



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO

MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y GESTIÓN LOCAL

**“EVALUACIÓN DE ESPERMATOZOIDES CRIOPRESERVADOS
DE OVINOS DE PELO EN CONDICIONES DE TRÓPICO DE
GUERRERO EN EL LAPROSEM-UAGro”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y GESTIÓN LOCAL**

P R E S E N T A:

MVZ. JULIO CESAR GÓMEZ VARGAS

D I R E C T O R E S:

**DR. ELEUTERIO CAMPOS HERNÁNDEZ
DR. EFRÉN ESTRADA PAQUI**

A S E S O R E S:

**DRA. CLAUDIA LETICIA MORALES EVANGELISTA
DR. ELÍAS HERNÁNDEZ CASTRO
MC. ROSENDO CUICAS HUERTA
MC. ROXANA REYES RÍOS**

IGUALA DE LA INDEPENDENCIA, GRO., NOVIEMBRE DE 2019

La presente tesis titulada **“EVALUACIÓN DE ESPERMATOZOIDES CRIOPRESERVADOS DE OVINOS DE PELO EN CONDICIONES DE TRÓPICO DE GUERRERO EN EL LAPROSEM–UAGro”** realizada por el alumno **JULIO CESAR GÓMEZ VARGAS**, ha sido leída y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y GESTIÓN LOCAL.

COMITÉ TUTORAL

N O M B R E

F I R M A

Dr. Eleuterio Campos Hernández

Dr. Efrén Estrada Paqui

Dra. Claudia Leticia Morales Evangelista

Dr. Elías Hernández Castro

MC. Rosendo Cuicas Huerta

MC. Roxana Reyes Ríos

DEDICATORIA

A Dios:

Por darme la vida y poder disfrutar de una excelente familia, por la oportunidad de terminar un posgrado para abrirme paso por la vida; por darme salud, fortaleza y paciencia para continuar.

A mi esposa:

Luz del Carmen

Por el apoyo brindado durante mi formación profesional, la paciencia, los desvelos, el amor y cariño. Gracias por ser el impulso que me ayudó a seguir adelante y poder culminar esta etapa. Te AMO!!!

A mi hijo:

Julio César

Porque fuiste mi inspiración y mi alegría, hiciste sentir que este proceso fuera más ameno. Aunque aún no puedas leer esto, muchas gracias por desvelarte con nosotros en noches de tarea. Gracias por ayudarme con la computadora a la hora de escribir parte de este documento. Te AMO!!!

A mis padres:

Lucio y Yolanda

Por su apoyo, ejemplo y consejos para no perder la esperanza. Este logro también es ustedes, gracias.

A mis hermanos:

Mayra Lucia, José Guadalupe, Lucio de Jesús

A pesar de que tengamos nuestras discusiones y malos encuentros, y de que tal vez seamos polos opuestos en ciertas cuestiones, han sido una de las personas que me inspiraron. Espero ser un buen ejemplo de superación.

A mis abuelitos:

Bertoldo Gómez (†), Amada Serrato, Juvenal Vargas (†) y Martina Suazo.

Por sus siempre puntuales consejos que me ayudaron a salir adelante y culminar mis metas. ¡¡¡Muchas gracias!!!

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Guerrero por la oportunidad de realizar mis estudios de Maestría.

De manera especial al comité tutorial por sus acertadas observaciones y opiniones:

Al *Dr. Efrén Estrada Paqui*, porque durante este complicado proceso ha sabido guiarme y apoyarme, además de brindarme su amistad. El resultado de esta etapa ha sido mejor de lo que esperaba y gran parte de ello es gracias a Usted.

Al *Dr. Eleuterio Campos Hernández*, por el apoyo y enseñanzas durante este largo proceso. Muchas gracias por su amistad.

A la *Dra. Claudia Leticia Morales Evangelista*, por el apoyo brindado durante este proceso. Por el tiempo dedicado durante mi estancia en el laboratorio de Genética y Reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Al *MC. Rosendo Cuicas Huerta*, por apoyarme y brindarme las facilidades para que pudiera cursar esta maestría, por su amistad y por creer en mí.

Al *Dr. Elías Hernández Castro* y la *MC. Roxana Reyes Ríos* por la revisión y sugerencias para mejorar este documento.

Al *Dr. Raúl Ulloa Arvizu* de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México por el apoyo en el análisis de datos del presente trabajo.

Al *Centro Nacional de Recursos Genéticos* del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias por abrirme las puertas del Laboratorio Acuático - Pecuario y poder realizar las evaluaciones del semen.

A la *Unidad Productiva Ovina* de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Guerrero, quien a través del Dr. Esteban J. Mireles Martínez brindaron las facilidades necesarias para trabajar con los ovinos MEVEZUG.

ÍNDICE

ÍNDICE DE CUADROS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	v
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. Situación de la ovinocultura	3
2.2. Sistemas extensivos	5
2.3. Sistema semi-intensivo	6
2.4. Sistema intensivo.....	6
2.5. Anatomía del aparato reproductor del ovino.....	7
2.5.1. Testículos.....	8
2.5.2. Conductos sexuales	8
2.5.3. Glándulas sexuales accesorias	9
2.5.4. Pene	10
2.5.5. Fisiología de la producción espermática.....	10
2.5.6. Factores sobre la producción y calidad espermática	12
2.5.7. Eyaculación	13
2.6. Análisis seminal	13
2.6.1. Evaluación de la motilidad espermática	14
2.6.2. Evaluación de la viabilidad e integridad de la membrana plasmática	15
2.6.3. Evaluación de la morfología espermática.....	16
2.6.4. Evaluación de la concentración espermática	17
2.7. Análisis computarizado.....	18
2.8. Criopreservación de semen ovino	19
2.9. Shock por frío y daño celular.....	20
2.10. Agentes crioprotectores.....	21
2.10.1. Yema de huevo.....	21
2.10.2. Lecitina de soya	21
2.10.3. Glicerol.....	22
2.10.4. Azúcares	22
2.11. Buenos y malos congeladores	22
2.12. Subpoblaciones espermáticas	23
2.13. Normatividad de laboratorios en México	24

2.13.1. Normatividad de laboratorios de procesamiento de semen	25
III. PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA	29
IV. OBJETIVOS.....	30
4.1. General	30
4.2. Específicos.....	30
V. MATERIAL Y MÉTODOS.....	31
5.1. Localización	31
5.2. Animales experimentales	31
5.3 Colección de semen.....	31
5.4. Evaluación de semen.....	32
5.4.1. Volumen	32
5.4.2. Motilidad.....	32
5.4.3. Viabilidad	33
5.4.4. Concentración	33
5.5. Protocolo de criopreservación	34
5.6. Evaluación de la motilidad a la descongelación	34
5.7. Evaluación de la viabilidad a la descongelación.....	35
5.8. Análisis estadístico.....	35
5.9. Normatividad aplicable a laboratorios de procesamiento de semen de animales domésticos.....	36
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
6.1. Evaluación de espermatozoides de ovino criopreservados	37
6.2. Gestión de acreditación de laboratorio de procesamiento de semen.....	43
VII. CONCLUSIONES	45
VIII. APORTACIONES	46
IX. BIBLIOGRAFÍA	47
X. ANEXOS	57

ÍNDICE DE CUADROS

Nombre	Número de página
Cuadro 1. Población de ovinos en los municipios de la Tierra Caliente de Guerrero del 2000 al 2007.	4
Cuadro 2. Características del eyaculado de ovino (Media \pm DE).	14
Cuadro 3. Relación de la motilidad masal y progresiva de los espermatozoides en ovinos.	15
Cuadro 4. Estimadores cinéticos de motilidad individual espermática utilizados en lo sistema asistidos por computadora CASA	19
Cuadro 5. Valores seminales de referencia de eyaculados ovinos de pelo en condiciones del trópico subhúmedo (n=28).	32
Cuadro 6. Motilidad y viabilidad de acuerdo a la categoría de congelabilidad del semen ovino a la descongelación (n=11)	39
Cuadro 7. Estimadores cinéticos de motilidad individual del espermatozoide ovino de acuerdo a la categorización a la descongelación (n=11).	41
Cuadro 8. Análisis de componentes principales (ACP) de variables espermáticas de cinética de motilidad y viabilidad del espermatozoide ovino de pelo (n=11).	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Nombre	Número de página
Figura 1. Esquema de aparato reproductor del macho ovino.	7
Figura 2. Colección de semen de ovino con vagina artificial.	31
Figura 3. Espermatozoides teñidos con eosina-nigrosina. A: Esp. vivo; B: Esp. Muerto.	33
Figura 4. Evaluación de viabilidad espermática. A: Espermatozoide vivo; B: Espermatozoide muerto.	35
Figura 5. Distribución porcentual de motilidad y viabilidad de acuerdo a cada ovino de pelo en condiciones de trópico de Guerrero (Media \pm EE, n=11).	37
Figura 6. Dendrograma de clasificación de congelabilidad de eyaculados de 11 machos ovinos de pelo de acuerdo a la motilidad y viabilidad a la descongelación.	38
Figura 7. Análisis de componentes principales (ACP) utilizando selección de las variables de viabilidad y motilidad total y patrones cinéticos individuales del espermatozoide ovino a la descongelación (n=11).	42

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue categorizar la congelabilidad de los eyaculados de carneros (Pelibuey-Blackbelly) mediante la evaluación de los parámetros de calidad seminal (motilidad progresiva, viabilidad) y cinemática de espermatozoides individuales. Fueron evaluados 28 eyaculados de once carneros, recolectados por vagina artificial. El semen se diluyó en medio comercial (TRILADYL™) y luego se envasó en pajuelas de 0,5 ml a una concentración de 200×10^6 espermatozoides viables. Antes de la congelación, se evaluó el semen para seleccionar eyaculados con valores más altos reportados para la especie. El semen se enfrió durante 120 minutos hasta alcanzar 5 °C, y se expuso a vapores de nitrógeno líquido (LN₂) durante 10 minutos, después se sumergió en LN₂ a -196 °C. La categorización se realizó mediante un análisis de agrupamiento jerárquico de la distancia entre las medias de las variables de motilidad total y viabilidad en la descongelación. La viabilidad de los espermatozoides se analizó con el kit FluoVit™. La motilidad total y el movimiento cinemático espermático fueron evaluados por CASA (Sperm Class Analyzer-SCA). Se obtuvo un dendrograma de disimilitud con dos categorías de crioconservación: carneros buenos congeladores (CBC) y carneros malos congeladores (CMC), se observaron mejores parámetros en el CBC ($P < 0.05$) en los porcentajes de viabilidad (53.3 ± 3.1 vs 35.7 ± 1.9) y motilidad total (60.6 ± 2.8 vs 39.9 ± 1.7) y también en patrones cinemáticos ($\mu\text{m/s}$) de motilidad espermática (VSL, 66.3 ± 8.6 vs 41.9 ± 5.2 , VCL 27.6 ± 5.3 vs 14.1 ± 3.3 y VAP 38.1 ± 6.0 vs 21.4 ± 3.7). Este trabajo enfatiza la importancia de realizar la categorización de la congelabilidad del semen, así como información sobre patrones cinemáticos del movimiento de espermatozoides de carneros en condiciones de trópico.

Palabras clave: carnero, congelación, espermatozoides, CASA.

ABSTRACT

The objective of this work was to categorize the freezability of ram's ejaculates (Pelibuey-Blackbelly) by evaluating the parameters of seminal quality (progressive motility, viability) and individual sperm kinematics. We evaluated 28 ejaculates of eleven rams collected by artificial vagina. The semen was diluted in commercial medium (TRILADYL™) and then packed in 0.5 ml straws at a concentration of 200×10^6 viable sperm. Prior to freezing, the semen was evaluated to select ejaculates with values higher than those reported for rams did. The semen was cooled for 120 min until reaching 5 °C, and exposed to vapors of liquid nitrogen (LN₂) for 10 min and submerged LN₂ at -196 °C. The categorization was carried through hierarchical clustering analysis of the distance between the means of the variables of total motility and viability at thawing. The sperm viability was analyzed with the kit FluoVit™. Total motility and spermatoc kinematic movement were evaluated by CASA (Sperm Class Analyzer-SCA). A dissimilarity dendrogram was obtained with two categories of cryopreservation: good freezability rams (GFR) and bad freezability rams (BFR), better parameters were observed in the GFR ($P < 0.05$) in the viability percentages (53.3 ± 3.1 vs 35.7 ± 1.9) and total motility (60.6 ± 2.8 vs 39.9 ± 1.7) and also in kinematic patterns ($\mu\text{m/s}$) of sperm motility (VSL, 66.3 ± 8.6 vs 41.9 ± 5.2 , VCL 27.6 ± 5.3 vs 14.1 ± 3.3 and VAP 38.1 ± 6.0 vs 21.4 ± 3.7). This work emphasizes the importance of performing the categorization of semen freezability, as well as information on kinematic patterns of sperm movement of rams in tropical conditions.

Keywords: Ram, freezability, sperm, CASA.

I. INTRODUCCIÓN

La producción de ovinos en México se encuentra mayormente distribuida en manos de pequeños productores, por lo cual el uso de la tecnología reproductiva es reducido, a pesar de que hoy en día se implementan cada vez más, técnicas que permiten producir cambios significativos en la producción, mediante la investigación se generan conocimientos que son la base para diseñar técnicas que puedan aplicarse en beneficio de la producción de ovinos.

Actualmente existen ciertas técnicas que nos pueden ayudar a incrementar la eficiencia reproductiva, obteniendo así mayores beneficios económicos de las explotaciones ovinas entre las que se hayan la criopreservación de semen y la inseminación artificial (IA) como biotecnologías que pueden ser aplicables en todos los sistemas de producción (Ruiz *et al.*, 2015).

La criopreservación del semen es esencial para la reproducción asistida, que permite la preservación del material genético por un periodo indefinido (Essawe *et al.*, 2018a). Durante los últimos 50 años, se han desarrollado y perfeccionado numerosas técnicas con el objetivo de conseguir nacimientos mediante la aplicación de dosis seminales congeladas/descongeladas (Watson, 1979), obteniendo así grandes avances en la criopreservación de semen de toro, mientras que, en otras especies, como la ovina, los resultados de fertilidad han sido muy variables e inconsistentes. Estos resultados pueden deberse a varios factores. Uno de ellos es el daño que sufren los espermatozoides por el proceso de congelación-descongelación denominado shock térmico, se sabe que provoca alteraciones morfológicas en la membrana plasmática, acrosomal y mitocondrial, incluso puede llegar a provocar una reacción acrosómica prematura, que acorta la vida del espermatozoide y por consecuencia reduce su fertilidad (Watson, 1995). Así en ovinos se han clasificado dos grupos, los espermatozoides que provienen de ovinos que son buenos congeladores (BC), que se caracterizan por una tasa de penetración del ovocito *in vitro* superior a la de los espermatozoides malos congeladores (MC) (O'Meara *et al.*, 2008), por lo anterior en este trabajo se

categoriza el potencial de congelación del semen de ovinos de pelo en base a la viabilidad y motilidad espermática.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Situación de la ovinocultura

La producción de ovinos en México se realiza en sistemas de producción muy variados, dependiendo de las condiciones del clima, disponibilidad de recursos y nivel socioeconómico de los productores (Vélez *et al.*, 2016). Estos sistemas van desde los altamente tecnificados que mantienen a los animales en completa estabulación sobre pisos elevados (intensivo), semi intensivo y extensivos (tradicionales) que mantienen los animales en condiciones pastoriles extensivas y sin uso de tecnología básica. Sin embargo, en México predominan los sistemas tradicionales, con bajos niveles productivos y tecnológicos (Orona *et al.*, 2014). Esta actividad es de gran interés socioeconómico ya que actúa como fuente generadora para los productores, proporciona proteína de elevada calidad y fija la población en las zonas normalmente deprimidas y con escasas alternativas laborales (Vélez *et al.*, 2016).

La población ovina mundial según reporte de la FAOSTAT (2015) en el año 2013 fue de 1,162,875,535 cabezas, de estas el 85,85% se localizan en los primeros 38 países con mayor población de ovinos en el mundo. La población de ganado ovino en México en el año de 1991 fue de 4,010,610 cabezas, en la región centro del país se ubicó el 34% del total (INEGI, 1995). Por su parte la SAGARPA en 2001 reporto que en 1995 la población ovina en México ascendió a 6,045,999 de cabezas, y de este inventario el 55% se localizó en la zona centro del país, el 23% en el norte, el 16% en el sureste y el 4% restante en otras regiones. Esta población detonó un crecimiento anual progresivo y en 2009 ascendió a un total de 7,306,600 animales (Mireles, 2015).

En México, el 80% del proceso productivo ovino, corresponde al sistema extensivo y se distribuye en todo el territorio nacional, la mayoría de los rebaños son pequeños y sus propietarios son campesinos cuya edad promedio es de 45 años, con escolaridad de 4.88 años. Donde se emplea la mano de obra familiar y los rebaños se manejan en áreas de vegetación nativa con tiempo de pastoreo de 6-7 horas.

Durante la temporada de lluvias los animales consumen gramíneas, arbustivas y herbáceas, mientras que en el periodo menos lluvioso pastorean en los rastrojos de los cultivos de granos (Martínez *et al.*, 2009).

La población ovina en el estado de Guerrero está compuesta por 106,824 animales que representa el 1.46% de la población total nacional, el cual lo coloca en el lugar 21 de las 32 entidades del país. De las siete regiones en que se divide el estado de Guerrero: Costa Grande, Costa Chica, Montaña, Centro, Zona Norte, Acapulco, y Tierra Caliente de acuerdo a SAGARPA (2006), en la región de la Tierra Caliente en el año 2000 existía una población 56,715 ovinos mientras que en el 2003 existió una disminución a 25,415. Sin embargo, según el INEGI (2009) en el 2007, la población fue de 35,927 animales y dicha cantidad significo un aumento poblacional de 41.36% y esta población represento el 33.63% en relación al total de ovinos del estado de Guerrero. Estos ovinos se encuentran distribuidos según el INEGI (2013) en el censo agropecuario realizado en el año 2007 en 291 unidades de producción pecuaria (Cuadro 1).

Cuadro 1. Población de ovinos en los municipios de la Tierra Caliente de Guerrero del 2000 al 2007.

Municipios	2000	2003	2007	UPP
Ajuchitlán del Progreso	22,090	11,624	6,731	51
San Miguel Totolapan	19,717	3,928	2,887	15
Arcelia	2,026	1,122	2,279	24
Tlapehuala	1,738	1,122	1,858	13
Coyuca de Catalán	2,920	2,182	6,332	37
Pungarabato	4,149	2,712	4,799	45
Cutzamala de Pinzón	1,662	1,097	8,046	80
Tlalchapa	980	732	1,430	15
Zirándaro	1,433	896	1,565	11
Total	56,715	25,415	35,927	291

Los sistemas de crianza de ovinos en el estado de Guerrero, se desarrolla en unidades de producción pecuaria (UPP's) con escaso uso de tecnología y por pequeños ganaderos en las siete regiones de la entidad (Mireles, 2015).

Los sistemas de producción de estas regiones se caracterizan por baja productividad y razas empleadas en su mayoría son ovinos de pelo. Desde el punto de vista comparativo con razas de lana, estas son pequeñas con una tasa de crecimiento lenta y mala conformación muscular, por lo tanto, se han cruzado para mejorar su crecimiento. Las razas de pelo como la Dorper y Katahdin muestran altas tasas de crecimiento y se han introducido en sistemas de cría con las razas Pelibuey y Blackbelly utilizadas en México (Canton *et al.*, 2009).

Estos sistemas de crianza, se practican principalmente en las regiones de la montaña de Guerrero y en las zonas tropicales del estado y se caracterizan por un periodo de 120 días de buena alimentación, lo que permite el crecimiento de los corderos para la venta, con probabilidad real de que las corderas se gesten nuevamente en esta estación, aunque se debe considerar la no estacionalidad reproductiva en esta especie.

Arteaga (2006) menciona que para mejorar la situación que guarda la ovinocultura en México se hace necesario actuar bajo estrategias que incluyan el mejoramiento genético del rebaño utilizando esquemas de cruzamiento dirigidos en transferencia de tecnología a los productores. Lo anterior puede apoyarse con técnicas como la inseminación artificial con semen congelado. Pues esta técnica permite utilizar diferentes sementales y la raza que mejor se adapte a las condiciones de la región.

2.2. Sistemas extensivos

Los sistemas extensivos tienen como característica principal que todos los animales se mantienen en un solo rebaño, no existe un control reproductivo definido, ya que el semental permanece en el rebaño durante todo el año (empadre continuo), los partos tienen márgenes muy amplios entre sí y ocurren durante todo el año (Mireles, 2015).

La alimentación se basa exclusivamente en pastoreo de forrajes nativos, los rebaños se encuentran en regiones marginadas con amplias áreas de pastoreo, generalmente de propiedad comunal, las cuales son aprovechadas por distintos sistemas de pastoreo de rumiantes. El aprovechamiento de pastizales nativos como fuente de forraje para el ganado no es una práctica exclusiva de México, en todo el mundo es común el uso de las mismas (Rivas *et al.*, 2014). El manejo sanitario consiste en las prácticas encaminadas a preservar la salud de un rebaño. Se realizan desparasitaciones cada seis meses, sin embargo, existen rebaños que no son desparasitados y generalmente solo se tratan animales enfermos (Pérez *et al.*, 2011).

2.3. Sistema semi-intensivo

En este sistema existe mayor control en la reproducción del rebaño, con estrategias de manejo reproductivo como épocas de empadre bien definidas, el macho se puede mantener separado del rebaño y solo ser utilizado en el empadre (Pérez *et al.*, 2011).

Los animales se mantienen en un solo rebaño, al igual que en el tipo extensivo, pastorean en praderas naturales entre las ocho y nueve de la mañana y regresan al corral de encierro entre las cuatro y seis de la tarde, la existencia de corrales es una característica de este sistema, así como la complementación con productos o subproductos agrícolas de la región. Las instalaciones para encierro nocturno o corrales, generalmente están construidas con materiales de la región, además de ser rústicas y carecer de un diseño bien definido (Valerio *et al.*, 2010). El manejo sanitario es similar al tipo extensivo con desparasitaciones periódicas y los animales son tratados solo cuando presentan signos clínicos de enfermedad (Pérez *et al.*, 2011).

2.4. Sistema intensivo

En el tipo intensivo existen variantes como el confinamiento total que es utilizado principalmente por productores de animales finalizados para abasto, por lo tanto,

los animales dependen de los alimentos proporcionados en el corral (Pérez *et al.*, 2011). En esta variante del sistema intensivo se observan estrategias de alimentación más tecnificadas como la estabulación en diferentes estados fisiológicos y la suplementación alimentaria de acuerdo a la finalidad productiva de cada animal; por ejemplo, pastoreo de reproductoras, estabulación de corderos suministrando complementación alimentaria de la venta (Valerio *et al.*, 2010).

En este sistema se observa mayor uso de tecnologías y estrategias de manejo que incrementan la producción. La alimentación se basa en núcleos, mezclas minerales, alimentos comerciales o mezclas propias, cuya finalidad es dar una alimentación completa para reducir el tiempo de finalización y maximizar el rendimiento cárnico de los animales. Los programas de reproducción son más productivos utilizando prácticas como inseminación artificial y confirmación de gestación. El manejo sanitario es más frecuente, existe control de parasitosis, prevención y tratamiento de enfermedades de manera continua durante el ciclo reproductivo (Pérez *et al.*, 2011).

2.5. Anatomía del aparato reproductor del ovino

El conocimiento de la anatomía y fisiología del aparato reproductor (AR) del macho ovino es necesaria y es indispensable para poder emitir un adecuado juicio en la evaluación andrológica y seminal del macho. El AR del ovino consta de testículos contenidos en el escroto, sistema de conductos, glándulas sexuales accesorias y el pene como órgano copulador (Figura 1).

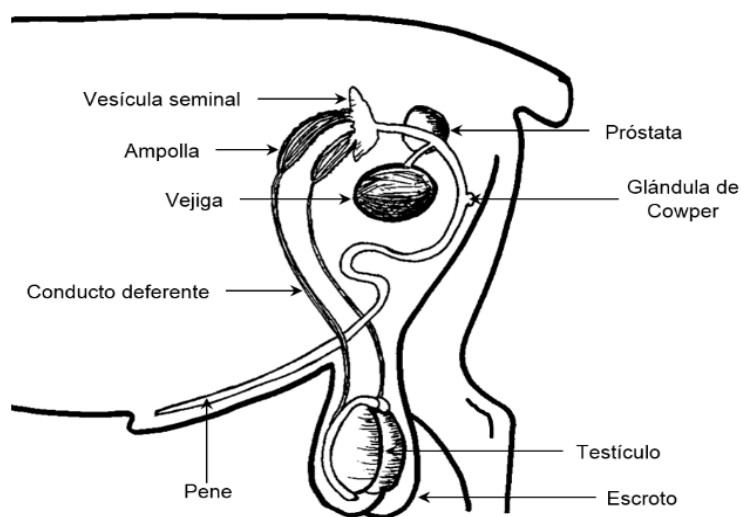


Figura 1. Esquema de aparato reproductor del macho ovino.
Fuente: Elaboración propia

2.5.1. Testículos

Los testículos tienen como función principal la producción de espermatozoides (función exocrina) y la producción de hormonas esteroideas (función endocrina) específicamente la producción de andrógenos como la testosterona (Hafez, 2002). Se encuentran ubicados en la región inguinal dentro del escroto, su forma es ovoide, el tamaño promedio es de 11-12 cm de largo, 6-7 cm de ancho y 6-8 cm de grosor y pesan alrededor de 200 a 300 gramos cada uno (Evans y Maxwell, 1990). Cada testículo está constituido por el parénquima testicular, el cual está conformado por varios lóbulos que contienen a los túbulos seminíferos. El parénquima está rodeado a su vez por la túnica albugínea, que es la encargada de proteger y darle forma al testículo. En el interior de los testículos, los túbulos seminíferos se continúan en unas trabéculas (*rete testis*) y se unen en el centro de la glándula para dar lugar al mediastino testicular. En el epitelio que reviste a los túbulos seminíferos se diferencian dos tipos de células básicas: células de Sertoli (las cuales tienen la función de nutrir, sostén y reguladora del proceso espermatogénico) y células germinales o espermatogonias, de cuya división y transformación se originan los espermatozoides (Hafez, 2002). Al exterior de los túbulos seminíferos se encuentran las células de Leydig que tienen la función de producir la testosterona, hormona que tienen influencia en el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios del macho y durante la espermatogénesis (Garner y Hafez, 2002).

2.5.2. Conductos sexuales

El epidídimo es el primer conducto externo que sale de los testículos, se originan de los conductos eferentes dentro del parénquima del testículo, los cuales al unirse forman un solo conducto, el epididímario, que se encuentra adherido a todo lo largo del borde medial del testículo, distinguiéndose tres porciones: cabeza, cuerpo y cola. El epidídimo tiene entre sus funciones el transporte, la maduración, el almacenamiento y la concentración de los espermatozoides (Dyce *et al.*, 2007). La cola del epidídimo es el principal sitio de almacenamiento y maduración de los espermatozoides, y en este sitio donde se almacenan cerca del 75% de las células espermáticas totales. **El conducto deferente** se proyecta desde la cola del

epidídimo, hasta cerca del cuello de la vejiga urinaria y desemboca en el colículo seminal, distinguiéndose tres porciones: funicular, abdominal y pelviana. El conducto tiene la función de transportar a los espermatozoides desde el epidídimo hasta la uretra y sus últimos 3-4 cm son más gruesos (ampollas del conducto deferente) que ocasionalmente tienen la función de almacenar a los espermatozoides (Köning y Liebich, 2005). **La uretra** representa el canal urogenital en el macho, la cual se inicia en el cuello de la vejiga urinaria y proyectándose caudalmente por la cavidad pelviana hasta el arco isquiático y se incorpora al pene, pasando por todo su trayecto, desembocando en el glande del pene, que en el caso del ovino se prolonga más allá del glande como un apéndice filiforme o también llamado proceso uretral (Hafez, 2002).

2.5.3. Glándulas sexuales accesorias

Estas comprenden a las vesículas seminales, próstata y las glándulas bulbouretrales, las cuales tienen la función de producir secreciones que constituyen el semen (Aké *et al.*, 2017).

Las **vesículas seminales** son cuerpos glandulares compactos que se encuentran situados dorsalmente al cuello de la vejiga, y cuyos conductos desembocan en común con los conductos deferentes, su secreción es rica en proteínas, lípidos y monosacáridos de gran importancia para la conservación y motilidad de los espermatozoides (Urroz, 2010). La **próstata** en el carnero está formada por dos lóbulos laterales localizados sobre el cuello de la vejiga, que se conectan por un istmo dorsal al inicio de la uretra pélvica por detrás de las glándulas vesiculares. El líquido prostático producido por ésta, drena a la uretra a través de túbulos excretores de diferentes tamaños. Las **glándulas bulbouretrales** o de Cowper son cuerpos redondeados compactos situados en la superficie dorsal de la uretra en el arco isquiático. La secreción de estas glándulas tiene la función de limpiar de orina el conducto uretral y lubricarlo antes de que los espermatozoides sean liberados al exterior por medio de la uretra, la cual se encuentra envuelta por el pene (Evans y Maxwell, 1990; Hafez, 2002).

2.5.4. Pene

El pene es el órgano copulador del macho, que en el ovino es de tipo fibroelástico de forma cilíndrica y de consistencia dura, el cual inicia en la arcada isquiática y continúa por debajo del rafe perineal pasando entre los muslos por la línea media en la pared abdominal y terminando detrás de la cicatriz umbilical protegido por el prepucio. En este trayecto se presenta una flexura sigmoidea, característica de los ruminantes y del cerdo, cuando se encuentra retraído dentro del cuerpo. El pene presenta tres cuerpos cavernosos: cuerpo cavernoso del pene; cuerpo cavernoso de la uretra, y cuerpo cavernoso del glande. Además, presenta una porción de la uretra que abarca más allá del glande, llamado proceso uretral o apéndice filiforme, por el cual sale el eyaculado (Evans y Maxwell, 1990; Hafez, 2002). En la erección, el pene se pone rígido debido a la compresión de los vasos (vena dorsal del pene) que drena al pene y al llenado de sangre de los cuerpos cavernosos (arterias helicoidales), lo que resulta en consecuencia la rigidez del pene, ya que, en el ovino, debido a su constitución fibroelástica, no se observan cambios importantes de tamaño. Para que se pueda efectuar la copula en el macho ovino es necesario que se reflejen los músculos retractores, lo que permite la salida del pene para la cópula (Aké *et al.*, 2017).

2.5.5. Fisiología de la producción espermática

La formación de los espermatozoides es un proceso fundamental dentro de la actividad reproductiva del macho, es un proceso continuo y puede ser afectado por diversos factores medioambientales y endocrinos. La función testicular de los machos de cualquier especie puede definirse como la capacidad para producir gametos en cantidad y calidad adecuada para llevar a cabo la fecundación. La espermatogénesis es un proceso de transformación celular que ocurre dentro de los túbulos seminíferos y que en el macho ovino tiene una duración aproximada de 47–49 días (Aké *et al.*, 2017).

Para esto, es necesario que el individuo produzca las hormonas necesarias que permitirán su maduración sexual (Cheng y Mruk, 2010). La hormona liberadora de

gonadotropinas (GnRH) es una hormona sintetizada en el hipotálamo y que actúa dentro de la fisiología del macho elevando las hormonas folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH) a nivel hipofisario, las cuales, a su vez, tienen un efecto directo sobre la espermatogénesis y la secreción de testosterona (Hafez, 2002). La hormona LH es la encargada de estimular la producción de testosterona por las células de Leydig en el estroma testicular. Los ovinos alcanzan la madurez sexual en la pubertad, que se define como la edad en la cual los órganos reproductores se vuelven funcionales. Esto ocurre entre los 5 y 7 meses de edad y cuando el animal tiene entre el 50 - 60% de su peso corporal de adulto.

La espermatogénesis inicia en la lámina basal del túbulo seminífero y las diferentes divisiones celulares se dirigen hacia la luz del túbulo. Las espermatogonias troncales sufren la primera división mitótica, lo que da como resultado en dos células hijas idénticas; una de estas células regresa a la lámina basal para permanecer como espermatogonia tipo basal y otra continúa dando lugar a las espermatogonias. Las divisiones mitóticas se continúan dando lugar a las espermatogonias tipo A₂, A₃, A₄. Estas últimas dan origen a las espermatogonias tipo intermedia, las cuales sufren una división para formar la espermatogonia tipo B, de las cuales se originan los espermatocitos primarios. Los espermatocitos primarios por lo general se encuentran en el centro del túbulo y experimentan cambios nucleares progresivos antes de sufrir la primera división meiótica, durante la cual ocurre la reducción del número de cromosomas somáticos a la mitad y la separación de los cromosomas sexuales X-Y originando a los espermatocitos secundarios. Los dos espermatocitos secundarios formados de cada espermatocito primario se dividen nuevamente (segunda división meiótica) lo que da lugar a la formación de cuatro espermátides (Aké *et al.*, 2017).

La espermatogénesis consiste en la metamorfosis de una célula redonda (espermátide) a una célula de forma alargada y con capacidad de movimiento, el espermatozoide. Entre estos cambios morfológicos se incluye la formación y unión de los gránulos proacrosómicos, condensación de la cromatina nuclear, la ubicación de las mitocondrias y el desarrollo del casquete acrosómico, desplazamiento del

citoplasma hacia la parte caudal del núcleo y la formación de la cola o flagelo; estos cambios se clasifican en cuatro fases llamadas Golgi, de encasquetamiento, acrosómica y de maduración. Con la formación del cuerpo residual se completa la maduración final, y las espermátidas alargadas se liberan como espermatozoides inmaduros. Cuando el desarrollo se ha completado, el espermatozoide inmaduro se separa del túbulo seminífero y es enviado al epidídimo, proceso que se conoce como espermiación. El espermatozoide, durante su tránsito por el epidídimo, adquiere maduración de sus organelos celulares y su capacidad fecundante, que en el ovino dura de 10 a 16 días (Aké *et al.*, 2017).

2.5.6. Factores sobre la producción y calidad espermática

La actividad reproductiva de los pequeños rumiantes está influenciada, entre otras causas, factores estacionales (Pelletier *et al.*, 1988), entre ellos se encuentra el fotoperiodo, cuya acción se produce a nivel del eje hipotálamo-hipófisis-gónada, vía glándula pineal. Esta glándula recibe las variaciones en las horas de luz y actúa como mediador transformando los impulsos ópticos de la luz en descargas hormonales de melatonina. Durante los días cortos, la glándula pineal aumenta la síntesis y secreción de melatonina que actuaría a nivel del sistema nervioso central variando la pulsatilidad de la secreción de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) en el hipotálamo. Esto supone, un aumento de la secreción de gonadotropina luteinizante (LH), lo que favorecerá el crecimiento testicular y la secreción de testosterona. Por el contrario, cuando el fotoperiodo es ascendente, a través del mecanismo anteriormente citado se deprime la secreción de LH y en consecuencia el tamaño testicular y la secreción de testosterona (Pelletier *et al.*, 1988).

Sin embargo, la influencia del fotoperiodo depende a su vez de la localización geográfica, reduciéndose a medida que nos acercamos a los trópicos. En este sentido, el tamaño testicular, la producción espermática y la calidad de los eyaculados, así como la capacidad de cubrición varían dependiendo de la latitud en la que se ubican las diferentes razas. En zonas de clima tropical o subtropical, donde

las variaciones del fotoperiodo a lo largo del año no son tan marcadas, cobran mayor importancia otros componentes climáticos tales como la temperatura y la humedad relativa (Pérez y Mateos, 1996), además de la disponibilidad de alimento.

En ovinos se ha evidenciado que tanto el comportamiento sexual como la calidad seminal varían en función de la edad y raza (Aisen, 2004; Tabarez *et al.*, 2017), aunque la libido puede estar más condicionada por la estación del año que por la propia edad de los animales (Aisen y Venturino, 2004), observándose que el número de montas disminuye durante semanas e incluso meses fuera de la estación reproductiva. Por otro lado, la calidad seminal está influenciada también por la actividad sexual o la frecuencia de recogida de semen.

2.5.7. Eyaculación

El reflejo de eyaculación en el carnero es provocado por estimulación del glande, por la temperatura, presión y lubricación de la vagina. La eyaculación ocurre por dos procesos: la emisión y la propulsión o eyaculación propia. El proceso de emisión se origina del movimiento del líquido espermático (espermatozoides) de la cola del epidídimo hasta la uretra pélvica en donde se mezcla con las secreciones de las glándulas accesorias, constituyendo así el semen. En los ovinos la eyaculación es espontánea y dura solo una fracción de segundos, se caracteriza por un violento empujón de la pelvis del macho, conocido como “golpe de riñón” (Aké *et al.*, 2017).

2.6. Análisis seminal

El análisis seminal incluye una serie de pruebas que evalúan diversos factores o funciones de la célula espermática. Como resultado del análisis seminal podemos calificar a la muestra como apta o no apta para uso en inseminación artificial en fresco, refrigerado o criopreservado (Fitzgerald y Morgan, 2007). Las técnicas de evaluación del semen, tanto para la utilización en investigación como en la práctica, depende todavía del análisis seminal rutinario clásico, a pesar de su limitado valor para predecir la fertilidad completa del ovino (Rodríguez-Martínez, 2003; Gillan *et al.*, 2005). Sin embargo, gracias a diferentes avances metodológicos, puede ayudar

a identificar el estado de la célula espermática en un momento dado y correlacionarlo con la fertilidad y calidad del eyaculado. Así se han desarrollado sistemas automáticos de análisis por imágenes, tal es el caso del análisis de espermatozoides asistido por computadora por sus siglas en inglés (CASA) y sistemas basados en la citometría de flujo, los cuales proporcionan una gran cantidad de información para estudiar distintas características del espermatozoide (Álvarez *et al.*, 2000). En el cuadro 2 se muestran las características seminales de ovinos de razas de pelo, bajo condiciones de trópico reportadas por diferentes autores.

Cuadro 2. Características del eyaculado de ovino (Media \pm DE).

Característica	Chi-Santiago (2009)	Cárdenas <i>et al.</i> , (2012)	Aké (2014)
Volumen seminal (mL)	0.68 \pm 0.09	0.57 \pm 0.07	0.54 \pm 0.05
Motilidad masal (0-5)	4.58 \pm 0.22	4.44 \pm 0.19	4.55 \pm 0.25
Motilidad individual (%)	89.9 \pm 1.63	83.6 \pm 2.70	85.6 \pm 2.6
Concentración ($\times 10^6$ esp/mL)	3,406 \pm 385	2,889 \pm 216	2,497 \pm 164
Anormalidades totales (%)	8.1 \pm 1.01	8.39 \pm 3.79	9.81 \pm 0.18

2.6.1. Evaluación de la motilidad espermática

La evaluación de la motilidad es uno de los parámetros que son más utilizados. La motilidad es necesaria para el transporte de los espermatozoides en el tracto reproductivo de la hembra y para atravesar todas las cubiertas del ovocito. Se puede evaluar subjetivamente y objetivamente mediante sistemas computarizados de análisis, pero la más utilizada y a su vez la más simple valoración visual de la motilidad masal (MM) que refleja el movimiento de las células espermáticas en conjunto (Gallego *et al.*, 2018). Esta valoración requiere de una elevada

concentración espermática para que las ondas y remolinos se hagan visibles, siendo empleada a nivel práctico en el análisis de semen de pequeños rumiantes (Aisen y Veturino, 2004). La motilidad progresiva (MP) se obtiene utilizando mediante observación en microscopio óptico a 100-400 aumentos de una gota seminal colocada entre un portaobjeto y cubreobjetos. La valoración se realiza de forma subjetiva tanto en porcentaje de espermatozoides motiles, el porcentaje de espermatozoides con movimiento progresivo y la calidad del movimiento (González *et al.*, 2006). En el cuadro 3 se muestra la clasificación de la motilidad masal en el semen ovino y la relación con la motilidad individual (Aké *et al.*, 2017).

Cuadro 3. Relación de la motilidad masal y progresiva de los espermatozoides en ovinos.

MM	Descripción	MP
5	Movimiento masal con formación y desaparición de remolinos con ondas de movimiento muy rápidos y súbitos o intensos	85 – 95%
4	Movimiento masivo definido y rápido, pero las ondas y los remolinos no son tan súbitos como los de valor 5.	75 – 85%
3	Movimientos masivos en forma de oleaje con buen vigor y definidos, pero sin la formación de remolinos.	60 – 75%
2	Movimiento más débil tipo oleaje, se observa movimiento de espermatozoides con vigor, pero el movimiento en masa es débil.	40 – 60%
1	El movimiento espermático es muy débil, apenas se aprecia un ligero movimiento u oscilante y una gran cantidad de espermatozoides están muertos.	15 – 40%
0	En el campo se aprecian pocos espermatozoides con vida o no se aprecia ninguno con movimiento.	0 – 15%

(Fuente: Aké *et al.*, 2017)

2.6.2. Evaluación de la viabilidad e integridad de la membrana plasmática

La membrana plasmática es una estructura de las más afectadas por el proceso de congelación-descongelación, es por ello que, es indispensable evaluar su estado. Las técnicas de tinción son las más ampliamente utilizadas en la valoración de la membrana plasmática, tanto las convencionales, como las fluorescentes. Las

tinciones convencionales se basan en el principio de que los espermatozoides con la membrana plasmática intacta (vivos) presentan mecanismos de permeabilidad selectiva que impiden la entrada del colorante, mientras que en aquellos que existe ruptura o daño de la membrana, y no existen esos mecanismos, el colorante logra penetrar y la célula por consecuencia se teñirán (Watson, 1990). Alguno de esos ejemplos es: azul tripán, verde/eosina, eosina/azul de anilina o el amarillo de naftol/eritrosina, siendo el más utilizado la combinación de la eosina/nigrosina.

La técnica de tinción con eosina/nigrosina ha demostrado ser efectiva para estudiar la morfología acrosomal. Sin embargo, se ha pensado que la tinción con eosina/nigrosina puede dar como resultado la producción de artefactos porque no implica la fijación química (Bamba, 1988). La eosina penetrará a través de la membrana plasmática de la célula espermática muerta y se excluirá de las células vivas, mientras que la nigrosina proporcionará un contraste de fondo para diferenciar entre vivos y muertos (Cecere, 2014). La alta afinidad que tienen los espermatozoides muertos por la eosina se atribuye a un aumento en la permeabilidad de las membranas celulares en el momento de la muerte.

Con la aparición de fluorocromos capaces de determinar con mayor objetividad el estado de integridad de la membrana, las tinciones clásicas se han desechado como técnica de elección para valorar este parámetro; así se han desarrollado una gran variedad de protocolos basados en la utilización de tinciones fluorescentes. Estas sustancias se clasifican en dos grupos principales en función de su mecanismo de acción. Así, las tinciones de membrana impermeable solo son capaces de atravesar las membranas plasmáticas dañadas o degeneradas, y por tanto permite identificar a las células muertas o en proceso de degeneración. Por otra parte, las tinciones de membrana permeable son capaces de atravesar membranas celulares intactas y por tanto permiten identificar la población de células viables (García, 2014).

2.6.3. Evaluación de la morfología espermática

Para la evaluación de la morfología espermática se realiza una preparación de frotis cuidando de mantener la temperatura de 37° C. Se realiza una estimación de

anomalías espermáticas contando de 100 o 200 espermatozoides, observados al microscopio; diferenciando a los espermatozoides normales de los que presentan algún tipo de anomalía morfológica (Hafez, 2002; Aké *et al.*, 2017). Para ello, una gota pequeña de semen diluido se mezcla con una gota de eosina-nigrosina, y se realiza un frotis, el cual se observa en el microscopio con el objetivo 100X.

Las anormalidades en el espermatozoide pueden abarcar la cabeza, cuello, pieza intermedia y cola, se clasifican de acuerdo con la porción de la célula afectada y el origen, en primarias y secundarias. Las anormalidades primarias son de origen testicular, se producen durante la espermatogénesis y estas no se corrigen mientras el espermatozoide pasa por todo el conducto genital. Las anormalidades secundarias se producen durante el proceso de maduración del espermatozoide (en el epidídimo) o por manipulación durante su evaluación y procesamiento. Para la evaluación se recomienda llevar registro detallado y diferencial de las anormalidades al momento de su valoración (Hafez, 2002; Aké *et al.*, 2017). El eyaculado del ovino deberá tener máximo 20% de las anormalidades espermáticas totales y de estas el porcentaje de las anormalidades primarias no deben rebasar el 10%.

2.6.4. Evaluación de la concentración espermática

La concentración espermática está definida como el número de espermatozoides por unidad de volumen, expresada normalmente en millones por mL de eyaculado ($\times 10^6/\text{mL}$). Los diferentes métodos utilizados para su cálculo varían en función de la rapidez y exactitud (Evans y Maxwell, 1990). Existen varios métodos que permiten la determinación de la concentración espermática, entre ellos figuran el recuento de la cámara de Neubauer y el método del fotocolorímetro. Ambos métodos son precisos y si bien el fotocolorímetro permite el recuento más rápido, su costo es más elevado que la cámara de Neubauer (Delgado, 2013). La cámara de Neubauer es un portaobjetos de vidrio grueso con dos cuadrículas situadas a un lado y otro (superior e inferior). Estas presentan líneas que ayudan en el conteo celular, sin embargo, el conteo de los espermatozoides se realiza tomando en cuenta la

cuadrícula formada por los 25 cuadros grandes (cinco por lado), delimitados por tres líneas cada uno, y subdivididos en 1 cuadros más pequeños (Cueto *et al.*, 2016; Mejía, 2017). El recuento en la cámara de Neubauer se lleva a cabo a través de los siguientes pasos:

1. Adherir el cubreobjetos sobre la cámara humedeciendo sus bordes y ejerciendo luego una firme presión contra la cámara.
2. Aspirar 10 μ l de semen previa dilución (1:400).
3. Colocar la muestra en el borde del cubreobjetos y dejar que la cámara se llene por capilaridad (no deben quedar burbujas de aire).
4. Colocar la cámara bajo observación microscópica (100x).
5. Realizar conteo de las cabezas de los espermatozoides de cinco cuadrantes (subdividido en 16 cuadros pequeños) de cada cámara (superior e inferior).
6. Obtener un promedio de los espermatozoides contados en ambas cámaras.
7. El número resultante deberá multiplicarse por 20,000,000 para obtener el número de espermatozoides por mL.

2.7. Análisis computarizado

Desde que se introdujeron en el mercado a principios de los años 80, originalmente para la evaluación del semen humano, los sistemas CASA se han ido perfeccionando y modernizando. En consecuencia, han comenzado a utilizarse con más frecuencia en veterinaria, especialmente en las especies bovina y equina (García, 2014). Consta de varias unidades interdependientes: un microscopio de contraste de fases conectado a una cámara de video, que envía la imagen desde el monitor a un ordenador, donde un analizador digital de imagen captura varias fotografías seriadas de cada campo microscópico seleccionado. El software discrimina a los espermatozoides de otras partículas que pueden parecer por su tamaño, y analiza la trayectoria recorrida por cada espermatozoide individual durante una fracción de segundo. Los diferentes sistemas CASA incluyen una serie de parámetros descriptores del movimiento espermático que son comunes a otros sistemas (Cuadro 4).

Cuadro 4. Estimadores cinéticos de motilidad individual espermática utilizados en lo sistema asistidos por computadora CASA.

Parámetros de velocidad:		
LIN (Índice de linealidad)	%	Es la relación porcentual entre la velocidad rectilínea y velocidad curvilínea. LIN: $(VSL/VCL) \times 100$
STR (Índice de rectitud)	%	Es la relación porcentaje entre la velocidad rectilínea y la velocidad lineal. STR: $(VSL/VAP) \times 100$
WOB (Índice de oscilación)	%	Es la relación porcentual entre la velocidad lineal y velocidad rectilínea. WOB: $(VAP/VCL) \times 100$
VCL (Velocidad curvilínea)	$\mu\text{m/s}$	Distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria real por unidad de tiempo.
VSL (Velocidad rectilínea)	$\mu\text{m/s}$	Distancia recorrida por el espermatozoide entre el primer y el último punto de su trayectoria por unidad de tiempo.
VAP (Velocidad media)	$\mu\text{m/s}$	Distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de la trayectoria media.
Parámetros de angularidad y oscilación de la cabeza:		
ALH (Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza)	μm	Es el desplazamiento que efectúa la cabeza espermática en su trayectoria curvilínea de un lado a otro de la trayectoria media o lineal.
BCF (Frecuencia de batido)	Hz	Es la frecuencia con la que la trayectoria curvilínea atraviesa la trayectoria lineal o media en función del tiempo.

Adaptado por García (2014).

2.8. Criopreservación de semen ovino

La criopreservación del semen es una biotecnología esencial para la reproducción asistida, que permite la preservación del material genético por un periodo indefinido (Essawe *et al.*, 2018a). Durante los últimos 50 años, se han desarrollado y perfeccionado numerosas técnicas con el objetivo de conseguir nacimientos mediante la aplicación de dosis seminales criopreservadas (Watson, 1979),

obteniendo grandes avances en la congelación de semen de toro, mientras que otras especies, como la ovina, los resultados de fertilidad han sido inconsistentes. Estas variaciones en los resultados pueden deberse a varios factores. Uno de ellos es el daño que sufren los espermatozoides por el proceso de congelación/descongelación. La disminución de la temperatura produce un daño drástico en algunos espermatozoides conocido también como shock térmico, provocando alteraciones morfológicas en la membrana plasmática, acrosomal y mitocondrial, incluso puede llegar a provocar una reacción acrosómica prematura, acortando la vida del espermatozoide y reduciendo su fertilidad (Watson, 1995). La criopreservación también causa daño celular debido al estrés osmótico y tóxico por las concentraciones molares de los agentes crioprotectores, y daño mecánico debido a la formación y disolución de cristales de hielo. Esta respuesta de los espermatozoides de ovino a los procesos de congelación/descongelación puede variar entre individuos dentro de la misma especie y estación del año (Salamon y Maxwell, 2000), lo que parece ser debido a diferencias en la composición de las membranas. La sensibilidad al shock térmico varía entre las especies. Es así que algunos componentes, como son los fosfolípidos y los ácidos grasos de la membrana espermática, son importantes en el grado de susceptibilidad de los espermatozoides al proceso de criopreservación.

2.9. Shock por frío y daño celular

El objetivo principal de la criopreservación de espermatozoides es mantener su viabilidad y funcionalidad a bajas temperaturas durante largos periodos de tiempo. Las células espermáticas se almacenan a -196°C en nitrógeno líquido. El Shock por frío es el daño celular debido a la sensibilidad frente a la velocidad de enfriamiento, y es causada por efectos de transición en la fase lipídica. El daño de enfriamiento es el ocasionado por la sensibilidad del espermatozoide frente a una temperatura específica o un rango de temperaturas. Este daño puede ser aminorado por agentes crioprotectores, la presencia de ciertos fosfolípidos (fosfatidil serina), una congelación lenta y preacondicionamiento en un medio con un nivel elevado de sales (Fernández *et al.*, 2009).

2.10. Agentes crioprotectores

Además de una adecuada velocidad de enfriamiento, para mejorar la viabilidad celular es necesario alterar el comportamiento físico-químico de las soluciones acuosas en las cuales tiene lugar la criopreservación, para ello se añaden al medio de congelación agentes crioprotectores. Los agentes crioprotectores son sustancias muy hidrosolubles y de baja citotoxicidad que disminuyen el punto eutéctico de una solución dada (punto en el cual una composición dada de A y B solidifica como un elemento puro). El descenso del punto eutéctico implica que se alcanzará una concentración dada de solutos a una temperatura menor, de forma que la célula estará más deshidratada y el gradiente osmótico al que estará sometido será menor (Ávila *et al.*, 2006; Fernández *et al.*, 2009).

2.10.1. Yema de huevo

Su acción consiste en proteger a los espermatozoides contra el choque térmico por frío, además la fracción lipídica de la yema de huevo (lecitina y cefalina) tiene una acción protectora, y la fracción lipoproteica, un efecto conservador (Daza, 1994). La yema de huevo se utiliza como agente protector de la membrana plasmática y acrosómica del espermatozoide y actúa como amortiguador osmótico. La protección que ejerce en la congelación se da por adhesión a la membrana plasmática, especialmente dada por la fracción lipoproteica de baja densidad (Jiménez *et al.*, 2004).

2.10.2. Lecitina de soya

La lecitina de soya es un crioprotector de origen vegetal y su uso está considerado como una alternativa a la yema de huevo para la criopreservación de espermatozoides en diversas especies, pues tiene alto contenido de lipoproteínas de baja densidad (LDL). La lecitina de soya ha sido estudiada en diversas especies como la ovina, bovina, caprina y peces. La adición de lecitina de soya en los diluyentes de criopreservación parece no tener ningún efecto citotóxico ni efecto negativo en la motilidad de los espermatozoides (García, 2014).

2.10.3. Glicerol

El glicerol es el crioprotector más usado en la preservación del semen en la mayoría de las especies animales (Polge *et al.*, 1949). Esta sustancia ocupa simultáneamente la membrana y los compartimentos extra e intracelulares. Sin embargo, autores mencionan que su principal efecto lo ejerce en el medio extracelular y existe un consenso en que a pesar de que el glicerol protege las membranas del espermatozoide durante la criopreservación, también ejerce una cierta toxicidad celular produciendo alteraciones en las características físicas del citoplasma, en su organización y viscosidad, en la permeabilidad y la estabilidad de la membrana plasmática (Holt, 2000).

2.10.4. Azucares

En pequeños rumiantes, los efectos beneficiosos de los azucares en los diluyentes sobre la viabilidad a la descongelación de los espermatozoides han sido descritos en numerosas ocasiones, ya que proporcionan un substrato energético para las células durante la incubación, manteniendo la presión osmótica del diluyente y actuando como crioprotector. Azucares no penetrantes como la sacarosa, trehalosa, rafinosa o lactosa proporcionan hipertonicidad a los diluyentes, causando la deshidratación de las células antes de la congelación, surgiendo una mayor eficacia de los disacáridos frente a los monosacáridos (Terada, 2003).

2.11. Buenos y malos congeladores

Actualmente es sabido que la susceptibilidad del espermatozoide a los daños por la criopreservación varía entre animales de la misma especie. Así las diferencias individuales han sido reportadas en rumiantes, cerdos, equinos, entre otros (Thomas *et al.*, 1997; Chaveiro *et al.*, 2006; Yeste *et al.*, 2015). El concepto de eyaculados malos congeladores (MC), sugiere que la criosobrevivencia no está relacionada necesariamente con la calidad inicial de la muestra de semen, de tal manera que para ciertos individuos aparentemente con buenos parámetros espermáticos antes de la congelación, la supervivencia a la descongelación es pobre (Curry, 2000).

De esta manera, se ha observado que no todos los eyaculados, presentan la misma capacidad para resistir la congelación-descongelación (Medrano y Holt, 1998; Hernández *et al.*, 2006; Leahy y Gadella, 2011). Al respecto, se ha informado sobre diferencias en la congelabilidad del espermatozoide entre líneas genéticas (Waterhouse *et al.*, 2006), individuos (Holt *et al.*, 2005; Casas *et al.*, 2009) e incluso entre fracciones procedentes del mismo eyaculado (como sucede en el cerdo y caballos, ya que la eyaculación es fraccionada). Sieme *et al.*, (2004) sugieren que puede haber diferencias en la congelabilidad, medidas por la motilidad, entre fracciones de la misma eyaculación y existen estudios que informan resultados contradictorios (Martínez-Pastor *et al.*, 2005, 2011). A pesar de la existencia de muchos ensayos de laboratorio para evaluar las funciones de los espermatozoides, la forma más confiable de evaluar el potencial de fecundación de los espermatozoides es a través de la inseminación. Sin embargo, los ensayos de inseminación artificial son costosos, tardan mucho tiempo y solo se puede analizar un número limitado de sementales. Otra alternativa es la FIV, sin embargo, se requiere de equipo especializado para realizar ensayos de unión de espermatozoides a la zona pelúcida (Essawe *et al.*, 2018b).

2.12. Subpoblaciones espermáticas

Diversos estudios realizados demuestran la existencia de subpoblaciones de espermatozoides en mamíferos (hámster dorado, el tití, la gacela, el jabalí y el perro Holt *et al.*, 2005; Martínez-Pastor *et al.*, 2005; Pichardo *et al.*, 2010; Morales *et al.*, 2012). Estas subpoblaciones fueron definidas por parámetros separados, tales como características de movimiento, el comportamiento preciso frente a un análisis de citometría de flujo o el patrón de distribución específica de glicoconjugados de membrana plasmática. Estos estudios indican la presencia de espermatozoides funcionalmente diferentes en un solo eyaculado, que actúan específicamente cuando las células se someten a procesos tales como la capacitación *in vitro* o sugieren una fuerte relación entre los cambios en los porcentajes de poblaciones diversas y la capacidad de fecundación de un eyaculado específico, al menos en verracos (Quintero-Moreno, 2003).

La existencia de estas subpoblaciones se descuida en el análisis clásico de la calidad del semen, y esto puede interferir seriamente con una evaluación correcta de la calidad del espermatozoide. Por lo tanto, sería importante iniciar nuevos estudios de subpoblaciones de espermatozoides para alcanzar una mejor definición de la calidad del semen. Esto también podría tener repercusiones económicas importantes, ya que un mejor análisis del semen podría conducir a la comercialización de dosis de semen que ofrezcan mayores garantías de calidad. Por lo tanto, el estudio y caracterización de estas subpoblaciones abre nuevas formas de mejorar las técnicas de análisis de semen de ovino.

2.13. Normatividad de laboratorios en México

En México la normalización se plasma en las Normas Oficiales Mexicanas (NOM) de carácter obligatorio, elaboradas por dependencias del gobierno federal y las Normas Mexicanas (NMX) de ámbito primordialmente voluntario, promovidas por la Secretaría de Economía y el sector privado, a través de los Organismos Nacionales de Normalización.

No cualquiera puede asegurar que un bien o servicio se ajusta a la norma. Se requiere que una entidad de acreditación valore la competencia técnica y confiabilidad de los organismos de certificación, laboratorios de prueba, laboratorios de calibración y unidades de verificación.

La normalización es el proceso mediante el cual se regulan las actividades desempeñadas por los sectores tanto privado como público, en materia de salud, medio ambiente, seguridad al usuario, información comercial, prácticas de comercio, industrial y laboral a través del cual se establecen la terminología, la clasificación, las directrices, las especificaciones, los atributos las características, los métodos de prueba o las prescripciones aplicables a un producto, proceso o servicio.

La actividad normalizadora se entiende como la consolidación del conocimiento que es recabado a través de consultas realizadas entre expertos de una rama o actividad

productiva. Es un documento mediante el cual los sectores interesados (entre los cuales están, fabricantes, usuarios y gobierno) acuerdan las características técnicas deseables en un producto, proceso o servicio. Este proceso se lleva a cabo mediante la elaboración, expedición y difusión a nivel nacional, de las normas que pueden ser de tres tipos principalmente:

Norma oficial mexicana (NOM), es la regulación técnica de observancia obligatoria expedida por las dependencias normalizadoras competentes a través de los Comités Consultivos Nacionales de Normalización, conforme al artículo 40 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización (LFMN), la cual establece reglas, especificaciones, atributos, directrices, características o prescripciones aplicables a un producto, proceso, instalación, sistema, actividad, servicio o método de producción u operación, así como aquellas relativas a terminología, simbología, embalaje, marcado o etiquetado y las que se le refieran a su cumplimiento o aplicación.

Norma mexicana (NMX), la que elabore un organismo nacional de normalización, o la Secretaría de Economía en ausencia de ellos, conforme el artículo 54 de la LFMN, la cual prevé para uso común y repetido reglas, especificaciones, atributos métodos de prueba, directrices, características o prescripciones aplicables a un producto, proceso, instalación, sistema, actividad, servicio o método de producción u operación, así como aquellas relativas a terminología, simbología, embalaje marcado o etiquetado.

2.13.1. Normatividad de laboratorios de procesamiento de semen

En México existe una norma oficial mexicana que regula los establecimientos que se dedican a procesar semen de animales (NOM-027-ZOO-1995-Proceso Zoonosanitario del Semen de Animales Domésticos) la cual fue publicada en el diario oficial de la federación el 11 de enero de 1996, la cual no ha sido modificada o actualizada (SENASICA, 1996).

Esta norma es de observancia obligatoria y tiene por objeto regular la condición sanitaria de la obtención y procesamiento de semen que es empleado en la inseminación artificial. La vigilancia de esta norma corresponde a la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural (Actualmente Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural) y la aplicación a la Dirección General de Salud Animal.

Para la correcta aplicación de esta norma se deben consultar las siguientes normas:

- NOM-003-ZOO-1994 Criterios para la Operación de Laboratorios de Pruebas Aprobados en Materia Zoosanitaria.
- NOM-EM-011-ZOO-1994 Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales.
- NOM-019-ZOO-1994 Campaña Nacional contra la Garrapata *Boophilus spp.*
- NOM-007-ZOO-1994 Campaña Nacional contra la Enfermedad de Aujeszky.

Así como documentos de consulta del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria:

- Criterios mínimos indispensables para la instalación y equipo de los laboratorios aprobados y/o autorizados.
- Criterios de operación para los laboratorios aprobados y/o autorizados.

La NOM-027-ZOO-1995 contempla tres tipos de clasificaciones que podrán registrarse bajo esta norma. El Gaprosem (Explotación pecuaria que se dedica a la obtención de semen de los animales), el Ceprosem (Centro de procesamiento de semen) y el Laprosem (Laboratorio de procesamiento de semen). A continuación, se describe las especificaciones que debe cumplir cada uno.

Gaprosem

- Estar ubicados de tal forma que queden separados de otros tipos de explotación pecuaria, otros animales no destinados al uso específico que señala esta Norma o centros de sacrificio.
- Contar con instalaciones hechas a base de materiales permanentes y con recubrimientos que permitan una adecuada limpieza y desinfección.

- Contar con las siguientes instalaciones: Área de aislamiento, área de obtención de semen, residencia de sementales, vado sanitario.

Ceprosem

- Estarán ubicados de tal forma que queden separados de otros tipos de explotación pecuaria, otros animales no destinados al uso específico que señala esta Norma o centros de sacrificio.
- Contar con instalaciones hechas a base de materiales permanentes y con recubrimientos que permitan una adecuada limpieza y desinfección.
- Contar con las siguientes instalaciones: Área de aislamiento, área de laboratorio, área de obtención de semen, área de registros, residencia de sementales, vado sanitario.

Laprosem

- Estarán ubicados fuera de cualquier tipo de explotación pecuaria o centros de sacrificio.
- Contar con instalaciones hechas a base de materiales permanentes y con recubrimientos que permitan una adecuada limpieza y desinfección.
- Contar con las siguientes instalaciones: Área de laboratorio, oficina de registros.

A los animales que se desea procesar su semen deben de permanecer en el área de aislamiento durante un periodo de 30 días y deben ser sometidos a un examen clínico general por un médico veterinario zootecnista y practicar las siguientes pruebas de laboratorio.

- Brucelosis (Bovinos y porcinos)
- Tuberculosis (Bovinos)
- Leptospirosis (Bovinos y porcinos)
- Campilobacteriosis (Bovinos)
- Rinotraqueitis viral bovina (Bovinos)
- Tricomoniasis (Bovinos)
- Diarrea Viral Bovina
- Enfermedad del ojo azul (Porcinos)
- Parvovirus (Porcinos)
- Enfermedad de Aujeszky (Porcinos)

Además de cumplir con la NOM-027-ZOO-1995 se debe cubrir los criterios mínimos indispensables para la instalación y equipo de los laboratorios aprobados y/o autorizados y los criterios de operación para los laboratorios aprobados y/o autorizados, que en resumen los aplicables para el laboratorio de procesamiento de semen se debe contar con lo siguiente:

1. **Oficina o área de control:** Esta área debe ubicarse inmediatamente al acceso principal del laboratorio y separada de las áreas especializadas de trabajo.
2. **Tapete sanitario:** Este servirá para que el personal que ingrese al laboratorio se desinfecte el calzado.
3. **Almacén:** Es el área específica para guardar los materiales, reactivos y otros insumos utilizados en el laboratorio.

Estos documentos señalan también las condiciones ambientales que se deben tener en el lugar donde se lleven a cabo las pruebas. Los laboratorios o áreas donde se ejecuten pruebas deben estar protegidos según se requiera, contra condiciones extremas, tales como excesos de temperatura, polvo, humedad, vapor, ruido, vibraciones o fluctuaciones de voltaje, y deben ser objeto de un mantenimiento apropiado.

Para el caso de los equipos que se encuentren en el laboratorio, estos deben mantenerse adecuadamente y tener disponibles los procedimientos de mantenimiento. Así mismo, se debe contar con un registro actualizado por cada uno de los equipos de medición, prueba y/o análisis. Estos registros deben contar con los siguientes datos:

- Nombre del equipo
- Nombre del fabricante, identificación del tipo y número de serie
- Fecha de recepción y la fecha de puesta en servicio
- Su estado cuando fue incorporado, por ejemplo: nuevo, usado, reacondicionado
- Detalles sobre el mantenimiento realizado
- Historial de cualquier daño, descompostura, modificación o reparación

III. PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA

Actualmente el control de la reproducción en la especie ovina está basado en la mayoría de los casos en la monta natural con el uso del carnero en sistema de empadre continuo en un grupo de ovejas, sin embargo, la biotecnología reproductiva como la IA va reemplazando el uso de carnero en el hato, al tener mejores estimadores de producción en las características de mejoramiento genético y su impacto en fertilidad, prolificidad y ganancia de peso de la progenie y calidad de la canal. Actualmente los estudios sobre congelabilidad del semen se han centrado en identificar algún parámetro morfológico y cinético que indique el estado de la célula espermática en un momento dado y que también pueda ser correlacionada la calidad del eyaculado.

Por lo que la utilización de semen criopreservado de buena calidad proveniente de laboratorios de procesamiento de semen acreditados sea una referencia para que los productores de ovinos puedan llevar a cabo programas reproductivos como la sincronización del estro conjuntamente con la IA y así mejor la producción de ovinos de pelo a nivel regional y estatal en condiciones de trópico.

IV. OBJETIVOS

4.1. General

Evaluar los parámetros de espermatozoides criopreservados de ovinos de pelo en condiciones de trópico de Guerrero y definir el procedimiento de acreditación del laboratorio de procesamiento de semen.

4.2. Específicos

- Determinar la congelabilidad de eyaculados de ovinos de pelo.
- Evaluar diferencias en la integridad de la membrana espermática (viabilidad) y motilidad de eyaculados de ovinos congelados-descongelados.
- Determinar patrones cinéticos de motilidad de espermatozoides de ovinos de acuerdo a la congelabilidad.
- Elaboración de guía para acreditación de laboratorio para procesamiento de semen bajo la NOM-027-ZOO-1995.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Localización

El trabajo se realizó en la Unidad Productiva Ovina (UPO) y el laboratorio de procesamiento de semen de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia pertenecientes a la Universidad Autónoma de Guerrero (UAGro), ubicada entre los paralelos 18° 21' 17'' de latitud norte y 100° 39' 58'' de longitud oeste, respecto al meridiano de Greenwich y una altitud promedio de 241 msnm.

5.2. Animales experimentales

Se evaluaron 28 eyaculados provenientes de 11 ovinos de la cruce pelibuey – blackbelly entre 18 y 24 meses de edad, alojados en corales individuales de 12 m² alimentados a base de una dieta con sorgo, soya y pastoreo con forraje nativo, desparasitados y vacunados contra clostridiasis. Los ovinos fueron entrenados previamente para la colección de semen con ayuda de una hembra estrogenizada y posteriormente utilizada como maniquí de monta.

5.3 Colección de semen

La colección de semen se realizó con VA a 42 °C (Figura 2), de acuerdo a la técnica descrita por Buitrago y Pérez (2008), la cual provee de temperatura y presión adecuada e imitan de mejor manera las condiciones naturales del depósito de semen en la vagina de la oveja, y se obtienen eyaculados con características normales y representativas (Mejía, 2017).



Figura 2. Colección de semen de ovino con vagina artificial.

5.4. Evaluación de semen

Previo al proceso de criopreservación se evaluó la calidad del eyaculado, donde se estimó el color, volumen, concentración por mL y motilidad masal, motilidad progresiva, viabilidad y se incluyeron los eyaculados cuyos valores de referencia del eyaculado fueran superiores a los reportados para la especie (Cuadro 5).

Cuadro 5. Valores seminales de referencia de eyaculados ovinos de pelo en condiciones del trópico subhúmedo (n=28).

Estimador seminal	Volumen (ml)	Concentración (X10 ⁶)	Viabilidad (%)	Motilidad masal (1-5)	Motilidad progresiva (%)
Media	1.03	3854	84.00	3.82	85.88
Desviación estándar	0.30	1906	3.54	0.73	5.07
Mínimo	0.50	1560	80.00	3.00	75.00
Máximo	1.50	9550	90.00	5.00	95.00

5.4.1. Volumen

El volumen fue medido directamente en el tubo graduado inmediatamente después de la colección.

5.4.2. Motilidad

La motilidad masal (MM, 0-5) fue evaluada por la técnica descrita por Aisen (2004) para microscopía óptica donde se observaron en el eyaculado las ondas producidas por los espermatozoides, utilizando la siguiente escala de valor: 5 (muy buena) ondas densas de movimiento muy rápido, 4 (buena) ondas y remolinos vigorosos, pero no tan rápidas, 3 (regular) ondas de movimiento lento, 2, (pobre) donde no aparecen ondas, pero se ven movimientos espermáticos, 1 (muy pobre) donde hay muy pocos movimientos y 0 (muertos) sin movimiento. Para la evaluación de la motilidad masal se colocó una gota de semen entero sobre un portaobjetos y fue analizado en microscopio con objetivo de 10X. Para la medición de la motilidad

progresiva (MP, %) se colocó una gota de semen sobre un portaobjetos y cubreobjetos respectivamente, y se observó en el microscopio óptico con el objetivo 40X. Se observaron varios campos con movimiento de espermatozoides hacia adelante.

5.4.3. Viabilidad

La viabilidad antes de la congelación se estimó mediante tinción de eosina-nigrosina, colocando una gota de semen en un portaobjetos junto a una de la tinción, posteriormente se homogenizó y con ayuda de un portaobjetos se realizó un frotis (Figura 3), donde se contaron 200 espermatozoides en el microscopio con el objetivo de 100X para después expresar el resultado en porcentaje (Aguilar *et al.*, 2013).

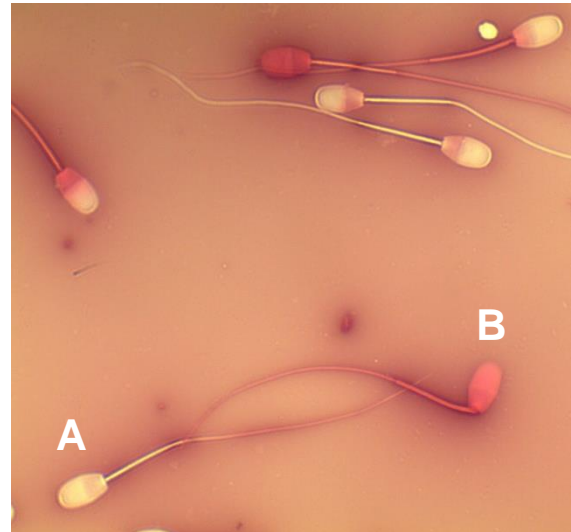


Figura 3. Espermatozoides teñidos con eosina-nigrosina. A: Esp. vivo; B: Esp. Muerto.

5.4.4. Concentración

La concentración espermática se analizó realizando una dilución del semen 1:400 en solución formolada al 2.9 % y posteriormente se realizó conteo en cámara de Neubauer. Se contaron las epicámaras, según la técnica descrita por Muiño (2008), la fórmula para obtener el número de espermatozoides fue la descrita por Cueto *et al.*, (2016).

$$\text{Espermatozoides/ml} = \frac{\# \text{esp contados en camara} \times 400 \times 16}{5} \times 1,000$$

5.5. Protocolo de criopreservación

Después de la colección el semen fue diluido de acuerdo a la concentración en el medio comercial (TRILADYL®) a base de TRIS, ácido cítrico, azúcar, tampón, glicerina, agua tridestilada y antibiótico a 37° C, se envaso en pajillas de 0.5 ml a una concentración 200×10^6 espermatozoides y selladas con alcohol polivinílico, se expusieron por dos horas a refrigeración hasta alcanzar 5° C. Inmediatamente fueron expuestas a vapores de nitrógeno líquido (NL₂) por 10 minutos, y almacenadas a -196 °C en termo criogénico (Cebrián *et al.*, 2010).

5.6. Evaluación de la motilidad a la descongelación

Esta evaluación se llevó a cabo en el Laboratorio Acuático – Pecuario del Centro Nacional de Recursos Genéticos. Para la evaluación de la cinética de los espermatozoides se descongelaron dos pajillas mediante agitación en baño maría a 37 °C durante 30 segundos. Después de 15 minutos se evaluó la motilidad progresiva (MP, %) en cámara Makler (Sefi-Medical Instruments Ltd., Biosigma Srl, Italia) de 10µm de profundidad, colocando 10µl de semen descongelado, velocidad curvilínea (VCL, µm/s), velocidad rectilínea (VSL, µm/s), velocidad lineal (VAP, µm/s), índice de linealidad (LIN, VSL/VCL x 100, %), índice de rectitud (STR, VSL/VAP x 100, %), amplitud media de desplazamiento lateral (ALH, µm) y la frecuencia de batido de la cabeza (BCF, Hz). Por medio del software CASA (Sperm Class Analyzer-SCA 5 2010), provisto de un microscopio de contraste de fases (Nikon, Eclipse E200MV R) atemperado a 37° C. Los ajustes del sistema CASA fueron los siguientes: número de imágenes (25/s), óptica (Ph-), escala (Nikon 10X), área de partículas (>15 a 70 µm²) esperma lento (10-45 µm/s), esperma promedio (45-75 µm/s), esperma rápido (> 75 µm/s), progresivo (80% STR) (Berlinguer *et al.*, 2009; Tabarez *et al.*, 2017).

5.7. Evaluación de la viabilidad a la descongelación

La viabilidad fue analizada con el kit comercial FluoVit® (Microptic). Se colocó una muestra de 10 µl de semen en un tubo eppendorf, donde se agregó 1 µl de (trihidrato de trihidrocloruro) previamente calentado a 37° C y posteriormente incubado durante cinco minutos. Después se adiciono 1 µl de yoduro de propidio (IP) a 37° C y la muestra fue mezclada e incubada por cinco minutos. Luego una alícuota de 10

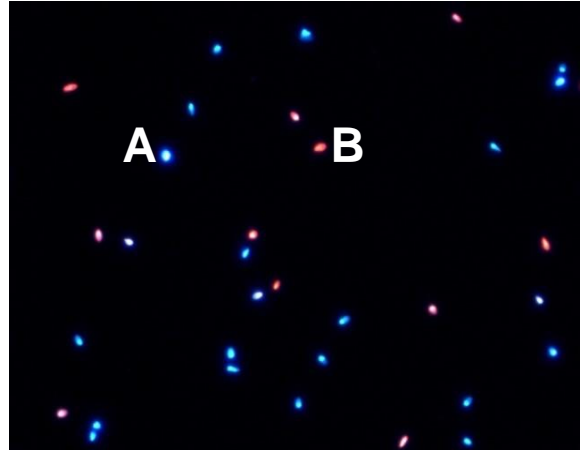


Figura 4. Evaluación de viabilidad espermática. **A:** Espermatozoide vivo; **B:** Espermatozoide muerto.

µl se analizó en microscopio Nikon Eclipse E200MV R, provisto del software Sperm Class Analyzer-SCA 5, con módulo de vitalidad espermática. Donde los espermatozoides se clasificaron dos poblaciones: vivos con membrana plasmática intacta (trihidrato de trihidrocloruro+/IP-) los cuales se tiñen de color azul y muertos con membrana plasmática dañada (trihidrato de trihidrocloruro -/IP+) los cuales se tiñen de color rojo. Se realizó un conteo de 200 espermatozoides y el resultado fue expresado en porcentaje (Figura 4).

5.8. Análisis estadístico

Los datos se presentan como media \pm SEM para las variables de motilidad progresiva y viabilidad espermática. A la descongelación se clasificó el potencial de criopreservación mediante la ejecución de un análisis de agrupamiento jerárquico, el cual consiste en calcular las frecuencias de chi-cuadrada a partir de las evaluaciones mencionadas, formando dos grupos: CBC (carneros buenos congeladores) y CMC (carneros malos congeladores) de acuerdo al procedimiento descrito por Casas *et al.*, (2009) y se obtuvo como resultado un dendrograma de disparidad. Se realizó análisis de varianza multivariado para los promedios de las variables (motilidad progresiva y viabilidad espermática) entre CBC y CMC. Los patrones cinéticos de motilidad espermática entre CBC y CMC fueron analizados

con un modelo lineal generalizado (GLM), se utilizó SPSS ver. 19.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, EE. UU.) El nivel de significancia se estableció en $P < 0.05$.

5.9. Normatividad aplicable a laboratorios de procesamiento de semen de animales domésticos

Para llevar a cabo la gestión de la acreditación del laboratorio de procesamiento de semen de la Facultad Medicina Veterinaria y Zootecnia No. 1 de la Universidad Autónoma de Guerrero se tomó como referencia la NOM-027-ZOO-1995-Proceso Zoosanitario del Semen de Animales Domésticos, los criterios mínimos indispensables para la instalación y equipo de los laboratorios aprobados y/o autorizados y los criterios de operación para los laboratorios aprobados y/o autorizados. Esto con la finalidad de elaborar los documentos necesarios para la acreditación del laboratorio de procesamiento de semen bajo esta norma (NOM-027-ZOO-1995-Proceso Zoosanitario del Semen de Animales Domésticos).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Evaluación de espermatozoides de ovino criopreservados

Los resultados del presente estudio de motilidad total (MT) y viabilidad (VIAB) espermática a la descongelación de cada ovino se muestra en la figura 5. Se puede observar que los machos 4, 6 y 9 fueron superiores al 45% para estas variables seminales, observando que los demás mostraron valores medios a bajos en MT y VIAB, en este sentido García (2014), encontró un porcentaje de MT de 40.83 a 47.37% y VIAB de 28.93 a 40.47% en ovinos de 1 y 2 años de edad respectivamente. Así mismo Brito *et al.*, (2004) observaron MT de 40.2 y 45.8% en semen de ovinos de pelo.

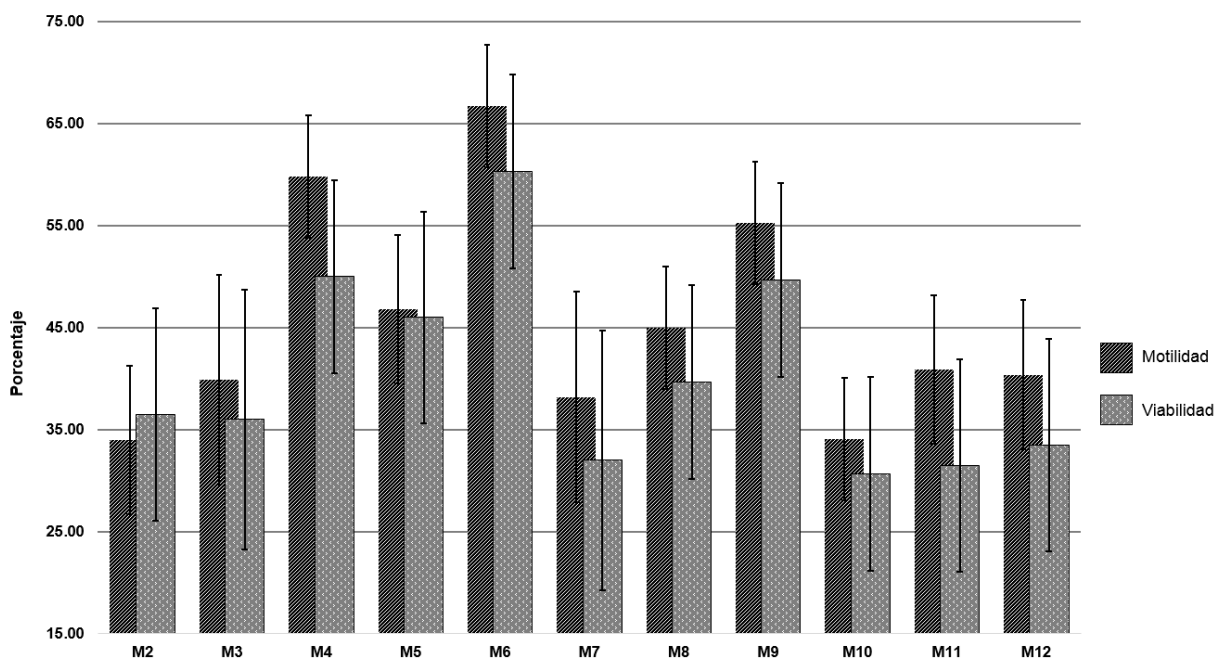


Figura 5. Distribución porcentual de motilidad y viabilidad de acuerdo a cada ovino de pelo en condiciones de trópico de Guerrero (Media \pm EE, n=11).

En lo que respecta a los resultados obtenidos de los porcentajes de motilidad y viabilidad de cada ovino, se categorizó el potencial de congelabilidad del semen de los ovinos de pelo y se determinaron dos categorías de congelabilidad: ovinos buenos congeladores (OBC) 27.27% y ovinos malos congeladores (OMC) 72.72% (Figura 6).

Dendrograma de clasificación de la congelabilidad del semen de ovino

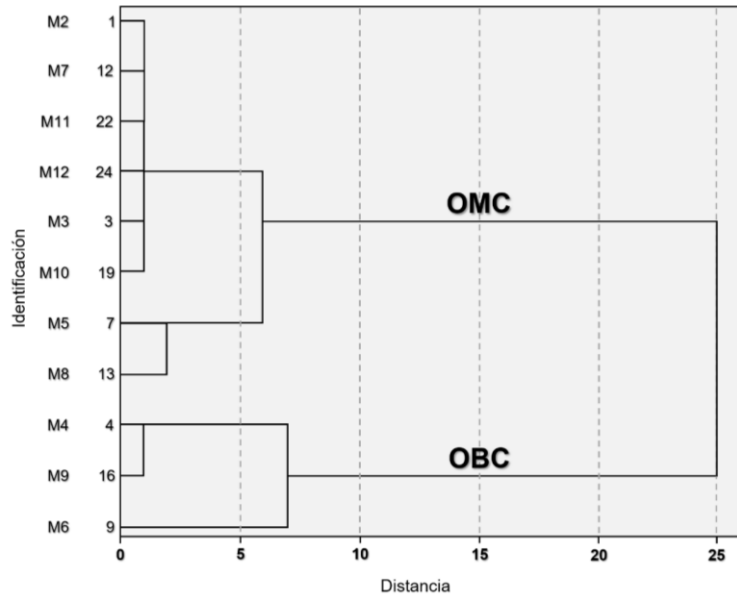


Figura 6. Dendrograma de clasificación de congelabilidad de eyaculados de 11 machos ovinos de pelo de acuerdo a la motilidad y viabilidad a la descongelación.

La distancia fue medida por la frecuencia de chi-cuadrada de motilidad total y viabilidad, la identificación indica el número de cada macho. En el dendrograma se describen dos categorías principales: **OBC** es el grupo que contiene los eyaculados con buena capacidad de congelación, y **OMC** es el grupo que contiene los eyaculados con poca capacidad de congelación.

Los valores medios de MT y VIAB a la descongelación de espermatozoides de ovinos se muestran en el cuadro 6, observando que los OBC superaron significativamente ($p < 0.05$) a los OMC. Se ha estudiado poco de estas diferencias en el potencial de congelabilidad entre ovinos y lo que se ha reportado hasta ahora es que existen diferencias individuales en la congelabilidad del semen a la descongelación, en donde los eyaculados de carneros BC son superiores en viabilidad, integridad de membrana del acrosoma y parámetros cinéticos (García, 2014). En el mismo contexto Yeste *et al.*, (2015) en equinos observaron en 24 eyaculados con diferencias significativas en la permeabilidad de la membrana plasmática, desorden lipídico de membrana y producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) a favor de los eyaculados de equino BC. También Casas *et al.*, (2009) han reportado en porcinos el potencial de congelabilidad, categorizando el 55.17 y 44.82% de verracos BC y MC respectivamente. De la misma manera Yeste *et al.*, (2013) reportaron 54.28 y 45.71% eyaculados provenientes de verracos BC y

MC respectivamente. La explicación fisiológica de estas diferencias en la congelabilidad entre machos está basada principalmente en la susceptibilidad del espermatozoide a los daños por el proceso de criopreservación entre animales de la misma especie. Las diferencias individuales han sido reportadas en rumiantes, cerdos, equinos y otros animales no domésticos (Curry, 2000). Esta tendencia se ha reportado y explicado de la mejor manera durante el proceso de criopreservación del semen de verraco en donde no todos los eyaculados presentan la misma capacidad para resistir al proceso de congelación-descongelación (Medrano y Holt, 1998; Hernández *et al.*, 2006; Leahy y Gadella, 2011). También se ha informado sobre diferencias en la congelabilidad entre razas genéticas (Park y Yi, 2002; Waterhouse *et al.*, 2006), entre verracos (Holt *et al.*, 2005; Casas *et al.*, 2009; Druart *et al.*, 2009) e incluso entre las fracciones procedentes del mismo eyaculado (Peña y Rodríguez, 2006).

El fenómeno de diferenciación entre eyaculados MC y BC parece ponerse en marcha en el momento de la eyaculación, puesto que Rath y Niemann (1997) observaron que las diferencias de congelabilidad entre verracos se da en muestras del eyaculado, pero no cuando los espermatozoides son colectados en la cola del epidídimo. Estas variaciones individuales en la congelación del semen han sido documentadas también en otras especies como en el caballo (Amann y Pickett, 1987) y el toro (Thomas *et al.*, 1997).

Cuadro 6. Motilidad y viabilidad de acuerdo a la categoría de congelabilidad del semen ovino a la descongelación (n=11).

	Variable	Media (%)	EE	Intervalo de confianza (%)	
				Inferior	Superior
OBC	Motilidad	60.6 ^a	2.8	54.3	67.0
	Viabilidad	53.3 ^a	3.1	46.3	60.3
OMC	Motilidad	39.9 ^b	1.7	36.0	43.8
	Viabilidad	35.7 ^b	1.9	31.5	40.0

Columnas sin literales comunes difieren significativamente ($p < 0.05$)

EE: Error estándar; **OBC:** Ovinos buenos congeladores; **OMC:** Ovinos malos congeladores

También se ha reportado que las diferencias en la congelabilidad de los eyaculados afectan a su posterior capacidad fecundante, observando que los espermatozoides criopreservados provenientes de eyaculados BC tienen una tasa de penetración en el ovocito *in vitro* superior que los espermatozoides de verracos MC (Gil *et al.*, 2005). Por lo tanto, las diferencias entre eyaculados MC y BC rebasan el ámbito estricto de la capacidad de resistencia a la congelación.

De la misma manera se han llevado a cabo estudios con la finalidad de determinar qué factores hacen posible la distinción entre eyaculados BC y MC, en este respecto, se ha sugerido que las diferencias entre estas categorías pueden deberse a un defecto en la espermatogénesis o fallas en la maduración en el epidídimo, principalmente en verracos MC (Calvin y Bedford, 1971). Respecto a este último punto, se ha obtenido mejor calidad de semen y fertilidad *in vivo* al retirar el plasma seminal después de la colección de semen y agregarlo en un 10% al momento de la descongelación de semen en muestras de MC (Okazaki *et al.*, 2009). Esto muestra que las modificaciones en los protocolos de congelación serán más o menos efectivas sobre la congelabilidad de los eyaculados en dependencia de si éstos son BC o MC. Sin embargo, en equinos, las diferencias individuales que existen es la habilidad de la resistencia a los protocolos de congelación-descongelación, los datos de estas diferencias principalmente han sido reportadas en la integridad de la membrana y motilidad. Por esta razón se ha observado diferencias entre eyaculados BC y MC (Yeste *et al.*, 2014).

Por otro lado, los estimadores cinéticos de motilidad individual (cuadro 7) de acuerdo al potencial de congelación, se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre OBC y OMC en los parámetros cinéticos de velocidad (VCL, VSL y VAP), sin embargo, los parámetros cinéticos de angularidad y oscilación (LIN, STR, ALH y BCF) no mostraron diferencias significativas entre categorías. Por otro lado, la MT observada en el presente trabajo fue superior a la reportada por García (2014) (MT: 48.4 ± 2.6 , 27.6 ± 3.0), contrariamente en los patrones de velocidad (VCL, VSL y VAP), los cuales fueron inferiores.

Cuadro 7. Estimadores cinéticos de motilidad individual del espermatozoide ovino de acuerdo a la categorización a la descongelación (n=11).

	Variable Cinética							
	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (μm)	BCF (Hz)
OBC	66.3 \pm 8.6 ^a	27.6 \pm 5.3 ^a	38.1 \pm 6.0 ^a	40.0 \pm 6.8 ^a	70.2 \pm 8.0 ^a	56.7 \pm 5.3 ^a	3.2 \pm .5 ^a	19.6 \pm 1.7 ^a
OMC	41.9 \pm 5.2 ^b	14.1 \pm 3.3 ^b	21.4 \pm 3.7 ^b	31.3 \pm 4.1 ^a	61.1 \pm 4.9 ^a	49.0 \pm 3.3 ^a	2.4 \pm .3 ^a	18.1 \pm 1.3 ^a

Columnas sin literales comunes difieren significativamente ($p < 0.05$)

OBC: Ovinos buenos congeladores; **OMC:** Ovinos malos congeladores; **VCL:** Velocidad curvilínea; **VSL:** Velocidad lineal; **VAP:** Velocidad media; **LIN:** Índice de linealidad; **STR:** Índice de rectitud; **WOB:** Índice de oscilación; **ALH:** Amplitud media del desplazamiento lateral; **BCF:** Frecuencia de batido de la cabeza. Espermatozoides analizados: **OBC:** 3,580, **OMC:** 4,813.

En este sentido existe poca información documentada basada en la congelabilidad de semen de carneros (Luna *et al.*, 2017). Aunque al respecto Ledesma *et al.*, (2017) mencionan que el incremento de los parámetros cinéticos como VCL, VSL y VAP, indican que los espermatozoides tienen una gran velocidad y mejor oportunidad de fecundar el ovocito. Los valores reportados por Ledesma *et al.*, (2017) en VCL: 124.9 \pm 45.2; VSL: 100.1 \pm 42.9; VAP: 110 \pm 41.1 junto con los de linealidad (LIN) fueron descritos como espermatozoides rápidos y lineales (velocidad y progresividad) y estos resultados son altamente significativos en comparación con los observados en el presente estudio. Sin embargo, los espermatozoides fueron analizados con sistema CASA a los 60 minutos a la descongelación y adicionando plasma seminal (SP).

Se definieron dos subpoblaciones de espermatozoides después del análisis de componentes principales (ACP) a la descongelación de 8,393 células espermáticas analizadas en el presente estudio. Los datos para las características de motilidad de estas subpoblaciones se muestran en la figura 7, donde las variables cinéticas de movimiento individual del espermatozoide ovino fueron establecidas donde la varianza suma el 84.1% en el ACP. Los patrones de movimiento (BC, ALH), progresividad (VAP, VSL y VCL) y de trayectoria (LIN y STR) explican el 68.1% de

la varianza y la viabilidad y motilidad total el 16% como se muestra en el cuadro 8. Estos resultados de las variaciones cinética individuales asociadas a la variable de viabilidad y motilidad total indican que los OBC tienen mejores parámetros seminales que los OMC.

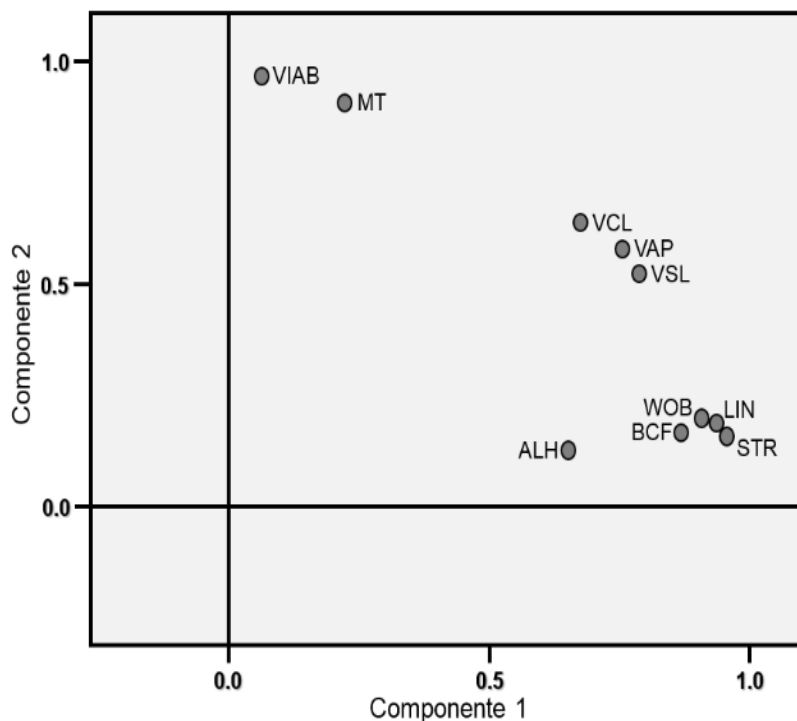


Figura 7. Análisis de componentes principales (ACP) utilizando selección de las variables de viabilidad y motilidad total y patrones cinéticos individuales del espermatozoide ovino a la descongelación (n=11).

VCL: Velocidad curvilínea; **VSL:** Velocidad lineal; **VAP:** Velocidad media; **LIN:** Índice de linealidad; **STR:** Índice de rectitud; **WOB:** Índice de oscilación; **ALH:** Amplitud media del desplazamiento lateral; **BCF:** Frecuencia de batido de la cabeza.

Cuadro 8. Análisis de componentes principales (ACP) de variables espermáticas de cinética de motilidad y viabilidad del espermatozoide ovino de pelo (n=11).

Componente principal	Varianza (%)	Variable	Extracción
Componente 1	68.1	VCL	0.86
		VSL	0.89
		VAP	0.91
		LIN	0.91
		STR	0.94
		WOB	0.86
		ALH	0.44
		BCF	0.78
Componente 2	16.0	VIAB	0.88
		MT	0.94
Total		84.1	

VCL: Velocidad curvilínea; **VSL:** Velocidad lineal; **VAP:** Velocidad media; **LIN:** Índice de linealidad; **STR:** Índice de rectitud; **WOB:** Índice de oscilación; **ALH:** Amplitud media del desplazamiento lateral; **BCF:** Frecuencia de batido de la cabeza.

6.2. Gestión de acreditación de laboratorio de procesamiento de semen

De acuerdo a la NOM-027-ZOO-1995, a los de criterios mínimos indispensables para la instalación y equipo de los laboratorios aprobados y/o autorizados y criterios de operación para los laboratorios aprobados y/o autorizados bajo la clasificación de LAPROSEM, el laboratorio de procesamiento de semen de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia No. 1 de la Universidad Autónoma de Guerrero, logró la acreditación, pues ha cumplido con las especificaciones de las reglamentaciones vigentes.

1. Áreas delimitadas (Área de laboratorio, oficina de registro, área de vestido).
2. Ventana de recepción de muestras (Cerrado hermético).
3. Manuales de procedimiento de técnicas empleadas
4. Bitácoras (Medición de nivel de NL_2 , de temperatura de refrigerador, rotación de sanitizante, entrada y salida de diluyentes, registro de visitas, mantenimiento y conservación de equipos).
5. Formato de reporte de evaluación seminal.

El Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria se encarga de aprobar organismos de certificación, laboratorios de pruebas y unidades de verificación, así como dar autorización a médicos veterinarios responsables, terceros especialistas y laboratorios para funcionar como colaboradores en las actividades en salud animal. Actualmente en México solo existen 7 laboratorios aprobados para procesar semen de animales domésticos (SENASICA, 2019). Y con la acreditación del LAPROSEM de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Guerrero el Estado tiene el primer laboratorio de procesamiento de semen autorizado.

Derivado de la presente investigación se realizó un esquema (flujograma) (Anexo 1) que servirá de guía para llevar a cabo el proceso de acreditación de laboratorios de procesamiento de semen bajo la NOM-027-ZOO-1995. Que básicamente se compone por dos líneas a seguir. La primera marca los requerimientos mínimos con los que debe contar un establecimiento prestador de servicios zoonosanitarios:

1. Médico Veterinario Zootecnista autorizado por el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria.
2. Instalaciones de materiales que permitan fácil limpieza
3. Áreas delimitadas (Área de laboratorio, oficina de registro, almacén, tapete sanitario).
4. Manuales de uso de equipo
5. Manuales de procedimientos
6. Manuales de mantenimiento
7. Bitácora de rotación de sanitizante

Y la segunda parte trata del procedimiento que debe seguirse para la solicitud de acreditación bajo la NOM-027-ZOO-1994-Proceso Zoonosanitario del Semen de animales domésticos.

Además se elaborará el manual de procedimientos del laboratorio de procesamiento de semen, y este servirá como medio de consulta para el personal de este establecimiento (Anexo 2).

VII. CONCLUSIONES

- Las variables seminales de motilidad y viabilidad espermática determinaron dos categorías de congelabilidad de semen en ovinos, las cuales fueron clasificadas como buenos congeladores y malos congeladores.
- Los ovinos que fueron clasificados como buenos congeladores mostraron porcentajes mejores de motilidad y viabilidad espermática, respecto a los clasificados como malos congeladores.
- Los espermatozoides congelados-descongelados provenientes de ovinos clasificados como buenos congeladores, mostraron patrones cinéticos de velocidad (VSL, VCL y VAP) superiores a los malos congeladores.

VIII. APORTACIONES

- Como resultado del presente trabajo se realizó guía para acreditación de laboratorios de procesamiento de semen.
- Con la presente investigación, se enfatiza la importancia de la categorización de la congelabilidad del semen, con el objetivo de utilizar semen de ovinos buenos congeladores en programas de mejoramiento genético conjuntamente con la inseminación artificial en condiciones de trópico de Guerrero.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar Morales, G. F., Amaro Sánchez, K. K., Hernández Moreno, G. (2013). Evaluación de dos diluyentes para la conservación de semen ovino: Yema de huevo vs lecitina de soya. Ciudad de México: Universidad Autónoma Metropolitana.
- Aisen, E. G., 2004. Reproducción ovina y caprina. 1 ed. Buenos Aires: Inter-medica.
- Aisen, E.G.; Venturino, A. (2004) Recolección y evaluación de semen. En Reproducción ovina y caprina. Ed. Aisen, E. Inter-Medica. Buenos Aires, Argentina. Pp. 55-69.
- Aké López, J. R., Aké Villanueva, N., Aké Villanueva, J., Segura Correa, J. C. (2017). Evaluación reproductiva del macho ovino. Editorial Académica Española.
- Aké, N. Y. (2014). Características seminales y conducta sexual a través del año en ovinos Pelibuey en el trópico. Universidad Autónoma de Yucatán, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- Álvarez, M.; Kaabi, M.; Boixo, J.C.; Anel, E.; Chamorro, C.A.; Martínez, S; Anel, L. (2000) Características seminales de las razas ovinas Churran y Assaf. SEOC, Teruel, España. Pp: 567-569.
- Amann, R. Pickett, B., 1987. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. Journal of equine veterinary science, Volumen 7, pp. 145-173.
- Arteaga C, J. D. (2006). Situación de la ovinocultura y sus perspectivas. Hidalgo, México: Memorias de Primera semana nacional de ovinocultura.
- Ávila, L. M., Madero, J. I., López, C., León, M. F., Acosta, L., Gómez, C., Reguero, M. T. (2006). Fundamentos de criopreservación. Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología, 57(4), 291-300.
- Bamba, K. (1988). Evaluation of acrosomal integrity of boar spermatozoa by bright field microscopy using an eosin-nigrosin stain. Theriogenology, 29(6), 1245-1251. doi:10.1016/0093-691X (88) 90004-0
- Berlinguer, F., Madeddu, M., Pasciu, V., Succu, S., Spezzigu, A., Satta, V., Naitana, S. (2009). Semen molecular and cellular features: these parameters can

- reliably predict subsequent ART outcome in a goat model. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 7(125). doi:10.1186/1477-7827-7-125
- Brito, F. I., Valencia, M. J., Balcázar, S. A., Angulo, M. R., Mejía, V. O. (2004). Congelación de semen de carnero en pellets con los diluyentes Tris-glucosa-yema de huevo o Lactosa-yema de huevo. *Avances en investigación agropecuaria*, 8(2).
- Buitrago, J. M., Pérez, L. M., 2008. Comparación de dos diluyentes para la criopreservación de semen ovino, Bogotá: Facultad de Medicina Veterinaria - Universidad la Salle.
- Calvin, H. I., Bedford, J. M. (1971). Formation of disulphide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. *J. Reprod. Fertil. Suppl*, 13, 65-75.
- Canton, G. C., Bores, Q. R., Baeza, R. J., Quintal, F. J., Santos, R. R., Sandoval, C. C. (2009). Energy Retention of F1 Pelibuey Lambs Crossed with Breeds for Meat Production. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 8(12), 2655-2661.
- Cárdenas G. MA., Aké L. JR., Centurión C. F., Magaña M. JG. (2012) The breed and season effects on scrotal circumference and semen characteristics of hair sheep rams under tropical conditions. *Reproduction in Domestic Animals*. 47: 92 – 94.
- Casas, I.; Sancho, S.; Briz, M.; Pinart, E.; Bussalleu, E.; Yeste, M.; Bonet, S. (2009) Fertility prediction of boar ejaculates assessed by functional sperm parameters and sperm proteins. *Science Direct*, Volumen 72, pp. 930-948.
- Cebrián, J.; Muño-Blanco, T.; Pérez-Pé, R.; Casao, A. (2010) Manejo y conservación del semen. *Manejo reproductivo en ganado ovino*. Ed. Servet. Zaragoza, España. Pp. 127-135.
- Cecere, J. T. (2014). Eosin-Nigrosin Staining in the evaluation of sperm. En J. J. Dascancio, & P. M. McCue, *Equine Reproductive Procedures* (págs. 373-376). John Wiley & Sons, Inc.
- Chaveiro, A., Liu, J., Engel, B., Critser, J. K., Woelders, H. (2006). Significant variability among bulls in the sperm membrane permeability for water and

- glycerol: Possible implications for semen freezing protocols for individual males. *Cryobiology*, 53(3), 349-359. doi:10.1016/j.cryobiol.2006.08.005
- Cheng, C. Y., Mruk, D. D. (2010). The biology of spermatogenesis: the past, present and future. *Philosophical transactions of the royal society*, 365, 1459-1463. doi:10.1098/rstb.2010.0024
- Chi-Santiago, PA. (2009) Evaluación de la capacidad reproductiva, libido y capacidad de servicio en cuatro razas de ovinos de pelo bajo condiciones tropicales. Tesis de licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yucatán, México.
- Cueto, M., Gibbons, A., Bruno, M. M., Fernández, J., 2016. Manual de obtención, procesamiento y conservación del semen ovino. 2a. ed. s.l.: INTA.
- Curry, M. (2000) Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Reviews of Reproduction*. 5: 46-52.
- Daza, J. 1994. Inseminación artificial y andrología bovina. Editorial Multimpresos. Montería (Córdoba).
- Delgado C, B. E. (2013). Evaluación espermática de semen de ovino tratado por la técnica de gradiente de densidad. Lima, Perú: Universidad Ricardo Palma, Facultad de Ciencias Biológicas.
- Druart, X., Gatti, J. L., Huet, S., Dacheux, J. L., Humblot, P. (2009). Hypotonic resistance of boar spermatozoa: sperm subpopulations and relationship with epididymal maturation and fertility. *Reproduction*, 137(2), 205-213. doi:10.1530/REP-08-0225
- Dyce, K., Sack, W., Wensing, C. (2007). *Anatomía Veterinaria* (3a. Edición ed.). Ed. McGraw-Hill Interamericana.
- Essawe, E.M., Johannisson, A., Wulf, M., Aurich, C., Morrell, J.M. 2018. Addition of seminal plasma to thawed stallion spermatozoa did not repair cryoinjuries. *Animal Reproduction Science* (196) 48-58
- Essawe, E.M., Wallgren, M., Wulf, M., Aurich, C., Macías, B., Sjunnesson, Y., Morrell, J. 2018. Seminal plasma influences the fertilizing potential of cryopreserved stallion sperm. *Theriogenology* (115) 99-107

- Evans, G., Maxwell, W. (1990). Inseminación artificial de ovejas y cabras. Zaragoza, España: Ed. Acribia.
- Fernández, A., Gonzalvo, M. d., Ruiz, R., Zamora, S., Roldán, M., Rabelo, B., Castilla, J. A. (2009). Fundamentos de criobiología espermática para bancos de semen. *ASEBIR*, 14(1), 17-25.
- Fitzgerald, J., Morgan, G. (2007). Reproductive physiology of the ram. In R. Youngquist, & W. Threlfall, *Current therapy in large animal theriogenology* (2nd Edition ed., pp. 617-620). Elsevier.
- Gallego, V., Herranz-Jusado, J. G., Rozenfeld, C., Pérez, L., Asturiano, J. F. (2018). Subjective and objective assessment of fish sperm motility: when the technique and technicians matter. *Fish Physiol Biochem*, 6(44), 1457-1467. doi:10.1007/s10695-018-0505-1
- García, W. C., 2014. Optimización de los protocolos de crioconservación de semen ovino de las razas autóctonas en peligro de extinción Xisqueta y Aranesa. s.l.: Universidad Autónoma de Barcelona.
- Garner, D., Hafez, E. (2002). Espermatozoides y plasma seminal. En E. Hafez, & B. Hafez, *Reproducción e inseminación en animales* (7a. Edición ed., págs. 98-112). México, DF.: Ed. McGraw-Hill Interamericana.
- Gil, M. A., Roca, J., Cremades, T., Hernández, M., Vázquez, J. M., Rodríguez-Martínez, H., Martínez, E. A. (2005). Does multivariate analysis of post-thaw sperm characteristics accurately estimate in vitro fertility of boar individual ejaculates? *Theriogenology*, 64(2), 305-316. 10.1016/j.theriogenology.2004.11.024
- Gillan, L.; Evans, G.; Maxwell, W.M.C. (2005) Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*, 63:445-457.
- González Urdiales, R.; Tejerina, F.; Domínguez, J.C.; Alegre, B.; Ferreras, A.; Peláez, J.; Bernal, S.; Cárdenas, S. (2006) Técnicas de análisis rutinario de la calidad espermática: motilidad, viabilidad, concentración, resistencia osmótica y morfología espermática. "Manual de técnicas de reproducción asistida en porcino" Universidad de Girona y Red temática nacional de reproducción porcina, Gerona, España. Pp: 19-38.

- Hafez, E. (2002). Anatomía del aparato reproductor del macho. En E. Hafez, & B. Hafez, Reproducción e inseminación artificial en animales (7a ed., págs. 3-12). México, DF.: Ed. McGraw-Hill.
- Hernández, M., Roca, J., Ballester, J., Vázquez, J. M., Martínez, E. A., Johannisson, A., Rodríguez-Martínez, E. (2006). Differences in SCSA outcome among boars with different sperm freezability. *International Journal of Andrology*, 29(6), 583-591. 10.1111/j.1365-2605.2006.00699.x
- Holt, W.V. (2000) Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology.*, 52: 47-58.
- Holt, W. V.; Medrano, A.; Thurston, L. M.; Watson, P. F. (2005) The significance of cooling rates and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. *Theriogenology.*, 63: 370-382.
- INEGI. (1995). Anuario estadístico de los Estados Unidos Mexicanos. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Información.
- INEGI. (2009). Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Recuperado el 6 de marzo de 2019, de http://www3.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos_geograficos/12/12029.pdf
- INEGI. (2013). VIII Censo Agrícola, Ganadero y Forestal 2007. México, DF: Instituto Nacional de Estadística y Geografía.
- Jiménez, F. M., Puchades, S., Mocé, E., Viudes de Cartro, M. P., Vicente, J. S., Rodríguez, M. (2004). Use of Powdered egg yolk vs fresh egg yolk for the cryopreservation of ovine semen. *Reproduction in Domestic Animals*, 39(6), 438-441. doi:10.1111/j.1439-0531.2004.00537.x
- König, H., Liebich, H. (2005). Anatomía de los animales domésticos. Tomo II. Editorial Medica Panamericana.
- Leahy, T., Gadella, B. M. (2011). Sperm surface changes and physiological consequences induced by sperm handling and storage. *Reproduction*, 142(6), 759-778. doi:10.1530/REP-11-0310
- Ledesma, A., Zalazar, L., Fernández-Alegre, E., Hozbor, F., Cesari, A., & Martínez-Pastor, F. (2017). Seminal plasma proteins modify the distribution of sperm

- subpopulations in cryopreserved semen of rams with lesser fertility. *Anim Reprod Sci*, 184, 44-50. 10.1016/j.anireprosci.2017.06.015
- Luna, C., Yeste, M., Rivera del Alamo, M., Domingo, J., Casao, A., Rodriguez-Gil, J., Muiño-Blanco, T. (2017). Effect of seminal plasma proteins on the motile sperm subpopulations in ram ejaculates. *Reprod. Fert. Develop*, 29, 394-405.
- Martínez, G. S., Aguirre, O. J., Zepeda, G. J., Ulloa, C. R., Figueroa, M. R., Macías, C. H., Moreno, F. L. (2009). La ovinocultura de Nayarit, México. *Fuente*, 1(2), 12-16.
- Martínez-Partor, F., Tizado, E. J., Garde, J. J., Anel, L., de Paz, P. (2011). Statistical series: Opportunities and challenges of sperm motility subpopulation analysis. *Theriogenology*, 75(5), 783-795. 10.1016/j.theriogenology.2010.11.034
- Martínez-Pastor, F., García-Macias, V., Alvarez, M., Herraez, P., Anel, L., de Paz, P. (2005). Sperm subpopulations in Iberian red deer epididymal sperm and their changes through the cryopreservation process. *Biology of reproduction*, 72(2), 316-327. 10.1095/biolreprod.104.032730
- Medrano, A. Holt, W., 1998. Variación individual en la susceptibilidad del semen porcino al congelado-descongelado. *Arch. Zootec.*, Volumen 47, pp. 319-327.
- Mejía, V.O. (2017) Recolección, evaluación, dilución y congelación de semen en ovinos. Memorias curso "Manejo de semen (fresco y congelado) e inseminación artificial en ovinos". Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Mireles M. E.J. (2015). Producción de corderos en praderas nativas suplementadas con vainas de *Acacia cochliacantha*, en el trópico seco. Tesis, Instituto de Ciencia Animal, Mayabeque, Cuba.
- Morales, C. L., Aragón, M. A., Pescador, S. N., Salazar, G. F. (2012). Swim-Up procedure in boar semen improves motility and viability but recovered sperm could carry active caspases and chromatin damage. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 11(4), 431-437. doi:10.3923/javaa.2012.431.437
- Muiño, R., 2008. Evaluación de la motilidad y viabilidad del semen bovino mediante el uso de sistemas CASA y citometría de flujo: identificación de

subpoblaciones espermáticas, s.l.: Facultad de Veterinaria - Universidad de Santiago de Compostela.

- O'Meara, C.M.; Hanrahan, J.P.; Prathalingam, N.S.; Owen, J.S.; Donovan, A.; Fair, S.; Ward, F.; Wade, M.; Evans, A.C.O.; Lonergan, P. (2008) Relationship between in vitro sperm functional tests and in vivo fertility of rams following cervical artificial insemination of ewes with frozen-thawed semen. *Theriogenology.*, 69: 513-522.
- Okazaki, T., Abe, S., Yoshida, S., Shimada, M. (2009). Seminal plasma damages sperm during cryopreservation, but its presence during thawing improves semen quality and conception rates in boars with poor post-thaw semen quality. *Theriogenology*, 71, 491-498. doi:10.1016/j.theriogenology.2008.08.014
- Orona Castillo, I., López Martínez, J. D., Vázquez Vázquez, C., Salazar Sosa, E., Ramírez Ramírez, M. E. (2014). Análisis microeconómico de una unidad representativa de producción de carne de ovino en el estado de México bajo un sistema de producción semi intensivo. *Revista mexicana de agronegocios*, 34, 720-728.
- Park, C. S., Yi, Y. J. (2002). Comparison of semen characteristics, sperm freezability and testosterone concentration between Duroc and Yorkshire boars during seasons. *Anim Reprod Sci*, 73(1-2), 53-61. doi:10.1016/S0378-4320(02)00129-X
- Pelletier, J.; Chemineau, P.; Delgadillo, J.A. (1988) Seasonality of sexual activity and its photoperiodic control in the adult ram and he-goat. *Proc. 11th Int. Cong. Anim. Reprod. AI, Dublin*, 5:211-219.
- Peña, F. J., Rodríguez, H. (2006). *Citometría de flujo: aplicaciones en el estudio del espermatozoide porcino*. Gerona, España: Universidad de Gerona y Red temática nacional de reproducción porcina.
- Pérez, B.; Mateos, E. (1996) Effect of photoperiod on semen production and quality in bucks of Verata and Malagueña breeds. *Small Ruminant Research*. 23 (1), 23-28.

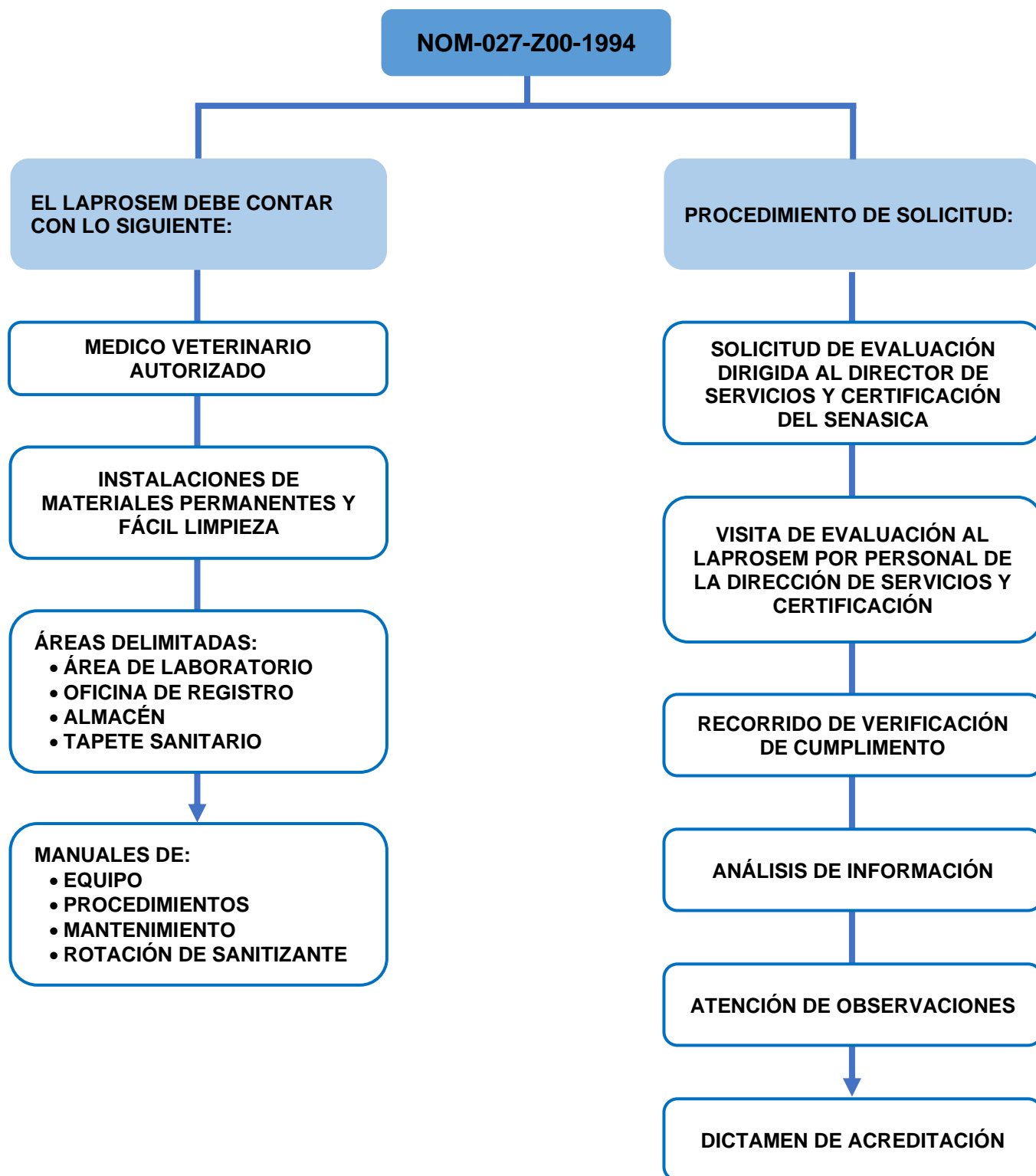
- Pérez, H. P., Vilaboa, A. J., Chalate, M. H., Candelaria, M. B., Díaz, R. P., López, O. S. (2011). Caracterización del sistema producto ovino en el estado de Veracruz, México. *Revista Científica, FCV-LUZ*, XX1(4), 327-334.
- Pichardo, A. I., Aragón-Martínez, A., Ayala-Escobar, M. E., Domínguez-Vara, I. A. (2010). Viability tests, active caspase-3 and -7, and chromatin structure in ram sperm selected using the swim-Up procedure. *Journal of andrology*, 31(2), 169-176. 10.2164/jandrol.108.007021
- Polge, C., Smith, A.U., Parkes, A.S. (1949) Revival of spermatozoa after vitrification a dehydration at low temperatures. *Nature* 164: 666.
- Quintero-Moreno, A., Miró, J., Teresa, A., Rodríguez, J.E. 2003. Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology*. 59: 1973 – 1990.
- Rath, D., Niemann, H. (1997). In vitro fertilization of porcine oocytes with fresh and frozen-thawed ejaculated or frozen-thawed epididymal semen obtained from identical boars. *Theriogenology*, 47(4), 785-793. doi:10.1016/S0093-691X(97)00034-4
- Rivas, J., García, A., Toro, M. P., Angón, E., José, P., Morantes, M., Dios, P. R. (2014). Caracterización técnica, social y comercial de las explotaciones ovinas manchegas, centro-sur de España. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias.*, 5(3), 291-306.
- Rodríguez-Martínez, H. (2003) Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? *Reprod. Dom. Anim.*, 38:312-318.
- Ruiz G., L., Sandoval M, R., Santiani A, A. (2015). Evaluación de la calidad espermática del semen ovino posdescongelación al emplear dos fuentes energéticas y dos crioprotectores. *Rev. Inv. Perú*, 1(26), 49-56. 10.15381/rivep.v26i1.10942
- Salamon, S.; Maxwell, W.M.C. (2000) Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci.*, 62: 77-111.
- Secretaría de economía. (2019). Gobierno de México. Recuperado el 7 de agosto de 2019, de <https://www.gob.mx/se/acciones-y-programas/competitividad-y-normatividad-normalizacion>

- SENASICA. (11 de enero de 1996). Gobierno de México. Recuperado el 9 de agosto de 2019, de <https://www.gob.mx/senasica/documentos/nom-027-zoo-1995>
- SENASICA. (17 de septiembre de 2018). Gobierno de México. Recuperado el 12 de agosto de 2019, de <https://www.gob.mx/senasica/documentos/establecimientos-prestadores-de-servicios-zoosanitarios?state=published>
- SENASICA. (2 de octubre de 2019). Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Obtenido de <https://www.gob.mx/senasica/documentos/establecimientos-prestadores-de-servicios-zoosanitarios?state=published>
- Sieme, H., Katila, T., Klug, E. (2004). Effect of semen collection practices on sperm characteristics before and after storage and on fertility of stallions. *Theriogenology* 61: 769-784
- Tabarez, A., García, W., Palomo, M. J. (2017). Effect of the type of egg yolk, removal of seminal plasma and donor age on buck sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*, 149, 91-98. 10.1016/j.smallrumres.2017.01.007
- Terada, T. (2003) Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm protection during freezing. *Biol Reprod.*, 69 (4) 1245-1250.
- Thomas, C. A., Garner, D. L., DeJarnette, J. M., Marshall, C. E. (1997). Fluorometric assessments of acrosomal integrity and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biology of reproduction*, 56(4), 991-998. 10.1095/biolreprod56.4.991
- Urroz, M. (2010). Elementos de anatomía y fisiología animal. Costa Rica: Ed. EUNED
- Valdez, D. (2013). Efecto del dodecil sulfato iónico adicionado a un diluyente libre de yema de huevo sobre la calidad del semen ovino congelado. Cuenca, Ecuador: Universidad de Cuenca.
- Valerio, C. D., García, M. A., Acero, C. R., Castaldo, A., Perea, J. M., Martos, P. J. (2004). Metodología para la caracterización y tipificación de sistemas ganaderos. Documentos de trabajo producción animal y gestión., 1.

- Vélez, A., Espinoza, J. A., De la Cruz, L., Rangel, J., Espinoza, I., Barba, C. (2016). Caracterización de la producción de ovino de carne del estado de Hidalgo, México. *Archivos de zootecnia*, 65(251), 425-428.
- Waterhouse, K.E.; Hofmo, P.O.; Tverdal, A.; Miller, R.R. (2006) Within and between breed differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of boar sperm. *Reproduction.*, 131:887-894.
- Watson, P.F. (1979) The preservation of semen in mammals. *Oxford Reviews of Reproductive Biology*, Finn, C.A. (Ed), Oxford University Press, Oxford, pp. 283-350.
- Watson, P.F. (1990) Artificial insemination and the preservation of semen. *Marshall's physiology of reproduction*. 4th edition. Vol. 2: Reproduction in the male. Ed. Lamming, G.E. Churchill Livingstone, New York, EEUU. 747-869.
- Watson, P.F. (1995) Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing. *Reprod. Fert. Dev.*, 7: 871-891.
- Yeste, M., Estrada, E., Casas, I., Bonet, S., Rodríguez-Gil, J. E. (2013). Good and bad freezability boar ejaculates differ in the integrity of nucleoprotein structure after freeze-thawing but not in ROS levels. *Theriogenology*, 79, 929-939.
- Yeste, M., Estrada, P., Rocha, L. G., Marín, H., Rodríguez-Gil, J. E., & Miró, J. (2015). Cryotolerance of stallion spermatozoa is related to ROS production and mitochondrial membrane potential rather than to the integrity of sperm nucleus. *Andrology*, 3(2), 395-407. 10.1111/andr.291

X. ANEXOS

Anexo 1





UAGro

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO

ANEXO 2

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS

**LABORATORIO DE PROCESAMIENTO DE SEMEN
DE LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA No. 1
(LAPROSEM – FMVZ)**

INTRODUCCIÓN

Al hablar de la reproducción animal nos lleva a pensar en todas las implicaciones de tipo conceptual de esta área. La mayoría de los especialistas que se dedican a esta rama la definen como un proceso complejo, ya que de ello depende la parte fundamental de las especies, su perpetuación y evolución. De esta manera se pretende que el presente manual guíe al personal académico y de apoyo durante la ejecución de las actividades dentro del laboratorio.

OBJETIVO

Este manual tiene como propósito apoyar al personal del laboratorio de reproducción animal, con los conocimientos procedimientos básicos que se realizan dentro de este. Además de que exista una planeación, operación y evaluación de las actividades prácticas de manera coordinada.

OBJETIVO DEL LABORATORIO DE REPRODUCCIÓN ANIMAL

Contribuir en la formación de alumnos a nivel licenciatura y posgrado, con un enfoque en el área de reproducción animal, a través de prácticas, asesorías, investigación y la difusión de actividades en manejo reproductivo a nivel regional, estatal y nacional.

MISIÓN DEL LABORATORIO DE REPRODUCCIÓN ANIMAL

Formar profesionales en reproducción animal para evaluar, controlar y optimizar el manejo reproductivo de los animales domésticos; así como generar y difundir los avances tecnológicos del área reproductiva. Además de brindar servicios a productores que cuentan con problemas reproductivos en las unidades de producción (bovinos, ovinos y caprinos).

VISIÓN DEL LABORATORIO DE REPRODUCCIÓN ANIMAL

Ser un departamento que se involucre con las necesidades de la producción pecuaria y la reproducción de los animales, formando alumnos capaces de dar solución a los requerimientos que exige la producción animal. Así mismo, ser una guía y un impulsor de la generación de conocimientos en las diferentes áreas que involucra el manejo reproductivo de los animales.

LEYES, REGLAMENTOS Y NORMAS OFICIALES MEXICANAS DE APOYO

- Criterios mínimos indispensables para la instalación y equipo de los laboratorios aprobados y/o autorizados – SENASICA.
- Norma Oficial Mexicana. **NOM – 027 – ZOO – 1994**. Proceso zoonosológico del semen de animales domésticos.
- Ley estatal número **491** de Bienestar Animal del Estado de Guerrero P.O. E. G. 26 de diciembre de 2014
- Norma Oficial Mexicana. **NOM-087-ECOL-SSA1-2002**, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico–infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.

REGLAMENTO DE LABORATORIO DE PROCESAMIENTO DE SEMEN

1. Está prohibido ingresar sin ropa adecuada al laboratorio.
2. Está prohibido comer, beber, fumar dentro del laboratorio.
3. Limpiar el área de trabajo y material utilizado en el laboratorio.
4. Utilizar bata blanca dentro del laboratorio.
5. Utilizar guantes de látex y cubre bocas cuando se manipule material biológico
6. Mantener orden y tranquilidad dentro del laboratorio.
7. No utilizar celular dentro del laboratorio

MEDIDAS GENERALES DE SEGURIDAD

1. Cuando se utilicen guantes, estos deberán desecharse en el cesto de basura.
2. Lavarse las manos después de trabajar con material biológico y al haber finalizado la práctica.
3. Desechar material punzocortante como agujas, cuchillos y bisturí en los recipientes destinados para ello.
4. Evitar contacto directo con material biológico.
5. Ingresar con ropa adecuada al laboratorio.
6. Toda persona que deba manejar animales debe estar capacitado y entrenado para las tareas a realizar.
7. Utilizar overol y botas de hule cuando se trabaje fuera del laboratorio.
8. Materiales de cristalería rotos deberán ser recogidos inmediatamente.

1. COLECCIÓN DE SEMEN

La colección de semen depende de la especie animal y debe realizarse en un área limpia y libre de polvo, lavar y secar el vientre y prepucio del semental a colectar, para evitar la contaminación del semen. La frecuencia de obtención de semen está supeditada a la libido de cada semental en particular. El semen se puede obtener mediante tres técnicas: 1) Vagina artificial (VA), 2) Electroeyaculador (EE) y 3) Manual por presión (MP), dependiendo de la especie, se utilizará la técnica de colección más adecuada.

1.1. Vagina artificial (VA)

El método de colección de semen mediante VA, se puede realizar en bovinos, caprinos y ovinos. Se debe seguir los siguientes pasos:

1. Preparar o armar la VA con todos sus componentes (tubo rígido, látex, cono colector, tubo graduado) (Fig. 1)
2. Agregar agua caliente a 42 °C
3. Se procede a la toma del eyaculado, sujetando una hembra en celo u otro macho o un maniquí. La persona encargada de la colección se debe colocar a la derecha del animal y mantener la VA en la mano derecha, con la abertura dirigida hacia el pene, mientras que con la mano izquierda colocada sobre el prepucio y dirigir el pene hacia la abertura de la VA.

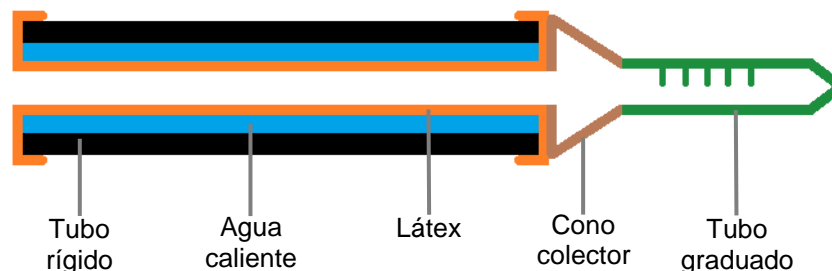


Figura 1. Esquema de vagina artificial

1.2. Electroeyaculador (EE)

EE consiste en estimular eléctricamente y por vía rectal las glándulas accesorias del aparato reproductor del semental, como son las vesículas seminales y la próstata, pero principalmente el centro eyaculatorio que se encuentra en las ramificaciones nerviosas de la columna vertebral, entre las últimas vértebras lumbares y las dos primeras vértebras sacras. La estimulación eléctrica sólo es requerida cuando los machos no pueden entrenarse o se rehúsan a utilizar la VA o cuando hay lesiones o enfermedades que hagan la monta imposible. Este método de colección puede llevarse a cabo en bovinos, caprinos y ovinos.

El equipo de electroeyaculación (Pulsator IV, Lane Manufacturing Inc.) cuenta con dos tipos de funcionamiento (Manual y automático), los cuales se pueden activar desde el controlador de la siguiente manera (Fig. 2):



Figura 2. Caratula del controlador de electroeyaculador.

Modo manual:

1. Encender el controlador con la tecla ON/OF
2. Seleccionar con la tecla MODE el modo manual hasta que el led rojo se encuentre encendido.
3. Con la perilla de intensidad se podrá controlar la intensidad de la descarga eléctrica.

Modo automático:

1. Encender el controlador con la tecla ON/OF
2. Seleccionar con la tecla **MODE** el modo RUN hasta que el led rojo se encuentre encendido.
3. Seleccionar el modo **“Program”**.
4. Iniciar el procedimiento con la tecla **STAR**.
5. Partes del equipo para realizar la electroeyaculación (Fig. 3):

1. Controlador
2. Transductor
3. Mango colector
4. Cargadores de controlador
5. Escrotímetro



Figura 3. Componentes del electroeyaculador

Para llevar a cabo el procedimiento de EE, el operador debe vaciar el contenido fecal del recto del animal para poder introducir el transductor, y se deben seguir los siguientes pasos:

1. Colocar el transductor en el recto con las bandas hacia la pelvis
2. Conectar el transductor al controlador
3. Seleccionar el modo que se utilizará (Manual y automático)

2. EVALUACIÓN DEL SEMEN

El semen está formado por una sola fracción en la que se obtiene los espermatozoides y líquidos seminales procedentes de las glándulas accesorias. A continuación, se describe brevemente la evaluación que se realiza (macroscópica y microscópica):

2.1. Valoración macroscópica:

Volumen: Medido a simple vista directamente en el tubo colector graduado.

Color: Es característico el color blanco cremoso con cierta tendencia a un tinte marfil en relación con el contenido en espermatozoides, siendo los colores anormales más frecuentes: el amarillento por contaminación de orina, el verdoso por procesos purulentos y el rojizo por presencia de sangre.

Olor: Es muy característico, pero en general no es muy intenso, por lo que los olores extraños derivados de contaminaciones con orina o enfermedades infecciosas deben ser excluidos.

Pureza: Los espermatozoides obtenidos en condiciones higiénicas no contienen sustancias patológicas ni cuerpos extraños, tales como sangre, pus, orina o porciones necróticas de la mucosa. Esto indica alteraciones del aparato reproductor o urinario. Pelos, suciedad prepucial, restos de heces indican falta de higiene en la recogida.

pH: Dado por las secreciones ácidas provenientes de la próstata y las secreciones alcalinas de las vesículas seminales. La medición del potencial de hidrógeno es realizada con potenciómetro, o bien con tiras reactivas en una pequeña muestra de semen.

2.2. Valoración microscópica:

Movilidad masal: Se refiere al movimiento global de una gota de espermatozoides puro. Se determina inmediatamente después de la recolección del semen y para ello se utiliza un microscopio compuesto u óptico común con objetivos de 10x y 40x (aumentos), manteniendo el semen y el material a una temperatura de 37 °C. Se coloca una gota de semen sin diluir con una pipeta tipo Pasteur en un portaobjetos y se califica con la escala que se presenta en el siguiente cuadro (cuadro 1).

Cuadro 1. Valoración de las ondas de movimiento (Evans y Maxwell, 1990).

Valor	Clase	Descripción
5	Muy buena	Ondas muy rápidas
4	Buena	Ondas rápidas
3	Regular	Ondas lentas
2	Pobre	Sin ondas (movimiento aislado)
1	Muy pobre	Sin movimiento
0	Mala	Muertos

Motilidad progresiva: Se evalúa de forma individual, mediante la determinación del porcentaje de espermatozoides con movimiento progresivo o de avance, para lo cual se coloca una gota de semen con ayuda de una micropipeta (10µl) en un portaobjetos y después se coloca un cubreobjetos.

Morfología y viabilidad espermática:

Se evalúan por separado colocando una gota de semen sobre un portaobjetos a 37° C y se mezcla con una gota de la tinción Eosina-Nigrosina y se realiza un frotis, después se deja secar a temperatura ambiente durante 1 a 2 minutos. La muestra debe ser observada en el microscopio con el objetivo de 100X, colocando una gota de aceite de inmersión sobre el frotis para después contar 200 espermatozoides. Se determinan el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos (Fig. 4).

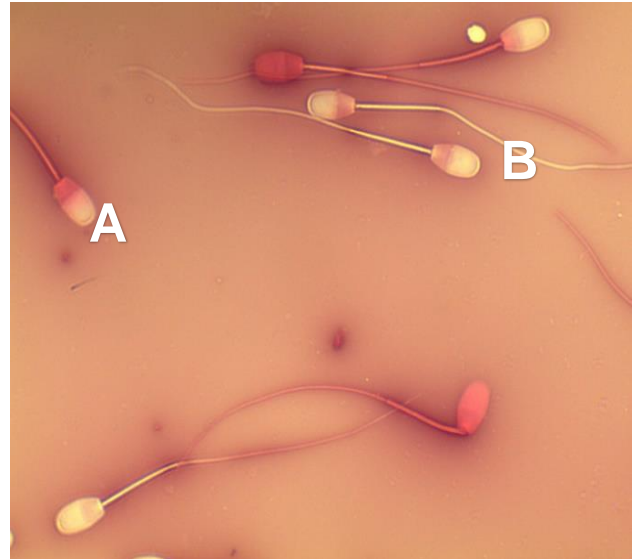


Figura 4. Frotis de espermatozoides. **A:** Espermatozoide vivo; **B:** Espermatozoide muerto.

Las anomalías morfológicas de los espermatozoides a las que habrá que prestar más atención serán las relacionadas con la espermatogénesis o anomalías primarias, es decir, las relacionadas con la estructura, como serán las cabezas grandes (macrocéfalos), pequeñas (microcéfalos) o irregulares (aplanadas) y las cabezas dobles y

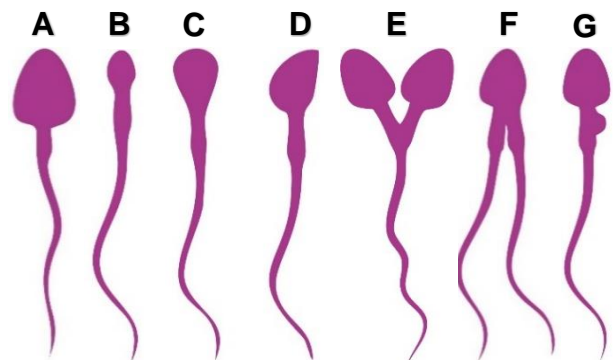


Figura 5. Anormalidades morfología del espermatozoide. (**A:** Macrocéfalo; **B:** Microcéfalo; **C:** Cabeza aplanada; **D:** Cabeza alargada; **E:** Cabeza doble; **F:** Cola doble; **G:** Gota citoplasmática proximal).

colas dobles. Las anomalías secundarias ocurren durante el tránsito de los espermatozoides por el epidídimo, por lo que pueden presentarse en machos sobretrabajados, siendo la más común la presencia de gotas citoplasmáticas o de cabezas desprendidas. Las anomalías terciarias se presentan durante la eyaculación o por un manejo inadecuado del semen, encontrándose por lo general las colas enrolladas o los espermatozoides aglutinados (Fig. 5).

Las muestras con una proporción de espermatozoides muertos mayor al 25% y con más del 20% de anomalías serán indicadoras de machos con fertilidad reducida.

Concentración espermática: Se determina con cámara de Neubauer, después de realizar una dilución del semen de acuerdo a la especie con una solución formolada al 3% en microtubos (Cuadro 2). Después se coloca una gota de la dilución sobre la cuadrícula de la cámara y se realiza un conteo con el objetivo 40x. El conteo se realiza en la cuadrícula central de la cámara de Neubauer contando los espermatozoides que se encuentren dentro de cinco cuadros chicos

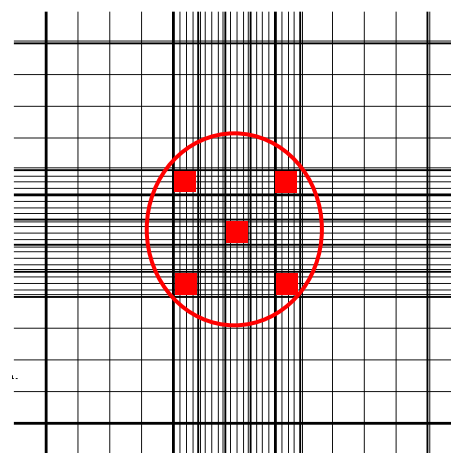


Figura 6. Cámara de Neubauer

(Figura 6). Después de haber realizado el conteo en ambas cámaras se obtiene un promedio para después obtener la concentración total de espermatozoides de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$CE = \# \text{ Esp. contados} \times \# SC \times PC \times FD \times 1,000$$

Donde:

- CE= Concentración espermática/ml
- # Esp. Contados= Numero de espermatozoides contados
- SC= Superficie contada de la cámara (5 cuadros)
- PC= Profundidad de la cámara (10)
- FD= Factor de dilución (1:100; 1:200; 1:400)

Cuadro 2. Microtubos para evaluación de concentración espermática.

Dilución	µL de Sol. formolada	µL de semen	Especie
1:100	990 µL	10 µL	Toro, perro y cerdo
1:200	1990 µL	10 µL	Toro, ovino y caprino
1:400	1995 µL	5 µL	Ovino y caprino

El cuadro 3 muestran los valores de referencia de volumen, concentración espermática y pH para las diferentes especies.

Cuadro 3. Valores de referencia de las características del semen de diferentes especies (Hafez, 1985).

Especie	Volumen (mL)	Concentración espermática (millones/mL)	pH
Toro	4-8	1,500 – 2,500	6.4-7.8
Carnero	0.8-1.5	2,000 – 6,000	5.9-7.3
Macho cabrío	0.5-1.5	1,500 – 5,000	7 aprox.

3. PROCESAMIENTO DE SEMEN PARA CONSERVACIÓN

La obtención y procesamiento del semen de un macho genéticamente superior para su utilización en fresco permite acelerar el mejoramiento de las características productivas de las unidades de producción, al aumentar el número de crías logradas con respecto a las que se obtendrían en servicio natural. Las técnicas de congelamiento de semen posibilitan la difusión de genes, al mismo tiempo que su conservación por períodos prolongados de tiempo.

Para llevar a cabo estos procedimientos es necesario haber evaluado el semen como se indica en la sección número dos. Ya que de esto dependerá la cantidad de diluyente que será agregado al semen para su posterior almacenamiento.

3.1. Dilución del semen

El semen debe ser diluido en diluyente convencional o preparado para cada especie animal. El semen debe ser envasado en pajillas de 0.5 o 0.25 ml, en caso de congelación en nitrógeno líquido (-196° C).

Para determinar el número de dosis que se van a preparar, es necesario conocer la concentración espermática del eyaculado, además del porcentaje de espermatozoides viables.

Pasos a seguir para la dilución del semen:

1. Conocer el número de espermatozoides viables en el eyaculado.
2. Dividir el número de espermatozoides vivos entre el número de espermatozoides que se desea almacenar en las pajillas.
3. Después de saber el número de pajillas que se podrán obtener del eyaculado se deberá realizar una multiplicación por la cantidad en mililitros de la pajilla a utilizar (0.25 o 0.5 ml) para conocer el volumen final de la dilución.
4. posterior conocer el volumen que debe tener la dilución (semen + diluyente) se deberá restar el volumen del eyaculado.
5. Agregar el diluyente al semen en varios pasos cuidando que la temperatura del semen y el diluyente sean las mismas.

Ejemplo:

Se realizó colección de semen con vagina artificial a un toro raza Simmental de 4 años de edad donde se obtuvieron 6 ml de eyaculado. Inmediatamente después se realiza la evaluación de semen (macroscópica y microscópica). Los resultados de la evaluación fueron los siguientes:

Volumen:	6 ml	pH:	7
Concentración espermática:	200,000,000/ml	MM:	4
Viabilidad:	94%	MP:	90%

1. Número de espermatozoides viables en el eyaculado.

Para conocer el número de los espermatozoides viables se debe multiplicar 200,000,000 por 6 ml para conocer la concentración espermática total del eyaculado, después multiplicar por .94 (viabilidad) para ajustar el número de espermatozoides viables.

$$200,000,000/\text{ml (concentración)} \times 6 \text{ ml (volumen)} = 1,200,000,000 \text{ Esp. totales}$$

$$1,200,000,000 \text{ Esp. totales} \times 0.94 \text{ (viabilidad)} = 1,128,000,000 \text{ Esp. vivos}$$

2. Dividir el número de espermatozoides vivos entre el número de espermatozoides que se desea almacenar en las pajillas.

$$\frac{1,128,000,000 \text{ Esp. vivos}}{35,000,000} = 32 \text{ pajillas}$$

3. Después de saber el número de pajillas que se podrán obtener del eyaculado se deberá realizar una multiplicación por la cantidad en mililitros de la pajilla a utilizar (0.25 o 0.5 ml) para conocer el volumen final de la dilución.

$$32 \text{ pajillas} \times 0.5 \text{ ml (pajilla)} = 16 \text{ ml de dilución (Semen + diluyente)}$$

4. Luego de conocer el volumen que debe tener la dilución (semen + diluyente) se deberá restar el volumen del eyaculado.

$$16 \text{ ml (Semen + diluyente)} - 6 \text{ ml (eyaculado)} = 10 \text{ ml de diluyente (agregar)}$$

5. Agregar el diluyente al semen en varios pasos cuidando que la temperatura del semen y el diluyente sean las mismas.

3.2. Refrigeración del semen diluido

El semen deberá refrigerarse hasta alcanzar 5° C durante 2 horas como mínimo o durante 36 horas como un período máximo como lo indique el diluyente comercial que se utilizó para su conservación

3.3. Congelación del semen

La criopreservación es una técnica mediante la cual el material biológico puede ser mantenido viable por tiempo indefinido por medio de la congelación de la célula espermática a muy bajas temperaturas, generando una disminución de su metabolismo celular hasta una etapa de inactividad celular.

El proceso de criopreservación está basado en 2 pasos: 1) enfriamiento progresivo del semen y 2) congelación en vapores de nitrógeno líquido.

Para la congelación de semen se debe haber realizado la dilución con diluyente comercial de acuerdo a la concentración espermática del eyaculado a criopreservar. Después de haber realizado la dilución de semen se debe homogeneizar bien el semen diluido antes de proceder al llenado de las pajillas (0.25 o 0.5 ml) y realizar lo siguiente:

1. Llenar las pajillas pipeteando las dosis seminales a través del tapón triple (algodón-alcohol polivinílico-algodón), sumergiendo el extremo sin tapón en el semen diluido.
2. Para proceder al llenado de las pajillas, se deben tomar del extremo con tapón (para no transmitir el calor de la mano al semen).
3. El alcohol polivinílico del tapón triple gelifica y sella en contacto con el líquido.
4. Crear en el extremo sin tapón, una cámara de aire.
5. Retirar el exceso de líquido en la pajilla con ayuda de un papel absorbente.
6. Sellar la pajilla con golpes suaves y perpendiculares sobre una placa que contenga alcohol polivinílico.
7. Deberá quitarse el excedente de alcohol polivinílico para que las pajillas no se adhieran entre sí.

8. Sumergir las pajillas inmediatamente en un recipiente con agua a temperatura similar (el tapón recién formado gelifica y sella en contacto con el agua).

Es importante que esta operación se lleve a cabo con rapidez y en un ambiente a baja temperatura, así como evitar cambios de temperatura. Pueden utilizarse distintos colores de alcohol polivinílico para identificar eyaculados de diferentes sementales.

Será necesario contar con una nevera de unicel con tapa, así mismo, con un soporte de aluminio para las pajillas. El soporte de aluminio debe alcanzar 5 cm de altura con respecto al nivel del nitrógeno líquido.

Deberá realizar los siguientes pasos:

1. Vaciar nitrógeno líquido a la nevera de unicel
2. Colocar el soporte de aluminio y verificar que el nivel de altura con respecto al nivel del nitrógeno líquido sea de 5 centímetros.
3. Tapar la nevera hasta que se enfríe su interior.
4. Colocar sobre el soporte de aluminio las pajillas, apoyando solo sus extremos.
5. Tapar la nevera y dejar que las pajillas estén expuestas a vapores de nitrógeno líquido durante 15 minutos.
6. Después de transcurrido el tiempo las pajillas se vuelcan directamente en el nitrógeno líquido de la nevera durante 15 minutos.
7. Después se almacenan en termo criogénico en goblet y varillas de aluminio.

3.4. Descongelación de semen

El descongelamiento debe realizarse en baño maría a de 37° C por agitación, de acuerdo a los siguiendo los pasos:

1. Sumergirse en el baño maría a 37° C y con ayuda de una pinza agitarlas durante un minuto bajo el agua (para asegurar un descongelamiento homogéneo).
2. Luego de su descongelamiento, la pajilla debe secarse con una toalla de papel (tratando de no frotarla).
3. Se debe sujetar la pajilla por el extremo de tapón triple (algodón-alcohol polivinílico-algodón) y cortar con ayuda de una tijera el lado opuesto y de manera recta.

4. PREPARACIÓN DE DILUYENTES DE CRIOPRESERVACIÓN

Los diluyentes para semen fresco, enfriado o refrigerado pueden ser sintéticos en base a TRIS o citrato, glucosa o fructosa y yema de huevo, o naturales en base a leche descremada en polvo. Sin embargo, en este laboratorio se utilizan los siguientes diluyentes comerciales: Triladyl[®], AndroMed[®], Steridyl[®] (Minitube, Alemania).

4.1. Preparación de Triladyl[®]

Es un concentrado estéril para la preparación de un diluyente con yema de huevo para la congelación de semen bovino en un solo paso. Triladyl[®] se presta también para la congelación de semen de otros rumiantes por ejemplo ovino, caprino, ciervo. Su contenido en antibióticos corresponde, a partir de una dilución de 1:8 (1 parte de semen a 8 partes de diluyente) al estándar de la UE: EC norma 88/407.

Composición:

- TRIS
- Ácido cítrico
- Azúcar
- Tampones
- Glicerina
- Antibióticos
- Agua de extrema pureza

100 ml del diluyente preparado contienen

- Tilosina 5,7 mg
- Gentamicina 28,6 mg
- Espectinomicina 34,3 mg
- Lincomicina 17,2 mg

Para la preparación del diluyente se requiere de

- Triladyl® concentrado
- Agua pura estéril
- Yema de huevo fresca
- Probeta graduada estéril o matraz de Erlenmeyer
- Papel filtro estéril
- Filtro-embudos estériles

El diluyente listo se compone de una parte de concentrado de Triladyl®, tres partes de agua pura estéril y de una parte de yema de huevo, lo que equivale al 20% de su volumen final. La solución madre se prepara vertiendo primero un frasco completo de concentrado de Triladyl® (250 g) en un matraz graduado, y agregando en varios pasos 750 ml de agua pura estéril. Esta solución madre es estable y puede mantenerse a +5° C por alrededor de una semana.

Para completar el diluyente, deben agregarse a la solución madre 250 ml de yema de huevo fresca. Es posible pesar 250 g de yema de huevo, por cuánto el volumen y peso son equivalentes. Se puede esterilizar la cáscara del huevo pasándolo por una llama.

En seguida se parten los huevos cuidadosamente, tratando de separar yema y clara, vertiendo la yema, sin romperla. Para liberar completamente la yema de la clara y las membranas, se colocan una por una sobre papel de filtro, haciéndolas rodar sobre el papel, que retiene los restos. Finalmente, la yema de huevo se posiciona en el borde del papel filtro, se envuelve en el papel y se presiona para abrir la membrana de tal forma, que la yema escurra libremente, dejando adherida la membrana al papel. Enseguida, se agrega la solución madre a la yema, mezclándola con un agitador magnético o una varilla de vidrio estéril.

Como último paso, el diluyente debiera filtrarse a través de un embudo o gasa estéril. La observación estricta de este orden es de importancia para permitir el total desarrollo de las cualidades de conservación del Triladyl® (agregar la solución madre a la yema, no al revés).

4.2. Preparación de AndroMed®

Es un concentrado estéril para la preparación de un diluyente libre de yema de huevo para eyaculados bovinos. Es apropiado para la congelación del semen y para la conservación de semen en fresco. AndroMed® también se utiliza para semen caprino, ovino y ciervo. Su contenido en antibióticos corresponde – a partir de la dilución en proporción 1:8 (una parte de semen por 8 partes de diluyente) - al estándar de la UE: EC norma 88/407.

Composición:

- Fosfolípidos
- TRIS
- Ácido cítrico
- Azúcar
- Antioxidantes
- Tampones
- Glicerina
- Antibióticos
- Agua de extrema pureza

100 ml del diluyente preparado contienen

- Tilosina 5,7 mg
- Gentamicina 28,6 mg
- Espectinomicina 34,3 mg
- Lincomicina 17,2 mg

Preparación del diluyente listo para su uso:

Para la preparación del diluyente final se tempera el contenido de una botella de AndroMed® (200 ml) a +35° C en un baño maría. Luego se temperan 800 ml de agua de gran pureza a +35° C y se agregan al concentrado. Si se respetan las

proporciones (1 parte de concentrado + 4 partes de agua) también es posible preparar cantidades menores.

Procedimiento de preparación

Temperar el volumen requerido de AndroMed® concentrado en un baño maría a +35° C y vacíelo en una probeta o matraz graduados, de tamaño suficiente. Tempere la cantidad de agua purísima a +35° C y agréguela al concentrado. Homogenice la solución agitándola manualmente o con ayuda de un agitador magnético.

Predilución y examen del semen: se recomienda prediluir el semen ingresado al laboratorio con AndroMed®, en proporción 1:1, dejando escurrir lentamente el diluyente por la pared de vidrio en dirección al semen. El diluyente debe tener la misma temperatura que el eyaculado (+/-1 °C). Mientras se procede al examen (microscopía, determinación de concentración), el semen debe permanecer en el baño maría a +28° a +32° C. La dilución final debe completarse dentro de 10 minutos. El eyaculado diluido desciende en forma pasiva a la temperatura de laboratorio (+20° hasta +23° C) y el semen es envasado a esta temperatura. En forma alternativa, AndroMed® también es adecuado para proceder al envasado a +5° C. El semen diluido debe equilibrarse a +5° C durante por lo menos 2 horas.

Congelación de las pajillas: La congelación de las pajillas se efectúa sobre rampas posicionadas horizontalmente a 4 cm sobre el nivel del Nitrógeno líquido, o en un equipo biocongelador profesional. El tiempo de congelación en el equipo automático debe extenderse para mini-pajillas (0,25 ml) a un mínimo de 7 minutos, para pajillas medianas (0,5 ml) a un mínimo de 10 minutos. A continuación, las pajillas son inmediatamente sumergidas en nitrógeno líquido

Almacenamiento y estabilidad: El concentrado debe ser almacenado en refrigerador a +4 °C hasta +8 °C. La etiqueta del frasco tiene impresa la vida útil mínima. Para la preparación de volúmenes menores de diluyente listo para usar se puede extraer una parte del concentrado para diluirlo en la proporción indicada (1 parte de concentrado + 4 partes de agua). El medio listo para usar puede guardarse

por un máximo de 3 días a +4° C hasta +8° C, así como a -18° C por un período de 12 meses.

4.3. Preparación de Steridyl®

Es un concentrado estéril para la preparación de un diluyente con yema de huevo para la congelación de semen bovino en un solo paso. Se presta también para la congelación de semen de otros rumiantes, por ejemplo, ovino, caprino, ciervo. Su contenido en antibióticos corresponde al estándar de la UE: EC norma 88/407.

Composición

- TRIS
- Ácido cítrico
- Azúcar
- Tampones
- Glicerina
- Yema de huevo
- Antibióticos
- Agua de extrema pureza

100 ml del diluyente preparado contienen

- Tilosina 5,7 mg
- Gentamicina 28,6 mg
- Espectinomicina 34,3 mg
- Lincomicina 17,2 mg

Para la preparación del diluyente se requiere:

- Steridyl concentrado
- Agua purísima estéril
- Probeta graduada estéril o matraz Erlenmeyer

Vaciar el contenido total de un frasco de Steridyl® (500 ml) en una probeta graduada y agregue a ésta en varios pasos 750 ml de agua purísima. En ningún caso proceda en orden inverso. Con eso el diluyente queda listo para su uso y puede conservarse por hasta 3 días en ambiente oscuro a +4° C hasta +8° C.

Después de coleccionar el semen, el eyaculado es mantenido en baño maría a +28° C a +32° C. Una vez evaluado el semen macroscópica y microscópicamente, se prediluye a razón de 1:1 (v/v) en el mismo vaso colector, dejando gotear lentamente el diluyente a lo largo de la pared del vaso. Una vez calculada la dilución final, el semen prediluido es vertido cuidadosamente, a lo largo de su pared, a un envase temperado de mayor tamaño, agregando a continuación el volumen de diluyente aún requerido. Es conveniente agitar el envase durante la dilución, para lograr una adecuada mezcla del semen con el diluyente. Es preferible el uso de una balanza electrónica, en lugar de medir el volumen en envases graduados.

Después de la predilución, el semen puede ser retirado del baño maría, continuando el procesamiento a temperatura ambiente de laboratorio. El envasado en pajillas se hace a temperatura ambiente, o a +5° C dentro de cámara frigorífica o un gabinete.

Congelación de las pajillas: La congelación de las pajillas se efectúa sobre rampas posicionadas horizontalmente a 4 cm sobre el nivel del nitrógeno líquido, o en un equipo congelador profesional a una temperatura de inicio de -120° C. El tiempo de congelación debe extenderse para mini-pajillas (0,25 ml) por un mínimo de 7 minutos, para pajillas medianas (0,5 ml) por un mínimo de 10 minutos. A continuación, las pajillas son inmediatamente sumergidas en nitrógeno líquido.

Almacenamiento, estabilidad: El concentrado debe ser almacenado en refrigerador entre +4° C y +8° C. La fecha de vencimiento aparece impresa sobre la etiqueta del frasco. El diluyente no precalentado y los frascos abiertos de diluyente pueden conservarse por hasta 3 días en refrigerador.

LABORATORIO DE PROCESAMIENTO DE SEMEN

FORMATO DE REPORTE DE EVALUACIÓN SEMINAL

NOMBRE DEL PROPIETARIO	NOMBRE DEL RANCHO	LUGAR	FECHA
ESPECIE	RAZA	EDAD	COLOR
1. EXAMEN FÍSICO GENERAL			
1.1. EXAMEN CLÍNICO	1.2. EXAMEN REPRODUCTIVO EXTERNO		
TEMPERATURA: (ADULTO: MIN 37.7°C, MED 38°C, MAX 38.5°C) FRECUENCIA CARDIACA LATIDOS/MINUTO (L/M): (ADULTOS: MIN 40 L/M, MED 60 L/M, MAX 80 L/M) FRECUENCIA RESPIRATORIA RESPIRACIONES/MINUTO (R/M): (ADULTOS: MIN 10 R/M, MED 20 R/M, MAX 30 R/M) PULSO: (FUERTE, LLENO, CONSTANTE) MOVIMIENTOS RUMINALES: (2-3 MOVIMIENTOS CADA 2 MINUTOS) LINFONODOS: (EXPLORABLES) MUCOSAS: (EXPLORABLES) CONDICIÓN CORPORAL: (ESCALA 1-5)	APARATO LOCOMOTOR: (NORMAL, CLAUDICACION) PREPUCIO: (NORMAL, EVERTIDO, PENDULAR, HERIDO) CIRCUNFERENCIA ESCROTAL: <15 meses: 30 cm; 15-18 meses: 31 cm; 18-21 meses: 32 cm; 21-24 meses: 33 cm; >24 meses: 34 cm TESTICULOS: (CONSISTENCIA) TEMPERAMENTO: (ALTO, NORMAL, BAJO) PENE: (SI ES POSIBLE OBSERVARLO): CORDÓN ESPERMÁTICO: (NORMAL, AUMENTADO DE TAMAÑO) EPIDIDIMOS: (MUY BUENA, BUENA, REGULAR, MALA)		
3.1. EVALUACIÓN MACROSCÓPICA DEL SEMEN			
PARAMETRO	RESULTADO	REFERENCIA	PARAMETRO
VOLUMEN			pH
COLOR			ASPECTO
4.2. EVALUACIÓN MICROSCÓPICA			
PARÁMETRO	RESULTADO		REFERENCIA
CONCENTRACIÓN/ml: CONCENTRACIÓN TOTAL: MOVILIDAD MASAL: (0: INMÓVILES; 1: MOVIMIENTO INDIVIDUAL; 2: MOVIMIENTO MUY LENTO; 3: MOVIMIENTO ONDULADO GENERAL; 4: MOVIMIENTO ONDULADO RÁPIDO; 5: MOVIMIENTO ONDULADO RÁPIDO CON REMOLINOS) MOTILIDAD PROGRESIVA: VIABILIDAD: MORFOLOGÍA: PRIMARIAS: SECUNDARIAS:			

Comentarios: _____

**NOMBRE DEL MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
CED. PROF.**

SATISFACTORIO () CUESTIONABLE () NO SATISFACTORIO ()

Comentarios: Se realizó colección de semen mediante electroeyaculador, obteniendo los resultados presentados anteriormente. Se recomienda cuidar la relación Macho: hembra indicada para la especie (1:30).

Satisfactorio: El toro no presenta alteración evidente alguna que permita sospechar algún problema reproductivo.

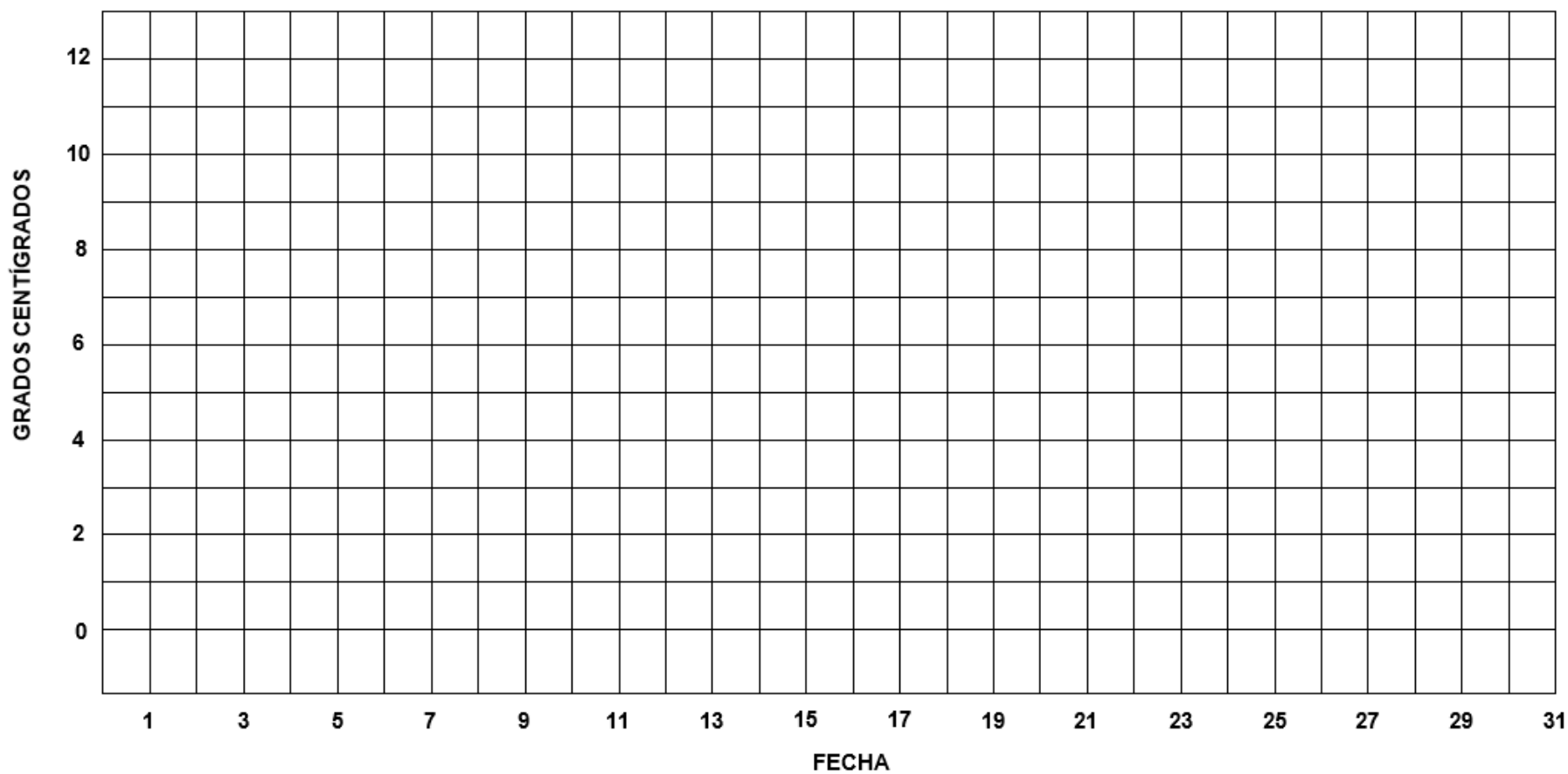
Cuestionable: El toro presenta alguna alteración o anomalía que podría afectar su capacidad reproductiva. Sin embargo, dicha alteración o anomalía no es muy evidente, el grado en que puede afectar la reproducción no es muy claro, o bien es un problema que puede ser pasajero.

No satisfactorio: El toro presenta alteraciones evidentes del tipo de las consideradas como causa determinante o predisponente de problemas reproductivos. Se recomienda no usar al animal como reproductor, pues algún problema reproductivo que se detectaron se puede transmitir a la descendencia, aunque la capacidad reproductiva actual del toro puede ser normal.

LABORATORIO DE PROCESAMIENTO DE SEMEN

BITÁCORA DE REGISTRO DE TEMPERATURA DE REFRIGERADOR

MARCA: _____ **MODELO:** _____ **N. SERIE:** _____ **AÑO:** _____ **MES:** _____



LABORATORIO DE PROCESAMIENTO DE SEMEN

Año: _____ Termo criogénico: _____

