



**UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



**FACULTAD DE MEDICINA
VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**Efecto de la congelación y
descongelación de semen equino,
en dos diluyentes comerciales**

TESIS QUE PRESENTA:

RICARDO AVILA AVILA

PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Tarímbaro, Michoacán; Septiembre, 2009



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

Efecto de la congelación y descongelación de semen equino, en dos diluyentes comerciales

TESIS QUE PRESENTA:

RICARDO AVILA AVILA

Asesor:

José Herrera Camacho.

PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Tarímbaro, Michoacán; Septiembre, 2009

U.M.S.N.H.
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
PROGRAMA ACREDITADO



www.vetzoo.umich.mx

Coordinación de Titulación FMVZ-UMSNH
Documento No. 0431/2009

Se dictamina APROBAR la impresión definitiva del documento

Morelia, Mich., a 23 de Junio de 2009

C. MVZ. ALBERTO ARRÉS RANGEL

Director de la FMVZ-UMSNH

PRESENTE.

Por este conducto hacemos de su conocimiento que la tesis titulada: "EFECTO DE LA CONGELACIÓN Y DESCONGELACIÓN DE SEMEN EQUINO, EN DOS DILUYENTES COMERCIALES", que forma parte del Proyecto de Investigación 6.14 "Tasa de gestación y concentración de progesterona plasmática en ovejas de pelo tratadas con ácido indolacético", aprobado por el H. Consejo de la Investigación Científica de la UMSNH como parte del programa de Investigación 2008, del **P. MVZ. RICARDO ÁVILA ÁVILA**, dirigida por el asesor **DR. JOSÉ HERRERA CAMACHO**, fue *revisada y aprobada* por esta mesa sinodal, conforme a las normas de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

ATENTAMENTE

MG. ALEJANDRA MINERVA MARÍN AGUILAR

Presidente

MVZ. MARCELINO MARTÍNEZ CONTRERAS

Vocal

DR. JOSÉ HERRERA CAMACHO

Vocal

UNIDAD ACUEDUCTO

Av. Acueducto y Tzintzuntzan
Col. Matamoros C.P. 58130
Morelia, Michoacán
Teléfono y FAX: (01443) 314 1463
C.E. direccion@urantia.vetzoo.umich.mx
subdireccion@urantia.vetzoo.umich.mx

UNIDAD POSTA

Carretera Morelia-Zinapécuaro Km. 9.5
Teléfono: (01443) 312 5236 FAX: 312 4176
Municipio de Tarímbaro, Michoacán
C.E. secretario.academico@urantia.vetzoo.umich.mx
secretario.administrativo@urantia.vetzoo.umich.mx
secretario.tecnico@urantia.vetzoo.umich.mx

AGRADECIMIENTOS

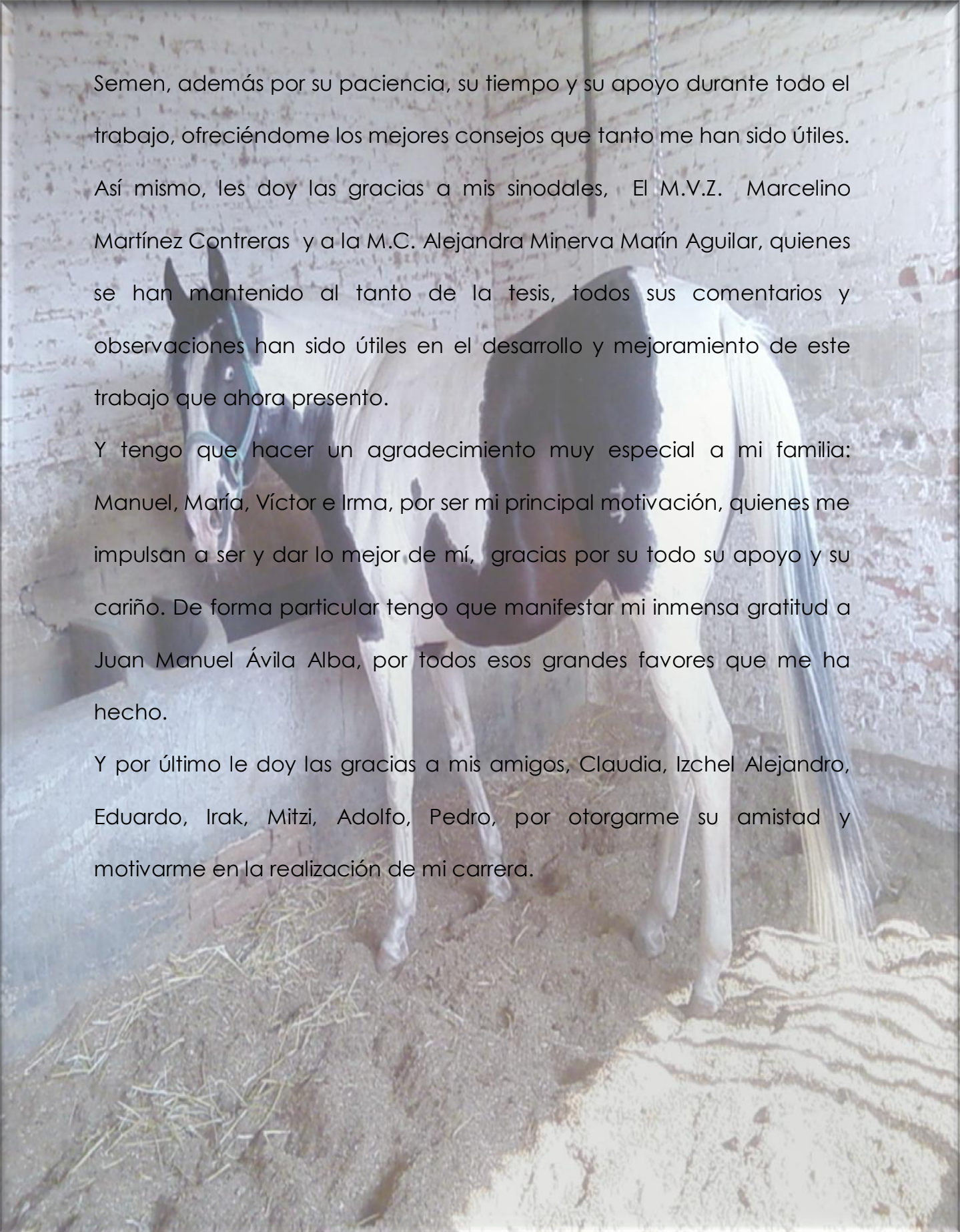
AGRADECIMIENTOS

La presente tesis es en parte producto del gran apoyo de varias personas. Entre ellas el Dr. José Herrera Camacho, quien me brindó su mayor apoyo a lo largo de todo el tiempo, siempre se mostró totalmente interesado en el trabajo y me motivó a hacerlo de la mejor manera posible.

De la misma forma le agradezco al Dr. Abelardo Esquivel Ortiz, por facilitarme los caballos para hacer posible este trabajo, quien me abrió las puertas de su rancho, con la mejor disposición de ayudar. Sin duda alguna, es una de las personas que mayor apoyo me brindado; además tengo que agradecerle su calidad humana, su disposición y la oportunidad que me ha otorgado en su rancho "Estación reproductiva de Michoacán".

De forma general agradezco a todo el personal de la "Estación reproductiva de Michoacán", quien me dio un trato distinguido. Sin la ayuda de ese gran equipo de trabajo, no hubiera podido realizar la extracción del semen.

Debo agradecer especialmente a Irma Toscano Torres, encargada de Laboratorio de Reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por ser la persona que me enseñó todo de la mejor forma posible en la colecta, evaluación, congelación y descongelación de

A white horse with a dark mane and tail is standing in a stable. The horse is facing left and is wearing a blue halter. The stable has a concrete floor with some straw and a brick wall in the background.

Semen, además por su paciencia, su tiempo y su apoyo durante todo el trabajo, ofreciéndome los mejores consejos que tanto me han sido útiles. Así mismo, les doy las gracias a mis sinodales, El M.V.Z. Marcelino Martínez Contreras y a la M.C. Alejandra Minerva Marín Aguilar, quienes se han mantenido al tanto de la tesis, todos sus comentarios y observaciones han sido útiles en el desarrollo y mejoramiento de este trabajo que ahora presento.

Y tengo que hacer un agradecimiento muy especial a mi familia: Manuel, María, Víctor e Irma, por ser mi principal motivación, quienes me impulsan a ser y dar lo mejor de mí, gracias por su todo su apoyo y su cariño. De forma particular tengo que manifestar mi inmensa gratitud a Juan Manuel Ávila Alba, por todos esos grandes favores que me ha hecho.

Y por último le doy las gracias a mis amigos, Claudia, Izchel Alejandro, Eduardo, Irak, Mitzi, Adolfo, Pedro, por otorgarme su amistad y motivarme en la realización de mi carrera.

I N D I C E

1. RESUMEN.....	3
2.INTRODUCCIÓN.....	4
3. REVISION DE LITERATURA.....	5
3.1 Diluyentes del semen.....	6
3.2 Funciones del diluyente.....	7
3.3 Semen	8
3.4 Semen congelado	8
3.5 Estado funcional de la membrana plasmática de los espermatozoides.	12
4. MARCO DEL ESTUDIO	13
4.1 Justificación	13
4.2 Planteamiento del problema	14
4.3 Hipótesis	14
4.4 Objetivo general	14
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
5.1 Ubicación.....	15
5.2 Colecta y evaluación de semen fresco.....	15
5.2.1 Colecta de semen	15
5.2.2 Evaluación macro y microscópica del semen	16
5.3 Preparación de diluyentes, Dilución y Congelación del semen 	17
5.3.1 Preparación de diluyentes	17
5.3.2 Dilución de semen	18
5.3.3 Congelación del semen.....	19
5.4 Evaluación de la movilidad progresiva y viabilidad del semen de garañón en dos diluyentes.....	19
6. RESULTADOS Y DISCUSION.....	21
7. CONCLUSIONES.....	25
8. LITERATURA CITADA.....	26

1. RESUMEN

Los métodos de conservación del semen buscan reducir o detener el metabolismo del espermatozoide y así prolongar su vida fértil. Existen dos métodos de conservación: 1) En estado líquido en refrigeración (0° a 15°C), y 2) criopreservado (-196°C). La fertilidad del semen en estado congelado, es más alta que la del semen en estado líquido después de 24 h de almacenamiento, ya que en este último caso, se reduce en un 10% a 35% por día de almacenamiento. En el presente trabajo, se evaluó la utilización del diluyente comercial triladyl, en semen de garañón, evaluando los porcentajes de movilidad progresiva y de viabilidad con un diluyente comercial para equinos E-Z Freezin LE, utilizado constantemente en la dilución de semen equino. El triladyl mostró ser un diluyente capaz de preservar de mejor manera el semen equino con respecto a el E-Z Freezin, obteniendo un mayor porcentaje de movilidad progresiva y presentando una viabilidad similar en ambos diluyentes.

2. INTRODUCCIÓN

La estación reproductiva de los garañones no esta bien marcada y es posible colectar semen todo el año. Sin embargo, se observan notables variaciones estacionales en tiempo y reacción, numero de montas por eyaculado, volumen de semen libre de gel, numero total de espermatozoides por eyaculado, aglutinación espermática y motilidad en semen fresco y diluido (Hafez y Hafez, 2000).

Las condiciones de trabajo para colectar semen, el estado de salud del animal y la experiencia del personal especializado que opera, son factores que deben tomarse en cuenta para mejorar la calidad del semen. Las diferencias en estos aspectos pueden causar grandes pérdidas económicas para el ganadero y reducir la calidad original del semen, así como también difundir enfermedades que afectan no solamente al semental , si no también a la hembras inseminadas y a su descendencia (González y Soto, 2005).

Los espermatozoides viven fuera del organismo solamente durante un tiempo limitado. Precisamente por eso, cuando el semen colectado se va a utilizar para inseminar deberá usarse lo mas rápidamente posible o proceder a su dilución. Los diluyentes son sustancias que se agregar al eyaculado para conservar su metabolismo, viabilidad y fertilidad (Galina y Valencia, 2008).

3. REVISION DE LITERATURA

La primera vagina artificial fue diseñada por G. Amantea, un profesor de fisiología de la universidad de Roma, en 1914. Este dispositivo se utilizó para recolectar semen de perro. En los años siguientes, muchos investigadores rusos diseñaron vaginas artificiales para el toro, gorañón y el carnero (<http://www.ponypuzzle.com> 16/09/08)

En 1957, el Servicio de Reproductores Americanos inició el uso de nitrógeno líquido como refrigerante para la congelación y almacenamiento de semen (www.monografias.com 20/09/09).

Los métodos de conservación del semen buscan reducir o detener el metabolismo del espermatozoide y así prolongar su vida fértil. Existen dos métodos de conservación: 1) En estado líquido en refrigeración (0° a 15°C), y 2) criopreservado (-196°C). La fertilidad del semen en estado congelado, es más alta que la del semen en estado líquido después de 24 h de almacenamiento, ya que en este último caso, se reduce en un 10% a 35% por día de almacenamiento (Salamon y Maxwell, 2000, Toscano, 2004)

Las bacterias en el semen equino han sido controladas con el uso de diluyentes comerciales que contienen concentraciones de antibióticos adecuados. Sin embargo, el efecto perjudicial de los antibióticos sobre la motilidad espermática puede ser mayor en el almacenamiento (Jasko *et al.*, 2004)

Barrer y Gandier en 1957 se reportó en Canadá el nacimiento del primer potro resultado de la inseminación artificial de una yegua usando semen congelado. Los espermatozoides fueron obtenidos de la cola del epidídimo y congelados en diluyente con 10% de glicerol. De 7 yeguas inseminadas con este semen, una subsecuentemente parió (Pickett *et al.*, 1987)

3.1 Diluyentes del semen

Un diluyente es una solución acuosa que permite aumentar el volumen del eyaculado hasta conseguir las dosis necesarias y preservar las características funcionales de las células espermáticas y mantener el nivel de fertilidad adecuado (<http://www.agroinformacion.com> 25/09/08).

Se han utilizado numerosos diluyentes para la preservación del semen equino refrigerado. La mayoría se basa en leche o subproductos, a los que se les añade otros ingredientes químicos para ajustar el pH y la osmolaridad, así como antibióticos para inhibir el crecimiento bacteriano. En la década de los ochenta comenzó a utilizarse la leche fresca descremada para la preservación del semen equino refrigerado, en forma similar como se ha usado en el caso del semen bovino. Sin embargo, este tipo de leche tiene que ser previamente calentada a temperatura de 92 a 95°C durante 10 minutos para inactivar la lactenina presente en la leche, la cual es tóxica para los espermatozoides de los equinos (Boeta y Zarco, 2000).

En los últimos años el mercado de la leche ha evolucionado de tal forma que es muy fácil encontrar leche descremada ultrapasteurizada, esta última tiene la ventaja de que ha sufrido previamente el proceso de ultrapasteurización durante el cual se inactiva la lactenina, no es necesario calentarla antes de usarla para diluir el semen. Además este tipo de leche no requiere refrigeración ni la adición de ningún otro nutrimento, puede ser un diluyente sumamente práctico, listo para utilizarse tal como sale del envase (Boeta y Zarco 2000).

Se espera que un diluyente sea capaz de preservar la capacidad fecundante de los espermatozoides además de su motilidad; también debe tamponar la acidificación del medio, consecuencia del metabolismo de los espermatozoides y eventualmente aportar nutrientes esenciales de tipo energético (Pickett *et al.*, 1987).

3.2 Funciones del diluyente

Para llevar a cabo su misión el diluyente debe aportar los nutrientes necesarios para el mantenimiento metabólico de la célula espermática (glucosa), la protección frente al shock térmico por frío (BSA), controlar el pH del medio (Bicarbonato, TRIS, HEPES), la presión osmótica (sales NaCl, KCl) y la inhibición del desarrollo microbiano mediante la adición de antibióticos (<http://www.agroinformacion.com> 25/09/09).

El semen que se recolecta para inseminación artificial debe siempre colocarse en un diluyente comercial o que es preparado. Cuando el semen se usa para inseminar poco después de recolectarse,

debe mezclarse con el diluyente en una proporción de 1:1 a 1:3 (semen a diluyente). Se recomienda que la dilución sea más extensa si el semen habrá de almacenarse durante mucho tiempo antes de la inseminación de 1:3 a 1:5 (Hafez y Hafez, 2000)

3.3 Semen

El semen es la suspensión celular líquida que contiene los gametos masculinos (los espermatozoides) y las secreciones de los glándulas accesorios del aparato reproductor masculino. La porción líquida de dicha suspensión, que se forma durante la eyaculación, se conoce como plasma seminal. El volumen eyaculado en los garañones es de 60-100 ml, con una concentración espermática de 150-300 millones/ml (Hafez y Hafez 2000). El volumen seminal del caballo aumenta apreciablemente en el mes de abril durante temporada reproductiva (Frandsen, 1995)

3.4 Semen congelado

En 1803, Lázaro Spallanzani informó que los espermatozoides enfriados con nieve no morían, sino que solo se tornaban inmóviles y que exponerlos al calor recuperaban la motilidad por varias horas (<http://www.monografias.com> 02/10/08)

Anteriormente a 1950, Broughton notó que si los espermatozoides eran separados del plasma seminal, y resuspendidos en un amortiguador que contuviera glicerol y glucosa, alrededor del 25% de

los espermatozoides eran móviles después de congelados a -79°C y descongelados (Pickett *et al.*, 1987)

El semen en estado líquido se almacena a temperaturas que oscilan entre 5°C y 15°C , debido a que cuando el semen se almacena a temperaturas cercanas a los 0°C se producen cambios irreversibles en el espermatozoide (shock térmico), que comprometen la fertilidad. Milovanov (1931) encontró dos procedimientos para evitar éste problema, mediante la reducción gradual de la temperatura de enfriamiento o por la adición de lípidos al diluyente (yema de huevo, testículos, cuerpo lúteo, cerebro y harina de soya) (Salamon y Maxwell, 2000; Toscano, 2004)

El uso de semen congelado para inseminación artificial de yeguas, no ha sido usado extensamente en la industria de los caballos debido a las pobres tasas de gestación que se obtenían (cercanas al 35%), restricciones impuestas por las diferentes asociaciones de equinos registradas y el poco interés de los criadores de equinos en el uso de semen congelado, por lo que las investigaciones a fondo en este tópico seguirán limitadas (Pickett *et al.*, 1987); no obstante, que el uso de IA permitiría incrementar a gran escala el potencial reproductivo de los garañones.

Los índices de preñez con cualquiera de los sistemas de IA utilizados (semen fresco, refrigerado o congelado) se han incrementado

recientemente (1998), lo suficiente como para dar márgenes de confiabilidad comercialmente aceptables (Losinno *et al.*, 2002.)

Se han utilizado varios diluyentes para la congelación del semen. Los diluyentes a base de citrato-glucosa o fructosa-yema de huevo producen tasas de parto bajas y moderadas (17% y 40% respectivamente), con IA cervical. También producen tasas de parto pobres (0-23%) y moderadas (30-45%), cuando se emplea IA cervical (Salamon y Maxwell, 2000).

El Tryladil es un diluyente comercial que contiene agua bidestilada, glicerol, TRIS (hidroximetil aminometano), ácido cítrico, fructosa, tilosina, gentamicina, espectinomicina y lincomicina; el cual se mezcla con yema de huevo en una proporción de 1:1. Este diluyente fue desarrollado originalmente para la conservación del semen bovino, (Mejía, 2004; Toscano 2004).

El Tris, un componente de los diluyentes para la conservación del semen de carnero fue utilizado por primera vez por Salamon y Visser en 1972. Estos autores encontraron que el espermatozoide de carnero tolera concentraciones de Tris de 250 a 400 mM, y obtuvieron tasas de parto del 30 al 57% después de inseminaciones cervicales.

El Triladyl* (glicerol-tris-ácido cítrico-fructosa-antibióticos) es un diluyente elaborado a base de Tris, disponible comercialmente, y elaborado originalmente para la conservación del semen de toro

(Hinsch *et al*, 1997; Gil *et al*, 2000). No existen reportes de la utilización del triladyl como medio para congelar semen equino.

El E-Z Freezin es recomendable para la congelación de semen equino y programas de mejoramiento genético. E-Z Freezin "LE" EDTA lactosa es una formula que contiene el antibiótico ticarcilina.

El E-Z Freezin es una formula de lactosa EDTA que contiene el antibiótico disodium de ticarcilina y es recomendado, para la congelación de semen. La formula de lactosa EDTA es una de varias formulas para congelar semen equino (<http://animalreproductionsystems.com> 05/10/08)

La centrifugación tiene lugar durante 15 minutos a 400 – 500 g por minuto. Cabe mencionar que las primeras veces que se congela semen de un determinado semental se debe comprobar el grado de apelmazamiento de los espermatozoides tras la centrifugación, con el fin de ajustar el tiempo de la misma. Una reducción del 10% de la motilidad de de los espermatozoides post-centrifugación se considera aceptable (<http://www.amasvet.com> 05/10/08).

La dosis necesaria para inseminar con semen de caballo congelado es de 500 millones de espermatozoides vivos en 1 ml, de manera que tras la congelación, la motilidad progresiva esperada debe ser superior al 30% (<http://www.amasvet.com> 05/10/08).

3.5 Estado funcional de la membrana plasmática de los espermatozoides.

El líquido de los oviductos tiene varias funciones, incluida la capacitación e hiperactivación del espermatozoide (Hafez y Hafez, 2000).

Los cambios en la maduración de los gametos masculinos dependen de las secreciones del epidídimo y del tiempo de transporte, esenciales para que el espermatozoide pueda fecundar al ovulo. Para lograr ser fértil y poder fusionarse al gameto femenino, el espermatozoide experimenta varias secuencias de cambios en su maduración, algunas conocidas y otras desconocidas, incluyendo la capacitación y las reacciones acrosomales (Hafez y Hafez, 2000).

La capacitación espermática se puede definir como el conjunto de modificaciones a nivel molecular que ocurren en el espermatozoide después de la maduración en el epidídimo, y que le confieren la capacidad de fecundar al ovocito. In Vitro, este proceso puede ser mimetizado, eliminado el plasma seminal por distintos sistemas de lavado e incubando a los espermatozoides en medios de composición comparable a la del fluido oviductal (Matas *et al.*, 2004).

La hiperactivación espermática ocurre principalmente en el oviducto casi al momento de la ovulación y puede ser decisiva en el

transporte final de los gametos, la capacitación completa de estos y la reacción acrosomal (Hafez y Hafez, 2000).

La reacción acrosomal (RA), en estudios *in vitro*, puede ser inducida por incubación de los espermatozoides en un medio o por la exposición a los inductores. Se han utilizado numerosos inductores fisiológicos y no fisiológicos de la RA. Estos incluyen progesterona, fluido folicular y las secreciones de las células del *cumulus oophorus* que contienen prostaglandinas, sulfato de esterol, glicosaminoglicanos y neoglicoproteínas (Santiane *et al.*, 2006)

4. MARCO DEL ESTUDIO

4.1 Justificación

De acuerdo a los resultados obtenidos en el mundo, es aceptando que las tasas de preñez media por celo con semen congelado están alrededor del 30 - 40 %, comparado con el 65 % o más con el semen fresco o refrigerado. Además, se ha reportado una variación considerable en las tasas de preñez alcanzadas con semen congelado (de 0 - 75 %) atribuible tanto al potro como a la experiencia de la persona que maneja el semen e insemina las yeguas (<http://www.caballoyrodeo.cl> 07/10/08).

La motilidad del semen bovino post-descongelación usando triladyl, es cercana al 50% (Carballo *et al.*, 2008), siendo este diluyente utilizado para congelar una serie de eyaculados de otros mamíferos,

como ovinos, caprinos, camélidos y caninos, como igualmente de diversas especies exóticas. No existen reportes que evalúen la movilidad progresiva post-descongelación del semen equino diluido en triladyl.

4.2 Planteamiento del problema

¿Cuál será el efecto en los espermatozoides de garañón, mediante la utilización del diluyente triladyl para su posterior conservación, de acuerdo con los resultados previamente obtenidos con el E-Z Freezing?

¿El diluyente triladyl, tendrá el mismo efecto benéfico en la conservación del semen de garañón, así, como se ha logrado comprobar sus buenos resultados de conservación en el semen de toro?

4.3 Hipótesis

El semen de garañón criopreservado, sin haber sido centrifugado ni retirado el líquido seminal, en un diluyente comercial diseñado para bovinos (triladyl), mantiene un mayor porcentaje de viabilidad y movilidad progresiva de los espermatozoides en comparación con un diluyente especialmente diseñado para equinos.

4.4 Objetivo general

- 1 Determinar el porcentaje de movilidad progresiva y viabilidad de los espermatozoides de semen de garañón diluido en dos diluyentes.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Ubicación

El trabajo se realizó en conjunto en la posta zootécnica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la UMSNH y la estación reproductiva en Puruándiro Michoacán. La FMVZ se localiza en el Km. 9.5 de la carretera Morelia-Zinapécuaro, mientras que la estación reproductiva se ubica en la calle Emilia Carranza N° 735 colonia centro del municipio de Puruandiro, Michoacán.

5.2 Colecta y evaluación de semen fresco

5.2.1 Colecta de semen

Se obtuvieron tres muestras de semen fresco de tres garañones de la raza cuarto de milla, adultos y con experiencia reproductiva. La colección del semen se realizó con una vagina artificial tipo Colorado (Figura 1); la cual consta de un tubo rígido (a), una funda de látex que envuelve por dentro al tubo (b), un cono de látex (c) que sostiene en un extremo al tubo colector (d).



Figura 1. Vagina artificial para colecta de semen en garañones

5.2.2 Evaluación macro y microscópica del semen

En la evaluación macroscópica se determinó el volumen, color, consistencia y olor. En la microscópica se evaluó, la movilidad masal, movilidad progresiva, viabilidad, mortalidad, concentración espermática y anomalías morfológicas.

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

Movilidad progresiva: Inmediatamente después de hacer la valoración masal del semen, se colocó un cubreobjetos sobre la gota de semen, para realizar la valoración individual de los espermatozoides y obtener así la movilidad progresiva que en promedio fue del 90%.

Viabilidad y morfología: Se realizó mediante un frotis; primeramente se colocó una gota de semen sobre un portaobjetos, posteriormente se agregó una gota de la tinción eosina-nigrosina, se mezcló con la punta de otro portaobjetos la tinción con la gota de semen fresco, finalmente se deslizó el portaobjetos sobre otro para realizar el frotis.

Concentración espermática: Se determinó con una cámara de Neubauer, se realizó la dilución del semen; en una parte de semen por 200 partes de agua común en una pipeta de toma. Se retiraron 3 a 4 gotas de agua de la pipeta de toma y finalmente se agregó una gota

con el semen diluido, en cada uno de los surcos de la cámara de Neubauer; obteniendo concentración promedio de 12,936,000,000

Cuadro 1. Valores normales de eyaculado de garañón

	(Hafez, 2000)	Davies Morel, 2005
Volumen eyaculado	60-100ml	30-250
Concentración de espermatozoides X 10 ⁶ /ml	150-300	30-600
Espermatozoides/eyaculado (miles de millones)	5-10	
Espermatozoides móviles	40-75	Mínimo 40%
Longevidad a temperatura ambiente		45% vivos después de 3 h 10% vivos después de 8 h
pH		6,9-7,8
Cociente entre vivos y muertos		6,0:4,0

Fuente Hafez, 2000 y Davies Morel, 2005

5.3 Preparación de diluyentes, Dilución y Congelación del semen

5.3.1 Preparación de diluyentes:

El triladyl fue preparado (100ml), en 60 ml de agua desionizada, 20 ml de yema de huevo y 20 ml de la mezcla tris. El E-Z freezin a diferencia del triladyl, el producto comercial está listo para usarse sin la adición de componentes extras, solo el semen.

Cuadro 2. Composición química del tryladil y del E-Z Freezin

Triladyl		E-Z Freezin	
Agua bidestilada	100 ml	Yema de huevo	2,5 g
Glicerol	3.63 g	Lactosa	6,6 g
TRIS (hidroximetil aminometano)	1.99 g	Glucosa	0,7 g
Acido cítrico	0.50 g	Citrato de sodio	0,16 g
Fructosa	100,000	Bicarbonato de sodio	0,015
Pencilina	UI	g	
Estreptomicina	100 mg	EDTA disódico	0,15 g
Yema de huevo	14 ml	Glicerol	3,5 ml
		Ticarcilina disódica	0,15 g

Fuente Salamon y Maxwell, 2000 y Villaraña

5.3.2 Dilución de semen

El semen que cumplió con los valores promedio de la evaluación fue utilizado para su dilución, mientras que el que se encontraba por debajo del promedio se desechó.

El semen se diluyó en triladyl (diluyente utilizado en cerdos y rumiantes) y E-Z Freezin (diluyente específico para semen de garañón), ambos diluyentes fueron mantenidos en baño maría a una temperatura de 38°C durante 20 minutos, para no causar un choque frío a los espermatozoides al momento de ser mezclados con los extensores. Se

utilizaron pajillas de 0,5 para almacenar el semen, con una concentración promedio de 500,000,000 espermatozoides, las pajillas fueron selladas con alcohol polivinílico para ser colocadas 5 de estas dentro de cada gobelet.

Los bastoncillos que contenían las pajillas fueron mantenidos en refrigeración a temperatura de 5°C, durante tres horas, con el motivo de estabilizar la temperatura de los espermatozoides, antes de ser expuestos a las bajas temperaturas del nitrógeno líquido para su posterior congelación de las pajillas.

5.3.3 Congelación del semen

El semen, una vez que ha pasado tres horas como tiempo de equilibrio, fue congelado mediante la exposición de las pajillas a vapor de nitrógeno durante aproximadamente 10 a 12 minutos, para posteriormente ser sumergidas en nitrógeno líquido a una temperatura de -196°C durante 2 a 3 minutos, y almacenadas en un termo criogénico de 20 L, siendo identificadas anteriormente.

5.4 Evaluación de la movilidad progresiva y viabilidad del semen de garañón en dos diluyentes.

La evaluación de la movilidad progresiva y de la viabilidad del semen en los dos diluyentes utilizados en el presente estudio se realizó previa descongelación del semen almacenado en nitrógeno líquido a -196 °C. El semen se descongeló a intervalos de 8 días, se tomaron de 5 a 7 pajillas de cada uno de los tratamientos (Triladyl y E-Z Freezin), que

fueron expuestas a temperatura ambiente durante 10 a 15 segundos y después introducidas al baño maría a una temperatura de 38 °C. Se evaluaron en cada pajilla las variables señaladas y se promedió el valor obtenido de todas ellas.

Los datos fueron analizados mediante estadística descriptiva, utilizando una hoja electrónica (EXCEL, Microsoft 2007)

6. RESULTADOS Y DISCUSION

Al ser comparada la movilidad progresiva de ambos diluyentes, se observa una ligera superioridad del semen diluido en el triladyl, con una movilidad progresiva del 35% en promedio, en comparación con una movilidad del 26% de movilidad progresiva (Figura 2). En ambos tratamientos se observó que a medida que se incrementaba el tiempo de conservación del semen en nitrógeno, la movilidad progresiva decrecía.

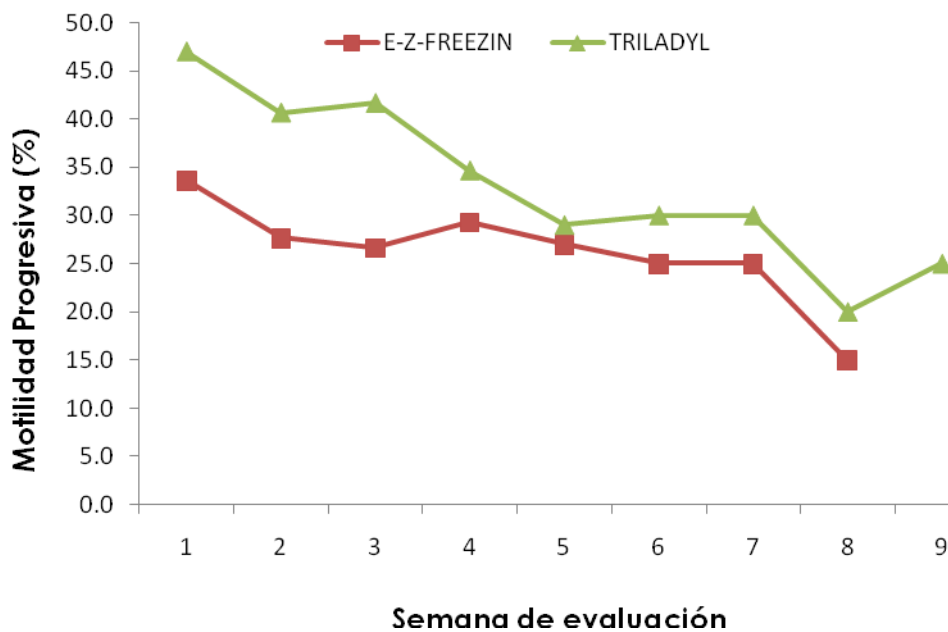


Figura 2. Motilidad Progresiva del semen de garañón descongelado diluido en triladyl y E-Z-Freezin.

Los resultados de movilidad obtenidos en el presente estudio pueden ser bajos si se considera que un semental con potencial reproductivo durante la época reproductiva, debe contener en el semen fresco después de los primeros cinco días de reposo sexual $\geq 8-10$ billones de

espermatozoides en el primer eyaculado y ≥ 4 billones en el segundo eyaculado. La movilidad en masa es de $\geq 65\%$ y la motilidad progresiva de $\geq 45\%$; mientras que el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales debe ser de al menos 50 %, (<http://www.merckvetmanual.com/mvm/index.jsp?cfile=htm/bc/182005.htm> 04/04/09).

Otros autores (Meyers *et al.*, 1995), indicaron que en garañones fértiles la motilidad progresiva en semen fresco puede oscilar entre 63 y 76% y un porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales de 78 a 90%, valores que fueron relacionados con una tasa de concepción en yeguas entre el 70-90%.

En otro estudio, Bataille *et al.* (1990), encontraron una motilidad progresiva $>35\%$ en semen post-descongelación, lo que coincide con lo observado en el presente trabajo, encontrando una correlación positiva con la fertilidad de las yeguas.

En otro estudio, Kuisma *et al.* (2006), encontraron un porcentaje de motilidad progresiva en semen descongelado fue de 37.7%, porcentaje similar al observado en el presente estudio cuando el semen fue diluido en triladyl. Mantovani *et al.* (2002), observaron una motilidad progresiva de 36.2% y 30% en semen diluido en leche descremada + glicerol y leche descremada + etilenglicol, respectivamente.

El porcentaje de viabilidad en los dos diluyentes fue similar encontrando valores cercanos al 79% en promedio en ambas diluciones (Figura 3). Al respecto, en un estudio realizado por Rathi *et al.* (2001), se observó una

viabilidad espermática de 35 % en semen fresco diluido en un medio sin bicarbonato, sustancia que se encuentra presente en el triladyl.

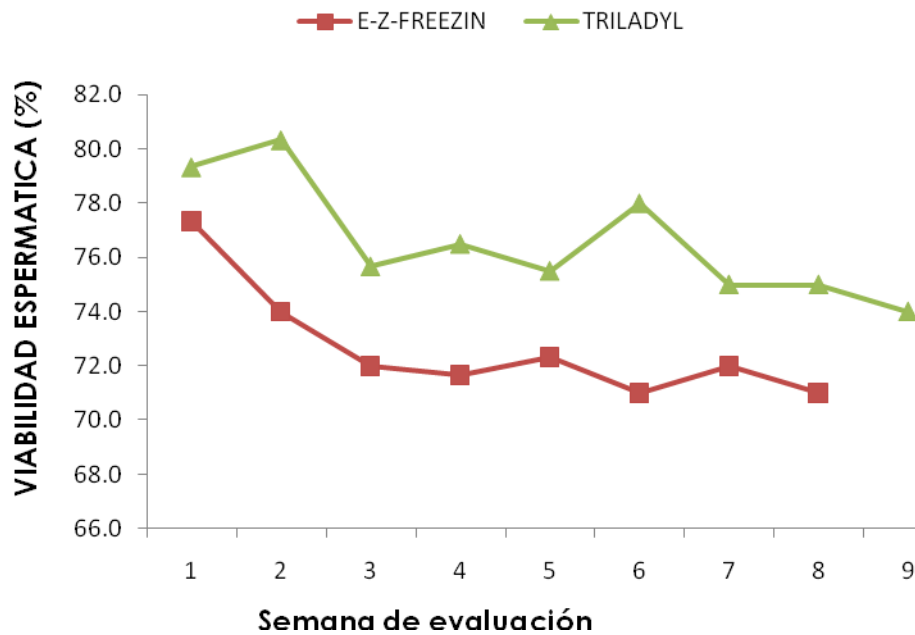


Figura 3. Viabilidad espermática del semen de garañón descongelado diluido en triladyl y E-Z-Freezin.

Los resultados obtenidos muestran, una clara superioridad desde el inicio del experimento, a favor del triladyl, encontrándose una porcentaje global del 35% de movilidad progresiva, en comparación una escasa movilidad total de 26%, existiendo una diferencia en porcentaje del 9% entre la movilidad de dos diluyentes.

De acuerdo a estos resultados, el triladyl, puede ser utilizado, como un diluyente en programas de reproducción equina sin problema alguno, para el almacenamiento de semen equino, tanto refrigerado como congelado.

En cuanto al porcentaje de viabilidad de los espermatozoides almacenados en triladyl y E-Z freezin fue similar, encontrándose resultados globales del 77% con triladyl; sin embargo, los valores logrados con el E-Z freezin fueron de 74%, no encontrándose una variable que marcara una diferencia significativa en este renglón, existiendo una diferencia en porcentaje del 4%.

El triladyl mostró una mayor efectividad que el E-Z Freezin para preservar el semen equino; por lo que puede ser utilizado en programas reproductivos, tanto como en semen refrigerado y semen congelado. Además este diluyente presenta ciertas ventajas en comparación con el E-Z Freezin LE, en cuanto al costo (\$777) y el contenido (250 ml) llegando a diluir hasta 100 eyaculados, mientras que el costo del E-Z Freezin tiene un costo mayor (\$550) de un sobre de 15 ml que únicamente es capaz de diluir un solo eyaculado.

La ventaja del E-Z Freezin, con respecto al triladyl es que esta listo para ser utilizado de inmediato, por otro lado el triladyl tiene que ser mezclado con agua desionizada y yema de huevo.

Con respecto a esto el triladyl, es un diluyente capaz de ser mezclado con cualquier semen, para su posterior conservación, por lo que puede ser una alternativa viable en la utilización del triladyl en los diferentes programas reproductivos llevados a cabo en el laboratorio de reproducción de la posta zootécnica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

7. CONCLUSIONES

- El triladyl es un diluyente, capaz de conservar eficazmente el semen crio-preservado de garañón, manteniendo un porcentaje de movilidad progresiva cercano al 40% y una viabilidad elevada que alcanza el 75%.
- El semen diluido en triladyl, puede ser utilizado con la misma efectividad, que otros diluyentes especialmente diseñados para equinos en programas reproductivos, donde se utilice la inseminación artificial alcanzado altas tasas de concepción en yeguas.

8. LITERATURA CITADA

Bataille B, Magistrini M, Palmer E. 1990. Analyse objective de la mobilite du sperme congele-decongele d'etalon. Essai de correlation avec la fertilite. (Objective determination of sperm motility in frozen-thawed stallion semen. Correlation with fertility). *Animal Breeding Abstract* 96-106.

Boeta M, Zarco QL 2000. Utilización de leche descremada ultrapasteurizada como diluyente de semen refrigerado de burro, destinado a la inseminación de yeguas. *Veterinaria México* 31:67-69.

Frandsen RD. 1995. Fisiología de la reproducción masculina. En *Anatomía y fisiología de los animales domésticos*. 5ta Edición. MV Textos. Buenos Aires Argentina. 399-409 pp.

Carballo D, Canseco R, García R, Montiel F, 2008. Comparación de dos diluyentes comerciales para criopreservar semen bovino bajo condiciones de campo en el trópico húmedo. XXI reunión científica-tecnológica forestal y agropecuaria Veracruz y I del trópico mexicano.

Galina C, Valencia J. 2008. Inseminación artificial. En *Reproducción de animales doméstico*. 3ra edición. Limusa. 219-235 pp

González SC, Soto BE. 2005. Como mejorar la colección, manejo y calidad microbiológica del semen. En *Manual de ganadería de doble propósito*. Instituto de Reproducción Animal e Inseminación Artificial, FCV, UCV. Maracay Dpto. Biología de los Organismos. Universidad Simón Bolívar. Caracas.504-509 pp

Hafez E, Hafez B. 2000. Caballos. En *reproducción e inseminación artificial en animales*. 7ª edición. Mcgraw-hill. 199-223 pp

Jasko DJ, Bedford SJ, Cook NL, Mum Ford EL, Squires EL, Pickett BW. 1993. Effects of antibiotic on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. *Theriogenology* 140:885-893.

Kuisma P, Andersson M, Koskinen E, Katila T. 2006. Fertility of frozen-thawed stallion semen cannot be predicted by the currently used laboratory methods. *Acta Veterinaria Scandinavica* 48:1-8.

Losinno L. Aguilar J. 2002. Reproducción y Biotecnologías en la producción equina. Cátedra de producción equina, Departamento de Producción animal, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Rio Cuarto. Brasil.

Matas, C. García-Vázquez, F., Sansegundo, M., Gadea, J., Coy, P., Ruiz, S. 2004 *estudio de la capacidad espermática in Vitro en espermatozoides eyaculados y epididimarios*. Dpto. Fisiología, facultad de veterinaria, universidad de Murcia.

Mejia, V. O. (2004). Congelación de semen e inseminación artificial en ovinos. Memorias del curso: Congelación de semen e inseminación artificial en ovinos, FMVZ-UMSNH.

Mantovani R, Rota A, Falomo ME, Bailoni L, Vincenti L. 2002. Comparison between glycerol and ethylene glycol for the cryopreservation of equine spermatozoa: semen quality assessment with standard analyses and with the hypoosmotic swelling test. *Reprod. Nutr. Dev.* 42 (2002) 217–226

Meyers AS, Overstreet WJ, Liu KMI. 1995. Capacitation in vitro of stallion spermatozoa: comparison of progesterone-induced acrosome reactions in fertile and subfertile males. *Journal of Andrology* 16: 47-54.

Pickett BW, Squires EL, McKinnon AO. 1987. preservation of stallion semen by freezing. En *Procedures for collection, evaluation and utilization of stallion semen for artificial insemination. Animal reproduction laboratory Colorado State University. Fort Collins 80523.* 75-95 pp.

Rathi R, Colenbrander B, Bevers MM, Gadella BM. 2001. Evaluation of in vitro capacitation of stallion spermatozoa. *Biology of Reproduction* 65: 462-470.

Salomon S, Maxwell WMC. 200. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science* 62: 77-111.

Santiane. A, Risopatrón. J, Sepulveda. N, Sanchez. R. 2006. *Efecto de la lisofosfatidilcolina en la reaccion del acrosoma de espermatozoides de perro.* Centro de Biotecnología en Reproducción- Facultad de Medicina. Departamento de Ciencias Básicas- Facultad de Medicina. Departamento de producción agropecuaria- Facultad de Ciencias. Agropecuarias y Forestales. Departamento de Ciencias Preclínicas. Universidad de la frontera, casilla 54-D, Temuco, Chile. 2004.

Toscano T.I.A. 2004. Efecto de la congelación-descongelación del semen utilizando un diluyente para bovino sobre el estado funcional de la membrana plasmática del semen ovino. Tesis Licenciatura Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

<http://www.ponypuzzle.com/Tutorial/history.html>

<http://www.monografias.com/trabajos44/inseminacionovinos/inseminacion-ovinos2.shtml>

<http://www.agroinformacion.com/leer-contenidos.aspx>

<http://www.monografias.com/trabajos44/inseminacionovinos/inseminacion-ovinos.shtml>

http://animalreproductionsystems.com/equine/html/epf-e-z_freezing.html

http://www.amasvet.com/repro_equina.htm

<http://www.caballoyrodeo.cl>

(<http://www.merckvetmanual.com/mvm/index.jsp?cfile=htm/bc/182005.htm>)