



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS

ESCUELA DE INGENIERÍA ZOOTÉCNICA

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO CRIOPROTECTOR DE DIFERENTES FUENTES
DE ANTIOXIDANTES EN EL SEMEN BOVINO”.**

TRABAJO DE TITULACIÓN

TIPO: TRABAJOS EXPERIMENTALES

Previo a la obtención del título de:

INGENIERO ZOOTECNISTA

AUTOR:

IDELMAR FABIAN BARRAGÁN BARRAGÁN

Riobamba – Ecuador

2017

Este trabajo de titulación fue aprobado por el siguiente tribunal.



Ing.MsC. Julio Cesar Benavides Lara
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL



Ing.MsC. Paula Alexandra Toalombo Vargas
DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN



Dr. Alex Arturo Villafuerte Gavilánez
ASESOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Riobamba 07 de Junio del 2017

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, **IDELMAR FABIAN BARRAGÁN BARRAGÁN** con cédula de identidad 020201994-9 declaro que el presente trabajo de titulación "**EVALUACIÓN DEL EFECTO CRIOPROTECTOR DE DIFERENTES FUENTES DE ANTIOXIDANTES EN EL SEMEN BOVINO**", es de mi autoría y los resultados de los mismos son auténticos. Además, la revisión bibliográfica que se tomó de otros autores está debidamente citada y referenciada.

Como autor, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación.

Riobamba 07 de junio del 2017



Sr. Idelmar Fabian Barragán Barragán.

020201994-9

AGRADECIMIENTOS

Primeramente a Dios, por permitirme llegar a estas instancias, por haberme dado una gran familia, unos padres ejemplares quienes han sido los pilares fundamentales para alcanzar esta meta, la de ser un profesional.

Además, expresar mis más sinceros agradecimientos para aquellas personas que estuvieron ahí en momentos difíciles, quienes de una u otra manera hicieron mi vida estudiantil más amena, más fácil y llevadera como son; amigos, docentes y demás personas, quienes fueron piezas claves para seguir y no decaer, sobre todo para seguir siendo cada día mejor persona y un mejor servidor.

Finalmente a mis buenos amigos y grandes docentes que me ayudaron en todo cuanto fue posible en la Universidad Autónoma de Chihuahua, ya que sin ellos no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

Este logro va dedicado al esfuerzo, constancia, dedicación y al apoyo de las personas que me impulsaron. Como son mi familia, a mis padres los cuales sin importar la ocasión o circunstancia estuvieron ahí siempre conmigo, a mis hermanos quienes con su ejemplo han hecho que vaya creciendo personalmente.

Esto va dedicado a todos quienes quisieron mi progreso y también a quienes no, ya que con esfuerzo y dedicación todo es posible.

CONTENIDO

	Pág.
Resumen	v
Abstract	vi
Lista de cuadros	vii
Lista de gráficos	viii
Lista de anexos	ix
I. <u>INTRODUCCIÓN.</u>	1
II. <u>REVISIÓN DE LITERATURA.</u>	3
A. ESPERMATOGÉNESIS.	3
B. SEMEN.	4
C. DEFINICIÓN DE ESPERMATOZOIDE.	4
1. <u>Estructura del Espermatozoide.</u>	4
a. Cabeza.	4
b. Acrosoma.	5
c. Cuello.	5
d. Cola.	5
D. TRANSPORTE DEL ESPERMATOZOIDE.	6
1. <u>Fases de Transporte.</u>	6
E. PÉRDIDAS DE ESPERMATOZOIDES.	7
F. ESPERMATOZOIDE FÉRTIL.	8
1. <u>Cambios en el Epidídimo.</u>	8
2. <u>Cambios en la vía genital femenina.</u>	9
a. Activación del Esperma.	9
b. Capacitación Espermática.	9
G. EXAMEN FÍSICO GENERAL DEL TORO.	11
1. <u>Examen de órganos sexuales externos.</u>	11
a. Examen del Escroto.	11
b. Examen de Testículos.	11
H. COLECCIÓN DEL SEMEN BOVINO.	12
1. <u>Método del Electroeyaculador.</u>	13
a. Colocación del Electroeyaculador en el recto del toro.	14

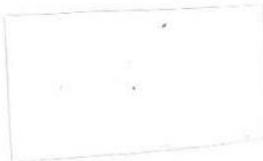
b.	Régimen de colección del semen.	15
c.	Ventajas y Desventajas del Electroeyaculador.	15
I.	ANÁLISIS DEL SEMEN.	16
1.	<u>Características Macroscópicas.</u>	16
a.	Volumen.	17
b.	Densidad.	17
c.	Color.	17
d.	Olor.	19
e.	pH.	18
2.	<u>Características Microscópicas.</u>	18
a.	Motilidad.	18
b.	Motilidad Masal.	19
c.	Motilidad Individual.	20
d.	Concentración Espermática.	20
(1)	Hemocitómetro de Spencer.	21
(2)	Espectrofotómetro.	21
(3)	CASA (Computer Assisted Semen Analysis).	21
(4)	Método Manual (hemocitómetro o cámara de newbauer).	22
e.	Morfología.	23
(1)	Anomalías Primarias.	24
(2)	Anomalías Secundarias.	24
(3)	Anomalías Terciarias.	25
3.	<u>Análisis Seminales Alternativos.</u>	25
a.	Vitalidad Espermática.	25
b.	Tinción Eosina-Nigrosina.	25
(1)	Procedimiento de la Prueba Eosina-Nigrosina.	25
c.	Integridad de Membranas.	26
d.	Prueba de Estrés Hipo-osmótico (HOST).	27
(1)	Procedimiento de la Prueba HOST.	27
e.	Análisis Computarizados de Motilidad Espermática.	28
(1)	Motilidad Progresiva.	28
(2)	Velocidad.	28
J.	ANTIOXIDANTES.	29
1.	<u>Antioxidantes Primarios.</u>	30

2.	<u>Antioxidantes Secundarios.</u>	31
3.	<u>Antioxidantes Terciarios.</u>	31
4.	<u>Cisteína.</u>	31
5.	<u>Cafeína.</u>	31
6.	<u>Vitamina C.</u>	32
K.	RADICALES LIBRES.	33
L.	ESTRÉS OXIDATIVO.	34
M.	ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO.	35
1.	<u>Producción de ROS por los Leucocitos en Semen.</u>	36
2.	<u>Fuentes de ROS en semen.</u>	37
3.	<u>Peroxidación Lipídica (pl).</u>	37
4.	<u>Mecanismo de acción de las ROS.</u>	38
N.	CRIOPRESERVACIÓN DEL SEMEN BOVINO.	38
1.	<u>Principios básicos para la crio conservación del semen bovino.</u>	39
2.	<u>Diluyentes.</u>	39
3.	<u>Funciones de los diluyentes.</u>	39
4.	<u>Componentes de los diluyentes.</u>	40
a.	Agua.	40
b.	Sustancias Iónicas y no Iónicas.	40
c.	Amortiguador del PH.	40
d.	Materiales Orgánicos.	40
e.	Agentes Crioprotectores.	41
f.	Azúcares Simples.	41
g.	Antibióticos.	41
h.	Opcionalmente.	42
5.	<u>Aspectos fisiológicos sobre el congelamiento de semen.</u>	42
6.	<u>Optidyl Diluyente Comercial.</u>	42
III.	<u>MATERIALES Y MÉTODOS.</u>	43
A.	LOCALIZACIÓN Y DURACIÓN DEL EXPERIMENTO.	43
B.	UNIDADES EXPERIMENTALES.	43
C.	MATERIALES, EQUIPOS E INSTALACIONES.	43
1.	<u>Materiales.</u>	43
2.	<u>Equipos.</u>	44
3.	<u>Instalaciones.</u>	44

D.	TRATAMIENTO Y DISEÑO EXPERIMENTAL.	45
E.	MEDICIONES EXPERIMENTALES.	46
F.	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS Y PRUEBAS DE SIGNIFICANCIA.	46
G.	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.	47
H.	METODOLOGÍA DE EVALUACIÓN.	48
1.	<u>Viabilidad %.</u>	48
2.	<u>Motilidad Progresiva %.</u>	48
3.	<u>Integridad de la Membrana %.</u>	48
4.	<u>Integridad Acrosomal %.</u>	48
5.	<u>Beneficio Costo.</u>	49
IV.	<u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.</u>	50
A.	Viabilidad.	50
B.	Motilidad Progresiva.	50
C.	Desplazamiento Lateral de la Cabeza Espermática (ALH).	52
D.	Velocidad Curvilínea (VCL).	52
E.	Velocidad Media (VAP).	53
F.	Velocidad Rectilínea (VSL).	53
G.	Integridad de la Membrana.	53
H.	Integridad Acrosomal.	54
I.	Beneficio Costo.	54
V.	<u>CONCLUSIONES.</u>	56
VI.	<u>RECOMENDACIONES.</u>	57
VII.	<u>LITERATURA CITADA.</u>	58
ANEXOS		

RESUMEN

En Chihuahua – México, en la Unión Ganadera Regional y Universidad Autónoma de Chihuahua, se evaluó diferentes concentraciones de antioxidantes Cisteína 2mM, Cafeína 5mM, ácido Ascórbico 4.5 mg/ml en un diluyente comercial más un tratamiento control para analizar calidad del semen: viabilidad %, motilidad progresiva %, integridad de membrana %, integridad acrosomal %. Se utilizó 6 eyaculados de diferentes animales, obtenidos mediante el uso de un electroeyaculador. El experimento se manejó bajo un DBCA, los resultados obtenidos fueron sometidos a una prueba estadística Tukey a una $P \geq 0.05$. Los datos presentados para las variables mencionadas no mostraron diferencias estadísticas significativas; el beneficio/costo fue \$1.63 para el tratamiento control. Bajo las condiciones técnicas y de recursos en las que se ejecutó esta investigación, la utilización de una fuente de antioxidantes extra en el diluyente comercial para la criopreservación de semen bovino, no mejora las características de calidad seminal.



ABSTRACT

Regional Livestock Union and Autonomous University of Chihuahua - Mexico, evaluated different concentrations of antioxidants; cysteine 2mM, Caffeine 5mM, ascorbic acid 4.5 mg / ml in a commercial diluent, plus a control treatment to analyze semen quality: Viability %, Progressive motility %, membrane integrity %, acrosomal integrity %. We used 6 ejaculates of different animals, obtained by the use of an electro ejaculator. The experiment was managed under a DBCA, the results obtained were subjected to a Tukey test at a $P \geq 0.05$. The data presented for the mentioned variables did not show significant statistical differences; the benefit / cost was \$ 1.63 for the control treatment. Under the technical conditions and resource in that this research was carried out, the use of a source of extra antioxidants in the commercial diluent for cryopreservation of bovine semen did not improve seminal quality characteristics.



LISTA DE CUADROS

N°		Pág.
1.	DURACIÓN DE LA CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA.	10
2.	CLASIFICACIÓN DE DENSIDAD Y COLOR DE SEMEN.	17
3.	MOTILIDAD MASAL.	19
4.	MOTILIDAD INDIVIDUAL.	20
5.	CONDICIONES METEOROLÓGICAS DEL ESTADO DE CHIHUAHUA.	43
6.	ESQUEMA DEL ANÁLISIS DE VARIANZA.	46
7.	EVALUACIÓN DEL EFECTO CRIOPROTECTOR DE DIFERENTES FUENTES DE ANTIOXIDANTES EN EL SEMEN BOVINO.	51
8.	ANÁLISIS BENEFICIO-COSTO DEL EFECTO CRIOPROTECTOR DE DIFERENTES FUENTES DE ANTIOXIDANTES EN EL SEMEN BOVINO.	55

LISTA DE GRÁFICOS

N°		Pág.
1.	Proceso de la Espermatogénesis.	3
2.	Estructura del Espermatozoide.	4
3.	Palpación Escrotal y Medición de Circunferencia Testicular.	12
4.	Sistema CASA.	22
5.	Cámara de Newbauer.	23
6.	Anormalidades de los Espermatozoides.	24
7.	Tinción Eosina-Nigrosina (vivos y muertos).	26
8.	Prueba Hipo-osmótica.	27

LISTA DE ANEXOS

N°

1. Preparación de soluciones antioxidantes.
2. Extracción de semen.
3. Preparación del semen más antioxidante.
4. Reducción de temperatura seminal.
5. Rotulación de pajillas.
6. Empajillado.
7. Almacenamiento de pajillas en nitrógeno líquido.
8. Análisis seminal en sistema (CASA).
9. Análisis de Varianza (ADEVA) Viabilidad (%).
10. Separación de medias según Tukey ($P < 0.05$) Viabilidad (%)
11. Análisis de Varianza (ADEVA) Integridad de Membrana Plasmática (%).
12. Separación de medias según Tukey ($P < 0.05$) Integridad de Membrana Plasmática (%).
13. Análisis de Varianza (ADEVA) Velocidad Rectilínea (um/s).
14. Separación de medias según Tukey ($P < 0.05$) Velocidad Rectilínea (um/s).
15. Análisis de Varianza (ADEVA) Velocidad Curvilínea (um/s).
16. Separación de medias según Tukey ($P < 0.05$) Velocidad Curvilínea (um/seg).
17. Análisis de Varianza (ADEVA) Velocidad Media (um/s).
18. Separación de medias según Tukey ($P < 0.05$) Velocidad Media (um/s).
19. Análisis de Varianza (ADEVA) Amplitud De Desplazamiento Lateral De Cabeza (um).
20. Separación de medias según Tukey ($P < 0.05$) Amplitud De Desplazamiento Lateral De Cabeza (um).

21. Análisis de Varianza (ADEVA) Motilidad Progresiva (%).
22. Separación de medias según Tukey ($P < 0.05$) Motilidad Progresiva (%).
23. Análisis de Varianza (ADEVA) Reacción Acrosomal (%).
24. Separación de medias según Tukey ($P < 0.05$) Reacción Acrosomal (%).
25. Análisis seminal previo a selección.
26. Datos reportados por sistema CASA, análisis de motilidad.

I. INTRODUCCIÓN.

La inseminación artificial es una de las mejores técnicas para el mejoramiento genético de los hatos bovinos. En el Ecuador es una habilidad altamente difundida en la crianza de los animales y ganaderos los cuales manejan sus ganaderías de manera eficiente y tecnificada. Esta práctica consiste en la introducción del semen en el aparato genital de la hembra sin intervención del toro y asistida por el hombre. La inseminación artificial como método biotecnológico ofrece posibilidades de mejorar las características productivas de nuestros animales. Así, permite al pequeño productor tener crías de toros élite de la raza deseada y a bajo costo. Por otra parte, evita la transmisión de enfermedades que se adquieren por la vía sexual y se elimina el riesgo del manejo de sementales en los ranchos o establos al igual que los costos de su mantenimiento. La fertilidad obtenida en hembras inseminadas artificialmente es similar a la que se logra cuando se emplea monta directa (Hernández, J. & Ortega, A. 2009).

Dentro de los campos de la reproducción animal existen detalles que se dejan de lado, sin tomar en cuenta que estas pueden ser las responsables del éxito o fracaso de los trabajos y protocolos reproductivos como son el estudio de factores que permitan incrementar los parámetros de calidad del semen, es ahí donde nace la necesidad de investigar y buscar nuevas alternativas de producción y procesamiento seminal, los cuales aseguren que este llegue en las mejores condiciones posibles a los productores y más aún al tracto reproductivo de la hembra bovina donde puedan expresar todo su potencial.

Durante todos los procesos fisiológicos normales y de almacenamiento existen una serie de componentes oxidativos, los cuales son capaces de causar efectos nocivos a los productos o componentes finales (Zhao, X. 2014). Los espermatozoides están compuestos de una gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados, mismos complejos grasos que son muy susceptibles a un daño peroxidativo (Asadpour, R. Jafari, R. & Nasrabadi, H. 2011). Lo cual hace que sea sumamente importante buscar fuentes alternativas que ayuden a mantener la

integridad de los espermatozoides y así obtener pajillas con mejores características en la funcionalidad de los espermatozoides.

Actualmente la criopreservación es uno de los métodos más eficientes que se tiene para almacenar el material genético de la mayoría de especies, como también para obtener de esta manera una seguridad sanitaria y minimizar el riesgo de brotes de enfermedades que afectan de maneras. Sin embargo, es necesario comprender todos los aspectos relacionados a esta técnica reproductiva y los efectos que se producen durante la vida en la congelación.

La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) puede causar daño a las membranas de los espermatozoides, dando como resultado una formación de compuestos citotóxicos tales como el molondialdehído, peróxidos, hidróxidos entre otros. Así estos pueden ocasionar disfuncionalidad de los espermatozoides, disminución de la fecundación, afecta la motilidad, roturas en el ADN etc, (Alvarez, J. et al, 1987). Estos compuestos oxidantes se forman en gran parte debido a la muerte de espermatozoides.

Superóxido dismutasa, glutamina reductasa, catalasa y glutamina peroxidasa son enzimas antioxidantes naturales que pueden eliminar estas especies reactivas de oxígeno (Zhao, X. 2014). Pero muchas veces estos antioxidantes no son lo suficientemente fuertes como para impedir el estrés oxidativo y daños mayores a la esperma (Hong, Hu. et al, 2010). Por lo cual en la presente investigación se evaluó el efecto que tiene la adición de antioxidantes en crioconservación de semen bovino y así determinar si este mejora o no las características de calidad seminal.

II. REVISIÓN DE LITERATURA.

A. ESPERMATOGÉNESIS.

Es el proceso biológico de la transformación gradual de las células germinales en espermatozoides en los túbulos seminíferos de los testículos, gráfico 1. Este proceso involucra la proliferación celular por divisiones mitóticas, duplicación de cromosomas, recombinación genética, reducción y división meiótica, hasta producir espermátides haploides y la diferenciación terminal de las espermátides en espermatozoides (Knobil, E. 2003).

La espermatogénesis incluye dos fases, la espermatocitogénesis, en la cual las espermatogonias sufren división celular hasta transformarse en espermátides y la espermiogénesis, en la que las espermátides sufren cambios morfológicos progresivos y se transforman en espermatozoides (Hafez, B. 2000).

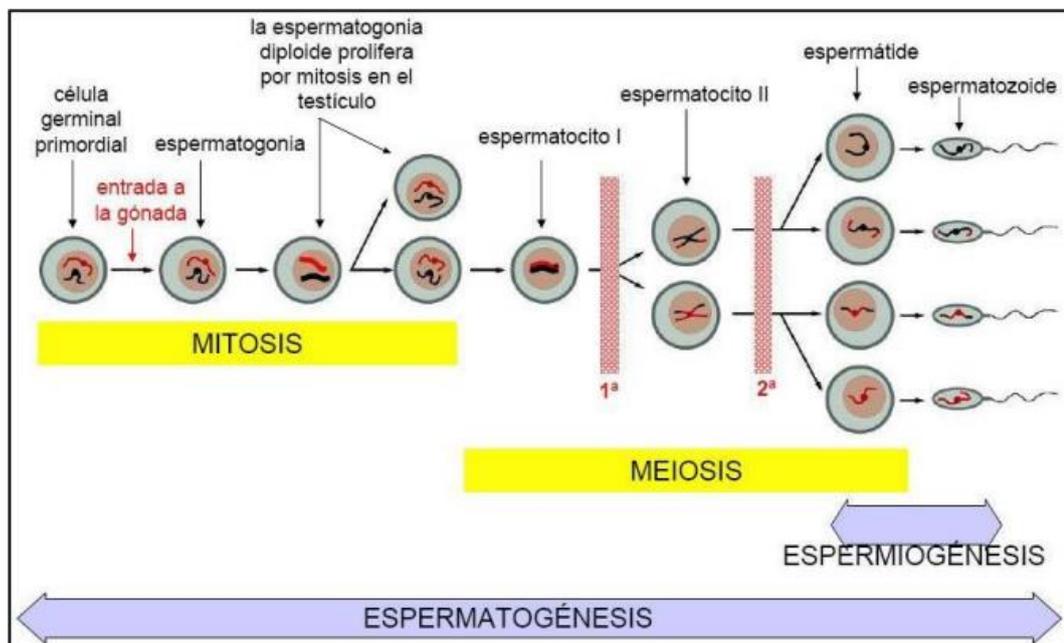


Gráfico 1. Proceso de la Espermatogénesis.

Fuente: (Navarro, C. s.f)

B. SEMEN.

Suspensión celular líquida que contienen los gametos masculinos (espermatozoides) y las secreciones de los órganos accesorios sexuales del aparato reproductor masculino, y se mezclan en el momento de la eyaculación (Knobil, E. 2003), citado por (Angelino, J. 2009).

C. DEFINICIÓN DE ESPERMATOZOIDE.

Gameto masculino que se forman en los túbulos seminíferos de los testículos. Gráfico 2. Son células alargadas consistentes de cabeza aplanada portadora de núcleo y una cola que es el aparato necesario para moverse (Knobil, E. 2003), Citado por (Angelino, J. 2009).

1. Estructura del Espermatozoide.

a. Cabeza.

Aplanada portadora del núcleo y una cola que contiene el aparato necesario para la movilidad celular.

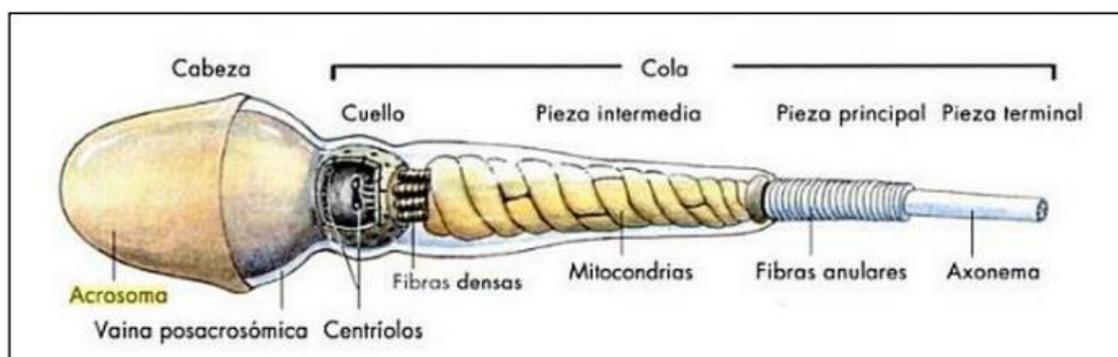


Gráfico 2. Estructura del Espermatozoide.

Fuente: (Gimeno, M. 2014)

La célula espermática está cubierta en su totalidad por la membrana plasmática. El extremo anterior del núcleo espermático está cubierto por el acrosoma (Garner, D. y Hafez, E. 1996), citado por (Muñoz, O. 2002).

b. Acrosoma.

Es un delgado saco membranoso de doble capa estrechamente adherido al núcleo durante las últimas etapas de la formación del espermatozoide. Esta estructura en forma de casquete, contiene varias enzimas hidrolíticas incluyendo proacrosina, hialuronidasa, esterases y ácidohidrolasa, que participan en el proceso de fecundación al romper la membrana del óvulo (Garner, D. y Hafez, E. 1996), citado por (Muñoz, O. 2002).

c. Cuello.

Une la cabeza del espermatozoide con la cola (flagelo), la cual se subdivide en los segmentos medio, principal y caudal (Garner, D. y Hafez, E. 1996), citado por (Muñoz, O. 2002).

d. Cola.

Formada por el cuello y los segmentos medio, principal y caudal. La región de la cola comprendida entre el cuello y el anillo citoplasmático es el segmento medio. El centro de este segmento medio, junto con toda la longitud de la cola, constituye el axonema. Este se compone de nueve pares de microtúbulos dispuestos radialmente alrededor de los filamentos centrales. El axonema y las fibras densas que lo rodean están cubiertos periféricamente por numerosas mitocondrias dispuestas en un patrón helicoidal (vaina mitocondrial), (Garner, D. y Hafez, E. 1996), citado por (Muñoz, O. 2002).

El segmento principal, que continúa en sentido posterior desde el anillo citoplásmico y se extiende casi hasta la punta de la cola, está formado por axonema en el centro y sus fibras gruesas asociadas. La vaina fibrosa da estabilidad a los elementos contráctiles de la cola (Angelino, J. 2009).

El segmento caudal, posterior a la terminación de la vaina fibrosa, contiene solo el axonema central cubierto por la membrana plasmática. El axonema es el que le da motilidad al espermatozoide. Los pares externos de micro túbulos del patrón 9 más 2 generan las ondas de flexión de la cola por un movimiento deslizante entre pares adyacentes (Angelino, J. 2009).

D. TRANSPORTE DEL ESPERMATOZOIDE.

(Rivera, M. 2011), menciona que durante la eyaculación los espermatozoides junto con el plasma seminal pasan por la uretra y a través de movimientos peristálticos se liberan en el tracto genital femenino. La eyaculación es el reflejo de expulsión de los espermatozoides y el plasma seminal fuera del tracto reproductivo. El reflejo eyaculatorio es el resultado de la estimulación sensorial especialmente en el glande, lo que causa contracciones musculares coordinadas. Una vez se introduce el pene en la vagina se inicia el reflejo por impulsos que se transmiten del glande a través del nervio púbico hasta la región lumbosacra de la médula espinal. Así el semen es forzado a pasar a la uretra lo que induce la contracción de los músculos uretrales, isquiocavernosos y bulboespongiosos. El eyaculado contiene además, las secreciones de las glándulas anexas (vesículas seminales, próstata, glándulas bulbouretrales). Luego de depositado el semen, los espermatozoides están expuestos a una serie de circunstancias ambientales que alteran significativamente su número y función.

1. Fases de Transporte.

El transporte de espermatozoides después de la cópula puede dividirse en dos fases, una fase de transporte rápido y una fase de transporte lento o prolongado

durante la fase rápida los mecanismos del tracto genital permiten la llegada de los espermios al oviducto sin la participación activa de estos (Senger, P. 2015).

Lo más importante del transporte es la fase de transporte lento durante la cual los espermatozoides son llevados al oviducto de manera sorpresiva desde los reservorios en el cérvix y la unión útero tubar. Estos sitios de colonización son los mismos lugares de depósito (Senger, P. 2015).

Sin embargo, investigaciones recientes demuestran que los espermatozoides que llegan al oviducto a los pocos minutos después de la cópula no eran viables, por lo que su importancia puede solamente representar una exacerbación de la actividad de transporte por la contractilidad del tracto femenino junto con la cópula. En la IA el 60 % se pierden por este mecanismo dentro de las 12 horas siguientes a su depósito. Por lo anterior se recomienda depositar el semen en lo más anterior posible del cérvix, lo que implica una nueva instrucción del personal responsable de la inseminación (Senger, P. 2015).

Luego del servicio en la vaca los espermatozoides deben sortear el sistema altamente circunvolucionado del cérvix por medio de su capacidad natatoria en el medio mucoso compuesto por sialomucinas y sulfomucinas. Las primeras muy viscosas desempeñan un mecanismo de lavado y las segundas más fluidas facilitan el movimiento y la natación del esperma (Senger, P. 2015).

El tiempo requerido para que el espermatozoide móvil entre y atravesase este medio especial influye significativamente en la fase de transporte lento (Senger, P. 2015).

E. PÉRDIDAS DE ESPERMATOZOIDES.

La pérdida de espermatozoides en el tracto genital femenino depende de la naturaleza física del eyaculado y el sitio de la deposición. Los espermatozoides se pierden en el tracto femenino por transporte retrógrado y muchos son fagocitados

por los leucocitos, que desde el punto de vista inmunológico actúan como cuerpos extraños, no diferenciando entre vivos o muertos. De hecho, un leucocito puede fagocitar varios espermatozoides móviles. Además, son importantes para prevenir infecciones del tracto genital (Rivera, M. 2011).

F. ESPERMATOZOIDE FÉRTIL.

Para que un espermatozoide sea fértil tiene que sufrir una serie de cambios tanto en el aparato reproductor masculino como en el femenino.

1. Cambios en el Epidídimo.

El espermatozoide una vez ha sido expulsado del tubo seminífero, no es apto para fecundar. Comienza a adquirir ésta capacidad en su paso por el epidídimo, en donde sufre una serie de cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos cuyo conjunto recibe el nombre de maduración epididimal y tiene una duración de 10 a 15 días. Los cambios en el epidídimo dependen de las secreciones del epidídimo y del tiempo de transporte (Rivera, M. 2011).

Estos cambios son:

- Adquisición de la motilidad.
- Modificaciones en la distribución y densidad de grupos anicónicos en su superficie.
- Formación de puentes de sulfuro -S-S- tanto en el núcleo como en estructuras de la cola del espermio.

El conjunto de cambios señalados, es quizás lo que le permite al espermatozoide adquirir eventualmente, su capacidad fecundante (Rivera, M. 2011).

2. Cambios en la vía genital femenina.

a. Activación del Esperma.

El espermatozoide adquiere la capacidad de mover el flagelo en su tránsito por el epidídimo, pero el movimiento empieza después de la eyaculación.

La movilidad del espermatozoide se desencadena por cambios en el medio iónico extracelular, por interacción con ligandos específicos y por glucosa, presentes en el líquido seminal y en el tracto reproductivo femenino; estos cambios inducen señales citosólicas flagelares, a través de la fosforilación de proteínas, de canales de Ca^{++} y de vías dependientes de nucleótidos cíclicos (GMPc y AMPc) (Rivera, M. 2011).

El espermatozoide, activado y capturado por las microvellosidades del istmo del oviducto se capacita, y esto desencadena señales intracelulares que inducen la hiperactivación. La activación y la hiperactivación utilizan mecanismos moleculares similares para generar el movimiento del flagelo cuyo eje funcional es el axonema y cuya proteína motora principal es la dineína. El axonema, además, está compuesto por microtúbulos, moléculas chaperonas, proteínas fijadoras de calcio y proteínas quinasas/fosfatasa (Rivera, M. 2011).

b. Capacitación Espermática.

El espermatozoide eyaculado, a diferencia del testicular, es capaz de fecundar, debido a los cambios que ocurren en condiciones normales en la vía genital femenina (Rivera, M. 2011).

Los espermatozoides son retenidos en las criptas oviductales y allí pierden los factores decapacitantes como mucopolisacáridos y proteínas que habían aportado las glándulas anexas; éste es el comienzo del proceso conocido como

capacitación, nombre que indica el potencial que adquiere el espermatozoide para hiperactivarse y para lograr la reacción acrosomal (Senger, P. 2015), como se muestra en el Cuadro 1 .

La capacitación, se caracteriza por la salida de colesterol de la membrana y el ingreso de Ca^{++} y HCO_3^- al citosol, lo cual tiende a aumentar la fluidificación de la membrana, niveles de AMPc y cambios en algunas enzimas como la protein Kinasa (Langlais, J. 1998).

Todos los espermatozoides no son capacitados al mismo tiempo, sino que lo hacen en un período relativamente largo de varias horas dependiendo de su localización en el tracto femenino. No hay duda que la membrana plasmática del espermatozoide, particularmente la cabeza, sufre una serie de cambios bioquímicos durante la capacitación. Durante la mezcla del esperma con el plasma seminal, este último recubre el esperma con varias proteínas, las cuales son retiradas en el tracto genital femenino (Senger, P. 2015).

Un concepto importante en relación con la capacitación es el que este proceso puede ser reversible si se reincorporan los espermatozoides capacitados al plasma seminal. (Senger, P. 2015).

Cuadro 1. DURACIÓN DE LA CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA.

Capacitación de espermatozoides del eyaculado in vivo	Capacitación de espermatozoides del eyaculado in vitro	Capacitación de espermatozoides del eyaculado in vitro
8 – 10 horas	No determinado	4 -6 horas

Fuente: (Vera, O. 2008).

Se postula que existe una selección de los espermatozoides a lo largo del tracto genital de la hembra para que experimenten capacitación; así los que llegan al ampulla como se ha observado, todos están capacitados (Vera, O. 2008).

G. EXAMEN FÍSICO GENERAL DEL TORO.

Consiste en la evaluación de la condición corporal y estado de salud del toro. Reconociendo que cualquier alteración orgánica compromete la función reproductiva. Así, defectos de la visión, dentadura o alteraciones en la estructura ósea o aplomos (patas y pezuñas) limitan significativamente la función reproductiva y acortan la vida útil de los sementales (Molina, E. 2006).

Los problemas de visión o dentadura comprometen el desenvolvimiento del animal en condiciones naturales (potrero), detectando las vacas en celo alimentándose inadecuadamente, las alteraciones músculo-esqueléticas limitan los movimientos y la capacidad de monta del toro (Molina, E. 2006).

1. Examen de órganos sexuales externos.

a. Examen del Escroto.

El escroto y su contenido se observan y palpan exhaustivamente desde atrás con el toro bien sujeto para evitar accidentes, hay que prestar atención a eventuales asimetrías, al desplazamiento de testículos y a la superficie de la piel y pelos del escroto. Se mide la circunferencia escrotal ya que existe una correlación positiva entre la circunferencia escrotal y la producción de espermatozoides (Angelino, J. 2009).

b. Examen de Testículos.

Los testículos varían en cierto modo respecto a tamaño, consistencia, desplazabilidad, aumento de temperatura, sensibilidad a la presión, forma y situación, aunque su estructura fundamental es la misma. Se les examina por inspección y palpación para esto se rodea la base del saco escrotal desde atrás con una mano y luego con la otra se hace presión con los pulgares se desplaza el

testículo hacia abajo hasta que el escroto esté tenso y sin pliegues como se muestra en el Gráfico 3, (Angelino, J. 2009).



Gráfico 3. Palpación Escrotal y Medición de Circunferencia Testicular.

Fuente: (Rivera M, 2013)

La consistencia o tono testicular (TT) se puede palpar con la yema de los dedos y calificarla por una combinación de firmeza y elasticidad en una escala de 1 a 4: (Angelino, J. 2009).

1. Muy firme y muy elástico.
2. Firme y elástico (el promedio).
3. Blando y esponjoso.
4. Muy blando y muy esponjoso.

H. COLECCIÓN DEL SEMEN BOVINO.

El proceso se lo puede realizar mediante dos formas, ya sea con ayuda de un electro-eyaculador o mediante la utilización de una vagina artificial dependiendo mucho del recurso y del adiestramiento que presente el toro.

El proceso de colecta debe ser higiénico y evitando el shock térmico de los espermatozoides. La colecta se realiza con vagina artificial (VA) o por electro

eyaculación (EE). Los toros *Bos taurus* se pueden colectar con vagina artificial con la ayuda de una vaca en celo, mientras que los toros *índicus* deben ser colectados por medio de la EE para proteger a los operarios (Escobar, C. 2011).

1. Método del Electroeyaculador.

En éste método se hace uso de un electro eyaculador que no es más que un electrodo conectado a una batería que genera estimulaciones rítmicas provocadas por descargas no mayores a 20 voltios (Rangel, E. 2007).

Los electroeyaculadores están diseñados para estimular los nervios pélvicos simpáticos y parasimpáticos con impulsos de bajo voltaje y amperaje y de esta forma pueden inducir erección penénea y eyaculación. Un sistema de electro eyaculación está constituido por los siguientes componentes: la caja de transporte, la sonda rectal, la unidad de control, el cargador de batería, el cable de energía, el cable de conexión de la sonda, el mango, el cono y el envase de colección (Angelino, J. 2009).

La técnica de electro eyaculación consiste en dar pulsos eléctricos muy leves en la próstata y vesículas seminales para que el animal presente erección y eyaculación (Arieta, R. 2014).

Con la utilización del electro eyaculador, como método para la recolección de semen, la eyaculación es un proceso bifásico, primero ocurre la emisión y continúa con la erección y la eyaculación propiamente dicha. Cuando se produce la estimulación adecuada, esta viaja vía nervio pudendo interno hacia los centros lumbosacros de la columna vertebral, desde allí parte la respuesta vía nervios simpáticos lumbares (nervio erigente del plexus hipogástrico), lo cual estimula la contracción de la musculatura lisa que recubre la próstata, glándulas vesiculares y conductos deferentes, asegurando la progresión de la masa espermática hacia la uretra pélvica (Morillo, M. Salazar, S. y Castillo, E. 2012).

Por otro parte, la respuesta nerviosa viaja vía nervios parasimpático para provocar la contracción de la musculatura estriada del tracto uretral (músculo isquiocavernoso, bulbo esponjoso y uretral), lo cual resulta en la erección del pene y la eyaculación propiamente dicha. Antes de la utilización del electro eyaculador se procede a la preparación del animal, lo cual incluye: recortar los pelos del orificio prepucial y limpiarlo, si es necesario se debe lavar y secar cuidadosamente el área. Un ayudante procede a limpiar el recto y a estimular mediante masaje transrectal las glándulas accesorias (glándulas vesiculares y ampollas de los conductos deferentes) y, posteriormente, se introduce el electrodo adecuado (Morillo, M. Salazar, S. y Castillo, E. 2012).

a. Colocación del Electroeyaculador en el recto del toro.

Primero se asegura que las tres líneas metálicas o electrodos ubicados ventralmente, estén limpios y libres de corrosión. Posteriormente se retira el exceso de heces del recto, se levanta la cola del toro hasta hacerla horizontal, se lubrica el electrodo y se introduce en el recto, dirigiéndolo ligeramente hacia abajo y haciendo movimientos rotatorios. Una vez insertado completamente el electrodo, se coloca la cola en el medio del mango (en forma de “U”) de este y se sujeta con la misma mano que sujetaba la cola (Arieta, R. 2014).

Cuando se utiliza la electro eyaculación se inician los estímulos a mínima intensidad y rítmicamente se incrementa, de acuerdo con la reacción del animal, cada estímulo debe durar menos de un segundo y se deben aplicar entre cinco y 10 estímulos por cada grado de intensidad. Las reacciones son muy variables entre animales y aún en el mismo animal (Morillo, M. Salazar, S. y Castillo, E. 2012).

Es muy importante destacar que la cantidad de estimulación debe ser estimada a través de las respuestas del animal y no prestando atención al voltaje del equipo. La primera estimulación debe ser pequeña hasta que el macho demuestre una mínima respuesta. Las estimulaciones sucesivas deben ir siendo incrementadas,

con una duración de uno o dos segundos y luego discontinuarse por medio segundo antes de comenzar con la siguiente estimulación. El fluido preseminal no debe recolectarse porque diluye el eyaculado y puede originar falsos resultados. Cuando éste comienza a tornarse más opaco y espeso comienza la colección en el cono o tubo de examinación colocado directamente en el pene (Pezzone, N. 2008).

Para obtener un mejor estímulo y menor tiempo de estimulación mediante el electrodo es necesario realizar un masaje de las glándulas anexas de manera manual con el fin de preparar al toro y consiguiendo con esto que el mismo desenvaine y esté listo para expulsar el semen de una manera más eficiente (Pezzone, N. 2008).

b. Régimen de colección del semen.

El intervalo de recolección de semen es de suma importancia, debido a que una alta frecuencia puede afectar la concentración espermática y la madurez de los espermatozoides. Por el contrario, una baja frecuencia de colección puede afectar la motilidad espermática y su vitalidad (Morillo, M. Salazar, S. y Castillo, E. 2012).

El recolector debe ser capaz de reconocer la fracción pre-espermática y sólo recolectar la segunda fracción rica en espermatozoide. Para la recolección del eyaculado se utiliza un aparato, el cual consiste en un aro de plástico con mango que sostiene un embudo de látex o plástico y un tubo graduado para la recolección del eyaculado, este último se protege con un envase plástico y agua a 37 ° C (Morillo, M. Salazar, S. y Castillo, E. 2012), se evitará que los rayos de luz le den directamente, mientras se traslada al laboratorio (Rangel, E. 2007).

c. Ventajas y Desventajas del Electroeyaculador.

Esta técnica no requiere montar animales, no es físicamente demandante y es fácilmente adaptable a la mayoría de las instalaciones para manejo de ganado.

En años recientes, se desarrolló una variedad de electro eyaculadores automáticos. Estas máquinas son particularmente útiles para los que no están acostumbrados a la técnica manual de aplicar estimulación eléctrica y tiende a ser muy confiable en términos de su capacidad para inducir emisión de semen. Una desventaja de la EEJ, sin embargo; es que es considerada como dolorosa para los toros (Rangel, E. 2007).

I. ANÁLISIS DEL SEMEN.

Muchos investigadores en el área de la reproducción están tratando de diseñar el “análisis seminal ideal”, que valore adecuadamente y prediga la fertilidad de una muestra de semen. Las cualidades que deben tener los espermatozoides de un eyaculado fecundante son: motilidad progresiva, morfología normal, metabolismo energético activo, capacidad para desarrollar una motilidad hiperactivada, integridad estructural y funcionalidad de la membrana, integridad de las enzimas asociadas con la fecundación, capacidad de penetración y transferencia óptima del material genético. Sin embargo, este análisis integral es muy difícil de desarrollar, debido a la enorme complejidad inherente a la función espermática (Hidalgo, C. 2007).

Los estudios de calidad seminal persiguen como objetivo final identificar algún parámetro cinético, morfológico o bioquímico que indique el estado de la célula espermática en un momento dado y que, al mismo tiempo, pueda ser correlacionado con la fertilidad y calidad del eyaculado. Las técnicas de contrastación del semen, tanto por su utilización en investigación y, especialmente, en la rutina de producción, deben ser precisas, sencillas, rápidas y económicas (Hidalgo, C. 2007).

1. Características Macroscópicas.

Dentro de estas tenemos algunas a determinar de manera rápida como son color, volumen, densidad, olor y otras que necesitan de ciertos instrumentos como el Ph.

a. Volumen.

Se mide directamente en el lugar de recolección ya que este se lo hace en un tubo cónico de 15 ml. Normalmente dicho valor, para el eyaculado de toros, es de aproximadamente 2 ml en animales jóvenes y en animales adultos \geq a 4 ml, llegando hasta 12 ml (Agüero, G. 2012).

b. Densidad.

La concentración espermática o densidad es el número de espermatozoides por mm³ o cc. La concentración normal del bovino es de 800-1200 millones espermatozoides por centímetros cúbicos (ml) o sea 0,8-1,2 millones por mm³ (Valenzuela, C. 2009). Sin embargo dependiendo de su concentración se lo clasifica como se ve en el Cuadro 2.

Cuadro 2. CLASIFICACIÓN DE DENSIDAD Y COLOR DE SEMEN.

Muy Bueno	Semen cremoso, granular, con 750 a 1000 millones de espermatozoides por cc.
Bueno	Lechoso con 400 a 750 millones de espermatozoides por cc.
Suficiente	Semejante a leche descremada con 400 a 750 millones de espermatozoides por cc.
Pobre	Translucido con menos de 750 millones de espermatozoides por cc.

Fuente: (Valenzuela, C. 2009).

c. Color.

Esta característica se evalúa por medio de la visualización en el laboratorio. El color del eyaculado depende del contenido de riboflavina, siendo normalmente desde blanquecino marfil hasta amarillento. Una coloración rojiza, indica la mezcla

con sangre fresca; si el color es pardo, indica la presencia de sangre más vieja (hemolizada), denominándose ambos tipos como hemospermia. Una coloración gris indica contaminación. Los eyaculados sin espermatozoides tienen una coloración amarillo-verdosa y son de apariencia acuosa. El pus en el eyaculado se reconoce frecuentemente por la presencia de flóculos, denominándose piospermia (Agüero, G. 2012).

d. Olor.

Las muestras de semen recolectadas higiénicamente, de toros sanos y fértiles, tienen un débil olor sui géneris (Agüero, G. 2012).

e. pH.

Evaluación inmediatamente después de la recogida seminal (pH metro/tiras de pH). Entre 6,4 - 7,8 en bovino. Está inversamente relacionado con la concentración espermática. El metabolismo espermático acidifica el medio y presencia de sustancias contaminantes como la orina y procesos inflamatorios le dan valores más altos (Gonzales. J. Martinez, Y. & Sanchez, D. 2013).

2. Características Microscópicas.

a. Motilidad.

La motilidad es uno de los parámetros más importantes de la analítica seminal. Estos métodos evalúan el porcentaje de espermatozoides móviles, así como el tipo de movimiento que presentaba la media de una población espermática. Estas medidas ofrecen una descripción general de la motilidad espermática, pero la exactitud y precisión están limitadas por las condiciones del sistema de medida y por la destreza del observador (Hidalgo, C. Tamargo, C. & Monforte, C. 2005).

La aparición de los sistemas informatizados de digitalización de imágenes abrió un nuevo campo en el estudio de la motilidad de los espermatozoides. Estos sistemas, denominados genéricamente CASA (Computer Assisted Motility Analysis), han automatizado y simplificado el proceso. El CASA establece, de una manera efectiva, medidas cuantitativas del movimiento individual de los espermatozoides. Con este tipo de análisis se espera obtener medidas correctas de la motilidad espermática que proporcionen información precisa acerca del estado funcional del axonema y de las membranas espermáticas (Hidalgo, C. Tamargo, C. & Monforte, C. 2005).

b. Motilidad Masal.

Por movimiento de masa se entiende, el movimiento en onda de todos los espermatozoides, observado en los eyaculados densos. Para su evaluación se toma una gota del semen a examinar (gota de semen íntegro) con una pipeta, se coloca la gota sobre un portaobjeto a 37°C y se observa en campo claro (aumento 10X), sin colocar el cubre objeto (Agüero, G. 2012). Para esta característica existen ciertas tablas de clasificación como se muestra en el Cuadro 3.

Cuadro 3. MOTILIDAD MASAL.

Calidad	Movimiento	Porcentaje
Muy Bueno	Movimiento masivo muy marcado y rápido	70 - 100
Bueno	Movimiento aparente pero moderado	50 - 69
Suficiente	Ondas apenas apreciables	30 - 49
Pobre	No muestra ondas	Menor de 30

Fuente: (Angelino, J. 2009).

c. Motilidad Individual.

Se coloca un volumen de 5 a 7 μ l de semen sobre un portaobjetos nuevo y precalentado creando una gota de aproximadamente 3 a 5 mm de diámetro, que luego se cubre con una laminilla cubreobjetos (Angelino, J. 2009).

La muestra es observada con microscopía de contraste de fase y con aumento de 200-400x, determinando el porcentaje de células espermáticas con movimiento progresivo lineal. Si el semen está muy concentrado, la muestra puede diluirse con una solución amortiguadora o diluyente de semen antes de colocar el cubreobjetos (Angelino, J. 2009). Estas se clasifican como se muestra en el Cuadro 4.

Cuadro 4. MOTILIDAD INDIVIDUAL.

Calidad	Movimiento	Porcentaje %
Muy Bueno	Progresivo	80 - 100
Bueno	Progresivo	60 - 79
Suficiente	Progresivo	40 - 59
Pobre	Progresivo	Menor de 40

Fuente: (Angelino, J. 2009).

d. Concentración Espermática.

Permite evaluar la capacidad de producción de espermatozoides del semental y calcular el número de dosis a producir por eyaculado. Existe correlación entre la concentración y fertilidad. Se observan variaciones en función del individuo, estación del año, frecuencia y técnica de recogida, etc., si bien la concentración media está entre 800-1000 $\times 10^6$ espermatozoides/ml (Olegario, C. Tamargo, C. y Diez, C. 2012).

Entre los diferentes métodos de evaluación tenemos:

(1) Hemocitómetro de Spencer.

Este método es el mismo que se utiliza para el conteo de glóbulos rojos. La dilución se efectúa con la pipeta de glóbulos rojos (dilución 1:100 o 1:200) utilizando una solución salina al 3 % con formalina para matar a los espermatozoides y poder contarlos sobre la cuadrícula de cámara de Spencer (Hafez, B. 2000).

(2) Espectrofotómetro.

Relaciona el grado de absorción de la luz que provocan los espermatozoides diluidos a una concentración conocida, con la concentración de la muestra. Rápido y con menor coeficiente de variación que el anterior (2.9 % vs. 12.3 %) pero los valores pueden verse afectados por contaminaciones (Gonzales, J. Martinez, Y. & Sanchez, D. 2013).

(3) CASA (Computer Assisted Semen Analysis).

Estos sistemas, denominados genéricamente CASA, han automatizado y simplificado el proceso. Establece, de una manera efectiva, medidas cuantitativas del movimiento individual de los espermatozoides además de dar información sobre la concentración del semen en cuestión. Con este tipo de análisis se espera obtener medidas correctas de la motilidad espermática y concentración que proporcionen información precisa acerca del estado del semen (Hidalgo, C. Tamargo, C. y Monforte, C. 2005).

Los sistemas automáticos de medición de imágenes se basan en la captura sucesiva de espermatozoides en movimiento provenientes de un microscopio. Estas imágenes se digitalizan identificando las células espermáticas que contienen la primera imagen. Luego se procede al seguimiento de estas células en imágenes sucesivas y al establecimiento de trayectorias definitivas. Las trayectorias se procesan matemáticamente, obteniendo así resultados numéricos

precisos. Los parámetros determinados para cada espermatozoide son la velocidad de movimiento sobre la base de varios descriptores, las trayectorias que realiza la cabeza del espermatozoide y la frecuencia de los cambios de dirección que efectúa (Hidalgo, C. Tamargo, C. y Monforte, C. 2005).

Actualmente, también existen en el mercado varios tipos de CASA como se ve en el Gráfico 4, que capturan el movimiento espermático y lo analizan, tanto en tiempo real, como de manera diferida, aportando un gran volumen de información (Hidalgo, C. Tamargo, C. y Monforte, C. 2005)

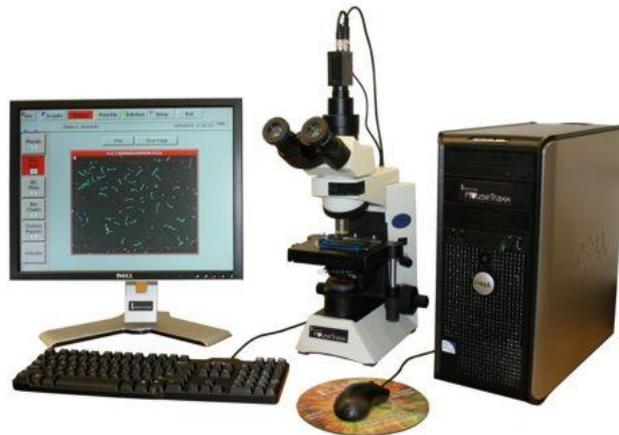


Gráfico 4. Sistema CASA

Fuente: (Cubero, M. 2012)

(4) Método Manual (hemocitómetro o cámara de newbauer).

Se trata de una gruesa placa de cristal con forma de portaobjetos, de unos 30 x 70 mm y unos 4 mm de grosor. Gráfico 5. En una cámara simple, la porción central, que es donde se realiza el conteo, está dividida en 3 partes.

En la parte central se encuentra grabada una retícula cuadrangular. En el caso de cámaras dobles, que son las más comunes, existen 2 zonas de conteo, una superior y otra inferior al eje longitudinal de la cámara.



Gráfico 5. Cámara de Neubauer

Fuente: (Cambero, S. 2012)

Cálculo de concentración.

- El área que se cuenta es de 1 mm. El cubreobjetos está 0.1 mm arriba del piso de la cámara. Por lo tanto, el volumen que se está contando es de 0.1 mm³ o 0.1 microlítro.
- Se multiplica el promedio de las dos cámaras por 10,000 para obtener la concentración por ml de la muestra diluida.
- Sea que para calcular la concentración del eyaculado original:
- Se saca el promedio de las dos cámaras.
- Multiplicarlo por 10,000
- Multiplicar eso por el factor de dilución.

e. Morfología.

El análisis morfológico de los espermatozoides es uno de los principales componentes de la evaluación de las características de una muestra seminal. La valoración de la morfología del espermatozoide se basa en la relación directa que haya entre la proporción de espermatozoides anormales en el eyaculado, el tipo de defecto morfológico y su relación con la fertilidad in vivo de los toros (Hidalgo, C. Tamargo, C. y Monforte, C. 2005).

Atendiendo a una clasificación estrictamente morfológica, las anomalías que puedan generarse se clasifican en anomalías en la cabeza, en el tracto intermedio y en la cola. Según el órgano donde puede haberse generado diferenciamos las anomalías primarias y secundarias, Gráfico 6. (Hidalgo, C. Tamargo, C. y Monforte, C. 2005).



Gráfico 6. Anormalidades de los Espermatozoides

Fuente: (Salgado, S. 2016).

(1) Anomalías Primarias.

De origen testicular, producidas durante la espermatogénesis. Corresponden a anomalías de la cabeza, pieza intermedia o inserción de la cola (Gonzales, J. Martinez, Y. & Sanchez, D. 2013). De origen genético. Pueden afectar a cualquier estructura espermática.

(2) Anomalías Secundarias.

Desarrolladas en el epidídimo a lo largo del proceso de maduración espermática, suelen corresponder a presencia de gotas citoplasmáticas. Afectan fundamentalmente a la cola del espermatozoide (Gonzales, J. Martinez, Y. & Sanchez, D. 2013).

(3) Anomalías Terciarias.

Originadas por manipulación incorrecta del semen tras la recolección (Gonzales, J. Martinez, Y. & Sanchez, D. 2013).

3. Análisis Seminales Alternativos.

a. Vitalidad Espermática.

El test de vitalidad del espermatozoide es una prueba realizada durante el seminograma en la que se calcula el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos de una muestra de semen. Aunque la movilidad nos indica vitalidad, no todos los espermatozoides inmóviles están muertos. El índice de vitalidad no se mide en todos los espermogramas; únicamente en aquellos casos en los que existe más de un 40 % de espermatozoides inmóviles (Rodrigo, A. 2016).

b. Tinción Eosina-Nigrosina.

Esta técnica de tinción sirve para determinar el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos. Distinguiremos fácilmente con ayuda de un microscopio los espermatozoides vivos y muertos.

Los espermatozoides con la membrana intacta no absorberán la tinción, mientras que los espermatozoides muertos adquirirán la tinción en su interior y aparecerán más oscuros.

(1) Procedimiento de la Prueba Eosina-Nigrosina.

- Colocar 10 micro litros en un slide o portaobjetos mismo que debe estar a una temperatura de 37 grados centígrados en una termoplatina.
- Añadir a la muestra de semen 10 micro litros de solución eosina-nigrosina.

- Mezclar con ayuda de una micro pipeta.
- Dejar que la tinción se fije por un tiempo de 30 segundos en la termoplatina o temperatura ambiente.
- Realizar un frotis y dejar secar por unos 5 minutos.
- Realizar la lectura en un microscopio con lente de 100X o se puede utilizar un lente de inmersión para mejor precisión.
- Contar 100 espermatozoides para poder obtener un estimado en porcentaje de vitalidad.
- Los espermatozoides vivos se muestran sin tinción y de color blanco como se presenta en el Gráfico 7.



Gráfico 7. Tinción Eosina-Nigrosina (vivos y muertos)

Fuente: (Barragán, I. 2016)

c. Integridad de Membranas.

La membrana espermática es una estructura dinámica que participa en el reconocimiento y transporte de moléculas. Estas funciones permiten que el espermatozoide adapte su metabolismo al medio circundante, proporcionando así un sistema molecular para el reconocimiento del ovocito. El análisis de la integridad de la membrana constituye una información importante en la evaluación de la fertilidad del macho. Además, esta integridad no sólo es fundamental para el

metabolismo espermático, sino que también lo es para una adecuada capacitación y reacción acrosómica y, por tanto, para la fertilidad del macho (Hidalgo, C. Tamargo, C. y Monforte, C. 2005).

d. Prueba de Estrés Hipo-osmótico (HOST).

Se fundamenta en la suspensión de espermatozoides en un medio hipo-osmótico que ocasiona un desequilibrio osmótico, situación que la célula compensa fisiológicamente difundiendo agua al compartimento intracelular y como consecuencia, el espermatozoide aumenta su volumen con consecuentes cambios morfológicos en los flagelos, como dilatación y enrollamiento de los mismos (Jeyendran, R. 1984), como se muestra en el Gráfico 8

(1) Procedimiento de la Prueba HOST.

- Preparar una solución con 0.735 gr de citrato de sodio, 1.35 gr de fructosa y se disuelve en 100 ml de agua destilada y filtrar.
- Agregar en un vial 1000 micro litros de solución hipo-osmótica y llevar a baño maría a 37 grados centígrados por 15 minutos.
- Adicionar a esta solución 50 micro litros de semen y llevar a baño maría por 30 minutos colocar una muestra en un portaobjetos y contar.



Gráfico 8. Prueba Hipo-osmótica.

Fuente: (Barragán, I. 2016)

e. Análisis Computarizados de Motilidad Espermática.

Mediante el uso del sistema CASA es posible valorar de forma objetiva la motilidad seminal. Permite la obtención de parámetros como el porcentaje de espermatozoides móviles, velocidad curvilínea (VCL), rectilínea (VSL), media (VAP), índice de linealidad, rectitud, oscilación, amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza, frecuencia del batido del flagelo etc. (Muiño, R. 2005).

(1) Motilidad Progresiva.

Se define como un tipo de motilidad en el cual el espermatozoide presenta un movimiento flagelar vigoroso y relativamente simétrico dando como resultado un desplazamiento hacia adelante. El espermatozoide obtiene la capacidad para llevar a cabo la motilidad progresiva durante la maduración en el epidídimo (Eddy, E. 2006).

Esta evaluación se realiza mediante la valoración de una gota de semen diluido observado con ayuda del microscopio, identificando los espermatozoides que presenten un movimiento individual lineal, progresivo y así obtener un porcentaje (Díaz, C. & Valencia, J. 2008).

En contraste (Contri, A. 2010), señalo que en los últimos años el sistema CASA ha tomado considerable importancia convirtiéndose en la herramienta más importante para evaluar, ya que existe una gran variabilidad en cuanto a la estimación subjetiva de la motilidad del semen.

(2) Velocidad.

Se expresa en $\mu\text{m}/\text{seg}$ según (Kubuscan. 2015)

Velocidad Curvilínea (VCL): Es el promedio de la velocidad de la cabeza espermática a través de su trayectoria real, (valor de referencia > 45 mm/seg).

Velocidad Rectilínea (VSL): Es el promedio de la velocidad de la cabeza espermática a través de la línea recta que une la primera posición de la trayectoria con la última (valor de referencia > 25 mm/seg).

Velocidad Promedio (VAP): Es el promedio de la velocidad de la cabeza espermática a través de su trayectoria promedio (valor de referencia > 35 mm/seg).

Desplazamiento Lateral de la Cabeza Espermática (alh): Se define como la amplitud de las variaciones de la trayectoria actual de la cabeza espermática en su relación con la VAP. El valor de referencia es >2mm.

Cualidades que deben tener los Espermatozoides de un Eyaculado Fecundante.

Según (Hidalgo, C. Tamargo, C. y Monforte, C. 2005).

- Motilidad progresiva.
- Morfología normal.
- Metabolismo energético activo.
- Integridad estructural y funcionalidad de la membrana.
- Integridad de las enzimas asociadas con la fecundación.
- Transferencia óptima del material genético.

J. ANTIOXIDANTES.

Son sustancias que está presentes en concentraciones menores a las del sustrato oxidable, y es capaz de retrasar significativamente o evitar la oxidación de un

sustrato. Por otro lado, en bioquímica inorgánica se define como una sustancia capaz de donar electrones resultando en la obstaculización de la reacción en cadena de oxidorreducción (Medina, R. & Hicks, J. 2001).

Los antioxidantes tienen una diversidad amplia pudiendo ser moléculas complejas, como la catalasa, peroxirredoxinas y superóxido dismutasa hasta moléculas muy sencillas como el glutatión y ácido úrico (Gutteridge, J. & Halliwell, B. 2010).

Los antioxidantes se pueden clasificar como enzimáticos y no enzimáticos (Martín, H. 2013). El grupo de antioxidantes no enzimáticos funcionan donando un electrón a un radical libre con la finalidad de estabilizarlo, estos se ubican en el citosol, matriz mitocondrial y nuclear además en los fluidos extracelulares (Córdova, I. 2009).

Se conocen tres grupos de antioxidantes:

1. Antioxidantes Primarios.

Que previenen la formación de nuevos radicales libres, transformándolos en moléculas menos perjudiciales, antes de que puedan reaccionar, o evitando la formación de radicales libres a partir de otras moléculas. Entre estos antioxidantes tenemos a la enzima superóxido dismutasa (SOD), que convierte al O_2^- en peróxido de hidrógeno. La enzima glutatión peroxidasa (GPx) que convierte el peróxido de hidrógeno y los peróxidos lipídicos en moléculas inofensivas antes de que formen radicales libres. Y las proteínas de unión a metales (ej: la ferritina y ceruloplasmina) que limitan la disponibilidad de Fe^{2+} necesaria para formar el radical OH (Bellabarba, G. 2005).

2. Antioxidantes Secundarios.

Los cuales capturan los radicales libres, evitando las reacciones en cadena. Entre estos tenemos: la vitamina E (alpha- tocoferol), vitamina C (ascorbato), betacaroteno, ácido úrico, bilirrubina y albúmina (Bellabarba, G. 2005).

3. Antioxidantes Terciarios.

Que reparan las biomoléculas dañadas por los radicales libres. Entre ellos tenemos las enzimas reparadoras de ADN y la metionina sulfóxido reductasa (Bellabarba, G. 2005).

4. Cisteína.

Este aminoácido es uno de los pocos que contiene azufre y es un excelente antioxidante que también protege al organismo de los efectos de la contaminación (Moragues, B. 2013).

La cisteína, un precursor de aminoácidos del glutatión se considera un antioxidante intracelular que protege las células de los daños mediados por ROS, estrés oxidativo (Meister, A. & Anderrsson, M. 1983). La información sobre el uso de L-cisteína en el diluyente para la criopreservación de los espermatozoides de toro es que es capaz de prolongar y puede mejorar la calidad post-descongelación (motilidad, membrana plasmática, integridad, viabilidad e integridad acrosomal) de espermatozoides de toro (Muhammad, S. et al, 2010).

5. Cafeína.

La cafeína es un alcaloide del grupo de las xantinas, sólido cristalino, blanco y de sabor amargo, que actúa como una droga psicoactiva, levemente dissociativa y

estimulante por su acción antagonista no selectiva de los receptores de adenosina (Fisone, G. Borgkvist, A. & Usiello, A. 2004).

La cafeína es un inhibidor de la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos que resulta en un aumento de la adenosina monofosfato cíclica intracelular (cAMP), la estimulación de la capacidad y la reacción acrosómica espontánea de los espermatozoides de jabalí (Funahashi, H. & Nagai, T. 2001), y por lo tanto aumentando la motilidad espermática. Además, la cafeína puede tener un efecto directo sobre el metabolismo celular, y tal efecto depende de la concentración de iones de calcio. Además, la fecundación in vitro del ganado se ha mejorado mediante la aplicación de heparina sola o mediante sus efectos sinérgicos cuando se utiliza con cafeína (Park, C. Ohgoda, O. and Niwa, k. 1989).

6. Vitamina C.

El Ácido Ascórbico (AA) o Vitamina C se caracteriza por ser una molécula soluble en agua y por ser más estable en medios ácidos. Esta juega un papel importante en el organismo, ya que actúa como un cofactor y catalizador en reacciones óxido-reducción (Arce, J. & Balderas, A. 2015).

El ácido ascórbico es como tal un antioxidante, su presencia ayuda a varios mecanismos en la disminución de numerosos radicales, incluyendo LPO (Knight, J. Blaylock, R. & Searles, A. 1993). La adición de ácido ascórbico en un diluyente puede mejorar el rendimiento de los espermatozoides al reducir el daño celular. A través de su acción continua de barrido de radicales (Beconi, M. et al, 1993). (Sierens, J. et al, 2001) demostró, que las especies antioxidantes actúan in vivo para disminuir el daño oxidativo al ADN, proteína y lípidos, y este hallazgo sugirió que el ácido ascórbico podría ser necesario para proteger los espermatozoides contra el ROS. El ácido ascórbico es un antioxidante no enzimático y por tanto, está potencialmente implicada en la protección del estrés oxidativo (Anane, R. & Creppy, E. 2001).

A pesar de las investigaciones sobre los efectos de los antioxidantes poco se conoce de los efectos de la adición de ácido ascórbico sobre la calidad del semen bovino después del deshielo (Hong, H. et al, 2010).

K. RADICALES LIBRES.

Un radical libre es aquella figura química que tiene en su estructura uno o más electrones no apareados. Es altamente reactiva y clave para formar otros radicales libres en cadena (Núñez, A. 2011), además por la vida media que es de microsegundos, ocurre una rápida propagación con moléculas aledañas y mayor daño potencial. De hecho, un radical libre puede afectar 1 millón de moléculas durante la reacción en cadena (Zamora, J. 2007).

Los compuestos en cuestión forman parte de las llamados especies reactivas del oxígeno (ERO) o ROS (Reactive Oxygen Species) (Núñez, A. 2011). Los radicales libres se liberan durante el metabolismo, y también se producen por contaminantes ambientales, (atmosféricos, acuáticos, de suelos), radiaciones (ultravioleta, gamma, hertziana), entre otros. Se pueden relacionar con una alimentación no adecuada, exposición a fertilizantes o pesticidas. Se incluye además el metabolismo de algunos químicos y elevado estrés físico o psíquico (Llancari, A. & Matos, A. 2011).

Los ROS reaccionan muy rápidamente con la mayoría de los compuestos orgánicos y comienzan una serie de reacciones en cadena que modifican la estructura de algunas moléculas biológicas, particularmente de aquellas que poseen un alto contenido de ácidos grasos polinsaturados. Cada radical libre (RL) formado en el organismo puede iniciar una serie de reacciones en cadena que continúan hasta que los RL sean eliminados (Bellabarba, G. 2005).

Estos radicales son: el anión superóxido (O_2^-) radical hidroxilo (OH^-) y el óxido nítrico. Existen otras moléculas como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que no son radicales libres pero que actúan fisiológicamente como tal; tienen una vida

media más larga y pasan a través de la membrana y no están cargadas eléctricamente. El sistema antioxidante protege a los tejidos de los efectos de los RL (Sheweita, S. Tilmisany, A. & Sawaf, H. 2005).

L. ESTRÉS OXIDATIVO.

La importancia del estrés oxidativo en la etiología de la infertilidad masculina fue descrita en 1943 por el andrólogo John MacLeod, quién demostró que la adición de catalasa podía mejorar la movilidad del espermatozoide incubado bajo condiciones aeróbicas (Fraczek, M. & Kurpisz, M. 2005).

Numerosos estudios han demostrado la vulnerabilidad del espermatozoide a los RL, sin embargo, no está totalmente esclarecido como es inducido este fenómeno (Bellabarba, G. 2005). Los RL son importantes tanto para explicar la función normal como la patofisiología del espermatozoide (Fraczek, M. & Kurpisz, M. 2005).

El Estrés Oxidativo (EO) es definido como un estado de desequilibrio originado en el cuerpo donde la excesiva producción de Especies Reactivas de Oxígeno abate las defensas antioxidantes, y así desencadena patologías como: deformidades al obstaculizar la espermatogénesis, daños en la funcionalidad del espermatozoide y como resultado final la infertilidad (Agarwal, A. Virk, C. & Ong, S. 2014).

Los principales blancos para el EO son los componentes de la célula entre los que se encuentra: lípidos, ácidos nucleicos, proteínas y carbohidratos. Algunos factores que determinan el daño por el EO incluyen la naturaleza y cantidad de ROS, así como el tiempo de exposición a estos últimos, otro tipo de factores que influyen son la temperatura, composición del medio ambiente adyacente y tensión de oxígeno los cuales reciben el nombre de factores extracelulares (Agarwal, A. Makker, K. y Sharma, R. 2008).

M. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO.

Son productos secundarios del metabolismo del oxígeno (Lavranos, G. et al, 2012). Estas moléculas se producen habitualmente en la mitocondria durante el sistema de transporte de electrones de un 1 - 2 % en una célula normal (Bathgate, R. 2011), sin embargo, en condiciones donde se incrementa la demanda de energía (ATP) estos se pueden llegar a producir en exceso (Vallorani, C. et al, 2010).

Los procesos de clasificación y almacenamiento del semen pueden ser perjudiciales ya que pueden ser causa de estrés y desencadenar una producción de ROS mayor a lo normal, todo esto resulta en una reducción importante de la calidad seminal (Vallorani, C. et al, 2010).

Las producciones de ROS por los espermatozoides pueden producirse de dos formas:

- Sistema de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa a nivel de la membrana plasmática del espermatozoide (Agarwal, A. Makker, K. y Sharma, R. 2008).
- Nicotinamida adenina dinucleótido dependiente de reacción óxido-reductasa a nivel de la mitocondria, siendo esta última el principal mecanismo en la producción de ROS (Agarwal, A. Makker, K. y Sharma, R. 2008).

Los principales ROS que se encuentran en el plasma seminal y que se conoce que juegan un papel nocivo para la funcionalidad de los espermatozoides son: Anión Superóxido (O_2^-), Radicales Hidroxilos ($-OH$) y Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2) (Agarwal, A. Makker, K. y Sharma, R. 2008).

Además, existen otros ROS de los cuales se tiene información que pueden producir daños al espermatozoide como: Radical Peroxilo (RO_2), Radical Alcoxi

(RO), Radical Hidroperoxilo (HO₂) o no radicales derivados de oxígeno como: Ácido Hipocloroso (HClO), Ozono (O₃), Oxígeno (O₂) y el Anión Peroxinitrito (ONOO⁻) (Bathgate, R. 2011).

Elevadas concentraciones de ROS desencadena patologías perjudiciales para el espermatozoide, entre las que se encuentran el agotamiento intracelular de ATP, el cual origina un daño axonemal por insuficiente fosforilación, peroxidación de los lípidos de la membrana, detrimento en la motilidad y viabilidad, además que pueden llegar a repercutir alterando las membranas mitocondriales, resultando en liberación de la proteína citocromo-c, activación de las caspasas y apoptosis (Agarwal, A. Makker, K. y Sharma, R. 2008).

1. Producción de ROS por los Leucocitos en Semen.

Se ha demostrado que la activación de los leucocitos, fundamentalmente de los neutrófilos, es un paso importante para que ellos produzcan citoquinas y ROS. El H₂O₂, el anión superóxido y los nitratos y nitritos son producidos por macrófagos y granulocitos activados y son altamente tóxicos para el espermatozoide (Sanocka, D. et al, 2003).

En el plasma seminal, los granulocitos pueden liberar grandes cantidades de ROS como respuesta a una infección e inflamación (Bellabarba, G. 2005).

El grado de daño espermático inducido por los ROS depende de la localización de la reacción inflamatoria, de la duración de la exposición del espermatozoide a estos productos y de la capacidad de la célula espermática para activar su sistema intrínseco de defensa inmunológica (Sanocka, D. et al, 2003).

La presencia de leucocitos en el semen y sus efectos sobre el espermatozoide continua siendo motivo de discusión (Bellabarba, G. 2005).

2. Fuentes de ROS en semen.

Existen fuentes endógenas y exógenas por las cuales se originan los ROS en el cuerpo (Agarwal, A. Virk, C. & Ong, S. 2014). El eyaculado está conformado por diferentes células entre las que se encuentran espermatozoides maduros e inmaduros, células redondas procedentes de diferentes etapas de la espermatogénesis, leucocitos y células epiteliales (Agarwal, A. Makker, K. y Sharma, R. 2008).

De las células anteriores, los espermatozoides inmaduros y leucocitos especialmente neutrófilos y macrófagos, se consideran las principales fuentes endógenas para la producción de ROS (Kessopoulou, E. et al, 1992).

3. Peroxidación Lipídica (pl).

La peroxidación lipídica (PL) del espermatozoide es considerada uno de los mecanismos claves del daño espermático, con la consecuente infertilidad (Fraczek, M. & Kurpisz, M. 2005).

La PL es un indicador de estrés oxidativo en células y tejidos. Los peróxidos lipídicos, derivados de ácidos grasos polinsaturados, son inestables y se descomponen para formar una serie de compuestos complejos. Entre estos se incluyen compuestos carbonilo, de los cuales el más abundante es el malonildialdehído (MDA). Por esta razón, la cuantificación del MDA es ampliamente usada como indicador de peroxidación lipídica (Browne, S. 1999).

Los niveles aumentados de lipoperóxidos han sido asociados con una variedad de enfermedades. El MDA reacciona rápidamente con grupos amino o con proteínas y otras biomoléculas, también forma compuestos con bases de DNA que son mutagénicas y posiblemente carcinogénicas. Los tipos más comunes de peroxidación lipídica son la PL no enzimática y la PL enzimática dependiente de NADPH y ADP (Bellabarba, G. 2005).

El comienzo de la peroxidación lipídica en espermatozoides susceptibles permite la acumulación progresiva de hidroperóxidos lipídicos en la membrana plasmática del espermatozoide la cual lo descompone para formar MDA (Alvarez, J. et al, 1987).

4. Mecanismo de acción de las ROS.

Las ROS afectan la fertilidad masculina debido a las alteraciones que se producen en la permeabilidad de la membrana plasmática, lo cual se traduce en alteraciones en la movilidad y morfología del espermatozoide; el H₂O₂ difunde a través de las membranas, entra a la célula e inhibe la actividad de algunas enzimas, tales como glucosa, fosfato deshidrogenasa (G6PDH) permitiendo una disminución en la producción de NADPH y una concomitante acumulación de forma reducida y oxidada del glutatión (GSSG y GSH) (Fraczek, M. & Kurpisz, M. 2005) (Saleh, R. & Agarwal, A. 2002).

El espermatozoide, rico en ácidos grasos polinsaturados, es atacado por las ROS. La disminución de la movilidad está fundamentada en que la oxidación reduce el contenido de los ácidos grasos en la membrana plasmática del espermatozoide y en consecuencia se produce una alteración en la fluidez e integridad de la misma, con la consiguiente disminución o pérdida de la movilidad, capacitación, reacción acrosómica e interacción con el ovocito para su fertilización (Zalata, A. et al, 2004).

N. CRIOPRESERVACIÓN DEL SEMEN BOVINO.

La criopreservación de semen es una importante biotecnología reproductiva, que busca promover la conservación del germoplasma masculino por tiempo indeterminado. Esta biotecnología, cuando se asocia a la inseminación artificial, representa un mecanismo eficiente para la promoción y difusión de material genético de excelente calidad. La criopreservación de semen proporciona una economía para el productor, al reducir los costos de alimentación y transporte de

los reproductores, así como los riesgos de transmisión de enfermedades (Castelo, T. 2008).

1. Principios básicos para la crio conservación del semen bovino.

Desde el descubrimiento del glicerol como agente crioprotector efectivo y del establecimiento de las técnicas básicas de criopreservación, el semen de una variedad de especies se congela y utiliza con éxito en la inseminación artificial (Holt, W. 2000).

El proceso de la criopreservación de semen comprende muchas etapas en las cuales difieren según el tipo de recursos y la accesibilidad de productos los cuales juegan un papel importante como es el caso de los diluyentes. El proceso de criopreservación incluye 5 etapas: Dilución, refrigeración, adición del crioprotector, congelación y descongelación. Mientras que algunas fases son relativamente inocuas, otras son muy estresantes, como es el caso de la refrigeración y la congelación (Carpio, V. 2015).

2. Diluyentes.

Por diluyente entendemos la solución acuosa que permite aumentar el volumen del eyaculado hasta conseguir las dosis necesarias, preservar las características funcionales de las células espermáticas y mantener el nivel de fertilidad adecuado (Carballo, M. 2009).

3. Funciones de los diluyentes.

Los diluyentes cumplen varias funciones entre las cuales se encuentran las de proporcionar una fuente de nutrientes para la manutención del metabolismo en el espermatozoide, ayudarlo contra descenso de temperaturas (BSA), sustentar una apropiada presión osmótica con ayuda de los electrolitos (NaCl, KCl), protección

contra cambios de pH mediante sustancias buffer ($\text{HCO}_3\text{-TRIS}$, HEPES) e inhibir el crecimiento bacteriano con ayuda de antibióticos (Duran, R. 2006).

4. Componentes de los diluyentes.

Según (Muiño, O. 2008), un diluyente efectivo debe contener sustancias lo más parecido al plasma seminal, ya que éste lo deberá proteger durante un determinado tiempo, por ello un diluyente invariablemente de la especie para la que sea, debe tener ciertos compuestos básicos como son:

a. Agua.

Bidestilada o ultra pura, como disolvente para el resto de los componentes.

b. Sustancias iónicas y no iónicas.

Principalmente cloruro de potasio y cloruro de sodio (regulan la presión osmótica entre el medio y los espermatozoides).

c. Amortiguador del PH.

Como el bicarbonato de sodio, aunque el ácido 3N-Morfolino propanesulfónico (MOPS), el ácido N-2-hidroxietilpiperazin-N-2-etanosulfónico (HEPES) e Hidroximetil aminometano tienen mayor acción.

d. Materiales Orgánicos.

Generalmente yema de huevo o leche, con capacidad de prevenir o atenuar el shock por frío, como alternativa se utilizan seroalbúmina bovina (BSA), hidroxitolveno butilado (BTH), etilen disódico diamino tetraacetato (EDTA), polivinil

pirrolidona (PVP-40) y alcohol polivinílico. Para retardar o prevenir modificaciones que llegaran a alterar la estructura y funcionalidad de la membrana del espermatozoide se han adicionado componentes al diluyente, entre estos se encuentran la Albumina Sérica Bovina (BSA), Hidroxitolueno Butilado (BTH), Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA) (Duran, R. 2006).

e. Agentes Crioprotectores.

Normalmente el glicerol. Los crioprotectores, son sustancias hidrosolubles y de baja toxicidad, que disminuyen el punto eutéctico de una solución dada, tienen como fin general, mantener la viabilidad celular durante un periodo determinado, incrementar el volumen del eyaculado, proteger al espermatozoide de la acción tóxica de los productos del metabolismo celular y de los cambios bruscos de temperatura (Garcia, L. 2016).

La función de los crioprotectores es la de proteger a las células de las lesiones producidas por la congelación. En la actualidad existen muchos tipos de protectores que se agrupan según las posibilidades de penetración o no en las membranas celulares. Se cree que los crioprotectores actúan reduciendo la cantidad de hielo presente a cualquier temperatura durante la congelación, moderando así los cambios en la concentración de solutos (Carpio, V. 2015).

f. Azúcares Simples.

Como fuente de energía y como crioprotectores adicionales, por ejemplo: glucosa, galactosa, fructosa, ribosa y trealosa (Fernandez, F. 2013).

g. Antibióticos.

La adición de antibióticos en el diluyente es de gran utilidad para reducir la contaminación de bacterias que pueda adquirirse durante la recolección y

procesamiento del semen (Morrell, J. y Wallgren, M. 2014). Las fuentes de contaminación se han clasificado en las relacionadas al animal: entre las que se incluyen la materia fecal, líquido preputial, piel/pelo y el personal, la segunda clasificación se refiere a: la no relacionadas con el animal, donde se enlistan el agua, lavabos/drenaje, sistemas de ventilación y objetos inanimados entre otros (Althouse, G. et al, 2008).

h. Opcionalmente.

Las propiedades protectoras de la yema de huevo sobre los espermatozoides durante la congelación fueron descubiertas por primera vez por Philips en 1939. Posteriormente se encontró que la yema de huevo tenía al menos dos factores activos, proteger contra el daño al enfriamiento y ayuda manteniendo la viabilidad (Carpio, V. 2015).

5. Aspectos fisiológicos sobre el congelamiento de semen.

Cuando se alcanzan temperaturas de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ no hay reacciones bioquímicas ni energía térmica dentro de la célula, ni cambios de índole genético, consecuentemente, dicha estabilidad solamente puede ser mantenida a temperaturas por debajo de los -130°C , ya que, a temperaturas mayores puede haber agua no congelada intracelularmente, la cual permite funciones metabólicas, causando degeneración de la célula (Palacios-Angola,1994) citado por (Garcia, L. 2016).

6. Optidyl Diluyente Comercial.

Elaborado por Cryo Vet S.A.S. Es un concentrado para diluyente con fórmula tris, yema de huevo ionizada, glicerol, antibiótico (penicilina, estreptomycin, espectinomycin, lincomycin) (Garcia, L. 2016).

III. MATERIALES Y MÉTODOS.

A. LOCALIZACIÓN Y DURACIÓN DEL EXPERIMENTO.

La presente investigación se llevó a cabo la ciudad de Chihuahua - México en la Facultad de Zootecnia y Ecología ubicada en el Periférico Francisco R. Almada Km1.Chihuahua, Chih. Con un tiempo de duración de 61 días, con los siguientes parámetros meteorológicos como se muestra en el Cuadro 5.

Cuadro 5. CONDICIONES METEOROLÓGICAS DEL ESTADO DE CHIHUAHUA.

Parámetro	Promedio
Altitud, msnm	1440
Temperatura, °C	25
Humedad relativa, %	40
Viento Km/h	8
Precipitación mm	0

Fuente: (ESTACIÓN CHIHUAHUA UNIVERSIT)

B. UNIDADES EXPERIMENTALES.

Se utilizó un total de 6 eyaculados y elaboró 48 pajillas por tratamiento, teniendo un total de 192 pajillas a evaluar sobre las cuales se realizaron repeticiones técnicas.

C. MATERIALES, EQUIPOS E INSTALACIONES.

1. Materiales.

- Pajillas
- Cámaras leja

- Optidyl
- Goblets
- Bastones
- Tanque de nitrógeno
- Tuper Ware
- Pipetas
- Matraces
- Guantes de latex
- Pota y cubre objetos
- Culler
- Micropipetas
- Libreta de apuntes
- Puntillas

2. Equipos.

- Equipo CASA
- Microscopio
- Electro eyaculador
- Termoplatina
- Empajilladora
- Computador
- Cámara fotográfica

3. Instalaciones.

- Cuarto frío para procesamiento de semen
- Laboratorio de Reproducción animal
- Mangas para manejo de los sementales

D. TRATAMIENTO Y DISEÑO EXPERIMENTAL.

El experimento se manejó bajo un DBCA, analizando únicamente el efecto del antioxidante que es cisteína, cafeína, vitamina C y un control, sobre los cuales se utilizó un total de 6 eyaculados, mismos que a su vez se utilizó como repeticiones.

TO: Diluyente Optidyl.

T1: Diluyente Optidyl 2mM Cisteína.

T2: Diluyente Optidyl 5mM Cafeína.

T3: Diluyente Optidyl + 4.5 mg/ml Vitamina C

Se utilizó el siguiente modelo lineal aditivo.

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + e_{ij}$$

Dónde:

Y_{ij} : Valor estimado de la variable.

μ : Media general.

T_i : Efecto antioxidante.

B_j : Efecto del bloque.

e_{ij} : Error Experimental.

E. MEDICIONES EXPERIMENTALES.

- Viabilidad %
- Motilidad progresiva %
- Velocidad Curvilínea (um/s)
- Velocidad Rectilínea (um/s)
- Velocidad Media (um/s)
- Amplitud de desplazamiento de cabeza (um)
- Integridad de la membrana %
- Integridad acrosomal %
- Beneficio Costo

F. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS Y PRUEBAS DE SIGNIFICANCIA.

Los datos experimentales fueron procesados y sometidos a los siguientes análisis estadísticos como se muestra en el Cuadro 6.

1. ADEVA
2. Comparación de medias según Tukey a una probabilidad menor del 0.05.

Cuadro 6. ESQUEMA DEL ANÁLISIS DE VARIANZA.

Fuente de Variación	Grados de Libertad
Total	23
Tratamientos	3
Bloques	5
Error	15

Fuente: (Barragán I, 2017)

G. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.

En la presente investigación se evaluó la calidad del semen bovino criopreservado en un diluyente comercial con la adición de diferentes tipos de antioxidantes entre los cuales tenemos: Cisteína, Cafeína, Ácido ascórbico y un tratamiento control. Dentro de los tratamientos a usar tenemos el T0 diluyente comercial (Optidyl), T1 que consiste en diluyente comercial + Cisteína 2mM (Muhammad, S. et al, 2010), T2 diluyente comercial + Cafeína 5mM (Barakat, B. et al, 2015) y el T3 diluyente comercial + ácido Ascórbico 4.5 mg/ml (Hong, Hu. et al, 2010). Se utilizó 6 eyaculados de diferentes toros con ayuda de la Unión Ganadera del Estado de Chihuahua, dicho semen fue procesado y empajillado sobre los cuales se realizó las observaciones y análisis correspondientes.

H. METODOLOGÍA DE EVALUACIÓN.

1. Viabilidad %.

Se evaluó mediante la tinción eosina-nigrosina con la técnica descrita en la sección correspondiente del escrito; se mezcló 10 ul de semen con 10 ul de tinción, se realizó un mezclado y frotis para dejar secar por un minuto y posteriormente efectuar un conteo de 100 espermatozoides con un lente de inmersión.

2. Motilidad Progresiva %.

Los datos correspondientes a Velocidad Curvilínea (um/s), Velocidad Rectilínea (um/s), Velocidad Media (um/s) y Amplitud de desplazamiento de cabeza (um) se obtuvo por medio del sistema informático CASA (Computer Assisted Motility Analysis). Para lo cual se tomó una muestra de 50 ul de semen y se lo mezcló con 50 ul de solución salina al 90 % con el fin que de que el programa pueda detectar los movimientos de cada esperma.

3. Integridad de la Membrana %.

Se evaluó mediante la técnica descrita en la sección correspondiente del presente escrito, es decir se tomó 50 ul de semen y se lo vertió en un vial con 1000 ul de solución hipo-osmótica, se incubó por tiempo de 30 minutos y posterior a esto se observó en un microscopio de 100X con el cual se contó un total de 100 espermatozoides dando un resultado en porcentaje.

4. Integridad Acrosomal %.

En la evaluación de este parámetro se utilizó una tinción de eosina-nigrosina tal como se describe en el apartado correspondiente del presente escrito, a fin de ser

un método alternativo a la identificación de membranas acrosomales. Una vez realizada la tinción se contó las espermatozoides utilizando un microscopio de campo claro con un lente de 100X, en el cual se contó un total de 100 espermatozoides con el propósito de evaluar el resultado en porcentaje.

5. Beneficio/Costo.

Se determinó utilizando este indicador económico entre los tratamientos, con el propósito de registrar cuál de estos resulta más rentable dejando con esto un mayor margen de ganancia.

IV. **RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**

A. **Viabilidad.**

Una vez evaluado el porcentaje de espermatozoides vivos por cada tratamiento en las pajillas, no se registró diferencias estadísticas significativas como se muestra en el Cuadro 7.

Entendiendo que el número de espermatozoides viables por dosis después de la crioconservación afecta significativamente la fertilidad en condiciones de campo (Andrabi, S. et al, 2006). Los valores obtenidos en esta investigación resultan ser inferiores al ser comparados con los de (Muhammad, S. et al, 2010), al utilizar el mismo nivel de L-Cisteína el cual reporta valores de 79.3 ± 4.2 % de viabilidad, lo que posiblemente se debe a la diferencia en el protocolo de criopreservación en cuanto se refiere al tiempo de refrigeración, el cual afecta en la actividad y vida espermática por estar en mayor contacto con el diluyente y sus componentes (Holt, W. 2000).

B. **Motilidad Progresiva.**

En el análisis de esta variable no se encontraron diferencias estadísticas significativas en los tratamientos como se muestra en el Cuadro 7. Se entiende por motilidad progresiva al movimiento en el cual el espermatozoide presenta una acción flagelar vigoroso y relativamente simétrica dando como resultado un desplazamiento hacia adelante, (Eddy, E. 2006).

Al revisar los valores obtenidos en la presente investigación y tomando como referencia el 19.03 % del tratamiento control, se comparó con los datos obtenidos por (Hong, Hu. et al, 2010), mismo que estudió el efecto de la adición ácido ascórbico en la congelación seminal reportando 36.18 ± 1.53 % de motiles progresivos, pudiendo observar que los resultados en este trabajo son inferiores,

Cuadro 7. EVALUACIÓN DEL EFECTO CRIOPROTECTOR DE DIFERENTES FUENTES DE ANTIOXIDANTES EN EL SEMEN BOVINO.

Variables	Tratamientos				E.E.	Prob.
	T0	T1	T2	T3		
Viabilidad (%)	58.03	a 52.56	a 54.47	a 53.92	a 1.48	0.10
Motilidad						
Progresiva (%)	19.03	a 17.58	a 13.59	a 18.06	a 2.03	0.28
Velocidad						
rectilínea (um/s)	85.97	a 85.53	a 89.79	a 82.72	a 1.81	0.09
Velocidad						
curvilínea (um/s)	148.97	a 152.02	a 157.34	a 143.70	a 4.47	0.22
Velocidad Media						
(um/s)	94.28	a 94.46	a 97.93	a 90.96	a 1.92	0.13
ALH (um)	6.88	a 6.79	a 6.94	a 6.73	a 0.30	0.96
Integridad de						
membrana (%)	44.81	a 46.86	a 42.56	a 43.55	a 1.84	0.41
Reacción						
Acrosomal (%)	96.94	a 96.78	a 96.67	a 96.50	a 0.54	0.95

Fuente: (Barragán I, 2017)

(ALH) Amplitud de desplazamiento de cabeza.

diferencias que se atribuye al protocolo de criopreservación utilizado y a factores intrínsecos del animal, o a su vez ésta movilidad podría estar afectada directamente por falta de adquisición completa del movimiento flagelar después del proceso de crioconservación debido a una falta en el momento de descongelación (Medina, R. 2007).

C. Desplazamiento Lateral de la Cabeza Espermática (ALH).

Se define como la distancia que una esperma mueve su cabeza para avanzar, en la cual no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos como se muestra en el Cuadro 7.

Al comparar los resultados de este estudio; T0 6.88 (um); T1 6.79 (um); T2 6.94 (um) y T3 6.73 (um); con los 2.29 ± 0.28 (um) reportados por (Hong, Hu. et al, 2010) al evaluar su muestra de manera directa en el sistema CASA; se puede observar que los presentados en esta investigación son superiores, diferencias que posiblemente se atribuye al método de dilución de la pajilla en el momento de ser analizado, el cual permitió visualizar de mejor manera las cabezas de los espermatozoides.

D. Velocidad Curvilínea (VCL).

Dentro del análisis de la velocidad curvilínea no se observó diferencias estadísticas significativas como se expresa en el Cuadro 7. Sin embargo, al comparar los valores del presente trabajo, con los 49.44 ± 2.21 (um/seg) obtenidos por (Hong, Hu. et al, 2010) en un estudio similar, se puede observar que los resultados de la presente investigación son superiores al obtener para el T0 148.97 (um/seg) , T1 152.02 (um/seg) , T2 157.34 (um/seg) y T3 43.70 (um/seg); lo que posiblemente se debe a la diferencia en la preparación de la muestras para el análisis de motilidad en el software CASA, al ser estas lecturas más claras que la del investigador en contraste.

E. Velocidad Media (VAP).

En el presente estudio para esta variable no se encontraron diferencias estadísticas significativas en cuanto a la utilización de fuentes de antioxidantes externas en el diluyente comercial como se puede observar en el Cuadro 7. Al ser los datos de esta investigación comparados con los de (Hong, Hu. et al, 2010) en un estudio semejante, se puede observar que son numéricamente superiores, al obtener este como máximo valor 33.17 ± 2.64 (um/seg), con lo que se puede afirmar que esta diferencia se debe a la lectura realizada por el software CASA, en la cual se utilizó un protocolo distinto de dilución de pajilla, misma que permitió detectar de mejor manera los movimientos de la cabeza de la esperma.

F. Velocidad Rectilínea (VSL).

Obtenidos los resultados no se encontró diferencias estadísticas significativas, por lo que se puede decir que todos los tratamientos tienen el mismo efecto, mismos que se muestran en el Cuadro 7. Al contrastar los resultados obtenidos con investigaciones similares, se puede observar que los encontrados en este trabajo presentan valores superiores a los conseguidos por (Hong, Hu. et al, 2010) al estudiar el efecto de la vitamina C como antioxidante en la congelación seminal, el cual obtuvo como valor máximo 25.63 ± 2.38 (um/seg), diferencias que se atribuyen posiblemente al cambio en la dilución de la pajilla, la cual permitió una mayor captación espermática y visibilidad de los mismos en la lente del sistema CASA.

G. Integridad de la Membrana.

La membrana plasmática del esperma juega un papel crítico en el proceso de capacitación, reacción acrosómica y penetración de ovocitos, al regular las interacciones del medio interno con el externo (Hidalgo, C. Tamargo, C. y Monforte, C. 2005). Es así que para esta variable no se encontró diferencias estadísticas significativas como se puede ver en el Cuadro 7.

Al comparar los resultados obtenidos en este trabajo, con los de otros autores como (Muhammad, S. et al, 2010) el cual utilizó el mismo nivel de L-cisteína obteniendo un $(56.0 \pm 2.6 \%)$ de membranas intactas, se encontró que los resultados de la presente investigación son inferiores, lo que posiblemente se debe a la diferencia en la composición de los diluyentes y a los diferentes protocolos de criopreservación en cuanto se refiere al tiempo en la etapa de enfriamiento, mismo que afecta directamente las características de funcionalidad celular del espermatozoide al permanecer mayor tiempo en contacto con los solutos del diluyente.

H. Integridad Acrosomal.

En la evaluación de la integridad acrosomal no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos como se muestra en el Cuadro 7.

Los resultados obtenidos en esta investigación son inferiores a los obtenidos por otros autores como son (Muhammad, S. et al, 2010) o (Hong, Hu. et al, 2010), los mismos que reportaron resultados superiores al 60 %, lo que posiblemente se deba a la diferencia en los procesos de tinción, ya que en la presente investigación no se usó el glutaraldehído como insumo fijador, esto debido a que se quiso estandarizar una técnica de bajo costo en la evaluación de integridad acrosomal, la misma que no fue capaz de teñir las membranas mostrando así resultados con bajas detecciones de membranas acrosomales.

I. Beneficio/Costo.

Dentro del análisis con el indicador beneficio/costo, podemos observar que el tratamiento más económico o que permite un mayor margen de ganancia es el tratamiento control como se puede ver en el Cuadro 8. El mismo que responde tener una ganancia de 63 centavos por cada dólar invertido.

Cuadro 8. ANÁLISIS BENEFICIO COSTO DEL EFECTO CRIOPROTECTOR DE DIFERENTES FUENTES DE ANTIOXIDANTES EN EL SEMEN BOVINO.

Variables	Presentación	Costo Unitario \$	Unidad	Cantidad/pajilla	Tratamientos			
					Costo \$ T0	Costo \$ T1	Costo \$ T2	Costo \$ T3
Diluyente Optidyl	Frasco 500 ml	100	MI	0.2	0.04	0.04	0.04	0.04
Pajillas 0.5 ml	Bolsa de 2000	203	1	1	0.10	0.10	0.1015	0.1015
Cafeína	gr	0.41	gr	0.0097			0.0040	0.003977
Ácido Ascórbico	ML	0.5	ml	0.022				0.011
L-Cisteína	gr	0.6	gr	0.006		0.0036		
Sondas	Funda 60	12.05	1	1	0.20	0.20	0.2008	0.20
Agua destilada	Lt	1.1	ml	0.3	0.0003	0.0003	0.00033	0.00033
Uso maquinaria (Cuarto frío, empajilladora, selladora)	Varios	1.5			1.50	1.50	1.50	1.50
Costo	Pajilla		1	1	1.84	1.85	1.85	1.86
Venta	Pajilla	3	1	1	3	3	3	3
B-C (\$)					1.63	1.62	1.62	1.61

Fuente: (Barragán I, 2017)

V. CONCLUSIONES.

- La utilización de una fuente de antioxidantes extra en el diluyente comercial para la criopreservación de semen bovino no tiene efectos mayormente beneficiosos, ya que aumenta la cantidad de solutos en la muestra y compromete la viabilidad del espermatozoide al realizarse un congelamiento lento.
- Una vez analizado la motilidad progresiva de los espermatozoides se determinó que, la utilización diferentes fuentes de antioxidantes en el extensor comercial no influye en el movimiento espermático, ya que el mejor tratamiento numéricamente fue el T0 19.03 %.
- Numéricamente el mejor tratamiento para la integridad de membrana espermática fue el tratamiento control usando un diluyente comercial, obteniendo con el mismo un 44.81 % de membranas intactas, al encontrarse los espermatozoides en presencia de una menor concentración de solutos.
- La utilización de la tinción eosina-nigrosina como alternativa económica para la identificación de membranas acrosomales no es eficiente, ya que no se fija correctamente en esta parte anatómica del espermatozoide, dando como resultado faltas en el momento de su interpretación; necesitando con esto de otro insumo que ayude a fijar la tinción.
- Se determinó que el tratamiento más rentable fue el control, al no requerir de ningún otro insumo para el procesamiento de semen bovino, siendo así el costo por cada pajilla de \$ 1.84 y, permitiendo obtener una ganancia de 63 centavos por cada dólar invertido en base al análisis beneficio-costos.

VI. RECOMENDACIONES.

- Realizar investigaciones sobre los tiempos ideales de congelación de acuerdo a los diluyentes o extensores utilizados, de modo que los espermatozoides no se vean afectados por las variaciones de solutos y tiempo.
- Estandarizar la técnica de tinción eosina-nigrosina para la detección de membranas acrosomales en semen bovino, de manera que sea fácil y económica al momento de realizar estudios de calidad seminal.
- Investigar sobre las tasas de congelación y descongelación de las pajillas, de manera que estas sean únicas para cada protocolo, a fin de evitar daños a los espermatozoides por posibles formaciones de cristales y daños estructurales.
- Buscar nuevas fuentes de aditivos y suplementos en el extensor de semen bovino que resulten ser más eficientes y menos perjudiciales en el proceso de conservación espermático.

VII. LITERATURA CITADA.

- AGARWAL, A; MAKKER, K; Y SHARMA, R. (2008). Clinical Relevance of Oxidative Stress in Male Factor Infertility. *J. Reprod. Immunol*, Pág 59:2–11.
- AGARWAL, A; VIRK, C; & ONG, S. (2014). Effect of oxidative stress on male reproduction. *World. J. Mens. Health*, Pág 32:1–17.
- AGUERO. G. (2012). Evaluación de las Características Seminal de Sementales Bovinos mediante el Analizador Seminal Computarizado (CASA). http://saber.ucv.ve/jspui/bitstream/123456789/3292/1/T026800002626-0-Tesis_Final_Gloria_Aguero-000pdf.
- ALTHOUSE, G; PIERDON, C; & LU, K. (2008). Thermotemporal dynamics of contaminant bacteria and antimicrobials in extended porcine semen. *Theriogenology*: Pág 70:1317–1323.
- ALVAREZ, J; TOUCHS, J; BLASCO, I; STOREY, B. (1987). Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. *J Androl*; Pág 8:338-348.
- ANANE. R & CREPPY. E. (2001). Lipid peroxidation as pathway of aluminum cytotoxicity in human skin fibroblast cultures: prevention by superoxide dismutase + catalase and vitamin E and C. *Hum. Exp. Toxicol*, Pág 477–481.
- ANDRABI, S; SIDDIQUE, M; ULLAH, N; & KHAN, L. (2006). Effect of reducing sperm number per insemination dose on fertility of cryopreserved buffalo bull semen. *Pakistan Veterinary Journal*.
- ANGELINO J. (2009). Manual de evaluación de semen en bovinos. Veracruz - México.
- ARCE, J; & BALDERAS, A. (2015). Vitaminas. En *Nutrición animal*. Shimada, animal. México. 3ª Edición. Editorial Trillas.
- ARIETA R. (2014). Métodos de extracción de semen bovino. México: Revista electrónica de Veterinaria.

- ASADPOUR, R; JAFARI, R; & NASRABADI, H. (2011). Influence of added vitamin C and vita-min E on frozen-thawed bovine sperm cryopreserved in citrate and tris-based extenders. *Vet. Res. Forum*. Pág 37–44.
- BARAKAT, B; MOHAMED, A; DANFOUR; FATMA A; AND MOHAMED, A. (2015). Effect of Various Concentrations of Caffeine, Pentoxifylline, and Kallikrein on Hyperactivation of Frozen Bovine Semen. *BioMed Research International*, Egipto. Pág. 7.
- BATHGATE. R. (2011). Antioxidant mechanisms and their benefit on post-thaw boar sperm quality. En A. R. Domest.
- BECONI, M; FRANCIÀ, R; MORA, G; AFFRANCHINO, M. (1993). Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. *Theriogenology*, Pág 841–851.
- BELLABARBA. G. (2005). Estrés oxidativo y función espermática. *Rev. Venez. Endocrinol. Metab.* v.3 n.3 Mérida, Pág 7.
- BROWNE. S. (1999). Oxidative stress in Huntingtons disease. Pág 9:147-163.
- CAMBERO S. (2012). Manual de prácticas de laboratorio “Biometría Hemática”. Obtenido de www.plerus.ac.cr: <http://www.plerus.ac.cr/docs/manual-de-practic-as-biometrica-hermatica.pdf>
- CARBALLO. M. (2009). Comparación de dos diluyentes comerciales para criopreservar semen de bovino bajo condiciones de campo en el trópico húmedo.
- CARPIO V. (2015). evaluación de dos diluyentes para la criopreservacion de semen bovino: yema de huevo vs leche descremada. Pág 83.
- CASTELO. T. (2008). Considerações sobre a criopreservação do sêmen. *Acta veterinaria*, Pág 67-75.
- CONTRI. A. (2010). Effect of semen preparation on casa motility results in cryopreserved bull spermatozoa. *Theriogenology*.
- CÓRDOVA. I. (2009). Estrés oxidativo y antioxidantes en la conservación espermática. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, Pág 38.

- CUBERO M. (2012). blogspot.com. Obtenido de ¿Que es el sistema CASA?: <http://invitrosperm.blogspot.com/2012/01/que-es-el-sistema-casa.html>
- DÍAZ, C; & VALENCIA, J. (2008). Inseminación artificial. En Reproducción de Animales Domésticos. México: Limusa.
- DURAN. R. (2006). Manual de la explotación y reproducción en porcino. Colombia. Grupo Latino Ltda. Pág 218-229:
- EDDY E. (2006). The Spermatozoon. En Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Academic Press, St Louis, Mo. Pág. 3-54.
- ESCOBAR C. (2011). Técnicas de congelación y sexado del semen bovino y su importancia en reproducción. <http://www.docentes.unal.edu.co/cjimeneze/docs/8209.pdf>.
- FERNANDEZ. F. (2013). Evaluación de dos diluyentes para la conservación de semen ovino yema de huevo vs lecitina de soya.
- FISONE, G; BORGKVIST, A; & USIELLO, A. (2004). Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action.
- FRACZEK, M; & KURPISZ, M. (2005). The redox system in human semen and peroxidative damage of spermatozoa. Postepy Hig Med Dosw, Pág 59:523-34.
- FUNAHASHI, H; & NAGAI, T. (2001). Regulation of in vitro penetration of frozen-thawed boar spermatozoa by caffeine and adenosine. Molecular Reproduction and Development, vol. 58, no. 4, Pág 424–431
- GARCIA. L. (2016). Comparación de la motilidad posdescongelacion de semen de bovino criopreservado en triladyl y optidyl fresco y congelado. Veracruz - méxico.
- GARNER, D; Y HAFEZ, E. (1996). Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. Interamericana.
- GIMENO M. (2014). Morfología espermática y parámetros seminales básicos en varones normo y oligoastenoteratozoospermicos. Obtenido

de<https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/46241/TFG%20Isabel%20Gimeno.pdf?sequence=1>

- GONZALES, J; MARTINEZ, Y; & SANCHEZ, D. (2013). Analisis seminal de Bovinos y Equinos. Análisis Básico. Obtenido de <http://invitrosperm.blogspot.mx/2013/01/analisis-seminal-equino-y-bovino.html>
- GUTTERIDGE, J; & HALLIWELL, B. (2010). Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Pág 393:561–564.
- HAFEZ, B. (2000). *Espermatogénesis, Reproducción e inseminación en animales.* USA: Mc Graw Hill.
- HERNÁNDEZ, J; y ORTEGA, A. (2009). *Manual de inseminación artificial en bovinos.* México.
- HIDALGO C. (2007). *Análisis del semen bovino.* México.
- HIDALGO, C; TAMARGO, C; y MONFORTE, C. (2005). Analisis de semen Bovino. Obtenido de www.serida.org: <http://www.serida.org/publicacionesdetalle.php?id=01495>
- HOLT W. (2000). Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, Pág 53: 47-58.
- HONG, HU; WAN-QIANG, TIANB; XIAN-LIN, ZHAOC; LIN-SEN, ZANA; & HUI, WANGA. (2010). The cryoprotective effects of ascorbic acid supplementation on bovine semen quality. *Animal Reproduction Science*, Pág 72 - 77.
- JEYENDRAN R. (1984). Development on an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to the other semen characteristics. *En J. R. Fertility.*
- KESSOPOULOU, E; TOMLINSON, M; BARRATT, C; BOLTON, A; Y COOKE, I. (1992). Origin of reactive oxygen species in human semen: spermatozoa or leucocytes? *J. Reprod. Fert.* Pág 94:463–70.

- KNIGHT, J; BLAYLOCK, R; & SEARLES, A. (1993). The effect of vitamins C and E on lipid peroxidation in stored erythrocytes. *Ann. Clin. Lab. Sci.* Pág 23.
- KNOBIL E. (2003). *Spermatogenesis, Overview (Vol. 4)*. San Diego California: Encyclopedia of reproduction.
- KUBUSCAN. (2015). *kubuscan.com*. Obtenido de *kubuscan.com*: <http://www.kubuscan.com/publicaciones/sistema-casa-para-evaluacion-objetiva-de-la-motilidad-seminal/>
- LANGLAIS. J. (1998). Identification of sterol acceptors that stimulate cholesterol efflux from human spermatozoa during in vitro capacitation. *Gamet*.
- LAVRANOS, G; BALLA, M; A. TZORTZOPOULOU, V; Y ANGELOPOULOU, R. (2012). Investigating ROS sources in male infertility: A common end for numerous pathways.
- LLANCARI, A; & MATOS, A. (2011). Valoración de los nutrientes y antioxidantes en la salud humana e industria alimentaria. En U. P. Unión., Congreso Nacional de Investigación. Perú.
- MARTÍN. H. (2013). "Fisiología celular y calidad seminal durante la conservación del semen porcino refrigerado" Tesis de Doctorado. En Departamento de Medicina Animal. Cáceres - España.
- MEDINA R. (2007). Crioconservación de semen bovino usando un congelador programable (CL-8800) y determinación de su calidad postdescongelación por medio un sistema de análisis espermático asistido por computador (CASA). *ORINOQUIA*, Pág 13.
- MEDINA, R; & HICKS, J. (2001). Radicales libres de oxígeno: Bioquímica inorgánica y biomedicina. En *Bioquímica*. Mexico: 1 Edición. Editorial McGraw-Hill.
- MEISTER, A; & ANDERSSON, M. (1983). Glutathione. Pág 52, 711.
- MOLINA. E. (2006). *Evaluación Reproductiva del macho*. Perú: <http://www.tarwi.lamolina.edu.pe>.

- MORAGUES B. (2013). beatrizmoragues.blogspot.mx. Obtenido de Para qué sirve la l-cisteína: propiedades y alimentos que la contienen: <http://beatrizmoragues.blogspot.mx/2013/07/para-que-sirve-la-l-cisteina.html>
- MORILLO, M; SALAZAR, S; y CASTILLO, E. (2012). Evaluación del potencial reproductivo del macho bovino. Maracay: Centro Nacional de Investigaciones Agrícolas.
- MORRELL, J; y WALLGREN, M. (2014). Alternatives to antibiotics in semen extenders: Pathogens. Pág 3:934–946.
- MUHAMMAD, S; BUSHRA, A; SHAMIM, A. (2010). Effect of L-cysteine in extender on post-thaw quality of Sahiwal bull semen. BioMed Research International, Pág 7.
- MUHAMMAD. S (2010). Effect of L-cysteine in extender on post-thaw quality of Sahiwal bull semen. Pakistan: Animal Science Papers and Report.
- MUIÑO O. (2008). Evaluación de la motilidad y viabilidad del semen Bovino mediante el uso de sistemas casa y citometría de flujo: Identificación de subpoblaciones espermáticas.
- MUIÑO R. (2005). Nuevas tecnologías aplicadas al proceso y evaluación del semen bovino en centros de inseminación artificial. Pág 191.
- MUÑOZ O. (2002). Predicción del potencial fértil del semen bovino mediante pruebas in vitro de la capacidad funcional espermática. Maracaibo - Venezuela: Astro Data S.A.
- NAVARRO C. (s.f). Gametogénesis I. Espermatogenesis. Obtenido de mural.uv.es: <http://mural.uv.es/monavi/disco/primerobiologia/Tema28.pdf>
- NÚÑEZ A. (2011). Terapia antioxidante, estrés oxidativo y productos antioxidantes: retos y oportunidades. Rev Cubana Salud pública, 37 (suppl.) Pág 644-60.
- OLEGARIO, C; TAMARGO, C; y DIEZ, C. (2012). Análisis de semen bovino. Obtenido de <http://invitrosperm.blogspot.mx/2013/01/analisis-seminal-equino-y-bovino.html>

- PARK, C; OHGODA, O; and NIWA, K. (1989). "Penetration of bovine follicular oocytes by frozen-thawed spermatozoa in the presence of caffeine and heparin,". *Journal of Reproduction and Fertility*, vol. 86, no. 2 Pág 577–582.
- PEZZONE, N. (2008). Técnicas de extracción de semen en animales domésticos. <http://www.latinpedia.net/Ciencia/animal/Tecnicas-de-extraccion-de-semen-en-animales-domesticos-ad462.htm>.
- RANGEL, E. (2007). Evaluación de la salud de sementales bovinos. En UNAM. México.
- RIVERA, M. (2011). Manual de reproducción Bovina. Obtenido de reproduccionbovina-mgrg.blogspot.mx: http://reproduccionbovina-mgrg.blogspot.mx/p/fecundacion_5.html
- RIVERA, M. (2013). [blogspot.com](http://manualbiotecnologiareproductiva.blogspot.com/p/evaluacion-reproductiva-del-hato.html). Obtenido de Manual Biotecnología Reproductiva en Bovinos: <http://manualbiotecnologiareproductiva.blogspot.com/p/evaluacion-reproductiva-del-hato.html>
- RODRIGO, A. (2016). Prueba de vitalidad: espermatozoides inmóviles vivos o muertos. Obtenido de [/www.reproduccionasistida.org](http://www.reproduccionasistida.org): <http://www.reproduccionasistida.org/analisis-de-la-vitalidad-de-los-espermatozoides/>
- SALEH, R; & AGARWAL, A. (2002). Oxidative Stress and Male Infertility: From Research Bench to Clinical Practice. Pág 23:737-752.
- SALGADO, S. (2016). [reproduccionasistida.org](https://www.reproduccionasistida.org/analisis-de-la-morfologia-de-los-espermatozoides/). Obtenido de Morfología del esperma: espermatozoides normales y anormales: <https://www.reproduccionasistida.org/analisis-de-la-morfologia-de-los-espermatozoides/>
- SANOCKA, D; JEDRZEJCZAK, P; SZUMALA-KAKOL, A; FRACZEK, M; & KURPISZ, M. (2003). Male genital tract inflammation: the role of selected interleukins in regulation of pro-oxidant and antioxidant enzymatic substances in seminal plasma.

- SENGER, P. (2015). Path way to pregnancy and parturition. Washington State University.
- SHEWEITA, S; TILMISANY, A; & SAWAF, H. (2005). Mechanisms of male infertility: role of antioxidants. . *Curr Drug Metab* .
- SIERENS, J; HARTLEY, J; CAPPBELL, M; LEATHEM, J; & WOODSIDE, V. (2001). Effect of phytoestrogen and antioxidant supplementation on oxidative DNA damage assessed using the comet assay. *J. Agric. Food Chem*, Pág 308–314.
- VALENZUELA, C. (2009). Manual de Evaluación de Semen en Bovinos. <http://cdigital.uv.mx/bitstream/12345678/147/1/JOSe%20NICOLaS%20ANGELINO%20OLIVERA.pdf>.
- VALLORANI, C; SPINACI, M; BUCCI, D; TAMANINI, C; y GALEATI, G. (2010). Effects of antioxidants on boar spermatozoa during sorting and storage. *Anim. Reprod. Sci*, Pág 58-65.
- VERA. O. (2008). Desarrollo Sostenible de Ganadería Doble Propósito. Fisiología de los espermatozoides bovinos. pdf.
- ZALATA, A; AHMED, A; ALLAMANENI, S; COMHAIRE, F; & AGARWAL, A. (2004). Relationship between acrosin activity of human spermatozoa and oxidative stress. Pág 313-318.
- ZAMORA. J. (2007). Antioxidantes: micronutrientes en lucha por la salud. *Rev Chil Nutr*. Pág 17-26.
- ZHAO X. (2014). Protective effects of ascorbic acid and vitamin E on antioxidant enzyme activity of freeze-thawed semen of Qinchuan Bulls. China. Pág. 10.

ANEXOS

Anexo 1. Preparación de soluciones antioxidantes.



Anexo 2. Extracción de semen.



Anexo 3. Preparación del semen más antioxidante.



Anexo 4. Reducción de temperatura seminal.



Anexo 5. Rotulación de pajillas.



Anexo 6. Empajillado.



Anexo 7. Almacenamiento de pajillas en nitrógeno líquido.



Anexo 8. Análisis seminal en sistema (CASA).



Anexo 9. Análisis de Varianza (ADEVA) Viabilidad (%).

F. Var	gl	S. Cuad	C. Medio	Fisher	P. Fisher	
Total	23	1173.05				
Tratamientos	3	97.98	32.66	2.48	0.10	1.48233338
Repetición	5	877.31	175.46	13.31	0.00	
Error	15	197.76	13.18			
CV %			6.63			
Media			54.74			

Anexo 10. Separación de medias según Tukey ($P < 0.05$) Viabilidad (%).

Tratamientos	Media	Grupo
T0	58.03	a
T1	52.56	a
T2	54.47	a
T3	53.92	a

Anexo 11. Análisis de Varianza (ADEVA) Integridad de Membrana Plasmática (%).

F. Var	gl	S. Cuad	C. Medio	Fisher	P. Fisher	
Total	23	1186.95				
Tratamientos	3	62.03	20.68	1.01	0.41	1.84340597
Repetición	5	819.08	163.82	8.03	0.00	
Error	15	305.83	20.39			
CV %			10.16			
Media			44.44			

Anexo 12. Separación de medias según Tukey ($P < 0.05$) Integridad de Membrana Plasmática (%).

Tratamientos	Media	Grupo
T0	44.81	a
T1	46.86	a
T2	42.56	a
T3	43.55	a

Anexo 13. Análisis de Varianza (ADEVA) Velocidad Rectilínea (um/s).

F. Var	gl	S. Cuad	C. Medio	Fisher	P. Fisher	
Total	23	1009.89				
Tratamientos	3	151.95	50.65	2.57	0.09	1.81381172
Repetición	5	561.84	112.37	5.69	0.00	
Error	15	296.09	19.74			
CV %			5.17			
Media			86.00			

Anexo 14. Separación de medias según Tukey (P < 0.05) Velocidad Rectilínea (um/s).

Tratamientos	Media	Grupo
T0	85.97	a
T1	85.53	a
T2	89.79	a
T3	82.72	a

Anexo 15. Análisis de Varianza (ADEVA) Velocidad Curvilínea (um/s).

F. Var	gl	S. Cuad	C. Medio	Fisher	P. Fisher	
Total	23	4504.56				
Tratamientos	3	586.60	195.53	1.63	0.22	4.47300358
Repetición	5	2117.26	423.45	3.53	0.03	
Error	15	1800.70	120.05			
CV %			7.28			
Media			150.51			

Anexo 16. Separación de medias según Tukey ($P < 0.05$) Velocidad Curcilínea (um/seg).

Tratamientos	Media	Grupo
T0	148.97	a
T1	152.02	a
T2	157.34	a
T3	143.70	a

Anexo 17. Análisis de Varianza (ADEVA) Velocidad Media (um/s)

F. Var	gl	S. Cuad	C. Medio	Fisher	P. Fisher	
Total	23	1189.20				
Tratamientos	3	145.79	48.60	2.19	0.13	1.92109592
Repetición	5	711.25	142.25	6.42	0.00	
Error	15	332.15	22.14			
CV %			4.98			
Media			94.41			

Anexo 18. Separación de medias según Tukey ($P < 0.05$) Velocidad Media (um/s).

Tratamientos	Media	Grupo
T0	94.28	a
T1	94.46	a
T2	97.93	a
T3	90.96	a

Anexo 19. Análisis de Varianza (ADEVA) Amplitud De Desplazamiento Lateral De Cabeza (um).

F. Var	gl	S. Cuad	C. Medio	Fisher	P. Fisher	
Total	23	15.21				
Tratamientos	3	0.16	0.05	0.10	0.96	0.29669358
Repetición	5	7.13	1.43	2.70	0.06	
Error	15	7.92	0.53			
CV %			10.63			
Media			6.84			

Anexo 20. Separación de medias según Tukey ($P < 0.05$) Amplitud De Desplazamiento Lateral De Cabeza (um).

Tratamientos	Media	Grupo
T0	6.88	a
T1	6.79	a
T2	6.94	a
T3	6.73	a

Anexo 21. Análisis de Varianza (ADEVA) Motilidad Progresiva (%).

F. Var	gl	S. Cuad	C. Medio	Fisher	P. Fisher	
Total	23	1534.57				
Tratamientos	3	103.16	34.39	1.39	0.28	2.02826554
Repetición	5	1061.16	212.23	8.60	0.00	
Error	15	370.25	24.68			
CV %			29.11			
Media			17.07			

Anexo 22. Separación de medias según Tukey ($P < 0.05$) Motilidad Progresiva (%).

Tratamientos	Media	Grupo
T0	19.03	a
T1	17.58	a
T2	13.59	a
T3	18.06	a

Anexo 23. Análisis de Varianza (ADEVA) Reacción Acrosomal (%).

F. Var	gl	S. Cuad	C. Medio	Fisher	P. Fisher	
Total	23	45.93				
Tratamientos	3	0.63	0.21	0.12	0.95	0.53844006
Repetición	5	19.20	3.84	2.21	0.11	
Error	15	26.09	1.74			
CV %			1.36			
Media			96.72			

Anexo 24. Separación de medias según Tukey ($P < 0.05$) Reacción Acrosomal (%).

Tratamientos	Media	Grupo
T0	96.94	a
T1	96.78	a
T2	96.67	a
T3	96.50	a

Anexo 25. Análisis seminal previo a selección.

ID Animal 301 IDELMAR
 Raza Angus negro
 Fecha y hora del análisis 04/11/2016 10:11:20
 Propietario
 Técnico de colección Noel Palma
 Técnico de laboratorio Normando Hernandez

**Centro
 de Biotecnología**
 Carretera Cuahutémoc Km 35.5
Análisis de Fertilidad



Motilidad

	Conteo	Muestra M	Concentración M/ml	Porcentaje total
Total	511	1917	255.56	100
Estáticos	57	214	28.51	11.2
Progresivos	229	859	114.53	44.8
Móviles	454	1703	227.05	88.8
Lentos	42	158	21.00	8.2

Morfología

	Conteo	Muestra M	Concentración M/ml	Porcentaje total
Colas dobladas	28	105	14.00	5.5
Colas enroscadas	2	8	1.00	0.4
DMR	4	15	2.00	0.8
Gota distal	5	19	2.50	1.0
Gota proximal	2	8	1.00	0.4
Fracción normal			92.6	%

Dosis

Volumen del eyaculado (ml)	7.5	Muestra seleccionada	Total
Muestra:Diluyente:	8	% Colas dobladas	5.5
Espermatozoides por dosis (M) :	20	% Colas enroscadas	0.4
Volumen de dosis (ml) :	0.55	% DMR	0.8
Volumen utilizable (ml)	0.5	% Proximal	0.4
Volumen de diluyente (ml) :	36.85	% Distal:	1
Número de dosis:	80	Concentración ajustada:	43.21

Anexo 26. Datos reportados por sistema CASA, análisis de motilidad.

64 - Aceptable

Parámetros Ayuda

Información Notas Campos de datos Resultados

Resultados

Summary

Class	Recuento	Muestra (M)	Concentración (M/ml)	%
Total	644	21.05	21.05	100
Estático	367	12.00	12.00	57
Móvil	277	9.05	9.05	43
Progresivo	82	2.68	2.68	12.7
Lento	144	4.71	4.71	22.4

Kinematics

Medir	Promedio	Unidades	SD	Medio
Móvil				
DAP	13.27	µm	10.68	9.95
DSL	10.22	µm	9.21	6.54
DCL	23.99	µm	19.99	18.23
VAP	46.71	µm/seg	34.1	42.85
VSL	36.55	µm/seg	30.1	27.64
VCL	80.87	µm/seg	57.19	74.83
STR	77.61	%	21.61	83.27
LIN	47.7	%	19.56	47.2
ALH	4.52	µm	3.38	4.02
BCF	21.59	Hz	9.96	21.76
WOB	59.73	%	14.03	58.47
Progresivo				
DAP	19.73	µm	11.84	16.98
DSL	17.84	µm	10.45	15.43
DCL	33.4	µm	22.72	27.28
VAP	77.91	µm/seg	20.41	75.09
VSL	71.6	µm/seg	19.62	68.61
VCL	126.1	µm/seg	38.53	120.2
STR	92.16	%	9.96	91.47
LIN	59.02	%	12.74	56.93
ALH	6.41	µm	2.78	6.43
BCF	17.52	Hz	7.15	18.41
WOB	64.16	%	12.58	61.99
Lento				
DAP	7.4	µm	5.19	5.51
DSL	4.41	µm	2.55	3.71
DCL	14.73	µm	11.66	10.65
VAP	20.37	µm/seg	16.35	13.5
VSL	11.56	µm/seg	7.05	8.63
VCL	40.37	µm/seg	35.89	27.13
STR	70.12	%	24.63	73.56
LIN	42.6	%	22.53	39.58
ALH	2.72	µm	2.71	1.58
BCF	24.62	Hz	10.51	23.72

Zeiss 10x NH CEROS-II CX-41 · X:1.31 Y:1.31 Cámara capilar 20µm