



**Evaluación de la motilidad del semen bovino Gyrholando fresco y criopreservado para determinar el porcentaje de motilidad progresiva mayor o igual al 60% con equipo CASA**

Lara Pazmiño, Hadassa Judith

Departamento de Ciencias de la Vida y Agricultura

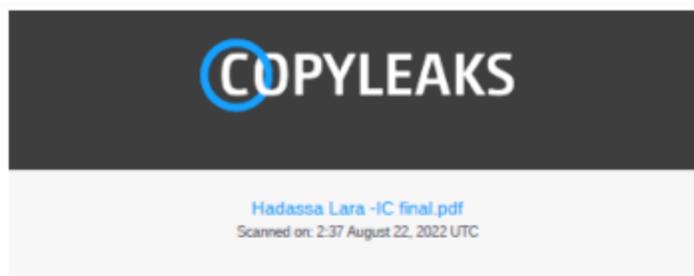
Carrera de Ingeniería en Biotecnología

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

Carrera Garcés, Fredy Patricio, Ph.D.

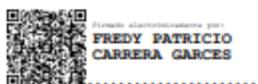
22 de agosto de 2022

## Reporte de verificación de contenido



Identical Words	161
Words with Minor Changes	63
Paraphrased Words	333
Omitted Words	142

Firma:



**Carrera Garcés, Freddy Patricio, Ph.D.**  
**Director del Trabajo de Integración Curricular**



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

**Carrera de Biotecnología**

**Certificación**

Certifico que el trabajo de integración curricular: **"Evaluación de la motilidad del semen bovino Gyrholando fresco y criopreservado para determinar el porcentaje de motilidad progresiva mayor o igual al 60% con equipo CASA"** fue realizado por la señorita **Lara Pazmiño, Hadassa Judith**, 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:



**Carrera Garcés, Freddy Patricio, Ph.D.**

C.C.: 0602031569



Departamento de Ciencias de la Vida y Agricultura

Carrera de Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Lara Pazmiño, Hadassa Judith**, con cédula de ciudadanía n°0925743783, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **Evaluación de la motilidad del semen bovino Gyrholando fresco y criopreservado para determinar el porcentaje de motilidad progresiva mayor o igual al 60% con 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

.....  
**Lara Pazmiño, Hadassa Judith**

C.C.: 0925743783



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

**Carrera de Biotecnología**

**Autorización de Publicación**

Yo **Lara Pazmiño, Hadassa Judith**, con cédula de ciudadanía n°0925743783, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **Evaluación de la motilidad del semen bovino Gyrholando fresco y criopreservado para determinar el porcentaje de motilidad progresiva mayor o igual al 60% con equipo CASA** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mí/nuestra responsabilidad.

**Santo Domingo de los Tsáchilas, 22 de agosto del 2022**

Firma

**Lara Pazmiño, Hadassa Judith**

C.C.: 0925743783

## Dedicatoria

Dedico el fruto de este trabajo a mis padres, Juan y Jessica por brindarme su guía, su amor incondicional y el apoyo para concluir esta etapa de mi vida, ustedes seguirán siendo mis luces por este sendero llamado vida.

A mi hermano David por consentirme y brindarme su fraternal cariño para seguir adelante, impulsándome en mis sueños y metas con sus consejos.

A mi amiga Solange por tu tiempo y las experiencias que compartimos, si la vida nos volvió a juntar debió ser por una buena razón.

A mis preciadas Damaris y Lizeth con ustedes sentí una conexión especial al poco de conocernos y cuya amistad atesoro en lo más profundo de mi corazón.

A mi inolvidable Gabriela, contigo experimenté diversas lecciones de vida que de alguna forma forjaron una parte de lo que soy ahora.

A quien una vez fue mi confidente y el colaborador de mis locuras, un buen amigo.

A mi bebé Blisa por la alegría y preocupaciones que me diste.

A mi querido gremio por mostrarme la alegría de compartir con diversas personas en distintas partes del mundo y afrontar diversas travesías, en especial Agustina, Alison, Maricel, Nahuel, Angélica, Sheila y Jazmín.

*Quien busca la felicidad fuera de sí es como un caracol que caminara en busca de su casa.*

Constancio C. Vigil

## Agradecimientos

A Dios por la vida que me fue otorgada, por el esfuerzo y la constancia que adquirí para culminar este trabajo, así como la voluntad para continuar con mis metas.

A mi tutor Dr. Fredy Carrera y al Ing. Andrés Vargas quienes con sus conocimientos y apoyo me guiaron a través de cada una de las etapas de este proyecto para alcanzar los resultados que buscaba.

A mis compañeras Solange, Marjorie y Ariana por su apoyo e ideas para completar las diferentes actividades de este trabajo.

A la Universidad de las Fuerzas Armadas y a sus docentes por brindarme los recursos, las herramientas y las experiencias que fueron necesarios para llevar a cabo el proceso de investigación.

A mi familia por el incondicional apoyo que me dieron para culminar esta etapa de mi vida, Juan, Jessica, David e Iosef. A mi segunda familia por su presencia y la chispa que dieron a mi vida en momentos preciados de mi vida.

A mis amigas incondicionales Damaris, Lizeth y Gabriela por su apoyo, su cariño y su presencia en los buenos y malos momentos.

A Johan por brindarme su cálida amistad en los buenos y malos momentos de mi vida, por el tiempo que compartimos y por aquellas diversas emociones que experimenté en tu compañía.

*A todos ustedes, quienes guardo en mi corazón, muchas gracias.*

## Índice de Contenido

Carátula .....	1
Reporte de verificación de contenido .....	2
Certificación .....	3
Responsabilidad de autoría.....	4
Autorización de publicación.....	5
Dedicatoria.....	6
Agradecimientos .....	7
Índice de Figuras .....	11
Índice de Tablas.....	12
Resumen .....	13
Abstract.....	14
Capítulo I: Introducción .....	15
Planteamiento del problema .....	16
Justificación.....	17
Objetivos .....	18
Objetivo General.....	18
Objetivos específicos .....	19
Capítulo II: Marco teórico .....	19
Aparato Reprodutor del Macho.....	19
Espermatogénesis.....	21
El semen .....	23

Evaluación del semen fresco.....	24
Concentración.....	25
Motilidad .....	25
Viabilidad y morfología.....	26
Crioconservación del semen bovino .....	27
Daños de membrana .....	30
Especies reactivas de oxígeno (ROS).....	30
Proceso de dilución seminal.....	30
Vitaminas .....	31
Evaluación de la motilidad en semen congelado.....	31
Capítulo III: Ubicación, materiales y métodos .....	33
Ubicación del Área de Investigación.....	33
<i>Ubicación Política</i> .....	33
<i>Ubicación Ecológica</i> .....	33
<i>Ubicación Geográfica</i> .....	33
Equipos .....	34
Insumos.....	34
Reactivos .....	35
Biológicos.....	35
Metodología .....	35
Recolección y evaluación seminal.....	35

Preparación de la dilución Optixcell y dilución del semen .....	36
Análisis de motilidad progresiva en el sistema CASA y viabilidad del semen fresco.....	36
Congelamiento del semen bovino.....	36
Descongelamiento de semen bovino y análisis de la motilidad y viabilidad. ....	37
Diseño experimental y análisis estadístico .....	37
Capítulo IV: Resultados y Discusión .....	38
Análisis de motilidad espermática medido por CASA .....	38
Capítulo V: Conclusiones.....	45
Capítulo VI: Recomendaciones .....	46
Capítulo VII: Bibliografía .....	47

**Índice de Figuras**

<b>Figura 1</b> <i>Anatomía del testículo y epidídimo</i> .....	20
<b>Figura 2</b> <i>Morfología del espermatozoide</i> .....	22
<b>Figura 3</b> <i>Curva de supervivencia celular acorde con la velocidad de congelamiento</i> .....	28
<b>Figura 4</b> <i>Esquema de los procesos físicos ocurridos durante el proceso de congelamiento</i> .....	29
<b>Figura 5</b> <i>Ubicación geográfica del área de investigación</i> .....	34
<b>Figura 6</b> <i>Parámetro de motilidad espermática en muestras de fresco y descongelado</i> .....	41
<b>Figura 7</b> <i>Correlación de Pearson entre las variables respuesta</i> .....	44

**Índice de Tablas**

<b>Tabla 1</b> <i>Componentes químicos del semen bovino</i> .....	24
<b>Tabla 2</b> <i>Análisis macroscópico del semen fresco de toros</i> .....	38
<b>Tabla 3</b> <i>Parámetros de motilidad espermática en muestras antes y después del congelamiento aplicando dos curvas de congelamiento junto con la adición de antioxidante</i> .....	39
<b>Tabla 4</b> <i>Media de los parámetros de motilidad espermática antes y después del congelamiento aplicando dos curvas de congelamiento junto con la adición de antioxidante para Toro 2.</i> .....	40
<b>Tabla 5</b> <i>Nivel de significación de la Correlación de Pearson entre las variables de respuesta</i> ..	43

## Resumen

Ecuador es un país productor de ganado siendo el sector bovino uno de los rubros más importantes, por lo que se utilizan diversas tecnologías para mejorar su material genético y reproductivo. La criopreservación de semen bovino permite mantener el material genético de un reproductor de interés por tiempo indefinido, por tanto, su aplicación es fundamental para preservar las tasas de producción de carne y leche. Esta investigación tiene como objetivo evaluar el semen fresco y descongelado de dos bovinos con motilidad progresiva mayor o igual al 60% utilizando el sistema CASA y determinar su relación con el índice de linealidad espermática. Los resultados muestran que el Toro 2 en comparación con el Toro 1 cumple con el esquema mencionado, indicando diferencias entre los reproductores. El efecto que genera la aplicación de la curva de congelación tiene un impacto significativo en la motilidad progresiva, por lo general, el 40-50% de la población espermática no sobrevive al proceso. Por otro lado, las tasas de enfriamiento de 0,5°C/min y 1°C/min presentan resultados estadísticamente iguales. La adición de 4 µM de ácido ascórbico no supuso ninguna diferencia en el control, por lo que la cantidad utilizada puede no haber sido la necesaria. Finalmente, se encontró correlación positiva entre la motilidad total y progresiva, entre los parámetros cinemáticos (VCL, VSL y VAP) y entre los índices de velocidades (LIN, STR y WOB).

**Palabras claves:** Criopreservación, Motilidad progresiva, Equipo CASA

### **Abstract**

Ecuador is a producing cattle country, and the bovine sector is one of the most important entries, therefore, therefore several technologies are used to improve its genetic and reproductive material. Semen cryopreservation makes it possible to maintain viable the genetic material of an interest breeder for an indefinite period hence its application is crucial to preserving meat and milk production rates. This research aims to evaluate the fresh and post-frozen semen of two bovines greater than or equal to 60% progressive motility using the CASA system and determine its relationship with the linearity index of sperm. Results show that Bull 2 compared to Bull 1 complies with the mentioned scheme, indicating difference between breeders. The effect generated by applying the freezing curve has a significant impact on progressive motility, in general, 40-50% of the sperm population do not survive the process. On the other hand, the freezing curves of 0.5°C/min and 1°C/min ended up with the same results. Adding 4 µM of acid ascorbic made no difference in the control thus the amount used may not have been necessary. Finally, correlation was found between total and progressive motility, between kinematic parameters (VCL, VSL, VAP) and velocity index (LIN, STR, WOB).

**Keywords:** Cryopreservation, Progressive motility, CASA System.

## Capítulo I: Introducción

Ecuador es considerado como un país de producción agropecuaria, siendo la ganadería una actividad económica importante tanto en la producción de carnes y derivados, como para la población rural. Al ser un país productor de ganado, el sector bovino constituye uno de los rubros más importantes para el país estimando una producción del 48% correspondiente a la cadena de productos lácteos y un 45% a la cadena de cárnicos (Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca, 2016).

El sector ganadero debido a su importancia utiliza diferentes tecnologías para el mejoramiento genético y reproductivo del ganado bovino entre los que destaca la inseminación artificial (IA), que consiste en la introducción de semen de toros genéticamente seleccionados por sus características productivas (Marizancén & Artunduaga, 2017).

Un eyaculado fecundante presenta las siguientes cualidades según (Hidalgo y otros, 2005) son: integridad estructural y funcionalidad de la membrana, integridad de las enzimas asociadas con la fecundación capacidad de penetración y transferencia óptima del material genético, capacidad para desarrollar una movilidad hiperactivada, movilidad progresiva, morfología normal y metabolismo energético activo. No obstante, para el análisis de semen fresco se evalúan tanto las características macroscópicas: olor, color y volumen, como las microscópicas: motilidad, morfología, viabilidad y concentración espermática (Páez & Corredor, 2014).

La técnica de congelamiento de semen o criopreservación permite mantener viable el material genético de una especie de interés por tiempo indefinido aplicando bajas temperaturas con ayuda de sustancias que otorgan termoresistencia a las células (Molano & Lombana, 2021). Las células espermáticas se almacenan a  $-196^{\circ}\text{C}$  en nitrógeno líquido, bajo estas condiciones de temperatura no se llevan a cabo reacciones químicas, en consecuencia, las

dificultades para el proceso de congelación se derivan de los procesos de enfriamiento y descongelamiento más que la permanencia a bajas temperaturas (Fernández y otros, 2009).

El almacenamiento a largo plazo del semen facilita su transporte a largas distancias, permite la cuarentena del semen y el uso prolongado de su germoplasma superior incluso luego de la muerte del toro (Bailey y otros, 2000). Dentro de la industria de animales la crioconservación del semen es fundamental para mantener las tasas de producción de carne y leche. Sin embargo, la principal desventaja de esta técnica es la muerte de al menos la mitad de la población de células espermáticas durante el proceso de congelación y descongelación, en los que diversos factores como la temperatura de almacenamiento, velocidad de enfriamiento, composición química del diluyente, concentración del crioprotector, especies reactivas de oxígeno (ROS), composición del plasma seminal y control higiénico afectan la vida útil de los espermatozoides, asimismo los parámetros de calidad del semen como la viabilidad, motilidad e integridad de la membrana son afectados (Hussain y otros, 2018).

Un aspecto importante de evaluación espermática antes y después del proceso de congelamiento es la valoración de la motilidad progresiva, este factor es esencial ya que determina la capacidad fecundante del espermatozoide al ovocito y además es un factor decisivo para examinar la viabilidad del espermatozoide y la integridad de la membrana plasmática. Por ende, un eyaculado que describe un bajo porcentaje de movilidad o una ausencia de este será descartado para su conservación o uso (Muiño, 2008).

### **Planteamiento del problema**

Durante el proceso de crioconservación una gran cantidad de espermatozoides sufren daños fisiológicos y estructurales por cambios en el equilibrio osmótico, estrés oxidativo y formación de cristales de hielo intracelular (Ugur y otros, 2019). Todos estos factores del proceso de criopreservación se encuentran limitados a la curva de congelación/descongelación que se emplea (Medina y otros, 2007). Por ejemplo, los resultados de Medina y otros, (2007)

mostraron porcentajes de motilidad del semen post descongelado significativamente menores con respecto al semen fresco.

La motilidad progresiva total de los espermatozoides luego del proceso de descongelación realizada por (Chaveiro y otros, 2015) presentó una disminución alrededor del 20%, demostrando que el proceso de congelación/descongelación repercute en la calidad del esperma. No obstante, la motilidad espermática obtenida por dichos autores tuvo un porcentaje aceptable del  $56.9 \pm 4.8\%$ .

Otras variables también fueron estudiadas para mejorar el protocolo de congelación de semen de toro por (Chaveiro y otros, 2006) sobre la viabilidad después de la congelación/descongelación de distintos componentes del medio y el efecto de las velocidades de enfriamientos en las distintas etapas del proceso. Otro estudio llevado a cabo por Arango et al., (2018) mejoró la curva de enfriamiento para la obtención de un semen criopreservado de mejor calidad basándose en los tiempos estipulados para evitar el estrés de los espermatozoides con respecto a la velocidad de enfriamiento, además de que el uso de nitrógeno fue más eficiente al automatizarse el sistema.

Estos antecedentes señalan la problemática de no poseer un protocolo de congelamiento/descongelamiento aplicable en cualquier situación y de la necesidad de mejorar los protocolos existentes para obtener un semen bovino de calidad luego del proceso de descongelamiento.

### **Justificación**

Debido a la importancia de la crioconservación de esperma para la producción, difusión y almacenamiento de las características de animales genéticamente superiores en todo el mundo, los procesos para el mejoramiento del método de criopreservación son de interés para muchos productores ganaderos. Por lo que el descubrimiento y desarrollo de los diluyentes

para semen tiene como finalidad proteger a los espermatozoides de los diversos factores nocivos que atraviesan durante la congelación y estabilizar sus propiedades incluyendo la morfología, motilidad, viabilidad, integridad de la membrana, y otros, siendo la motilidad espermática el parámetro más crítico para evaluar la fertilidad (Bustani & Baiee, 2021).

Un estudio reciente llevado a cabo por (Singh y otros, 2022) mostró que aplicando dosis de óxido de grafeno de 0.05 y 0.1 mg/ml la motilidad total y progresiva de los espermatozoides de bovinos y búfalos posterior al descongelamiento aumentaron significativamente en comparación con el control. Asimismo, la tasa de congelación de 50°C/min durante la zona de congelamiento de -15 a 60°C fue mucho más efectiva. Por otro lado, en los resultados de (Mosquera & Anchatuña, 2017) sobre el rendimiento de la motilidad espermática con diferentes tiempos de equilibrio a 5°C previo al proceso de congelamiento, mostró que un tiempo de 2 horas mostraba mejores resultados con un promedio de 60.75% de motilidad progresiva.

De ahí la tendencia a la búsqueda de nuevos crioprotectores como el óxido de grafeno (Singh y otros, 2022), la adición de antioxidantes para evitar el daño por las especies reactivas de oxígeno, la adición de azúcares para evitar el estrés osmótico, entre otros. Sin embargo, cabe destacar que la influencia más grande durante el proceso de crioconservación viene dada por la curva de congelamiento, por ende, la finalidad de este trabajo también es valorar y encontrar la curva de congelamiento que ofrezca los resultados de una motilidad progresiva mayor o igual al 60% luego del descongelamiento.

## **Objetivos**

### ***Objetivo General***

Evaluar la motilidad del semen bovino Gyrholando fresco y criopreservado para determinar el porcentaje de motilidad progresiva mayor o igual al 60% con equipo CASA.

### **Objetivos específicos**

- Evaluar la motilidad del semen fresco de bovino Gyrholando para determinar el porcentaje de motilidad progresiva mayor o igual al 60% con equipo CASA.
- Analizar la motilidad del semen bovino Gyrholando descongelado mediante el uso del equipo CASA.
- Determinar la relación de la motilidad progresiva con los parámetros cinemáticos de los espermatozoides en semen fresco/criopreservado bovino Gyrholando utilizando el equipo CASA.

## **Capítulo II: Marco teórico**

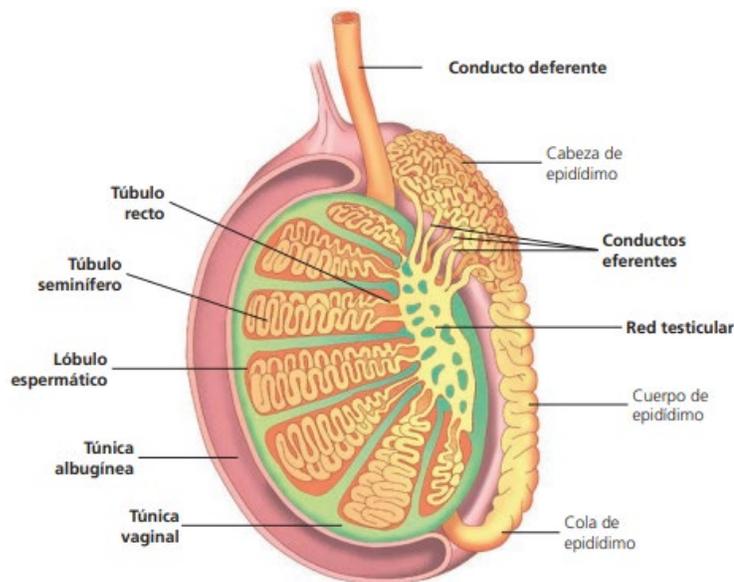
### **Aparato Reproductor del Macho**

El aparato reproductor está formado por varios órganos como: sistema de conductos masculinos, glándulas accesorias, cordones espermáticos prepucio, pene, testículos y escroto. Los testículos internamente están compuestos por vasos eferentes, conductos deferentes (Bearden & Fuquay, 1982)

Los testículos son los órganos productores de espermatozoides al interior de los túbulos seminíferos, a la vez estas gónadas generan también hormonas sexuales (andrógenos) que se originan en las células de Leydig (Bearden & Fuquay, 1982; Brinsko, 2003). Los testículos se encuentran ubicados en el interior del escroto que está fuera de la cavidad abdominal, los cuales tienen una forma ovalada y constan de una masa de túbulos seminíferos encapsulado por una membrana fibrosa delgada denominada túnica albugínea (Bearden & Fuquay, 1982; García, 2018) (véase figura 1). El descenso testicular se relaciona con el requerimiento de la temperatura para una adecuada espermatogénesis en el caso de los toros, la temperatura es 4° menor a la temperatura abdominal; una característica importante de este órgano es que su tamaño en el toro de monta puede llegar a medir hasta 13 cm de longitud, 8 cm de ancho y 280 g de peso cada uno (Gloobe, 1989).

## Figura 1

### *Anatomía del testículo y epidídimo*



*Nota.* Anatomía del testículo, la cabeza del epidídimo se conecta con el cordón espermático, luego de la cola del epidídimo se une el conducto deferente. Tomado de *Fisiología Veterinaria* por García, 2018, Editorial Tébar Flores.

Los túbulos seminíferos son delgados y enrollados dentro de una red ubicada en el eje del testículo conocida como la red testicular o *rete testis*. Las células de Sertoli cumplen funciones nutritivas y de sostén manteniendo sus actividades principales en la liberación de los espermatozoides, así como eliminando los desechos y restos citoplasmáticos durante la maduración del espermatozoide (García, 2018).

El epidídimo es un conducto sinuoso, largo y enrollado dividido en tres segmentos: cabeza, cuerpo y cola, este conducto aporta el medio adecuado para concentrar, madurar y capacitar a los espermatozoides (Brinsko, 2003). El tiempo de tránsito de los espermatozoides a través de la cabeza y el cuerpo del epidídimo es similar en todas las especies domésticas que va de 2 a 5 días, mientras que su almacenaje puede ser de 10 a 15 días (García, 2018).

El epidídimo continúa como conducto deferente mientras que a partir de la cabeza del epidídimo forma parte del cordón espermático (Brinsko, 2003), una estructura desarrollada dentro la cavidad abdominal hasta los testículos, que se compone de una vaina de tejido conectivo que recubre al conducto deferente, nervios, vasos sanguíneos y vasos linfáticos que nutren al testículo (García, 2018).

### **Espermatogénesis**

Los precursores de las células reproductoras son los gonocitos primordiales que dan lugar a las espermatogonias en la gónada masculina, el proceso de espermatogénesis es largo y encaminado a la división de las células madre diploides de la base de los túbulos seminíferos por mitosis para mantener su número y que a su vez generen progenies que se dividan de forma meiótica hasta diferenciarse en espermátidas haploides que maduren en espermatozoides. La espermatogénesis consta de dos etapas denominadas espermatocitogénesis, la cual ejerce una función proliferativa de divisiones mitóticas, y espermiogénesis, donde las espermátidas se transforman por completo en espermatozoides (García, 2018).

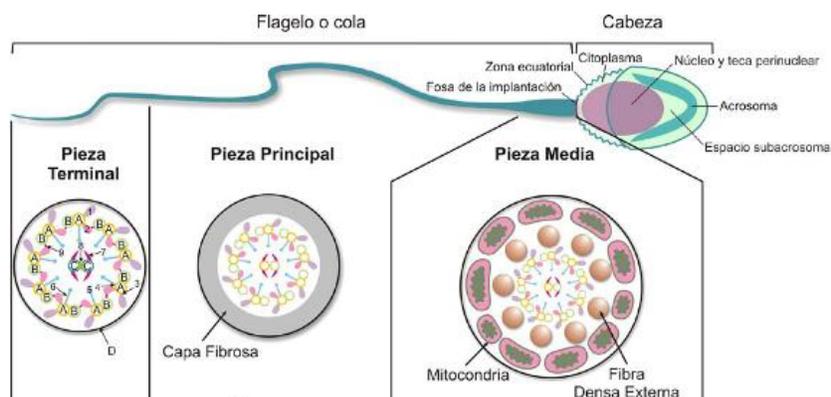
En la primera etapa las espermatogonias latentes se dividen mitóticamente, pero no entran en el ciclo y mantienen la población de células indiferenciadas, tal función es la responsable de la capacidad del macho de producir de forma continua espermatozoides durante toda la vida adulta (Brinsko, 2003). Por otro lado, las espermatogonias activas se transforman en espermatogonias tipo B que pasan al compartimiento luminal, se dividen por mitosis y se transforman en espermatoцитos primarios.

Consecutivamente, los espermatoцитos primarios se convierten en células haploides al atravesar un proceso de división celular meiótica al transformarse primero en espermatoцитos secundarios y después en espermátidas, de este modo se llegan a obtener cuatro espermatozoides (Marina, 2003).

La espermiogénesis se divide en cuatro procesos (figura 2) las cuales son la preparación del acrosoma, la condensación del núcleo, la formación del flagelo y la maduración (García, 2018).

## Figura 2

### Morfología del espermatozoide



*Nota.* Morfología final del espermatozoide: cabeza, cuello (pieza media) y cola. En la pieza media se ubican las mitocondrias. Tomado de El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización, por Olivera et. al, 2006, *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 19(4).

Durante la estructuración del acrosoma, el aparato de Golgi desprende vesículas que forman poco a poco la vesícula acrosomal para luego ubicarse en el ápice del núcleo. El centriolo proximal que rodea el aparato de Golgi se sitúa en la base del núcleo mientras que el axonema crece a partir del centriolo distal componiéndose por dos microtúbulos centrales y nueve pares de microtúbulos periféricos (Olivera y otros, 2006).

En la fase de condensación del núcleo, la vesícula acrosomal se aplana formando una capucha sobre el núcleo, este se compacta más al intercambiar las histonas por protaminas de forma que no existe ni replicación ni transcripción. Debido a que cesan los procesos de

transcripción del núcleo del espermatozoide, este se vuelve dependiente de las modificaciones postranscripcionales para acoplarse a sus necesidades (Olivera y otros, 2006).

Durante la siguiente fase, el acrosoma se ubica hacia la membrana basal, el citoplasma se traslada hacia la base de la cabeza y se coloca por debajo de la unión núcleo axonema; las mitocondrias se agrupan para estructurar la pieza intermedia y adquirir la morfología definitiva del espermatozoide (Olivera y otros, 2006). Finalmente, durante la maduración espermática la cabeza adquiere la forma peculiar de cada especie (oval y plana), la cola se dispone de las piezas intermedia, principal y final; mientras que el citoplasma se elimina por desplazamiento hacia la pieza terminal de la cola (véase figura 2) (Olivera y otros, 2006).

### **El semen**

El semen se compone de una suspensión celular semilíquida que contiene espermatozoides y plasma seminal. Los espermatozoides se generan dentro de los túbulos seminíferos de los testículos, cuando maduran son células alargadas que comprenden una cabeza aplanada portadora del núcleo y una cola que le permite la motilidad celular. La membrana plasmática recubre todo el espermatozoide, el acrosoma se ubica en el interior de la cabeza que consiste en una estructura de doble pared alojada en la porción anterior del núcleo. La cabeza se une con la cola mediante un cuello, y a su vez la cola se subdivide en segmentos medio, principal y terminal o caudal (Hafez & Garner, 1996). Algunas características y componentes químicos del semen de toro se describen en la tabla 1.

De acuerdo con el contenido del semen en bovino presentados en la tabla 1 es importante realizar la evaluación del semen fresco puesto que dicho análisis permite determinar la capacidad fecundante del semental y de esta forma optimizar los resultados de las tecnologías de reproducción asistida que se aplican en programas de cría, inseminación artificial y fecundación *in vitro* (Guataquira Velásquez, 2019).

**Tabla 1***Componentes químicos del semen bovino*

<b>Componentes</b>	<b>Valores</b>
Volumen del eyaculado (mL)	5 – 8
Concentración de espermatozoides (millones/mL)	800 – 2000
Espermatozoides eyacular (miles de millón)	5 - 15
Espermatozoides móviles (%)	40 – 75
Espermatozoides morfológicamente normales (%)	65 – 95
Proteína (g/ 100 ml)	6.8
pH	6.4 – 7.8
Fructuosa	460 – 600
Sorbitol	10 – 140
Ácido cítrico	620 – 806
Inositol	25 – 46
Glicerilfosforilcolina	100 – 500
Sodio	225 ± 13
Potasio	155 ± 6
Calcio	40 ± 2
Magnesio	8 ± 0.3
Cloruro	174 – 320

*Nota.* Adaptado de Hafez & Garner, (1996)

**Evaluación del semen fresco**

Una vez realizada la colecta del semen fresco, en laboratorio se debe evaluar las características macroscópicas y microscópicas del eyaculado. Dentro de las características

macroscópicas se evalúan el olor, característico de cada especie que no es desagradable; color, que depende del contenido de riboflavina que puede ir desde blanco lechoso hasta un lechoso oscuro; otra característica a evaluar es el volumen que depende de la raza, la edad, nutrición y el estado sanitario del ejemplar; el volumen, puede ser medido de forma directa en el tubo de recolección y varía entre 2 ml para especímenes jóvenes hasta 4 – 12 ml en especímenes adultos (Páez & Corredor, 2014).

En cuanto a las características microscópicas los parámetros tradicionalmente usados para conocer la calidad del eyaculado son: concentración, motilidad, viabilidad y morfología.

### ***Concentración***

El número de espermatozoides inseminados y la fertilidad guardan una estrecha correlación con la concentración, puesto que, cuanto mayor sea el número de espermatozoides con características normales mayor será la posibilidad de fertilización. Esta particularidad es importante cuando se utiliza semen descongelado puesto que el proceso que sufre a los cambios bruscos de temperatura provoca un daño irreversible en una proporción alta de espermatozoides (Hidalgo y otros, 2005).

Cabe destacar que existe una variabilidad significativa en las concentraciones de diferentes eyaculados tanto de un mismo toro como de toros diferentes, por ende, es esencial conocer la concentración espermática por eyaculado para calcular las dosis de pajuelas que serán congeladas.

### ***Motilidad***

La motilidad representa una variable importante durante el examen de semen, de modo que existen diferentes métodos para evaluar el porcentaje de espermatozoides motiles, desde sistemas computarizados hasta los métodos subjetivos, valorándose también el tipo de movimiento presentado en la media de una población observada (Hidalgo y otros, 2005).

Con la llegada de los sistemas informáticos de digitalización de imágenes, denominados genéricamente CASA (Computer Assisted Motility Analysis), el análisis computarizado de la motilidad espermática es actualmente usado en diversos centros de investigación en andrología y reproducción asistida (Hidalgo y otros, 2005).

Los dispositivos de evaluación computarizadas consisten en un microscopio de contraste de fase negativo, que permite apreciar espermatozoides blancos en un fondo negro, además permite la visualización de las colas lo que facilita la identificación de los verdaderos espermatozoides. El sistema CASA usa una cámara de alta resolución con un escáner de imágenes y un ordenador con un programa informático especializado (Valverde, 2021). Estos dispositivos se basan en la técnica de análisis de imagen donde se captura el movimiento espermático, se reconstruye la trayectoria del espermatozoide y su posición en animaciones sucesivas, luego el programa calcula varios parámetros de movilidad y concentración de forma simultánea. Una característica que manejan la mayoría de los dispositivos es la proyección de secuencias de video del último campo evaluado lo que proporciona un control adicional para la validez de la identificación de los espermatozoides y la reconstrucción correcta de su trayectoria (Valverde, 2021).

La motilidad progresiva según (Ávalos y otros, 2018) se puede clasificar en Muy Bueno (80 – 100%), Bueno (60 – 79%), Regular (40 – 56%) y Pobre (menos del 40%).

### ***Viabilidad y morfología***

Una rotura en la membrana plasmática se asocia con la pérdida de viabilidad celular, sin embargo, una membrana intacta no siempre es indicativo de la viabilidad de la célula, durante el procesado del semen, incluyendo la crioconservación, el espermatozoide sufre de “estrés” que afecta principalmente a la membrana, daños que pueden atribuirse a modificaciones en su organización, permeabilidad y composición lipídica (Hidalgo y otros, 2005). La evaluación morfológica de la integridad de la membrana se realiza utilizando tinción con eosina/nigrosina o

con tinta china para identificar las principales anomalías presentadas en la cabeza, en el tracto intermedio y en la cola (Páez & Corredor, 2014).

### **Crioconservación del semen bovino**

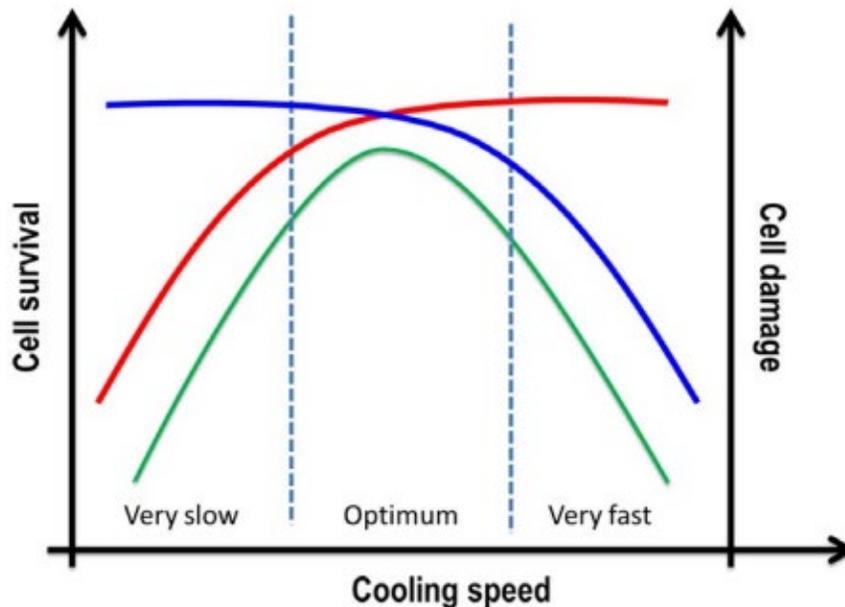
La crioconservación tiene como finalidad mantener la viabilidad y funcionalidad de las células a bajas temperaturas, este proceso involucra una serie de eventos de reducción de temperatura, deshidratación celular, congelación y descongelación (Ugur y otros, 2019).

El congelamiento de semen a  $-196^{\circ}\text{C}$  es el método más comúnmente utilizado para la conservación de la capacidad fecundante del espermatozoide. La congelación lenta en tasas de  $1-2^{\circ}\text{C}/\text{min}$  en diferentes etapas hasta llegar a  $-196^{\circ}\text{C}$  es el método más usado, sin embargo, los inconvenientes que presenta este método se deben principalmente a la nucleación heterogénea del hielo que da lugar al crecimiento descontrolado de cristales y a la disipación inadecuada del calor latente (Upadhyay y otros, 2021). Una temperatura de enfriamiento entre  $4^{\circ}\text{C}$  y  $5^{\circ}\text{C}$  es globalmente aceptada para mantener la calidad del semen y reducir el metabolismo celular en distintas especies incluidas el toro. Sin embargo, el mayor desafío que presentan los espermatozoides durante la criopreservación es cruzar la zona de temperatura intermedia entre  $-15^{\circ}\text{C}$  y  $-60^{\circ}\text{C}$ , ya que deben pasar dos veces por estas temperaturas, primero durante la congelación y luego durante la descongelación provocando efectos nocivos en la integridad de la membrana, el acrosoma, el núcleo, la función mitocondrial y la motilidad espermática (Bustani & Baiee, 2021).

A su vez, la “hipótesis de dos factores” propone que el daño celular causado durante la crioconservación ocurre mediante dos mecanismos distintos: la producción de hielo y la deshidratación celular (o estrés osmótico) los cuales están relacionadas con la velocidad de congelamiento (véase figura 3). Durante la formación de hielo extracelular el balance isotónico se modifica debido al incremento de la concentración de solutos disueltos en el medio extracelular mientras que dentro de la célula no ocurren cambios (Grötter y otros, 2019).

**Figura 3**

*Curva de supervivencia celular acorde con la velocidad de congelamiento*



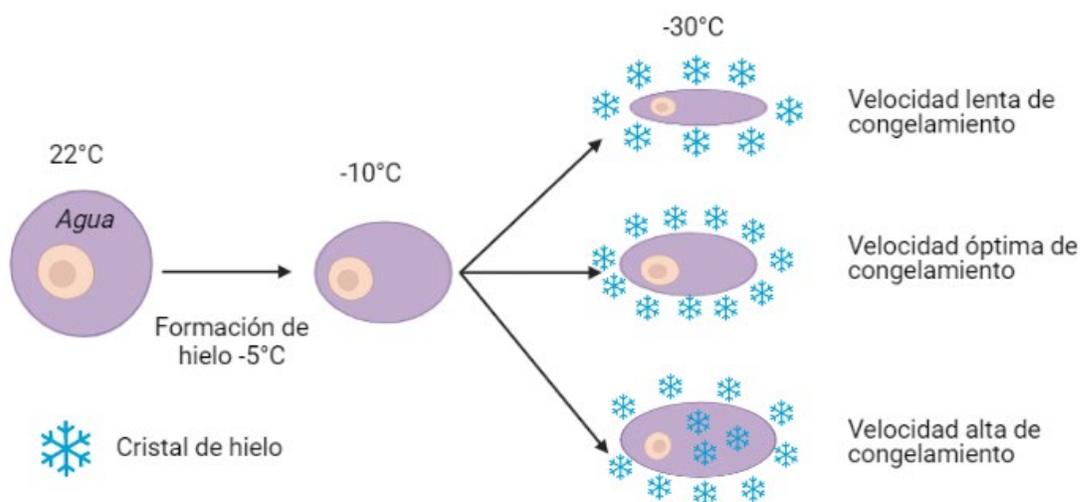
*Nota.* La línea verde representa la tasa de supervivencia de la célula de acuerdo con la tasa de congelamiento. La línea roja indica el daño causado por la formación de cristales mientras que la línea azul representa el daño ocasionado por el efecto osmótico. Tomado de *“Recent advances in bovine sperm cryopreservation techniques with a focus on sperm post-thaw quality optimization”* (p. 656), por Grötter et al., 2019, *Reproduction in Domestic Animals*, 54(4).

La diferencia de la concentración de solutos entre los espacios intra y extracelular genera una mayor presión en el espacio con menor concentración de solutos, lo que implica un flujo de agua desde la región menos concentrada hacia la de mayor concentración. En consecuencia, la formación de hielo extracelular provoca la deshidratación celular. A medida que comienza la nucleación del agua extracelular lo que sucede dentro del interior de la célula depende mucho de la velocidad de enfriamiento; si la velocidad de congelación es muy rápida la célula no puede deshidratarse lo suficientemente rápido y cuando se alcance la temperatura

de nucleación del agua, el líquido dentro de la célula se congela formando hielo intracelular; por el contrario, cuando la velocidad de enfriamiento es demasiado lenta provoca la deformación mecánica de la célula debido a la reducción del tamaño por acción de la deshidratación intensa y prolongada (Grötter y otros, 2019). La figura 4 representa un esquema de los cambios físicos que ocurren durante las distintas tasas de congelamiento.

#### Figura 4

*Esquema de los procesos físicos ocurridos durante el proceso de congelamiento*



*Nota.* Un congelamiento a tasas lentas evita la formación de hielo intracelular, sin embargo, provoca la deshidratación excesiva de la célula causando deformación en su estructura. Por el contrario, si la tasa de congelamiento es demasiado rápida puede formarse hielo intracelular que ocasionaría daños en el interior de la célula y destrucción celular. Tomado de “*Recent advances in bovine sperm cryopreservation techniques with a focus on sperm post-thaw quality optimization*” (p. 656), por Grötter et al., 2019, *Reproduction in Domestic Animals*, 54(4).

### ***Daños de membrana***

La membrana plasmática es el principal sitio que sufre daños durante el congelamiento (Bailey y otros, 2000), esto se debe a que sucede un cambio en la composición lipídica y la organización de la membrana que puede derivar en la capacitación prematura del espermatozoide (Watson, 1995). Cuando la temperatura disminuye, el movimiento de los fosfolípidos se restringe debido a sus cadenas laterales que al llegar a la temperatura de transición los fosfolípidos pasan de una fase fluida a una fase de gel produciendo defectos en el empaquetamiento de la membrana y asociándose a una mayor permeabilidad de los solutos a través de esta (Fernández y otros, 2009).

### ***Especies reactivas de oxígeno (ROS)***

Cualquier cambio en la fluidez de la membrana ocasionado durante la crioconservación puede liberar ROS los cuales poseen un papel importante en la fertilidad/infertilidad. Los ROS como el peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ), óxido nítrico y anión superóxido poseen efectos positivos en la señalización intracelular, capacitación de los espermatozoides y las reacciones del acrosoma (Ugur y otros, 2019). Sin embargo, cuando la producción de ROS es excesiva y los antioxidantes propios del plasma seminal no logran contrarrestarlo se genera un estrés oxidativo, por ejemplo, el  $H_2O_2$  detiene la motilidad y bloquea el metabolismo oxidativo de los espermatozoides (Bailey y otros, 2000). Muchos de los daños causados por los ROS se asocian a la inactivación de proteínas por la ionización de estas, la peroxidación lipídica y el daño del ADN (Ugur y otros, 2019).

### ***Proceso de dilución seminal***

La dilución del semen favorece el correcto metabolismo del espermatozoide con la finalidad de conservar las condiciones fisiológicas óptimas durante el mayor tiempo posible, los compuestos básicos para su funcionamiento incluyen una sustancia iónica o no iónica para mantener la osmolaridad, lipoproteínas de alto peso molecular, crio protectores, antioxidantes y

antibióticos (Molano & Lombana, 2021). A su vez, deben controlar el pH del medio entre 6.8 - 7.2, aportar energía y evitar la contaminación (Bustani & Baiee, 2021).

Los crio protectores protegen a la célula espermática de la formación de cristales de hielo, así como del estrés osmótico y químico, pueden ser permeables, es decir penetran la membrana plasmática, y no permeables. El glicerol es el agente protector permeable más utilizado en la crioconservación de semen bovino mientras que la yema de huevo es el agente protector no permeable. Entre los diluyentes comerciales que se utilizan a menudo en la investigación se encuentran: Biladyl, Triladyl (ambos de Minitub), Biociphos, Bioxcell, Laciphos (pertenecientes a IMV), Tris-Gibco BRL (Holland Genetics) y CAPROGEN (Livestock Improvement) (Kowalczyk y otros, 2020).

### ***Vitaminas***

Las vitaminas se añaden a los diluyentes para mejorar los parámetros funcionales del semen durante el almacenamiento en nitrógeno líquido ya que son antioxidantes no enzimáticos. La vitamina C es el antioxidante más importante en el plasma, (Hu y otros, 2010) determinaron que la adición de 4.5 mg/ml de ácido ascórbico al diluyente suprimió el efecto nocivo de las ROS en el esperma de toro incrementando significativamente el porcentaje de motilidad de los espermatozoides. A su vez, diferentes concentraciones podían producir efectos negativos como positivos, observándose que concentraciones altas (mayores a 8.5 mg/ml) resultaba en la disminución de los porcentajes de motilidad. Estudios en semen humano como el de (Mangoli y otros, 2018) mostró que la adición de 600  $\mu$ M de vitamina C en muestras previamente licuada ayudó a contrarrestar los efectos negativos de la vitrificación en la motilidad progresiva ( $56.05 \pm 7.62\%$ ) con respecto al control ( $50.55 \pm 9.07\%$ ).

### ***Evaluación de la motilidad en semen congelado***

Desde el punto biológico la motilidad de un espermatozoide es imprescindible para la fertilidad, sin embargo, el tipo y la calidad de la motilidad pueden ser afectados por las

condiciones en las que se realiza la prueba (Love, 2016). Los parámetros cinéticos más críticos que se evalúan en la motilidad incluyen la velocidad en línea curva, la velocidad en línea recta y la velocidad de trayectoria promedio (Bustani & Baiee, 2021).

La motilidad progresiva del semen descongelado se realiza de forma inmediata y a las 2 horas luego de la incubación en baño 37°C. Según (Catena & Cabodevila, 1999) en general, un semen descongelado de buena calidad tiene entre un 40-50% de motilidad progresiva y después de 2 horas estos valores disminuyen entre un 10-15%. Sin embargo, las normas mínimas aceptables definidas por el Departamento de Medicina del Rodeo y Teriogenología de la Universidad de Saskatchewan (correspondiente a las normas ISO 9002) son 25% de motilidad progresiva inmediatamente después del descongelado y 15% de motilidad progresiva a las 2 horas de incubación (Catena & Cabodevila, 1999).

### Capítulo III: Ubicación, materiales y métodos

#### Ubicación del Área de Investigación

##### *Ubicación Política*

La presente investigación se realizó en la parroquia Luz de América, hacienda “Zoila Luz” vía Quevedo Km 24 en la Universidad de las Fuerzas Armadas “ESPE” sede Santo Domingo ubicado en la provincia Santo Domingo de los Tsáchilas, país Ecuador.

##### *Ubicación Ecológica*

Zona de Vida:	Ecológica
Altitud:	Bosque Húmedo Tropical
Temperatura:	25°C
Precipitación:	2860 mm/año
Humedad relativa:	85%
Heliofanía:	680 horas luz/año
Suelos:	Franco arenosos

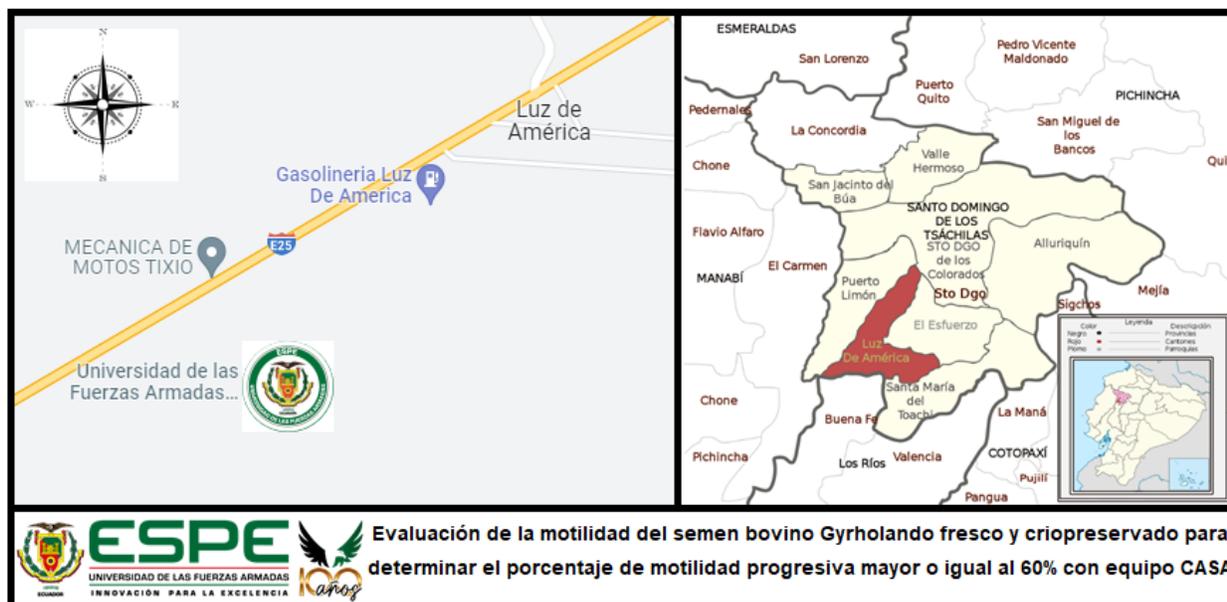
##### *Ubicación Geográfica*

El trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, extensión Santo Domingo.

Latitud:	00° 24' 44" Sur
Longitud:	79° 18' 32" Oeste
Altitud:	270 msnm

Figura 5

Ubicación geográfica del área de investigación



### Equipos

- Equipo CASA
- Baño María
- Microscopio óptico
- Autoclave Tuttnaver
- Platina térmica
- Equipo IceCube 14 M Minitube
- Envasadora de pajuelas
- Espectrofotómetro

### Insumos

- Termómetro Digital
- Cámaras lejas

- Puntas blancas, amarillas y azules
- Micropipetas de 5, 100 y 1000  $\mu$ L
- Tubos de ensayos
- Matraz Erlenmeyer
- Pajillas de 0,5 mL
- Gradillas
- Microcubetas

### **Reactivos**

- Tinción eosina
- Tinción nigrosina
- Diluyente Optixcell
- Alcohol etílico (70%)
- Agua ultrapura
- Agua bidestilada
- Nitrógeno líquido ( $N_2L$ )

### **Biológicos**

Semen bovino de dos toros Gyrholando de cinco años.

### **Metodología**

#### ***Recolección y evaluación seminal***

El semen se recolectó con vagina artificial e inmediatamente se midieron el pH y temperatura ( $^{\circ}C$ ). El volumen se cuantificó directamente en el tubo graduado de colecta. Posteriormente, se tomaron 25  $\mu$ l del semen fresco para calcular la concentración espermática usando el fotómetro (Minitube). Finalmente, el semen se colocó a baño María a una temperatura de  $30^{\circ}C$ .

### **Preparación de la dilución Optixcell y dilución del semen**

Se realizó una predilución del diluyente comercial Optixcell con agua bidestilada ultrapura a razón 1:2, se mezclaron 10 mL de diluyente comercial con 20 mL de agua bidestilada previamente calentados a baño María a 32°C durante 15 minutos. Una vez homogenizado la predilución se dejó activar la solución durante 15 minutos a baño María. El semen fresco se diluyó a razón 1:1 con la solución anterior prediluida y se analizó microscópicamente la muestra.

### **Análisis de motilidad progresiva en el sistema CASA y viabilidad del semen fresco**

Se tomó una alícuota de 1mL de la muestra diluida y se incubó a 37°C durante 30 segundos. Posteriormente, se dispuso 5 µl de la alícuota en una cámara Leja y se realizó el análisis de la motilidad progresiva y otros parámetros cinéticos en el programa SpermVision a 0 horas. De la misma alícuota se efectuó la tinción de viabilidad de la siguiente forma: en una placa se colocaron 20 µl de muestra y se le adicionaron 10 µl de tinción eosina, luego de seis segundos de espera se añadieron 10 µl de tinción nigrosina, se homogeneizó suavemente para realizar el frotis. La placa se dejó secar durante 5 min en platina térmica a 37°C.

### **Congelamiento del semen bovino**

De la primera predilución del semen (1:1) se añadió la cantidad suficiente de diluyente comercial para obtener una concentración por pajuela de  $30 \times 10^6$  espermatozoides/mL, adicionando el diluyente en tres partes. La primera adicción del diluyente se preparó en baño María a 32°C, luego de 10 min se agregó la segunda parte del diluyente a 20°C, después la dilución se separó en dos fracciones para añadir a una de ellas ácido ascórbico en concentración 4 µM, finalmente se completó la tercera parte del diluyente final y se envasó en pajuelas.

Se ejecutó la crioconservación del semen probando dos curvas de congelamiento diferentes utilizando el equipo programable IceCube; la primera corresponde a la curva estándar de IMV para congelamiento de semen bovino donde se inició con una tasa de enfriamiento de 1°C/min desde 20°C a 4°C, luego de 4°C a -10°C con tasa de 5°C/min; de -10°C a -100°C con tasa de 40°C/min; y de -100°C a -140°C con tasa de 20°C/min, el tiempo de equilibrio fue de 3 horas. La segunda curva tuvo una ligera variación comparada con la primera, la tasa de enfriamiento fue 0.5°C/min, desde 20°C a 4°C. Posteriormente, las pajuelas fueron almacenadas en un termo de nitrógeno líquido (N<sub>2</sub>L) a -196°C.

### **Descongelamiento de semen bovino y análisis de la motilidad y viabilidad.**

Se procedió a extraer las pajuelas del termo de nitrógeno líquido (N<sub>2</sub>L) y se descongelaron en baño María a 37°C durante 30 s, luego las pajuelas se dispensaron en un tubo de ensayo y se efectuó la lectura de la motilidad progresiva con el sistema CASA a 0 horas. La viabilidad se realizó como se describió con anterioridad al evaluar el semen fresco.

### **Diseño experimental y análisis estadístico**

Se elaboró un diseño experimental trifactorial con dos réplicas para el análisis del primer semental cuyos factores fueron: estado de la muestra (E<sub>0</sub> y E<sub>1</sub>), curvas de congelamiento (C<sub>0</sub> y C<sub>1</sub>), adición de antioxidante (A<sub>0</sub> y A<sub>1</sub>) mientras que las variables respuestas fueron la motilidad total y progresiva. Además, se correlacionaron los valores de motilidad total, progresiva, los parámetros cinéticos y los índices de velocidad. El análisis estadístico se llevó a cabo usando el programa versión estudiantil de Infostat utilizando un nivel de significancia de  $p < 0.05$  en la prueba estadística de Tukey.

Para el segundo semental se llevó a cabo un análisis de T apareada con dos réplicas para determinar el efecto de la aplicación de las diferentes curvas y la adición de antioxidante a la muestra seminal.

## Capítulo IV: Resultados y Discusión

Se realizó la evaluación del eyaculado previo al congelamiento de las dosis seminales para verificar que cumplieran con los valores adecuados para continuar el proceso como se muestra en la tabla 2.

**Tabla 2**

*Análisis macroscópico del semen fresco de toros*

<b>Toros</b>	<b>Volumen (mL)</b>	<b>pH</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Aspecto</b>	<b>Concentración (millones/mL)</b>
Toro 1	4,7	6,5	31,6	Amarillo lechoso	1 080
Toro 2	5,5	6,49	31,8	Amarillo claro	312*

*Nota.* (\*) La concentración es demasiado baja para ser aceptado para el proceso de congelamiento, no obstante, por fines investigativos se procedió a criopreservar. Investigación directa (2022). Fuente: Elaboración propia.

### **Análisis de motilidad espermática medido por CASA**

El promedio más la desviación estándar de la motilidad total y motilidad progresiva en los parámetros de: estado de la muestra, efecto de las curvas evaluadas y efecto de la adición de antioxidantes para Toro 1 se muestran en la tabla 3. Las muestras de semen presentaron variación significativa ( $p < 0,05$ ) en el estado de la muestra siendo mayores en el semen fresco comparado con el congelado. No hubo variación significativa en los porcentajes de motilidad total y progresiva para las curvas de congelamiento empleadas y tampoco para la adición de antioxidantes y las interacciones.

Los resultados analizados para Toro 2 presentados en la tabla 4 mostraron que el porcentaje de motilidad total y progresiva difieren en los estados fresco y descongelado, donde

los valores de motilidad en semen fresco fueron significativamente más altos comparados al semen descongelado, esto guarda relación con que los factores de estrés como la formación de hielo intracelular, efecto solución y modificaciones osmóticas ocasionadas durante el proceso de congelamiento causan cambios estructurales en la organización, fluidez, permeabilidad y composición lipídica de la membrana espermática (Upadhyay y otros, 2021). No hubo diferencias para las curvas de congelamiento y la adición de antioxidantes.

**Tabla 3**

*Parámetros de motilidad espermática en muestras antes y después del congelamiento aplicando dos curvas de congelamiento junto con la adición de antioxidante*

<b>Efecto</b>	<b>Motilidad total</b>	<b>Motilidad progresiva</b>
Semen fresco	60,65 ± 9,39 <sup>a</sup>	48,73 ± 6,10 <sup>a</sup>
Semen descongelado	23,12 ± 4,82 <sup>b</sup>	14,36 ± 3,64 <sup>b</sup>
p-valor	< 0,0001	< 0,001
Primera curva	39,55 ± 18,70 <sup>a</sup>	30,76 ± 17,34 <sup>a</sup>
Segunda curva	44,22 ± 18,73 <sup>a</sup>	32,33 ± 20,58 <sup>a</sup>
p-valor	0,1247	0,5043
Sin antioxidante	37,40 ± 20,34 <sup>a</sup>	28,84 ± 18,92 <sup>a</sup>
Con antioxidante	46,36 ± 21,37 <sup>a</sup>	34,24 ± 18,73 <sup>a</sup>
p-valor	0,0111	0,0430

*Nota.* Análisis estadístico del Toro 1. Las letras a y b representan diferencias significativas entre las columnas. Investigación directa (2022). Fuente: Elaboración propia.

Se apreció la diferencia significativa de los porcentajes de motilidad por efecto del congelamiento dentro las motilidades evaluadas tal como se muestra en la figura 5. En general,

entre el 40-50% de población espermática no sobrevive al proceso de criopreservación lo que indica que la población inicial de espermatozoides vivos se ve comprometida durante dicho proceso (Grötter y otros, 2019). Pese a ello, los espermatozoides se consideran que deberían ser menos sensibles a los daños generados durante el proceso debido a su bajo contenido de agua y alta fluidez de la membrana, no obstante, la integridad de su membrana y su metabolismo se ven afectados por la criopreservación (Ugur y otros, 2019). Además del daño de la membrana celular, el estrés oxidativo que experimentan los espermatozoides interrumpe la actividad mitocondrial, promueve la salida de enzimas intracelulares, así como altera las proteínas axonales lo que conduce a la pérdida de la motilidad espermática (Kowalczyk y otros, 2020).

La sensibilidad de los espermatozoides al congelamiento también podría explicarse por la rápida pérdida de calor que presenta la pajueta debido a su gran área superficial y su delgada pared, permitiendo que el semen se congele pronto (Hafez & Garner, 1996).

#### **Tabla 4**

*Media de los parámetros de motilidad espermática antes y después del congelamiento aplicando dos curvas de congelamiento junto con la adición de antioxidante para Toro 2*

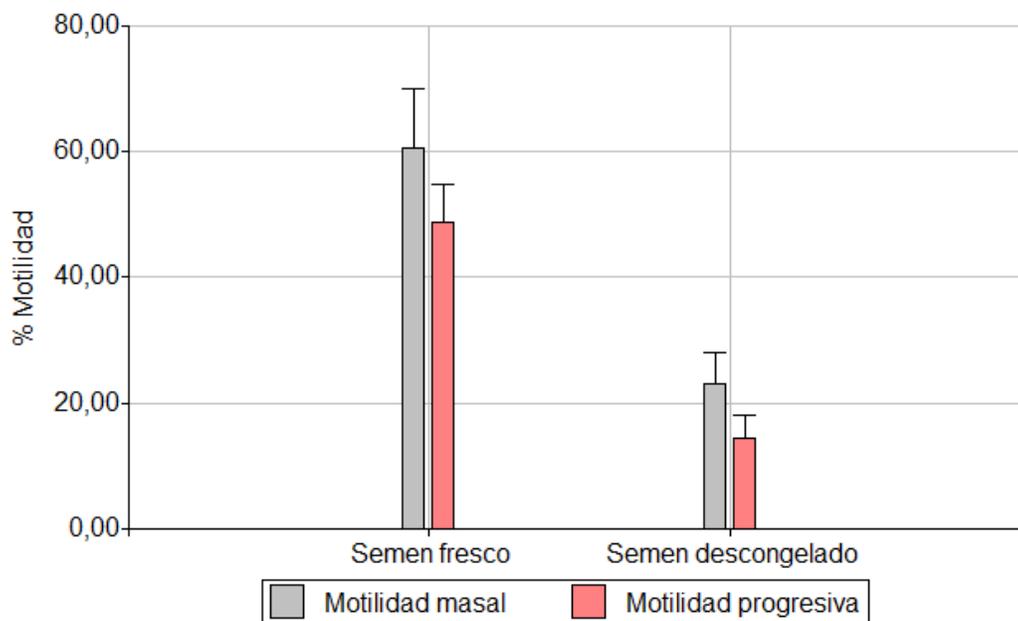
<b>Efecto</b>	<b>Motilidad total</b>	<b>Motilidad progresiva</b>
Semen fresco	82,90	74,84
Semen descongelado	20,63	14,05
p-valor bilateral	0,0004*	0,0004*
Primera curva	48,16	40,80
Segunda curva	55,37	48,10
p-valor bilateral	0,1078	0,0734

Sin antioxidante	51,93	44,55
Con antioxidante	44,34	44,34
p-valor bilateral	0,1450	0,9595

*Nota.* Análisis estadístico de las medias de motilidad total y progresiva del seminal Marcelo comparando los efectos del estado de la muestra, curvas de congelamiento empleadas y adición de antioxidante. (\*) El valor bilateral menor que 0,05 indica que hay diferencia estadística en las medias de los parámetros evaluados en sus respectivos efectos. Fuente: Elaboración propia.

### Figura 6

*Parámetro de motilidad espermática en muestras de fresco y descongelado*



*Nota.* Diferencias significativas entre el semen fresco y descongelado en los parámetros de motilidad total y progresiva. Fuente: Elaboración propia.

Además, otros aspectos individuales como la raza y especie también influyen en los resultados del congelamiento (Upadhyay y otros, 2021), por ello, se apreciaron diferencias significativas entre los dos sementales evaluados siendo Toro 2 (74,84%) el que presentó mayor motilidad progresiva frente a Toro 1 ( $48,73 \pm 6,10$  %) en estado fresco.

Pese a que en la literatura (Bustani & Baiee, 2021; Ugur y otros, 2019) se menciona que la adición de vitaminas permite mejorar los parámetros de la calidad del semen durante el congelamiento, puesto que inhiben la formación de ROS y la peroxidación lipídica generada por el estrés de la tasa de enfriamiento, el presente estudio no encontró diferencias significativas en cuanto a la adición o no de ácido ascórbico. Mientras que algunos estudios muestran que la adición de ácido ascórbico de 4,5 mg/mL (Hu y otros, 2010; Patel y otros, 2016) aumentó la motilidad de los espermatozoides bovinos y la adición 600  $\mu$ M (Mangoli y otros, 2018) atenuó los efectos perjudiciales de la vitrificación en parámetros espermáticos; otros como el de (Shahin y otros, 2020) no mostraron un aumento significativo de la motilidad progresiva con respecto al control en cuanto a la adición de ácido ascórbico. De aquello se puede inferir que la cantidad de antioxidante añadido (145  $\mu$ L) durante este estudio no fue suficiente para arrojar resultados estadísticos significativos.

Se encontró una correlación positiva (tabla 5 y figura 7) entre las variables de motilidad total y motilidad progresiva, entre los parámetros cinemáticos (VCL, VSL y VAP) y entre los índices de velocidades (LIN, STR y WOB), resultados semejantes se hallaron en el estudio de (Bravo y otros, 2011). La velocidad curvilínea (VCL) es la distancia total que recorre la cabeza del espermatozoide durante el periodo de observación siendo el mayor de las tres velocidades, mientras que la velocidad en línea recta (VSL) se determina desde la distancia en línea recta entre el primer y último punto de la trayectoria, siempre siendo el menor de los tres valores de velocidad, por último, la velocidad media de la trayectoria (VAP) es la distancia que el espermatozoide ha recorrido en la dirección media del movimiento en el periodo de

observación (Mortimer, 2000). Cuando la trayectoria de la cabeza del espermatozoide es muy regular y lineal, con muy poco movimiento lateral, entonces la VAP es casi igual a la VSL (Mortimer, 2000), lo que podría explicar la alta correlación positiva entre ambas variables. Por otro lado, la correlación positiva entre el VCL con respecto a VSL y VAP tiene bastante lógica debido a que son variables de distancia de la trayectoria del espermatozoide observado, por ende, siempre que una aumente las otras también lo harán.

En tanto, los índices de velocidad marcan una relación entre las variables de velocidad previamente observadas, el índice de linealidad (LIN) se presenta como una medida de la dirección espermática, el índice de rectitud (STR) es un cálculo de la densidad del movimiento mientras que el índice de oscilación (WOB) indica el tambaleo del espermatozoide.

Sin olvidar que la congelación afecta esencialmente en el movimiento y modifica el tamaño y la forma de la cabeza del espermatozoide lo que también puede afectar a los patrones de motilidad de modo que los espermatozoides adquieran distintos patrones de movimiento (Yáñez-Ortiz y otros, 2021). Además, otro factor para considerar es la preparación de las muestras de semen antes y durante la evaluación computarizada, pues factores como los agrupan (Yeste y otros, 2018) pueden afectar a los valores obtenidos luego de la evaluación de la motilidad con el sistema entre los que ellos categorizan: (1) muestra y placa, (2) microscopio, (3) hardware y software y (4) usuario.

### Tabla 5

*Nivel de significación de la Correlación de Pearson entre las variables de respuesta*

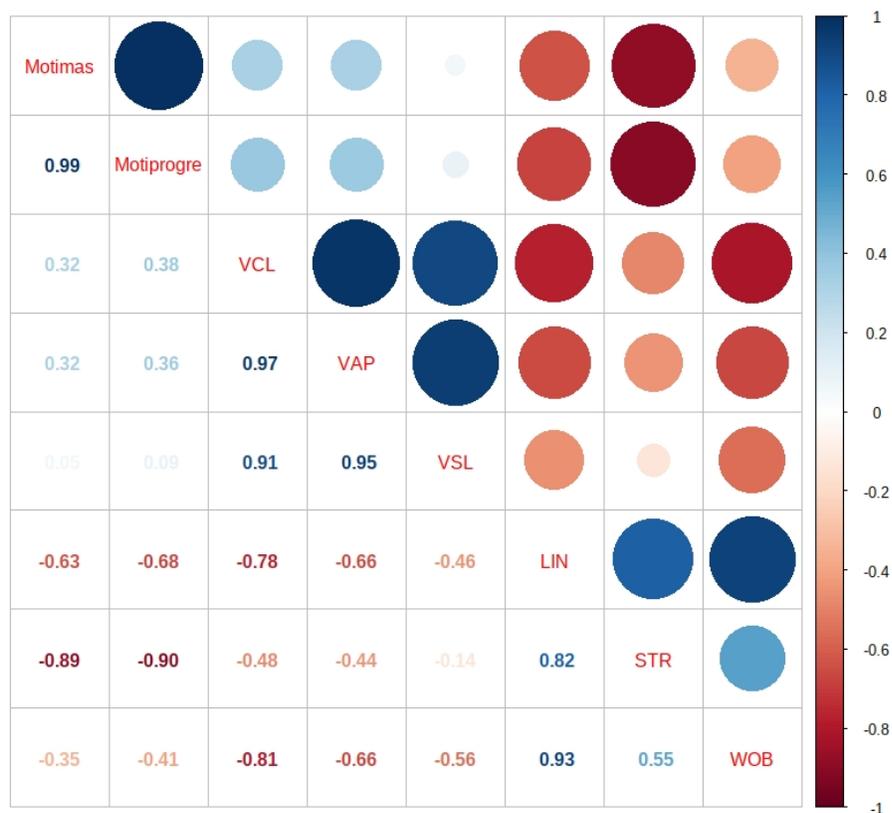
	Mmas	Mpro	VCL	VAP	VSL	LIN	STR	WOB
Mmas	1,000	<0,001**	0,220	0,224	0,850	0,008*	<0,001**	0,184
Mpro		1,000	0,151	0,166	0,736	0,004*	<0,001**	0,114

VCL	1,000	<0,001**	<0,001**	<0,001*	0,058	0,000*
VAP		1,000	<0,001**	0,006*	0,088	0,005*
VSL			1,000	0,076	0,605	0,005*
LIN				1,000	0,000**	<0,001**
STR					1,000	0,029*
WOB						1,000

*Nota.* Se muestran los p-valor de la correlación entre cada variable. (\*) Indica correlación significativa, (\*\*) Indica una correlación altamente significativa.

### Figura 7

*Correlación de Pearson entre las variables respuesta*



*Nota.* Las variables respuesta que presentan alta correlación positiva (superior a 0.80) se visualizan de color azul intenso, mientras que las variables que presentan una alta correlación negativa (inferior a -0.80) se observan de un color rojo intenso. Fuente: Elaboración propia.

## **Capítulo V: Conclusiones**

La motilidad progresiva fue del 60% en el Toro 2 en comparación con el Toro 1, indicando diferencias entre los reproductores. En la evaluación del semen descongelado se hallaron diferencias significativas en comparación con el semen fresco en ambos, lo que indica un efecto generado por la curva de congelamiento sobre la motilidad progresiva del semen fresco.

En cuanto a la comparación entre las curvas evaluadas, no se presentaron diferencias significativas, por ende, una tasa de enfriamiento inicial entre 0,5°C/min y 1°C/min presentan resultados significativamente iguales. La adición de antioxidante 4 µM no mostró diferencia significativa con respecto al control, por ende, la cantidad pudo no haber sido la necesaria.

Finalmente, se encontró una correlación positiva entre las variables de motilidad total y motilidad progresiva, entre los parámetros cinemáticos (VCL, VSL y VAP) y entre los índices de velocidades (LIN, STR y WOB).

## Capítulo VI: Recomendaciones

Se recomienda realizar el estudio con una cantidad mayor de sementales para abarcar mayor número de muestras y robustecer el análisis estadístico. Además, para evaluar el efecto del antioxidante se sugiere comparar distintas concentraciones para encontrar la concentración adecuada.

Es recomendable el uso de un refrigerador a 4°C para almacenar las muestras durante el tiempo de equilibrio requerido y posteriormente proceder al congelamiento en el equipo automatizado.

## Capítulo VII: Bibliografía

- Ávalos, A., González, J., Vargas, A., & Herrera, J. (2018). *Recolección y manipulación seminal in vitro*. Casa Abierta al tiempo. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Bailey, J., Bilodeau, J., & Cormier, N. (2000). Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *Journal of andrology*, 21(1), 1-7.
- Bearden, J., & Fuquay, J. (1982). *Reproducción animal aplicada*. El Manual Moderno.
- Bravo, J. A., Montanero, J., Calero, R., & Roy, T. J. (2011). Relación entre variables subjetivas e informatizadas del movimiento espermático del morueco. *Archivos de Zootecnia*, 60(232), 1087-1094.
- Brinsko, S. (2003). Fisiología reproductora del macho. En J. Cunningham (Ed.), *Fisiología Veterinaria* (3 ed., págs. 421-428). Elsevier.
- Bustani, G., & Baiee, F. (2021). Semen extenders: An evaluative overview of preservative mechanisms of semen and semen extenders. *Veterinary world*, 14(5), 1220-1233. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.1220-1233>
- Catena, M., & Cabodevila, J. (1999). Evaluación de semen bovino congelado. [*Presentación de artículo*]. *Simposio Internacional de Reproducción Bovina*. Tandil, Argentina. [https://www.produccion-animal.com.ar/informacion\\_tecnica/inseminacion\\_artificial/05-evaluacion\\_de\\_semen\\_bovino\\_congelado.pdf](https://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/inseminacion_artificial/05-evaluacion_de_semen_bovino_congelado.pdf)
- Chaveiro, A., Cerqueira, C., Silva, J., Franco, J., & Moreira da Silva, F. (2015). Evaluation of frozen thawed cauda epididymal sperms and in vitro fertilizing potential of bovine sperm collected from the cauda epididymal. *Iranian journal of veterinary research*, 16(2), 188-193.

- Chaveiro, A., Machado, L., Frijters, A., Engel, B., & Woelders, H. (2006). Improvement of parameters of freezing medium and freezing protocol for bull sperm using two osmotic supports. *Theriogenology*, *65*(9), 1875-1890.
- Fernández, A., Gonzalvo, M., Clavero, A., Ruiz, R., Zamora, S., Roldán, M., Rabelo, B., Ramírez, J. P., Yoldi, A., & Castilla, J. A. (2009). Fundamentos de criobiología espermática para bancos de semen. *[Presentación de artículo]. V Congreso. 14*, págs. 17-25. Valencia: ASEBIR. <https://revista.asebir.com/assets/asebir-junio-2009.pdf>
- García, A. (Ed.). (2018). *Fisiología Veterinaria*. Editorial Tébar Flores.
- Gloobe, H. (1989). *Anatomía aplicada del bovino*. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura.
- Grötter, L. G., Cattaneo, L., Marini, P. E., Kjelland, M. E., & Ferré, L. B. (2019). Recent advances in bovine sperm cryopreservation techniques with a focus on sperm post-thaw quality optimization. *Reproduction in domestic animals*, *54*(4), 655-665. <https://doi.org/10.1111/rda.13409>.
- Guataquira Velásquez, L. (2019). *Evaluación in vitro del semen en bovinos*. [Tesis de pregrado, Universidad Cooperativa de Colombia], Repositorio Institucional de la Universidad Cooperativa de Colombia. <http://hdl.handle.net/20.500.12494/14794>
- Hafez, E. E., & Garner, D. (1996). *Reproducción e inseminación artificial en animales* (Sexta ed.). McGraw-Hill Interamericana S.A.
- Hidalgo, C. O., Tamargo, C., & Díez, C. (2005). Análisis del semen bovino. *Tecn Agro*(2), 39-43.

- Hu, J. H., Tian, W. Q., Zhao, X. L., Zan, L. S., Wang, H., Li, Q. W., & Xin, Y. P. (2010). The cryoprotective effects of ascorbic acid supplementation on bovine semen quality. *Animal reproduction science*, 121(1-2), 72-77. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.04.180>
- Hussain, M., Begum, S., Kumar, M., Ahmed, K., & Nath, R. (2018). Additives used in semen preservation in animals: A short review. *International Journal of Chemical Studies*, 6(5), 354-361.
- Kowalczyk, A., Kuczaj, M., & Czerniaws, E. (2020). The role of environmental optimization for storing bulls' sperm cells. *Systems biology in reproductive medicine*, 66(5), 300-310. <https://doi.org/10.1080/19396368.2020.1795432>.
- Love, C. (2016). Modern Techniques for Semen Evaluation. *The Veterinary clinics of North America. Equine practice*, 32(3), 531-546. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2016.07.006>
- Mangoli, E., Talebi, A., Anvari, M., Taheri, F., Vaanparast, M., Rahiminia, T., & Hosseini, A. (2018). Vitamin C attenuates negative effects of vitrification on sperm parameters, chromatin quality, apoptosis and acrosome reaction in neat and prepared normozoospermic samples. *Taiwanese journal of obstetrics & gynecology*, 57(2), 200-204. <https://doi.org/10.1016/j.tjog.2018.02.006>
- Marina, S. (2003). Avances en el conocimiento de la espermatogénesis. Implicaciones clínicas. *Revista Iberoamericana de Fertilidad.*, 20(4), 213-225.
- Marizancén, M., & Artunduaga, L. (2017). Mejoramiento genético en bovinos a través de la inseminación artificial y la inseminación artificial a tiempo fijo. *RIAA*, 8(2), 247-259.
- Medina, V., Sánchez, E., Velasco, Y., & Cruz, P. (2007). Crioconservación de semen bovino usando un congelador programable (CL-8800) y determinación de su calidad

- postdescongelación por medio un sistema de análisis espermático asistido por computador (CASA). *Orinoquia*, 11(1), 75-86.
- Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca. (2016). *El sector agropecuario ecuatoriano: análisis histórico y prospectiva a 2025*. MAGAP:  
<https://www.agricultura.gob.ec/biblioteca/>
- Molano, D., & Lombana, H. (2021). Fundamentos y métodos para la dilución y congelación de semen en bovinos. (*Trabajo de Pregrado*). Universidad Cooperativa de Colombia.  
<http://hdl.handle.net/20.500.12494/34389>
- Mortimer, S. T. (2000). CASA--practical aspects. *Journal of andrology*, 21(4), 515-524.
- Mosquera, J., & Anchatuña, C. (2017). Efecto de distintos tiempos de equilibrio sobre la calidad espermática pre y post-congelación de semen bovino de toros reproductores Holstein Friesian. [*Tesis de grado, Universidad Central del Ecuador*]. Repositorio institucional de la Universidad Central del Ecuador <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/9830>
- Muiño, 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*. Universidad Santiago de Compostela.
- Olivera, M., Ruiz, T., Tarazona, A., & Giraldo, C. (2006). El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 19(4), 426-436.
- Páez, E., & Corredor, E. (2014). Evaluación de la aptitud reproductiva del toro. *Ciencia y agricultura*, 11(2), 49-59.

- Patel, H., Siddiquee, G., Chaudhari, D., & Suthar, V. S. (2016). Effect of different antioxidant additives in semen diluent on cryopreservability (-196°C) of buffalo semen. *Veterinary world*, 9(3), 299-303. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.299-303>
- Restrepo, G. (2008). *Bioteconlogías reproductivas aplicables a la producción bovina en Colombia*. Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid.
- Shahin, M. A., Khalil, W. A., Saadeldin, I. M., Swelum, A. A.-A., & El-Harairy, M. A. (2020). Comparison between the Effects of Adding Vitamins, Trace Elements, and Nanoparticles to SHOTOR Extender on the Cryopreservation of Dromedary Camel Epididymal Spermatozoa. *Animals : an open access journal from MDPI*, 10(1), 78. <https://doi.org/10.3390/ani10010078>
- Singh, P., Bedi, M., Singhal, S., Singh, A. K., Kumar, A., & Honparkhe, M. (2022). Effect of graphene oxide as cryoprotectant on post-thaw sperm functional and kinetic parameters of cross bred (HF X Sahiwal) and Murrah buffalo (*Bubalus bubalis*) bulls. *Cryobiology*, 106, 102-112. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2022.03.002>
- Ugur, M. R., Saber Abdelrahman, A., Evans, H. C., Gilmore, A. A., Hitit, M., Arifiantini, R. L., Purwantara, B., Kaya, A., & Memili, E. (2019). Advances in Cryopreservation of Bull Sperm. *Frontiers in veterinary science*, 6, 268. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00268>
- Upadhyay, V. R., Ramesh, V., Dewry, R. K., Kumar, G., Raval, K., & Patoliya, P. (2021). Implications of cryopreservation on structural and functional attributes of bovine spermatozoa: An overview. *Andrologia*, 53(8), e14154. <https://doi.org/10.1111/and.14154>
- Valverde, A. (2021). Importancia de la evaluación de la aptitud reproductiva mediante el análisis de semen por sistemas CASA. *Investiga. TEC*, 1(40).

Watson, P. (1995). Cooling spermatozoa and fertilizing capacity. *Reproduction in Domestic Animals*, 31(1), 135-140. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.1995.tb00016.x>

Yáñez-Ortiz, I., Catalán, J., Rodríguez-Gil, J., Miró, J., & Yeste, M. (2021). Advances in sperm cryopreservation in farm animals: Cattle, horse, pig and sheep. *Animal reproduction science*, 106904. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106904>

Yeste, M., Bonet, S., Rodríguez-Gil, J., & Rivera Del Álamo, M. (2018). Evaluation of sperm motility with CASA-Mot: which factors may influence our measurements? *Reproduction, fertility, and development*, 30(6), 789-798. <https://doi.org/10.1071/RD17475>