

**Evaluación de la eficiencia en la motilidad y viabilidad espermática con la adición de
Glutamina al semen fresco de Bovino**

CRISTIAN VLADIMIR CHACÓN CHALA

Cód.1070332003

Universidad de pamplona

Facultad de Ciencias Agrarias

Medicina Veterinaria

Notas de Autor:

La correspondencia relacionada con este documento deberá ser enviada:

cristian.chacon2@unipamplona.edu.co

Pamplona

2025

**Evaluación de la eficiencia en la motilidad y viabilidad espermática con la adición de
Glutamina al semen fresco de Bovino**

CRISTIAN VLADIMIR CHACÓN CHALA

Cód.1070332003

Tutor: Fernando Gómez Parra

PhD. En Ciencias Agrarias

Pamplona, Colombia

2025

Dedicatoria

A Dios por permitirme lograr mis metas.

A mi Madre María del Tránsito Chala. Por su apoyo infinito e incondicional. Gracias por creer en mí.

A mi Hija Helen Gabriela Chacón Beltrán, por ser el motor de mi vida, por enseñarme a amar.

Gracias.

Agradecimientos

A los docentes Fernando Gómez Parra y Dubel Reinaldo Cely Leal, por su dedicación, guía, paciencia y enseñanzas.

A mis compañeros de pasantía ya que hicieron más agradable el tiempo durante la misma, por esas charlas motivacionales que nos dimos a lo largo de la pasantía.

A los operarios de la Granja Experimental Villa Marina de quienes me llevo muchas enseñanzas.

Tabla de Contenido

Introducción	10
Descripción Sitio de Practica	10
Granja Experimental Villa Marina	10
Actividades Realizadas	12
Resumen	14
Palabras Clave	14
Abstract	15
keywords	¡Error! Marcador no definido.
Evaluación de la eficiencia en la motilidad y viabilidad espermática con la adición de Glutamina al semen de bovino.....	14
Capítulo I	16
Planteamiento del Problema.....	16
Justificación.....	17
Objetivos	18
General	18
Específicos	18
Capítulo II	19
Introducción	19
Marco Teórico	20

Antisepsia y colecta	21
Evaluación andrológica y análisis seminal	21
Sistema CASA y evaluación objetiva de la calidad seminal	21
Dilución y rol de la glutamina en la preservación	22
Estrés oxidativo y crio preservación.....	23
Mecanismos moleculares de la glutamina y antioxidación	23
Otros antioxidantes en la conservación del semen	24
Metabolismo energético y función mitocondrial	24
Evidencia clínica in vivo	24
Antecedentes	25
Capítulo III.....	28
Materiales y Métodos	28
Diseño experimental.	28
Materiales.	¡Error! Marcador no definido.
Metodología	28
Selección.....	28
Proceso de colecta del semen	29
Evaluación macroscópica del semen	30
Evaluación andrológica	30
Preparación de muestras y adición de Glutamina.....	33

Capítulo IV	36
Resultados	36
Experimento 1.....	36
Experimento 2.....	39
Experimento 3.....	42
Discusión.....	45
Capítulo V	49
Conclusiones	49
Recomendaciones.....	50
Referencias Bibliográficas	51

Tabla de Figuras

Figura 1 Ejemplares seleccionados.	28
Figura 2 Colecta por medio de electro eyaculación.	30
Figura 3 Asistente computarizado para análisis de semen (CASA).	34
Figura 4 Preparación de muestras.....	34
Figura 5 Evaluación de la motilidad espermática.	37
Figura 6 Evaluación de parámetros cinemáticos y de movilidad.	38
Figura 7 Evaluación de la motilidad espermática.	40
Figura 8 Evaluación de parámetros cinemáticos y de movilidad.	41
Figura 9 Evaluación de la motilidad espermática.	43
Figura 10 Parámetros cinemáticos y de movilidad espermática.	44

Lista de Abreviaturas

ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza.

BCF: frecuencia de batido de cola.

CASA: asistente computarizado de análisis seminal.

DAP: distancia del trayecto promedio.

DCL: distancia curvilínea.

DSL: distancia en línea recta.

IA: inseminación artificial.

LIN: linealidad.

STR: tiempo en línea recta.

VAP: velocidad promedio de la trayectoria.

VCL: velocidad curvilínea.

VSL: velocidad rectilínea.

WOB: Oscilación.

Introducción

Las pasantías en Medicina Veterinaria son una parte fundamental en la formación profesional, ya que permiten a los estudiantes aplicar los conocimientos adquiridos. Durante las pasantías los estudiantes adquiere destrezas en diagnóstico, tratamiento de enfermedades, manejo animal, así como el desarrollo de relaciones interpersonales para familiarizarse con el entorno laboral y afianzar la toma de decisiones.

En este contexto, el presente trabajo de grado tiene como objetivo detallar las experiencias y actividades desarrolladas en la Granja Experimental Villa Marina, así como los casos clínicos y procedimientos de reproducción asistida realizados, que permiten a los estudiantes integrar conocimientos teóricos y prácticos con situaciones de la vida profesional; a través de estas prácticas se busca formar Médicos Veterinarios competentes y comprometidos con la salud animal, la seguridad alimentaria y la prevención de enfermedades zoonóticas, contribuyendo al bienestar de las especies y al desarrollo sostenible de la producción animal.

Descripción Sitio de Practica

Granja Experimental Villa Marina

Ubicada en el kilómetro 49 de la carretera que conecta Cúcuta con Pamplona. Dirigida por los Médicos Veterinarios Freddy Rodríguez y Madary Yurley Galvis; se ha convertido en un centro de aprendizaje para los estudiantes de Medicina Veterinaria pues los alumnos tienen la oportunidad de participar en prácticas, actividades académicas y científicas, además de asistir a charlas y capacitaciones centradas en temas como sanidad animal reproducción aplicada y manejo zootécnico y clínico.

A continuación, se detallan los diferentes sistemas de producción que se manejan en la Granja Experimental Villa Marina:

Producción conícola. En esta producción se manejan diferentes etapas de la producción, que son: cría, levante y ceba, para venderlos en canal o también como mascota. Actualmente cuenta con razas como: Mariposa, Nueva Zelanda, Cabeza de León, Chinchilla y Californiano; la alimentación de los animales se basa en concentrados Solla®, y forrajes nutritivos: Ramio, Botón de oro y Morera.

Producción porcina. Esta producción se enfoca en la cría de lechones utilizando razas como Pietran, large White, Landrace, así como sus cruces. Estos animales se alimentan con concentrados Solla®, ya que son los correctos para satisfacer los requerimientos nutricionales de cada etapa de la producción.

Producción Ovino-Caprina. Esta producción se centra en el pie de cría y levante en razas ovinas Dorper y caprinas como: Sannen, La Mancha y Toggenburg. Estos animales se alimentan a base de forrajes como: Botón de oro, Morera, King Grass morado y Clon 51.

Producción de bovinos. El fin de esta producción es el pie de cría, se manejan razas como Gyr, Brahaman, Girolando, Romosinuano, Pardo suizo y sus cruces. Su alimentación se basa en pastoreo y suplementación con pastos de corte como Clon 51, Cuba 22, King Grass, así como sales mineralizadas y bloques nutricionales Solla®.

Producción bufalina. Esta producción se enfoca en el pie de cría de bubillas de la raza Murrah y Mediterráneo. Su alimentación se basa en pastoreo y suplementación con pastos de corte como Clon 51, Cuba 22, King Grass, así como sales mineralizadas y bloques nutricionales Solla®.

La Granja Experimental Villa Marina cuenta con el Laboratorio de Biotecnología y Reproducción Animal de la Universidad de Pamplona (LABRUP), en el cual los estudiantes y

docentes realizan procedimientos de reproducción asistida como lo son: producción de pajilla por crio preservación, vitrificación, inseminación artificial, aspiración folicular, fertilización *in vitro*, entre otros procedimientos, estos se realizan bajo estándares de control y calidad para así asegurar un aprendizaje productivo y así mismo lograr destacar el programa de Medicina Veterinaria de la Universidad de Pamplona en los procesos de reproducción animal a nivel departamental y nacional.

Actividades Realizadas

Durante la pasantía en la Granja Experimental Villa Marina, se participó en diversas actividades relacionadas con el manejo de la salud animal, la ejecución de planes sanitarios y el monitoreo de la reproducción en los animales. Esta experiencia permitió aplicar y expandir los conocimientos de Medicina Veterinaria y en la gestión de sistemas de producción animal.

Una de las actividades principales fue la ejecución de planes sanitarios, los cuales se enfocan en el control y prevención de enfermedades en los animales. También se instauraron tratamientos a diversas patologías como: laceración, abscesos, claudicaciones y abortos; estos casos refirmaron los conocimientos en técnicas de diagnóstico y manejo de la farmacología, bajo supervisión de profesionales.

Además, se contribuyó al proceso de revisión y evaluación de la dieta que se suministra en los diferentes sistemas de producción según sus necesidades y requerimientos, esta actividad resalto la importancia de ofrecer un alimento adecuado, asegurando el bienestar y la productividad de los animales.

En cuanto al Laboratorio de Reproducción Animal, inicialmente se hizo un reconocimiento de los quipos que se utilizan en técnicas de reproducción asistidas y

mejoramiento genético. Las labores consistieron principalmente en manejo de los equipos realizando prácticas, esta experiencia ha permitido obtener una mejor visión general de las técnicas empleadas en la reproducción animal y su impacto en las grandes producciones, así mejorando la eficacia en nuestro sector pecuario.

Evaluación de la eficiencia en la motilidad y viabilidad espermática con la adición de Glutamina al semen de bovino.

Resumen

La Granja Experimental Villa Marina de la Universidad de Pamplona, fue el escenario de un estudio sobre la mejora de la conservación del semen bovino. El presente trabajo evaluó la eficiencia de la adición de glutamina al semen fresco refrigerado a 4°C, con el objetivo de optimizar la motilidad y viabilidad espermática. La investigación buscó como intentar reducir los problemas del estrés oxidativo durante el equilibrio y crio preservación, que compromete la calidad del semen bovino y la efectividad de la IA. La glutamina, conocida por sus propiedades antioxidantes y su papel en el metabolismo energético, ha sido propuesta como solución para mitigar los daños, el estudio fue de tipo longitudinal y comparó un grupo control sin adición de glutamina con grupos experimentales a diferentes concentraciones de glutamina (0.0025 mg/ml, 0.005 mg/ml y 0.01 mg/ml). Se evaluaron motilidad y cinética espermática 5, 24, 48, 72 y 96 horas en refrigeración, y se utilizó el sistema CASA para una evaluación precisa. Los resultados demostraron que la adición de glutamina a 0.005 mg/ml, mejoro significativamente la motilidad total, progresiva y rápida, en comparación con el grupo control, además se observó una mejor preservación de los parámetros cinemáticos en los grupos con glutamina. En conclusión, la adición de glutamina a 0.005 mg/ml es efectiva para mejorar la calidad espermática del semen refrigerado, lo que puede tener un impacto positivo en programas de IA, en áreas de acceso limitado a nitrógeno líquido.

Palabras Clave

Crio-preservación, estrés oxidativo, sistema CASA, inseminación artificial (IA), refrigeración, antioxidantes.

Abstract

The villa Marina Experimental Farm at the University of Pamplona was the setting for a study on improving bovine semen preservation. This work evaluated the efficiency of adding glutamine to fresh semen refrigerated at 4°C, with the aim optimizing sperm motility and viability. The research focused on avoiding the problems of oxidative stress during equilibration and cryopreservation, which compromises the quality of bovine semen and the effectiveness of AI. Glutamine, known for its antioxidant properties and its role in energy metabolism, has been proposed as a solution to mitigate the damage. The study was longitudinal and compared a control group without glutamine addition to experimental groups with different glutamine concentrations (0.0025 mg/ml, 0.005 mg/ml and 0.01 mg/ml). Motility and sperm kinetics were evaluated at 5, 24, 48, 72 y 96 hours of refrigeration, and the CASA system was used for precise evaluation. The results demonstrated that the addition of glutamine at 0.005 mg/ml significantly improved total, progressive, and rapid motility compared to the control group. Furthermore, better preservation of kinematic parameters was observed in the glutamine groups. In conclusion, the addition of glutamine at 0.005 mg/ml is effective in improving the sperm quality of refrigerated semen, which can have a positive impact on AI programs in areas with limited access to liquid nitrogen.

Keywords

Cryopreservation, oxidative stress, CASA system, artificial insemination (AI), refrigeration, antioxidants.

Capítulo I

Planteamiento del Problema

La calidad del semen bovino es un factor fundamental en los programas de inseminación artificial (IA), ya que es una herramienta clave para el mejoramiento genético y productivo del ganado. La crio preservación, es el proceso mediante el cual el semen es congelado mediante curvas de congelamiento y posterior-mente almacenado para luego descongelarse, por lo cual es indispensable para garantizar su disponibilidad a largo plazo. Sin embargo, este proceso afecta negativamente la viabilidad espermática, debido al estrés oxidativo que compromete la motilidad y la capacidad fecundante de los espermatozoides (Tuncer et al., 2011).

Durante la refrigeración y congelación, la generación de especies reactivas de (ROS), daña las membranas plasmáticas espermáticas, disminuyendo la motilidad y reduciendo la capacidad de fecundación (Sariözkan et al., 2014). A pesar de los avances en técnicas y medios de conservación, la preservación de la calidad seminal post descongelación continúa siendo un desafío en la crio preservación (Amirat-Briand et al., 2009).

Como alternativa para mitigar estos daños, se ha propuesto la adición de antioxidantes y aminoácidos como la glutamina. Esta molécula desempeña un papel crucial en la regulación del equilibrio reducción oxidación (REDOX) celular y en el metabolismo energético (Zhu et al., 2017). Souza et al. (2020), resaltan el potencial de la glutamina para reducir el estrés oxidativo, mejorando la integridad celular y la motilidad espermática después de la crio preservación. Sin embargo, algunos estudios reportan resultados variables, lo que evidencia la necesidad de investigaciones adicionales para validar su efecto y dosis optima (Nuntapaitoon et al., 2024).

Asimismo, la implementación de tecnologías como el sistema (CASA), se considera indispensable para evaluar con precisión la calidad del semen, permitiendo monitorear

parámetros claves como motilidad y cinética, que inciden directamente en la fertilidad (Singh et al., 2021).

Por lo tanto, esta investigación buscó evaluar el impacto de la adición de glutamina al semen bovino diluido y refrigerado a 4°C, específicamente en términos de motilidad, cinética y viabilidad. Este estudio buscó determinar si la glutamina puede mejorar la calidad seminal durante el proceso extendido de equilibrio o refrigeración a 4°C.

Justificación

La búsqueda de estrategias efectivas para mitigar los daños espermáticos derivados del estrés térmico y oxidativo ha llevado al estudio de antioxidantes naturales. La glutamina, además de participar en procesos bioenergéticos, ha mostrado propiedades cito protectoras mediante la estabilización de membranas, protección del ADN y reducción de ROS (Sangeeta et al., 2015; Zhu et al., 2017).

Investigaciones como la de Sariözkan et al. (2014) y Nuntapaitoon et al. (2024), han demostrado que el uso de glutamina puede mejorar la calidad espermática post descongelación, incluyendo mayor motilidad, integridad acrosomal y menor daño mitocondrial. Su inclusión en protocolos de manejo seminal bovino podría mejorar la eficiencia de los programas reproductivos en condiciones comerciales o experimentales.

Además, la correcta evaluación de la glutamina en el semen refrigerado a 4°C, amplía las posibilidades de conservación sin congelación hasta 96 horas, permitiendo el uso de material seminal en sitios donde no hay acceso continuo a nitrógeno líquido. Por lo tanto, este trabajo tiene la finalidad de aportar evidencia experimental sobre la efectividad de la glutamina como aditivo en el diluyente utilizado para la conservación del semen bovino.

Objetivos

General

- Evaluar el efecto de la adición de glutamina en distintas concentraciones sobre la motilidad y viabilidad espermática del semen bovino refrigerado a 4°C, mediante el sistema CASA.

Específicos

- Evaluar los efectos de la glutamina sobre la motilidad total y progresiva a 5, 24, 48, 72 y 96 horas de refrigeración a 4°C.
- Comparar la motilidad y viabilidad espermática entre el grupo control y los grupos experimentales con glutamina.
- Establecer una concentración efectiva para la adición de glutamina al semen bovino refrigerado a 4°C.

Capítulo II

Introducción

La inseminación artificial (IA), es una herramienta fundamental en el mejoramiento genético del ganado bovino, ya que permite la diseminación de características reproductivas deseables como el incremento en la producción de leche y carne. No obstante, uno de los principales retos en la implementación de la IA radica en la conservación adecuada del semen bovino, esencial para garantizar su uso efectivo en programas de IA (Salman et al., 2023).

La crio preservación, que consiste en la congelación a -196°C , es una técnica clave para la conservación de material genético a largo plazo. Sin embargo, este proceso puede inducir alteraciones estructurales y funcionales en los espermatozoides, debido a factores como el estrés oxidativo, la formación de cristales de hielo y la deshidratación celular, lo cual deteriora la motilidad, viabilidad y fertilidad del semen (Sangeeta et al., 2015; Tuncer et al., 2011).

Durante la crio-preservación, el aumento en la generación de (ROS), genera daño oxidativo sobre lípidos de membranas, proteínas y ADN espermático, lo cual reduce considerablemente la capacidad fecundante (Zhu et al., 2017). Aunque se han desarrollado diluyentes avanzados y técnicas de congelación más eficientes, mejorar la calidad del semen post descongelación continúa siendo un desafío en la reproducción bovina.

Entre las estrategias empleadas para mitigar estos efectos, la incorporación de antioxidantes y aminoácidos en los diluyentes ha mostrado resultados prometedores. En particular la glutamina es un aminoácido no esencial involucrado en procesos metabólicos y antioxidantes celulares, ha demostrado mejorar la integridad y motilidad espermática post descongelación (Nuntapaitoon et al., 2024; Souza et al., 2020).

Este estudio, pretende estandarizar protocolos de preservación de semen. En ese contexto se plantea evaluar el efecto de la adición de glutamina sobre la calidad espermática durante la fase de refrigeración a 4°C, como una estrategia para mejorar la motilidad y viabilidad espermática antes y después de la congelación.

El objetivo de este fue determinar el impacto de diferentes concentraciones de glutamina sobre la calidad del semen bovino almacenado a 4°C, empleando para ello el sistema (CASA). Se incluyó un grupo control sin adición de glutamina, y se evaluarán las muestras a las 5, 24, 48, 72 y 96 horas en refrigeración. Este análisis se realizó con el fin de generar información que contribuya a optimizar los protocolos de conservación y mejorar los resultados reproductivos en los programas de IA desarrollados en la Universidad de Pamplona.

Marco Teórico

El éxito de los programas de inseminación artificial en bovinos depende en gran medida de la calidad del semen utilizado, la cual está determinada por los procesos aplicados desde la selección del animal hasta la refrigeración y crio preservación del semen. El manejo higiénico, el análisis seminal con tecnología como el sistema CASA, y el uso de aditivos antioxidantes como la glutamina, son aspectos clave para preservar la viabilidad espermática y asegurar resultados reproductivos satisfactorios.

Célula espermática

El espermatozoide es la célula especializada en transportar el material genético hasta el ovocito, su estructura altamente diferenciada se divide en tres regiones principales: cabeza, cuello, cola; la cabeza contiene el núcleo con el material genético compacto y el acrosoma, una vesícula que alberga enzimas necesarias para penetrar el ovocito. El cuello une la cabeza con la cola y contiene centriolos que ayudan en la formación del huso mitótico después de fertilizar. La

cola o flagelo es fundamental para la motilidad, está compuesta por un axonema con microtúbulos y rodeada por vainas fibrosas y mitocondrias que están en la pieza intermedia estas mitocondrias suministran la energía para el movimiento flagelar, que permite al espermatozoide desplazarse; la motilidad es regulada por señales bioquímicas y depende de la integridad estructural y funcional del flagelo, (Vicentin et al., 2022).

Antisepsia y colecta

La antisepsia del prepucio y el glande de los toros es una práctica esencial que se debe realizar antes de la colecta, esto reduce significativamente la contaminación bacteriana que puede comprometer la calidad seminal. Según Ávalos Rodríguez et al. (2018), la limpieza con solución yodada o salina mejora la calidad seminal al reducir la carga microbiana, los que es fundamental para obtener muestras limpias y aptas para la conservación y uso reproductivo.

Evaluación andrológica y análisis seminal

Una vez colectado el semen, se realiza una evaluación que incluye parámetros como: volumen, color, turbidez, olor, motilidad, morfología y concentración espermática. Estos datos permiten estimar la capacidad fecundante de los espermatozoides y detectar alteraciones estructurales o funcionales que puedan afectar la fertilidad. Agustinus & Cennikon Pakpahan. (2020), destacan que una evaluación precisa de estos parámetros, apoyada en tecnología CASA, es esencial para seleccionar muestras viables y eficientes para IA. Valverde Abarca & Madrigal Valverde. (2018), complementan que estas evaluaciones deben realizarse bajo condiciones estandarizadas para evitar alteraciones por temperatura o manipulación.

Sistema CASA y evaluación objetiva de la calidad seminal

La motilidad espermática es uno de los parámetros más importantes para evaluar la calidad del semen. Este parámetro está directamente relacionado con la capacidad que tiene el espermatozoide para fecundar y juega un papel fundamental en los programas de reproducción asistida. La tecnología CASA (Computer Assisted Sperm Analysis), ha revolucionado la evaluación seminal, permitiendo análisis precisos y cuantitativos mediante algoritmos informáticos y cámaras de alta resolución (Singh et al., 2021a).

El sistema CASA supera las limitaciones de los métodos tradicionales como la observación visual, ofreciendo resultados reproducibles y objetivos. A través de este sistema se analizan parámetros como: velocidad curvilínea (VCL), velocidad lineal (VSL), linealidad (LIN), amplitud lateral de la cabeza (ALH) y la frecuencia de batido de cola (BCF), que son cruciales para evaluar la capacidad de movimiento y la viabilidad del semen (Brito, 2025).

Dilución y rol de la glutamina en la preservación

Para conservar el semen, diluirlo en un medio que proteja a los espermatozoides contra los daños causados por el enfriamiento y la congelación. El diluyente comercial Optixcell-2®, que actúa como amortiguador osmótico y fuente de nutrientes, ha sido evaluado en combinación con antioxidantes. Salman et al. (2023), demostraron que extender el periodo de equilibrio hasta las 24 horas con Optixcell® no afecta la motilidad ni la integridad espermática post descongelación.

La glutamina es un aminoácido implicado en el metabolismo energético celular y precursor del glutatión, un potente antioxidante intracelular. Tuncer et al. (2011), evidenciaron que su adición en concentraciones de 5 a 20 mM (0.73 a 2.92gr/L), mejora la motilidad, la integridad de membranas y la función mitocondrial en el semen bovino. (Khelifaoui et al. (2005)

y Nuntapaitoon et al. (2024), trabajando en equinos y porcinos, demostraron que la glutamina ayuda a estabilizar las membranas celulares y mejora la motilidad post descongelación al actuar sobre el metabolismo mitocondrial.

Sin embargo, Sangeeta et al. (2015) y Tuncer et al. (2011), dicen que concentraciones superiores a 50 mM pueden generar efectos adversos, alterando el equilibrio osmótico y disminuyendo la motilidad, por lo que es necesaria la estandarización de la concentración óptima.

Estrés oxidativo y crio preservación

La congelación genera un aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), que dañan lípidos de membrana, proteínas estructurales y el estrés oxidativo son causas de la reducción de fertilidad del semen crio preservado (Sangeeta et al., 2015; Tuncer et al., 2011). Ibrahim. (2024), añade que a pesar de la existencia de protocolos modernos de crio preservación, los ROS continúan siendo una limitación para mantener una motilidad y viabilidad adecuadas post descongelación.

El uso de antioxidantes como la glutamina en los diluyentes busca contrarrestar estos efectos, mejorando la motilidad post descongelación y aumentando la tasa de recuperación de espermatozoides funcionales (Nuntapaitoon et al., 2024; Salman et al., 2023). Por ello, la investigación en esta área es fundamental para optimizar protocolos y extender la utilidad del semen bovino en programas reproductivos.

Mecanismos moleculares de la glutamina y antioxidación

La glutamina contribuye a la defensa antioxidante. A través de su papel como precursor en la síntesis del glutatión (GSH), un tripéptido esencial que neutraliza radicales libres y protege

lípidos, proteínas y ADN de daños oxidativos (Zhu et al., 2017). Además, ayuda a estabilizar la osmolaridad intracelular, lo que evita la ruptura de membranas durante los cambios térmicos en equilibrio y crio preservación (Tuncer et al., 2011).

Otros antioxidantes en la conservación del semen

Aunque la glutamina es uno de los aminoácidos más estudiados, también existen otros antioxidantes que se emplean en diluyentes como: la cisteína, vitaminas E y C, compuestos fenólicos e incluso plasma seminal. Barrientos-Morales et al. (2018), evidenciaron que la adición de plasma seminal en semen de verracos mejora la motilidad progresiva y protege la integridad espermática post descongelación. Además, la combinación de glutamina con LDL ha mostrado mejores resultados en motilidad y viabilidad que otros diluyentes tradicionales (Amirat-Briand et al., 2009; Bencharif et al., 2012).

Metabolismo energético y función mitocondrial

La glutamina también juega un papel importante en el metabolismo energético espermático, al aportar intermediarios para el ciclo de Krebs y favorecer la producción de ATP, esencial para la motilidad espermática (Souza et al., 2020). Su capacidad para proteger la función mitocondrial se asocia con una mayor motilidad y resistencia al estrés oxidativo en semen (Khelifaoui et al., 2005; Nuntapaitoon et al., 2024).

Evidencia clínica in vivo

Aunque la mayoría de los estudios sobre glutamina se han realizado en laboratorios con semen evaluado *in vitro*, hay indicios de que su uso en diluyentes mejora la fertilidad en campo, aumentando las tasas de preñez en toros reproductores (Salman et al., 2023). Sin embargo, se

requieren más investigaciones clínicas para confirmar estos efectos en poblaciones bovinas amplias y estandarizar su aplicación a nivel comercial.

Antecedentes

Ávalos Rodríguez et al. (2018), describieron detalladamente el procedimiento de colecta y manipulación *in vitro* de semen en bovinos. El protocolo incluyó antisepsia previa con soluciones yodadas, descartando la primera fracción del eyaculado para evitar contaminación. Se enfatizó la importancia del tiempo de procesamiento y el control de la temperatura.

Rupert P. Amann et al. (2010), en su manual definen los pasos esenciales para una evaluación andrológica completa, incluyendo examen físico, medición escrotal, comportamiento sexual, y análisis seminal detallado. Proveen criterios de referencia para motilidad, viabilidad y concentración espermática.

Román et al. (2014), describen las técnicas comunes de colecta como: vagina artificial y electro eyaculación. También resaltan la importancia de la higiene, el tipo de estímulo, la frecuencia de colectas y el transporte del eyaculado, para mantener la calidad seminal.

Tuncer et al. (2011), evaluaron la adición de glutamina a 20mM y azúcares al semen bovino crio preservado. Reportaron un aumento significativo de la motilidad total de 41.5% a 54.8%. además, observaron una disminución en la peroxidación lipídica y en el daño al ADN espermático, lo que indica un efecto antioxidante eficaz.

Amirat-Briand et al. (2009), investigaron el efecto de la glutamina en asociación con LDL (lipoproteínas de baja densidad), como crio protector en semen bovino. Encontraron una mejora significativa en la motilidad progresiva, la velocidad lineal recta (VSL) y una reducción en las anomalías de cabeza y cola espermática.

Zhu et al. (2017), aunque trabajaron con semen de conejo, demostraron que la glutamina protegía a los espermatozoides durante la crio preservación mediante la estimulación de la síntesis de glutatión, reduciendo el estrés oxidativo. Los autores sugieren que los mecanismos antioxidantes observados son extrapolables a otras especies, incluyendo bovinos.

Sariözkan et al. (2014), evaluaron la adición de diversos antioxidantes, incluyendo la glutamina, en el medio TCM-199 para semen bovino. Los resultados mostraron un aumento en la integridad del ADN, mayor motilidad post descongelación y mejores tasas de fecundación *in vitro*, lo cual se asocia con una menor peroxidación lipídica.

Salman et al. (2023), estudiaron el efecto de extender el periodo de equilibrio de semen bovino congelado con Optixcell® hasta las 24 horas. Determinaron que esta extensión no comprometió la calidad espermática post descongelación, permitiendo considerar la adición de antioxidantes como la glutamina sin riesgo de deterioro adicional.

Nuntapaitoon et al. (2024), en su estudio con verraco, demostraron que la suplementación de glutamina durante la conservación a 17°C permitió mantener la motilidad, integridad acrosomal y redujo los niveles de ROS. Aunque la especie es distinta, sugiere potenciales beneficios en bovino bajo condiciones similares de conservación a corto plazo.

Souza et al. (2020), demostraron que la adición de aminoácidos sintéticos, incluida la glutamina, mejoró la calidad del semen ovino tras la crio preservación. Se observaron aumentos en la motilidad e integridad de membrana; estos resultados respaldan el uso de aminoácidos como crio protectores efectivos.

Agustinus & Cennikon Pakpahan. (2020) y Singh et al. (2021), expusieron el uso y validación del sistema CASA para análisis de motilidad y parámetros cinemáticos espermáticos

en animales. El sistema permita evaluar: VCL, VSL, ALH, BCF, LIN, entre otros, con alta precisión y es especial mente útil en estudios de fertilidad asistida.

Ge et al. (2023), evaluaron el sistema automático GSA-810 para análisis de semen en especies ganaderas. El quipo mostró alta precisión en la evaluación de concentración, motilidad y morfología, facilitando diagnósticos más exactos en laboratorios de reproducción animal.

Capítulo III

Materiales y Métodos

Diseño experimental.

En este experimento se realizó un estudio longitudinal donde se evaluó las muestras de semen colectado de diferentes toros de las razas: Gyr, Girolando y Romosinuano, por medio de electro eyaculación, se realizaron tres experimento donde se hizo una evaluación macro y microscópica y luego se diluyeron con Optixcell-2®; se hizo un grupo control y un grupo experimental con glutamina a diferentes concentraciones, se mezcló con el vortex y se realizó la evaluación post dilución se llevaron a refrigeración 4°C y se evaluaron mediante el sistema CASA durante 5, 24, 48, 72 y 96 horas posteriores a la dilución.

Metodología.

Selección. En este trabajo se seleccionaron tres toros reproductores de alta calidad, propiedad de la Universidad de Pamplona. Los toros cuentan con un historial de semen apto para IA, libre de enfermedades reproductivas y en óptimas condiciones físicas, lo que garantiza la calidad del material seminal (Ávalos Rodríguez et al., 2018).

Los toros se mantienen en ambiente controlado, con dieta balanceada y manejo sanitario, reduciendo factores de estrés que puedan alterar la calidad seminal (Kumaresan & Srivastava, 2022).

Figura 1

Ejemplares seleccionados



Nota. Ejemplares seleccionados para el estudio con glutamina en semen fresco de bovino.

Fuente: Elaboración propia.

Proceso de colecta del semen

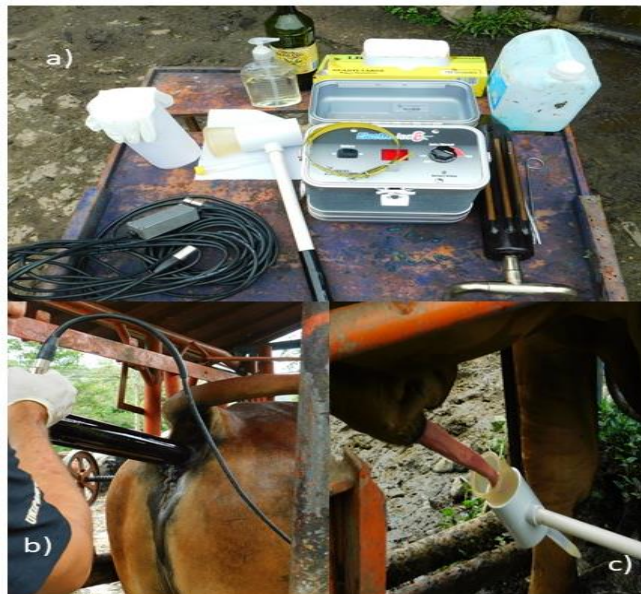
La colecta se realizó con electro eyaculador, cono colector, tubos colectores de 15 ml estériles para evitar contaminación. Para garantizar la seguridad del animal y del personal, el toro fue asegurado en un brete, donde se realizó el examen, (evaluación de testículos, epidídimo, cordones espermáticos y circunferencia escrotal), sin hallazgos de sensibilidad ni alteraciones.

Se hizo tricotomías del prepucio y lavado con jabón neutro, seguido de solución fisiológica para higiene intraprepucial con catéter y secado con toallas absorbentes. Posteriormente se realizó palpación rectal con guante de palpar y gel lubricante, para estimular las glándulas accesorias y así estimular la eyaculación; luego se introdujo la sonda lubricada con gel en el recto del toro y se orientó ligeramente hacia abajo, introduciéndolo completamente

donde el esfínter del ano asegure la base de la sonda, para luego inducir la eyaculación por medio de impulsos eléctricos (Ávalos Rodríguez et al., 2018).

Figura 2

Colecta por medio de electro eyaculación.



Nota. Proceso de colecta con electro eyaculador; a) equipo de electro eyaculador y los diferentes materiales necesarios; b) introducción de la sonda o bala vía rectal; c) colecta de semen con cono colector, funda siliconada y tubo colector. Fuente: Elaboración propia.

Evaluación macroscópica del semen

Una vez colectado el semen, se hizo una evaluación macroscópica para verificar sus características como: volumen, color, turbidez y apariencia general. Solo las muestras que cumplieron con los estándares de calidad establecidos por el (LABRUP) fueron utilizadas para análisis posteriores.

Evaluación andrológica

Las muestras fueron llevadas al laboratorio y atemperadas a 37°C en baño maría. Se evaluó la motilidad en masa colocando una gota de semen en portaobjetos y observando en microscopio a 10x, se clasificó de 0 a 5 según sus movimientos

Dilución del semen. El semen fue diluido 1:1 con Optixcell-2®, y con temperatura a 37°C en el baño maría para conservar la calidad espermática. Este diluyente ha demostrado efectividad en mantener la motilidad durante la refrigeración (Brito, 2025; Salman et al., 2023).

Análisis morfológico. Se llevó a cabo un análisis microscópico para determinar la morfología espermática, evaluando el porcentaje de espermatozoides normales y anormales. Este análisis es fundamental para garantizar que las muestras de semen sean adecuadas para IA y cumplan con los criterios de calidad necesarios.

Motilidad espermática. La motilidad se evaluó mediante el sistema CASA, que proporciona un análisis detallado y objetivo de la cinética espermática (Singh et al., 2021a), donde se puso una gota de la muestra en porta objetos y cubreobjetos. Los parámetros evaluados por el sistema CASA fueron:

Motilidad progresiva (PROG %). Representa el porcentaje de espermatozoides que se mueven en una dirección progresiva, es decir, hacia adelante en lugar de moverse en círculos o de forma errática. Es uno de los parámetros más relevantes para la fertilización, ya que los espermatozoides con alta motilidad progresiva tienen una mayor probabilidad de llegar al ovulo.

Circularidad (CIRC %). Mide cuán circular es la trayectoria del espermatozoide, comparando su forma con una circunferencia ideal. Si los valores de circularidad están bajos indican movimientos más rectos y eficientes, mientras que valores altos sugieren movimientos erráticos o en círculos.

Motilidad promedio ($MP \mu\text{m/s}$). Se refiere a la velocidad promedio de todos los espermatozoides en la muestra. Útil para obtener una visión general de la motilidad en una muestra de semen, sin entrar en detalles sobre los movimientos específicos de cada espermatozoide.

Velocidad curvilínea ($VCL \mu\text{m/s}$). Mide la velocidad a lo largo de la trayectoria curvilínea del espermatozoide y es un indicador general de la velocidad del espermatozoide, pero no diferencia entre un movimiento eficiente y uno errático.

Velocidad rectilínea media ($VSL \mu\text{m/s}$). Mide la velocidad a lo largo de la línea recta entre el punto de inicio y el punto final de la trayectoria del espermatozoide, este parámetro refleja cuán directo y eficiente es el movimiento del espermatozoide.

Velocidad promedio de la trayectoria ($VAP \mu\text{m/s}$). Mide la velocidad media del espermatozoide y proporciona una visión general de la velocidad, pero no refleja la eficiencia del movimiento.

Distancia de la velocidad lineal ($DSL \mu\text{m/s}$). Mide la consistencia de la velocidad de los espermatozoides en la dirección de su movimiento, esto ayuda a identificar si los espermatozoides se mueven de manera uniforme.

Distancia del ángulo de curvatura (DCL°). Este parámetro mide la variabilidad del ángulo de curvatura de los espermatozoides mientras se desplazan en la muestra. Si las muestras presentan una DCL elevada, los espermatozoides no tienen una motilidad adecuada.

Distancia de la amplitud de la cabeza ($DAP \mu\text{m}$). Este mide la variabilidad del movimiento de la cabeza de espermatozoide. Si el DAP es muy alto indican un movimiento poco eficiente, poca motilidad.

Amplitud de lateralidad del movimiento (ALH μm). Mide la amplitud de las oscilaciones laterales de la cabeza de espermatozoide mientras se mueve; un valor bajo indica un movimiento más eficiente y rectilíneo, mientras que valores altos reflejan movimientos ineficientes.

Frecuencia de batido de cola (BCF Hz). Es la frecuencia con la que se mueve la cola del espermatozoide durante el nado. Ayuda a identificar espermatozoides que tienen una buena motilidad en su cola, lo cual es importante para la movilidad general del espermatozoide.

Porcentaje de alta motilidad (HAC %). Muestra el porcentaje de espermatozoides que tienen una motilidad de alta calidad. Es indicador para evaluar la capacidad de desplazamiento con rapidez y eficiencia hacia el ovulo.

Linealidad (LIN %). Es la relación entre la VSL y la VCL, proporcionando una medida de lo recto o no recto es el movimiento del espermatozoide, valores más altos indican movimiento eficiente y directo, mientras que valores bajos sugieren movimientos erráticos.

Tiempo en línea recta (STR %). Mide lo recta que fue la trayectoria del espermatozoide. Un valor alto de SRT señala que el espermatozoide sigue un trayecto recto, y es viable para fertilización.

Preparación de muestras y adición de Glutamina

Grupo control. El grupo control fue tratado con el diluyente Optixcell-2®, sin adición de glutamina. Los grupos controles se evaluaron post dilución y se llevaron a refrigeración a 4°C en nevera.

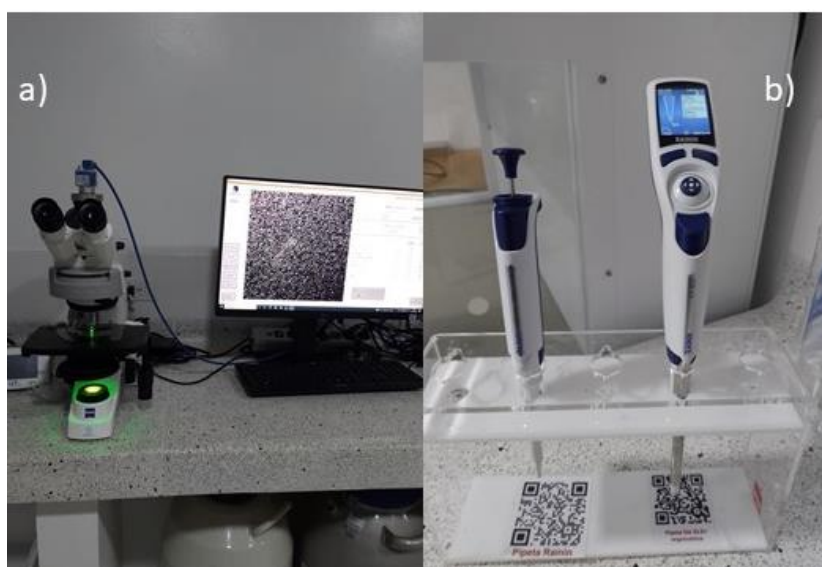
Adición de glutamina. En el grupo experimental, se evaluaron diferentes concentraciones de glutamina, aunque se realizaron pruebas desde 1gr de glutamina/5ml de semen diluido, no fue sino hasta las concentraciones de 0.01, 0.005 y 0.0025gr/ml, donde se

observaron buenos resultados luego se agito con el vortex para homogenizar la glutamina y el semen, esperando observar cambios en la motilidad y viabilidad.

Todas las muestras se evaluaron posterior a la dilución y luego se llevaron a refrigeración a 4°C, evaluándose a las 5, 24, 48, 72 y 96 horas posteriores. Las muestras fueron analizadas en el sistema CASA, tras atemperarlas a 37°C durante 30 segundos, se evaluaron 4 campos aleatoriamente conforme a las recomendaciones del fabricante.

Figura 3

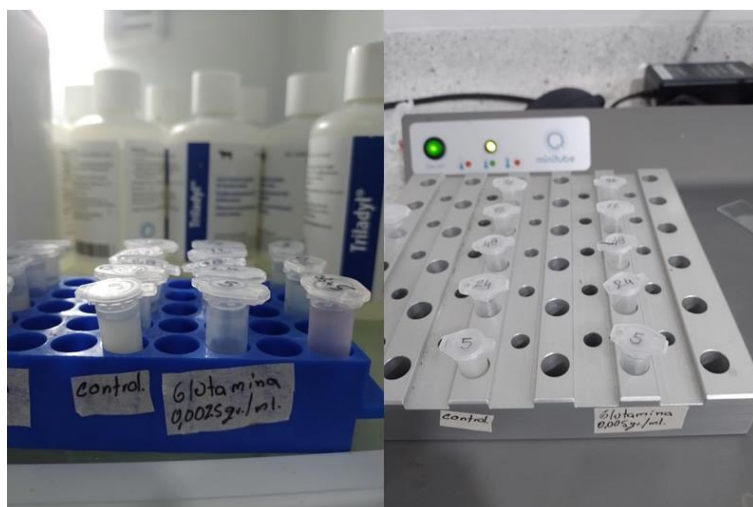
Asistente computarizado para análisis de semen (CASA).



Nota. Sistema CASA empleado en la evaluación de muestras con y sin glutamina; a) equipos del sistema CASA; b) micropipeta digital y micropipeta manual del equipo CASA. Fuente: Elaboración propia.

Figura 4

Preparación de muestras



Nota. Muestras con glutamina a diferentes concentraciones y grupo control para ser evaluados.

Fuente: Elaboración propia.

Capítulo IV

Resultados

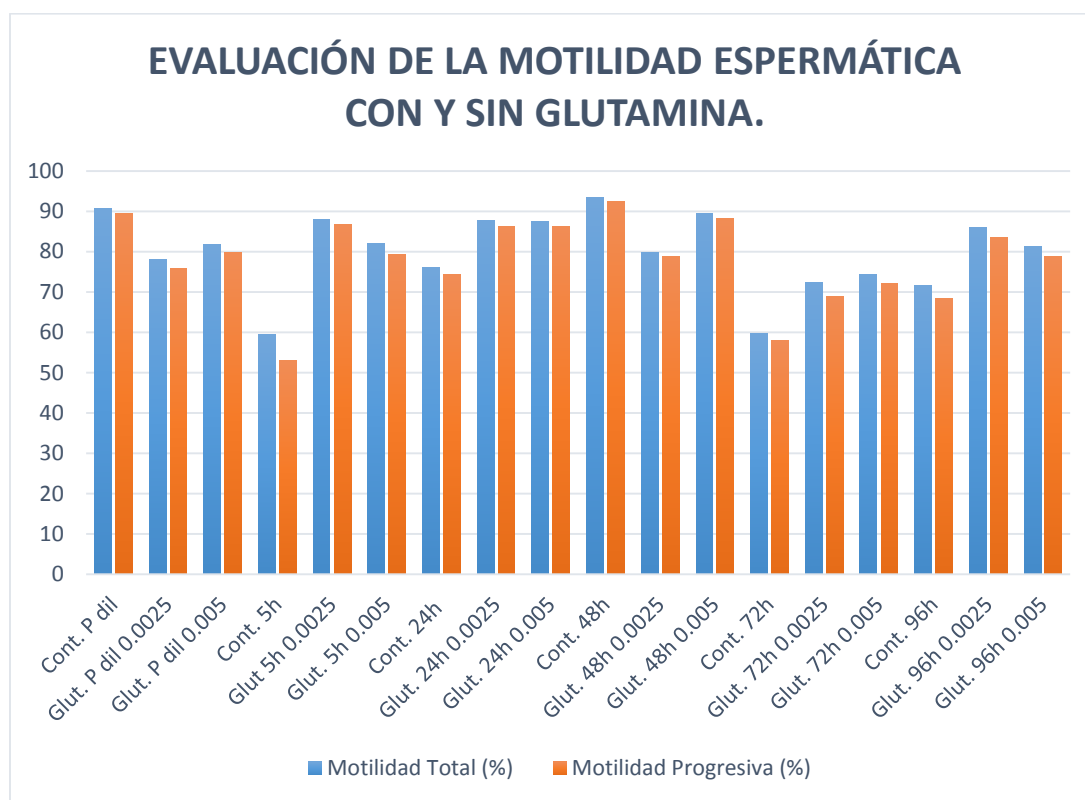
Se realizaron cuatro experimentos donde se adicionó glutamina en diferentes concentraciones: 0.0025 gr/ml, 0.005gr/ml, 0.01gr/ml, y se utilizó un grupo control sin glutamina, se llevó a refrigeración a 4°C y luego se evaluaron los parámetros de motilidad y movilidad espermática a las 5, 24, 48, 72 y 96 horas postdilución mediante el sistema (CASA).

Experimento 1

Motilidad total. En este experimento el grupo control mostró una buena motilidad total post dilución (90.72%), hasta las 48 horas y luego disminuyó notablemente hasta (71.58%) a las 96 horas. Por otro lado la glutamina a 0.0025 gr/ml tuvo una motilidad total estable durante las 5 horas (87.91%) a 96 horas (86.11%), mientras que el grupo con glutamina a 0.005 gr/ml inició con (81.82%) a las 0 horas y finalizó con (81.33%) de la motilidad total.

Motilidad progresiva. En el grupo control se observó una motilidad progresiva inicial de (89.34%) y finalizó con (68.36%), mientras el grupo con glutamina a 0.0025 gr/ml se observó con (75.98%) y finalizó con un (83.66%). El grupo con glutamina a 0.005 gr/ml se evidenció una motilidad progresiva inicial de (79.88%) a las 0 horas y finalizó con (78.74%), lo cual demuestra que la adición de glutamina favorece la motilidad espermática tal como lo evidenciaron (Ibrahim, 2024).

Motilidad rápida. Este parámetro es clave para el éxito de la fecundación y también se observó su disminución en el grupo control de (56.14%) a las 0 horas y (36.71%) a las 96 horas, de manera distinta la glutamina al 0.0025 (inicio con 41.76%) a las 0 horas y mostró una mejoría a las 48 y 96 horas (55.08%); mientras el grupo con glutamina a 0.005 gr/ml se comportó de manera más estable desde la hora 0 (44.57%) y las 96 horas (47.75%).

Figura 5*Evaluación de la motilidad espermática*

Nota. Evaluación de la motilidad total, motilidad progresiva e inmotilidad del grupo control y los grupos experimentales con glutamina a 0.0025gr/ml y 0.005 gr/ml durante las evaluaciones

Fuente: Elaboración propia.

Parámetros cinemáticos y de movilidad. los parametros de velocidad espermatica también demostraron un efecto benefico de la glutamina, mientras la VCL en el grupo control bajo de (145.17 μ m/s) en las 0 horas a (114.45 μ m/s) en las 96 horas, y la VSL de (64.16 μ m/s) a (52.37 μ m/s). Los grupos con glutamina a 0.0025 y 0.005gr/ml mostraron buenos resultados el mas favorable fue la glutamina a 0.005mg/ml ya que mostro un VCL de (183.4 μ m/s) a la hora 0 y finalizó con (129.67 μ m/s) alas 96 horas; y una VSL de (78.01 μ m/s) a (59.9 μ m/s) durante las 96 horas.

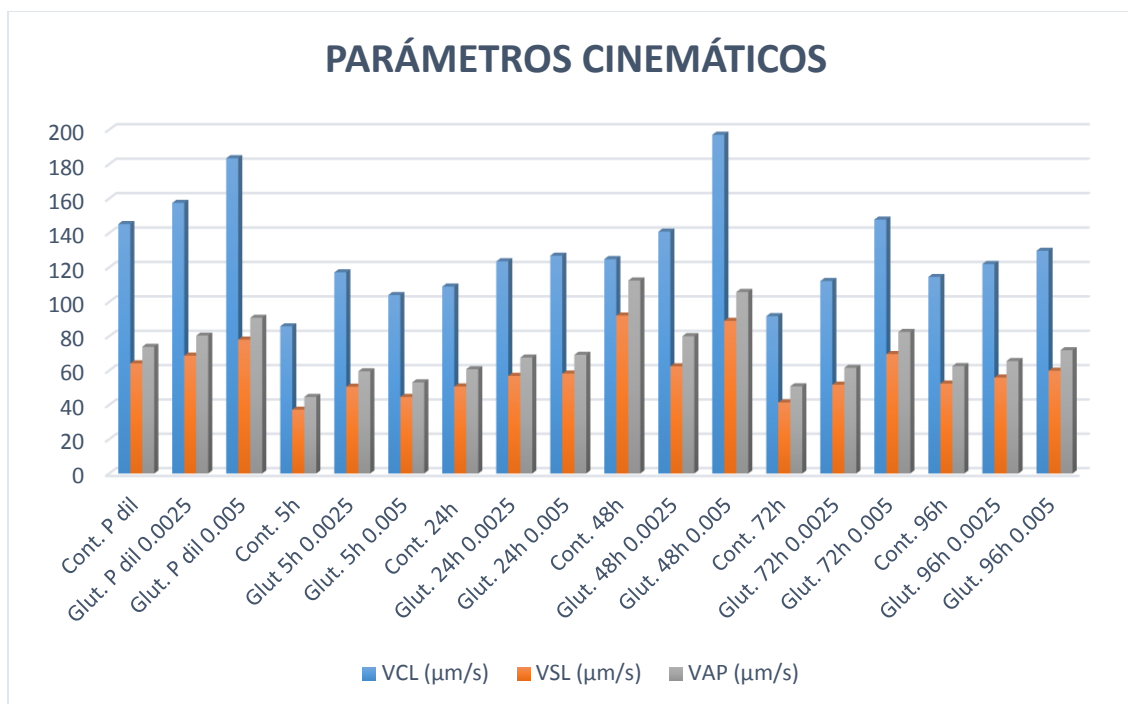
El análisis de ALH arrojó que el grupo con adición de glutamina a 0.005 mg/ml tuvo los valores mas altos, (1.71 μ m) en la hora 0 y (1.22 μ m) en las 96 horas, mientras el grupo control durante las primeras horas estuvo estable (1.37 μ m) en la hora 0, tuvo una disminución significativa a las 96 horas (1.08).

Con respecto al BCF, la glutamina a 0.005 mg/ml también fue la que mejor se comportó iniciando con (10.41Hz) y (8.91Hz), en comparación con el control que inicio con (9.47Hz) y finalizó con (8.11Hz).

Los valores de WOB, LIN y STR se mantuvieron mas estables con los grupos de glutamina en especial el grupo con adición de glutamina a 0.005mg/ml mostró mejoras en el STR y LIN. Estos valores son importantes para una navegación del espermatozoide mas efectiva hacia el oocito, confirmando lo demostrado por (Singh et al., 2021).

Figura 6

Evaluación de parámetros cinemáticos y de movilidad.



Nota: valores de las diferentes velocidades espermáticas evaluadas durante 96 horas mediante el sistema CASA. Fuente: Elaboración propia.

Experimento 2

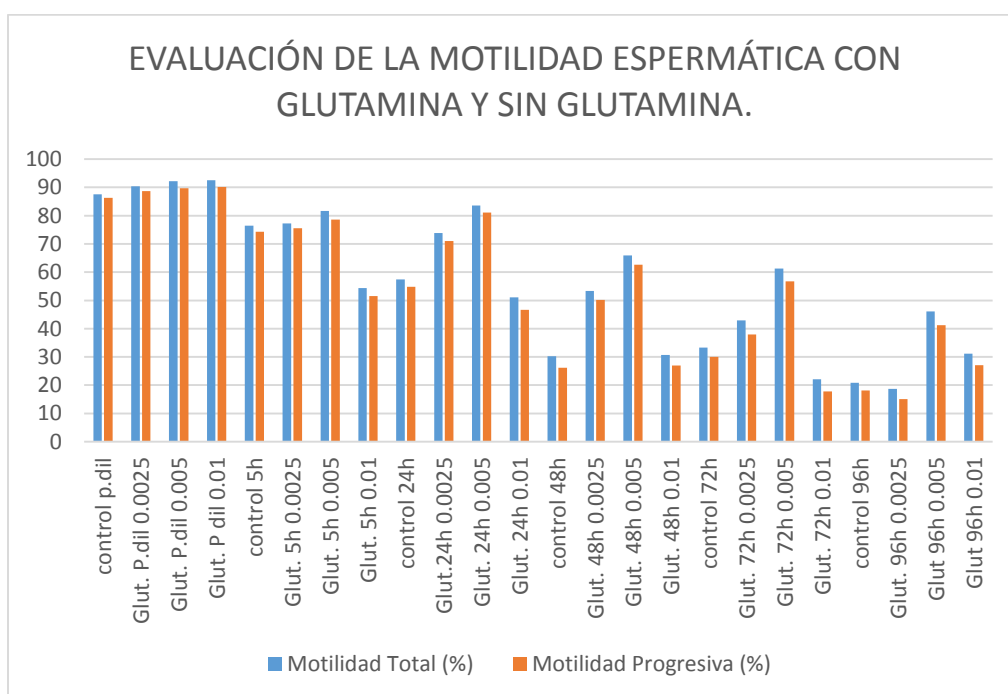
Motilidad total. En este el grupo control indico una motilidad total inicial de (87.52%) a las 0 horas, con un descenso notorio hasta (20.79%) a las 96h, en contraste el grupo con glutamina a 0.0025gr/ml mantuvo de (77.3%) desde las 5 horas hasta (73.83%) a las 24 horas y luego disminuyo a (18.72%) a las 96 horas; mientras la glutamina a 0.005 mg/ml evidenció una capacidad superior de preservación desde un (92.18%) en la hora 0 hasta (46.09%) a las 96 horas, marcando diferencia ante el grupo control. El grupo con adición de glutamina a 0.01 gr/ml mostró una disminución un poco más lenta que el grupo control, pero aun así fue menos efectiva que la glutamina a 0.005 iniciando en (32.6%) a las 0 horas y finalizando con (31.1%) a las 96 horas.

Motilidad progresiva. De forma similar la motilidad progresiva mantuvo una superioridad en la preservación del semen en los grupos con adición de glutamina, el grupo control disminuyó de (86.37%) a las 0 horas a solo (18.15%) a las 96 horas, la glutamina a 0.0025 fue efectiva, pero solo hasta las 24 horas (71.02%) y luego descendió hasta (15.09%) a las 96 horas. En cuanto a la glutamina a 0.005 gr/ml inicio a las 0 horas con (89.68%) y disminuyó de forma lenta hasta (41.17%) a las 96 horas; el grupo con glutamina a 0.01gr/ml mostró una buena respuesta inicial (90.15%) pero luego bajo hasta (27.1%).

Motilidad rápida. El grupo control disminuyó de (50.81%) a (4.54%) a las 96 horas, mientras tanto la glutamina a 0.005 fue la que mostró mayor efectividad manteniendo aún el (16.29%) a las 96 horas. La glutamina a 0.01gr/ml también evidenció una mejor motilidad rápida en comparación al grupo control ya que mantuvo (9.19%) a las 96 horas.

Figura 7

Evaluación de la motilidad espermática.



Nota. Evaluación de la motilidad total, progresiva, en el grupo control y el grupo experimental con glutamina a 0.0025, 0.005 y 0.01gr/ml durante 96 horas. Fuente: Elaboración propia.

Parámetros cinemáticos y de movilidad. El VCL fue superior con la glutamina en las diferentes concentraciones, la glutamina a 0.005 fue la que mejores resultados obtuvo ya que inicio con (127.28 μ m/s) y termino (64.15 μ m/s), frente al control que obtuvo (131.8 μ m/s) y (30.33 μ m/s) durante las 96 horas. La glutamina a 0.01gr/ml también arrojó resultados positivos ya que la VCL final también estuvo por encima del control (42.65 μ m/s).

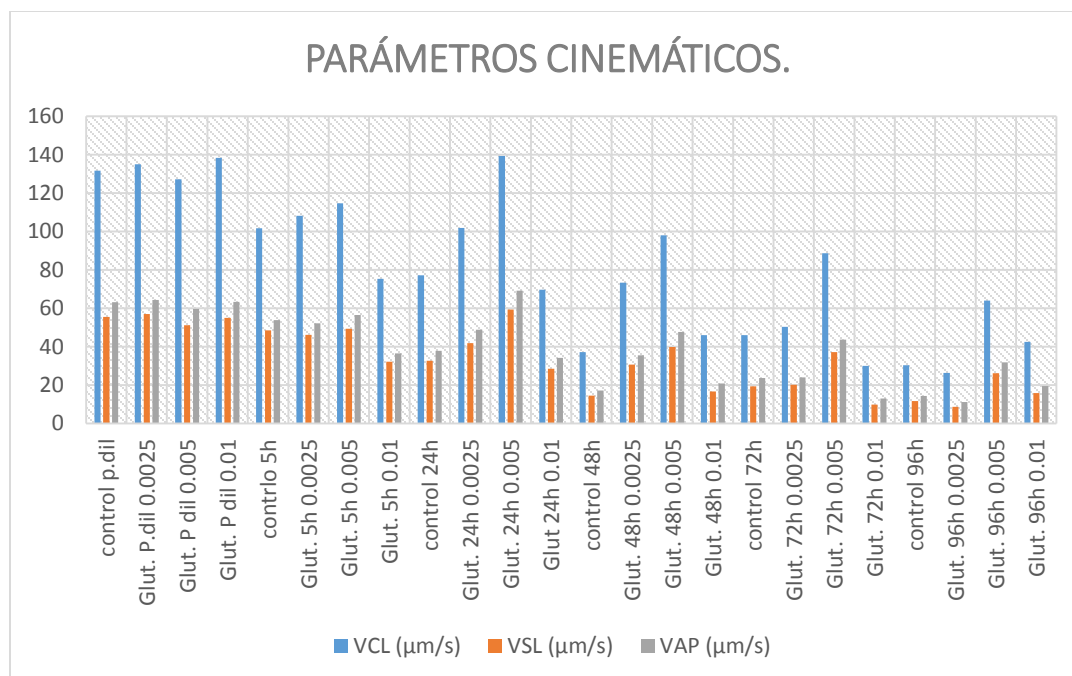
La VSL se comportó de manera similar en el grupo con glutamina a 0.01 y 0.005gr/ml ya que se registraron valores finales por encima de los obtenidos del grupo control. sin embargo, los mejores fueron con la glutamina a 0.005 que en la hora cero obtuvo (51.2 μ m/s), mientras el control mostró (55.63) y finalizaron con (26.32 μ m/s y 11.81 μ m/s) respectivamente.

La ALH y el BCF que reflejan la preservación de la energía cinética mostraron que el grupo con glutamina a 0.005gr/ml fue el que mejor desempeño tuvo con una ALH de (1.21 μ m a 0.68 μ m) frente al control que evidencio (1.22 μ m a 0.38 μ m) durante las 96 horas de evaluación. Y un BCF de (11.42Hz a 8.03Hz) para la glutamina a 0.005 y (13.01Hz a 6.44Hz) en el control durante las 96 horas.

El WOB, LIN y STR mantuvieron una estabilidad inicial pero la glutamina a 0.005gr/ml frente al grupo control, mostro una mejor trayectoria de estos parámetros durante las 96 horas evaluadas.

Figura 8.

Evaluación de parámetros cinemáticos y de movilidad.



Nota. Valores de las diferentes velocidades espermáticas evaluadas durante 96 horas mediante el sistema CASA. Fuente: Elaboración propia.

Experimento 3

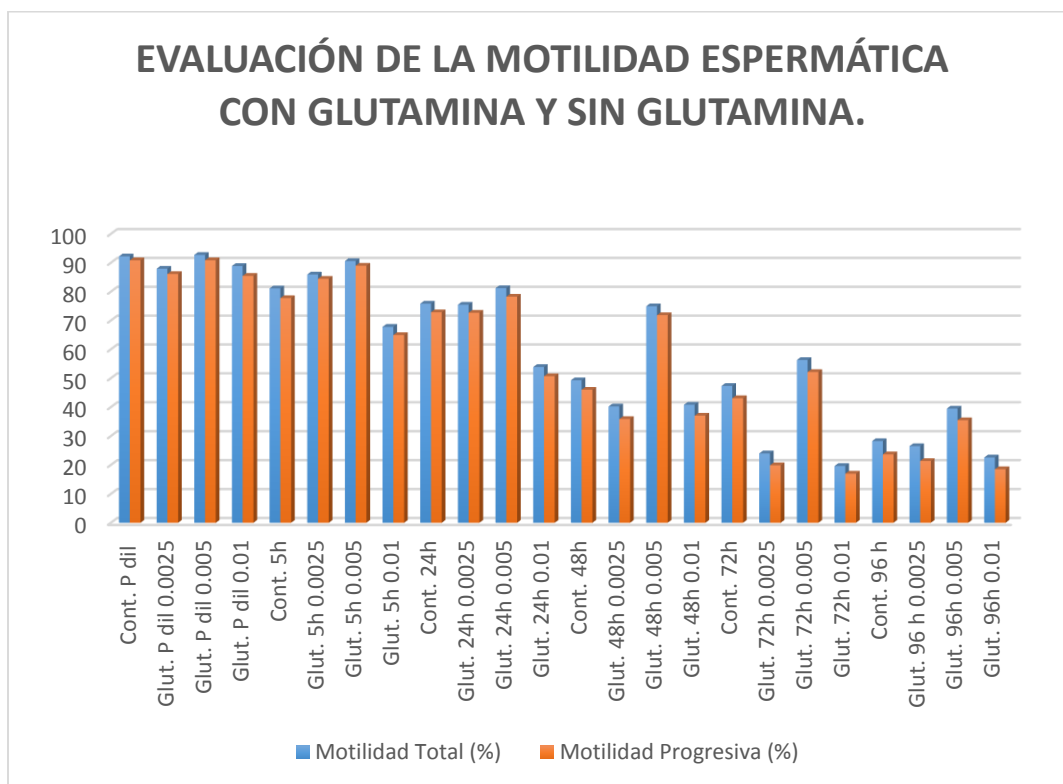
Motilidad total. En el grupo control está disminuyendo desde un valor de (92.23%) post dilución hasta (28.25%) en la hora 96, en contraste el grupo con adición de glutamina fue el que presentó una mayor motilidad total durante el experimento iniciando con (92.72%) y terminando con (39.48%), los grupos con glutamina a 0.0025 y 0.01gr/ml, aunque mostraron una respuesta favorable en las primeras horas, al final del experimento no superaron los resultados del control.

Motilidad progresiva. Aunque todos los grupos tienden a la baja la glutamina a 0.005gr/ml, logra superar los resultados del control con (90.86% a 35.45%) para la glutamina y (90.86% a 23.66%) para el control. La glutamina a 0.0025 y 0.01gr/ml, se comportaron de manera similar al grupo control siendo el grupo con glutamina a 0.01gr/ml el que evidenció resultados más bajos.

Motilidad rápida. el grupo control descendió desde (62.03%) a la hora cero a (5.69%) a las 96 horas. La glutamina a 0.005gr/ml conservó valores más altos durante el experimento iniciando en (61.3%) y finalizando con (13.2%).

Figura 9

Evaluación de la motilidad espermática.



Nota. Evaluación de la motilidad total, progresiva, en el grupo control y el grupo experimental con glutamina a 0.0025, 0.005 y 0.01gr/ml durante 96 horas. Fuente: Elaboración propia.

Parámetros cinemáticos y de movilidad. La VCL en el grupo control presento una reducción desde (169.75 μ m/s) hasta (38.73 μ m/s) durante las 96 horas, mientras que el grupo experimental con glutamina a 0.005gr/ml mantuvo valores más altos iniciando en (158.48 μ m/s) y terminando en (55.67 μ m/s). La VSL se registró más alta en el grupo con glutamina a

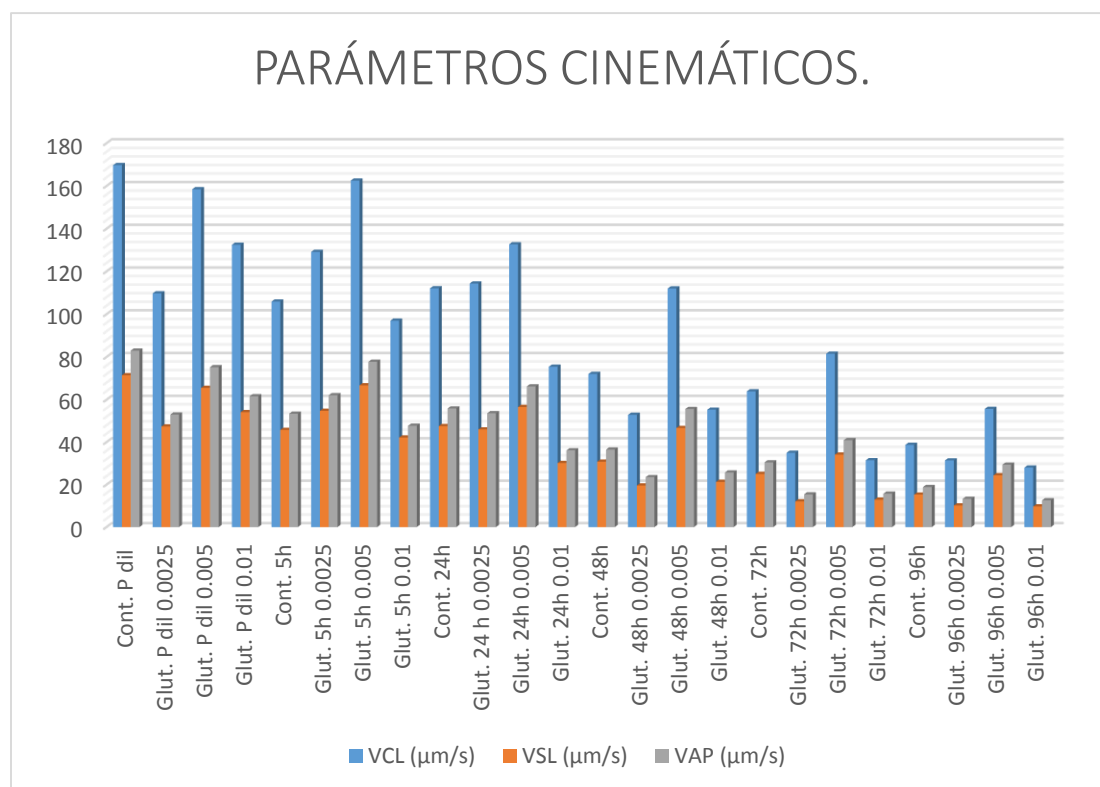
0.005gr/ml en la cual se observó un inicio de (65.53 μ m/s) y un final de (24.39 μ m/s), y con un grupo control que obtuvo (71.42 μ m/s) al inicio y (15.3 μ m/s) al final del experimento; los grupos con glutamina a 0.0025 y 0.01gr/ml registraron valores inferiores al control.

Respecto a la ALH y la BCF ambos fueron más favorables en el grupo con adición de glutamina a 0.005gr/ml, observándose en (10.09Hz) en las 0 horas y (8.84Hz) en las 96 horas.

El WOB, LIN y STR que son indicadores de movimiento total y dirigido, también se mostraron mejores resultados en el grupo con glutamina a 0.005gr/ml, el cual mantuvo valores más altos y estables durante el experimento.

Figura 10

Parámetros cinemáticos y de movilidad espermática.



Nota. Valores de las diferentes velocidades espermáticas evaluadas durante 96 horas mediante el sistema CASA. Fuente: Elaboración propia.

Discusión

La presente investigación permitió evidenciar el efecto benéfico de la glutamina sobre la motilidad y viabilidad espermática del semen bovino refrigerado a 4°C, al comparar los diferentes grupos con adición de glutamina fue evidente que la glutamina a 0.005 gr/ml mostró mejores resultados, más consistentes y favorables durante el proceso de 0 a 96 horas.

En el grupo control, se observó una motilidad total y progresiva estable durante las primeras 24 horas y luego disminuyó drásticamente durante las siguientes horas, se esperaban estos datos ya que el almacenamiento en frío induce alteraciones en la membrana plasmática, disminuye la producción de ATP y aumenta el estrés oxidativo, como lo demostraron (Nuntapaitoon et al., 2024).

Los grupos con adición de glutamina 0.0025, 0.005 y 0.01 gr/ml evidenciaron una motilidad total y progresiva mejores que el grupo control, sin embargo, fue la glutamina a 0.005 gr/ml la que mejor respuesta tuvo, estos resultados son similares a los reportados por Bencharif et al. (2012) y Brito, (2025), quienes demostraron que la glutamina es un potente aminoácido antioxidante, capaz de proteger los espermatozoides del daño inducido por ROS y estabiliza sus estructuras celulares en la refrigeración a 4°C. Este hallazgo también coincide con lo descrito por Tuncer et al. (2011) y Zhu et al. (2017), quienes demostraron que la glutamina en el semen de conejos y bovinos mejoró la motilidad espermática y la integridad de las membranas al disminuir el daño oxidativo durante la criopreservación.

De forma similar, Khelifaoui et al. (2005) y Nuntapaitoon et al. (2024), afirmaron que en equinos y porcinos la glutamina estabiliza las membranas celulares durante el estrés térmico, manteniendo la motilidad espermática. En este estudio se demostró que la glutamina a una concentración de 0.005mg/ml obtuvo una motilidad progresiva rápida mayor en comparación con el grupo control.

Además, Bencharif et al. (2012) y Tuncer et al. (2011), señalan que las concentraciones correctas de glutamina optimizan el balance redox celular sin generar desequilibrios osmóticos ni afectar el metabolismo espermático, reflejándose así en una mejor cinética espermática; lo cual coincide con este estudio donde se evidenció que los valores de los parámetros cinemáticos siempre fueron más altos con la glutamina a 0.005gr/ml en comparación con el control.

Amirat-Briand et al. (2009) y Qualidade Seminal De. (2017), observaron que dosis muy bajas de aminoácidos antioxidantes pueden ser ineficaces al no mitigar el daño mitocondrial progresivo, especialmente en condiciones de almacenamiento extendido. De manera parecida se evidenció en el estudio donde la glutamina a 0.0025gr/ml, mostró un efecto protector en las etapas iniciales, no resultó eficiente para mantener una buena cinética espermática con el paso del tiempo.

El grupo con adición de glutamina a 0.01gr/ml, dejó ver un efecto no eficiente a partir de las 24 horas, con una disminución progresiva en la motilidad total y los parámetros cinemáticos; lo cual respalda la hipótesis de Qualidade Seminal De. (2017) y Sangeeta et al. (2015), que concentraciones elevadas de glutamina alteran el equilibrio osmótico intracelular y provocan efectos citotóxicos o inhibitorios sobre el metabolismo espermático. Algo similar reportaron Nuntapaitoon et al. (2024) y Tuncer et al. (2011), donde describen que los aminoácidos en exceso pueden inducir daños en la membrana y reducir el ciclo mitocondrial. Esto explica por

qué la glutamina a 0.01mg/ml tuvo una disminución rápida de VCL, VSL y motilidad progresiva.

En cuanto al análisis espermático, el uso del análisis convencional se caracteriza por ser subjetivo y con alta variabilidad y porcentaje de error, el sistema CASA por el contrario proporciona resultados rápidos y confiables mediante algoritmos de reconocimiento digital de imagen, y evalúan parámetros como: motilidad total, motilidad progresiva y rápida, VCL, VSL WOB, LIN entre otros (Brito, 2025; Singh et al., 2021). En este estudio el uso del sistema CASA permitió establecer diferencias estadísticamente notorias entre los grupos experimentales con glutamina y el grupo control, evidenciando que los grupos con adición de glutamina a 0.005mg/ml presentaron valores más altos y sostenidos en parámetros como VCL, VSL, motilidad progresiva y rápida durante las 96 horas experimentales. Esto reafirma hallazgos como el de Tuncer et al. (2011), donde destacaron la utilidad del sistema CASA para evaluar los efectos antioxidantes de aminoácidos como la glutamina sobre la cinética espermática.

Nuntapaitoon et al. (2024) y Topraggaleh et al. (2014), mencionaron que el uso del sistema CASA no solo mide el impacto de los aditivos anti oxidantes, sino que también optimiza los protocolos de dilución y almacenamiento al identificar el punto inflexión en la pérdida de motilidad espermática. En este estudio se observó como la glutamina a 0.005gr/ml mantuvo una motilidad progresiva superior al 78% incluso a las 96 horas.

Estudios realizados por Bencharif et al. (2012) y Salama et al. (2024), donde la evaluación de otros parámetros cinemáticos como WOB, LIN y STR, que están directamente relacionados con el desplazamiento y capacidad fecundante de los espermatozoides, fue posible únicamente mediante la tecnología del sistema CASA. Igualmente, en este estudio esta tecnología permitió el

seguimiento a estos parámetros demostrando la calidad y direccionalidad del movimiento espermático.

La buena conservación del semen, así como la supervivencia con el uso de antioxidantes como la glutamina, depende en gran parte de la selección del animal donador y la técnica de coleta utilizada (Bucak et al., 2010; Gloria et al., 2013). En este estudio de seleccionaron tres toros de alta calidad genética, siguiendo lo planteado Ávalos Rodríguez et al. (2018) y Kumaresan & Srivastava. (2022), donde sugieren que debe contar con animales clínicamente sanos, buena salud testicular y en buenas condiciones nutricionales, ya que estos presentan una espermatogénesis más eficiente, lo que se traduce en eyaculados de mayor volumen, concentración, motilidad y viabilidad espermática.

En este estudio se utilizó la técnica de electro eyaculación, ya que ha demostrado ser una técnica confiable y que permite seguir un protocolo estricto de higiene. Conforme lo dicho por Ávalos Rodríguez et al., (2018); Rupert P. Amann et al., (2010), que el uso de esta técnica y con una alta higiene permite obtener muestras con bajo nivel de contaminación, lo cual reduce la generación de ROS y afectar la integridad espermática.

Capítulo V

Conclusiones

La selección adecuada de los animales, el manejo higiénico y la técnica de electro eyaculación fueron fundamentales para obtener muestras seminales de calidad, condiciones necesarias para evaluar objetivamente el efecto de la glutamina como aditivo.

El uso del sistema CASA facilitó realizar una evaluación objetiva y precisa de los parámetros de motilidad y cinemáticos como VCL, VSL, VAP entre otros, esta herramienta fue necesaria para detectar cambios en la calidad espermática y así mismo confirmar el buen comportamiento de los grupos con glutamina a 0.005gr/ml.

La adición de glutamina al semen bovino refrigerado a 4°C tuvo efecto benéfico sobre la motilidad y la cinética espermática, especialmente en los grupos con glutamina a 0.005gr/ml, que dejó ver una mayor capacidad de preservación de las diferentes motilidades hasta las 96 horas, lo cual reafirma lo dicho por Bucak et al. (2010) y Funahashi & Sano. (2005), quienes demostraron que la glutamina mejora la integridad de la membrana, la función mitocondrial y la viabilidad post conservación.

Este estudio demostró que la glutamina en dosis adecuadas puede ser eficaz para la mejora y conservación del semen bovino en refrigeración a 4°C, favoreciendo parámetros cinemáticos claves para la fertilización, estos hallazgos tienen implicaciones tanto educativas como de extensión ya que estos favorecen los programas de inseminación artificial, en las zonas rurales donde no se cuenta con los materiales necesarios para obtener una pajilla crio preservada.

Recomendaciones

Mantener un protocolo de higiene y antisepsia antes y durante la colecta, el cual incluye tricotomía, lavado y desinfección del prepucio con el fin de disminuir la carga microbiana lo cual mejora la calidad y preservación del semen en refrigeración.

Estandarizar un protocolo de conservación donde se utilice la glutamina a 0.005gr/ml, ya que mostro un resultado positivo en la preservación de la motilidad y cinética espermática. También se sugiere realizar estudios donde se pueda comprobar el efecto benéfico de la glutamina junto con un diluyente diferente al Optixcell-2®.

Realizar investigaciones en campo evaluando la eficiencia de la glutamina en el semen bovino, observándose en las tasas de preñez, para saber si es igual de efectiva que en los estudios de preservación en refrigeración a 4°C y crio preservación a -196°C.

Referencias

- Agustinus, & Cennikon Pakpahan. (2020). Computer Assisted Sperm Analysis: A Review. *Indonesian Andrology and Biomedical Journal*, 1(2), 60–66.
<https://doi.org/10.20473/IABJ.V1I2.35>
- Amirat-Briand, L., Bencharif, D., Vera-Munoz, O., Bel Hadj Ali, H., Destrumelle, S., Desherces, S., Schmidt, E., Anton, M., & Tainturier, D. (2009). Effect of glutamine on post-thaw motility of bull spermatozoa after association with LDL (low density lipoproteins) extender: Preliminary results. *Theriogenology*, 71(8), 1209–1214.
<https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2008.10.002>
- Ávalos Rodríguez, A., González Santos, J. A., Vargas Ibarra, A. K., & Herrera Barragán, J. A. (2018). recoleccion_manipulacion. *UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA*.
- Barrientos-Morales, M., Barrientos-Villeda, M., Domínguez-Mancera, B., Pinos-Rodríguez, J. M., & Juárez-Mosqueda, M. L. (2018). Effects of supplemental seminal plasma on cryopreserved boar sperm quality. *South African Journal of Animal Science*, 48(1), 67–70. <https://doi.org/10.4314/SAJAS.V48I1.8>
- Bencharif, D., Amirat-Briand, L., Garand, A., Anton, M., Schmitt, E., Desherces, S., Delhomme, G., Langlois, M. L., Barrière, P., Destrumelle, S., Vera-Munoz, O., & Tainturier, D. (2012). The advantages of using a combination of LDL and glutamine in comparison with TRIS egg yolk and Equex® STAMP extenders in the cryopreservation of canine semen. *Research in Veterinary Science*, 93(1), 440–447.
<https://doi.org/10.1016/J.RVSC.2011.06.027>

- Brito, L. F. C. (2025). Sperm Motility Evaluation in Stallion Fresh, Cooled and Frozen Semen Using a Portable Computer-Assisted Sperm Analysis System. *Reproduction in Domestic Animals*, 60(3), e70052.
<https://doi.org/10.1111/RDA.70052>;WGROU:STRING:PUBLICATION
- Bucak, M. N., Tuncer, P. B., Sariözkan, S., Başpınar, N., Taşpınar, M., Çoyan, K., Bilgili, A., Akalin, P. P., Büyükleblebici, S., Aydos, S., Ilgaz, S., Sunguroğlu, A., & Öztuna, D. (2010). Effects of antioxidants on post-thawed bovine sperm and oxidative stress parameters: Antioxidants protect DNA integrity against cryodamage. *Cryobiology*, 61(3), 248–253. <https://doi.org/10.1016/J.CRYOBIOL.2010.09.001>
- Funahashi, H., & Sano, T. (2005). Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10°C. *Theriogenology*, 63(6), 1605–1616.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.06.016>
- Ge, Y. M., Lu, J. C., Tang, S. S., Xu, Y. H., & Liang, Y. J. (2023). Performance evaluation of sperm concentration, motility, and morphological analysis for GSA-810 series of sperm quality analysis system. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 37(23–24), e24986. <https://doi.org/10.1002/JCLA.24986>
- Gloria, A., Carluccio, A., Contri, A., Wegher, L., Valorz, C., & Robbe, D. (2013). The effect of the chamber on kinetic results in cryopreserved bull spermatozoa. *Andrology*, 1(6), 879–885. <https://doi.org/10.1111/J.2047-2927.2013.00121.X>,
- Ibrahim, M. A. (2024). Bull sperm cryopreservation: An overview on the current status and future perspectives. *German Journal of Veterinary Research*, 4(1), 9–22.
<https://doi.org/10.51585/GJVR.2024.1.0071>

- Khelifaoui, M., Battut, I., Bruyas, J. F., Chatagnon, G., Trimeche, A., & Tainturier, D. (2005). Effects of glutamine on post-thaw motility of stallion spermatozoa: an approach of the mechanism of action at spermatozoa level. *Theriogenology*, 63(1), 138–149. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2004.04.012>
- Kumaresan, A., & Srivastava, A. K. (2022). Current Concepts in Bovine Reproduction. *Current Concepts in Bovine Reproduction*, 1–342. <https://doi.org/10.1007/978-981-19-0116-4/COVER>
- Nuntapaitoon, M., Tummaruk, P., & Suwimonteerabutr, J. (2024). Supplementation of glutamine in a short-term boar semen extender during 17°C holding time enhances post-thaw sperm quality for cryopreservation. *Porcine Health Management*, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/S40813-024-00403-8/TABLES/3>
- Qualidade Seminal De, A. N. (2017). *Efeitos da adição in vitro de aminoácidos na qualidade seminal de asnos andaluzes após o descongelamento*. <http://repositorio.ufla.br/jspui/handle/1/12841>
- Román, A., de Jesús, R., Figueroa, F., Antonio, J., & Peña, M. (2014). Métodos de extracción de semen bovino. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 15(5), 1–8. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63633881001>
- Rupert P. Amann, John K. Amory, Janice L. Bailey, William J. Bremner, & Terry R. Brown. (2010). *Manual-Andrologia-2da-Edicion-Version-Castellano*.
- Salama, M. S., Ashour, M. A., Taher, E. S., Rashed, F., Ibrahim, I. M., El-Nablaway, M., Ibrahim, A. M., Mihaela, O., Olga, R., Mohammed, N. A., Abdeen, A., & Shukry, M. (2024). Effect of autologous platelet-rich plasma on the fertility and quality of

cryopreserved buffalo bull semen: a comparative study using OptiXcell® and tris egg yolk extenders. *BMC Veterinary Research*, 20(1), 1–10.

<https://doi.org/10.1186/S12917-024-04022-X/FIGURES/1>

Salman, A., Fernández-Alegre, E., Francisco-Vázquez, R., Gómez-Martín, R., Fernández-Fernández, A., Areán-Dablanca, H., Domínguez, J. C., González-Montaña, J. R., Caamaño, J. N., & Martínez-Pastor, F. (2023). Extension of the equilibration period up to 24 h maintains the post-thawing quality of Holstein bull semen frozen with OPTIXcell®. *Animal Reproduction Science*, 250, 107209.

<https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2023.107209>

Sangeeta, S., Arangasamy, A., Kulkarni, S., & Selvaraju, S. (2015). Role of amino acids as additives on sperm motility, plasma membrane integrity and lipid peroxidation levels at pre-freeze and post-thawed ram semen. *Animal Reproduction Science*, 161, 82–88.

<https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2015.08.008>

Sariözkan, S., Bucak, M. N., Tuncer, P. B., Büyükleblebici, S., & Cantürk, F. (2014). Influence of various antioxidants added to TCM-199 on post-thaw bovine sperm parameters, DNA integrity and fertilizing ability. *Cryobiology*, 68(1), 129–133.

<https://doi.org/10.1016/J.CRYOBIOL.2014.01.007>

Singh, A. K., Kumar, A., & Bisla, A. (2021a). Computer-assisted sperm analysis (CASA) in veterinary science: A review. *The Indian Journal of Animal Sciences*, 91(6), 419–429.

<https://doi.org/10.56093/IJANS.V91I6.115435>

- Singh, A. K., Kumar, A., & Bisla, A. (2021b). Computer-assisted sperm analysis (CASA) in veterinary science: A review. *The Indian Journal of Animal Sciences*, 91(6), 419–429.
<https://doi.org/10.56093/IJANS.V91I6.115435>
- Souza, W. L., Moraes, E. A., Matos, J. C., Ferreira, J. de C., Sousa, P. H. F., Luna, F. de S., & Toniolli, R. (2020). Addition of synthetic amino acids in sheep semen improves its quality after cryopreservation. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, 27(2), 80–87.
<https://doi.org/10.4322/rbcv.2020.016>
- Topraggaleh, T. R., Shahverdi, A., Rastegarnia, A., Ebrahimi, B., Shafiepour, V., Sharbatoghli, M., Esmaeili, V., & Janzamin, E. (2014). Effect of cysteine and glutamine added to extender on post-thaw sperm functional parameters of buffalo bull. *Andrologia*, 46(7), 777–783.
<https://doi.org/10.1111/AND.12148>;CTYPE:STRING:JOURNAL
- Tuncer, P. B., Sarözkan, S., Bucak, M. N., Ulutaş, P. A., Akalın, P. P., Büyükleblebici, S., & Canturk, F. (2011). Effect of glutamine and sugars after bull spermatozoa cryopreservation. *Theriogenology*, 75(8), 1459–1465.
<https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2010.12.006>
- Valverde Abarca, A., & Madrigal Valverde, M. (2018). Sistemas de análisis computadorizado de semen en la reproducción animal. *Agronomía Mesoamericana*, 29(2), 469–484. <https://doi.org/10.15517/MA.V29I2.30613>
- Vicentin, D., Lardone, M., & Giojalas, L. C. (2022). *El espermatozoide: de Sertoli al ovocito*. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).
<https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/185205>

Zhu, Z., Fan, X., Lv, Y., Lin, Y., Wu, D., & Zeng, W. (2017). Glutamine protects rabbit spermatozoa against oxidative stress via glutathione synthesis during cryopreservation. *Reproduction, Fertility and Development*, 29(11), 2183–2194.
<https://doi.org/10.1071/RD17020>