental de semen en el tracto genital femenino, en el sitio adecuado, en el momento oportuno para obtener una gestación; también se puede definir como la introducción de semen en los órganos genitales de la hembra sin la intervención del macho (Peter y Ball 1995; Hafez, 1996).

El método de IA nos permite utilizar los mejores toros a un precio que de otra forma resultaría muy costoso (más económico el costo de dosis de semen y la mano de obra necesaria para la IA, que tener un macho de monta libre y mantenerlo) además de que el uso de sementales sobresalientes ofrece la oportunidad de mejorar genéticamente los animales del hato y también constituye una forma de prevenir algunas enfermedades reproductivas en las que los toros se consideran vector tales como Brucelosis, Leptospirosis, Tricomoniasis, etc. (Hafez, 1996; Aiello, 2000; Galina y Valencia, 2006).

La inseminación artificial y la criopreservación del semen han significado una mejora en la cría potencial de ganado bovino. Sin embargo existen diferentes protocolos de congelación de semen y, en algunos el resultado es desfavorable ya que se reduce la calidad del semen (Cotter *et al.*, 2005).

Antes de comenzar a describir el protocolo de congelación es importante tomar en cuenta que para utilizar a un toro como futuro semental, éste debe de ser evaluado rigurosamente y a manera de resumen a continuación se describe los aspectos que se toman en cuenta y cuales son las posibles calificaciones:

Registro genético, si se tiene.

Control Sanitario y Preventivo. Los toros que van a ser los sementales deberán estar sanos y libres de enfermedades infecto-contagiosas y aislados de otros bovinos. Las pruebas diagnósticas deben ser completadas para cada toro, en especial las de las siguientes enfermedades:

Tuberculosis, Brucelosis, Leptospirosis, Campilobacteriosis, Tricomoniasis, Diarrea Viral Bovina (Servicios de Certificación de Semen CSS, 2002).

Evaluación de la aptitud reproductiva del toro

Metodología:

Orden de la revisión de un futuro semental:

Examen físico general.

a).- En Dinámica. Observación de la condición corporal, calificación de la misma, forma de apoyo al desplazarse durante la caminata y durante la carrera, inducirlo a correr, observación de cojeras, fracturas, etc.

b).- En Estática. El animal debe ser inmovilizado en una manga o prensa para realizar el examen que comprende: la exploración física general tomando en cuenta las constantes fisiológicas, poner un poco más de atención en la revisión de pezuñas, patas, ojos y prepucio; los **genitales internos** deben palpase por vía rectal localizando la uretra pélvica que sirve como punto de referencia para el examen, para poder detectar cualquier anomalía, se palpan las glándulas accesorias como son **próstata**, la porción palpable de esta glándula accesoria forma una discreta elevación en el extremo anterior de la uretra pélvica dorsal y lateralmente. Esta elevación es de perfil triangular. Enseguida se palpan las **vesículas seminales**, sus características a la palpación son: lobuladas, esponjosas, alargadas y simétricas; el tamaño varía en las diferentes razas y en un mismo animal (Zemjanis, 1980; Aiello, 2000). El **examen de los genitales externos** se realiza por medio de la inspección y palpación y se revisa principalmente lo siguiente:

Palpación de gónadas. En el caso de los testículos por su importancia prioritaria y su situación, permiten un examen en detalle de sus características, primero debe ser observada y palpada la piel escrotal, debe ser suave, cubierta de pelo más fino, sin cicatrices ni adherencias, una vez cubierta esta fase se procede a realizar a fondo la exploración de los testículos. Estos deben ser simétricos, de consistencia elástica, suaves y firmes,

homogéneos, deslizables dentro de las cubiertas escrotales, sin bultos palpables. Es importante medir la **circunferencia escrotal** que se correlaciona en forma positiva con la capacidad de producción de por vida de semen (a mayor diámetro o circunferencia testicular mayor producción de por vida de semen). En el caso de los toros actualmente se considera que animales jóvenes que presenten un diámetro mayor a 30 cm. de circunferencia escrotal se encuentran aptos para la función reproductiva, independiente de la edad. Existen tablas de calificación de la medida de circunferencia escrotal para las diversas razas y edades de los toros (Esperón y López, 1991).

Epidídimo.- Debe de ser cuidadosamente palpado en sus tres porciones (cabeza, cuerpo y cola). Normalmente la consistencia del epidídimo es más firme que la de los testículos y no debe presentar masas irregulares, o crecimiento exagerado, o carencia de algún segmento del mismo (Sorensen, 1982; Pérez y Pérez, 1985).

Pene y prepucio.- La integridad y la normalidad del pene y del prepucio son indispensables para la realización eficaz de la cópula; la revisión de estos órganos es muy importante, sobre todo en las razas que presentan el prepucio de forma pendulante el cual está predispuesto a sufrir laceraciones y otros traumatismos. Otras alteraciones en las que el prepucio puede verse implicado son: la fimosis o imposibilidad de extender el pene hacia fuera del prepucio y la parafimosis o la imposibilidad de retraer el pene hacia el interior del mismo. El examen del pene se puede efectuar mediante el masaje por vía rectal para facilitar la exteriorización del pene al producir la respuesta de erección y protrusión peneana, se puede combinar por medio de la manipulación de la flexura sigmoidea, este manejo debe ser realizado por dos personas, una comienza a masajear las glándulas accesorias por vía rectal y realizando presión hacia delante de la flexura sigmoidea, el toro comienza a prolapsar el pene, la otra persona debe sujetarlo entre los dedos con la ayuda de una toalla de algodón de la porción libre del pene, evitando la mucosa peneana para evitar que se resbale y efectúa una tracción suave hasta exteriorizarlo lo más que se pueda, dado que se examina que el pene no tenga ninguna anomalía o lesión (Elmore y Romo, 1988).

El pene normal debe moverse libremente dentro de la vaina prepucial, no debe haber presencia de adherencias que impidan su movimiento. Algunas alteraciones pueden encontrarse a la inspección del pene como: frenillo persistente, papilomatosis, anillos de pelo, tejido de cicatrización, etc. Al terminarse la revisión anatómica del probable semental,

si este se califica como bueno, se prosigue con la **evaluación de la calidad seminal** donde es necesario obtener una muestra de semen del toro; para esto, existen tres diferentes métodos: vagina artificial, electroeyaculación y masaje transrectal; cada uno de estos métodos tiene sus ventajas y desventajas. En este caso solo se utilizaron los dos primeros, cabe mencionar que el masaje transrectal solo se utiliza cuando los toros no responden a los métodos anteriores, aunque ésta es una opción viable, muy pocos toros eyaculan con este método, cuando así lo hacen, normalmente no hay erección del pene, por lo que la muestra que se obtiene puede ser contaminada fácilmente y la cantidad del semen es generalmente menor que la obtenida con los otros métodos. Los otros métodos así como la evaluación macroscópica y microscópica serán descritos en la parte correspondiente a la secuencia que sigue el proceso de congelación (Sorensen, 1982; Holy, 1983).

CALIFICACION DE LOS SEMENTALES:

La calificación final de un toro se determina, tomando en cuenta todos los aspectos de la evaluación: Registro genético, libre de enfermedades, examen físico general, examen de los órganos genitales externos e internos, medición de la circunferencia escrotal y evaluación de la calidad del semen); las normas actuales de la Sociedad de Teriogenología para la evaluación de sementales considera dos posibles calificaciones de acuerdo al resultado de la evaluación: **Satisfactorio (Apto) o No satisfactorio (No apto)** (Aiello, 2000).

Cualquier anomalía observada durante el examen físico y la revisión de los genitales que se considere pueda disminuir seriamente la habilidad reproductiva o que limite en forma importante o impida el apareamiento, así como los defectos graves heredables, son causas suficientes para calificar al semental como insatisfactorio. Cuando no se detectan problemas físicos ni genitales importantes que pudieran afectar la habilidad reproductiva del toro, su calificación se basa en el resultado de la circunferencia escrotal, la morfología espermática y la motilidad seminal. Los sementales deben rebasar un umbral mínimo en cada uno de estos criterios para ser considerados satisfactorios (**circunferencia escrotal a partir de los 30 cm., la motilidad mínima recomendada es de 30 % y la morfología espermática mínima recomendada es de 70% de espermatozoides normales**) (Jiménez, 1989).

Es importante recalcar que con la evaluación de la capacidad reproductiva no se intenta pronosticar la fertilidad individual de cada semental. Este sistema de evaluación nos permite detectar a los toros que tienen problemas, que puedan afectar su potencial reproductivo para desecharlos, manteniendo en el hato solo aquellos animales que tienen características deseables que nos ayuden a tener una buena fertilidad.

El resultado de esta evaluación refleja el potencial reproductivo del semental solo en la fecha en que es evaluado, de tal forma que la evaluación no refleja la habilidad reproductiva del toro en el pasado, ni garantiza por completo el futuro, pues existen diversos factores externos e internos que pueden alterarla de un momento a otro (Jiménez, 1989).

Una vez que se realiza la evaluación de la capacidad reproductiva de los toros, y el resultado obtenido es satisfactorio, pueden ser empleados como sementales en el proceso de congelación, que se desarrolla más adelante.

Selección del diluyente a utilizar. Existen gran cantidad de diluyentes, desde los químicos, constituidos por soluciones salinas isotónicas, hasta aquellos que contienen sustancias orgánicas como la yema de huevo, leche o agua de coco (Galina y Valencia, 2006).

El diluyente que se utiliza en cada técnica es variable, lo mismo que el proceso de congelación; a continuación se describe un protocolo donde se utiliza como diluyente al Triladyl®, después de considerar varios factores para la preparación del diluyente, costo del material, ambiente de trabajo, temperaturas, se producen la mejor calidad de semen y la mejor fertilidad en campo (Thun *et al.*, 2002); además que el semen diluido con Tris- yema de huevo y glicerol tiene menos porcentaje de espermatozoides dañados en su micro y macroestructura (Guminskaya, 2005).

En el caso de la FESC, se desea obtener un método confiable de congelación de semen bovino de manera manual; por lo cual se seleccionó el empleo del Triladyl® (Tris), yema de huevo, con la finalidad de producir pajillas de semen congeladas de buena calidad.

3.-OBJETIVOS

Objetivo General.

Evaluar un protocolo de congelación de semen bovino mediante procedimiento manual, llevado a cabo en las instalaciones de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, donde se utilizará el diluyente Triladyl®, con la finalidad de obtener porcentajes de motilidad posteriores a la descongelación mayores al 50% de espermatozoides móviles.

Objetivos Particulares.

Describir como se realiza la preparación del diluyente Triladyl®.

Determinar si el uso del diluyente Triladyl® permite obtener porcentajes de motilidad posdescongelado mayores a 50% y si hay diferencias significativas de motilidad posdescongelado entre los toros manejados.

4.-MATERIALES Y METODOS

MATERIAL Y EQUIPO:

Para la preparación del diluyente.

Material de cristalería estéril.

2 probetas graduadas de 100 c.c.

1 matraz de Erlenmeyer de 100 a 150 c.c.

Agitador magnético.

Mosca para el agitador.

Varilla de cristal para agitar.

4 huevos frescos.

1 litro de agua bidestilada, desionizada, estéril.

Triladyl ® (Minitüb, Tiefenbach, Germany) (diluyente).

Papel filtro estéril.

Pipetas Pasteur.

Antibióticos:

Gentamicina*.

Tilosina**.

Lincomycin/espectina ***.

Caja de jeringas insulínicas de 1.c.c.

Baño maría.

Termo de transporte para recibir el semen diluido a nivel de campo.

Microscopio de campo (objetivos de 10, 40; ocular de 10 o de 12 X) para observación inmediata del semen colectado.

Portaobjetos, cubreobjetos.

Microscopio con toma de corriente en el laboratorio (objetivos 10, 40 y 100 X).

Platina caliente, graduable (estabilizada a 37⁰ centígrados)

Cámaras de Thoma.

Cámaras de Neubauer.

Contadores de células.

*Gentomicyn super. Lab Tornel. Frasco ampula de 10 c.c.

** Tylan 200. Lab Eli Lilly. Frasco ampula de 100 ml.

*** Lincocin (lincomicina 600 mg/2ml) uso humano inyectable. Lab Pharmacia.

Agujas número 21 desechables.

Toallas de papel (un paquete de 50).

Refrigerador graduable (2 a 5 grados centígrados) controlar antes de la recolección.

Algodón.

Alcohol puro de caña 96 grados.

Material Biológico: 4 toros para la recolección de semen:

Se manejaron 4 toros, 1 Simmental (Juanito, de 4 años y 812 kg de peso) y 3 Jersey (Beno de 3 años y de un peso de 658 kg, Quique de 3 años y 651 kg de peso, Belcebú de 3 años y 635 kg de peso) que fueron alojados en los corrales del centro de enseñanza agropecuaria (CEA) donde se alimentaron a base de concentrado, alfalfa achicalada, además de tener agua a libre acceso. Los cuatro con pruebas negativas a Brucella y Tuberculosis.

Para la recolección:

4 Vaginas artificiales.

Fundas internas.

2 Cintas para medir circunferencia escrotal.

4 conos colectores (hule o silicón).

4 colectores graduados de cristal o de plástico (capacidad 12 a 14 c.c).

2 colectores de plástico de 100 c.c, con tapón de hule para baño maría.

2 protectores externos de plástico para evitar la entrada de luz al semen colectado.

Ligas gruesas y delgadas para el armado de las vaginas.

Cafetera para calentar agua.

2 Termómetros de columna y 2 de carátula (escala 0 a 100 grados).

1 Electroeyaculador (tomas de corriente y cables).

1 cubeta para lavado prepucial, jabón, tijeras.

Sistema de contención con puertas de acero

Reatas suficientes para el control de los toros.

Acceso a agua corriente.

Para la congelación y almacenamiento:

Congelador horizontal/ cámara fría graduable (3 a 5 grados centígrados).

2 racks para pajillas de 0.25 c.c.

1 block para pajillas de 0.25

1 paquete de pajillas de 0.25 c.c (paquetes de 2000 pajillas).
250 gramos de alcohol polivinílico azul.
2 vasos de precipitado de 500 c.c.
2 pinzas para sujetar pajillas de 0.25
2 cajas de Petri.
1 peine para el llenado de pajillas de 0.25 c.c.
Tubo de goma para adaptarlo al peine.
Recipiente del semen que va a ser empajillado.
Termómetro de carátula
Regla y marcador.
Sujetador de pajillas para poder realizar el llenado homogéneo (parte interna de hule)
Termo para nitrógeno capacidad de 10 kg. lleno.
Termo para nitrógeno almacén de pajillas, lleno.
Nitrógeno líquido.
Caja de poliuretano de las siguientes medidas: largo 88cm, alto 24 cm. y ancho 37cm.
50 bastones.
50 gobelets o contenedores.
1 maskin tape.
2 plumas para identificación de bastones.
Identificador de pajillas (automáticos, semiautomáticos).

METODOS

Orden de los pasos del procesamiento para la congelación del semen:

- 1.-Preparación del diluyente Triladyl®.
- 2.-Preparación de la mezcla de antibióticos.
- 3.-Recolección del semen por medio de uno de dos métodos:
 - Vagina artificial o electroeyaculador.
- 4.-Manejo del semen colectado:
 - Examen macroscópico:
 - Volumen.
 - Densidad/ Concentración aparente.
 - Grado de contaminación o pureza.
 - pH.
 - Toma de muestra de semen crudo para su evaluación inmediata en microscopio de campo para motilidad masal y dilución para conteo espermático en cámara de Thoma.
 - Agregar los antimicrobianos
 - Dilución 1:1 (semen/diluyente)
 - Protección en baño maría entre 32 a 35 grados centígrados para evitar shock térmico.
- 5.-Examen de la motilidad espermática al diluyente en la primo dilución en microscopio/platina caliente en el laboratorio
 - Examen microscópico:
 - Motilidad individual progresiva.
 - Morfología espermática/Tinción con rosa de Bengala
 - Concentración espermática (conteo en la cámara de Neubauer)
- 6.-Cálculo del número de dosis con una concentración de 20×10^6 de espermatozoides por pajilla con un volumen de 0.25 c.c.
- 7.-Cálculo del diluyente restante que se debe agregar para pajillas con capacidad de 0.25 c.c.
- 8.-Adaptación al crioprotector, refrigeración entre 3 a 5 ° centígrados durante 4 horas.
- 9.-Muestreo y toma de decisión (la motilidad debe ser mayor al 70%).
- 10.-Empaquetado de las pajillas de 0.25 c.c.

- 11.-Sellado con alcohol polivinílico. Una vez selladas todas las pajillas se toman con un guante y se distribuyen en el block de aluminio al cual previamente se le ha colocado el rack; el cual permitirá la distribución homogénea y rápida de las mismas y se introduce lo más rápido posible en la caja térmica con nitrógeno líquido
- 12.-Congelación en vapor de nitrógeno líquido.
- 13.-Prueba final de decisión para calificar un semen como apto para el proceso de inseminación artificial. Se basa en la motilidad porcentual espermática de la muestra postdescongelado, tomando en cuenta que cada pajilla tiene 20×10^6 de espermatozoides vivos y que, al menos un 50% de ellos sobrevivan y tengan motilidad fuerte y progresiva para que los resultados del procedimiento de congelación de semen sean adecuados.

El procedimiento consiste en descongelar de 3 a 5 pajillas por eyaculado en agua, durante 30 segundos a 35°C centígrados de temperatura, depositar una gota pequeña en un portaobjetos, protegerla con un cubreobjetos y observar su motilidad en una platina caliente a $35-37^{\circ}\text{C}$ con 100 X de aumento, para tener un campo suficientemente amplio, que permita calificar su motilidad.
- 14.- El siguiente paso consiste en almacenar las pajillas obtenidas bien identificadas en termos criogénicos para su posterior utilización en pruebas de campo.
- 15.- Los datos obtenidos de motilidad posdescongelado fueron sometidos a análisis de varianza para determinar si hubo o no diferencias significativas entre los toros utilizados.

1.-PREPARACIÓN DEL DILUYENTE

El triladyl® es un concentrado para la preparación de un diluyente listo para su uso de un paso. Está basado en Tris (hidroximetil aminometano), glicerol, ácido cítrico, fructuosa, antibióticos y agua bidestilada.

El diluyente puede ser preparado a temperatura ambiente.

Pasos para su preparación:

Material y equipo:

Concentrado Triladyl®.

Agua Bidestilada, desionizada, estéril

Yema de huevo fresco.

Probetas y material de cristalería estéril.

Papel filtro estéril.

Compresas estériles.

Antibióticos: Gentamicina, Tilosina, Linco-espectina.

Para preparar 100 ml del medio de un solo paso Triladyl ®:

20 ml (20%) de Triladyl ®.

60 ml (60%) de Agua Bidestilada estéril, desionizada. Mezclar estas dos sustancias perfectamente antes de añadir la yema de huevo.

20 ml (20%) de Yema de huevo (sin membrana vitelina) libre de chalazas.

Depositar estos ingredientes en una probeta graduada de 100 ml.

Mezclar con una varilla de vidrio estéril evitando la formación de espuma, durante 3 a 5 minutos, después vaciar la mezcla en un matraz de Erlenmeyer para revolverla con un mezclador magnético durante 5 a 8 minutos más. Filtrar la mezcla si lo considera necesario con una compresa estéril.

Diluyente listo para utilizarse.

Colocarlo en un baño maría entre **34** a **36°** C para llevarlo a la zona de recolección de semen, perfectamente protegido colocándolo en un recipiente térmico.

2.-PREPARACIÓN DE LA MEZCLA DE ANTIBIÓTICOS

Los antibióticos que deben añadirse al semen y al diluyente para brindar un efectivo control microbiológico de algunos agentes como son: *Mycoplasma*, *Ureoplasma*, *Histophilus somni*, *Campylobacter foetus*, etc,

Comprende mezclar los siguientes antimicrobianos: 500 µg de gentamicina, 100µg tilosina, 300/600 µg de linco-espectina, diluidos en agua bidestilada desionizada. Se prepara rutinariamente 0.40 ml del combinado y se agregan 0.02 ml por cada mililitro de semen recolectado, al que se le agregan los antibióticos directamente.

3.-LA RECOLECCIÓN DEL SEMEN SE REALIZÓ DE 2 FORMAS:

Para animales que no han sido entrenados o que por su agresividad exista peligro para el técnico o el MVZ, el método de elección es el **electroeyaculador**; al utilizar este método el toro debe de ser introducido en una manga de manejo o en una prensa y debe de ser sujetado adecuadamente, de tal forma que no tenga libertad de movimiento; es recomendable que se le coloque un cinturón ancho o una cuerda gruesa en la parte inferior del cuerpo justo detrás de los miembros anteriores, para evitar que se deje caer al sentir los estímulos eléctricos y también un control de los movimientos, posteriormente por vía rectal y con un guante desechable se extrae la mayor cantidad de materia fecal para que no interfiera con la electroeyaculación; se procede a la revisión de órganos genitales internos y dar un masaje a las glándulas accesorias como un preestímulo.

El electroeyaculador consiste en una sonda o electrodo rectal que está equipada con una serie de bandas de metal conectados a una fuente de corriente y voltaje variable. Inicialmente se procedió la obtención de semen con un electroeyaculador que después de insertarse en el recto con los electrodos dirigidos ventralmente; se conecta al cerebro del electroeyaculador que permite administrar impulsos por ciclos de intensidad progresiva; (de 0 a 15 Volts, 100-150 mA) la reacción varía considerablemente, pero es común aplicar impulsos de 2 a 4 segundos de duración repetidos a intervalos de 1 a 2 segundos. Después de un número variable de estos impulsos puede producirse la erección y protrusión del pene, seguidas de la salida del semen o el toro puede eyacular sin exteriorizar el pene. En algunos toros la eyaculación ocurre solo después de aplicar una serie de impulsos, pero algunos necesitan un voltaje/amperaje más alto y sostenido para lograr estimularlos.

Después se utilizó un electroeyaculador automático de características similares que después de instalarlo solo se enciende y comienza con las descargas eléctricas, la respuesta es diferente entre cada toro, y con un número variable de estímulos se produce la eyaculación. El semen se deposita en un cono colector los mejores son los de silicón aunque pueden ser utilizados de plástico desechable, en su parte terminal se encuentra el colector estéril, graduado de vidrio o de plástico para conocer el volumen del eyaculado, de preferencia este colector deberá estar protegido dentro de otro tubo de plástico que sirva de baño maría (36-37° C) para que al momento de recibir el semen se eviten cambios bruscos de temperatura, además todo esto deberá ser cubierto con una funda para evitar que los rayos del sol incidan directamente en la muestra.

El semen recogido por estímulo eléctrico es de calidad semejante al recolectado con vagina artificial pero tiene una diferencia: “es mayor el volumen y menor la concentración seminal debido a que aumenta la cantidad de secreción de las glándulas accesorias, así como el pH aumenta debido al mayor volumen de fluido de las glándulas accesorias” (Galina y Valencia, 2006).

El uso de **la vagina artificial** requiere que el toro sea entrenado previamente para que aprenda a eyacular en ella; bajo estas condiciones, este sería el método de elección, pues las características del eyaculado obtenido con la vagina artificial son similares a las de un eyaculado normal; además con este método se pueden evaluar algunos aspectos de la conducta sexual del toro y su capacidad de monta. La forma en que son armadas es la siguiente: Colocar el hule de látex en el un tubo cilíndrico de aproximadamente 45 cm. de largo, se le asegura al hule con tres ligas en cada extremo y se le coloca un cono y un colector graduado para poder medir el volumen del eyaculado, asegurando estos accesorios también con ligas; después de terminar el armado se le coloca agua caliente y la vagina debe tener una temperatura final entre los 39 y 42° C; además de tener una presión adecuada tomando como referencia que pase un dedo en el espacio interior y, entonces se asegura la válvula de seguridad que nos ayuda a mantener la presión y evitar pérdidas de agua y de aire.

Antes de colectar el semen se tienen en cuenta dos aspectos muy importantes: la higiene y el estímulo del semental.

Antes de la monta deberá bañarse el semental o por lo menos lavar con agua y secar perfectamente el vientre y la zona del prepucio; el mechón de pelos del orificio prepucial estará limpio y los pelos se cortarán a una longitud aproximadamente de 2 cm.

El método más efectivo para estimular al toro es la monta falsa, que consiste en permitir al semental montar a la vaca en calor, sin dejar que copule, con el objetivo de que el animal elimine contaminantes de la uretra, la monta falsa permitirá que las secreciones de las glándulas accesorias realicen esta función y se podrá obtener un mayor volumen de semen al tener este estímulo.

Posterior a la monta falsa se colecta el semen de dos a tres eyaculados, dependiendo de la cantidad, calidad y número de dosis que se deseen elaborar. Se recomienda que cada eyaculado sea colectado en vaginas diferentes para evitar contaminación, si los eyaculados son homogéneos se podrán mezclar.

La persona encargada de la recolección se coloca a la derecha del toro y mantiene la vagina con la mano derecha; en el momento de la monta coloca la vagina por detrás del miembro anterior, con la abertura dirigida hacia el pene, mientras que con la mano izquierda aplicada sobre el prepucio, dirige el pene hacia la abertura de la vagina; hay que evitar tocar directamente el pene, porque la erección puede inhibirse. Tan pronto como el pene hace contacto con la vagina se desencadena el reflejo eyaculatorio.

La vagina artificial es solamente un tubo que en el momento de la eyaculación permite el paso del pene; el semen se deposita en el cono de látex y en el tubo graduado,

Es muy importante mencionar que la temperatura y la presión adecuadas son el estímulo más importante para la eyaculación, sin olvidar un manejo gentil que permita al toro un recuerdo agradable.

Algunas ventajas y desventajas que se observaron al emplear la vagina y el electroeyaculador son: el electroeyaculador es útil en animales que no responden cuando no han tenido un manejo adecuado para realizar la recolección con vagina artificial o en casos donde no haya vacas en calor, dado que algunos de los toros si no captan feromonas, ni siquiera hacen el intento por montar; al utilizar la vagina artificial se puede evaluar el libido de el toro y el semen obtenido es de mejor calidad.

Como desventajas: la persona que tiene el colector debe estar muy atenta para saber cual es el momento adecuado de la recolección, ya que a veces el toro le gana a eyacular y se tira el

semen. Mayor grado de contaminación del semen recolectado, aún realizando previamente el bañado del toro así como el lavado prepucial, sobre todo en caso de que un animal eyacule dentro del prepucio. Otras desventajas son el costo del electroeyaculador y algunos animales son más sensibles por lo que demuestran un grado mayor de incomodidad a los estímulos.

4.-Una vez colectado el semen: se retira con cuidado el colector graduado, y se observa el volumen que típicamente es de 4 a 8 ml, además de observar la densidad o concentración aparente y determinar si la muestra está limpia o no, medir el pH y posteriormente se realiza lo siguiente:

a) Toma de muestra de semen crudo para su evaluación inmediata en microscopio de campo para motilidad masal y dilución para conteo espermático en cámara de Thoma que posteriormente nos servirá para calcular el número de dosis que se pueden obtener de ese eyaculado.

b) Se añade la mezcla de los antibióticos directamente al semen dependiendo del volumen como ya se especificó, y se mezcla cuidadosamente durante 3 a 5 minutos.

c) Añadir diluyente para protección inmediata del semen a cambios de temperatura, pH, además nutrientes (añadir diluyente relación 1:1 a una temperatura similar a la del eyaculado, para evitar shock térmico, homogeneizar suavemente durante 3 minutos).

A partir de este momento la temperatura ira descendiendo lentamente, para conseguir esto deberá introducirse el semen diluido al baño maría (32 a 35 grados centígrados).

Ya en el laboratorio se continuará con la evaluación microscópica: motilidad individual progresiva porcentual, anormalidades primarias y secundarias, por último, una vez aprobado en sus características se obtendrá el número de dosis y desde luego se añadirá el volumen total del diluyente necesario para este procedimiento, a la misma temperatura que tenga el semen/diluyente inicial. Se transfieren a un envase mayor lentamente y se mezclan suavemente.

5.-EXAMEN DEL EYACULADO

a) EVALUACIÓN MACROSCÓPICA:

Volumen, densidad, pH, limpieza (debe eliminarse semen contaminado aunque tenga buenas características si es que se va a someter a congelación).

-Volumen: se mide directamente en el colector graduado al terminar la eyaculación. Se observa la graduación y se anota la cantidad en ml.

-Pureza, o grado de contaminación: se deja sedimentar el eyaculado por unos dos minutos, se observa al fondo para determinar el grado y tipo de contaminantes. Semen contaminado podrá ser evaluado pero no puede ser utilizado en la congelación.

-Densidad/ Concentración aparente: para realizar esta prueba se observa en forma directa el eyaculado en el tubo colector sobre fondo oscuro, para que en contraste en forma cualitativa se determine esta característica, ver la tabla siguiente:

ASPECTO	DENSIDAD	CONCENTRACION APROXIMADA POR mm ³
Cre moso	3	Mayor a un millón
Le choso	2	500,000-1,000,000
Opalescente	1	200,000-500,000
Acuoso	0	Menor de 200,000

Fuente: Zemjanis (1980).

-pH: se realiza la medición con tiras reactivas para pH; aplicando una gota del eyaculado sobre la tira reactiva y deberá hacerse la lectura dentro de los primeros treinta segundos posteriores. La cuantificación del grado de acidez o alcalinidad de una muestra de semen aporta información respecto a la calidad del mismo. El pH es también medida de la actividad metabólica de los espermatozoides. Conforme pasa el tiempo en el semen crudo, se produce mayor cantidad de ácido láctico como resultado de la glucólisis; la acumulación del ácido disminuye el pH, lo que a su vez disminuye la motilidad y posterior muerte de los espermatozoides.

Ya en el laboratorio se continuará con la evaluación microscópica: motilidad masal, motilidad individual progresiva porcentual, anormalidades primarias y secundarias

b) EVALUACIÓN MICROSCÓPICA:

-Motilidad masal: se efectúa con una gota de semen sin diluir, con aumentos de 100x y a una temperatura de 36 a 38° C en un portaobjetos limpio sin poner cubreobjetos y se basa en el modelo de ondas o de movimiento de remolino observado y sus características, ver cuadro siguiente:

ESCALA DESCRIPTIVA	PUNTUACIÓN	ASPECTO DEL MODELO
MUY POBRE	0	No hay ondas, células espermáticas inmóviles
POBRE	3	No hay ondas, células espermáticas móviles
ACEPTABLE	10	Ondas con movimiento apenas perceptible
BUENO	12	Ondas aparentes, movimiento moderado
MUY BUENO	20	Ondas oscuras marcadas, en movimiento rápido

Fuente: Zemjanis (1980); Galina y Saltiel (1986).

-Motilidad individual progresiva: se realiza con semen diluido, con aumentos de 200 a 400x y en capa delgada (poniendo un cubreobjetos y a la misma temperatura que la motilidad masal). Se basa en la velocidad con que se desplaza un espermatozoides detectado en forma individual en forma rectilínea y se obtendrá el porcentaje para posteriormente compararlo con la escala de puntuación que aparece en la siguiente tabla:

CLASIFICACIÓN	MOTILIDAD	CALIFICACIÓN
MUY BUENA	LINEAL RÁPIDA	20
BUENA	LINEAL MODERADAMENTE RÁPIDA	12
REGULAR	LINEAL, LENTO ERRÁTICO	10
POBRE	MUY LENTO, A MENUDO ERRÁTICO	3

Fuente: Zemjanis (1980); Sorensen (1982).

-Morfología Espermática: el semen contiene normalmente cierta proporción de espermatozoides morfológicamente anormales sin embargo, cuando se sobrepasa el límite de esta proporción influye en forma negativa sobre la fertilidad; ya que el espermatozoide puede realizar sus funciones biológicas fundamentales solo cuando está cualitativa y morfológicamente bien constituido.

El objeto de examinar frotis de semen después de teñirlos es poder descubrir anomalías morfológicas de los espermatozoides y cuantificarlas para evitar tomarlos en cuenta dentro de los potencialmente fértiles.

Las anomalías se dividen en dos clases:

Primarias: son de origen testicular, debido a que ocurren trastornos durante la espermatogénesis.

Secundarias: Se presentan luego de haberse completado la espermatogénesis. Pueden ser causadas a nivel de epidídimo, por alteración de glándulas sexuales accesorias o debido a influencias adversas al semen una vez colectado (Zemjanis, 1980; Sorensen, 1982; Holy, 1983).

Se calificará según el criterio que recomienda la Sociedad de Teriogeniología ver la siguiente tabla:

Grado	Anormalidades primarias	Anormalidades secundarias	Calificación
Muy buena	Menor al 10 %	Menor al 20%	40
Buena	Menor al 20%	Menor al 35 %	24
Regular	Menor al 30%	Menor al 50%	10
Mala	Menor al 50%	Menor al 50%	03

Fuente: Galina y Saltiel (1986); Elmore y Romo (1989).

El frotis se realiza en un portaobjetos con una gota de el semen que se trabajó en la pipeta de Thoma con el Rosa de Bengala que es el colorante que nos ayuda a teñir, matar y dispersar a los espermatozoides para realizar un conteo individual, además esta tinción nos ayuda a ahorrar tiempo al no utilizar otros colorantes; se distribuye la gota con ayuda de otro portaobjetos , se deja secar y se observa al microscopio, enfocando un campo, y con ayuda de el contador se van a ir contando todos los espermatozoides que se vean, se va a ir clasificando según sean normales o que tipo de anomalía presenten, se cambia de campo y se hace lo mismo hasta que se cuenten 100, y así se determina el porcentaje de células normales y anormales.

-Concentración espermática: la determinación exacta de la concentración del semen tiene gran importancia económica, ya que de esta forma se puede aprovechar al máximo el semen de los toros, tratando de que al momento de la inseminación artificial cada dosis tenga 20×10^6 de espermas, para pruebas de fertilidad a realizar por diferentes médicos veterinarios en diversas explotaciones, debe recordarse que en compañías particulares trabajan concentraciones entre 10 y 15 millones de espermas por pajilla.

La concentración se mide con la ayuda de una pipeta de Thoma + Rosa de Bengala, esto es que con una pipeta Pasteur, se toma una muestra de semen crudo y se le acerca a la boquilla de la pipeta de Thoma y se absorbe el semen hasta un nivel donde la graduación marca 0.5 y después se absorbe el colorante Rosa de Bengala hasta el nivel 1:01, donde la concentración dentro de la cámara de Thoma es de 1:200 ;se tapan los extremos de la pipeta y se agita 120 veces, se tiran las primeras 3 gotas y se coloca la siguiente en una cámara de Neubauer cubierta con un cubreobjetos especial, teniendo cuidado de realizar un buen llenado de la cámara, que está graduada y tiene una serie de cuadrículas que nos permiten contar los espermatozoides, el número obtenido en este conteo que se puede realizar de

diversas formas es indispensable para calcular el número de dosis a obtener, por último, una vez aprobado en sus características macroscópicas y microscópicas el semen, se obtendrá el número de dosis y desde luego se añadirá el volumen total del diluyente necesario para este procedimiento, a la misma temperatura que tenga el semen/diluyente inicial. Se transfieren a un contenedor mayor (baño maría) lentamente y se mezclan suavemente, para iniciar el proceso de adaptación al glicerol durante 4 horas con el diluyente recomendado (Triladyl®) a una temperatura de 4 o 5° en un refrigerador previamente graduado.

6.-Fórmula para obtener el número de dosis de un eyaculado

La fórmula es la siguiente:

$$\# \text{ DE DOSIS} = \frac{\text{Concentración} \times 10^7 \times \text{Volumen en ml} \times \text{Motilidad en \%}}{\# \text{ Espermas por dosis}}$$

7.-El número de dosis resultante se multiplica por el volumen de capacidad de las pajillas generalmente 0.25 o 0.5 ml y se obtiene la **cantidad de diluyente** que se debe agregar, restándole el volumen del semen y del diluyente agregado al realizar la dilución 1:1.

8-9.-El semen, diluyente y los envases de vidrio deberán tener una temperatura idéntica para evitar el “shock de temperatura”, el baño maría conteniendo el semen diluido deberá equilibrarse a una temperatura entre 4 a 6 grados centígrados durante 4 horas en refrigerador graduado y controlado. Una vez transcurrido el tiempo, en este momento se observa una gota del semen diluido y entibiado a 37 grados centígrados para observar la motilidad de las células espermáticas, si es buena (>70%), puede iniciarse el procedimiento de empaquetado (empajillado) y someterse a congelación en vapor de nitrógeno líquido durante 15 a 20 minutos a una distancia aproximada de 2cm de la superficie del nitrógeno líquido.

10-11-12.-SECUENCIA DEL EMPAJILLADO MANUAL Y CONGELACION

Para realizar el empaquetado, actualmente se utiliza en la mayoría de los laboratorios de procesamiento de semen el empaquetado en pajillas de polivinil con capacidades de 0.5 o se prefiere las de 0.25 c.c. que son las que se van a utilizar.

A continuación se describe la secuencia:



I

II

III



IV

V

VI

I, II.- Después de haber colocado todo el material en el congelador horizontal graduable a una temperatura entre 3 y 5° C, durante unos 10 minutos aproximadamente, se puede comenzar con el empajillado que consiste en colocar las pajillas en el peine de succión conectado a la manguera, y sujetado por el clip. De esta manera se evitan los cambios de temperatura al tener el material a la misma temperatura del semen/diluyente.

III.- Se introduce la punta de las pajillas en el recipiente que contiene el semen para su absorción.

IV, V.- Se comienza a succionar hasta el nivel marcado en la pajilla con lo que se busca dejar un espacio de aire y evitar a la hora de sellarlas y congelarlas estallen, se procura realizar el llenado lo más uniforme posible, sin presencia de burbujas, se retiran las pajillas del recipiente y se secan del extremo donde se sumergieron, y se acomodan en un vaso de precipitado.

VI.- Una vez llenas todas las pajillas, se comienza a realizar el sellado del extremo abierto, utilizando como sellador el alcohol polivinílico, se introduce la punta de la pajilla en una cajita de Petri que contiene el sellador en polvo, dándole de 2 a 3 toques y posteriormente se sumerge en agua, para que el tapón gelifique y selle perfectamente; finalmente se seca cuidadosamente este extremo y se coloca en otro vaso de precipitado.

VII.- Una vez selladas todas las pajillas se toman con un guante y se distribuyen en el block de aluminio al cual previamente se le ha colocado el rack, el block posee un ranurado según el calibre de las pajillas (0.25cc), el cual permitirá la distribución homogénea y rápida de las mismas sobre el rack; al retirar este último, las pajillas quedan distribuidas en forma homogénea sobre el y posteriormente el rack se introduce lo más rápido posible en la caja térmica con nitrógeno líquido con una separación entre la superficie del nitrógeno y las pajillas de una distancia de 2 cm. Se contempla un periodo entre 15 a 20 minutos para que ocurra la congelación, la cual se realiza en una atmósfera de vapor de nitrógeno.

13.-Una vez transcurrido este tiempo se procede a realizar la:

PRUEBA FINAL de la calidad del semen congelado. Se basa en la motilidad de las células espermáticas/viabilidad porcentual de la muestra postdescongelado.

El método más simple de evaluación del semen congelado es la determinación subjetiva de la motilidad espermática después del descongelamiento.

Procedimiento:

Descongelar las pajillas que sean necesarias mínimo 3 pajillas cada vez que se lleve a cabo el trabajo (30 segundos a 35 grados centígrados en baño maría) y se observa la motilidad de la muestra descongelada, considerando que durante el proceso de congelación y descongelación pueden morir hasta 1/3 de la población. Los espermias descongelados deberán tener una motilidad fuerte y progresiva, así como el % de vivos se encuentre por arriba del 50 % para su utilización en inseminación artificial, tomando en cuenta que cada pajilla tiene 20 millones de espermatozoides vivos, y que al menos la mitad sigan vivos.

Después de observar las muestras descongeladas y basándose en el criterio anterior se tomará la decisión de almacenarlo en el termo o no. Se realiza una calificación subjetiva tomando como referencia lo siguiente:

Menos de 40% de vivos la muestra es mala y no se almacena.

De 40 a 49 % de vivos la muestra es regular y es posible almacenarla, con reserva.

De 50 % en adelante se considera una muestra buena y se almacena.

14.-Después de realizar esta prueba y si se decide **almacenar las pajillas**, la secuencia es la siguiente: Todas las maniobras se deberán llevar a cabo en una atmósfera de vapor de nitrógeno y dentro de la caja de poliuretano.

Se comienzan a acomodar las pajillas dentro de los gobelets, si se usan pajillas de 0.25 cc caben 14 pajillas por gobelets, pero se recomienda solo acomodar 10 para evitar que entren muy forzadas, este empaqueo se realiza con ayuda de la pinza para no tomar directamente las pajillas y cambiarles la temperatura; una vez acomodadas o empacadas todas las pajillas dentro de los gobelets, se colocan estos en unas varillas/bastones, previamente identificadas con el nombre del semental y la fecha, la capacidad de cada una de las varillas/bastones es de 2 gobelets; recordemos que todo esto se realiza en la caja con nitrógeno líquido y sin separar mucho estos materiales del vapor de nitrógeno para evitar cambios bruscos de temperatura que aumentan la mortalidad espermática; una vez terminado este procedimiento, se acerca la caja con el semen empaquetado al termo almacén, este se abre y se identifica la canastilla correspondiente para el semental y se deposita lo más rápido posible y con esto se termina todo el procesamiento del semen.

15.-ANÁLISIS DE LOS DATOS OBTENIDOS

Los datos en porcentaje (%) de motilidad posdescongelado del semen, fueron transformados a valores árcoseno para su análisis estadístico bajo un arreglo totalmente aleatorizado desbalanceado (Steel y Torrie, 1985). El análisis se hizo con el programa Excel utilizando en herramientas el análisis de datos específicamente: Análisis de varianza de un factor.

5.-RESULTADOS

En el cuadro 1 y 2 se enlistan los resultados que se obtuvieron al realizar la evaluación macro y microscópica de los eyaculados de cada toro, que nos permiten conocer que cumplen con los requisitos para poder congelar su semen.

Cuadro 1. Resultados promedio de la evaluación de la densidad, pH, anormalidades primarias y secundarias de cada toro.

NOMBRE	DENSIDAD	PH	ANORMALIDADES PRIMARIAS %	ANORMALIDADES SECUNDARIAS %
1.JUANITO	Lechoso/ cremoso	7.1	1	7
2.BENO	Lechoso/ cremoso	6.8	2	9
3.BELCEBU	Lechoso/ cremoso	6.9	1	7
4.QUIQUE	Opalescente/lechoso/ cremoso	6.8	1	8

Cuadro 2. Número de eyaculados, el promedio de el volumen, motilidad y concentración \pm la desviación estándar de los datos; así como el número de dosis por eyaculado promedio.

TORO	# DE EYACULADOS	VOLUMEN EN ML. $\bar{X} \pm DS$	MOTILIDAD EN % $\bar{X} \pm DS$	CONCENTRACIÓN X 10⁶ $\bar{X} \pm DS$	# DOSIS POR EYACULADO $\bar{X} \pm DS$
1.JUANITO	20	6.8 \pm 1.5	94 \pm 1.8	610 \pm 210	193 \pm 66
2. BENO	10	7.8 \pm 3.1	91 \pm 5.2	830 \pm 330	290 \pm 156
3.BELCEBU	10	5.2 \pm 1.5	94 \pm 1.5	1060 \pm 400	253 \pm 89
4.QUIQUE	7	8.4 \pm 1.6	91 \pm 4.7	670 \pm 400	260 \pm 177

$\bar{X} \pm DS$ = promedio \pm desviación estándar

A continuación se muestra en el cuadro 3, los resultados que se obtuvieron al realizar el trabajo, donde se enlistan los valores de viabilidad espermática posdescongelado y la desviación estándar de estos datos.

Cuadro 3. Resumen de los datos obtenidos muestran el promedio porcentual de motilidad posdescongelado y la desviación estándar de los datos de cada toro.

TOROS	PROMEDIO DE MOTILIDAD (%)	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
1.- JUANITO	52.5 ^a	5.95
2.- BENO	53.5 ^a	7.09
3.- BELCEBU	52.5 ^a	7.16
4.- QUIQUE	50.0 ^a	7.07
TOTAL	52.34	6.81

Nota: No hay diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los promedios (^a).

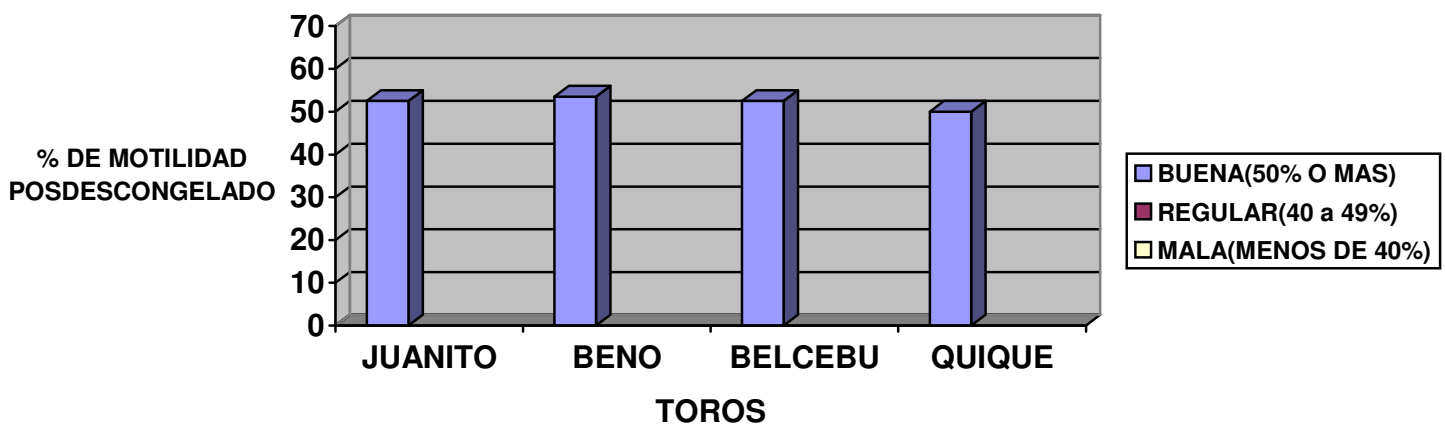
Después de convertir los valores reales a valores árcoseno se realiza el análisis estadístico de ANDEVA (cuadro 4) que nos permite valorar si existe diferencia significativa entre los toros, en este caso no se encontró diferencia alguna entre ellos ($p > 0.05$). Lo que quiere decir que el protocolo de congelación es bueno siempre y cuando se maneje y controle adecuadamente cada punto del proceso.

Cuadro 4. Tabla de ANDEVA (Análisis de Varianza).

ANALISIS DE VARIANZA:					
FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADOS MEDIOS	F	PROBABILIDAD
Entre toros	52.5531915	3	17.5177305	0.39855154	0.75471156
Dentro de los toros	1890	43	43.9534884		
Total	1942.55319	46			

A continuación se muestra una gráfica que nos permite visualizar los resultados obtenidos, tomando en cuenta la estandarización con la que se manejaron los datos en cuanto a la motilidad espermática posdescongelado:

GRÁFICA 1.PROMEDIOS PORCENTUALES DE MOTILIDAD DEL SEMEN DESCONGELADO:



6.-DISCUSIÓN

Los resultados de motilidad espermática posdescongelado coinciden con el porcentaje informado por Salisbury *et al.*, (1978) de que en el proceso de congelado y posdescongelado mueren aproximadamente un 50% de espermatozoides, ya que en el estudio se obtuvo un promedio de 52.3% de espermatozoides móviles y, al realizar la prueba estadística de análisis de varianza encontramos que no hay diferencia significativa entre los promedios obtenidos de los 4 toros.

Los resultados se pueden comparar con otros estudios realizados por Ahmad *et al.*, (1986) que al utilizar el diluyente que contiene hidroximetil aminometano obtuvo un porcentaje de motilidad posdescongelado que va de el 32 al 55% de células vivas trabajando búfalos, al compararlo con los resultados que se obtuvieron con los toros en el estudio, se observa que son semejantes.

Resultados mejores que los obtenidos en este estudio son los de Dobranic *et al.*, (2006) han revelado que eyaculados de diferentes toros han mostrado diferente calidad espermática. Al observar la motilidad progresiva antes de la congelación está entre 80 y 85%, obtuvieron una motilidad después de la congelación y descongelación que se encuentra entre 68 y 73%. Los resultados obtenidos por Janett *et al.*, (2005) informan de 78% de motilidad espermática posdescongelado al utilizar el Triladyl®; muy superior al del presente estudio, aunque estos autores emplearon un equipo totalmente mecanizado para el procesamiento.

Al analizar las fallas o errores por los que en repetidas ocasión no se pudo llevar a cabo el protocolo de congelación. La causa más frecuente fue la de fallas en el control de la temperatura en diferentes puntos del proceso; a veces en la refrigeración, durante el enpajillado, o en el almacenado e incluso en la congelación. Para llegar a controlar este factor se fueron implementando diversas técnicas por ejemplo, en cada proceso se utilizaron varios termómetros (2 tipo reloj, 1 de varilla y otro de carátula) para tener en cuenta algún cambio de temperatura y regular ya sea el refrigerador o el congelador horizontal, hasta conseguir temperaturas estables en las diversas fases del proceso de congelación.

Para evitar cambios bruscos de temperatura, se trabajó en una cámara fría con temperatura controlada, donde se obtuvieron buenos resultados, con el inconveniente que no se dispone

en forma regular de esta instalación y la incomodidad del personal debida al frío de 4° C durante el procedimiento. Esos resultados nos llevan a la misma conclusión escrita por Nur *et al.*, (2005) que nos dice que la congelación de los espermatozoides es muy sensible a cambios bruscos de temperatura antes, durante y después de la congelación.

Otro problema inicialmente fue el agua que se utilizaba, que era bidestilada, al utilizarla se obtuvieron resultados muy desfavorables, ya que después de hacer la dilución y hacer diversos muestreos, el semen tenía un gran porcentaje de mortalidad y al descongelar incluso a veces todos los espermatozoides estaban muertos. Después de analizar cual sería la probable causa; fue contemplado desde que el diluyente estuviera contaminado, o una mala calidad de la yema de huevo, etc. se pensó en el agua que se estaba utilizando y al analizarla se observó que tenía un pH muy elevado, se procedió al cambio de agua y al trabajar con Agua bidestilada, desionizada y estéril se eliminó el problema, consiguiendo congelados de calidad adecuada.

El agua bidestilada, desionizada, estéril fue facilitada por el laboratorio de Biología Molecular de la FES- Cuautitlán.

7.-CONCLUSIONES:

Con esto se concluye que existen diferentes factores en el proceso de congelación que se han de tomar al pie de la letra en cada paso del proceso, por parte del personal que realiza la manipulación del semen desde la colección hasta la congelación y almacenaje que tienen influencia directa sobre la motilidad y futura fertilidad del semen que se congele.

En el proceso de congelación de semen de los toros evaluados llevado a cabo en la FESC, la calidad del agua fue el factor de mayor importancia, en segundo lugar las variaciones de temperatura a lo largo del proceso y otros problemas, como fallas en el funcionamiento del electroeyaculador, falta de libido de los toros, etc. que no fueron tan relevantes.

La preparación del diluyente Triladyl® es fácil y de un solo paso, además de que se prepara a temperatura ambiente y que al realizar los muestreos a nivel microscópico, se puede observar claramente a los espermatozoides, lo que representa una gran ventaja sobre otros diluyentes que se utilizan para el procesamiento del semen.

Al evaluar este protocolo de congelación donde se utilizó el diluyente comercial Triladyl® con un procesamiento manual, después de analizar los resultados nos reflejan que es un buen método de congelación y que el porcentaje promedio de motilidad al descongelado es aceptable (52.34% de espermatozoides móviles) tomando en cuenta que cada pajilla tiene 20×10^6 de espermatozoides lo que quiere decir que sobreviven un poco más de la mitad con motilidad fuerte y progresiva; siempre y cuando se maneje y controle adecuadamente cada punto del proceso. Por último, no se hubo diferencias significativas entre los 4 toros manejados. Se concluye que la congelación de semen por medio de este protocolo permite obtener semen de calidad suficiente para su utilización en programas de inseminación artificial.

8.-BIBLIOGRAFÍA

- 1.-Ahmad M, Ahmad KM, Khan A. Cryopreservation of buffalo spermatozoa in Tris (hydroxymethyl-aminomethane). Pakistan Veterinary Journal 1986; 6: 1, 1-3.
- 2.- Aiello ES. El manual Merck de veterinaria 5ª ed. Barcelona, España: Océano grupo editorial, 2000.
- 3.- Bonadonna T. Fisiopatología de la reproducción y fecundación artificial ganadera. 1ª ed. Tomo I y II Barcelona, España: Salvat editores S.A. 1962.
- 4 - Cotter PZ, Goolsby HA, Prien SD. Preliminary evaluation of a unique freezing technology for bovine spermatozoa cryopreservation. Reproduction in Domestic Animals 2005; 40: 2, 98-99.
- 5.-De Alba J. Reproducción animal. México DF: Ediciones científicas, 1986.
- 6.- Derivaux J. Reproducción de los animales domésticos. 2ª ed. Española: Acribia, 1982.
- 7.- Dobranic T, Samardzija M, Prokopec J, Resanovic R, Grizelj J, Vince S. The quality evaluation of diluted bull sperm before and after deep freezing. Veterinarska Stanica 2006; 37: 1, 3-12.
- 8.- Elmore RG y Romo S. Examen de la eficiencia reproductiva del toro. Rev. Ganadero Vol. XIII, núm. 6. Nov.- Dic. 1988. Pp. 34-37.
- 9.- Esperón SAE y López BB. Estimación de los parámetros reproductivos en toretos cebú brahmán, implantados con anabólicos. Memorias del Congreso Nacional de Buiatría efectuado en Zacatecas (Zac.) México. México (DF): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos A.C. 1991.
- 10.- Galina C y Saltiel C. Reproducción de animales domésticos. México, DF: Limusa, 1986.
- 11.-Galina C y Valencia J. Reproducción de animales domésticos. 2ª. ed. México, DF: Limusa, 2006.
- 12.- Guminskaya E. Yu. Medium for diluting of sperms of bulls. Agrarian Sciences Series National 2005; 2, 79-83
- 13.-Hafez ESE. Reproducción e inseminación artificial en animales. 2ª. ed. México DF: Mc Graw Hill, 1996.
- 14.- Holy L. Bases biológicas de la reproducción bovina. 1ra ed. México, D.F.: Diana, 1983.

- 15.- Janett F, Keo S, Bollwein H, Hässig M, Thun R. Comparison of AndroMed, Bioxcell and Triladyl extender for cryopreservation of bull semen. Schweiz Arch.2005; 147:62.
- 16.- Jiménez SH. Capacidad reproductiva de sementales bovinos en trópico seco. Memorias de la Reunión Nacional de Investigación Pecuaria, México, D.F. 1989.p 176.
- 17.-Nur Z, Sagirkaya H, Dogan I, Soylu MK, Ak K, Ileri IK. Effect of low temperature thawing procedure and post-thaw cold shock on frozen bull semen. Medycyna Weterynaryjna 2005; 61: 9, 991-993.
- 18.-Pérez y Pérez F. Reproducción animal, inseminación artificial y transferencia de embriones. 1ª ed. Barcelona, España: Editorial Científico Médica, 1985
- 19.-Pérez y Pérez F. Reproducción e inseminación ganadera. 1ª ed. Barcelona, España: Editorial Científico Médica, 1966.
- 20.- Peter AR y Ball PJ. Reproduction in cattle. 2ª ed. E.U.: Blackwell science, 1995.
- 21.- Ramírez G. y Ríos R. Tecnologías reproductivas de vanguardia aplicadas en la ganadería bovina. INIFAB “Primer foro de análisis de los recursos genéticos de la ganadería bovina” 1997.p. 21-23.
- 22.-Salisbury GW, Van Demark NL, Lodge JR. Fisiología de la reproducción e inseminación artificial de los bóvidos. 2ª ed. España: Acribia, 1978.
- 23.- Servicios de Certificación de Semen CSS, “Requerimientos mínimos para el control de enfermedades en semen producido para inseminación artificial” 2002.
- 24.-Sorensen AM. Reproducción animal principios y prácticas. México DF: Mc Graw Hill, 1982.
- 25.- Steel R y Torrie J. Bioestadística, principios y procedimientos. 2ª ed. México: Mc Graw Hill, 1985.
- 26.-Thun R, Hurtado M, Janett F. Comparison of Biociphos-Plus and TRIS-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. Theriogenology 2002; 57: 3, 1087-1094.
- 27.-Zemjanis R. Reproducción animal, diagnóstico y técnicas terapéuticas. 1ra ed. México, D.F.: Limusa, 1980.