



**Comparación de la morfología del semen bovino Gyrholando fresco y criopreservado  
teñidos con Spermac, Triple tinción y Farelly, para determinar la viabilidad y el  
porcentaje de motilidad progresiva con el equipo CASA.**

Chicaiza Cuzco, Solange Lizbeth

Departamento de Ciencias de la Vida

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Carrera Garcés Fredy Patricio Ph. D.

22 de agosto de 2022

## Reporte de Verificación de Contenido



Tesina-Chicaiza Solange.pdf

Scanned on: 1:29 August 22, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

Identical Words	46
Words with Minor Changes	5
Paraphrased Words	17
Omitted Words	286



Website | Education | Businesses



Escanea el código QR para:  
FREDY PATRICIO  
CARRERA GARCÉS

Carrera Garcés Fredy Patricio Ph. D.

Director del Trabajo de Integración Curricular



**Departamento de Ciencias de la Vida y Agricultura**

**Carrera de Ingeniería en Biotecnología**

### **Certificación**

Certifico que el trabajo de integración curricular: **"Comparación de la morfología del semen bovino Gyrholando fresco y criopreservado teñidos con Spermac, Triple tinción y Farelly, para determinar la viabilidad y el porcentaje de motilidad progresiva con el equipo CASA"** fue realizado por la señorita **Chicaiza Cuzco Solange Lizbeth**, el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizada en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 22 de agosto del 2022

Firma:



Firmado electrónicamente por:  
**FREDY PATRICIO  
CARRERA GARCÉS**

Carrera Garcés Fredy Patricio Ph. D.

Director del trabajo de integración curricular

C. C: 0602031569



**Departamento de Ciencias de la Vida y Agricultura**

**Carrera de Ingeniería en Biotecnología**

**Responsabilidad de Autoría**

Yo, **Chicaiza Cuzco Solange Lizbeth**, con cédula de ciudadanía n°1723693790, declaro/ que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **"Comparación de la morfología del semen bovino Gyrholando fresco y criopreservado teñidos con Spermac, Triple tinción y Farelly, para determinar la viabilidad y el porcentaje de motilidad progresiva con el equipo CASA"** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 22 de agosto del 2022

Firma

**Chicaiza Cuzco Solange Lizbeth**

C.C.:1723693790



**Departamento de Ciencias de la Vida y Agricultura**

**Carrera de Ingeniería en Biotecnología**

**Autorización de Publicación**

Yo **Chicaiza Cuzco Solange Lizbeth**, con cédula/cédulas de ciudadanía n°1723693790, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **"Comparación de la morfología del semen bovino Gyrholando fresco y criopreservado teñidos con Spermac, Triple tinción y Farelly, para determinar la viabilidad y el porcentaje de motilidad progresiva con el equipo CASA"** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 22 de agosto del 2022

Firma

**Chicaiza Cuzco Solange Lizbeth**

C.C.:1723693790

### **Dedicatoria**

Este trabajo se lo dedico a Kaitlyn Chávez, mi hermana; María Cuzco, mi madre y Luis Chicaiza, mi padre, quienes me amaron y me apoyaron incondicionalmente. A María Morales y Clementina Toapanta por ser mis mentoras y mis guías.

A Hadassa, Jennifer, Luis, mis colegas y amigos, ya que han formado parte de mi trayectoria académica y personal, sin su apoyo y sus ocurrencias no lo lograría

Jasfer, Berlin, Chiquis, Pepe, Canela, Susi, Tete y a mis otros compañeros de vida, por estar incondicionalmente a mi lado, por amarme y por acompañarme hasta en mis malas noches, desde la infinidad los amo.

*Cuando se trata de sentir, no existen los cálculos.*

*Anónimo*

## **Agradecimientos**

Agradezco a mi familia por la compañía, el apoyo, el amor y la confianza que han depositado en mí. Por forjarme en la mujer que soy ahora.

Agradezco al Dr. Fredy Carrera quien más allá de ser mi tutor en este proyecto ha sido mi mentor, sin el este sueño no hubiera sido posible.

Agradezco a Ing. Andrés Vargas, Ing. Mario Muñoz, Ing. Gisella Mantilla y Dr. Santiago Ulloa porque me acompañaron a lo largo de este proceso, quienes me guiaron y me formaron como una profesional integra en mi área.

A mi gran amiga Ana Cobos por brindarme asilo cuando no sabía a donde recurrir y que desde el primer momento que cursamos una clase juntas me brindo todo su apoyo incondicional, siempre dedicándome tiempo a informarme y acompañarme en este largo camino.

Solo me queda agradecer a una persona especial quien en su momento se presentó como una chispa de motivación y de respeto, por ser cómplice de los momentos únicos...

## Índice de Contenidos

Carátula .....	1
Reporte de Verificación de Contenido .....	2
Certificado de Director .....	3
Responsabilidad de Autoria .....	4
Autorización de Publicación .....	5
Dedicatoria.....	6
Agradecimientos .....	7
Índice de Figuras .....	12
Índice de Tablas.....	13
Resumen .....	14
Abstract.....	15
Capítulo I: .....	16
Introducción .....	16
Planteamiento del problema.....	18
Justificación .....	19
Objetivos.....	20
Objetivo general .....	20
Objetivo específico .....	20
Capitulo II:.....	21
Marco teórico .....	21



Morfología del aparato reproductor bovino .....	21
El semen y sus componentes.....	23
Células espermáticas.....	23
Espermatogénesis.....	24
Espermatocitogénesis .....	24
Espermiogénesis .....	25
Morfología del espermatozoide .....	26
Anormalidad espermática .....	27
Factores que afectan la calidad del semen.....	29
Plasma seminal .....	31
Crioconservación del semen bovino .....	32
Papel del ácido ascórbico (antioxidante) en la calidad del semen bovino .....	32
Espermograma.....	33
Tinción del semen para evaluar la morfología espermática .....	34
Capítulo III: .....	35
Ubicación, materiales y metodología.....	35
Ubicación política del área de investigación .....	35
Ubicación geográfica del área de investigación .....	35
Ubicación ecológica.....	36
Materiales .....	36
Equipos .....	36

	10
Insumos.....	36
Reactivos .....	37
Muestra biológica .....	37
Metodología .....	37
Evaluación de las características del semen recolectado .....	37
Preparación de la dilución Optixcell.....	38
Análisis de motilidad progresiva en el sistema CASA con semen fresco y descongelado .....	38
Congelamiento .....	38
Descongelamiento.....	38
Comparación morfológica de semen fresco y descongelado .....	38
Tinción Farelly .....	38
Tinción Spermac.....	39
Triple tinción .....	39
Diseño experimental.....	40
Capítulo IV: .....	41
Resultados y discusión .....	41
Evaluación de las principales características del semen recolectado .....	41
Análisis de motilidad progresiva en el sistema CASA con semen fresco y descongelado .....	41
Comparación morfológica de semen fresco y descongelado .....	44
Efecto del antioxidante en las principales anomalías espermáticas en la tinción Farelly.....	49
Capítulo V: .....	51

Conclusiones .....	51
Capítulo VI: .....	52
Recomendaciones .....	52
Capitulo VII: .....	53
Bibliografía.....	53

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> <i>Fisiología del aparato reproductor bovino</i> .....	21
<b>Figura 2</b> <i>Proceso de espermatogénesis</i> .....	25
<b>Figura 3</b> <i>Estructura general de un espermatozoide</i> .....	27
<b>Figura 4</b> <i>Anomalías espermáticas</i> .....	29
<b>Figura 5</b> <i>Ubicación geográfica</i> .....	35
<b>Figura 6</b> <i>Porcentaje de motilidad progresiva en los dos estados de la muestra</i> .....	43
<b>Figura 7</b> <i>Efecto de los factores en el porcentaje de morfología espermática</i> .....	46
<b>Figura 8</b> <i>Comparación de la morfología espermática usando los tres tipos de tinciones</i> .....	48

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1</b> <i>Características fundamentales del semen bovino</i> .....	24
<b>Tabla 2</b> <i>Principales anormalidades de las células espermáticas bovinas</i> .....	28
<b>Tabla 3</b> <i>Principales componentes del plasma seminal</i> .....	31
<b>Tabla 4</b> <i>Características macroscópicas del semen bovino</i> .....	41
<b>Tabla 5</b> <i>Porcentaje de motilidad progresiva</i> .....	42
<b>Tabla 6</b> <i>Resumen experimental: Porcentaje de anormalidades en semen fresco y descongelado. Usando tres tipos de tinciones.</i> .....	44
<b>Tabla 7</b> <i>Resumen estadístico del efecto de dos concentraciones de antioxidantes en las principales anormalidades espermáticas en el Toro 1</i> .....	49
<b>Tabla 8</b> <i>Resumen estadístico del efecto de dos concentraciones de antioxidantes en las principales anormalidades espermáticas en el Toro 2</i> .....	50

## Resumen

La criopreservación del semen bovino permite la distribución del material genético de alta calidad en las pajillas, para su empleo en tecnologías de reproducción animal como la inseminación artificial (IA), la transferencia de embriones (TE) y la producción in vitro (PIV) entre otras. El manejo del semen criopreservado presenta ventajas como la disminución de costos para los productores, disminución de enfermedades de transmisión sexual, preservación genética y el desarrollo de bancos de almacenamiento seminal. De tal modo, es indispensable un análisis morfológico de los espermatozoides para determinar la concentración, el estado del acrosoma, viabilidad y motilidad progresiva a su vez se puede evaluar la capacidad de fertilización y los efectos de la manipulación en el proceso de criopreservación. El objetivo de esta investigación fue evaluar la morfología espermática del semen fresco y descongelado con tres tipos de tinciones, analizar el efecto del antioxidante en la morfología espermática y estimar el porcentaje de motilidad progresiva del semen fresco y descongelado en el sistema CASA. La tinción Farelly permitió una mejor diferenciación de los dos estados de la muestra seminal a comparación de los otros tipos de tinciones, mientras que el efecto del antioxidante en la morfología espermática generó un efecto crioprotector en las anomalías, por último, se estableció que el porcentaje de motilidad progresiva esta influenciado por el estado de la muestra seminal.

**Palabras clave:** Morfología espermática, Tinción Farelly, Tinción Spermac y Triple tinción

### **Abstract**

Bovine semen Cryopreservation allows for the distribution of genetic quality material in straws, for its use in animal reproductive technologies as artificial insemination (IA), embryo transfer (ET), in vitro production (IVP) and others. Advantages of semen Cryopreservation are reduction in production cost, avoidance of sexually transmitted diseases, genetic preservation and development of a semen storage bank. Therefore, morphological analysis is fundamental to determine concentration, acrosome status, viability, progressive motility, fertilizing capacity and the effects of handling in the cryopreservation process. The research aims were to evaluate sperm morphology in fresh and post-thaw, to analyze the antioxidant effect on sperm morphology besides estimating progressive motility in fresh and post-thaw semen in the CASA system. Farrow's stain allowed for better differentiation between both states of semen compared to other staining types. While antioxidant action caused a cryoprotective effect on abnormalities, finally, the progressive motility was influenced by the state of the semen.

**Keywords:** Morphology sperm, Farrow's stain, Spermac stain and triple stain

## Capítulo I:

### Introducción

La criopreservación del semen bovino permite la distribución del material genético de alta calidad en las pajillas, las cuales son empleadas en tecnologías de reproducción animal como la inseminación artificial (IA), la transferencia de embriones (TE) y la producción *in vitro* (PIV) entre otras. El manejo del semen criopreservado presenta ventajas como la disminución de costos para los productores, disminución de enfermedades de transmisión sexual, preservación genética y el desarrollo de bancos de almacenamiento seminal (Westfalewicz et al., 2021).

Para el manejo del semen criopreservado es indispensable un análisis morfológico de los espermatozoides, como también la determinación de la concentración, estado del acrosoma, viabilidad y motilidad progresiva (Hidalgo Ordoñez et al., 2005). La evaluación morfológica de los espermatozoides permite comprobar la capacidad de fertilización y los efectos de la manipulación en el proceso de criopreservación (Duque Villa et al., 2016), tales efectos que se producen en la manipulación repercuten de forma directa en la estructura de los espermatozoides e incluso pueden presentar modificaciones en la membrana espermática, como consecuencia se pierde la integridad y la viabilidad del espermatozoide (Corredor Hernández et al., 2017). Es aceptable un porcentaje de anomalías morfológicas inferior al 20% (Mallma Marca, 2019).

Para la evaluación morfológica de los espermatozoides, se emplean colorantes específicos tales como Eosina/Nigrosina (Mallma Marca, 2019), Spermac (Durán et al., 2018), Farelly (Minitube, 2017) y Triple tinción (Muiño Otero, 2008). El empleo de este tipo de procedimientos permite analizar las distintas anomalías, que presentan las células germinales del macho, las anomalías pueden ser clasificadas de acuerdo a su origen si esta se



produce en los testículos se les denominan anomalías mayores, pero si se presentan en el epidídimo se les conoce con anormalidades menores (Muiño et al., 2005). En el flagelo del espermatozoide se presenta la mayor incidencia de anomalías producto de los procesos de congelación y descongelación (Blom, 1977).

El porcentaje de motilidad progresiva tiene relevancia en el manejo del semen criopreservado, debido a que, evalúa el movimiento espermático usando sistemas informáticos tales como el sistema CASA (Computer Assisted Motility Analysis) en tiempo real con el fin de establecer mediante el uso de cálculos matemáticos la trayectoria de las células espermáticas (Hidalgo Ordoñez et al., 2005).

Considerando la relevancia que posee la evaluación morfológica de los espermatozoides se planteó el presente estudio con el objetivo de evaluar el porcentaje de anormalidades morfológicas mediante la implementación de tres tipos de tinciones, además se valorará el porcentaje de motilidad progresiva.

### **Planteamiento del problema**

Los daños irreversibles en la membrana de las células espermáticas producto de la congelación, inducen a la muerte celular o modificaciones en su estructura (Ghirardosi et al., 2018). El proceso de criopreservación se desarrolla mediante el uso de curvas de congelamiento, las cuales pueden ser de efecto lento y rápido, generando un impacto negativo en la morfología de las células espermáticas debido al desequilibrio osmótico.

Existe la necesidad de d qué tipo de tinción es más factible al momento de la evaluación morfológica del semen fresco y descongelado con el fin de establecer el porcentaje de anormalidades que demostrará el estado físico de la función de los testículos, capacidad fertilizante y el estado del epidídimo (Ferrerías, 2014). Se pretende evaluar la concentración del ácido ascórbico que actúa como antioxidante para mantener el mínimo porcentaje de anormalidades durante la crioconservación del semen bovino. Se destaca los principales defectos o anormalidades de las células espermáticas: Cabeza (grande, pequeña, circular, vacuolada, doble cabeza y con forma de pera), cuello y pieza media (ancha o estrecha), cola (pequeña, doble o múltiple, rota, doblada y enrollada) y por último la presencia de gotas citoplasmáticas (Kvist & Björndahl, 2004).

## Justificación

El sector agropecuario del país tiene relevancia dentro de la economía del Ecuador, ya que tiene una representación del 7,7% en el producto interno bruto (PIB), por ende, posee un papel fundamental en la seguridad alimentaria (INEC, 2021). Cabe destacar que el empleo de la biotecnología en el ámbito de la reproducción animal tiene importancia dentro del sector agropecuario al momento de implementar tecnologías a fin de obtener beneficios para el mejoramiento genético animal.

Es de suma importancia la evaluación de la morfología espermática y el análisis de la motilidad progresiva, ya que, permite correlacionar la fertilidad con la calidad de las células espermáticas, esto incide en el avance de las tecnologías de inseminación artificial y fertilización *in vitro/in vivo*. (Mallma Marca, 2019). El uso de tinciones como Spermac, Triple tinción y Farelly permite identificar las principales anomalías que se presentan en las muestras de semen fresco y descongelado, además de identificar el porcentaje permisible de anormalidades con el fin de proporcionar un diagnóstico del estado seminal.

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

Comparar la morfología de espermatozoides bovinos frescos y descongelados teñidos con Spermac, Triple tinción y Farelly y el porcentaje de motilidad progresiva con el equipo CASA

### **Objetivo específico**

Evaluar la morfología espermática del semen fresco y descongelado usando la tinción Spermac, triple tinción y Farelly.

Analizar el efecto del antioxidante (ácido ascórbico) en la morfología espermática mediante el empleo de la tinción Farelly.

Estimar el porcentaje de motilidad progresiva del semen fresco y descongelado en el sistema CASA.

## Capítulo II:

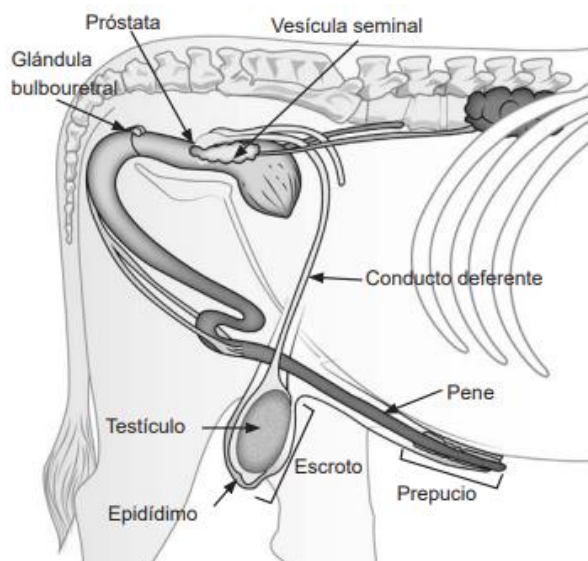
### Marco teórico

#### Morfología del aparato reproductor bovino

El aparato reproductor del macho está formado por: escroto, testículos, epidídimo, y las glándulas bulbo uretrales, próstata, vesículas seminales y pene. El aparato reproductivo está influenciado por el eje hipotálamo/hipofisario, generador de hormonas como la gonadotropina (GnRH), que influye sobre la adenohipófisis esta a su vez secreta la hormona folículo estimulante (FSH) y la luteinizante (LH) y las células germinales que liberan los andrógenos (Busch & Waberksi , 2007).

#### Figura 1

##### *Fisiología del aparato reproductor bovino*



*Nota:* El aparato reproductor bovino está formado por la próstata, glándula bulbouretral, vesícula seminal, testículos, epidídimo, escroto, pene y prepucio. Tomado de *Manual de biotecnologías reproductivas y conservación de germoplasma* (p. 11), por Domínguez R. et al., 2020, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

**Testículos.** – Se encuentran localizados en la región inguinal, poseen una forma ovoide y son considerados los principales órganos reproductores. La longitud oscila entre los 10 a 16 cm, 4 a 9 cm de ancho y un grosor de 5 a 8 cm. Se conforman por túbulos seminíferos donde surge el proceso de espermatogénesis (Tecnológico, 2016).

**Escroto.** – Recubre y da protección a los testículos, el cual posee la función termorreguladora para el proceso de espermatogénesis (Tecnológico, 2016).

**Epidídimo.** – Este órgano se encuentra adyacente a los testículos, las funciones principales son la maduración, transporte y almacenamiento de las células espermáticas. Se divide en tres secciones: la cabeza, cuerpo y cola, en esta se da la unión hacia al cordón espermático conjuntamente con vasos sanguíneos y linfáticos de los testículos, permitiendo el transporte del semen a la uretra (Rangel Porta et al., 2009).

**Próstata.** - Se localiza cerca de la vejiga y esta se encarga de la producción de líquidos con pH alcalino para condicionar el medio del espermatozoide en el canal vaginal (Domínguez Vidal et al., 2020).

**Glándulas bulbouretrales.** – Están ubicadas en cada extremo de la uretra, secretan una sustancia gelatinosa que forma parte del plasma seminal (Bariogilio , 2001).

**Vesículas seminales.** – Son dos estructuras que se encuentran de forma lateral al cuello de la vejiga y hacia adelante sobre la próstata, estas vesículas secretan un líquido con alto contenido de azúcares y ácido cítrico (Domínguez Vidal et al., 2020).

**Pene.** – El pene del bovino tiene una estructura semejante a una lanza, posee dos funciones principales: la expulsión de la orina y la expulsión del líquido seminal en la hembra (Tecnológico, 2016).

**Prepucio.** – Es una estructura generada a partir de la piel del bovino con el fin de dar protección del medio al pene, posee una cobertura interna de tejido mucoso y la cubierta externa es piel (Domínguez Vidal et al., 2020).

## **El semen y sus componentes**

### ***Células espermáticas***

La concentración promedio de los espermatozoides en un eyaculado es de 1200 millones por cada ml, se estima que alrededor del 50% de estos espermatozoides contienen cromosoma X y el restante el cromosoma Y. La motilidad progresiva de estas células oscila del 60 al 70% a una velocidad promedio de 6mm por minuto y la morfología ideal está dentro del rango del 80 al 90% de células normales (Bearden & Fuquay, 1982).

La formación de los espermatozoides se da en los túbulos seminíferos de los testículos, son células de forma alargada y se constituyen por tres partes principales: la cabeza que contiene el núcleo, el cuello donde se da la unión entre los dos segmentos principales y la cola flagelar para la movilidad, además se encuentra recubierto por una membrana plasmática. La célula espermática posee una estructura denominada acrosoma, la cual se encuentra entre la cubierta de membrana y la cabeza (Hafez, 2002).

**Tabla 1**

*Características fundamentales del semen bovino*

<b>Características principales</b>	<b>Toro</b>
Volumen (mL)	4-6
Espermatozoides totales (miles de millones)	4-7
Ph	6,5-7

Nota: Esta tabla demuestra el volumen ideal de una muestra seminal bovina, la concentración de esta y el valor de pH. *Tomado de Reproducción e inseminación artificial, (p.99), por E.S.E Hafez, 2002.*

### **Espermatogénesis**

La llegada de la madurez sexual del bovino se da en la edad de 10 a 12 meses, manifestando cambios físicos en el cuerpo, aumento de la euforia sexual, crecimiento del pene y testículos. Conjuntamente comienza la producción continua del semen dentro del testículo, de forma cíclica en el epitelio de los túbulos seminíferos (Bearden & Fuquay, 1982).

Este proceso se divide en dos fases:

### **Espermatocitogénesis**

Se produce la división mitótica de las células espermatogonias, formando un espermatogonio latente y uno activo, el primero ubicado en el epitelio germinal y el segundo se dividirá para dar origen a cuatro divisiones mitóticas, generando los espermatocitos primarios, que luego enfrentarán una división meiótica para formar las espermátides (Bearden & Fuquay, 1982).

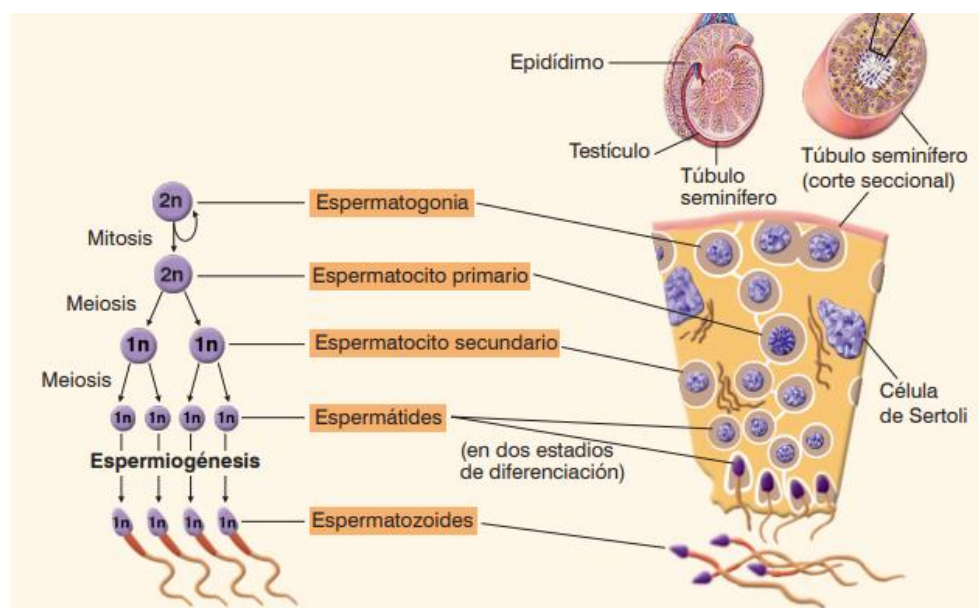


## Espermiogénesis

Las espermatidas se unan a las células de Sertoli, sufren varios cambios hasta convertirse en espermatozoides. Este proceso consta de cuatro fases: la fase de Golgi en la cual surge el desarrollo del acrosoma, la fase casquete donde se produce el desarrollo y diferenciación de los componentes del acrosoma, la fase acrosómica determina el alargamiento del núcleo y la expansión del acrosoma y la fase de maduración que es la conversión completa de la célula a espermatozoide (Busch & Waberksi , 2007).

### Figura 2

#### Proceso de espermatogénesis



*Nota:* Las espermatogonias se dividen por el proceso de mitosis hasta transformarse en los espermatocitos primarios, luego estos enfrentan el proceso de división meiótica y se generan los espermatocitos secundarios y estas a su vez poseen una nueva división meiótica hasta ser espermatidas. Por último, ocurre la espermiogénesis que es la maduración de las espermatidas a espermatozoides. Tomado de *Espermograma* (p. 145), por Toro. A, 2009, Medicina & Laboratorio.

## **Morfología del espermatozoide**

Según G.E. Freneau (2011) “la morfología espermática es uno de los parámetros más relevantes en la detección de precocidad sexual bovina”. Al momento del eyaculado las células espermáticas deben poseer la madurez necesaria, en otras palabras, la cromatina condensada se completa junto con el acrosoma, la pieza intermedia debe estar en óptimas condiciones y no tener presencia de gotas citoplasmáticas en su flagelo. Cada una de estas características permitirá el movimiento de la célula espermática ideal en el tracto reproductor femenino además de mantener los componentes intactos y así ejecutar la fertilización (Martins et al., 2016).

### **a. Cabeza**

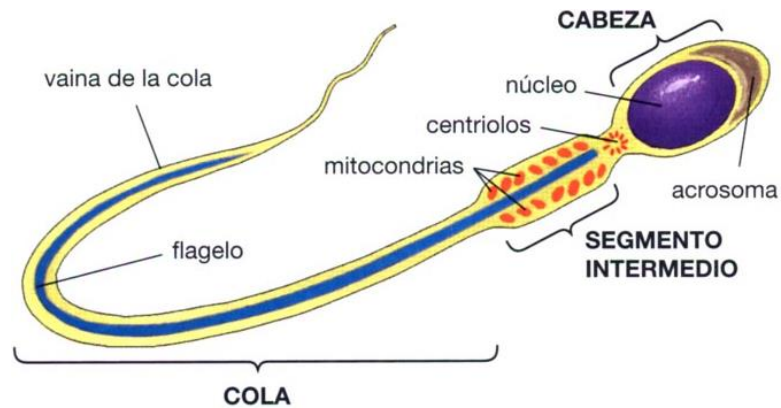
Dentro de la cabeza se encuentra el núcleo formado por una cromatina condensada y cubierta por una membrana nuclear. En la posición anterior se encuentra el acrosoma el cual cubre dos tercios de la cabeza, la función está relacionada con la reacción acrosómica y con la penetración en la zona pelúcida. En la línea ecuatorial de la cabeza se halla la región postacrosómica (Busch & Waberksi , 2007).

### **b. Cola**

Está formada por el cuello unido al cuerpo basal del flagelo, su composición interna se constituye de nueve pares de microtúbulos unidos mediante un complejo proteico denominado dineína. El flagelo se divide en tres segmentos, la pieza media formada en su interior por mitocondrias, la pieza principal con elementos estructurales del axonema y fibras, por último, está la pieza terminal con fibras de cobertura (Busch & Waberksi , 2007).

### Figura 3

#### Estructura general de un espermatozoide



*Nota:* El espermatozoide está formado por cabeza, el segmento medio y la cola. Tomado de *Biología Vida en la Tierra*, por Audersirk et al., 2003, Pearson.

#### Anormalidad espermática

El límite permisible de anomalías está entre el 8 al 10%, si se sobrepasa este límite se puede determinar una posible disminución de la fertilidad (Bearden & Fuquay, 1982).

Una célula espermática posee características específicas:

- La cabeza del espermatozoide debe poseer una forma ovalada, con una longitud aproximada de 5  $\mu\text{m}$  con un diámetro de 3,5  $\mu\text{m}$ . Además, debe poseer una región acrosomal de alrededor del 40 al 70% del área total de la cabeza (Alarcón et al., 2020).
- La pieza media debe ser alargada y con un diámetro menor a un 1  $\mu\text{m}$  (Alarcón et al., 2020).
- El flagelo debe tener firmeza y ser uniforme, no debe poseer enrollamientos y por lo general mide 45  $\mu\text{m}$  de extensión (Alarcón et al., 2020).

**Tabla 2**

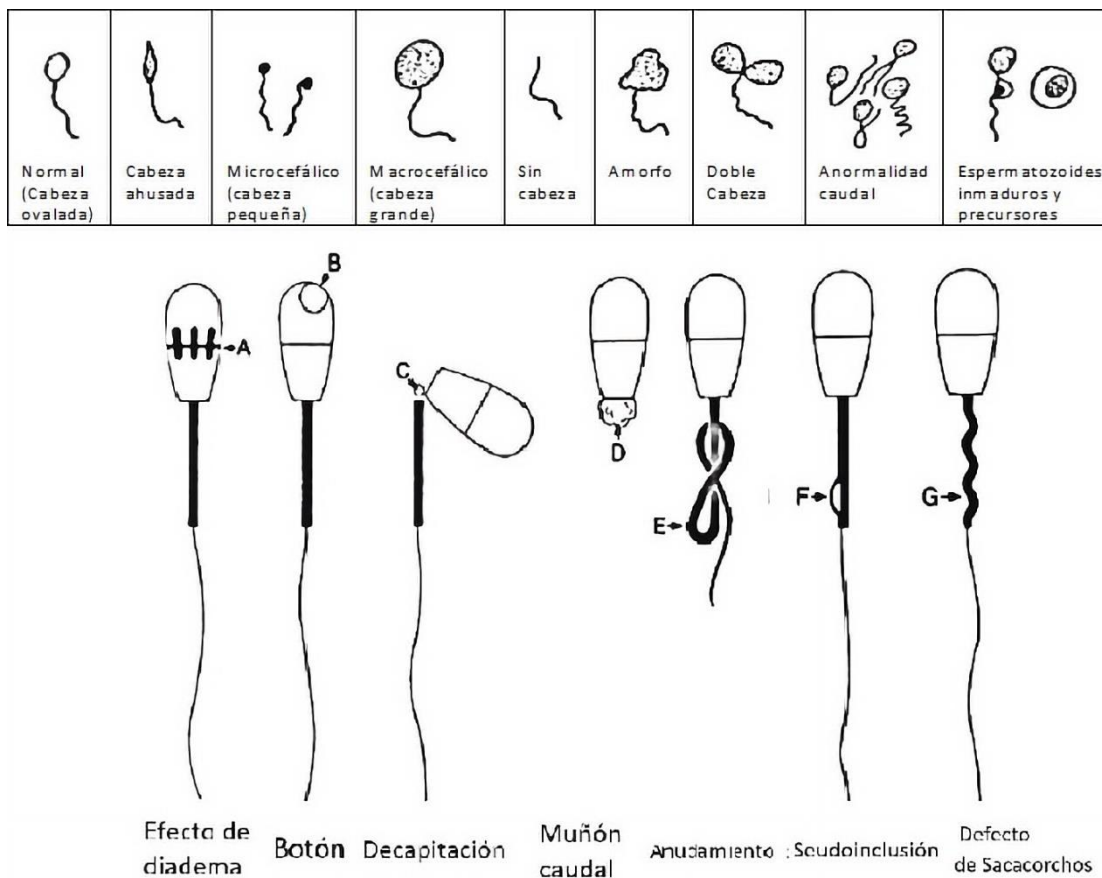
*Principales anomalías de las células espermáticas bovinas*

<b>Anormalidades</b>	<b>Defectos</b>
<b>Cabeza anormal</b>	Asimetría, estrechamiento, agrandamiento, acintada, área acrosomal pequeña, piriformes y cabeza doble.
<b>Defectos de cuello y pieza media</b>	Cuello doblado, pieza media gruesa y pieza media fina.
<b>Colas anormales</b>	Alargadas, rotas, dobladas, filiformes enroscamiento, dobles y múltiples.
<b>Gotas citoplasmáticas</b>	Proximales y distales

*Nota:* Se detalla acerca de las diferentes anomalías y los casos más comunes que se manifiestan en el semen bovino. *Tomado de Reproducción animal aplicada, por H.Joe Bearden y W.John Fuquay, 1982.*

Figura 4

## Anomalías espermáticas



*Nota:* Principales anomalías de la célula espermática. Tomado de *Reproducción e inseminación artificial*, (p.382), por E.S.E Hafez, 2002.

## Factores que afectan la calidad del semen

- Infecciosos

Existen enfermedades virales que pueden ser detectadas a nivel testicular, debido a que los agentes patógenos aprovechan la barrera hemato-testicular y así evitar los mecanismos de defensa o tratamientos suministrados. Existen enfermedades tales como el herpes de virus bovino (BHV-1), virus de la diarrea viral bovina (BVDV) y el orbivirus de la lengua azul (BTV),

las consecuencias de las enfermedades que se generan se reflejan en el porcentaje de motilidad y morfología de las células espermáticas. Otros microorganismos como bacterias infieren en la calidad y son transmisibles por vía uterina, un ejemplo claro es la leptospirosis (Lozano , 2009).

- No infecciosos

Edad. – La edad del ejemplar influye de forma directa en el volumen y concentración del semen obtenido. El proceso de espermatogénesis inicia alrededor de los tres a cuatro meses de edad y las primeras erecciones se dan a los ocho meses (Velásquez Vergara, 2020). El porcentaje de viabilidad, motilidad y morfología normal de los espermatozoides es mayor en ejemplares jóvenes y adultos (Kumar Ahirwar et al., 2018).

Tamaño testicular. - La medida de la circunferencia escrotal es un criterio relevante para evaluar la capacidad reproductiva del ejemplar, con el tamaño del testículo se relaciona también la producción de testosterona (Kumar Ahirwar et al., 2018).

Nutrición. – Un aspecto fundamental en el desarrollo del ejemplar es la calidad de la nutrición, la cual debe de ser equilibrada considerando su edad. En el caso de bovinos en etapa de inicio de pubertad se debe de establecer una dieta rica en pastos y un adecuado porcentaje de proteína, esto permite una adecuada formación testicular. En casos de desnutrición se refleja un atraso de la fase de la pubertad, entre otros problemas se puede destacar los relacionados con las pezuñas debido a la obesidad, repercutiendo en la libido del animal (Lozano , 2009).

Raza. – El tipo de raza influye en la concentración y volumen del eyaculado (Velásquez Vergara, 2020).

Ritmo de recolección. - Las colectas que se dan de forma constante afectan de forma negativa en el volumen, concentración y morfología espermática, el aumento de recolección

representa una alteración de los patrones de secreción y reabsorción de los fluidos generados por el epidídimo, las consecuencias se reflejan en la maduración y posibles anormalidades en las células espermáticas (Velásquez Vergara, 2020).

### **Plasma seminal**

Es una secreción proveniente de distintos órganos como los testículos, epidídimo y las glándulas accesorias. Está constituido por compuestos bioquímicos que se encuentran presentes en la tabla 3. A su vez también contienen aminoácidos, péptidos, proteínas, lípidos, ácidos grasos, enzimas y algunas sustancias hormonales como FSH, LH, estrógenos, andrógenos (Hafez, 2002).

**Tabla 3**

*Principales componentes del plasma seminal*

<b>Principales componentes</b>	<b>Toro (mg/100mL)</b>
Fructosa	530
Sorbitol	75
Glicerilfosforilcolina	350
Ácido cítrico	720
Sodio	230
Inositol	35
Plasmalógeno	60
Potasio	140
Cloro	180
Calcio	44

---

*Nota:* El plasma seminal se conforma de distintos componentes, de los cuales se detalla los principales componentes. *Tomado de Reproducción e inseminación artificial, (p.99), por E.S.E Hafez, 2002.*

### **Crioconservación del semen bovino**

La crioconservación del semen bovino a través del congelamiento con nitrógeno líquido permite extender la viabilidad de las células espermáticas considerando que este tipo de células son muy susceptibles a cambios de temperatura y de corta vida. Este tipo de tecnologías se emplea en el área reproductiva como la inseminación artificial, demostrando ser una biotecnología reproductiva para el mejoramiento y preservación de la genética bovina. La calidad del semen es uno de los requisitos principales para emplear esta tecnología, además, depende del protocolo de congelación, conlleva una serie de pasos rigurosos y específicos a fin de mantener la viabilidad del semen (Muiño Otero, 2008).

Las células espermáticas poseen una tasa de enfriamiento ideal, en el caso de que esta tasa sea superior se generara la formación de cristales intracelulares, por el contrario, si la tasa de velocidad es menor se produce un “efecto solución” el cual involucra el aumento de concentraciones de los solutos intracelulares, deshidratación y alteraciones en el pH. Afectando de forma directa en la viabilidad de la célula (Muiño Otero, 2008).

### **Papel del ácido ascórbico (antioxidante) en la calidad del semen bovino**

La vitamina C o ácido ascórbico es uno de los principales antioxidantes crioprotectores, el cual actúa en el plasma y en el interior de la célula espermática (Viotti, 2011). Tiene la capacidad de protección a las lipoproteínas de la célula espermática contra el daño peroxidativo provocado por radicales libres (López Rivadeneyra et al., 2001).



## Espermograma

El análisis de semen o espermograma comprende una evaluación completa de la capacidad fecundante.

El examen macroscópico permite valorar características visibles y posibles afecciones del animal, dentro de este examen se determinan:

Volumen. – la cantidad de volumen a obtener depende de la especie bovina y de diferentes factores ambientales o de manejo (Busch & Waberksi , 2007). Bajos valores del volumen del eyaculado pueden ser manifestaciones de problemas de salud o de protocolos de extracción (Bearden & Fuquay, 1982).

Aspecto. – El color y la consistencia permiten evaluar el estado del aspecto, considerando que el color puede tener diferentes tonalidades (marfil, blanquecino, blanco amarillento, amarillo o blanco grisáceo), en el ámbito de consistencia se observan apariencia cremosa, lechosa, serosa u acuosa (Bearden & Fuquay, 1982).

Olor. – Poseen un olor neutro, en caso de que la muestra presente un olor diferente se debe de descartar la muestra.

En el examen microscópico se determinan las siguientes variables:

La concentración de espermatozoides. – se considera el número de espermatozoides por cada mililitro.

Motilidad progresiva. – Mide el porcentaje de células espermáticas con la capacidad de movimiento rectilíneo y de forma continua, el porcentaje mínimo aceptable es del 50% en adelante (Páez Barón & Corredor Camargo , 2014). El sistema CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) permite la evaluación del porcentaje de motilidad y morfología de la célula espermática a través del microscopio de contraste de fases el cual está conectado a una

cámara de video, la imagen captada por el sistema se refleja hacia el ordenador, donde se encuentra el sistema de evaluación digital para la imagen generada. El análisis se basa en la captura de imagen de la trayectoria recorrida de cada espermatozoide por campo de visión en un segundo (Muiño Otero, 2008).

**Viabilidad.** – Para identificar el porcentaje de viabilidad se realiza la prueba de eosina-nigrosina. Las células que se encuentran muertas pierden la capacidad de permeabilidad en la membrana, lo que permite el ingreso del colorante eosina generando una coloración rosa, mientras que las células espermáticas vivas presentaran un color transparente (Vasquez & Vasquez Echeverri , 2007).

**Morfología.** – La evaluación de las anomalías de las células espermáticas permite estimar la capacidad fecundante y se evalúa a través de tinciones específicas (Toro Montoya , 2009).

### **Tinción del semen para evaluar la morfología espermática**

La evaluación morfología del semen bovino se realiza por medio de tinciones tales como: Farelly, Spermac, Eosina-Nigrosina, Triple tinción, Papanicolau y tinta china (Lozano , 2009). El proceso de tinción se da a través del uso de colorantes los cuales son absorbidos por las células espermáticas para su diferenciación, se pueden realizar tinciones con varios colorantes previo a una fijación (Mallma Marca, 2019).

## Capítulo III:

### Ubicación, materiales y metodología

#### Ubicación política del área de investigación

El proyecto de integración curricular se desarrolló en la Hacienda “Zoila Luz” donde se encuentra las instalaciones de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE-Sede Santo Domingo, el proceso experimental se realizó dentro del laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal, se encuentra ubicado en la Vía Quevedo Km 24, en la parroquia Luz de América, ciudad de Santo Domingo de los Colorados, provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas.

#### Ubicación geográfica del área de investigación

El proceso experimental se encuentra localizado geográficamente en las coordenadas de latitud  $00^{\circ} 24' 44''$  y con una longitud  $79^{\circ} 18' 7''$ .

#### Figura 5

##### *Ubicación geográfica*



*Nota-* Ubicación geográfica de las instalaciones donde se ejecutó el proyecto de integración curricular. Fuente: Elaboración propia.

### Ubicación ecológica

Zona de Vida:	Bosque Húmedo tropical
Altitud:	270 msnm
Temperatura:	25-27°C
Precipitación:	2860 nm/año
Humedad relativa:	85%
Heliofanía:	680 horas luz/año
Suelos:	Franco arcillosos

### Materiales

#### Equipos

- Sistema CASA
- Fotómetro (MiniTube)
- Microscopio óptico
- Platina térmica
- Sistema Ice-Cube
- Envasadora de pajillas (MiniTube)
- Baños María
- Estufa
- Autoclave
- Micropipetas 10-1000ul
- Potenciómetro

#### Insumos

- Pajillas (0,5 mL)
- Puntas de micropipeta

- Fundas ziploc
- Termo de pajillas
- Papel toalla
- Cámaras lejas
- Cajas Petri
- Portaobjetos
- Gradillas
- Tijeras
- Pinzas
- Papel aluminio
- Vagina artificial
- Tubos de ensayo
- Tubos Falcon
- Probetas
- Guantes
- Jeringuillas

### **Reactivos**

- Pack tinción Farelly
- Pack tinción Spermac
- Pack Triple tinción
- Diluyente OptiXcell
- Nitrógeno líquido
- Alcohol (70%)
- Agua ultrapura
- Acido ascórbico (Vitamina (4 y 5 mM))
- Agua bidestilada

### **Muestra biológica**

- Semen bovino

## **Metodología**

### **Evaluación de las características del semen recolectado**

Recolectada la muestra seminal por medio de vagina artificial, se midió el volumen directamente en el tubo graduado de colecta, el pH y la temperatura (°C) fue estimada utilizando un medidor de pH, la concentración espermática fue medida empleando el fotómetro (MiniTube), finalmente la muestra se incubó a baño María (30°C)

### **Preparación de la dilución Optixcell**

Se realizó la solución madre en una relación 2:1 (agua ultra pura: Optixcell) a temperatura de 32°C. La siguiente dilución fue 1:1 con el diluyente y la muestra de semen. Se adicionaron dos concentraciones 4 y 5  $\mu\text{M}$  de antioxidante (ácido ascórbico). Se evaluó viabilidad, morfología y motilidad progresiva.

### **Análisis de motilidad progresiva en el sistema CASA con semen fresco y descongelado**

Se tomó una alícuota de 1 mL de la muestra diluida, se incubó a baño María (37°C). En una cámara Leja se dispuso 5  $\mu\text{l}$  de la alícuota, usando el sistema SpermVision se realizó la medición de la motilidad progresiva.

### **Congelamiento**

Con la muestra de semen previamente diluida y la adición de las dos concentraciones de antioxidantes, se procedió a llenar las pajuelas de 0,5 mL en la envasadora y selladora automática de pajuelas (MiniTube). En el sistema Ice Cube se realizó el congelamiento del semen diluido, aplicando una curva de congelamiento estandarizada IMV hasta alcanzar una temperatura de -140°C. Al finalizar la curva de congelamiento, se llevaron las pajuelas al termo de nitrógeno líquido que se encuentra a una temperatura de -196°C.

### **Descongelamiento**

Se retiró la pajuela del termo, e inmediatamente se lo llevó a baño María (37°C) por 30 segundos. Se secó la muestra con papel toalla y se cortó un extremo de la pajuela, se colocó en el tubo de ensayo y se cortó el extremo sobrante para disponer el contenido dentro del tubo.

### **Comparación morfológica de semen fresco y descongelado**

#### ***Tinción Farelly***

En un portaobjetos se agregaron 20  $\mu\text{l}$  de la muestra de semen, se realizó un frotis y se dejó secar en platina térmica. Luego se agregó 500  $\mu\text{l}$  del fijador A y se dejó reposar por un

minuto, Se dispensaron 500 µl del colorante B y se dejó reposar por un minuto. Posteriormente se lavó la placa con agua destilada. Se adicionaron 500 µl del colorante C y se dejó reposar por un minuto. Con agua destilada se lavó el portaobjetos. En la platina térmica (37°C) se secó la muestra por al menos 2 horas. Se observó en el microscopio óptico con el lente objetivo 100X previamente se añadió aceite de inmersión a la placa.

### ***Tinción Spermac***

Se puso 20 µl de muestra seminal en el portaobjetos y se realizó el frotis. Se adicionó 500 µl de fijador y se dejó reposar por 5 minutos, se eliminó el restante y se secó en platina térmica a 37°C durante 15 minutos. Se lavó con agua destilada. Se añadió 500 µl del colorante A y se dejó reposar por un minuto. Después se adicionaron 500 µl del colorante B y se dispuso en reposo por un minuto. Por último, se añadieron 500 µl del colorante C durante un minuto, después de cada paso se lavó la muestra. Finalmente, en la platina térmica a 37°C se dejó secar la muestra por al menos 2 horas para su observación. Luego el análisis se realizó en el microscopio óptico con el lente objetivo de 100X se observaron los resultados a un lente de 100x.

### ***Triple tinción***

Se tomo 10 µl de la muestra seminal y se dispuso en el portaobjetos. Se agregó 10 µl de azul tripán en una concentración de 0,2 %. Se homogenizó y se realizó el frotis. Se dejó secar la muestra en platina térmica a 37°C por 15 minutos. Se añadió 500 µl de rojo neutro a una concentración de 0,8%, por 20 minutos, se dejó reposar. La muestra fue enjuagada 3 veces con agua destilada y se escurrió el portaobjetos en posición vertical por 2 minutos, posteriormente se añadió 500 µl de café Bismarck a una concentración de 0,8%. Se dejó reposar en platina térmica a 40°C por 10 minutos. Se enjuago la muestra y se dejó secar por al menos 12 horas.

Para determinar el porcentaje de anomalías en espermatozoides se aplica la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de anomalía} = \frac{N^{\circ} \text{ de espermatozoides anormales} * 100\%}{200 \text{ espermatozoides}}$$

### **Diseño experimental**

Se planteó un análisis estadístico AxBxC para evaluar la comparación de las tinciones en el cual los factores considerados son el ejemplar, el estado de la muestra y la tinción aplicada. A su vez se realizó un análisis AxB en el efecto del antioxidante sobre las principales anomalías reflejadas (Defectos de cabeza, defectos de pieza media, gotas citoplasmáticas y defectos de flagelo). Se empleó un ANOVA y una prueba de Tukey con el porcentaje de significancia del 5% considerando que la distribución de los datos era normal.

Para el análisis de la motilidad progresiva en el equipo CASA se ejecutó una prueba de t pareada para dos muestras, considerando la variable de estado de muestra y las concentraciones de antioxidantes. El programa estadístico empleado fue InfoStat Versión estudiantil.



## Capítulo IV:

### Resultados y discusión

Se registraron las medidas de las características macroscópicas de los dos ejemplares, considerando los parámetros estándares para el proceso de criopreservación como se detalla en la tabla 4.

#### Evaluación de las principales características del semen recolectado

**Tabla 4**

*Características macroscópicas del semen bovino*

Características	Ejemplares	
	Toro 1	Toro 2
Nombre del ejemplar	Toro 1	Toro 2
pH	6.4	6.5
Volumen (mL)	5	4.73
Temperatura (°C)	31.7	31.5
Aspecto	Amarillento	Amarillento lechoso
Olor	Neutro	Neutro
Concentración (Millones/mL)	1080	208 <sup>a</sup>

*Nota.* Evaluación macroscópica de las características del semen bovino de los ejemplares analizados. <sup>a</sup> Se considera que la concentración del Toro 1 presento una concentración inferior a la recomendada en la literatura, se realizó el procedimiento de criopreservación con fines académicos. Fuente: Elaboración propia.

#### Análisis de motilidad progresiva en el sistema CASA con semen fresco y descongelado

Los porcentajes de motilidad progresiva obtenidos del sistema CASA del estado de la muestra (semen fresco y semen descongelado). Se visualizan en la tabla 5.

**Tabla 5***Porcentaje de motilidad progresiva*

<b>Toro 1</b>		<b>Toro 2</b>	
<b>Semen fresco</b>	<b>Semen Descongelado</b>	<b>Semen fresco</b>	<b>Semen Descongelado</b>
50,84	19,34	73,21	12,04
p bilateral	0,0001	p bilateral	0,0002

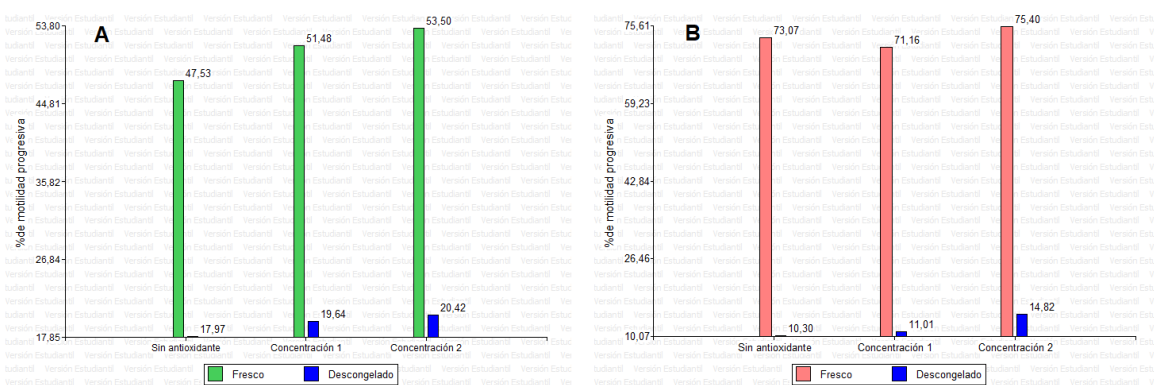
*Nota.* Los resultados de la prueba de t pareada reflejan diferencia en las medias obtenidas entre el estado de la muestra (semén fresco y semén descongelado) mediante el valor de p bilateral > 0,05. Fuente: Elaboración propia.

El porcentaje de motilidad progresiva del Toro 1 presenta diferencias significativas en el estado de la muestra entre semén fresco y semén descongelado el valor de  $p = 0,0001$ . De igual manera hay diferencias significativas en el Toro 2, el valor de  $p = 0,0002$ .

Considerando que existe diferencia de medias en la prueba estadística ejecutada, se realizó la representación gráfica de las medias de los porcentajes de motilidad progresiva detallados en la figura 5.

Figura 6

*Porcentaje de motilidad progresiva en los dos estados de la muestra*



*Nota.* Representación del porcentaje de motilidad progresiva en base al estado de la muestra (Fresco y descongelado) y el uso de antioxidantes. (A) Toro 1 y (B) Toro 2. Fuente: Elaboración propia.

En la figura 5A y 5B se determina la diferencia entre los estados de la muestra de semen fresco y descongelado, se observa valores más altos de motilidad progresiva en el semen fresco comparado con el descongelado.

Las medias del semen fresco del Toro 2 oscilan desde 73-75%, este resultado concuerda con los valores de motilidad progresiva obtenidos por (Cabrera Próspero & Pantoja A, 2017). Con respecto al ejemplar Toro 1 las medias de motilidad del semen fresco están entre 47-53%, es decir, en el límite del valor mínimo aceptado que es el 50% para criopreservación (Páez Barón & Corredor Camargo , 2014).

Con respecto a los valores del Toro 2 de semen descongelado, se observa que el porcentaje de motilidad progresiva está entre el 10-14%, este valor es bajo al comparar con los valores mencionados por (Li et al., 2014), que señala que el valor mínimo admisible es del 20%

de motilidad progresiva. No así los valores de motilidad progresiva del Toro 1 oscila entre 17-20% mismos que llegan a obtener los valores mínimos de motilidad del semen descongelado.

(Ribeiro Peres et al., 2014) señalan que, en el proceso de congelamiento del esperma bovino, la membrana celular sufre daños que afecta la morfología, estructura y función de la célula espermática lo cual afecta en el porcentaje de motilidad, posiblemente estos fenómenos ocurrieron en las muestras de los ejemplares en estudio y es la razón del porcentaje de motilidad progresiva reducido en especial del Toro 2.

### Comparación morfológica de semen fresco y descongelado

La morfología espermática observada luego de realizar los tres tipos de tinciones se detalla en la tabla 6.

**Tabla 6**

*Resumen experimental: Porcentaje de anomalías en semen fresco y descongelado.*

*Usando tres tipos de tinciones.*

		% de anomalías		
		Tinciones		
Ejemplares	Estado de la muestra	Farely	Spermac	Triple tinción
Toro 1	Fresco	45,85 ± 0,27	43,15 ± 0,50	42,25 ± 1,06
Toro 1	Descongelado	65,72 ± 0,94	63,00 ± 0,71	56,83 ± 3,67
Toro 2	Fresco	49,14 ± 1,92	31,93 ± 0,13	26,66 ± 1,12
Toro 2	Descongelado	63,93 ± 1,75	42,22 ± 1,01	37,98 ± 2,86
Estado de la muestra (valor de p)		<0,0001		
Tinciones (valor de p)		<0,0001		
Ejemplares (valor de p)		<0,0001		

Ejemplares\*Estado de muestra (valor  $<0,0001$

de p)

Ejemplares\*Tinciones (valor de p)  $<0,0001$

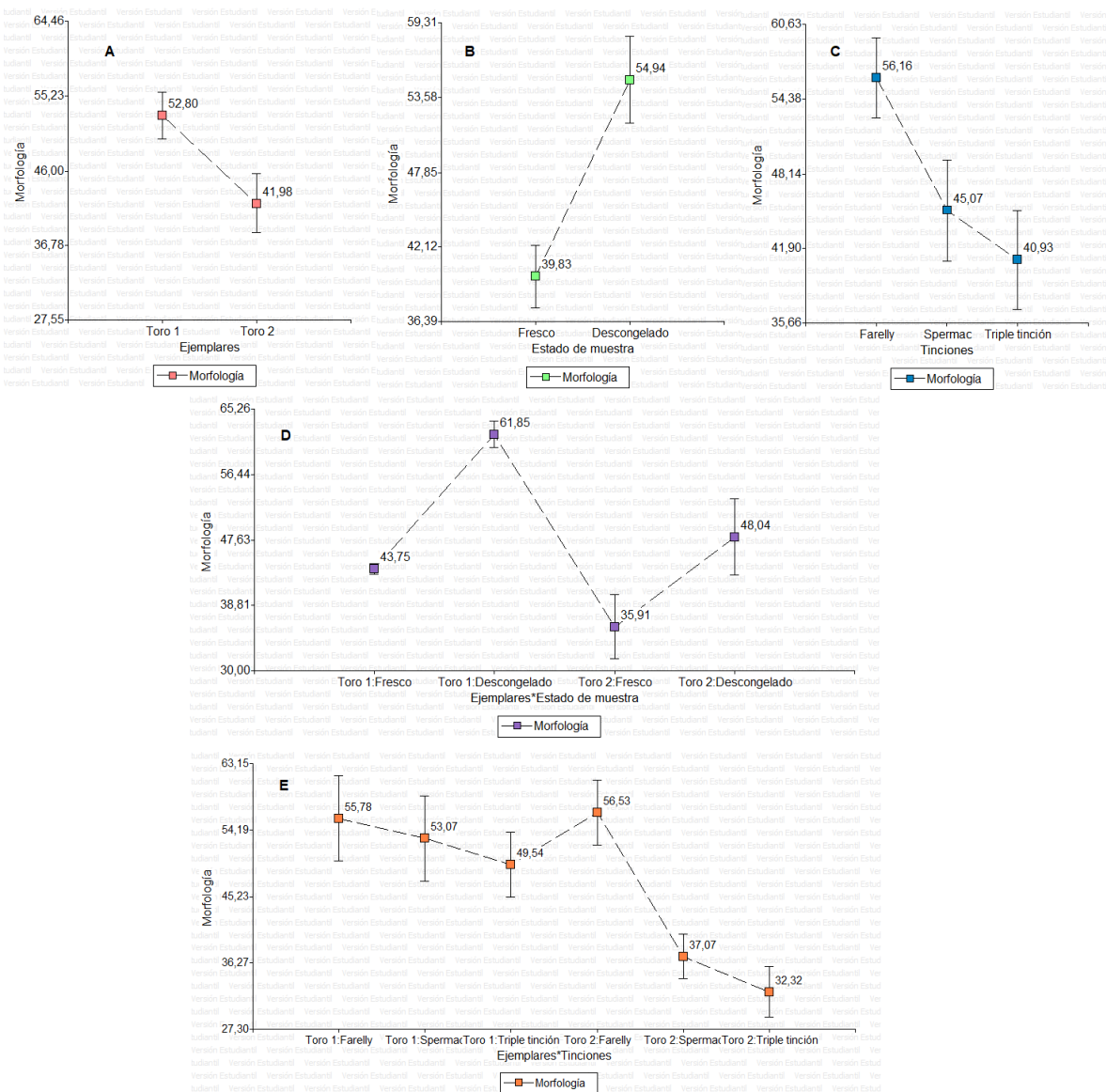
---

*Nota.* Síntesis de análisis ANOVA de tres factores, destacando diferencia de medias del porcentaje de anomalías en el estado de la muestra, tinciones, ejemplares, interacción entre los ejemplares y el estado de muestra, además de la interacción entre los ejemplares y tinciones, mediante el p value  $> 0,05$ . Fuente: Elaboración propia.

Considerando el p value ( $p > 0,05$ ) se obtienen diferencias significativas en el estado de la muestra (fresco y descongelado), tipos de tinciones, ejemplares y la interacción de los ejemplares con las tinciones al momento de evaluar el porcentaje de anomalías presentes en las muestras obtenidas. Para una mejor comprensión se realizó el análisis de cada factor ver la figura 6.

**Figura 7**

*Efecto de los factores en el porcentaje de morfología espermática.*



**Nota.** (A) Influencia de los ejemplares bovinos en el porcentaje de anomalías espermáticas.

(B) Efecto del estado de la muestra en el porcentaje de anomalías espermáticas. (C)

Efecto de los tres tipos de tinciones en el porcentaje de anomalías. (D) Influencia de la

interacción entre los ejemplares y estado de la muestra en el porcentaje de anomalías

espermáticas. (E) Influencia de la interacción entre los ejemplares y los tres tipos de tinciones empleadas en el porcentaje de anomalías espermáticas. Fuente: Elaboración propia.

En la figura 6A se observa la diferencia de los ejemplares en las medias del porcentaje de anomalía espermática y aquí se destaca la raza de cada uno. En el caso del Toro 2 es una raza mixta 3/4 Gyr-Holstein, mientras que el Toro 1 es 5/8 Gyr-Holstein. Los autores (Hoflack et al., 2007) mencionan que existe diferencia en la calidad del semen dependiendo el tipo de raza, esto es debido a la información genética de cada especie.

En la figura 6B se destaca que el estado de la muestra presenta diferencias considerables con respecto a las medias obtenidas de los porcentajes de anomalías y se refleja que en el semen descongelado existe un aumento en el porcentaje de anomalías. Debido posiblemente a diferentes aspectos señalados por (Molano Villamil & Lombana Portes, 2021) en donde se destaca el proceso de diferentes tipos de estrés (osmótico, oxidativo, peroxidación y formación cristales) afectando la integridad de la membrana, de diferentes orgánulos y la degradación o rompimiento del ADN.

En la figura 6C se observan diferencias entre los tres tipos de tinciones usados (Farely, Spermac y Triple tinción), esto considerando las medias del porcentaje de anomalías espermáticas. Se destaca que la tinción Farely demostró una mejor identificación de anomalías en comparación de las tinciones restantes.

La composición del colorante Farely consta de un reactivo A (solución fijadora), reactivo B (Anilina azul) y reactivo C (Cristal Violeta). El contraste de los dos colorantes permite la visualización de la cabeza, el acrosoma, la línea ecuatorial, pieza media y la cola de la célula espermática, se recomienda usar este tipo de tinción en semen diluido (Minitube, 2017).

El pack de tinción Spermac consta de cuatro reactivos un fijador, el componente A es un colorante rojo, el componente B es colorante verde claro, el componente C es un colorante

verde oscuro, se emplea para observar la cabeza, acrosoma, línea ecuatorial, pieza media y la cola. Es usado comúnmente para muestras de semen congelado (Minitube, 2017).

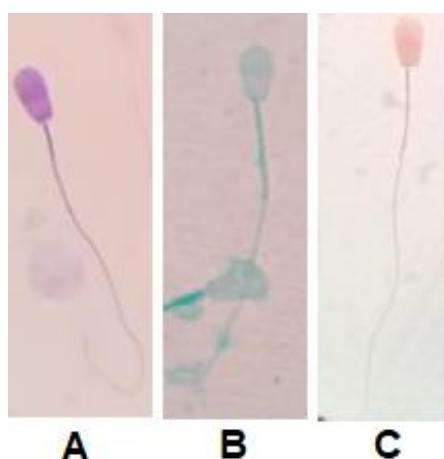
La técnica de triple tinción consta de tres colorantes, el azul tripán permite diferenciar células espermáticas vivas o muertas, el rosa de bengala o rojo neutro que tiñe de color a los espermatozoides con cromosomas sanos y el café Bismark que permite la visualización del estado del acrosoma y de la cabeza (Talbot & Chacon , 2018).

En el apartado 6D se identificó que existe diferencia de medias entre la interacción de los ejemplares y el estado de la muestra seminal, siendo así que la media con mayor porcentaje de anomalías esta entre el Toro 1 con semen descongelado.

Estadísticamente se visualiza en la figura 6E que la interacción de los factores ejemplar y tinción empleada mostró mayor porcentaje de anomalía en el Toro 2 al utilizar la tinción Farelly.

### Figura 8

*Comparación de la morfología espermática usando los tres tipos de tinciones*



*Nota.* (A) Espermatozoide con tinción Farelly. (B) Célula espermática teñido con Spermac. (C) Espermatozoide bovino con triple tinción. Fuente: Elaboración propia.



En la figura 7 se observa la cabeza, pieza media y cola de la célula espermática. La tinción Farelly permite mejor observación de cada sección del espermatozoide al comparar con otras tinciones, se observa sedimentados y una mala distribución del colorante impidiendo una lectura correcta.

### **Efecto del antioxidante en las principales anomalías espermáticas en la tinción**

#### **Farelly**

Estadísticamente la tinción Farelly diferencia mejor las anomalías espermáticas, por tal razón se lo utilizó para observar las morfologías anormales de las muestras seminales que tenían el antioxidante (ácido ascórbico), se consideraron cuatro categorías principales: Defectos de cabeza, pieza media y de flagelo como también la gota citoplasmática tanto distal como proximal. Los resultados se detallan en la tabla 7.

**Tabla 7**

Resumen estadístico del efecto de dos concentraciones de antioxidantes en las principales anomalías espermáticas en el Toro 1

Parámetros	Defectos de cabeza		Defectos de pieza media		Gotas citoplasmáticas		Defecto de flagelo	
	Fresco	Congelado	Fresco	Congelado	Fresco	Congelado	Fresco	Congelado
Sin antioxidante	11,94 <sup>a</sup>	15,74 <sup>a</sup>	1,18 <sup>a</sup>	3,16 <sup>a</sup>	1,89 <sup>a</sup>	2,05 <sup>a</sup>	30,17 <sup>b</sup>	43,56 <sup>a</sup>
Concentración 1	9,39 <sup>a</sup>	16,89 <sup>a</sup>	6,68 <sup>a</sup>	1,22 <sup>a</sup>	1,89 <sup>a</sup>	2,83 <sup>a</sup>	22,12 <sup>c</sup>	36,55 <sup>b</sup>
Concentración 2	11,41 <sup>a</sup>	16,80 <sup>a</sup>	3,68 <sup>a</sup>	5,34 <sup>a</sup>	4,04 <sup>a</sup>	1,81 <sup>a</sup>	21,39 <sup>c</sup>	33,10 <sup>b</sup>

*Nota.* Valores de medias de las principales anomalías espermáticas. Diferencia de medias en el parámetro de defectos de flagelo, grupos distintos representan diferencia significativa con el valor de  $p < 0,05$ . Fuente: Elaboración propia.

La influencia del ácido ascórbico (Vitamina C) se reflejó en las anomalías del flagelo, representando medias estadísticamente diferentes por un p value menor a 0,05.

La influencia del ácido ascórbico (Vitamina C) se reflejó en las anomalías de cabeza, gotas citoplasmáticas y defectos del flagelo, representando medias estadísticamente diferentes con un p value menor a  $p > 0,05$ .

### Tabla 8

*Resumen estadístico del efecto de dos concentraciones de antioxidantes en las principales anomalías espermáticas en el Toro 2.*

Parámetros	Defectos de cabeza		Defectos de pieza media		Gotas citoplasmáticas		Defecto de flagelo	
	Fresco	Congelado	Fresco	Congelado	Fresco	Congelado	Fresco	Congelado
Sin antioxidante	32,28 <sup>c</sup>	52,99 <sup>a</sup>	0,99 <sup>a</sup>	3,00 <sup>a</sup>	7,45 <sup>a</sup>	1,75 <sup>c</sup>	7,94 <sup>b</sup>	6,22 <sup>b</sup>
Concentración 1	16,42 <sup>d</sup>	45,17 <sup>b</sup>	0,98 <sup>a</sup>	0,24 <sup>a</sup>	3,19 <sup>b</sup>	0,99 <sup>c</sup>	25,25 <sup>a</sup>	4,91 <sup>b</sup>
Concentración 2	32,27 <sup>c</sup>	43,83 <sup>b</sup>	1,70 <sup>a</sup>	1,00 <sup>a</sup>	4,35 <sup>b</sup>	0,75 <sup>c</sup>	6,32 <sup>b</sup>	9,36 <sup>b</sup>

*Nota.* Valores de medias de las principales anomalías espermáticas. Diferencia de medias en el parámetro de defectos de cabeza, gotas citoplasmáticas y defectos de flagelo, grupos distintos representan diferencia significativa con el valor de  $p \text{ value} < 0,05$ . Fuente: Elaboración propia.

Se destaca que el uso de ácido ascórbico como un aditivo en el diluyente tiene beneficios en el rendimiento de los espermatozoides por su efecto crioprotector. Mediante el proceso de eliminar los radicales libres que pueden alterar la integridad de la membrana celular espermática (Barragán Barragán , 2017).

## **Capítulo V:**

### **Conclusiones**

Se analizó la morfología espermática del semen fresco y descongelado con tres tinciones diferentes, el uso de Farelly permitió una mejor diferenciación de los dos estados de la muestra seminal a comparación de los otros tipos de tinciones.

El efecto del antioxidante (ácido ascórbico) en la morfología espermática generó un efecto crioprotector en anomalías de cabeza y defectos de cola considerando los estados de la muestra seminal.

Se estableció que el porcentaje de motilidad progresiva está influenciado por el estado de la muestra seminal.

## **Capítulo VI:**

### **Recomendaciones**

Estandarizar el protocolo de triple tinción y añadir un fijador para mejores resultados.

El uso de otro tipo de tinciones como Papanicolau, Eosina-Nigrosina y Diff-Quik pueden compararse en investigaciones futuras.

Se recomienda utilizar la herramienta de análisis de morfología del Sistema CASA a fin de comparar y validar resultados.

Evaluar la morfología espermática utilizando diferentes tipos de antioxidantes y con mayor amplitud de concentraciones.

## Capítulo VII:

### Bibliografía

- Alarcón , P., Brienza, I., Cámpora, T., Capocasa, J., Masiá Rojkin , M., & Scataglini, M. (2020). Morfología espermática y tinciones . *Universidad Nacional De Rosario* , 11.
- Bariogilio , C. F. (2001). *Diccionario de Producción Animal* (Vol. 2). Argentina : Brujas .
- Barragán Barragán , I. (2017). Evaluación del efecto crioprotector de diferentes fuentes de antioxidantes en el semen Bovino . *Trabajo de titulación* .
- Bearden , H., & Fuquay, J. (1982). *Reproducción Animal aplicada*. México : El manual Moderno .
- Blom, E. (1977). Sperm morphology with reference to bull infertility. 61-81.
- Busch , W., & Waberksi , D. (2007). *Manual de inseminación artificial de los animales domésticos y de explotación zootécnica*. Alemania: Atribia S.A.
- Cabrera Próspero , V., & Pantoja A, C. (2017). Sperm viability and acrosome integrity in national frozen bull semen. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 23.
- Corredor Hernández, L., Moreno Quintero, A., Rodríguez Camargo, O., & López Rojas, M. (2017). Evaluación de la integridad funcional y estructural de espermatozoides caprinos criopreservados mediante diluyentes comerciales. *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*, 10.  
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=95950495006>
- Domínguez Vidal , R. I., Sánchez Hernández , F. E., & López Gómez , J. J. (2020). *Manual de biotecnologías reproductivas y conservación de germoplasma* . Universidad Juárez Autónomas de Tabasco .

- Duque Villa, N., Valencia Giraldo , J., Cómez Londoño, G., & Henao Uribe , F. (2016). The effect of errors regarding frozen semen insemination on bovine sperm morphophysiology. *Orinoquia*, 20.
- Durán, M., Stella, M., & Castillo, D. (2018). Efecto del método de extracción del semen en la calidad espermática de toros Sahiwal. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 22(1), 8.
- Ferreras, R. P. (2014). *Estudio de la calidad seminal del toro de Lidia: Fragmentación del ADN espermático* . Tesis doctoral .
- G.E. Freneau. (2011). Sperm morphology aspect in bulls. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 35, 10.
- Ghirardosi, M. S., Fischman, M., Jorge, A., Chan, D., & Cisale, H. (2018). Relationship between morphological abnormalities in commercial bull frozen semen doses and conception rate. *Andrologia*, 5. <https://doi.org/10.1111/and.12884>
- Hafez, E. (2002). *Reproduccion e inseminacion artificial* (7ma ed.). MCGRAW HILL.
- Hidalgo Ordoñez, C., Tamargo Miguel , C., & Diez Monforte , C. (2005). Análisis del semen bovino. *Boletín informativo del SERIDA* .
- Hoflack , G., Opsomer, G., Rijsselaere, T., Van Soom, A., Maes, D., De Kruif, A., & Duchateau, L. (2007). Comparison of Computer-assisted Sperm Motility Analysis Parameters in Semen from Belgian Blue and Holstein–Friesian Bulls. *Reproduction in Domestic Animals*. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00745.x>
- INEC. (2021). *Documento metodológico de la Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua (ESPAC)*. Quito .

- Jiang, H., Kwon, J.-w., Lee, S., Jo, Y.-J., Namgoong, S., Yao, X.-r., . . . Kim, N.-H. (2019). Holstein and Korean native cattle using three-dimensional refractive index tomography. *Scientific Reports*, 9.
- Kondracki, S., Wysokińska, A., Kania, M., & Górski, K. (2017). Application of Two Staining Methods for Sperm Morphometric Evaluation in Domestic Pigs. *J Vet Res*, 5.
- Kumar Ahirwar, M., Kataktalware , M., Prasad, K., Prakash Pal , R., Barman , D., & Thul and Naval Rawat, M. (2018). Effect of non-genetic factors on semen quality in bulls: A review. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 6.
- Kvist, U., & Björndahl, L. (2004). *Manual de Análisis Básico de Semen*. Monografías de la ESHRE.
- Li, Y., Kalo , D., Zeron , Y., & Roth , Z. (2014). Progressive motility – a potential predictive parameter for semen fertilization capacity in bovines. *Cambridge University*, 13. <https://doi.org/https://doi.org/10.1017/S0967199414000720>
- López Rivadeneyra, E., Stone , B., Navarro Martínez , C., & P Marrs , R. (2001). Impacto del ácido ascórbico y su correlación con la reacción acrosomal, movilidad espermática, acridina naranja y prueba de penetrancia en huevo de hámster. *Revista de la Asociación Médica del Centro Médico ABC*, 46, 7.
- Lozano , H. (2009). Factores que afectan la calidad seminal en toros . *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia* , 15. <https://doi.org/56:258-272>
- Mallma Marca, P. (2019). Colorantes Diff-Quik y Eosina-Nigrosina en la evaluación morfológica de espermatozoides antes y después de la criopreservación del semen del toro Holstein. *Trabajo de grado* . Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac, Abancay, Perú.

- Martins, C., Nunes Dode, M., & Feliciano Silva, A. (2016). *Atlas de Morfología Espermática Bovina*. Brasil : Embrapa Cerrados.
- Minitube. (2017). Tecnología de Reproducción Animal Bovina.
- Molano Villamil, D., & Lombana Portes, H. (2021). Fundamentos y métodos para la dilución y congelación de semen bovinos. *Universidad Cooperativa de Colombia Sede Villavicencio*.
- Morris, J., Acton, G., Murray, B., & Fonseca, F. (2012). Freezing injury: the special case of the sperm cell. *Cryobiology*.
- Muiño Otero, R. (2008). Evaluación de la motilidad y viabilidad del semen bovino mediante el uso de sistemas CASA y citometría de flujo: Identificación de subpoblaciones espermáticas. *Tesis Doctoral*. Universidad de Santiago de Compostela.  
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.11.028>
- Muiño, R., Fernández, M., Areán, H., Viana, J., & López, M. (2005). Nuevas tecnologías aplicadas al procesado y evaluación del semen bovino en centros de inseminación artificial. *ITEA*, 101(3), 17.
- Páez Barón, E. M., & Corredor Camargo, E. S. (2014). Evaluación de la aptitud reproductiva del toro. *Ciencia y Agricultura*, 11. <https://doi.org/0122842049>
- Rangel Porta, L. E., Alarcón Zapata, M. A., Galina Hidalgo, C., Hernández Cerón, J., Porras Almeraya, A. I., Valencia Méndez, J. d., . . . Páramo Ramírez, R. (2009). *Manual de prácticas de reproducción animal*. México : Universidad Nacional Autónoma de México .  
<https://doi.org/9786070204012>
- Ribeiro Peres, A., Munita Barbosa, L., Yumi Kanazawa, M., Mello Martins, M., & Ferreira de Souza, F. (2014). Cryopreservation of bovine spermatozoa from the epididymal tail



- using conventional and automated methods. *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Estadual Paulista*, 8.
- Talbot, P., & Chacon , R. (2018). A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. *Exp Zool*. <https://doi.org/10.1002/jez.1402150210>
- Tecnológico, I. N. (2016). *Anatomía y fisiología animal* . Nicaragua : Gobierno de reconciliación y Unidad Nacional .
- Toro Montoya , A. (2009). *Espermograma*. Colombia : Editora Médica Colombiana S.A.
- Vasquez , F., & Vasquez Echeverri , D. (2007). Espermograma y su utilidad clínica. *Salud Uninorte*, 23, 0. <https://doi.org/0120-5552>
- Velásquez Vergara, C. (2020). Factores que influyen en la calidad y principales características seminales del verraco. *Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión*, 13.
- Viotti, G. (2011). Procesamientos de semen bovino para la inseminación artificial . *Universidad de la república* , 71.
- Westfalewicz, B., Słowińska, M., Judycka, S., Cierieszko, A., & A. Dietrich, M. (2021). Comparative Proteomic Analysis of Young and Adult Bull (*Bos taurus*) Cryopreserved Semen. *Animals (Basel)*, 13.