

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS VETERINARIAS**



**“TIEMPO DE REDUCCIÓN DEL AZUL DE METILENO EN EL SEMEN OVINO”**

TESIS:  
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE: MAESTRO EN  
CIENCIAS VETERINARIAS

PRESENTA:  
Edén Antonio Arce Patrón

Director de Tesis  
Dr. Victor Manuel Gonzalez Vizcarra

Co-Director de Tesis  
Dra. Olga Maritza Manríquez Núñez

MEXICALI, B.C. MÉXICO.

FEBRERO DE 2014

Tiempo de reducción del azul de metileno en el semen ovino. Tesis presentada por Edén Antonio Arce Patrón como requisito parcial para obtener el Grado de Maestro en Ciencias Veterinarias, que ha sido aprobado por el comité indicado:

---

Dr. Víctor Manuel González Vizcarra  
Director principal

---

Dr. Martín Francisco Montaña Gómez  
Asesor

---

Dra. Olga Maritza Manríquez Núñez  
Asesor

Mexicali, Baja California, México.

Febrero del 2014

---

Lugar y fecha

## RESUMEN

El objetivo fue evaluar la técnica de reducción de azul de metileno como indicador de la calidad espermática y resistencia a la refrigeración prolongada de semen de ovino. Se utilizaron siete sementales cruzas de las razas Dorper con Katahdin. La alimentación fue a base de alfalfa y sudan molido. Las muestras de semen fueron colectadas por electro eyaculación. El semen se recolecto en tubos graduado. Volumen y color se determino por visualización macroscópica. La motilidad masal e individual se realizo mediante microscopia. La prueba de azul de metileno se realizo tomando una muestra de semen 10 $\mu$ l y 10 $\mu$  de azul de metileno se mezclaron e introdujeron en tubos capilares y se coloco en baño maría a 37°C y se tomo el tiempo hasta retorno a leucobase. El modelo estadístico empleado un Coeficiente de Correlación lineal ( $r$ ). Los resultados obtenidos en este experimento muestran correlación lineal positiva entre las variables evaluadas.

# ABSTRACT

## CONTENIDO

RESUMEN.....	3
ABSTRACT .....	4
LISTA DE FIGURAS .....	7
INTRODUCCIÓN.....	8
REVISIÓN DE LITERATURA .....	9
Técnicas de extracción de semen en animales domésticos.....	9
<i>Obtención de semen con vagina natural.....</i>	9
<i>Método de la vagina artificial .....</i>	10
<i>Método de electro eyaculación .....</i>	10
Técnicas utilizadas para la evaluación de la concentración espermática .....	11
<i>Hemocitometría .....</i>	11
<i>Citometria de flujo.....</i>	12
<i>Espectrofotometría.....</i>	14
<i>Reacciones de oxido-reducción .....</i>	14
<i>Reducción de azul de metileno .....</i>	15
<i>Reducción de resazurina.....</i>	16
Diluyentes.....	16
<i>Diluyentes no comerciales .....</i>	17
<i>Diluyente a base de yema de huevo.....</i>	18
<i>Diluyentes comerciales.....</i>	19
Métodos de conservación de semen .....	20
<i>Semen fresco.....</i>	20

<i>Semen refrigerado</i> .....	20
<i>Semen congelado</i> .....	21
HIPÓTESIS .....	23
OBJETIVO GENERAL.....	23
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	23
MATERIALES Y MÉTODOS .....	24
Descripción del Área de estudio .....	24
Descripción de la población .....	24
Alimentación .....	24
Recolección del semen.....	26
Evaluación del semen.....	27
<i>Motilidad Masal</i> .....	28
<i>Motilidad Individual</i> .....	29
RESULTADOS.....	32
LITERATURA CITADA .....	34

## LISTA DE FIGURAS

## INTRODUCCIÓN

El azul de metileno es un colorante quinoide el cual puede ser hidrogenado para formar una base incolora. Ciertas enzimas reductoras son necesarias para activar la hidrogenación, ya que el hidrógeno no causa la reducción del color. Algunas sustancias biológicas como el semen, pueden contener estas enzimas o el azul de metileno puede actuar como un catalizador para activar la hidrogenación. El semen contiene oxígeno libre o combinado, el cual, debido a las bacterias o enzimas, es usado para cambiar el material desde una sustancia ligeramente oxidada a ligeramente reducida. La tasa de esta reducción en el semen, depende ampliamente de la concentración y actividad de los espermatozoides; sin embargo, otros factores como bacterias, enzimas, luz y otras características pueden influenciar en algún grado variando la tasa de reducción.

En el semen que contiene una alta concentración de espermatozoides activos, el oxígeno es usado a una más alta tasa que en el semen de pobre calidad. Esto causa un exceso de hidrógeno, el cual combinado con el azul de metileno, forma una leuco base de azul de metileno. El cambio relativamente lento del color azul, sirve como indicador del número y actividad de espermatozoides en el semen. El objetivo del presente trabajo es el de evaluar la técnica de reducción de azul de metileno como indicador de la calidad espermática y resistencia a la refrigeración prolongada de semen de ovino.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### **Técnicas de extracción de semen en animales domésticos**

En la actualidad existen diferentes métodos para la recolección de semen en los animales domésticos, pero alguno de ellos han sido desplazados por el uso de la vagina artificial (VA). Los centros de inseminación artificial están de acuerdo que el uso de la VA es el método más sencillo, sobre todo para animales de talla grande. (Hernández et al, 2005).

### ***Obtención de semen con vagina natural***

El método consiste en utilizar una hembra en estro para que la monte al menos una o dos veces, cuando el semen es utilizado para inseminar en fresco, mayormente usado en ovinos. Una vez que el semental eyaculo e inmediatamente se extrae el semen directamente de la vagina utilizando una pajilla esterilizada de 0.25ml de capacidad unida a una jeringa de 5-10ml (Rangel, 2000). y se procede a la evaluación de rutina. Este método presenta las ventajas de que la obtención se hace en forma natural, sin ejercer presión alguna ni estrés sobre el semental y utilización mínima de equipo, una desventaja que presenta es la posible contaminación de la muestra con los fluidos naturales de la vagina, aunque esto no impide el realizar una correcta evaluación del semen.

### ***Método de la vagina artificial***

Éste método es utilizado en la mayoría de las especies animales domésticas, mediante esta técnica el macho que eyacula desarrolla totalmente la cadena de reflejos y la mecánica del coito fisiológico, aunque no exista penetración ni eyaculación en la vagina de una hembra. Los machos seleccionados para la recolección de semen mediante el uso de una VA deben estar entrenados. El animal de monta debe estar sujeto, y aquellos que no estén familiarizados con la VA pueden requerir la presencia de una hembra en celo. Como alternativa, una hembra sedada (xilacina, 0.03 mg/kg) sujeta para que se pueda facilitar la colección. Básicamente la VA es preparada llenando la camisa interna con agua lo suficientemente caliente para resultar en una temperatura final de 42-50 °C. Se puede agregar aire para incrementar la presión de la vagina. Finalmente ésta es lubricada con gel estéril no espermicida (Hernández y Carrillo., 2005).

### ***Método de electro eyaculación***

Esta técnica es transrectal que permite estimular las vesículas seminales fundamentalmente para controlar la erección peneana y la posterior eyaculación, a través de descargas eléctricas controladas, su manejo consiste en aumentar gradualmente el voltaje desde cero hasta 10-15 voltios, con incrementos de un voltio en intervalos de 5 -10 segundos. Es importante que se obtenga la erección del pene, el desenvaine y finalmente la eyaculación. Este método de recolección

es el más utilizado ya que no requiere de entrenamiento previo de los sementales. (Mellisho y Gallegos., 2006).

Técnicas utilizadas para la evaluación de la concentración espermática

### ***Hemocitometría***

Determinar la concentración de un eyaculado es uno de los pasos más importantes en la evaluación seminal debido a que de ella depende la tasa de dilución a utilizar para el proceso de almacenamiento, sin embargo es uno de los pasos que más se pasa por alto. La concentración se puede calcular mediante pruebas basadas en consistencia o apariencia del semen, usando el hemocitómetro, espectrofotómetro o por medio de citometría de flujo, pero para el campo el hemocitómetro es el más utilizado desde hace mucho tiempo, es lento pero muy preciso. (Macpherson., 2001).

El hemocitómetro es utilizado comúnmente para el conteo de células blancas o rojas y consta de una cámara y un cubreobjetos especial que viene con el hemocitómetro, no es posible utilizar uno para microscopio. También consta de una pipeta capilar de volumen exacto. Para realizar el conteo espermático se requiere que tanto la cámara como el cubreobjetos estén perfectamente limpios y libres de grasa. Lo primero que hay que realizar después de tomada la muestra es llenar la pipeta de semen hasta la marca calibrada con 0.5 y seguidamente aspirar sin formación de burbujas el reactivo de Hayem hasta la marca 101, mas sin

embargo se busca utilizar diluyentes no tan contaminantes, por lo que es recomendable utilizar la solución de Kolmer (Baracaldo et al., 2006).

Se toma la pipeta entre el pulgar y un dedo colocando el dedo índice en su extremo superior para cerrarla y se desechan 2 o 3 gotas de liquido no mezclado que se encuentran en el capilar graduado de la pipeta, se coloca la punta de la pipeta en la hendidura que separa el borde del cubreobjetos de la cámara, dejando que el liquido llene por capilaridad la totalidad de la misma, no debe permitirse que el liquido fluya por las juntas que circundan el área elevada. Se coloca la cámara sobre la platina del microscopio, el conteo de los espermatozoides se lleva a cabo en el área central finamente graduada de la cámara. Se cuentan los cuadros secundarios de las esquinas y el cuadro central, la suma de los espermatozoides contados en los 5 cuadros pequeños multiplicada por 10 000 nos da la cifra total. (Knox., 2004).

### ***Citometria de flujo***

Otra forma de determinar concentración espermática es por medio de citometria de flujo, se puede decir que esta técnica para la evaluación de la concentración espermática en cualquier animal domestico es muy reciente, se habla de unos 15 años atrás. La combinación de una técnica de fluorescencia unida a citometria de flujo nos permite evaluar miles de células espermáticas por muestra y brinda de una precisión mucho más alta. Este sistema automático es

fácil de utilizar y no se requiere de alguien experto para realizar el análisis. (Christensen et al., 2005).

La evaluación de la concentración espermática por medio de citometria de flujo sea tratado de manejar de una forma rápida debido a la necesidad de tener una respuesta rápida, sensitiva, objetiva, y conseguir medidas múltipara métricas sobre el potencial de fertilidad en el semen. En los últimos años la técnica de citometria de flujo ha alcanzado un nivel alto que le permite ser incluida en la lista de métodos disponibles y rutinarios para el estudio de la capacidad reproductiva. Esta técnica permitiendo un análisis rápido de las características biofísicas y bioquímicas, pueden representar una herramienta ideal para dichos propósitos. (Ferrara et al., 1997).

La evaluación microscópica permite una observación directa a dominios de membrana de espermatozoides, sin embargo la citometria de flujo se encuentra basada en un análisis cuantitativo de eventos (células) que emiten ciertas ondas de luz después de haber sido excitados por medio de un láser. Esta técnica ha probado tener una gran ventaja sobre la evaluación microscópica, permitiendo la exanimación de miles de células espermáticas en un periodo de tiempo más corto que el utilizado para microscopia. (Januskauskas y Zilinkas, 2002).

## ***Espectrofotometría***

La técnica de Espectrofotometría es una prueba que ha sido utilizada últimamente al igual que citometria de flujo ya que es una prueba que nos brinda de resultados de una manera muy rápida y mucho más eficaz que el hemacitómetro. En un estudio realizado en 25 eyaculados de toro se encontró que el hemacitometro nos daba una motilidad entre un 62 a 69%, mientras que espectrofotometria nos mostraba una motilidad del 82% siendo más eficiente. (Farell et al., 1988).

## ***Reacciones de oxido-reducción***

Este tipo de reacciones también conocidas como Redox, son las reacciones de transferencias de electrones. Esta transferencia se produce entre un conjunto de elementos químicos, uno oxidante y uno reductor. Para que exista una reacción Redox, en el sistema debe haber un elemento que ceda electrones y otro que los acepte, el agente reductor es aquel elemento químico que suministra electrones de su estructura química al medio, aumentando su estado de oxidación, es decir oxidándose, y el agente oxidante es el elemento químico que tiende a captar esos electrones, quedando en un estado de oxidación inferior al que tenía. Se debe tener en cuenta que en realidad una oxidación o una reducción en un proceso por el cual cambia el estado de oxidación de un compuesto. Este cambio no significa necesariamente un intercambio de electrones.

### ***Reducción de azul de metileno***

El azul de metileno se conocía en la biología de la célula desde muchos años atrás pero fue hasta 1942 cuando Sorensen lo utilizó para evaluar la calidad espermática. Durante los procesos de respiración del esperma, gracias a la presencia de los sistemas enzimáticos (deshidrogenasas) se libera el hidrógeno que puede reducir a su aceptor, representado en este caso por el azul de metileno, a una leucobase sin color. La duración del proceso de decoloración depende de la intensidad del metabolismo y densidad del semen y se encuentra influida también por varios factores internos y ambientales, de estos últimos, la temperatura, pH, situación osmótica, concentración del azul de metileno, etc. Teniendo en cuenta que el nivel del metabolismo de los espermias es más o menos constante, es posible según el tiempo de la decoloración, en condiciones ambientales constantes, no solamente evaluar la actividad sino también la densidad y desde luego la fertilidad. La metodología consiste en un cristal de reloj se vierten 0.2 ml de semen fresco y 0.2 ml de azul de metileno al 0.1%, se mezcla cuidadosamente agitando el cristal y el semen coloreado se aspira mediante una pipeta capilar (Pasteur) y se tapan ambos extremos con plastilina o parafina, la pipeta con la columna de semen se coloca en baño maría a 40 °C y se anota el tiempo de decoloración que varía entre 2 - 20 min. Dependiendo la concentración y actividad de las células espermáticas. Existe una correlación positiva entre el tiempo de la decoloración y la fertilidad, y el semen utilizado en la IA debe reducir el azul de metileno durante 3 -10 min. (Lubus Holy, 1983).

### ***Reducción de resazurina***

Un aceptor semejante al azul de metileno durante el proceso del metabolismo de los espermatozoides es la resazurina. Este colorante cambia por la actividad del hidrogeno su color de azul a rosado (resorrufina) y por fin pierde el color rosado, formándose hidrorresorrufina. La metodología para esta prueba comienza mezclando en un pequeño tubo de ensayo 0.2 ml de solución de resazurina (11mg de resazurina en 200 ml de agua destilada), la mezcla se cubre con una capa de aceite de parafina y se incuba a 45 grados centígrados. En el semen de buena calidad aparece el color rosado en un minuto y la decoloración se realiza después de 4 minutos o más. (Lubos Holy, 1983).

### **Diluyentes**

Diluyente es una solución acuosa que nos permite incrementar el volumen del eyaculado, preservar las características del semen y mantener el nivel de fertilidad (Gadea, 2003).

En la actualidad los diluyentes nos permiten almacenar semen congelado en nitrógeno líquido ( ) a una temperatura de  $-196^{\circ}\text{C}$  y en hielo seco a  $-79^{\circ}\text{C}$ . (Sorensen, 1984).

Los diluyentes se clasifican en no comerciales y comerciales, en los no comerciales se tiene que adquirir cada uno de los ingredientes y pesar con precisión en una balanza analítica en el laboratorio. En los comerciales estos se adquieren ya preparados para su uso y los resultados son más consistentes.

## ***Diluyentes no comerciales***

***Diluyente a base de leche:*** La leche ha sido utilizada como parte del diluyente para semen de ovino, porque se le ha encontrado que conserva la capacidad de fertilización de 14 a 16 horas a 15C, obteniendo de un 65 a 75% de pariciones (Tron et al., 2004).

La preparación de diluyentes a base de leche, según Tron y Arbiza (2004), basado en la publicación de Salomon y Cols (1990), recomiendan utilizar la leche reconstituida, isotónica y descremada, también es necesario que sea calentada, porque contiene una proteína llamada lactenina que lesiona a los espermias.

A esta solución se le agregan antibióticos (penisilina, estrptomocina y sulfanilamidas). La cantidad de leche descremada es de 10grs en 100ml de agua o de 90ml de agua y 10ml de leche. Cuando la leche no está en polvo debe ser calentada por 10min. De 90 a 94°C, bajando posteriormente a 30°C, en este momento se le agrega 1mg de sulfanilamida y 10 mg de catalasa por mililitro adicionado, en esta forma la leche puede ser utilizada por 30min. Manteniendo siempre la temperatura de 30°C o bien por periodos de 14 a 16 hrs a 15°C.

La leche que no requiere ser calentada es la ultra pasteurizada descremada (la leche light) de larga vida de anaquel.

Para la dilución de leche usando semen fresco se recomienda no enfriar la mezcla a menos de 15C ya que si se llega a 4C la mortalidad espermática es alta. Es importante que el diluyente debe ser agregado al semen y no esté a la leche.

### ***Diluyente a base de yema de huevo***

formula de citrato con yema de huevo. Yema de huevo 20ml, citrato de sodio 2.37gr, glucosa 0.8 gr y agua destilada 80ml. El citrato de sodio puede ser remplazado por otra sal que se considera por tener mejores resultados es el TRIS (Tri-hidroxi-metil-aminometano), en trabajos recientes no se ha encontrado una superioridad sobre el citrato cuando el semen se mantiene a 5 C por dos días, pero se observó mayor integridad de la membrana citoplasmática y su viabilidad es mejor en este último a los cuatro días de dilución (López et al., 1999).

En 1987 Evans y Maxwell dieron a conocer la siguiente formula TRIS.

Tris 3.60gr, fructuosa 0.50gr, acido cítrico 1.99gr, yema de huevo 14.0 ml y agua destilada 100ml.

Para su elaboración se utilizan huevos de no más de tres días, se coloca la yema en papel filtro, moviéndose en forma circular para que se adhiera bien el resto de la clara y se presiona suavemente doblando el papel para que se libere la yema por uno de los extremos, para que la yema caiga en un recipiente.

Se disuelve en el agua el citrato, la glucosa y los antibióticos, se colocan en baño maría junto con el recipiente que contiene la yema y se deja que alcance los 37-38 C, después se agrega la yema al agua evitando que toque las paredes. Se agregan 10,000 UI de penicilina y 10mg de sulfato de estreptomicina por ml.

El preparado se mezcla suavemente evitando la formación de espuma hasta quedar bien mezclado, se coloca al baño maría cuando alcanza los 30 C el diluyente se puede combinar con el semen.

### ***Diluyentes comerciales***

***Skim milk extender:*** Fabricado en Alemania por la compañía Minitube. Es una solución de leche y antibióticos, concentrada para preparar un litro de diluyente para semen fresco (Catalogo Minitube. 2002).

***Triladyl:*** Fabricado en Alemania, por el laboratorio Minitube. Es un concentrado para la preparación de un diluyente listo para el uso de un solo paso, que está basado en TRIS (Hidroxi-metil aminometano) que es un amortiguador sintético, contiene glicerol, acido cítrico, fructosa y por cada 100ml contiene los siguientes antibióticos: 5mg tilosina, 25mg gentamicina, 30mg espectinomicina y 15mg lincomicina.

Para su preparación se adicionan tres partes de agua bidestilada, una parte de yema de huevo y una parte del concentrado comercial (Manual de Triladyl. 1993).

***Biladyl:*** Fabricado en Alemania por Minitube este es para preparación en dos pasos, está constituido por una fracción A y una B (con glicerol) y una C con antibióticos (Catalogo Minitube. 2002).

## **Métodos de conservación de semen**

### ***Semen fresco***

Por lo regular se conserva de 30 a 39°C por no más de 4 horas, debido a que la actividad metabólica es muy elevada, lo cual incrementa la concentración de ácido láctico en el medio, que afecta negativamente la motilidad y viabilidad del esperma. En la IA de ovinos se utiliza normalmente semen fresco, generalmente se utiliza inmediatamente después de su colección y su previa dilución. (Vivianco, 1998). Una de las ventajas por el cual es usado, es que mantiene altas tasas de fertilidad con un bajo número de espermatozoides comparado con el semen congelado (Yoshida, 2000).

### ***Semen refrigerado***

Método más utilizado para conservar semen en forma líquida por tiempos mayores de 24 h es mediante la reducción de la temperatura, debido a que con esto se produce una reducción de la motilidad y actividad metabólica, de la motilidad y actividad metabólica, aumentando la vida media del esperma hasta su utilización. La motilidad se detiene totalmente a los 5°C, pero se puede restituir si se eleva nuevamente la temperatura a los niveles normales, siempre y cuando no se hayan producido daños de tipo estructural causados por “shock térmico” (Vivianco, 1998). Cuando el semen es conservado a temperaturas cercanas a los 0°C, se debe de tener en cuenta que los espermatozoides se someten a un “shock

térmico”, lo cual puede causar cambios irreversibles en la célula espermática (Salomón et al, 2000).

El descubrimiento de las propiedades protectoras de las lipoproteínas de la yema de huevo contribuyó a incrementar la sobrevivencia y protección de espermatozoides cuando se somete al proceso de enfriamiento (Vishwanath et al, 2000). Evaluaciones en el laboratorio han demostrado que el semen diluido y refrigerado a 5°C muestra una gran variabilidad en sobrevivencia y fertilidad en las siguientes 72h de conservado.

### ***Semen congelado***

La conservación de semen mediante la congelación implica una gama de procesos sumamente complicados que se inician al momento de la obtención de la muestra y termina después de la descongelación (Vishwanath et al, 2000).

La conservación de los espermatozoides a -76°C en hielo seco a -196°C en nitrógeno líquido, conserva indefinidamente su potencial fertilizante. El glicerol como criopreservación de semen fue creado inicialmente para preservar semen de bovinos, pero se ha utilizado en otras especies con algunos pequeños cambios. Los resultados obtenidos en ovinos bajo inseminación artificial (IA) intrauterina han sido considerados pobres con un 9 a 25% de gestación, moderados con 30 a 50% y satisfactorio con un 70% de gestación (Maxwell, 1986; Gurley et al., 1990; Windsor et al., 1994; Moses et al., 1997).

La utilización de semen congelado brinda una gran flexibilidad al empleo de la IA. Por otra parte, la reducción de la temperatura seminal por debajo de los 4C enfrenta los problemas de la cristalización de agua intra y extracelular, causando daños estructurales con ruptura de la membrana por aumento del volumen del agua al cristalizarse y por aumento de la presión osmótica intracelular al aumentar la concentración de sales (Vivianco, 1998). Al adicionar glicerol al semen diluido antes de la congelación, bajo el punto de congelación del agua al mezclarse ambas sustancias, lo cual ocasiona una reducción de la cristalización y cambios osmóticos. El glicerol también deshidrata parcialmente la célula espermática, reduciendo aun más el riesgo de cristalización intracelular (Salomón et al., 2000).

## **HIPÓTESIS**

La reducción del azul de metileno en un tiempo inferior a 5 minutos garantiza la termo resistencia del semen ovino refrigerado.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la técnica de reducción de azul de metileno como indicador de la calidad espermática y resistencia a la refrigeración prolongada de semen de ovino.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Evaluar la prueba de azul de metileno como herramienta para determinar la viabilidad espermática.
- Determinar que el tiempo de reducción de azul de metileno inferior a 5 minutos es un buen predictor de la termo resistencia espermática.
- Determinar grado de correlación entre tiempo de reducción de azul de metileno y calidad de semen.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Descripción del Área de estudio**

La presente investigación se realizó en el Centro de Reproducción Ovina y en el Laboratorio de Procesamiento de Semen e Inseminación Artificial del Instituto de Investigación en Ciencias Veterinarias de la Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali B.C. México. La ubicación geográfica del lugar es de 32°24'27.71" Latitud Norte y 115°23'03.68" Longitud Oeste. El clima es de tipo desértico, donde el mes más frío es enero, con una temperatura mínima promedio de -1.66 °C y 13 °C de temperatura media siendo julio el mes más cálido con una temperatura máxima, mínima y promedio de 45, 20 y 33 °C respectivamente. La temperatura media anual es de 22 °C (INEGI, 2010).

### **Descripción de la población**

Se utilizarán siete sementales cruzas de las razas Dorper con Katahdin. Se alojaron en corraletas individuales las medidas por corraleta son de 1.5m de ancho por 12m de largo con una superficie de 18m<sup>2</sup> por animal. La superficie de sombra es de 1.5m de ancho y 6m de largo con una superficie de 9m<sup>2</sup> por animal y el suministro de agua fue a libre acceso que se les proporcionara en bebederos automatizados

### **Alimentación**

La alimentación fue a base de alfalfa y sudan molido, que se ofreció mañana y tarde la cantidad ofrecida fue el 3% del peso vivo del animal.

Composición de la dieta

Composición de la dieta		Análisis de la dieta		Requerimientos	
Ingrediente	%	TND	1,110 (kg)	TND	1.5 (kg)
Alfalfa	75	CP	.318 (kg)	CP	.263 (kg)
Sudan	25	CA	.029 (kg)	CA	.008(kg)
Total	100	P	.005 (kg)	P	.004 (kg)

(TND) total de nutrientes digestibles, (CP) proteína cruda, (CA) calcio, (P) fosforo

Calendario de actividades

Semana 1	Días de Muestreo	Semana 2	Días de muestreo
Lunes	M <sub>1</sub> -M <sub>2</sub>	Lunes	D
Martes	D	Martes	M <sub>1</sub> -M <sub>2</sub>
Miércoles	M <sub>1</sub> -M <sub>2</sub>	Miércoles	D
Jueves	D	Jueves	M <sub>1</sub> -M <sub>2</sub>
Viernes	M <sub>1</sub> -M <sub>2</sub>	Viernes	D
Sábado	D	Sábado	M <sub>1</sub> -M <sub>2</sub>
domingo	M <sub>1</sub> -M <sub>2</sub>	Domingo	D

M<sub>1</sub>= Muestra uno M<sub>2</sub>= Muestra dos D= Descanso

## Recolección del semen

De cada semental se obtuvo un eyaculado mediante electroeyaculador. Electrojac V<sup>®</sup>. Que puede ser utilizado de dos maneras distintas; En modo manual, la intensidad se controla ajustando el control manual de manera que se aplique voltaje continuo a los electrodos de la sonda.

En modo automático, el circuito produce una serie de 32 ciclos, y cada ciclo brinda una intensidad ligeramente superior. Cada ciclo dura 2 segundos, con una pausa de 2 segundos. Diseñado para pasar por los 32 ciclos a menos que sea interrumpido por el interruptor de encendido/apagado o el interruptor de intervalo.

El interruptor de intervalo se utiliza para controlar impulsos automáticos. Al presionar y mantener el interruptor de intervalo, el sistema permanece en ese ritmo (2 segundos encendido, 2 segundos apagado) hasta que se suelte el interruptor. Manual Electro Jac V

El equipo consta de:

- Sonda para ovinos.
- Adaptador/cargador de CA.
- Conector de sonda.
- Conector de intervalo.
- Ensamble de cono de recolección.
- Cinta para circunferencia escrotal.
- Batería de gel de 12 V.

El electro eyaculador provee una estimación rectal que permite estimular las glándulas accesorias. Desencadenando la erección peneana y la eyaculación. Su manejo consiste en aumentar gradualmente los ciclos desde 0 hasta 32 ciclos, con incrementos de dos ciclos en intervalos de 2 segundos. Una vez que haya desenvainado se mantienen las pulsaciones de modo automático hasta obtener el semen, este es recolectado en un tubo falcon graduado. Inmediatamente después de obtener la muestra se retira el tubo, se mide volumen, aspecto y color del semen, se coloca en baño maría a 37 °C, del cual se toma una muestra para su evaluación. Entre cada sesión de trabajo de los sementales se tendrá un periodo de descanso de al menos dos días.

### **Evaluación del semen**

La valoración del semen busca determinar la calidad del mismo, haciéndose una visualización macroscópica del volumen y color. La motilidad masal e individual se hace en un microscopio óptico marca, Micro star, AO American Optical.

**Volumen:** El volumen del semen se mide utilizando un tubo de recolección graduado. El volumen de eyaculado es aproximadamente de .8 - 1.5ml, que varía según la especie, edad, raza, condición corporal, método de recolección, frecuencia de recolección y destreza del operador Hafez, (1989).

**Aspecto:** El aspecto se observara a simple vista. El semen eyaculado es un liquido denso para poder ser aceptado deben presentar un aspecto blanco

cremoso, ligeramente amarillento y debe estar libre de restos de orina y sangre  
Chenowethlarg, (2004).

### *Motilidad Masal*

La Motilidad Masal (MM) es el resultado de la concentración espermática, el porcentaje de células con movimientos **progresivos** y velocidad de movimiento de los espermatozoides Barth, (2000).

Habiendo homogeneizado el eyaculado por agitación del tubo, se toman 10 $\mu$  de semen con una pipeta de glóbulos rojos y se coloca sobre un portaobjetos templado en la platina eléctrica y sin cubre objeto. La observación se realiza con semen sin diluir en el microscopio con el objetivo de 10X. Se observa la calidad seminal por la velocidad con que se hacen y deshacen las ondas. La motilidad se estima por el vigor del movimiento de las ondas en una escala que va de 0 a 5 (0 mínimo y 5 máximo).

Según Derivaux (1976), Morrow (1986) y Hafez (1989), la clasificación se realiza bajo los parámetros que se encuentran en la tabla 1.

Tabla 1. Escala basada en el porcentaje de células móviles y criterio evaluativo, según Derivaux (1976), Morrow (1986) y Hafez (1989).

<b>VALOR DESCRIPTIVO</b>	<b>ASPECTO DEL MODELO</b>	<b>% CÉLULAS MÓVILES</b>
Muy buena	Movimiento en ondas vigorosas y en remolinos rápidos	80-90%
Buena	Remolinos y ondas más lentas	60-80%
Regular	Sin remolinos, pero con oscilaciones generalizadas	40-60%
Mala	Escasa o ninguna motilidad	0-40%

### ***Motilidad Individual***

La motilidad individual, es el resultado de la evaluación del movimiento progresivo de los espermatozoides y de los cambios en su motilidad. Para su valoración se coloca en un porta objetos perfectamente limpio y tibio 10 $\mu$  de semen diluido y colocando un cubre objeto encima. La muestra se observara al microscopio con el objetivo de 45X. Esta se determina en una escala del 0 al 100%. Barth, (2000).

Según Salisbury (1978), Hafez (1989) y Barth (2000), la clasificación se muestra bajo parámetros que se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Escala basada en el porcentaje de células móviles según Salisbury (1978),Hafez(1989) y Brath (2000).

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

La motilidad progresiva también puede ser evaluada siguiendo la velocidad de movimiento o grado de movimiento y se hace bajo la siguiente escala según Barth, (2000)

Tabla 3. Escala basada en la velocidad de movimiento de las células móviles  
Barth (2000)

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

## RESULTADOS

Tabla 3: valores de las variables

TRAM	MM	M%
6	1	85
3	3.5	85
6	4	85
2	4	90
2	5	95
2	5	95
7	5	90
5	4	90
10	2	50
4	2	90
10	1	20
10	0	0
10	2	80
10	1	50
10	2	50

TRAM= Tiempo de Reducción de Azul de Metileno MM= Motilidad Masal M%= Motilidad Porcentual

Los resultados obtenidos entre las variables I y II fueron de un  $r = -0.7257$  y con un  $\alpha$  de 0.01 hubo correlación lineal entre Tiempo de Reducción del Azul de Metileno y la Motilidad Masal. Así como también entre la variable I y III hubo una correlación lineal, con un  $r = -0.7591$  y un  $\alpha$  de 0.01 y entre las variables II y III se obtuvo un  $r = 0.7687$  y con un  $\alpha$  de 0.01 decimos que hay correlación lineal entre Motilidad Masal y Motilidad Porcentual.

Tafolla en el 2010 encontró resultados similares a los obtenidos en este experimento ya que demostró que si hay relación entre las variables que se medían.

Con esto podemos tener la certeza de que si utilizamos el azul de metileno como indicador para la prueba de concentración y motilidad de los espermatozoides es altamente confiable su uso. Esta prueba es fácil y sencilla por lo cual nos ahorra tiempo y dinero en su aplicación por eso es ampliamente recomendable.

## LITERATURA CITADA

BARTH, Albert, BO, Gabriel, TRIBULO, Humberto. Curso de evaluación de toros

1976. 139-166 p.

Catalogo de minitube para inseminación artificial en pequeños rumiantes. 2002.

Christensen P., D. Boelling, K. M. Pedersen, I.R. Korsgaard and J. Jensen. 2005.

Relationship Between Sperm Viability as Determined by Flow Citometry and Nonreturn rate of Dairy Bulls. *J. Androl.* 26:98-106.

DERIVAUX, J. Reproducción de los animales domésticos. 2 ed. España: Acribia,

control de la calidad seminal: 16 al 19 de Agosto del 2000. 1 ed. Córdoba (Argentina). Universidad católica de Córdoba, 2000. 3-10, 55 p.

Evans G. Maxwell W.M.C., Salomon. Artificial insemination of sheep and goats.

1987. Butterworths. pp 46-58.

Farrell, P.B, G.A. Presicce, C.C. Brockett and P.H. Foote. 1988. Quantification of

bull sperm characteristics measured by computer assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility.

Ferrara F., R. Daverio, G. Mazzini, P. Bonini and G. Banfi. 1997. Automation of

human sperm cell analysis by flow citometry. *Clinical Chemistry.* 43:801-807.

Gadea J., Spanish Journal of Agricultural research. 2003; 1 (2): pp. 17-27

Gourley, D.D., y R.L. Riese. 1990. Laparoscopic artificial insemination of sheep. Vet Clin. North. Am. Food Anim. Prac. 6:615-633.

HAFEZ, E. S. E. Reproducción e inseminación artificial en animales. 5 ed. México: Hernández BJA y Carrillo DFB. Manual de Reproducción en Ovinos. Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Nayarit. 2005.

Holy L. 1983. Bases Biológicas de la reproducción bovina. Ed. Diana. Pág. 347  
INEGI (2010)

Interamericana - McGraw-Hill, 1989. 12-27 J50-165, 198-204, 506-513 p.

Januskaukas A. and H. Zilinskas. 2002. Bull Semen Evaluation Post-Thaw and Relation of Semen Characteristics to Bulls Fertility. J. Veterinarija ir Zootechnika. 17:39-46.

Knox R.V. 2004. Practicalities and Pitfalls of Semen Evaluation. J. Advances in Pork Production. 15:315-322.

López A. P., Soderquist L., Rodríguez M. H., Spem viability in ram semendiluted and stored in three different extenders. 1999. Acta vet. Scan. 40:1-3.

Macpherson M.L. 2004. How to Evaluate Semen in the Field. J. IVIS. 47:410-416.

Manual de uso y preparación del Triladyl, de Laboratorios Minitube. 1993.

Manual Electrojac V

Maxwell, W.M. 1986. Artificial insemination of ewes with frozen-thawed semen at a synchronized oestrus. 2. Effect of dose of spermatozoa and site of intrauterine insemination on fertility. Anim. Reprod. Sci. 10:309-316.

- Mellisho SE y Gallegos A. Manual de laboratorio de reproducción animal. Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú. 2006.
- MORROW, D. A. Current. Therapy in Theriogenology diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in small and large animals. Philadelphia: Saunders company - Philadelphia, 1986. 132-136 p.
- Moses, D., A.G. Matinez, G. Lorio, A. Valcárcel, A. Ham, H. Pessi, R. Castañon, A. Marciá, and M.A. de las Heras. 1997. A large-scale program in laparoscopic intrauterine insemination with frozen-thawed semen in Australian Merino sheep in Argentine Patagonia. Theriogenology 48:651-657.
- SALISBURY, GW. Y VAN DERMARK N. L. AND LODGET J. R. Fisiología de la Reproducción e inseminación artificial de los bovinos. Ed. W.H Freeman and company (USA). 1974. 209, 232-236, 250-252, 283 p.
- Salomon S., Evans G. y Maxwell W. M. C. 1990 Inseminación artificial de ovejas y cabras. Editorial Acribia, S.A. pp 109-113, 95-107.
- Salomón, S., and W.M. Maxwell. 2000. Storage of ram semen. Anim. Reprod. Sci. 62:77-111.
- Sorensen M.A., Reproducción animal. Editorial McGraw. 1994. pp 117-192.
- Tron J de L. y Arbiza S. I., sistemas de apareamiento e inseminación artificial en ovinos. UNAM Cuautitlán. 2004. pp 65-69.
- Vishwanath, R., and P. Shannon. 2000. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. Anim. Reprod. Sci. 62: 23-53.

Vivianco, M. W. 1998. Inseminación artificial en ovinos. Memorias del Seminario Internacional Aplicaciones de técnicas Biotecnológicas en la Reproducción de Ovinos y Caprinos. 26-27 de octubre. Chapingo, México.

Windsor, D.P., A.Z. Szell, C. Buschbeck, A.Y. Edward, J.T. Milton, and B.C. Buckrell. 1994. Transcervical artificial insemination of Australian Merino ewes with frozen-thawed semen. *Theriogenology*. 42: 47-57.

Yoshida, M. 2000. Conservation of sperms: current status and new trends. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61: 349-355.