

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS**  
**FACULTAD DE AGRONOMÍA**  
**CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**



**TESIS DE GRADO**

**ANÁLISIS DE LA FLORA MICROBIANA DEL SEMEN BOVINO (*Bos taurus*)  
ANTES Y DESPUÉS DEL CONGELAMIENTO EN LA ESTACIÓN  
EXPERIMENTAL CHOQUENAIRA**

**GABRIEL CHIPANA CHAMBI**

**LA PAZ – BOLIVIA**

**2014**

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES  
FACULTAD DE AGRONOMÍA  
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**

**ANÁLISIS DE LA FLORA MICROBIANA DEL SEMEN BOVINO (*Bos taurus*)  
ANTES Y DESPUÉS DEL CONGELAMIENTO EN LA ESTACIÓN  
EXPERIMENTAL CHOQUENAIRA**

Tesis de Grado presentado como requisito  
Parcial para optar el título de  
Ingeniero Agrónomo

**GABRIEL CHIPANA CHAMBI**

**ASESORES:**

M.V.Z. René Juan Condori Equice .....

Dra. Justina Ordoñez Jorge .....

Ing. Zenón Martínez Flores .....

**COMITÉ REVISOR:**

Dr. Augusto Vargas Hudson .....

Ing. Héctor Arcenio Cortez Quispe .....

Ing. Víctor Castañón Rivera .....

**Aprobada**

**Presidente Tribunal Examinador.....**

## *DEDICATORIA*

**Gracias a Dios;**

**A la comprensión, cariño y paciencia de  
Mis padres, por el apoyo  
Incondicional, sacrificio y confianza, para  
Poder concluir el presente trabajo**

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres Manuel Chipana y Margarita Chambi, como también a mis hermanos; Hugo, Daniel, Jhovana, Sonia y Silvia por la comprensión y paciencia que tuvieron, para la conclusión del presente trabajo.

A los Docentes de la Facultad de Agronomía, por la educación que me impartieron durante mis estudios universitarios.

A la Estación Experimental de Choquenaira, por brindarme el apoyo mediante una beca, para poder realizar el presente trabajo de investigación.

A mis asesores M.V.Z. René Equice, Dra. Justina Ordoñez Jorge é Ing. Zenón Martínez Flores, por transmitirme sus conocimientos y colaborarme en el transcurso del trabajo de campo, que me permitió culminar el presente trabajo de investigación.

Al tribunal revisor conformado por el Ing. Víctor Castañón Rivera, Ing. Héctor Cortez y Dr. Augusto Vargas Hudson; por las observaciones, sugerencias y modificaciones que hicieron, para poder concluir satisfactoriamente el presente trabajo.

Un agradecimiento fraternal a todos los trabajadores de la Estación Experimental de Choquenaira y al personal del laboratorio Gen y Vida, por brindarme su colaboración y afecto en todo momento.

Finalmente un agradecimiento a todos mis amigos de la Facultad de Agronomía por la amistad y por el apoyo que mutuamente nos brindamos en los bellos momentos que pasamos en la Facultad.

## INDICE DE CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCION</b> .....	1
<b>1.1 OBJETIVOS</b> .....	2
1.1.1 Objetivo general .....	2
1.1.2 Objetivos específicos.....	2
<b>2 REVISION BIBLIOGRÁFICA</b> .....	3
2.1 Generalidades de los bovinos .....	3
2.2 Aspectos generales reproductivos de los bovinos.....	4
2.3 Características reproductivas de los bovinos .....	4
2.4 Anatomía del aparato reproductor del toro .....	5
2.4.1 Desarrollo prenatal de los órganos reproductivos .....	5
2.5 Escroto .....	6
2.5.1 Función del escroto .....	6
2.6 Testículos .....	7
2.6.1 Conductos externos.....	10
2.6.1.1 Epidídimo .....	10
2.6.1.2 Conductos deferentes .....	12
2.6.1.3 Uretra .....	12
2.6.1.4 Órganos sexuales accesorios .....	12
2.6.1.5 Vesículas seminales.....	13
2.6.1.6 Próstata.....	13
2.6.1.7 Glándulas bulbouretrales o de cowper .....	13
2.7 Pene .....	14
2.7.1 Emisión y eyaculación .....	14
2.7.2 Espermatogénesis.....	15
2.7.3 Espermatocitogénesis .....	15
2.7.4 Espermiogénesis .....	17
2.7.5 Espermiación.....	19
2.8 Control endocrino de la espermatogénesis .....	19
2.8.1 Ciclos de producción espermática.....	20
2.8.2 Onda de producción espermática.....	21

2.9 Colección de semen por vagina artificial o por electroeyaculador .....	21
2.9.1 Colección de semen .....	21
2.9.2 Descripción de la vagina artificial .....	23
2.9.3 Procesamiento del semen .....	24
2.9.4 Conservación a 5 °C.....	24
2.9.5 Conservación mediante congelación.....	25
2.9.6 Condiciones del animal .....	26
2.9.7 Régimen de colección de semen .....	27
2.10 Mantenimiento y limpieza de los equipos y accesorios utilizados en la colección .....	27
2.10.1 Procedimientos y recomendaciones en la colección y manejo del semen .	27
2.10.2 Evaluación microbiológica del semen.....	28
2.10.3 Infecciones de superficie .....	28
2.10.4 Microorganismos asociados con la transmisión por semen .....	29
2.10.5 Preparación de los sementales .....	30
2.11 Metabolismo del espermatozoide .....	30
2.12 Nutrición y cultivo de microorganismos .....	31
2.12.1 Bacterias Gram positivas.....	32
2.12.1.1 Genero Staphylococcus .....	33
2.12.1.2 Genero Streptococcus.....	33
2.12.2 Bacterias Gram negativas .....	34
2.12.2.1 Genero Escherichia .....	35
2.12.2.2 Genero Proteus .....	35
2.12.2.3 Genero Pseudomonas.....	36
2.12.3 Bacilos esporulados .....	36
2.12.4 Medios de cultivo.....	37
2.13 Antibiograma .....	38
<b>3. LOCALIZACIÓN .....</b>	<b>40</b>
3.1. Ubicación del estudio .....	40
3.1.1. Descripción ecológica.....	41
3.1.1.1 Fisiografía.....	41

3.1.1.2	Clima .....	41
3.1.1.3	Suelo .....	42
3.1.1.4	Vegetación .....	42
3.1.1.5	Ganadería .....	43
3.1.1.6	Características Climáticas .....	43
<b>4.</b>	<b>MATERIALES Y METODOS</b> .....	<b>44</b>
4.1	Materiales.....	44
4.1.1	Materiales para recolección de semen en campo .....	44
4.1.2	Materiales de laboratorio .....	44
4.1.3	Material Químico .....	44
4.1.4	Antibióticos .....	45
4.1.5	Material auxiliar .....	45
4.2	Metodología.....	45
4.2.1	Etapas experimentales.....	45
4.2.1.1	Lavado y esterilizado del material .....	45
4.2.1.2	Preparación de los medios de cultivo en laboratorio .....	46
4.2.1.3	Higiene del toro .....	46
4.2.2	Obtención de muestras .....	46
4.2.2.1	Lavado prepucial .....	46
4.2.2.2	Semen fresco .....	47
4.2.2.3	Semen congelado.....	47
4.2.2.4	Cultivo de muestras.....	47
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>49</b>
5.1	Confirmación de identidad de las muestras tomadas a los sementales .....	49
5.2	Clasificación general de las bacterias aisladas .....	51
5.3	Clasificación general de antibióticos .....	53
5.4	Antibiograma individual de los sementales bovinos .....	54
5.5	Unidades Formadoras de Colonia (UFC/ml) .....	57
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>63</b>
<b>7.</b>	<b>RECOMENDACIONES</b> .....	<b>65</b>
<b>8.</b>	<b>LITERATURA CITADA</b> .....	<b>69</b>

## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Diferencia entre temperatura corporal y testicular en el toro (°C).....	7
<b>Cuadro 2.</b> Resultados obtenidos en las pruebas de identificación de bacterias Gram negativas en medios selectivos, a partir de lavados prepuciales, semen fresco y semen congelado.....	49
<b>Cuadro 3.</b> Resultados de las pruebas de identificación de bacterias Gram negativas, en medios selectivos, partiendo del lavado prepucial, semen fresco y congelado.....	50
<b>Cuadro 4.</b> Resultados de las pruebas de identificación de bacterias Gram positivas, en medios selectivos, partiendo del lavado prepucial, semen fresco y congelado.....	51
<b>Cuadro 5.</b> Clasificación general de las bacterias patógenas reconocidas, aisladas en el lavado prepucial, semen fresco y semen congelado.....	51
<b>Cuadro 6.</b> Microflora del lavado prepucial, semen fresco y semen congelado de acuerdo a la especie de microorganismo.....	52
<b>Cuadro 7.</b> Especies aisladas de acuerdo al semental bovino.....	52
<b>Cuadro 8.</b> Clasificación general de antibióticos utilizados en diferentes especies de microorganismos.....	53
<b>Cuadro 9.</b> Antibiograma individual de acuerdo al desarrollo de bacterias en cultivo de lavado prepucial.....	54
<b>Cuadro 10.</b> Antibiograma individual de acuerdo al desarrollo de bacterias en cultivo de semen fresco.....	55
<b>Cuadro 11.</b> Antibiograma individual de acuerdo al desarrollo de bacterias en cultivo de semen congelado.....	56
<b>Cuadro 12.</b> Clasificación individual de la Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de las especies aisladas en lavados prepuciales de los sementales bovinos.....	61
<b>Cuadro 13.</b> Clasificación general de la Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de las especies aisladas en el semen fresco de los sementales bovinos.....	61
<b>Cuadro 14.</b> Clasificación general de la Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de las especies aisladas en el semen congelado de los sementales bovinos.....	61
<b>Cuadro 15.</b> Clasificación general de la Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de las especies aisladas en los sementales.....	61



## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Clasificación taxonómica de los bovinos.....	3
<b>Figura. 2</b> Características reproductivas del macho.....	4
<b>Figura 3.</b> Eventos realizados durante la espermatocitogénesis, las flechas indican al siguiente tipo celular.....	17
<b>Figura 4.</b> Colecta de semen con el método de la vagina artificial.....	22
<b>Figura 5.</b> Partes que componen la vagina artificial. ....	23
<b>Figura 6.</b> Tanques de nitrógeno líquido para el almacenamiento de pajuelas de semen.....	26
<b>Figura 7.</b> Agar Muller Hinton, para realizar el antibiograma, con seis discos de antibióticos dispuestos en igual proporción en la caja petri.....	39
<b>Figura 8.</b> Ubicación de la Estación Experimental de Choquenaira, Facultad de Agronomía – U.M.S.A.....	40
<b>Figura 9</b> Datos Climatológicos de la Estación Experimental Choquenaira.....	41
<b>Figura 10</b> Unidades Formadoras de Colonias en el lavado prepucial.....	57
<b>Figura 11</b> Unidades Formadoras de Colonias en el semen fresco.....	59
<b>Figura 12</b> Unidades Formadoras de Colonias en el semen congelado.....	61
<b>Figura 13.</b> Determinación del porcentaje de bacterias presentes en los sementales bovinos.....	62
<b>Figura 14.</b> Determinación del número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC/ml) presentes en los sementales bovinos.....	62

## RESUMEN

Se determinó mediante cultivo la presencia bacteriana en el semen bovino de 4 toros sementales de las razas Pardo suizo y Holstein, en el laboratorio de crioconservación de semen bovino de la Estación Experimental de Choquenaira, Provincia Ingavi, del Departamento de La Paz, dependiente de la Facultad de Agronomía, U.M.S.A.

El presente estudio se efectuó para determinar el grado de contaminación que puede existir en el proceso de crioconservación del semen bovino.

Se utilizaron cuatro reproductores de la estación, 3 pertenecientes a la raza Holstein y uno de la raza pardo suizo; se realizó tres diferentes tomas de muestras de cada uno de los animales, la primera muestra se obtuvo al efectuar el lavado prepucial, para el cual se usó la solución del suero fisiológico, seguidamente se realizó la colecta de semen fresco; utilizando la técnica de la vagina artificial, y la tercera muestra perteneció a las pajillas congeladas del laboratorio de crioconservación de la estación.

Para el análisis bacteriológico, se procesaron pajillas de los cuatro sementales, se utilizaron medios generales (Agar sangre), selectivos, (MacConkey), y específicos (Agar chocolate). Las muestras para el cultivo se obtuvieron del lavado prepucial, semen fresco y semen congelado o criopreservado, las cuales fueron transportadas hasta el laboratorio Gen y Vida (ubicado en la Avenida Busch del departamento de La Paz). En las muestras se observó crecimiento bacteriano, al ser sembradas por triplicado en cajas Petri, incubándose aeróbicamente a 37° C por 48 horas, las placas se incubaron en una atmósfera combinada de 10 % de dióxido de carbono y 90 % de oxígeno.

Cada uno de los aislamientos obtenidos se sometió a pruebas de diferenciación bioquímicas, así como la tinción Gram y azul de metileno, determinación de grado de toxicidad, prueba de catalasa, reducción de nitratos, H<sub>2</sub>S y TSI, además de realizar pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.

Entre los microorganismos identificados se encuentran *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*. Este grupo de microorganismos se encuentran en cantidades pequeñas como parte de la flora normal de vías respiratorias superiores y vías genitales; se aíslan frecuentemente en el suelo y agua, pero se vuelven patógenas cuando alcanzan tejidos ajenos a sus hábitats.

Otros microorganismos aislados en este estudio fueron bacterias saprofitas, *Staphylococcus sp*, *Streptococcus sp*, son microorganismos que se consideran patógenos oportunistas del tracto respiratorio y vías urinarias.

La presencia de *Pseudomonas aeruginosa*, se observo en un solo animal, siendo este el microorganismo a considerar, ya que este germen ha sido relacionado con una baja concentración de espermatozoides vivos, daño acrosomal, y por ende disminución en la capacidad fertilizante del semen descongelado de bovino.

Con relación a la resistencia de los microorganismos a ciertos antibióticos se encontró que los antibióticos que pueden ser usados en la congelación del semen bovino son la Gentamicina, Ceftazidima, Ciprofloxacina y amoxicilina + ácido clavulánico, trimetopim + sulfametoxazol solo en el caso de *Staphylococcus sp*.

En el semen congelado se obtuvo un conteo de 850 UFC/ml por la presencia de *Pseudomona aeruginosa* solamente en uno de los sementales. También se obtuvieron recuentos de 300, 200, 250 y 300 UFC/ml, tanto para *Staphylococcus* (HAVANO), *Streptococcus sp* (DANTE), *Escherichia coli* (NENE) y *proteus mirabilis* (DANTE, HAVANO, OLIVER Y NENE) respectivamente.

## SUMMARY

Bacterial presence in bovine semen 4 stud bulls of Holstein and Brown Swiss breeds was determined by culture in the laboratory of cryopreservation of bovine semen Choquenaira Experimental Station, Ingavi Province, La Paz Department, under the Faculty of Agriculture, UMSA

The present study was performed to determine the extent of contamination that may exist in cryopreservation of bovine semen.

Four DVD station were used, 3 belonging to the Holstein breed and one of the Brown Swiss breed; three different sampling of each of the animals, the first sample was obtained upon the preputial washing, for which saline solution was used, then the collection of fresh semen was performed was performed; using the technique of artificial vagina, and the third sample belonged to frozen lab station cryopreservation straws.

For bacteriological analysis, the four stallions straws were processed, specific general media (blood agar), selective (Mac conkey) and (chocolate agar) were used. Specimens for culture were obtained preputial, fresh or frozen semen and cryopreserved semen, which were transported to the laboratory and Life Gen (located on Avenida Busch department of La Paz). In samples bacterial growth, when cultivated in Petri dishes in triplicate and incubated aerobically at 37 ° C for 48 hours, the plates were incubated in a combined atmosphere of 10% carbon dioxide and 90% oxygen was observed.

Each of the isolates were subjected to biochemical tests of differentiation as well as the Gram stain and methylene blue, determination of toxicity, catalase test, nitrate reduction, H<sub>2</sub>S and TSI, in addition to antimicrobial susceptibility testing.

Among the identified microorganisms are *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*. This group of organisms are found in small amounts as part of the normal flora of upper respiratory tract and genital tract; frequently isolated in soil and water, but become pathogenic when they reach tissues outside their habitats.

Other organisms isolated in this study were saprophytic bacteria, *Staphylococcus* sp, *Streptococcus* sp, are microorganisms that are considered opportunistic pathogens of the respiratory tract and urinary tract.

The presence of *Pseudomonas aeruginosa*, was observed in one animal, and this is the microorganism to be considered, since this organism has been associated with a low concentration of live sperm, acrosomal damage and thus decrease in the fertilizing capacity of semen thawed cattle.

Regarding the resistance of microorganisms to certain antibiotics were found to antibiotics that can be used in freezing bovine sperm are gentamicin, ceftazidime, ciprofloxacin and amoxiclav, trimethoprim + sulfametoxazol only in the case of *Staphylococcus* sp.

Frozen semen in a count of 850 UFC/ml was obtained by the presence of *Pseudomonas aeruginosa* in only one of the stallions. Counts of 300, 200, 250 and 300 UFC/ml for both *Staphylococcus* sp (HAVANO), *Streptococcus* sp (DANTE), *Escherichia coli* (NENE) and *Proteus mirabilis* (DANTE, HAVANO, OLIVER AND NENE) respectively were also obtained.

## 1. INTRODUCCION

El consumo de Leche en Bolivia varia de 30 a 40 litros per cápita y la creciente demanda obliga al productor a ser más competitivo y obtener mejores rendimientos. Para obtener un mejor rendimiento, el productor debe realizar la selección del ganado, mejorar las condiciones físicas y fisiológicas que le permitan adaptarse al medio en la que se lo cría. Sin embargo en nuestro país existe la falta de conocimientos sobre selección de bovinos aptos para la producción lechera se considera como una de las limitantes principales.

Actualmente, la técnica de la inseminación artificial se utiliza como una alternativa para mejorar el ganado criollo del altiplano, especialmente para mejorar la producción lechera del ganado bovino, es así que el laboratorio de inseminación artificial de Kallutaca del departamento de La Paz, ha reportado múltiples beneficios a la ganadería bovina, en cuanto a la producción de leche, aunque cuyo desarrollo ha sido lento.

La introducción del semen congelado, práctica generalizada en la actualidad, si bien se asegura una muestra libre de contaminación microbiana, agravo el problema debido a que facilita el intercambio del material seminal sin limitaciones geográficas , sin embargo muchos agentes infecciosos sobreviven al proceso de congelación.

Por esta razón es aconsejable, una estricta supervisión y control veterinario de la salud de los machos donantes, unido a un adecuado laboratorio de diagnóstico, es posible garantizar la seguridad necesaria para obtener un semen libre de contaminaciones.

Así mismo, una de las ventajas de la inseminación artificial, es el de contribuir al control y prevención de ciertas enfermedades difíciles de controlar como la *Brucelosis*, *Tuberculosis*, *Campibacteriosis*, *Trichomoniasis*, *Leptospirosis*, *Rinotraqueitis Infecciosa Bovina*, *Diarrea Viral Bovina*, de los animales domésticos, sin embargo, cuando este control es violado en su uso práctico,

puede convertirse en un serio peligro por la diseminación más intensa de estas, aun con mayor frecuencia que la monta natural.

En la práctica diaria, ha puesto en evidencia la presencia de microorganismos patógenos y saprofitos de varios géneros y especies en el líquido seminal de los sementales bovinos, a pesar de las medidas higiénicas que se toman en los centros de procesamiento de pajuelas para la manipulación y preparación del semen, en este puede encontrarse especies bacterianas saprofitas, con mayor frecuencia, pero también pueden estar presentes algunas especies patógenas como *Actinomyces pyogenes bovis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*.

## **1.1 OBJETIVOS**

### **1.1.1 Objetivo general**

- ❖ Analizar la flora microbiana del semen bovino (*Bos taurus*) antes y después del congelamiento en la Estación Experimental de Choquenaira

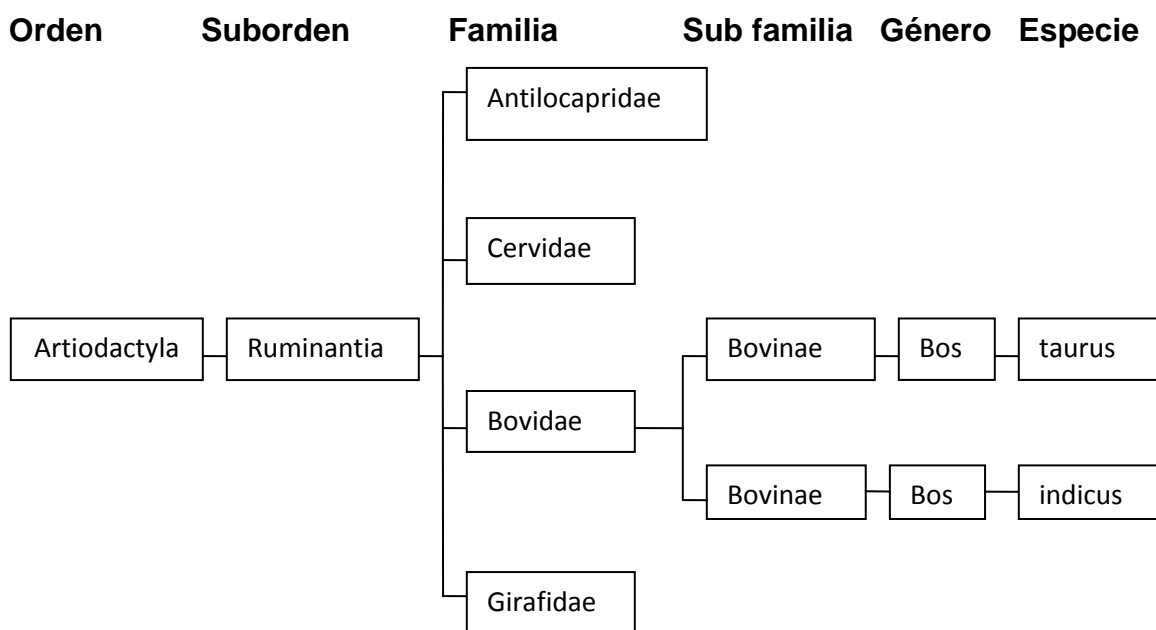
### **1.1.2 Objetivos específicos**

- ❖ Identificar los principales agentes patógenos en lavados prepuciales de los sementales bovinos
- ❖ Identificar la flora microbiana (bacterias) antes y después de la congelación de semen bovino.
- ❖ Evaluar la sensibilidad a los antibióticos (Antibiograma).

## 2 REVISION BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Generalidades de los bovinos

Los bovinos domésticos (*Bos taurus*), son mamíferos rumiantes sub-clase ungulados (provistos de pezuñas), orden artiodáctilos (con dos dedos pares ó animales de pezuña hendida), sub-orden Rumiantes (poligástricos), familia bovinos (Cuernos óseos huecos en su base y sin dientes incisivos superiores), género Bos con dos sub-géneros el taurus (ganado europeo) y el indicus (ganado tropical), (Figura. 1).



**FIGURA 1.** Clasificación taxonómica de los bovinos

Diferencias tan marcadas entre los animales del género *Bos taurus* y *Bos indicus* provienen de la adaptación a ambientes diametralmente opuestos de las latitudes, con influencia polar y tropical, respectivamente.

El *Bos taurus* constituye el grupo de razas europeas entre las que se destacan las razas lecheras Holstein, Jersey, Pardo suizo y las razas del tipo carne Charolais, Angus, Hereford, las cuales se adaptan a regiones templadas por excelencia.

El *Bos indicus* constituye el grupo de razas tropicales de carne tales como, Nelore, Guzera, Gir, Brahman e Indobrasil, las cuales tienen mayor resistencia al calor.



## 2.2 Aspectos generales reproductivos de los bovinos

Gasque (2008), Indica que el proceso reproductivo constituye la esencia de la renovación biológica en todas las especies. Una alta eficiencia reproductiva es requisito indispensable para el éxito económico, tanto de la ganadería lechera como la de carne. Los bovinos son animales que presentan ciclos estrales de normal regularidad, comprendido entre periodos de estros consecutivos, el cual tiene una duración entre 19 a 21 días.

## 2.3 Características reproductivas de los bovinos

Generalmente en bovinos, la pubertad se define como el tiempo en que un macho es capaz de dejar gestante a una vaca. Para lograr esto, se requiere la presencia de al menos, 50 millones de espermatozoides por cada eyaculación, de estos más de 105 mil deben mostrar motilidad precoz. (Gasque 2008).

<b>CARACTERISTICAS REPRODUCTIVAS DEL MACHO</b>	
Volumen de eyaculado	4ml 2 - 15 ml
Número de espermatozoides	4000 - 5000 millones
Sitio de inseminación	Vagina de la Vaca
Tiempo de llegada del semen al oviducto	2 - 13 minutos
Número de espermatozoides que llegan la oviducto	4200 – 27500
Vida fértil del espermatozoide	30 - 48 horas
Tiempo de eyaculación	1- 2 segundos
Porcentaje Ideal de motilidad	75%
Porcentaje ideal de células normales	95%
pH del semen	6.7 - 6.9 (promedio 6.8)
Edad a la pubertad	10 meses
Inicio para la utilización como semental	18 - 24 meses

**Figura. 2** Características reproductivas del macho  
(Fuente: Enciclopedia Bovina, 2008 UNAM – México)

## **2.4 Anatomía del aparato reproductor del toro**

La función natural de los sementales es la producción de espermatozoides potencialmente fértiles y su adecuado depósito en el aparato reproductor de la hembra (Salisbury *et al.*, 1978).

Salisbury, Van Demark (1990), describe que la inseminación artificial modifica únicamente los medios y lugar de depósito de los espermatozoides. Todos los procesos fisiológicos del toro contribuyen a la producción y mantenimiento de los espermatozoides. Los órganos sexuales masculinos principales son los dos testículos, que en los mamíferos se hallan localizados en una bolsa externa llamada escroto.

Para poder cumplir con esta función, el macho está provisto de una serie de órganos reproductivos, que para su fácil comprensión se han dividido en tres:

a) órganos sexuales primarios o testículos, ubicados en el escroto; b) órganos reproductivos secundarios, que son los conductos que comunican los testículos con el exterior y el pene, entre ellos se encuentran, los conductos eferentes, epidídimos y conductos deferentes; y c) órganos reproductivos accesorios que incluyen la glándula prostática, dos glándulas vesiculares y dos glándulas bulbouretrales (Salisbury *et al.*, 1978).

Los testículos tienen dos funciones: a) producción de espermatozoides fértiles y b) producción de hormonas sexuales, bajo la influencia de las hormonas de la adenohipófisis. En los mamíferos, la producción de espermatozoides se efectúa a una temperatura inferior a la del resto del cuerpo, lo que se puede lograr gracias a la ubicación del escroto en relación al cuerpo (Salisbury *et al.*, 1978).

### **2.4.1 Desarrollo prenatal de los órganos reproductivos**

Los testículos se desarrollan en el interior del abdomen, en posición medial respecto al riñón (mesoneros). Dentro del testículo, el plexo de conductos se conecta a los túbulos mesonéricos para formar el epidídimo, conducto deferente y glándulas vesiculares. Las glándulas prostáticas y bulbouretral se forman a partir

del seno urogenital embrionario, y el pene a partir de un tubérculo que se desarrolla en el orificio del seno urogenital (Hafez y Hafez, 2002).

## **2.5 Escroto**

El escroto es un saco bilobulado o dividido por un surco vertical medio que contiene los testículos y se localiza en la región inguinal. El escroto se halla formado por varias capas:

- a) La piel, se halla cubierta por pelos finos y posee muchas glándulas sebáceas y sudoríparas grandes.
- b) La túnica de Dartos, íntimamente ligado a la piel excepto en la parte dorsal de la bolsa, está formada de tejido muscular involuntario y de fibras y de conexiones de tejido conjuntivo. En el fondo de cada bolsa, la túnica de Dartos se fija a la túnica vaginal.
- c) La túnica vaginal, es una prolongación de peritoneo. La túnica vaginal tiene dos capas, una capa visceral que es el revestimiento del testículo y el epidídimo y otra parietal que reviste la cavidad escrotal. Desciende dentro del escroto como una bolsa bilobulada que se estrecha en la parte posterior por donde atraviesa el anillo inguinal. En su interior se encuentran las arterias y venas espermáticas, los nervios linfáticos y conductos de los testículos (cordón espermático) además de glándulas que segregan un líquido lubricante).
- d) El músculo cremaster, se origina en el orificio interno del canal inguinal, es estriado y se fija en la parte exterior de la túnica vaginal en las zonas posteriores y externa (Salisbury *et al.*, 1978).

### **2.5.1 Función del escroto**

El escroto con todas sus capas, músculos y revestimientos le dan soporte y protección a los testículos, además de que le ayudan a mantener una temperatura menor a la corporal, lo que se requiere para mantener una espermatogénesis activa. La diferencia en temperatura entre la cavidad abdominal y los testículos es de 2 °C en el mono, hombre y perro y hasta de 8°C en la rata. En el toro se han

encontrado variación entre la diferencia de temperatura corporal y la testicular (**Cuadro 1**) dependiendo esto de la temperatura ambiente (Salisbury *et al.*, 1978).

**Cuadro 1. Diferencia entre temperatura corporal y testicular en el toro (°C).**

<b>Ambiental</b>	<b>Organismo</b>	<b>Intra-testicular</b>	<b>Escroto externo</b>
15.2	38.6	34.7	31.8
37.8	39.1	37.0	35.6

Fuente: Salisbury *et al.*, 1978

Cuando la temperatura testicular es baja, la túnica Dartos se contrae retrayendo al escroto y acercando los testículos al cuerpo del animal, lo contrario pasa cuando la temperatura es alta, la túnica Dartos se relaja, alejando así los testículos del cuerpo; esta función termorreguladora empieza en los machos hasta la pubertad y está controlada por las hormonas testiculares. Otro factor termorregulador es el ofrecido por el plexo pampiniforme, en el cual se enfría o se calienta la sangre de la arteria testicular por medio del contacto con las venas testiculares (Salisbury *et al.*, 1978), además de que los receptores ubicados en la piel escrotal pueden inducir respuestas que desencadenan en la disminución de la temperatura corporal y a provocar jadeo y sudoración (Hafez y Hafez, 2002).

Cuando la temperatura es muy alta y no se puede controlar por estos factores termorreguladores, se produce degeneración de tejidos espermáticos y se detiene la espermatogénesis, mientras que la actividad de las células de Leydig se mantiene (Salisbury *et al.*, 1978).

## **2.6 Testículos**

Los testículos tienen dos funciones básicas, la producción de espermatozoides potencialmente fértiles y la producción de los andrógenos testosterona y androstenediona. Los testículos del toro tienen forma oval alargado, suspendidos dentro del escroto por el cordón espermático. El tamaño de los testículos del toro varía según la edad y raza del toro (Salisbury *et al.*, 1978).

En cada testículo se hayan las siguientes estructuras: la túnica albugínea, es la capa externa de los testículos, es una capa delgada y blanquecina de tejido conjuntivo elástico; por debajo de ella se encuentra el parénquima, que es de color amarillento y está dividido en segmentos por tejido conjuntivo; dentro del parénquima se encuentran numerosos túbulos seminíferos, se calcula que en el toro adulto entre todos tienen una longitud aproximada de 4.8 km y un diámetro cada uno de 200 a 300 micras, estos túbulos desembocan los espermatozoides en un tabique medial llamado mediastino su contenido, entre los túbulos seminíferos se encuentran las células intersticiales o de Leydig que representan aproximadamente el 20% del peso del testículo normal del toro (Salisbury *et al.*, 1978; Hafez y Hafez, 2002).

La inervación e irrigación del testículo están íntimamente asociadas. El nervio simpático externo que nace en el ganglio mesentérico posterior acompaña a la arteria espermática en el cordón espermático y se divide para inervar los testículos. La inervación de los propios testículos se cree que está formada totalmente por nervios simpáticos vasoconstrictores que controlan el flujo de sangre por todo el testículo. Los nervios del epidídimo y escroto tienen fibras colinérgicas y adrenérgicas, lo que indica que se hallan presentes fibras simpáticas y parasimpáticas. Por ello la corriente sanguínea de los testículos se ve disminuida cuando existe el miedo (Salisbury *et al.*, 1978).

La inervación autónoma de los testículos mantiene la regulación de las funciones del aparato genitourinario del macho, donde los mecanismos adrenérgico, colinérgico y no adrenérgico no colinérgico operan conjuntamente (Hafez y Hafez, 2002).

La irrigación está a cargo de la arteria espermática (testicular), esta nace de la aorta, la arteria espermática se va arrollando conforme desciende al cono testicular, lo que es un mecanismo mediante el cual la sangre venosa (más fría) ayuda a disminuir la temperatura de la sangre arterial, además de que disminuye la presión arterial casi a cero (Salisbury *et al.*, 1978; Hafez y Hafez, 2002).

La arteria testicular pasa sobre el testículo hasta la porción ventral (bajo la cola del epidídimo), en donde se divide en tres o cuatro ramas arrolladas que después se subdividen una vez más para formar un modelo de arterias arrolladas sobre sí mismas, que atraviesan de abajo arriba la superficie del testículo. Las arterias terminales se dividen y penetran en el testículo a lo largo del mediastino desde el que se irradian para irrigar los lóbulos del tejido testicular, después estas se subdividen hasta llegar a capilares, los cuales corren a lo largo y alrededor de los túbulos seminíferos, pero no los atraviesan. La linfa procedente del testículo y epidídimo pasa a los ganglios linfáticos de la aorta lumbar (Hafez y Hafez, 2002).

**a) Túbulos seminíferos:**

Los túbulos seminíferos contienen en su interior células de Sertoli y células germinales en diferente estadio de desarrollo. Las células de Sertoli inmediatamente antes de la pubertad forman una barrera que aísla a las células germinativas y en diferenciación de la circulación general, además de servir de guía en la diferenciación de espermatozoides segregan líquido hacia la luz del tabuló seminífero (Hafez y Hafez, 2002).

Los túbulos seminíferos se unen formando los tubos rectos que a su vez forman la *rete testis* en el mediastino, ya ahí se continúan en una docena de vasos eferentes hasta que confluyen en la parte dorsal del mediastino dando lugar así al comienzo del epidídimo (Salisbury *et al.*, 1978).

**b) Células intersticiales o de Leyding:**

Se distribuyen en el parénquima de los testículos y entre los túbulos seminíferos, son las principales productoras de hormonas masculinas, las que vierten en las venas testiculares y vasos linfáticos (Salisbury *et al.*, 1978; Hafez y Hafez, 2002). En los bovinos se empiezan a observar desde que el embrión tiene 30 mm de tamaño y a partir de ese momento empiezan a aumentar en número hasta inmediatamente antes del parto, cuando se observa una disminución en su crecimiento (Salisbury *et al.*, 1978; Hafez y Hafez, 2002).

### **c) Función endocrina de los testículos:**

La producción de hormonas es una función muy importante de los testículos, ya que aparte de manifestar los caracteres de masculinidad en los machos son necesarios para la correcta producción de los espermatozoides (Salisbury *et al.*, 1978).

Los andrógenos se forman en los testículos bajo la influencia de las hormonas folículo estimulantes (FSH) y hormona luteinizante (LH) u hormona estimulante de las células intersticiales (ICSH); a su vez, la secreción de gonadotropinas se encuentra controlada por los andrógenos y estrógenos, un aumento en cualquiera de ellos da como resultado una disminución en la producción de gonadotropinas (Salisbury *et al.*, 1978).

Las funciones de la testosterona son:

- a) Tiene relación para el comienzo y mantenimiento de la espermatogénesis,
- b) Es responsable del deseo sexual (libido) del macho,
- c) Desarrollo de los caracteres secundarios del macho,
- d) Mantiene la integridad funcional del músculo de la túnica Dartos y el epidídimo
- e) Mantiene la actividad secretora de las glándulas sexuales accesorias.

### **2.6.1 Conductos externos**

#### **2.6.1.1 Epidídimo**

Es la estructura que le sigue a los conductos eferentes, en la parte dorsal del testículo y para su mejor comprensión se divide en 3 porciones: cabeza, cuerpo y cola del epidídimo (Salisbury *et al.*, 1978).

El epidídimo se encuentra dentro de una vaina de revestimiento de tejido conjuntivo que es una prolongación de la túnica albugínea, la porción más arrollada del epidídimo es la cabeza, ubicada en la porción dorsal del testículo. Las circunvoluciones del tubo empiezan a disminuir mientras que este desciende a

la porción ventral hasta tomar un aspecto de tubo recto (cuerpo); para finalmente en la porción ventral aumentan las circunvoluciones y en unión con la vaina que lo rodea forma la cola del epidídimo (Salisbury *et al.*, 1978).

La luz del conducto epididimal se haya revestida de glándulas; sin embargo, en la cabeza del epidídimo se encuentra un epitelio prismático pseudoestratificado con cilios, que mueven en dirección del cuerpo del epidídimo; en el toro el epidídimo puede llegar a medir hasta 35 m. (Salisbury *et al.*, 1978).

Las principales funciones del epidídimo son:

1. transporte, son varios los factores que contribuyen al movimiento de los espermatozoides por el epidídimo, uno es la presión que ejercen los espermatozoides en los túbulos seminíferos y la red testicular; otro factor que posiblemente ejerza influencia sobre el movimiento de los espermatozoides son los cilios presentes en el epidídimo, (Bearden y Fuquay, 1982). En el toro, los espermatozoides duran de 9 a 13 días en pasar por el epidídimo, cuando las eyaculaciones son frecuentes, el transporte se acelera de un 10 a 20% (Bearden y Fuquay, 1982; Hafez y Hafez, 2002).
2. Concentración, diariamente el testículo segrega una gran cantidad de líquidos hacia el epidídimo (hasta 60 ml en el carnero), este es absorbido principalmente en la cabeza del epidídimo, y así existe una concentración de espermatozoides aproximada en el toro de  $100 \times 10^6$  a  $400 \times 10^7$  por ml (Bearden y Fuquay, 1982; Hafez y Hafez, 2002).
3. Almacenamiento, el epidídimo cuenta con las condiciones adecuadas para almacenar espermatozoides viables hasta por 60 días, (Bearden y Fuquay, 1982). La cola del epidídimo es el principal órgano de almacenamiento, pues casi el 75% de los espermatozoides en el epidídimo se encuentran en esta última estructura (Hafez y Hafez, 2002).
4. Maduración, cuando los espermatozoides entran a la cabeza del epidídimo no tienen la capacidad de movilidad y de fertilidad, y es en el epidídimo



donde la adquieren, además de perder una gota citoplasmática ubicada en el cuello (Bearden y Fuquay, 1982).

#### **2.6.1.2 Conductos deferentes**

Estos nacen donde termina el epidídimo, en la porción ventral del testículo y se prolongan a la porción dorsal atravesando el anillo inguinal con el cordón espermático, una vez en la cavidad abdominal se dirige hacia la pelvis para desembocar en la uretra. Los conductos deferentes tienen un diámetro de 32 a 46 mm, con una luz relativamente pequeña y revestida de una mucosa de epitelio prismático pseudo estratificada; tiene además dos capas de fibras musculares involuntarias, una circular y otra longitudinal y se encuentra recubierto por peritoneo (Salisbury *et al.*, 1978).

Los conductos deferentes tienen una abundante inervación proveniente del plexo pelviano, del sistema nervioso simpático. En la región pelviana cada conducto deferente se ensancha para formar la ampolla de Henle, en la cual se acumulan los espermatozoides, esta ampolla cuenta con numerosas glándulas que segregan fructosa y ácido cítrico (Salisbury *et al.*, 1978).

#### **2.6.1.3 Uretra**

Es la vía común para la excreción de la orina y la eyaculación. Se extiende a través de la zona pelviana y del pene hasta la punta del glande del pene como orificio uretral externo. La uretra se origina en el cuello de la vejiga, en el orificio uretral interno y se ensancha inmediatamente después formando el *culliculus seminalis*, en donde se mezclan las secreciones provenientes de los conductos deferentes, y glándulas accesorias (Salisbury *et al.*, 1978).

#### **2.6.1.4 Órganos sexuales accesorios**

Estos proporcionan la mayor parte del eyaculado, contiene abundantes carbohidratos, citratos, proteínas, aminoácidos, enzimas, vitaminas hidrosolubles y minerales y posee una capacidad tampón relativamente alta, que sirve para mantener los procesos vitales de los espermatozoides (Salisbury *et al.*, 1978).

La arteria pudenda interna irriga los genitales pélvicos, y sus ramas salen de la cavidad pélvica por el arco del isquion (arco isquiático) para llevar sangre al pene. La linfa de las glándulas accesorias, uretra y pene llega a los ganglios iliacos medios y sacros; la del escroto, prepucio y de tejidos peripeneanos drena hacia los ganglios linfáticos inguinales superficiales (Hafez y Hafez, 2002).

#### **2.6.1.5 Vesículas seminales**

Situadas una a cada lado de la ampolla, se abren en el *culliculus seminalis* por encima o abajo de los conductos deferentes. Tienen una longitud > 10 cm y un grosor > 2.5 cm; son lobuladas; las paredes contienen fibras musculares involuntarias y una cubierta fibrosa externa. La irrigación sanguínea proviene de la arteria pudenda interna. Son glándulas de mucha actividad secretora, contribuyen en el toro con más del 50% del volumen del semen; la secreción tiene más del 1% de fructosa y ácido cítrico, además contiene amortiguadores como fosfatos y carbonato (Salisbury *et al.*, 1978; Bearden y Fuquay, 1982).

#### **2.6.1.6 Próstata**

Se sitúa dorsalmente a la unión de la uretra pelviana con el cuello de la vejiga; tiene una longitud de unos 3.7 cm, una anchura de 1.25 cm y un grosor de 1.25 cm. La próstata rodea a la uretra pelviana, siendo más gruesa en la parte dorsal que la ventral y vierte su contenido a ese conducto mediante numerosos orificios pequeños. Se halla rodeada de músculos uretrales. La próstata se haya revestida por células glandulares prismáticas, es el origen de la antiaglutinina del macho y segrega un líquido rico en iones inorgánicos como sodio, cloro, calcio y magnesio (Salisbury *et al.*, 1978; Bearden y Fuquay, 1982).

#### **2.6.1.7 Glándulas bulbouretrales o de Cowper**

Situadas a ambos lados de la uretra pelviana, aproximadamente a 10 o 15 cm de la próstata, se hayan parcialmente enterradas en el músculo bulbo cavernoso. Están revestidas por una gruesa capa de tejido fibroso, son algo ovoides y miden aproximadamente 2.5 cm de longitud por 1.25 cm de grosor. Cada una de ellas vierte una secreción a la uretra a través de un orificio simple. Producen una sustancia lubricante viscosa, de aspecto de moco (Salisbury *et al.*, 1978).

## **2.7 Pene**

En los mamíferos, el pene tiene tres cuerpos cavernosos que se agrupan alrededor de la uretra peniana. El cuerpo cavernoso, que rodea la uretra, se expande. Este bulbo está cubierto por un músculo bulbo esponjoso estriado. El cuerpo cavernoso se origina en un par de raíces del arco isquiático, que están cubiertas por los músculos isquiocavernosos. La túnica albugínea envuelve a los cuerpos cavernosos (Hafez y Hafez, 2002).

La parte fija del pene se denomina raíz, la parte principal del órgano cuerpo y la parte libre se llama glande del pene. Constituido en la mayoría de las especies de gran parte de tejido eréctil, dado por los cuerpos cavernosos, que cuando el macho se estimula sexualmente se llenan de sangre, aumenta la presión y el pene se pone erecto (Salisbury *et al.*, 1978).

En el toro, carnero y verraco, los espacios vacíos del cuerpo cavernoso del pene son pequeños, excepto en las raíces y en el dobles distal de la curvatura sigmoidea, motivo por el cual el pene de los machos de estas especies no se hace más grande, pero si más rígido cuando se excita. La cavidad prepucial tiene unos 38 cm de longitud y un diámetro de 2.5 cm y se haya revestido de epitelio escamoso estratificado de diferente altura (Salisbury *et al.*, 1978; Hafez y Hafez, 2002). El pene y el escroto son irrigados por la arteria pudenda externa, la cual proviene de la cavidad abdominal a través del conducto inguinal (Hafez y Hafez, 2002).

### **2.7.1 Emisión y eyaculación**

La emisión consiste en el paso de líquido espermático a través de los conductos deferentes hacia la uretra pélvica, en donde se mezcla con las secreciones de las glándulas accesorias; esta es realizada por la acción de los músculos lisos, bajo el control del sistema nervioso autónomo. Durante la excitación y eyaculación, existen también contracciones de la cola del epidídimo y el conducto deferente (aumentando la tasa de flujo); dichas contracciones son controlada por los nervios autónomos simpáticos del plexo pélvico, provenientes de los nervios hipogástricos (Salisbury *et al.*, 1978; Hafez y Hafez, 2002).

Sorensen (1980), menciona que la eyaculación es el resultado de una serie de fenómenos que por lo regular, comienza con la aparición de la libido o deseo sexual en el macho. Ello depende de la presencia de testosterona, la hormona sexual masculina, que se encuentra en forma más o menos continua en el macho. Hasta cierto punto, el estado de salud del animal determina el nivel de la libido, ya que los que están enfermos carecen del deseo de copular. La presencia de una hembra en celo aumenta la actividad sexual del macho, si bien, este procurara montar cualquier hembra.

La eyaculación es el paso del semen por la uretra peniana, para que esta pueda llevarse a cavo, el músculo bulbo esponjoso comprime el bulbo peniano, de modo que bombea sangre desde este hacia el resto del cuerpo esponjoso. A diferencia del cuerpo cavernoso peniano, este cuerpo cavernoso normalmente es drenado por venas dístales y las ondas de presión de este ayudan a transportar el semen por la uretra (Hafez y Hafez, 2002).

### **2.7.2 Espermatogénesis**

La espermatogénesis es un proceso mediante el cual ocurre una diferenciación celular, para lo cual es necesario que ocurran una serie de divisiones mitóticas y meióticas además de transformaciones citológicas hasta la formación completa de un espermatozoide (Barth y Oko, 1989). Todo el proceso es llevado a cabo en los túbulos seminíferos a partir de las espermatogonias, la espermatogénesis se divide a su vez en dos fases: la espermatocitogénesis y espermiogénesis (Salisbury *et al.*, 1978).

### **2.7.3 Espermatocitogénesis**

Antes de la pubertad solo se encuentran dos tipos de células en los túbulos seminíferos, las células de Sertoli (sirven de sustento) y espermatogonias o células sexuales primarias del macho, estas últimas experimentan una serie de divisiones y cambios que comienzan en la periferia y avanzan hacia la luz del túbulo, (Salisbury *et al.*, 1978; Hafez y Hafez, 2002); no se sabe a ciencia cierta en

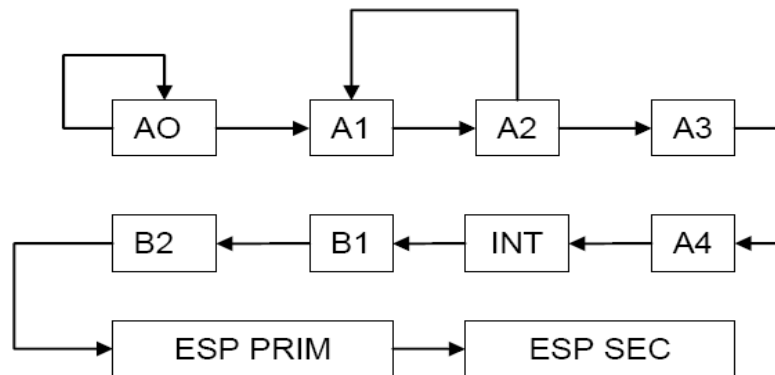
qué clase de procesos están implicados las células de Sertoli, pero se supone que desempeñan el papel de alimentación de espermatozoides totalmente formados, antes de que abandonen los túbulos (Salisbury *et al.*, 1978).

Las espermatogonias (tipo A0), son células diploides, estas y las células de Sertoli son relativamente inactivas hasta antes de la pubertad, que en el ternero es a los 6-9 meses de edad y es cuando empieza la división de espermatogonias, las cuales llenan la periferia y se extienden hacia la luz del túbulo (Salisbury *et al.*, 1978; Hafez y Hafez, 2002). Las espermatogonias tipo A0 se dividen para dar origen a las espermatogonias A1, las cuales se dividen progresivamente para formar las espermatogonias A2, A3 y A4. El tipo A4 se divide para formar espermatogonias intermedias y este a su vez forma los tipos B1 y B2, estas células se pueden identificar mediante cortes histológicos y tinciones (Barth y Oko, 1989; Hafez y Hafez, 2002).

Es posible que las espermatogonias tipo A2 no solo se dividen para formar espermatozoides, sino que también para reponer la población del tipo A1, mientras que los tipo A0 reponen la población de células madre (Barth y Oko, 1989; Hafez y Hafez, 2002).

Las espermatogonias tipo B2 son la base de la producción de espermatozoides, estas se dividen para formar dos espermatocitos primarios, hasta este momento, todas las divisiones han sido mitóticas, es decir, se han conservado los números diploides de cromosomas (Salisbury *et al.*, 1978).

Los espermatocitos primarios se dividen a su vez en dos células haploides, llamadas espermatocitos secundarios, cada uno de los cuales a su vez se dividen en 2 espermátides, de modo que cada espermatocito primario da origen a cuatro espermátides (Figura 3). Los espermatozoides, en su estadio final, se producen a partir de las espermátides, después de que las divisiones celulares se sucedieron hasta espermátides, continua la espermiogénesis o segunda fase de la espermatogénesis (Salisbury *et al.*, 1978).



**Figura 3.** Eventos realizados durante la espermatocitogénesis, las flechas indican al siguiente tipo celular

#### 2.7.4 Espermiogénesis

Se conoce como espermiogénesis a la segunda fase de la espermatogénesis, la cual consiste en la metamorfosis de la espermatíde hasta espermatozoide totalmente formado, aunque inmaduro (Salisbury *et al.*, 1978).

La espermiogénesis se divide en 4 fases: 1) fase de Golgi, 2) de encasquetamiento, 3) acrosómica y 4) de maduración:

1. Fase de Golgi: Caracterizada por la formación de gránulos proacrosómicos y su coalescencia en una sola vacuola, la adhesión del gránulo acrosómico resultante a la envoltura nuclear, y las etapas tempranas de formación de la cola (Hafez y Hafez, 2002). El centríolo proximal se acerca al núcleo, se cree que de ahí forma una base para la unión de la cola y cabeza (Salisbury *et al.*, 1978; Hafez y Hafez, 2002).
2. Fase de escasquetamiento: Caracterizada por la dispersión del granulo acrosómico adherente sobre la superficie del núcleo de la espermatíde, continuando el proceso hasta aproximadamente dos tercios de la porción anterior del núcleo, quedando cubierto por un delgado saco membranoso de doble capa adherido íntimamente a la envoltura nuclear, el acrosoma del espermatozoide se forma a partir de estas estructuras y el líquido contenido

en la vacuola (Salisbury *et al.*, 1978; Hafez y Hafez, 2002). En esta fase los componentes axonémicos de la cola en desarrollo, formados a partir del centriolo distal, se alargan más allá de la periferia del citoplasma celular. En el desarrollo temprano, el axonema es muy parecido a un cilio, ya que consiste en dos túbulos centrales rodeados por nueve pares de túbulos (Hafez y Hafez, 2002).

3. Fase acrosómica: Se reconoce esta fase por cambios en el núcleo, lo cual es facilitado por la rotación del núcleo hacia la base del túbulo seminífero las colas hacia la luz del túbulo. Los cambios incluyen condensación de la cromatina en gránulos densos y remodelación del núcleo, de esferoide ha aplanado y alargado. Aquí las histonas nucleares son sustituidas progresivamente por proteínas transicionales. El acrosoma, íntimamente adherido al núcleo, también se condensa y alarga (Hafez y Hafez, 2002). El citoplasma se desplaza hacia la parte caudal del núcleo rodeando la parte proximal de la cola en desarrollo; en el citoplasma, los microtúbulos se asocian y forman una vaina cilíndrica temporal llamada manguito que rodea laxamente al axonema, dentro del manguito, el cuerpo cromatoide se condensa alrededor del axonema formando una estructura llamada anillo citoplásmico, el cual emigra a lo largo de la cola (Hafez y Hafez, 2002). Las mitocondrias se concentran en la parte posterior de la célula en la membrana intracitoplasmática, formando un collar que aparece desde los bordes externos de la parte posterior del núcleo. Esta membrana, conocida como tubo caudal, define la zona del citoplasma que va a incluirse en la vaina mitocondrial que recubre los filamentos axiales (Salisbury *et al.*, 1978).
4. Fase de maduración: Durante esta fase, dentro del núcleo, los gránulos de cromatina se condensan progresivamente, mientras las proteínas transicionales son substituidas por protaminas formando así un material homogéneo que llena homogéneamente todo el núcleo espermático. Alrededor del axonema se forma una vaina fibrosa y las 9 fibras gruesas subyacentes al parecer estas se asocian individualmente con los 9 pares de

microtúbulos del axonema y son continuas con las presentes en el cuello del segmento conector de la espermátide. La vaina fibrosa cubre el axonema hasta el inicio del segmento caudal. El anillo citoplásmico migra caudalmente hasta el punto donde más tarde se separara el segmento medio del principal y las mitocondrias se empaquetan apretadamente en una vaina continua desde el cuello hasta el anillo citoplásmico (Hafez y Hafez, 2002). Después de la eliminación del exceso de citoplasma, queda una gota citoplasmática residual (Salisbury *et al.*, 1978).

### **2.7.5 Espermiación**

Se llama espermiación a la liberación de las células germinales hacia la luz del túbulo seminífero, en esta etapa, las espermátides se orientan perpendicularmente hacia la pared de la célula de Sertoli y sobresalen poco a poco hacia la luz del túbulo. La unión de las espermátides con la célula de Sertoli es entonces un puente intercelular que se va destruyendo hasta solo quedar un delgado tallo conectado al cuello de la espermátide. Después de la liberación, queda una gota citoplasmática en el espermatozoide y los residuos son fagocitados por las células de Sertoli, que además fagocita muchas espermátides degeneradas (Hafez y Hafez, 2002).

### **2.8 Control endocrino de la espermatogénesis**

El proceso de la espermatogénesis se encuentra bajo el control endocrino, no se tienen datos suficientes para determinar la secuencia exacta de todas las hormonas que interactúan para llevar a cabo con éxito la espermatogénesis, pero se ha demostrado que las principales glándulas que influyen en ella son el hipotálamo, la pituitaria y los testículos (Salisbury *et al.*, 1978).

La espermatogénesis requiere tanto la acción de la FSH como de los andrógenos inducidos por la acción de la LH en las células intersticiales. La secuencia de acontecimientos en el control hormonal de la espermatogénesis en el toro parece ser de la siguiente manera:



1. En la pubertad la gonadotropina LH actúa sobre las células de Leydig (células intersticiales), para producir andrógenos.
2. El andrógeno inicia las primeras fases de la espermatogénesis posiblemente actuando en unión con la FSH.
3. La FSH estimula las células Sertoli para producir y liberar una proteína que se liga a los andrógenos (ABP) que aumenta el enlace y la acumulación de éstos andrógenos dentro del túbulo seminífero.
4. La FSH estimula la espermiogénesis y en presencia con el andrógeno termina la producción de espermatozoides.
5. La espermatogénesis se mantiene por un equilibrio entre la FSH, andrógenos y estrógenos.
6. El andrógeno además de mantener las condiciones óptimas durante la espermatogénesis, favorece el transporte de espermatozoides y depósito del semen cerca del lugar de fecundación (Salisbury *et al.*, 1978).

### **2.8.1 Ciclos de producción espermática**

En los túbulos seminíferos de machos reproductivamente activos, existe una clase de sincronía en la cual forman asociaciones celulares que experimentan cambios cíclicos (Bearden y Fuquay, 1982; Hafez y Hafez, 2002), en el toro se han identificado 12 etapas de este ciclo, a estos ciclos se les denomina *ciclo de epitelio seminífero* y se define como “una serie de cambios en un área determinada de epitelio seminífero entre dos apariciones de la división celular o entre dos del desarrollo” y dura en el toro aproximadamente 14 días (Hafez y Hafez, 2002). De tal manera que los espermatozoides liberados tienen una asociación única con 13 tipos específicos de células, además de las 14 fases diferentes en las que se divide una espermátide durante la espermiogénesis, durante las 12 etapas en las que se divide el ciclo del epitelio seminífero (Barth y Oko, 1989), estas asociaciones celulares se encuentran seriadas y en regularidad cíclica (Bearden y Fuquay, 1982).

### **2.8.2 Onda de producción espermática**

Las etapas del ciclo seminífero cambia no solo con el tiempo, sino que también ocurren en secuencia a lo largo del asa tubular (Bearden y Fuquay, 1982; Barth y Oko, 1989; Hafez y Hafez, 2002); ese cambio secuencial a través del tiempo y espacio se conoce como *onda del epitelio seminífero*, así comienza una serie de etapas de menos avanzada a media asa y continua con etapas progresivamente más avanzadas cerca de la red testicular (Hafez y Hafez, 2002).

Por ejemplo, si el ciclo de epitelio seminífero, se encuentra en fase 3, entonces encontramos a los lados las fases 2 y 4, aunque muchas veces el orden puede cambiar por modulaciones en el epitelio seminífero (Barth y Oko, 1989).

### **2.9 Colección de semen por vagina artificial o por electroeyaculador**

El método ideal para la colección de semen es con vagina artificial, en especial cuando se dispone de los instrumentos apropiados (brete de monta, vagina artificial, baño de agua maría a 37°C y personal entrenado). Por lo general, la factibilidad del uso de este método se aplica a los animales más dóciles y por lo tanto fáciles de entrenar. El segundo método es la electroeyaculación, con la cual se obtiene un mayor volumen debido a la estimulación directa sobre las glándulas accesorias. Este método es ideal cuando se necesita evaluar un gran número de reproductores aunque son menos dóciles para habituarse al uso de vagina artificial. El técnico encargado de la colección por electroeyaculación debe reconocer y recuperar sólo la fracción rica en espermatozoides, para que la colección de semen sea semejante a la obtenida con vagina artificial (Zemjanis, 1982).

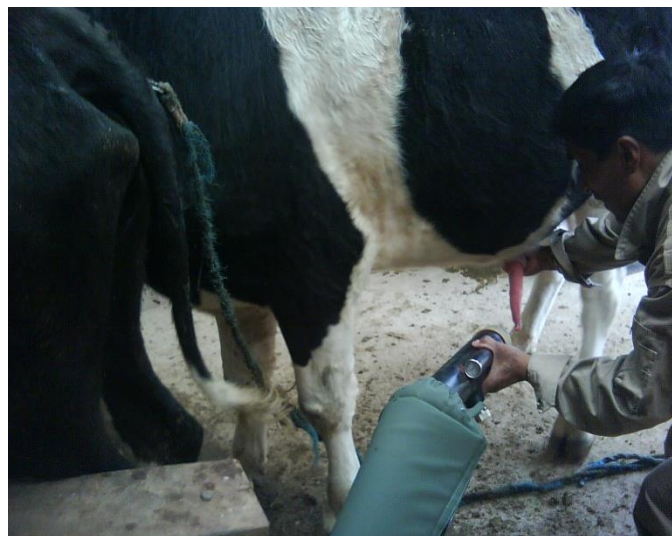
#### **2.9.1 Colección de semen**

Existen diferentes métodos para la recolección de semen en los bovinos: 1) La vagina artificial, 2) Electroeyaculación y 3) Masajes de las glándulas genitales accesorias. El más comúnmente utilizado es la vagina artificial, por cuanto ofrece al macho, condiciones parecidas a la vagina de la hembra (Vera, 2005).

Por una válvula ubicada en la vagina artificial se introduce agua a una temperatura de 40 a 45 grados centígrados, hasta llenar los dos tercios de su capacidad total. En el momento de colectar el semen, la temperatura óptima en el interior de la vagina debe ser de 38 a 39°C. Sin embargo, existen toros que exigen una mayor temperatura para eyacular.

Luego se procede a la toma del eyaculado, sujetando una hembra en celo u otro macho o un maniquí. El técnico encargado de la recolección se coloca a la derecha del toro y mantiene la vagina artificial en la mano derecha, con la abertura dirigida hacia el pene, mientras que con la mano izquierda colocada sobre el prepucio lo dirige hacia la abertura de la vagina (Figura 4).

Debe evitarse tocar directamente el pene, ya que la erección puede ser inhibida y el toro negarse a montar. Es recomendable practicar la falsa monta, con la finalidad de que el toro alcance el máximo grado de erección y de esta manera obtener un semen de buena calidad. Luego de practicar la falsa monta, se procede a efectuar la recolección, mediante la introducción del pene en la vagina artificial hasta lograr la eyaculación; después el operador retira la vagina artificial y el eyaculado o semen se deposita en el tubo colector (Vera, 2005).



**Figura 4.** Colecta de semen con el método de la vagina artificial

## 2.9.2 Descripción de la vagina artificial

**Cuerpo de la vagina:** consiste en un tubo cilíndrico, provisto de una válvula y una tapa, generalmente de caucho resistente, tiene 40 a 50 centímetros de largo y 7 a 10 centímetros de diámetro (Figura 5). **Funda interna:** goma elástica o de látex que se ubica en el interior del tubo cilíndrico y representa las paredes de la vagina, sus extremos se doblan sobre la parte externa del tubo y se fija con bandas de caucho. **Cono de látex:** se fija en uno de los extremos de la vagina cerca de la válvula para el agua. **Tubo colector de semen:** se coloca en el otro extremo del cono; este tubo está protegido por una cubierta protectora, que generalmente es una jeringa plástica, cuya finalidad es proteger el semen de la luz y de los cambios de temperatura (Vera, 2005).



Figura 5. Partes que componen la vagina artificial. **A) y F)**, Tubo colector de semen. **B)**, Cono de látex. **C, E y G)**, Cuerpo de la vagina. **D)**, Funda interna. (Vera, 2005).

La vagina artificial presenta las siguientes ventajas:

- Obtención del total del eyaculado.
- Medida exacta del eyaculado.
- Viabilidad del espermatozoide, mejor que con cualquiera de otros métodos.
- Ausencia de todo tipo de secreciones exteriores.
- Dada su rapidez y limpieza, no es estresante para el animal.
- Es indudablemente el método más fidedigno en lo que respecta la calidad de la muestra recolectada.
- Permite coleccionar semen, varias veces por semana sin producir malestar en el macho, (Gonzales, 1989).

### **2.9.3 Procesamiento del semen**

El procesamiento de semen se realiza para aumentar el volumen del eyaculado para inseminar mayor número posible de hembras, proteger a los espermatozoides para mantenerlos fértiles el mayor tiempo posible. El procesamiento del semen comprende lo siguiente, dilución: para diluir el semen se utilizan diferentes diluyentes, entre los más conocidos tenemos citrato-yema, fosfato-yema y los elaborados a base de leche. A estos diluyentes se les agrega antibióticos, con el propósito de frenar el desarrollo de gérmenes que pudieran estar presentes en el eyaculado (Vera, 2005). La composición de un diluyente típico a base de citrato y yema de huevo se utilizan los siguientes componentes:

Citrato de sodio 74 partes Yema de huevo 25 partes Glucosa 1 parte Penicilina 1000 UI/cc Estreptomina 500 mg/cc El grado de dilución del semen depende de la concentración espermática y de la técnica de conservación.

### **2.9.4 Conservación a 5 °C**

Cuando el semen se va a mantener a temperatura de 5°C, el grado de dilución que se realiza es menor, en comparación con la técnica de la congelación. Bajo

estas condiciones el semen conserva su poder fecundante por un periodo de cuatro a cinco días (Vera, 2005).

### **2.9.5 Conservación mediante congelación**

El grado de dilución que se realiza es mayor que el anterior y una vez congelado en nitrógeno líquido, el semen se conserva por un tiempo indefinido. Proceso de congelación en nitrógeno líquido Una vez determinada la concentración espermática se procede a determinar la cantidad de diluyente que se puede agregar al semen, en base a la siguiente fórmula:

$$V \times MI \times C \text{ (ml)}$$

**N° de espermatozoides / pajuela**

Donde: V = volumen del semen en ml, MI = motilidad individual en porcentaje  
C = concentración espermática expresada en ml

Después de determinar el número de pajuelas se procede a calcular el volumen del diluyente de la siguiente manera:

$$\text{Volumen diluyente} = NP \times 0,5 - V$$

Donde:

NP = número de pajuelas

0.5 = corresponde al volumen de las pajuelas medianas

V = volumen del semen en ml

Después del llenado y sellado de las pajuelas y una vez que se ha alcanzado el período de estabilización se procede a la congelación en nitrógeno líquido. Primeramente se colocan las pajuelas en un termo con vapores de nitrógeno hasta alcanzar la temperatura de 120°C en 10 minutos. Este proceso se llama pre-congelación (Vera, 2005). Inmediatamente las pajuelas se introducen directamente en el nitrógeno líquido para alcanzar una temperatura de 196°C, este proceso recibe el nombre de congelación (Figura 6).



**Figura 6.** Tanques de nitrógeno líquido para el almacenamiento de pajuelas de semen

Las condiciones de trabajo para coleccionar semen de bovino, el estado de salud del animal y la experticia del personal especializado que opera, son factores que deben tomarse en cuenta para mejorar la calidad del semen. Las deficiencias de 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, sino también a las hembras inseminadas y a su descendencia (Vera, 2005).

#### **2.9.6 Condiciones del animal**

Para incorporar a un semental a los programas de colección de semen debe tomarse en cuenta la edad, raza y peso del reproductor. El peso sigue siendo un buen indicador del estado de salud del animal y cuando no es posible pesarlo en la finca, la estimación de su condición corporal pasa a ser un buen indicador. Para mantener saludable a los animales se les debe proporcionar un ambiente adecuado, en cuanto a temperatura, luz, humedad y espacio suficiente para desplazarse, además de una alimentación balanceada y los controles sanitarios debidamente establecidos (Zemjanis, 1982).

### **2.9.7 Régimen de colección de semen**

Si se cuenta con reproductores de alto valor genético y se desea obtener el mayor número de dosis de semen de alta calidad, a fin de transmitir esas cualidades a un mayor número de descendientes, se dispone de dos recursos para aumentar el número de espermatozoides recogidos por unidad de tiempo, ellos son: la preparación sexual previa a la colección, cuyas ventajas son reconocidas y el aumento de la frecuencia de eyaculación. Estudios en la raza Holstein sugieren una frecuencia de colección de 2 eyaculados, 2 veces por semana para reproductores de 44 meses. El brahmán rojo y blanco sugiere una frecuencia de 2 eyaculados una vez por semana en reproductores de 48 a 60 meses, recomendando una abstinencia sexual entre 5 y 7 días al iniciar el período de colección. El intervalo de colección de semen es de importancia debido a que una alta frecuencia puede afectar la concentración espermática y la madurez de los espermatozoides; por el contrario una baja frecuencia de colección puede afectar la motilidad espermática y su vitalidad, (Zemjanis, 1982).

### **2.10 Mantenimiento y limpieza de los equipos y accesorios utilizados en la colección**

La preparación de las soluciones requiere de una campana de flujo laminar de aire, la cual crea el ambiente libre de contaminación para preparar dichas soluciones (PBS, diluyentes para congelación de semen, etc.), microscopio de contraste de fase, baños de agua para mantener la temperatura de los medios de cultivo y eyaculados al momento de la evaluación (37°C), centrífugas, refrigerador-congelador, balanza analítica, horno seco de esterilización del material de vidrio (2 horas a 125°C) y un autoclave para esterilizar el material utilizado en la colección de semen (Zemjanis, 1982).

#### **2.10.1 Procedimientos y recomendaciones en la colección y manejo del semen**

La extracción del semen debe realizarse bajo condiciones de máxima asepsia, es decir, que todos los equipos necesarios deben estar debidamente lavados y esterilizados para evitar la contaminación. Un cuidado particular debe prestarse al



semental que se prepara para la colección de un eyaculado, de modo que la región ventral del abdomen y los alrededores del prepucio se laven con agua y jabón, seguidamente se enjuaguen con abundante agua y se desinfecten. También debe prepararse el animal ó maniquí, al que se lava bien y desinfecta especialmente en la región posterior (Vera, 2005).

Para evitar la contaminación es necesario realizar el lavado prepucial con solución fisiológica antes de la colección del eyaculado. Estas precauciones contribuyen a disminuir la cantidad de microorganismos en el eyaculado, de esa forma, la evaluación será más precisa. Una vez obtenido el semen, la muestra se identifica con los datos del toro (raza y número), fecha y hora de extracción. El tubo colector se cierra con un tapón estéril, para evitar la contaminación durante el traslado al laboratorio o lugar donde va a ser evaluado. La evaluación seminal debe realizarse en un tiempo breve para que sea confiable y no se modifiquen las características del semen como motilidad, vitalidad y pH. Cuando se requiere el estudio microbiológico del semen, se toma 1ml del eyaculado y se coloca en un termo con hielo para enviarlo de inmediato al laboratorio de microbiología junto con la historia clínica, los resultados de la fertilidad anterior, el diagnóstico clínico y el último espermiograma (McDonald, 1991).

### **2.10.2 Evaluación microbiológica del semen**

Los agentes de transmisión sexual pueden invadir el tracto genital y alcanzar diferentes niveles. Aquellos microorganismos localizados en las mucosas provocan infecciones de superficie, ubicándose en los órganos genitales y transformándose en sexualmente transmisibles (McDonald, 1991).

### **2.10.3 Infecciones de superficie**

Estas infecciones se localizan en el pene, prepucio y uretra, no se acompañan de sintomatología, y por lo tanto pueden persistir por largo tiempo, lo que representa un riesgo epidemiológico importante para las hembras inseminadas natural o artificialmente. Entre estas infecciones silenciosas tenemos: *Campylobacter fetus*, *Trichomonas fetus*, *Ureaplasma diversum* y *Acholeplasma laidlawii*. La eliminación espontánea es poco usual y la susceptibilidad a la infección aumenta con la edad.

Generalmente la calidad del semen no está afectada, pero el fluido prepucial puede infectar a la hembra, en el caso de monta natural o cuando se colecta el semen con vagina artificial, Las infecciones agudas se eliminan rápidamente. Un ejemplo, corresponde a contaminación por el virus Herpes BHV-1 que congestiona las mucosas del pene y prepucio y evoluciona a nódulos, vesículas y pústulas. Esto genera una aversión al coito e impotencia (Derivaux, 1982).

Como es norma cuando se adquieren animales y cuando ingresa un reproductor a un Centro de congelación de semen e IA se requiere obligatoriamente aislarlos durante un período de cuarentena. Los controles que se realizan durante ese período tienen por objeto determinar si los sementales están libres de *Brucelosis*, *Tuberculosis*, *Leptospirosis*, *Campilobacteriosis genital bovina*, *Trichomoniasis* y otras (Derivaux, 1982).

#### **2.10.4 Microorganismos asociados con la transmisión por semen**

Como ya se mencionó es importante tomar en cuenta que existen microorganismos patógenos que se encuentran en el semen y pueden transmitir enfermedades a todo el rebaño cuando se utiliza IA. Es de especial interés diagnosticar aquellos que no producen signos clínicos, porque son silentes y pasan desapercibidos, estableciéndose en los órganos genitales. A largo plazo ocasionan procesos inflamatorios infecciosos, difíciles de erradicar. A continuación se señalan los agentes infecciosos que se encuentran en el semen y que deberían ser diagnosticados para mantener la salud reproductiva del rebaño (Vera, 2005).

*Rinotraqueítis infecciosa bovina (BHV-1)*. Este virus replica en la mucosa del prepucio, pene y parte distal de la uretra. El virus puede estar presente en el semen, sin que el animal manifieste signos clínicos. El diagnóstico de rutina para semen se realiza en cultivos celulares de origen bovino. Es conveniente usar sólo toros seronegativo (Vera, 2005).

*Brucelosis*. Las brúcelas en toros pueden localizarse en vesículas seminales, ampollas, testículos y epidídimo. Para el diagnóstico se utilizan pruebas de

aglutinación, especialmente en reproductores que provienen de áreas de riesgo (Vera, 2005).

*Trichomoniasis*. El toro es un portador asintomático de la enfermedad. El parásito puede sobrevivir en semen fresco y congelado. El diagnóstico de rutina se realiza cultivando esmegma prepucial. También en este caso se deben realizar controles semestrales.

*Chlamydia psittaci*. En toros produce principalmente vesiculitis. Los autores Eaflesome y García han observado excreción de *Chlamydia* en semen de toros con piospermia, asociado con alto porcentaje de espermatozoides con morfología anormal, aunque otros autores han detectado presencia de *Chlamydia* en semen de buena calidad. Actualmente se ofrecen técnicas de diagnóstico inmunoenzimático y PCR para identificación de *Chlamydia psittaci*.

Es indispensable mantener registros actualizados y confiables que contribuyan a tratar a tiempo o prevenir las enfermedades infecciosas. Por otra parte, debe existir una política de evaluación microbiológica que se aplique antes de comenzar la colección de semen y los programas de inseminación y no esperar a que los resultados, en cuanto a calidad seminal y fertilidad sean deficientes para solicitar los diagnósticos microbiológicos del semen y aplicar los correctivos cuando sea demasiado tarde. Se trata de un plan inteligente de costos beneficios, pues de nada sirve economizar en salud y multiplicar los gastos en tratamientos,

#### **2.10.5 Preparación de los sementales**

Previo a la colecta los toros fueron colocados en una manga de manejo para realizar el recorte del pelo prepucial y el lavado externo e interno del prepucio con agua limpia. En el área de colecta una hembra se mantuvo sujeta en la prensa, posteriormente el semental se paseaba alrededor de la hembra para ser estimulado y de forma que pudieran montar con mayor facilidad.

#### **2.11 Metabolismo del espermatozoide**

Hoskins y Casillas (1973), mencionan que las reservas intracelulares de trifosfato de adenosina (ATP) proveen la energía requerida para la motilidad espermática.

La concentración endógena de mono fosfato de adenosina cíclico (AMPC) no solo regula el empleo del ATP por el espermatozoide, sino que también tiene su efecto directo sobre la motilidad de los espermatozoides.

Mann (1975), indica que los espermatozoides, aunque carecen de varias de las organelas presentes en otras células, son metabólicamente activos. Ellos poseen enzimas necesarias para realizar diversas reacciones bioquímicas, como la glucólisis (vía de Embden-Meyerhol), el ciclo del ácido tricarboxílico, la lanzadera de monofosfato de hexosa.

Garner y Hafez (2000), afirman que los espermatozoides degradan glucosa, fructosa o manosa a ácido láctico cuando se encuentra en condiciones anaerobias. Esta actividad fructolítica permite a estos gametos sobrevivir en las condiciones anaerobias. Esta característica es importante durante el almacenamiento de espermatozoides para su uso en inseminación artificial.

En presencia de oxígeno los espermatozoides utilizan una variedad de sustratos. Su actividad respiratoria es la que permite emplear el lactato o piruvato resultante de la fructólisis de azúcares, con la producción de dióxido de carbono y agua (Mann, 1975). Esta vía oxidativa, que se localiza en las mitocondrias, es mucho más eficiente que la fructólisis para producir energía. Gran parte del ATP se emplea en el proceso consumidor de energía de la motilidad, y otra parte se destina a mantener la integridad de los procesos de transporte activo impiden la pérdida de componentes iónicos vitales de la célula espermática (Garner y Hafez, 2000). En ausencia de sustratos exógenos. Los espermatozoides utilizan sus reservas intracelulares del plasmalogeno como fuente de energía a corto plazo (White, 1980).

## **2.12 Nutrición y cultivo de microorganismos**

Los microorganismos, al igual que todos los seres vivos, precisan sustancias que deben tomar de su entorno y que se denominan nutrientes. Estos nutrientes han de aportar a los microorganismos los elementos químicos necesarios para cumplir tres funciones fundamentales: 1) Fabricar su propio material celular. 2) Mantener

la actividad de sus enzimas y sistemas de transporte. 3) Producir energía biológicamente utilizable.

Se considera que aun bajo practicas adecuadas de higiene o cuando se incorpora diversos agentes bacterianos, a los espermatozoides que se van a congelar, es común hallar un número variable de diferentes microorganismos, tales como *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus sp* y *Campilobacter fetus*, en semen descongelado de bovino; en la actualidad se acepta, como numero limite 500 unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro de semen para obtener un índice satisfactorio de concepción (Ostaszko FAO, 1985).

Algunos investigadores reportan que al incrementarse la cantidad de bacterias mesofilicas aerobias o UFC, la motilidad de los espermatozoides tiende a disminuir. Recientemente se observo que la cantidad de *Pseudomona aeruginosa* de 10, 500, 1000 UFC/ml, bajan la concentración de espermatozoides vivos a 3.7, 6.0 y 8.8 % correspondientemente y por ende, disminuyen la capacidad fertilizante del semen descongelado de bovino (Ostaszko FAO, 1985).

### **2.12.1 Bacterias Gram positivas**

Poseen varias características que ayudan a diferenciarlas de los organismos Gram negativos, debido a los elevados contenidos de glucopeptidos, acido teicoico, algunos aminoácidos que incluyen L-alanina, D-alanina, D-glutamico, lisina y bajos contenidos lipidicos de sus paredes celulares, siendo el peptidoglucano el 90% de la pared. En bacterias Gram positivas habitualmente se establece el enlace de varios aminoácidos cuyo número y tipo depende de la bacteria.

En *Staphylococcus sp*, que es bacteria Gram positiva que mejor se conoce, el puente está formado por cinco glicinas conectadas por enlaces peptidicos. (Brock, 2000).

Usualmente las bacterias Gram positivas retienen el colorante cristal violeta de la tinción de Gram (realizada por el médico danés Hans Christian Gram), debido a que los alcoholes y otros solventes orgánicos no penetran en las paredes

celulares deficientes en lípidos; siendo más resistentes a efectos de desecación, calor, luz solar y sustancias químicas. (Mattar y Melo, 1998).

### **2.12.1.1 Genero Staphylococcus**

En la actualidad en el género *Staphylococcus* se reconocen 32 especies y varias subespecies, si bien sólo algunas de ellas tienen importancia desde el punto de vista clínico. Los estafilococos, según produzcan o no la enzima coagulasa, se dividen en dos grandes grupos: estafilococos coagulasa positivos (ECP) y estafilococos coagulasa negativos (ECN). Existe una buena correlación entre la producción de coagulasa y la capacidad patógena de los estafilococos, de tal manera que, en general, se considera que los ECP son patógenos y que los ECN no lo son. No obstante, algunas especies de ECN se han relacionado con procesos patológicos tanto en animales como en el hombre. Los estafilococos están ampliamente difundidos en la naturaleza. Su hábitat natural es la piel y las membranas mucosas de los mamíferos y las aves. También pueden encontrarse en forma transitoria en el tracto intestinal. No obstante, la difusión de cepas de estafilococos entre diferentes especies animales es limitada. (Machota V. et al, 2003)

### **2.12.1.2 Genero Streptococcus**

Son células esféricas u ovoides, con un diámetro de 0.5 a 2  $\mu\text{m}$ , que se dividen en un plano y pueden quedar adheridas y formar parejas o bien cadenas largas cuando crecen en medios de cultivo líquidos. Entre sus características fundamentales se incluye la incapacidad de producir catalasa, enzima que cataliza la destrucción del peróxido de hidrogeno, este que permite diferenciarlos fácilmente del genero *Staphylococcus*. No poseen citocromos y obtienen energía por fosforilación, que dependen normalmente de la fermentación de los azucares. Son quimioorganótrofos, ya que obtienen la energía a partir de la oxidación de compuestos químicos orgánicos. Realizan un fermentación homoláctica, con producción de acido láctico sin formación de gas. Desde el punto de vista de sus necesidades nutricionales, tienen la particularidad de que requieren, para su crecimiento, medios de cultivo enriquecidos con sangre o suero; por otro lado a

veces crecen mejor en condiciones de microaerofilia (en atmosferas con un 5 % de CO<sub>2</sub>). Los estreptococos son microorganismos muy sensibles a las variaciones de pH óptimo aproximadamente 7; asimismo, crecen en un intervalo de temperaturas entre 20 y 40 °C, siendo 37 °C, normalmente la temperatura idónea. (Machota V. et al, 2003).

Los microorganismos del género *Streptococcus* son sensibles a una gran variedad de agentes antimicrobianos. Como ocurre en todas las infecciones bacterianas, es recomendable instaurar la terapia antimicrobiana después de haber estudiado *in vitro* la sensibilidad de estas bacterias. En cualquier caso, los *beta-lactamicos* (penicilina, ampicilina, amoxicilina y alguna cefalosporina) constituyen el tratamiento de elección de las infecciones originadas por estos microorganismos.

### **2.12.2 Bacterias Gram negativas**

La pared celular de esta clase de bacterias es compleja desde el punto de vista químico, estructuralmente posee una membrana citoplasmática fosfolipídica, rodeada por una capa de peptidoglucano que constituye solo el 10% de la pared celular que delimita el espacio periplasmático, así como una pared externa que contiene elementos intercalados como lipopolisacáridos (LPS), moléculas construidas sobre la región y una cadena lateral.

Una propiedad biológica importante de la membrana externa de muchas bacterias Gram negativas es que resulta habitualmente tóxica para los animales. Bacterias Gram negativas patógenas para el hombre y otros animales incluyen miembros de los géneros *Salmonella*, *Shigella* y *Escherichia coli* entre otros.

La propiedad tóxica de la membrana externa de estas bacterias es responsable de algunos síntomas de infección a los que dan lugar; estas propiedades tóxicas se asocian a una parte de la capa de lipopolisacárido, más concretamente al lípido A, El uso del término endotoxina hace alusión precisamente a este componente tóxico del LPS, es interesante destacar no obstante que también el LPS de algunas bacterias no patógenas presenta actividad de endotoxina, por esto no se

requiere que el organismo sea patógeno para que su pared celular contenga elementos tóxicos. (Brock, 2000).

Estos microorganismos poseen un espacio periplasmático entre la membrana citoplasmática y la membrana externa, el cual ha demostrado contener proteínas, enzimas hidrolíticas como fosfatasas, DNAsa I, RNAsa I y penicilasas controladas por plasmidos (Brock, 2000).

#### **2.12.2.1 Genero Escherichia**

La familia *enterobacteriaceae* está formada por bacilos rectos grannegativos, no formadores de esporos, anaerobios facultativos, móviles mediante flagelos peritricos o inmóviles, y con necesidades nutricionales sencillas. Los miembros de esta familia se hallan ampliamente distribuidos en el agua, la tierra, las plantas y muy especialmente en el tracto intestinal del hombre y de los animales formando parte de la micropoblación bacteriana normal del intestino grueso. Su presencia en aguas y alimentos es indicativa de una contaminación fecal reciente (días o semanas). (Machota V. et al, 2003).

#### **2.12.2.2 Genero Proteus**

El nombre de este género se debe a proteo, un Dios de la mitología griega capaz de cambiar de forma. Estas bacterias son móviles gracias a la presencia de abundantes flagelos peritricos. Debido a su gran movilidad, las colonias aparecen en los medios de cultivo rodeadas de una serie de halos o capas que recuerdan a las olas del mar. Todas las especies son ureasas positivas. Poseen los antígenos flagelar H y somático O. las bacterias del género *Proteus* están ampliamente distribuidas en la naturaleza: se encuentran en el suelo, el agua y los vegetales; forman parte de la micropoblación intestinal del hombre y de los animales.

El género *Proteus* comprende cuatro especies de las cuales *P. mirabilis* y *P. vulgaris* son las más frecuentes en la naturaleza y en las heces. *P. mirabilis* es un patógeno oportunista del hombre y los animales. Produce infecciones urinarias y otitis externas en perros y gatos. También suele originar diarreas en animales jóvenes, como corderos, terneros y visones. Las bacterias del género *Proteus*



suelen ser sensibles a los antibióticos betalactámicos más recientes, a los aminoglucósidos y las fluoroquinolonas. No obstante, como para el resto de las enterobacterias, se recomienda el empleo del antibiograma para las cepas aisladas de muestras clínicas. (Machota V. et al, 2003).

### **2.12.2.3 Genero Pseudomonas**

El género *Pseudomonas* consta numerosas especies, que se caracterizan por su gran versatilidad metabólica. Son microorganismos ecológicamente importantes, capaces de degradar muchos compuestos solubles derivados de la descomposición de materiales procedentes de plantas y animales.

La *Pseudomina aeruginosa* se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza. Es el bacilo gramnegativo no fermentador aislado con mayor frecuencia en el laboratorio. Posee determinadas características que permiten diferenciarlo de otras especies de *Pseudomonas*. Se desarrolla en la mayoría de los medios de cultivo de laboratorio. Asimismo la capacidad de producir piocianina (del griego, pus azul) es la razón de que a *P. aeruginosa*, cuando produce infecciones de carácter supurativo (pus azul de las heridas), se la denomine “bacilo piocianico”.

Se ha descrito la capacidad que presentan algunas cepas de *P. aeruginosa* para producir metritis contagiosa equina junto a *klebsiella pneumoniae*. Este proceso es muy contagioso y puede causar infertilidad en las yeguas. La transmisión puede producirse por la acción del ser humano al manipular los equipos, por el agua incluso por medio de los colectores de semen. Unas buenas normas de higiene pueden evitarlo. El síntoma principal es una fuerte secreción vaginal, aunque en ocasiones no se detectan síntomas. La capacidad de *P. aeruginosa* en vacas produce mastitis, infecciones uterinas, infecciones de la piel, abscesos, enteritis y artritis. (Machota V. et al, 2003).

### **2.12.3 Bacilos esporulados**

Muchos miembros de los géneros *Bacillus* y *Clostridium* entre otros tienen la propiedad para formar un cuerpo refringente intracelular llamado endoespora, sirve de protección a la desecación y condiciones ambientales adversas,

impenetrabilidad a las sustancias químicas, resistencia al calor, sobrevivencia y diseminación a la especie.

Contiene grandes cantidades de dipicolinato calcico, una sustancia que no se encuentra en las células vegetativas, la cual desempeña un papel importante en la resistencia al calor de la endospora, también contiene aproximadamente cinco veces más aminoácidos cisteína por miligramos del nitrógeno total, y el alto contenido de grupos de disulfuro es el que la resistencia a la radiación ultravioleta. (Mota y Foster, 1998).

#### 2.12.4 Medios de cultivo

- **Agar sangre:** Agar nutritivo + 7 – 10 % de sangre desfibrinada de conejo, carnero o caballo. Para *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Neumococcus*, *Haemophilus*.
- **Agar chocolate:** Es el agar de sangre sometido a una temperatura de 80°C, de esta forma la hemoglobina se transforma en metahemoglobina, dándole al agar el aspecto de una tableta de chocolate. Para *Neisserias*.
- **Agar Mac Conkey:** es otro medio de cultivo que por la presencia de sales biliares y violeta de crista puede definirse como selectivo pues inhibe el desarrollo de gérmenes Gram (+), sin embargo posee un sustrato importante que es lactosa de manera que también podemos detectar la capacidad de las enterobacterias para fermentarla y esto se hace patente por el viraje del indicador de pH rojo neutro que nos demostrara finalmente la fermentación o no de este azúcar. para Enterobacterias, *Escherichia coli*, *Aerobacter aerogenes*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Vibrio*.

### **2.13 Antibiograma**

El antibiograma es el conjunto de procedimientos que nos permite determinar la sensibilidad o la resistencia bacteriana “in vitro” ante determinados quimioterápicos y/o antibióticos. (Collins, 1989).

**Sensibilidad:** Es la capacidad potencial bacteriana para interactuar con los quimioterápicos, produciéndose a consecuencia de este fenómeno alteraciones reversibles e irreversibles en el crecimiento bacteriano.

**Resistencia:** Es una capacidad potencial que presentan las bacterias, misma que puede manifestarse a consecuencia de fenómenos genéticos o no genéticos, determinando un estado refractario a la acción de los quimioterápicos.

En algunos casos es factible encontrar un comportamiento intermedio, el cual nos estaría demostrando un estadio de indiferenciación respecto a la interacción con los quimioterápicos. (Collins, 1989).

Los discos de antibiograma son de papel filtro con un diámetro promedio de 0.5 cm. Y se hallan embebidos de un quimioterápico y/o antibiótico determinado, cabe resaltar que la concentración es constante. No solo hay discos de antibiograma sino que también existen pastillas para este fin y finalmente sistemas multidiscos que presentan un eje central, llevando cada disco un antibiótico. En una caja petri de diámetro corriente no debemos colocar más de 7 discos (Figura 7); esto significa que en orden de disposición pondremos 6 discos siguiendo una trayectoria circular y uno al centro. (Collins, 1989).

Para hacer más fácil este trabajo tan solo debemos marcar con un lápiz graso fuera de la Caja petri (contratapa), los puntos donde correspondan los discos. No debemos olvidar una vez que se hayan colocado se deben presionar levemente con la pinza anatómica a fin que queden bien asegurados. Las cajas petri ya preparadas deben ser incubadas a 37°C. Por un lapso de 18 a 24 horas. (Collins, 1989).

Realice la lectura, para lo cual debe medirse con una regla que nos permitirá conocer el diámetro de los halos de inhibición de crecimiento.

La terminología de lectura hoy en día se basa en un sistema binario (resistente o sensible), aceptándose en algunas condiciones el termino de intermedio. Una vez obtenido el diámetro del halo de inhibición lo único que se debe hacer es comparar la lectura con una tabla. (Collins, 1989).

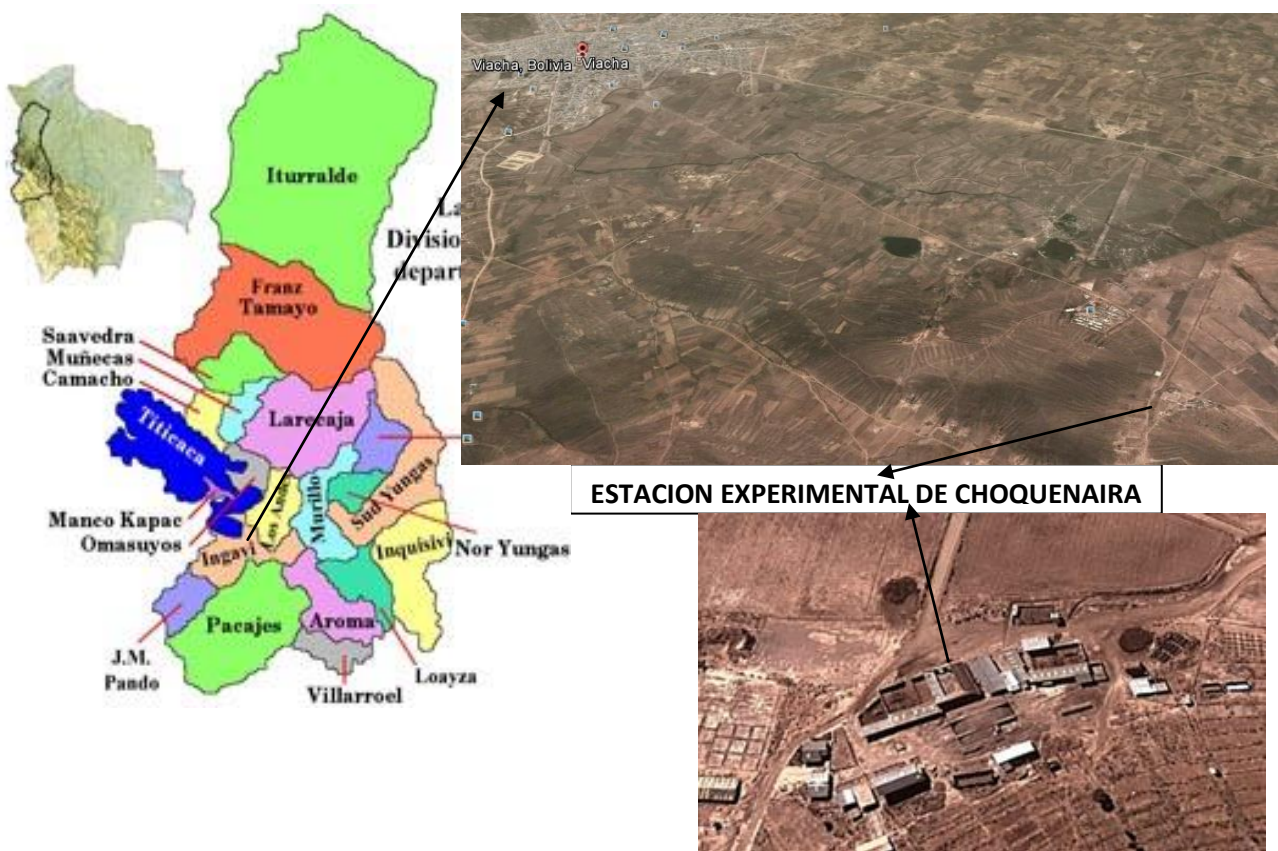


**Figura 7.** Agar Muller Hinton, para realizar el antibiograma, con seis discos de antibióticos dispuestos en igual proporción en la caja petri

### 3. LOCALIZACIÓN

#### 3.1. Ubicación del estudio

El presente estudio se realizó en las instalaciones de la Estación Experimental de Choquenaira, dependiente de la Facultad de Agronomía de la Universidad Mayor de San Andrés (U.M.S.A), geográficamente está ubicado en el altiplano Central, Provincia Ingavi del departamento de La Paz, al sur de la población de Viacha. Ubicado aproximadamente a 32 km al sur - oeste de la ciudad de La Paz y a 6 km de la población de Viacha, entre los paralelos 16°42'5" de latitud sur y 68°15'15" de longitud oeste y una altitud de 3870 m.s.n.m. (Figura 8).



**Figura 8.** Ubicación de la Estación Experimental de Choquenaira, Facultad de Agronomía – U.M.S.A

### 3.1.1. Descripción ecológica

#### 3.1.1.1 Fisiografía

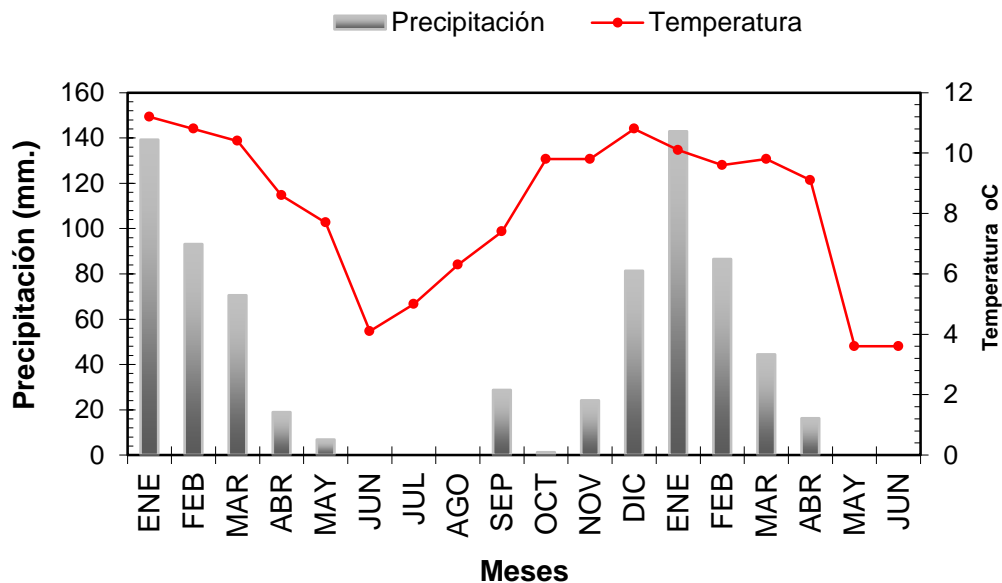
Fisiográficamente el Centro Experimental de Choquenaira, corresponde al paisaje aluvial no inundable y aluvial inundable, éste último ocupa la mayor parte del área de la Estación. Así mismo la distribución de tierras de la Estación, mayormente son planas con una pendiente suave de 0.56% (Callisaya, 1994), con ondulación muy ligera.

#### 3.1.1.2 Clima

La comunidad de Choquenaira está clasificada como “clima templado frío” con vegetación montano Estepa Espinosa (Holdridge, 1982). La temperatura máxima promedio para la estación de verano es de 11.2 °C y mínima en invierno de 3.6 °C y una precipitación pluvial media de 41.87 mm., con una máxima de 139.2 mm., para la estación lluviosa (SENAMHI, 2004).

La Figura 9 muestra la marcada variabilidad de la precipitación, donde se diferencia claramente la época de la estación seca (Abril a Noviembre) y la estación lluviosa (Diciembre a Febrero). También se observa que la humedad relativa se mantiene sin mucha variación con una media anual de 42.5%

**Figura 9** Datos Climatológicos de la Estación Experimental Choquenaira



### 3.1.1.3 Suelo

La Estación Experimental Choquenaira, presenta suelos con características físico – químicos moderados a bajas, aptos para todo tipo de cultivo agropecuario, especialmente para cultivos permanentes y/o anuales. En general, estos suelos presentan una fertilidad natural moderada a baja, la materia orgánica oscila de baja a muy bajo (Callisaya, 1994).

### 3.1.1.4 Vegetación

La vegetación natural y cultivable de la Estación Experimental, está conformado por especies arbustivas, herbáceas y plantas anuales.

La flora natural de la zona está constituida por las siguientes especies:

- Ichu (*Stipa ichu*)
- Chillihua (*Festuca dolychophylla*)
- Cebadilla (*Bromus unioloides*)
- Chiji blanco (*Distichlis húmilis*)
- K'ora (*Torcina capitata* )
- Totorilla (*Scirpus rigidus*)
- Thola (*Lepidophyllum quadrangulare A.*)
- Thola (*Parastrephia lepidóphylla*)
- Cola de ratón (*Hordium andicola*)
- Layu (*Trifolium amabile*)
- Diente de león (*Taraxacum officinalis*)
- Reloj reloj (*Erodium cicutarum*)
- Cachu chiji (*muhlebergia fastigiata*)
- Paja brava (*Festuca ortophylla*)
- Sillu sillu (*Lachemilla pinnata*)

### **Las especies que se cultivan son:**

- Quinoa                    (*Chenopodium quinoa*, Wild)
- Papa                      (*Solanum sp*)
- Cebada                   (*Hordeum vulgare*)
- Avena                    (*Avena sativa*)
- Alfalfa                   (*Medicago sativa*)
- Trébol                    (*Trifolium sp*)
- Festuca alta            (*Festuca arundinacea*)

#### **3.1.1.5 Ganadería**

La Estación Experimental de Choquenaira se dedica a la producción de diferentes especies, cuenta con ganado bovino criollo mejorado de la raza Holstein y Pardo suizo, cuyo hato lechero produce leche para la elaboración de queso, ovinos de la raza Corriedale y llamas (camélidos domésticos) con fines de investigación y mejoramiento.

#### **3.1.1.6 Características Climáticas**

Choquenaira presenta una temperatura media de 10 °C en verano y 7.4 °C en invierno, con una precipitación anual entre 400 a 600 mm (Arguedas, 2006).



## **4. MATERIALES Y METODOS**

### **4.1 Materiales**

#### **4.1.1 Materiales para recolección de semen en campo**

- Vagina artificial
- Fundas de látex
- Tubos colectores
- Jeringa de 20 ml
- brete de sujeción /hembra
- Jeringa de 10 ml
- Suero fisiológico
- Papel toalla
- Secadores
- Tijera

#### **4.1.2 Materiales de laboratorio**

- Autoclave
- Mechero Bunsen
- Estufa de incubación
- Pajillas 0,5 ml
- Baño María
- Pinzas
- Refrigerador
- Llenador de pajillas
- Balanza analítica
- Cajas petri de 5 y 10 cm
- Tubos de ensayo
- Embebedores
- Gradillas
- Azas de siembra
- Tubos con medio liquido
- Termo criogénico
- Termómetro digital
- pH-metros
- Nitrógeno liquido
- Microscopio óptico
- Porta y cubre objetos
- Hornilla eléctrica
- Termómetro digital
- Vasos precipitados

#### **4.1.3 Material Químico**

- Agar Chocolate
- Agar Mac Conkey
- Agar Sangre
- Muller Hinton

#### **4.1.4 Antibióticos**

- |                                 |                                |
|---------------------------------|--------------------------------|
| Ciprofloxacina                  | - Cotrimoxazol                 |
| - Ceftazidima                   | - Amoxicilina                  |
| - Gentamicina                   | - Penicilina                   |
| - Amoxicilina + ac. Clavulanico | - Trimetropin + sulfametoxazol |
| - Cotrimoxazol                  | - Estreptomicina               |

#### **4.1.5 Material auxiliar**

- Registros de colecta
- Calculadora
- Computadora
- Cámara fotográfica

### **4.2 Metodología**

#### **4.2.1 Etapa experimental**

El estudio tuvo una duración de 5 meses, desde la colecta, congelación y descongelación del semen hasta el cultivo de muestras.

##### **4.2.1.1 Lavado y esterilizado del material**

Uno de los principales factores primordiales en el trabajo de laboratorio es el lavado y esterilización de los materiales de vidrio y otros, por lo que se recomienda lavar con detergente biodegradable, para luego enjuagar con agua potable cuantas veces sea necesario, posterior a este enjuagar con agua destilada, escurrir y secar en la estufa para el paso ultimo que es el esterilizado en autoclave o luz ultravioleta.

#### 4.2.1.2 Preparación de los medios de cultivo en laboratorio

##### Medios de cultivo

- Agar sangre: Agar nutritivo + 7 – 10 % de sangre desfibrinada de conejo, carnero o caballo. Para *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Neumococcus*, *Haemophilus*.
- Agar chocolate: Es el agar de sangre sometido a una temperatura de 80°C, de esta forma la hemoglobina se transforma en metahemoglobina, dándole al agar el aspecto de una tableta de chocolate. Para *Neisserias*.
- Agar Mac Conkey: es otro medio de cultivo que por la presencia de sales biliares y violeta de cristal puede definirse como selectivo pues inhibe el desarrollo de gérmenes Gram (+), sin embargo posee un sustrato importante que es lactosa de manera que también podemos detectar la capacidad de las enterobacterias para fermentarla y esto se hace patente por el viraje del indicador de pH rojo neutro que nos demostrara finalmente la fermentación o no de este azúcar. para Enterobacterias, *Escherichia coli*, *Aerobacter aerogenes*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Vibrio*.

#### 4.2.1.3 Higiene del toro

Antes de realizar la monta del toro para la colecta de semen, se realizo el lavado prepucial con suero fisiológico y el corte de los pelos del prepucio, en este caso todos los pelos que estén largos y sucios.

### 4.2.2 Obtención de muestras

#### 4.2.2.1 Lavado prepucial

Para obtener las muestras del lavado prepucial, se realizo el lavado externo del prepucio con agua corriente é interno con agua destilada, para posteriormente tomar la muestra de 10 ml utilizando el suero fisiológico, el cual era introducido con una jeringa dentro del prepucio, para lavar todas las paredes internas del mismo y luego recoger la muestra.

#### **4.2.2.2 Semen fresco**

La colecta del semen fresco se realizo luego de haber hecho la limpieza del animal y habiendo ya tomado la muestra del lavado prepucial. El toro es llevado al box de colecta, donde está sujeta la vaca en celo. El semental monta y se procede a la colecta del semen fresco utilizando el método de la vagina artificial.

Ya colectada la muestra de 0.5 ml, esta se dispone a mantenerlo a una temperatura de 37° C, y posterior traslado al laboratorio.

#### **4.2.2.3 Semen congelado**

Una parte del semen fresco ya colectado era destinado al proceso de congelamiento en pajuelas de 0.5 ml, donde se uso técnicas de congelamiento en una serie de procesos ordenados, en tiempos determinados (Protocolos de congelación), los cuales aseguran que se obtenga un producto de calidad, y la muestra ya congelada era posteriormente llevada al laboratorio.

#### **4.2.2.4 Cultivo de muestras**

Las muestras tomadas de lavado prepucial, semen fresco y semen congelado tuvieron el mismo proceso de cultivo en el laboratorio de Gen y Vida, utilizando cultivos en medios nutritivos, como Agar chocolate, Agar Mac conkey y Agar sangre.

**Estudio microscópico:** Cada una de las muestras fue observada al microscopio para evaluar si existía la contaminación, presencias de picos, eritrocitos y flora bacteriana.

**Siembra de la muestra:** Una vez ambientadas las cajas Petri con diferentes medios de cultivo se dejo durante 30 minutos para luego proceder a la realización de la siembra de cada una de las muestras, en un ambiente estéril (utilizando mechero de Bunsen), para esto se utilizo una aza calibrada de 50 ul

con lo cual se recoge la muestra homogenizada y se deposita en la superficie estirando en forma vertical hasta completar en toda la superficie.

Posteriormente se llevan las muestras contenidas en las cajas petri a la estufa de incubación donde se puede controlar las temperaturas para facilitar el desarrollo de los microorganismos a su temperatura óptima de crecimiento (generalmente 35° a 37°C).

**Evaluación de las muestras:** Las muestras incubadas fueron evaluadas a las 24 horas y 48 horas, para observar la presencia y crecimiento bacteriano, forma color de las colonias, cantidad de colonias, cambio de color del medio de cultivo, la turbidez del medio y el olor característico del microorganismo.

**Tipificación de bacterias:** La tipificación se realizó utilizando baterías de medios de cultivo que presenta reacciones químicas de acuerdo a las propiedades fisiológicas.

**Antibiograma:** Utilizando el medio de cultivo de Muller Hinton y tipificado el microorganismo se procedió a realizar el antibiograma, para lo cual se utilizaron diferentes discos de antibióticos con diferentes concentraciones y nuevamente en un medio estéril se procedió a abrir el medio y dejar los discos de antibióticos, una vez terminados se dejó en la estufa de cultivo a 37°C y en un lapso de 24 horas. Al día siguiente se evaluó los halos de cada uno de los antibióticos el cual nos indica la sensibilidad y resistencia del microorganismo al antibiótico utilizado.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Confirmación de identidad de las muestras tomadas a los sementales

Se aislaron diversos tipos de microorganismos, los más representativos fueron en su orden, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus sp*, *Escherichia coli*, y *Proteus mirabilis*.

**Cuadro 2. Resultados obtenidos en las pruebas de identificación de bacterias Gram negativas en medios selectivos, a partir de lavados prepuciales, semen fresco y semen congelado.**

BACTERIA	<i>Escherichia coli</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
Características de las colonias en medio	Colonias circulares, convexas de borde continuo o ligeramente ondulado, con brillo verde metálico	Colonias rojas viscosas y agrupadas.
Morfología en	Bacilo Gram negativo	Bacilo Gram negativo
GLUCOSA	Positivo	Positivo
LACTOSA	Positivo	Negativo
UREA	Negativo	Positivo
INDOL	Negativo	Negativo
L. DECARBOXILASA	Positivo	Positivo
L. DEAMINASA	Positivo	Negativo
CITRATO	Negativo	Positivo
H <sub>2</sub> S	Negativo	Positivo
MOTILIDAD	Negativo/positivo	Positivo

(Según las pruebas bioquímicas en medios selectivos, se obtuvieron los siguientes datos para la diferenciación de las bacterias)

**Cuadro 3. Resultados de las pruebas de identificación de bacterias Gram negativas, en medios selectivos, partiendo del lavado prepucial, semen fresco y congelado**

BACTERIA	<i>Pseudomona aeruginosa</i>
Características de las colonias en medios	colonias grandes, irregulares planas, de olor como vino de uva y de aspecto de vidrio esmerilado
Morfología en tinción de Gram	Bacilo Gram negativo
OXIDASA	Positivo
GLUCOSA	Negativo
LACTOSA	Negativo
UREA	Positivo
INDOL	Negativo
L. DECARBOXILASA	Positivo
L. DEAMINASA	Negativo
CITRATO	Positivo
H <sub>2</sub> S	Negativo
MOTILIDAD	Positivo

(Según las pruebas bioquímicas en medios selectivos, se obtuvieron los siguientes datos para la diferenciación de las bacterias)

**Cuadro 4. Resultados de las pruebas de identificación de bacterias Gram positivas, en medios selectivos, partiendo del lavado prepucial, semen fresco y congelado**

BACTERIA	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
Características de las colonias en medio	Colonias elevadas redondas con borde continuo, lisas brillantes
Morfología en tinción de Gram	Coco Gram positivo
PIGMENTACION	Amarillo o dorado
CATALASA	Positivo
COAGULASA TUBO	Positivo
OXIDASA	Negativo
HEMOLISIS	$\beta$ -hemolítico
MR/VP	Negativo/Positivo
NITRATO	Positivo
GALACTOSA	Negativo
MANITOL	Negativo

(Según las pruebas bioquímicas en medios selectivos, se obtuvieron los siguientes datos para la diferenciación de las bacterias)

## 5.2 Clasificación general de las bacterias aisladas

**Cuadro 5. Clasificación general de las bacterias patógenas reconocidas, aisladas en el lavado prepucial, semen fresco y semen congelado.**

BACTERIA	<i>Pseudomona</i>	<i>Sthaphylococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
Nene	<b>Positivo</b>	Negativo	Negativo	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>
Oliver	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	<b>Positivo</b>
Dante	Negativo	Negativo	<b>Positivo</b>	Negativo	<b>Positivo</b>
Habano	Negativo	<b>Positivo</b>	Negativo	Negativo	<b>Positivo</b>

En el cuadro 5 observamos el tipo de microorganismo hallado en el medio de cultivo para cada uno de los sementales bovinos.



**Cuadro 6. Microflora del lavado prepucial, semen fresco y semen congelado de acuerdo a la especie de microorganismo**

BACTERIAS	PORCENTAJE
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	1/4 (25%)
<i>Staphylococcus sp</i>	1/4 (25%)
<i>Streptococcus</i>	1/4 (25%)
<i>Escherichia coli</i>	1/4 (25%)
<i>Proteus mirabilis</i>	4/4 (100%)

En el cuadro 6 observamos el porcentaje de animales infectados de acuerdo a la especie de microorganismo.

**Cuadro 7. Especies aisladas de acuerdo al semental bovino**

	Muestra obtenida		
	Lavado prepucial	Semen fresco	Semen congelado
Nene	<i>Proteus, E. coli, Pseudomona</i>	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	<i>Pseudomona aeruginosa</i>
Oliver	<i>Proteus mirabilis</i>	Ninguno	Ninguno
Dante	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Streptococcus sp.</i>	Ninguno
Habano	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Staphylococcus</i>	Ninguno

El cuadro 7 muestra, el tipo de microorganismo hallado en cada uno de los sementales bovinos, en el lavado prepucial, semen fresco y semen congelado.

### 5.3 Clasificación general de antibióticos

**Cuadro 8. Clasificación general de antibióticos utilizados en diferentes especies de microorganismos**

Sementales	Microorganismos	Antibióticos utilizados y número de aislamientos resistentes								
		Ceftazidima	Gentamicina	Trimetropin Sulfametoxazol	Ciprofloxacina	Cefadroxilo	Cotrimoxazol	Amoxicilina Ac. Clavulánico	Amoxicilina	Penicilina
<b>OLIVER</b>	<i>Proteus mirabilis</i>	R	S		S	R	S	S	R	
<b>HAVANO</b>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>		S	S	S			S	R	R
	<i>Proteus mirabilis</i>	R	S		S	R	S	S	R	
<b>DANTE</b>	<i>Streptococcus sp</i>		S	S	S			S	R	R
	<i>Proteus mirabilis</i>	R	S		S	R	S	S	R	
<b>NENE</b>	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	S	S		S	R	R	R		
	<i>Escherichia coli</i>		S	S	S		R		R	R
	<i>Proteus mirabilis</i>	R	S		S	R	S	S	R	

El cuadro 8 nos muestra la sensibilidad y la resistencia que tienen los microorganismos cuando se los expone a diferentes antibióticos.

**S** = Sensible a Antibióticos (Capacidad del antibiótico para eliminar la bacteria)

**R** = Resistente a Antibióticos (Resistencia de la bacteria a ser eliminada por el antibiótico)

#### 5.4 Antibiograma individual de los sementales bovinos

**Cuadro 9. Antibiograma individual de acuerdo al desarrollo de bacterias en cultivo de lavado prepucial.**

ANTIBIOGRAMA	
TORO DANTE	Microorganismo
LAVADO PREPUCIAL	<i>Proteus mirabilis</i>
Ciprofloxacina	Sensible
Amoxicilina + ac. Clavulanico	Sensible
Gentamicina	Sensible
Cotrimoxazol	Sensible
Ceftazidima	Resistente
Cefadroxilo	Resistente

ANTIBIOGRAMA	
TORO HAVANO	Microorganismo
LAVADO PREPUCIAL	<i>Staphylococcus saprophiticus</i>
Ciprofloxacina	Sensible
Amoxicilina + ac. Clavulanico	Sensible
Gentamicina	Sensible
Trimetropin + sulfametoxasol	Sensible
Amoxicilina	Resistente
Penicilina	Resistente

ANTIBIOGRAMA	
TORO OLIVER	Microorganismo
LAVADO PREPUCIAL	<i>Proteus mirabilis</i>
Ciprofloxacina	Sensible
Gentamicina	Sensible
Cotrimoxazol	Sensible
Ceftazidima	Resistente
Cefadroxilo	Resistente

ANTIBIOGRAMA	
TORO NENE	Microorganismo
LAVADO PREPUCIAL	<i>Pseudomona aeruginosa</i>
Ciprofloxacina	Sensible
Ceftazidima	Sensible
Gentamicina	Sensible
Cotrimoxazol	Resistente
Cefadroxilo	Resistente
Amoxicilina + ac. Clavulanico	Resistente

**Cuadro 10. Antibiograma individual de acuerdo al desarrollo de bacterias en cultivo de semen fresco.**

<b>ANTIBIOGRAMA</b>	
TORO DANTE	<b>Microorganismo</b>
SEMEN FRESCO	<i>Streptococcus sp</i>
Ciprofloxacina	Sensible
Amoxicilina + ac. Clavulanico	Sensible
Gentamicina	Sensible
Cotrimoxazol	Sensible
Ceftazidima	Resistente
Cefadroxilo	Resistente

<b>ANTIBIOGRAMA</b>	
TORO HAVANO	<b>Microorganismo</b>
SEMEN FRESCO	<i>Staphylococcus saprophiticus</i>
Ciprofloxacina	Sensible
Amoxicilina + ac. Clavulanico	Sensible
Gentamicina	Sensible
Trimetropin + sulfametoxasol	Sensible
Amoxicilina	Resistente
Penicilina	Resistente

<b>ANTIBIOGRAMA</b>	
TORO OLIVER	<b>Microorganismo</b>
SEMEN FRESCO	<i>Proteus mirabilis</i>
Ciprofloxacina	Sensible
Gentamicina	Sensible
Cotrimoxazol	Sensible
Ceftazidima	Resistente
Cefadroxilo	Resistente

<b>ANTIBIOGRAMA</b>	
TORO NENE	<b>Microorganismo</b>
SEMEN FRESCO	<i>Pseudomona aeruginosa</i>
Ciprofloxacina	Sensible
Ceftazidima	Sensible
Gentamicina	Sensible
Cotrimoxazol	Resistente
Cefadroxilo	Resistente
Amoxicilina + ac. Clavulanico	Resistente

**Cuadro 11. Antibiograma individual de acuerdo al desarrollo de bacterias en cultivo de semen congelado.**

ANTIBIOGRAMA	
TORO DANTE	
SEMEN CONGELADO	<b>Sin Desarrollo</b> hasta las 48 horas
	<b>Antibiograma No procede</b>

ANTIBIOGRAMA	
TORO HAVANO	
SEMEN CONGELADO	<b>Sin Desarrollo</b> hasta las 48 horas
	<b>Antibiograma No procede</b>

ANTIBIOGRAMA	
TORO OLIVER	
SEMEN CONGELADO	<b>Sin Desarrollo</b> hasta las 48 horas
	<b>Antibiograma No procede</b>

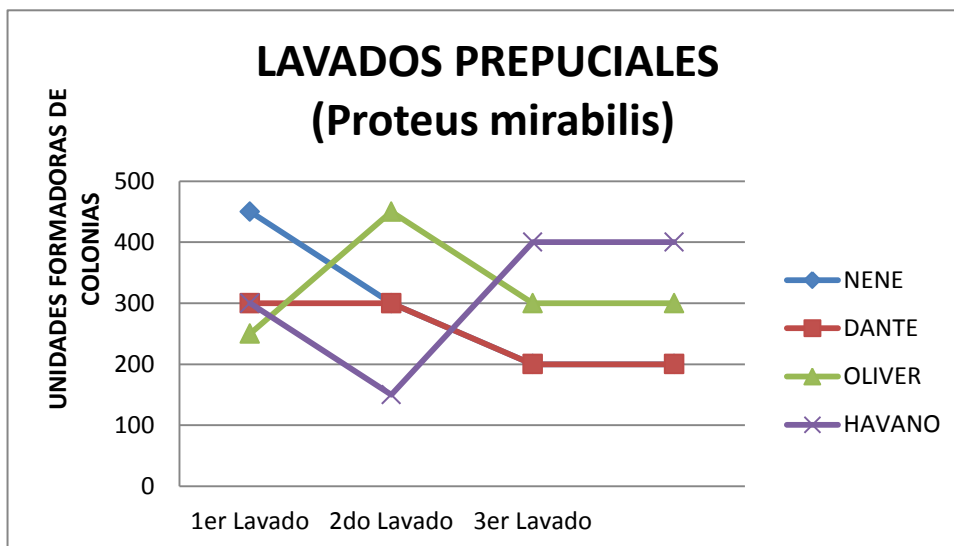
ANTIBIOGRAMA	
TORO NENE	<b>Microorganismo</b>
SEMEN CONGELADO	<i>Pseudomona aeruginosa</i>
Ciprofloxacina	Sensible
Ceftazidima	Sensible
Gentamicina	Sensible
Cotrimoxazol	Resistente
Cefadroxilo	Resistente
Amoxicilina + ac. Clavulanico	Resistente

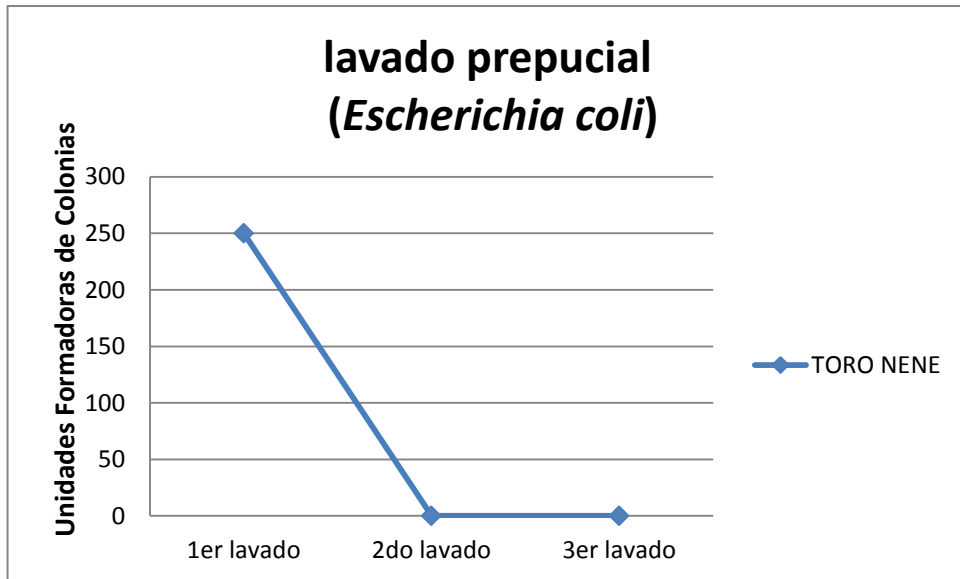
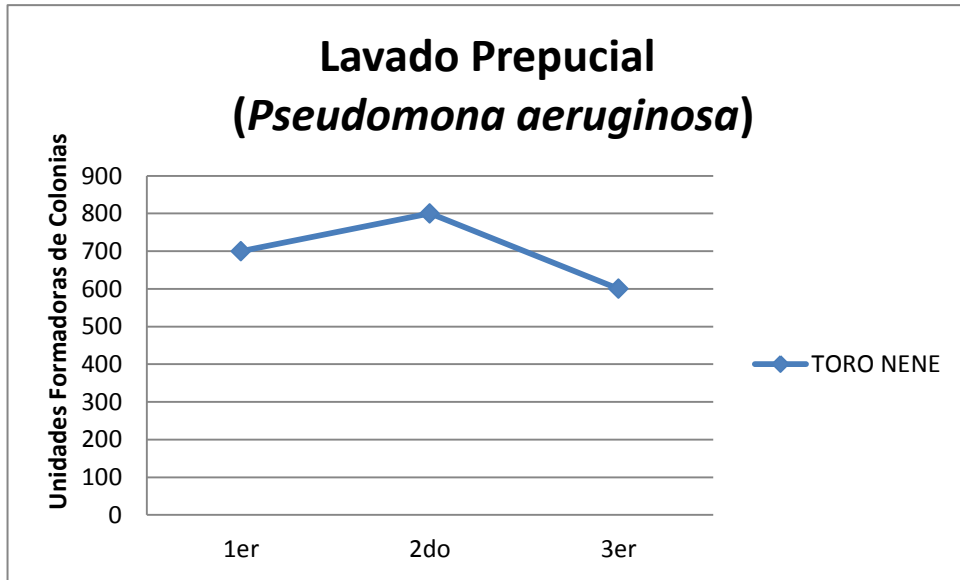
## 5.5 Unidades Formadoras de Colonia (UFC/ml)

**Cuadro 12. Clasificación individual de la Unidades Formadoras de Colonias (UFC/ml) de las especies aisladas en el lavado prepucial de los sementales bovinos**

	Lavado prepucial	Lavados (UFC/ml)		
		1er	2do	3er
<b>Nene</b>				
	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	700	800	600
	<i>Escherichia coli</i>	250	0	0
	<i>Proteus mirabilis</i>	450	300	200
<b>Oliver</b>				
	<i>Proteus mirabilis</i>	300	300	200
<b>Havano</b>				
	<i>Proteus mirabilis</i>	250	450	300
<b>Dante</b>				
	<i>Proteus mirabilis</i>	300	150	400

**Figura 10.** Unidades formadoras de colonias en el lavado prepucial de los sementales bovinos





En la **figura 10** observamos los microorganismos encontrados en el lavado prepucial del semental bovino Nene.

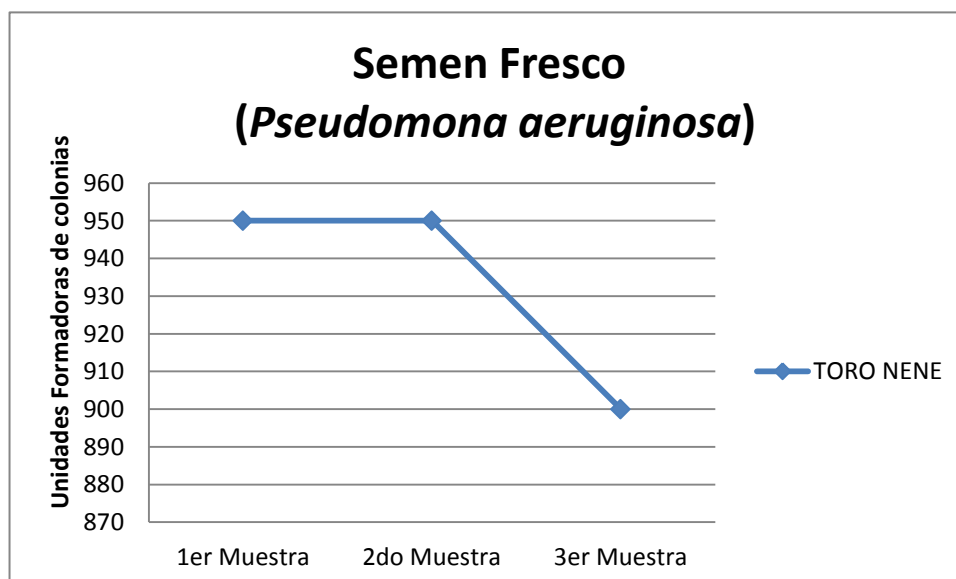
**Cuadro 13. Clasificación individual de la Unidades Formadoras de Colonias (UFC/ml) de las especies aisladas en el semen fresco de los sementales bovinos**

Nene	Semen Fresco	Colectas (UFC/ml)		
		1er	2do	3er
	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	950	950	900

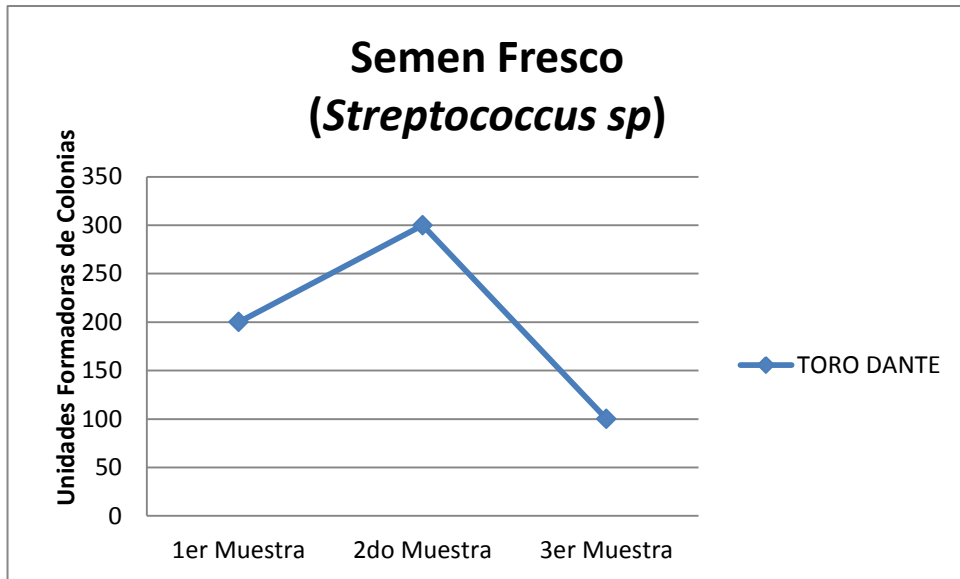
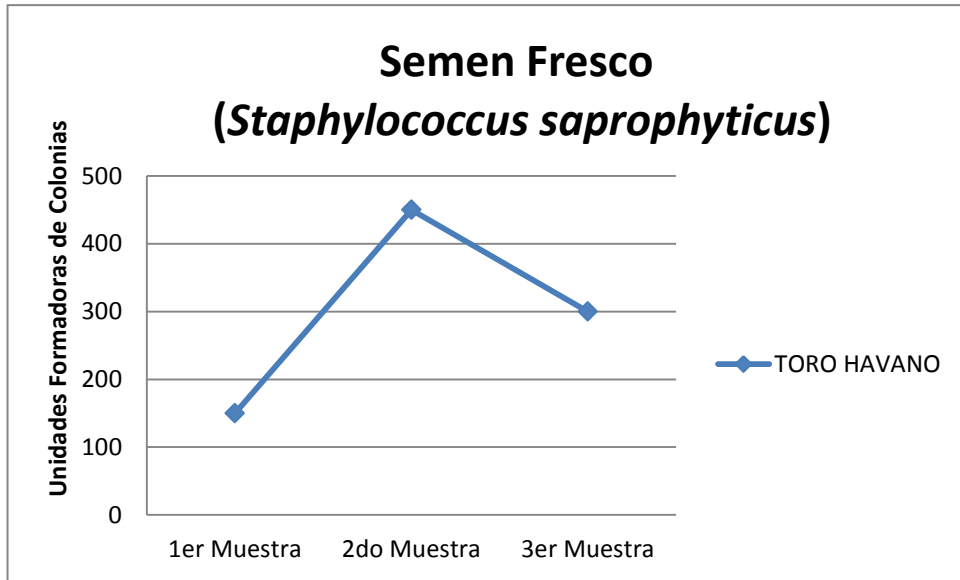
Havano	Semen Fresco	Colectas (UFC/ml)		
		1er	2do	3er
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	150	450	300

Dante	Semen Fresco	Colectas (UFC/ml)		
		1er	2do	3er
	<i>Streptococcus sp</i>	200	300	100

**Figura 11. Unidades Formadoras de colonias en el semen fresco de los sementales bovinos**



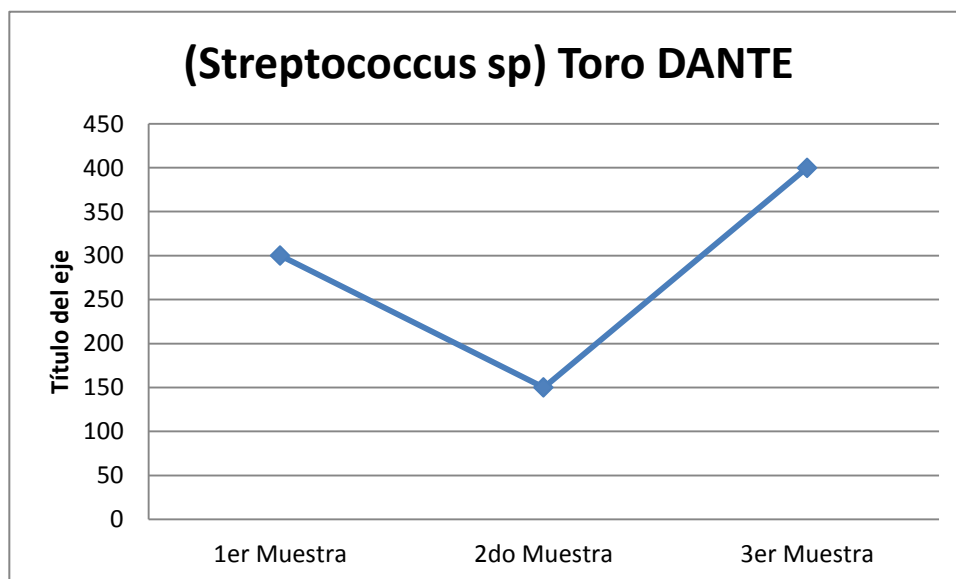




En la **figura 11** observamos los microorganismos encontrados en el semen fresco de cada uno de los sementales bovinos. Con mayor relevancia al semental Nene el cual mantiene la ***Pseudomona aeruginosa***.

**Cuadro 14. Clasificación individual de la Unidades Formadoras de Colonias (UFC/ml) de las especies aisladas en el semen congelado del semental bovino**

Nene	Semen congelado	Pajuelas (UFC/ml)		
		1er	2do	3er
	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	900	850	1000

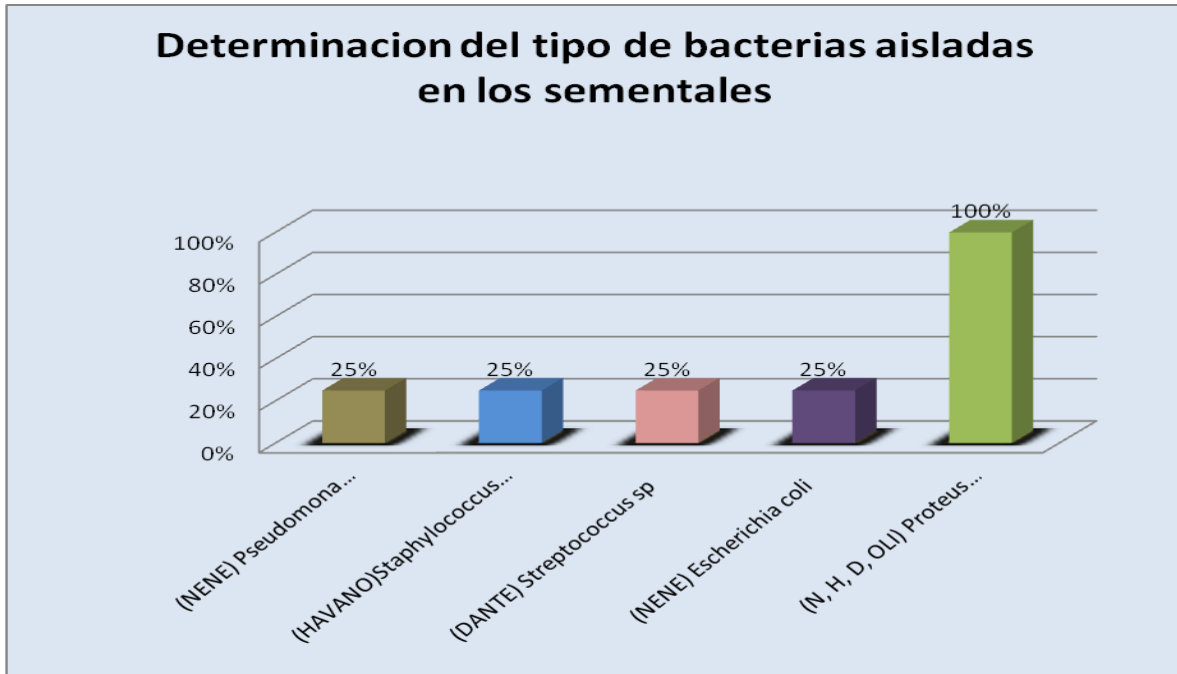


En la **figura 12** observamos los microorganismos encontrados en la muestra del semen congelado, con la relevancia que el único semental bovino Nene mantiene la contaminación del microorganismo *Pseudomona aeruginosa*.

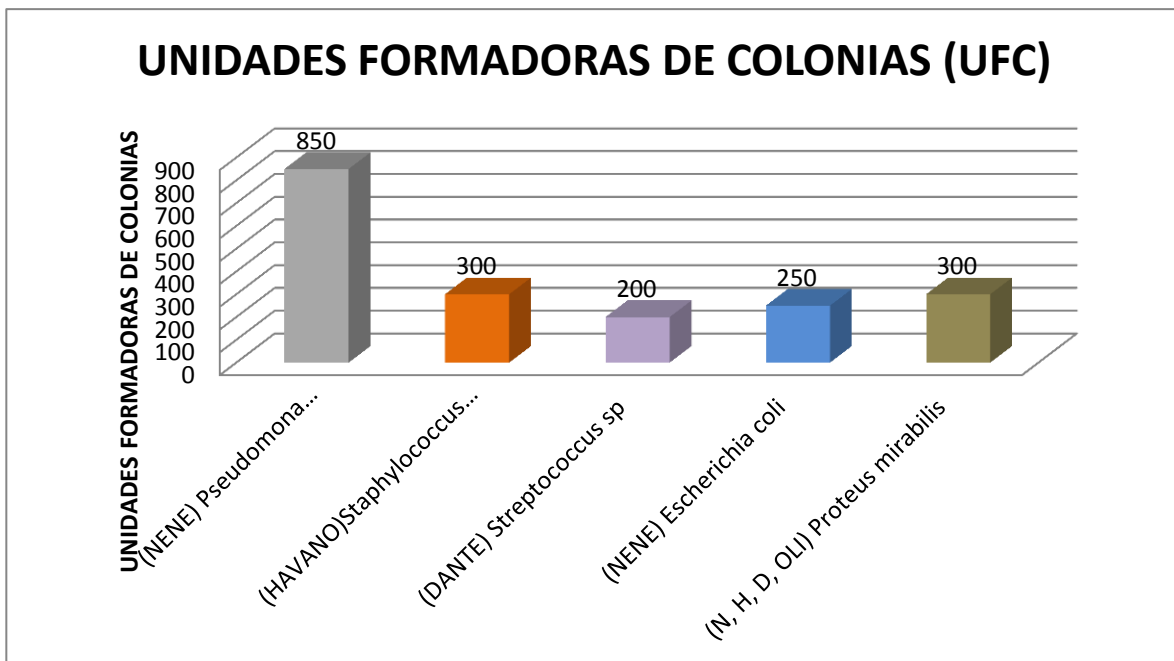
**Cuadro 15. Clasificación general de la Unidades Formadoras de Colonias (UFC/ml) de las especies aisladas en los sementales**

PROMEDIOS DE LAS UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC/ml)		
(NENE)	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	850 (UFC/ml)
(HAVANO)	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	300 (UFC/ml)
(DANTE)	<i>Streptococcus sp</i>	200 (UFC/ml)
(NENE)	<i>Escherichia coli</i>	250 (UFC/ml)
(NENE, HAVANO, DANTE y OLIVER)	<i>Proteus mirabilis</i>	300 (UFC/ml)

**Figura 13.** Determinación del porcentaje de bacterias presentes en los sementales bovinos



**Figura 14.** Determinación del promedio de Unidades Formadoras de Colonias (UFC/ml) presentes en los sementales bovinos



## 6. CONCLUSIONES

Se debe considerar que aun bajo practicas adecuadas de higiene o cuando se incorpora diversos agentes bacterianos, a los espermatozoides que se van a congelar, es común hallar un número variable de diferentes microorganismos, en el semen descongelado de bovino; en la actualidad se acepta, como numero limite 500 unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro de semen para obtener un índice satisfactorio de concepción (Ostaszko FAO, 1985).

El número de microorganismos aislados en el lavado prepucial, de cada uno de los sementales bovinos nos hace referencia a que se debe realizar la limpieza minuciosa del prepucio y el corte de los pelos prepuciales ya que en ellos pueden estar adheridos los microorganismos.

En las muestras de semen fresco y semen congelado observamos un buen porcentaje de microorganismo los cuales nos pone en evidencia que alguno de estos patógenos puede ser transmitibles a las vacas destinadas a la inseminación artificial,

Los microorganismos encontrados en el presente estudio (*Pseudomona aeuroginosa*, *Sthaphylococcus sp*, *Streptococcus sp*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*), están relacionados, con infecciones, muertes embrionarias, septicemias y toxemias o directamente afectan al medio ambiente uterino.

La contaminación bacteriana principalmente produce una serie de alteraciones entre las que se encuentra una disminución de la motilidad, aumento en las aglutinaciones espermáticas, aumento del porcentaje de acrosomas alterados y una reducción del pH a niveles ácidos, que conducen a una reducción en el tiempo de conservación de las dosis seminales. Por lo tanto, la adición del antibiótico en la adecuada concentración favorecerá la supervivencia espermática (Gadea, 2003).

Los patógenos no específicos principalmente bacterias entran al útero por infección ascendente o por inseminación.

Es posible que otra fuente de microorganismos haya provenido por contaminación externa, especialmente de las heces del animal o durante la colección de semen por el método de la vagina artificial, a pesar de contar con todo el material estéril, es difícil asegurar un lavado aséptico del prepucio.

Al incrementarse la cantidad de bacterias mesofilicas aerobias o UFC, la motilidad de los espermatozoides tiende a disminuir. Recientemente se observó que la cantidad de *Pseudomonas aeruginosa* de 10, 500, 1000 UFC/ml, bajan la concentración de espermatozoides vivos a 3.7, 6.0 y 8.8 % correspondientemente y por ende, disminuyen la capacidad fertilizante del semen descongelado de bovino (Ostaszko FAO, 1985).

## **7. RECOMENDACIONES**

- Se debe tomar en cuenta que existen otros riesgos que deben ser evaluados microbiológicamente como son los componentes de origen animal utilizados en el proceso de congelación del semen.
- Se debe establecer un lugar adecuado para el descanso de los sementales, mantener su asepsia, realizar constantemente la limpieza tanto de las instalaciones como el cuidado del animal para que este extinto de adquirir alguna contaminación por un medio externo.
- Realizar los controles necesarios (microbiología del semen), semestralmente de los sementales destinados a la colecta de semen, ya que estos pueden transmitir enfermedades malignas a las vacas que sean inseminadas por el material genético.
- El centro de colecta de semen debe estar bajo la supervisión general de la Administración Veterinaria, la cual controlará periódicamente el estado de salud y el bienestar de los animales, así como los métodos utilizados físicamente de los bovinos.
- Los bovinos destinados a la colecta de semen, deben estar debidamente aislados de los animales de granja que se encuentren en campos o en granjas vecinas por medio de barreras naturales o artificiales.
- Todos los contenedores y locales de almacenamiento de semen deben poder desinfectarse.
- Debe ser objeto de riguroso control la entrada de visitantes al centro de colecta de semen. El personal del centro debe ser técnicamente competente y observar normas de higiene personal muy estrictas para evitar la introducción de gérmenes patógenos y se suministrará al personal ropa de protección y botas para uso exclusivo en el centro de colecta de semen.
- Al llevar al toro del establo a la sala de toma del semen, el técnico deberá asegurarse de que el toro está limpio y no transporta restos de cama o partículas

de alimentos en el cuerpo o en las pezuñas, porque esos materiales están siempre muy contaminados.

- En el caso de un orificio prepucial anormalmente grande o de anomalías de esta cavidad que pudieran facilitar una invasión por microorganismos, se debe lavar el saco prepucial antes de la toma del semen. Se puede introducir varias veces solución salina estéril dentro del prepucio, utilizando para ello un catéter acoplado a una jeringa o sifón. Esta precaución es vital si el eyaculado debe ser sometido a una prueba para la detección de bacterias patógenas.

- Se recomienda que en caso de suciedad manifiesta, se limpiara minuciosamente, con jabón o detergente, el orificio prepucial y las zonas contiguas, y después enjuagar y secar concienzudamente.

- Se debe cepillar al semental con demasiada regularidad y, si es preciso, la víspera de la toma del semen, poniendo especial cuidado en la parte baja del abdomen.

- Se deberá mantener limpio el pelaje del toro y, por lo general, cortado al rape.

- Se recomienda que la longitud del penacho de pelos del orificio prepucial, que está invariablemente sucio, se cortará a unos 2 cm. No se cortará por completo, a causa de su función protectora. Si se deja demasiado corto puede provocar una irritación de la mucosa prepucial.

- Se debe mantener al toro en condiciones correctas de higiene en pastizal o, si no, en establo, suelto o sujeto. Si está sujeto, la cama deberá estar limpia y ser renovada tan a menudo como sea necesario.

- Los tubos de toma deben estar esterilizados y el método de esterilización recomendado es el calentamiento en un horno a 180°C durante por lo menos 30 minutos. Los tubos se tapan mientras no se utilicen, por ejemplo con un tapón de algodón en rama estéril, y se mantendrán en una caja o almacenar estéril hasta que vuelvan a utilizarse.

- En caso de toma de eyaculados sucesivos, se cambiará de vagina artificial para cada monta. La vagina también se cambiará si el toro ha insertado el pene y no ha eyaculado.
- Se recomienda no sacudir la vagina artificial después de la eyaculación, para evitar que el lubricante y las impurezas pasen a través del cono y se mezclen al contenido del tubo recolector.
- El lubricante que se utilice deberá ser estéril y estar contenido en tubos. La varilla empleada para extender el lubricante estará esterilizada y no se expondrá al polvo entre cada toma.
- Es indispensable limpiar completamente la vagina artificial antes de cada toma. La vagina se desmontará de antemano y se lavarán, enjuagarán, secarán y mantendrán protegidas del polvo cada una de sus partes. El interior del cuerpo del aparato y del cono se esterilizará, antes de volver a montar la vagina, con métodos de esterilización autorizados, como los que utilizan alcohol etílico al 70% o alcohol isopropílico al 98 - 99%, óxido de etileno o también vapor. Una vez montada, la vagina artificial se conservará en un armario que se limpiará y desinfectará con regularidad.
- Se recomienda que la mano de la persona encargada de la toma de semen no deberá entrar en contacto con el pene del toro. Se aconseja emplear guantes desechables y, preferentemente, esterilizados, que confieren una protección suplementaria si el toro se mueve inopinadamente.
- Deberán mantenerse limpios los cuartos traseros del excitador, ya sea maniquí o animal excitador vivo. El maniquí será limpiado a fondo después de cada período de tomas de semen. Los cuartos traseros de los animales deben ser lavados cuidadosamente antes de cada sesión de toma. Se aconseja repetir la limpieza cada vez que se cambie de toro, particularmente en caso de ensuciamiento por defecaciones. Las protecciones plásticas son mal aceptadas por los toros y no suelen utilizarse.



- Debe ser fácil de limpiar, secar y desinfectar el suelo de la zona de monta. Así se evitarán los suelos polvorientos.

## 8. LITERATURA CITADA

- **A. M. Sorensen. Jr, (1980)**, Reproducción Animal Principios y Practicas, Edit. Mc Graw-Hill, México DF.
- **Arguedas, R., 2006.** “Estudió de la suplementación de llamas lactantes y gestantes en condiciones de pastoreo en pradera nativa”. Tesis de grado Universidad Mayor de San Andrés
- **Barth, A.J. y Oko, R.J. (1989).** Morfología del espermatozoide bovino. AMES. Estados Unidos de América. pp19-39.
- **Buxade Carlos (1995)**, Zootecnia, Bases de Producción Animal, Tomo II. Reproducción y alimentación, Edit Mundi Prensa, Madrid-España, pp 344
- **Bearden, J. H y J. W. Fuquay. 1982.** Reproducción Animal Aplicada, Editorial al Manual Moderno S. A. de C. V. México.
- **Callisaya I. (1994)**, Caracterización de las tierras de la Estación Experimental de Choquenaira, según su capacidad uso y aptitud para riego, Tesis de Grado, Universidad Mayor de San Andrés, Facultad de Agronomía, La Paz – Bolivia, pp 40-42
- **Collins, C.H. (1989):** Métodos Microbiológicos. Editorial. Acribia, España.
- **Derivaux, J. (1982):** Reproducción de los animales domésticos; editorial acribia; España, pp 142-157.
- **Duran, D. C. A. 1980.** Anatomía, Fisiología de la reproducción e Inseminación Artificial en Bovinos. Ed. Hemisferio sur. Uruguay. 264pp.
- **Fausta Maniardi Fazio (1980)**, Cría Moderna de Bovinos, Edit, De Vecchi. S. A. Barcelona – España, pp 237
- **Gasque Gómez Ramón (2008)**, Enciclopedia Bovina, Primera Edición, UNAM México DF, pp 432

- **Gadea, J. (2003).** Los Diluyentes de la Inseminación Artificial. REDVET 11():1-32.
- **Gonzales, C. (1989);** “Inseminación Artificial y Reproducción Programada” 3ra Edición, Maracaibo-Venezuela.
- **G. W. Salisbury, N. L. Van Demark (1990),** Fisiología de la reproducción e inseminación artificial de los Bovidos, Edit, Acribia, Zaragoza – España, pp 831
- **Hafez, E y Hafez, B. (2002).** Reproducción e inseminación artificial en animales. 7ª ed. McGraw-Hill. México, Distrito Federal. 522 pp.
- **Holdrige. L. (1982),** Ecología Basada en Zonas de Vida, IICA, San José de Costa Rica, pp 216
- **Holy. L. (1987),** Reproducción del ganado Femenino y Masculino, Edit, Revolucionaria Cuba, pp 343
- **Holy, Lubos (1983),** Bases Fisiológicas de la Reproducción Bovina
- **Inchausti. Daniel. (1980),** Bovinotecnia, Edit, El Ateneo, Buenos Aires – Argentina, pp 800
- **McDonald, L. E.;** Endocrinología veterinaria y reproducción; 4ª edición; editorial, interamericana; México, D.F. 1991.
- **Machota V. Santiago, Mateos Y. Emilio, Piriz D. Segundo, (2003)** Manual de Microbiología Veterinaria, Edit. McGraw-Hill Interamericana, pp. 837
- **Mattar, S. Melo, M. (1998)** Bacteriología clínica: estudio etiológico de las enfermedades infecciosas de origen bacteriana. Santa Fe de Bogota-Colombia. Edit. Ceja, Tomo I, pp. 278 – 322
- **Maxwell. W. M. C. y Evans O. (1990).** Inseminación Artificial, Edición Acribia, S. A. (Madrid), Cap. 3-4: 19-32.
- **Moat, A. Foster, J. (1988).** Fisiología microbiológica, segunda edición, U.S.A

- **Ostaszko. (1985).** Control del semen en transferencia de embriones. FAO. Roma. *Producción animal*. pp 23- 24.
- **O'Donnell, L., K Robertson m, Jones and E. Simpson. 2001.** Estrogen and Spermatogenesis. *Endocr Rev.* pp 289-318
- **R. H. F. Hunter. (1991),** Fisiología Y tecnología de la Reproducción Bovina, Edit, Acribia, Zaragoza – España, pp 362
- **SENAHMI (2004),** Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología, Estación Viacha, Provincia Ingavi, La Paz – Bolivia
- **Sorensen, A. M. (1986).** Reproducción Animal Principios y Prácticas. 2da Ed. Editorial Mc Graw-Hill, México. 539 pp.
- **Salisbury, G., Vandemark, N. y Lodge. J. (1978).** Fisiología de la reproducción e inseminación artificial de los bóvidos. Acribia. Zaragoza España. 832 p.
- **Vera Muñoz, Oscar;** Como mejorar la colección, manejo y calidad microbiológica del semen; Instituto de reproducción animal e inseminación artificial; Departamento de biología de los organismos, Universidad Simón Bolívar; Caracas.
- **Zemjaniz, R. (1982).** Reproducción animal, diagnostico y técnicas terapéuticas; 7ª edición; editorial limusa; México,

## ANEXOS



Nombre: Dante N° Arete: 348  
Fecha de nacimiento: 17 de mayo del 2006  
Raza: Holstein  
Procedencia: Granja peruana, inseminación artificial semen americano



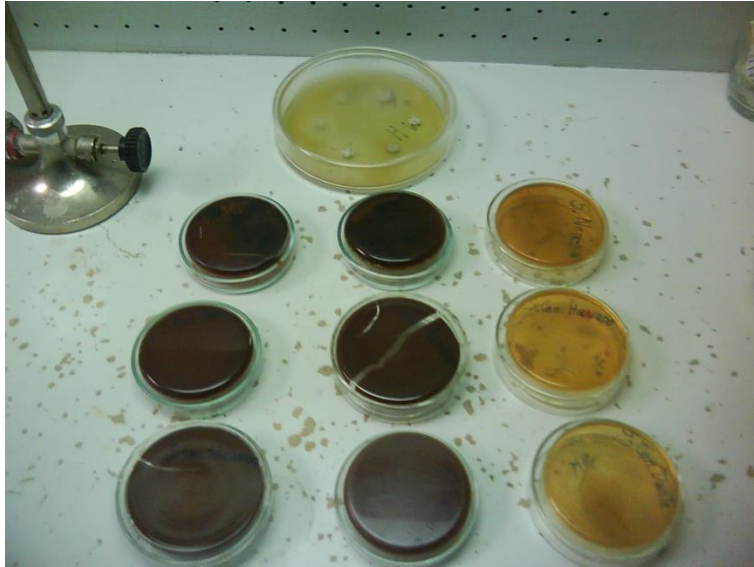
Nombre: Havano N° Arete: 349  
Fecha de nacimiento: 11 de abril del 2006  
Raza: Pardo suizo  
Procedencia: Granja peruana, la joya inseminación artificial



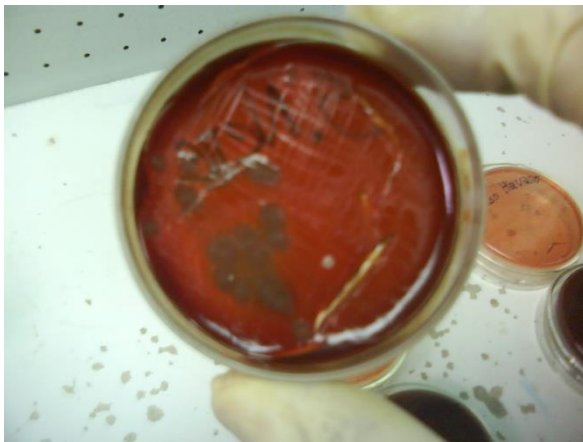
Nombre: Nene                      N° Arete: 407  
Fecha de nacimiento: 28 de enero del 2009  
Raza: Holstein



Nombre: Oliver                      N° Arete: 408  
Fecha de nacimiento: 04 de febrero del 2009  
Raza: Holstein



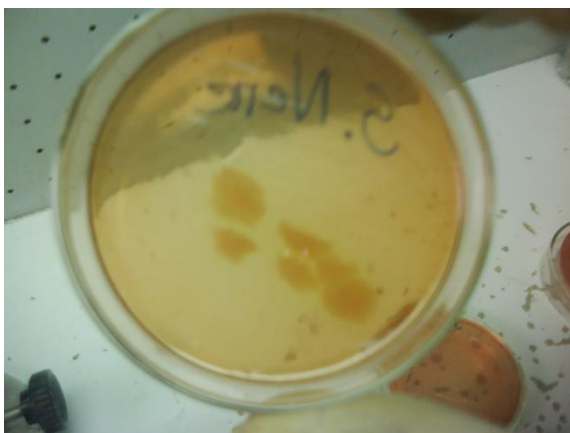
Cultivo de muestras en el laboratorio Gen y vida, lavado prepucial, semen fresco y semen congelado



**Agar Sangre**



**Agar Chocolate**



**Agar Mac conkey**



**Agar Muller Hinton**, para realizar el antibiograma, con seis discos de antibióticos dispuestos en igual proporción en la caja petri