



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE  
LA AGRICULTURA.**

**CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA**

**TESIS PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE  
INGENIERO AGROPECUARIO**

**TEMA: EVALUACIÓN DE DOS DILUYENTES CASEROS Y UN  
DILUYENTE COMERCIAL PARA CRIOPRESERVAR SEMEN  
BOVINO DE LAS RAZAS BROWN SWISS Y PATUA (*Bos taurus*)  
EN EL TRÓPICO HÚMEDO**

**AUTORA: PALACIOS RAMÍREZ LISBETH FABIOLA**

**DIRECTOR: Dr. FREDY CARRERA MSc.**

**CODIRECTOR: Dr. FÉLIX VALDIVIESO**

**SANTO DOMINGO – ECUADOR**

**2015**



## CERTIFICACIÓN

Los suscritos, docentes de la Carrera de Ingeniería Agropecuaria, Santo Domingo, certificamos que el Proyecto de Investigación de Grado intitulado **“EVALUACIÓN DE DOS DILUYENTES CASEROS Y UN DILUYENTE COMERCIAL PARA CRIOPRESERVAR SEMEN BOVINO DE LAS RAZAS BROWN SWISS Y PATUA (*Bos taurus*) EN EL TRÓPICO HÚMEDO”** cumple las disposiciones reglamentarias establecidas en la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.

Esta investigación desarrollada por la egresada señorita LISBETH FABIOLA PALACIOS RAMÍREZ, fue guiada en forma permanente por nuestra parte y en las conclusiones y recomendaciones de este documento se destaca la importancia para el sector ganadero de la zona.

Santo Domingo, 08 de junio del 2015

 Dr. FREDY CARRERA MSc. DIRECTOR.	 Dr. FÉLIX VALDIVIESO. CODIRECTOR.
--	--

## AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

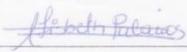
LISBETH FABIOLA PALACIOS RAMÍREZ.

### Declaro que:

El proyecto de grado denominado **“EVALUACIÓN DE DOS DILUYENTES CASEROS Y UN DILUYENTE COMERCIAL PARA CRIOPRESERVAR SEMEN BOVINO DE LAS RAZAS BROWN SWISS Y PATUA (*Bos taurus*) EN EL TRÓPICO HÚMEDO”**, fue desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mi autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Santo Domingo,



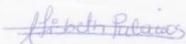
LISBETH FABIOLA PALACIOS RAMÍREZ.

## AUTORIZACIÓN

LISBETH FABIOLA PALACIOS RAMÍREZ.

Autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo **“EVALUACIÓN DE DOS DILUYENTES CASEROS Y UN DILUYENTE COMERCIAL PARA CRIOPRESERVAR SEMEN BOVINO DE LAS RAZAS BROWN SWISS Y PATUA (*Bos taurus*) EN EL TRÓPICO HÚMEDO”**, manifiesto que el contenido, ideas y discusiones son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Santo Domingo,



LISBETH FABIOLA PALACIOS RAMÍREZ.

## DEDICATORIA

### ***A Dios.***

*Por bendecirme durante toda mi carrera universitaria y por hacer de mí una persona perseverante para superar todo obstáculo en el transcurso de mi vida.*

### ***A mis padres José Palacios y Fabiola Ramírez.***

*Porque lograron con su esfuerzo darme lo mejor para que forjara una carrera universitaria, porque me motivaron a seguir adelante a pesar de los obstáculos y dificultades, a ustedes mi vida entera.*

### ***A mis hermanos Danny y Joao.***

*Por ser un apoyo constante en todo momento de mi vida.*

*Lisbeth Fabiola Palacios Ramírez*

## AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento a todos quienes hicieron posible esta investigación, aportando sus conocimientos y calidez humana.

A la Universidad de las Fuerzas Armadas, a la Carrera de Ingeniería Agropecuaria Santo Domingo – ESPE-IASA II y al Laboratorio de Biotecnología Animal.

Al Cnrl. E.M.C. Francisco Narváez, al Mayo Vet. Julio Tobar, a los Dr(s) Fredy Carrera y Félix Valdivieso, Director y Codirector de tesis respectivamente, por su ayuda en el desarrollo del presente trabajo.

Al Ing. Vinicio Uday, por su colaboración para la culminación de este trabajo.

Al Doctor Santiago Ulloa por su amistad y apoyo en el desarrollo y culminación de la investigación.

Al Ingeniero Carlos Álvarez por su motivación constante durante el desarrollo de mi tesis de pregrado.

Al Doctor César Ulloa por su amistad y apoyo en la culminación de la investigación.

A los señores Mauricio Vergara y Carlitos Moreira, por su amistad y apoyo durante la etapa de campo en la investigación, a la Sra. Patricia Macas por el apoyo recibido durante la investigación en el proceso de adquisición de bienes con el proyecto de iniciación científica.

A mis abuelitas Leonor Nuñez y Laura Guerrero, a mis tíos Narcisa Palacios y Vinicio Ramírez por su apoyo brindado durante mi carrera universitaria.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

CERTIFICACIÓN .....	ii
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD .....	iii
AUTORIZACIÓN .....	iv
DEDICATORIA .....	iv
AGRADECIMIENTOS .....	vi
RESUMEN.....	xxi
ABSTRACT.....	xxii
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>23</b>
1.1. OBJETIVO GENERAL: .....	26
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	27
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>	<b>27</b>
2.1. MÉTODOS PARA LA COLECCIÓN DE SEMEN.....	27
2.1.1. Colección de Semen con Vagina Artificial (VA) .....	28
2.1.2. Colección de Semen por Electroeyaculación (EE) .....	28
2.2. EVALUACIÓN MACROSCÓPICA DEL SEMEN FRESCO.....	29
2.2.1. Volumen.....	29
2.2.2. Color.....	29
2.2.3. pH.....	30
2.3. EVALUACIÓN MICROSCÓPICA DEL SEMEN FRESCO .....	30
2.3.1. Motilidad Espermática evaluada con Computer Assisted Semen Analysis (CASA). .....	31
2.3.2. Viabilidad Espermática .....	32
2.3.3. Morfología Espermática.....	32
2.3.4. Concentración Espermática.....	34
2.4. CONSERVACIÓN DEL SEMEN BOVINO Y DILUYENTES .....	34
2.5. TIPOS DE DILUYENTES.....	34
2.5.1. Diluyente de Yema de Huevo Fosfatada.....	35
2.5.2. Diluyente de Yema de Huevo Citratada.....	35
2.5.3. Adiciones Empleadas en Diluyentes.....	35
2.5.4. Concentrados Comerciales para la Elaboración de Diluyentes.....	36
2.6. EVALUACIÓN MICROSCÓPICA DE SEMEN .....	38
CONGELADO/DESCONGELADO.....	38

2.6.1.	Motilidad Individual (MI).....	38
2.6.2.	Viabilidad Post Descongelación. ....	39
2.6.3.	Morfología Espermática.....	39
2.6.4.	Test Hiposmotico (Hyposmotic Swelling Test - HOST).....	39
III.	MATERIALES Y MÉTODOS:.....	40
3.1.	UBICACIÓN GEOGRÁFICA:.....	40
3.1.1.	Ubicación Política. ....	40
3.1.2.	Ubicación Ecológica:.....	42
3.2.	MATERIALES Y REACTIVOS:.....	42
3.2.1.	Materiales de Campo.....	42
3.2.2.	Materiales Biológicos.....	42
3.2.3.	Materiales de Laboratorio.....	42
3.2.4.	Equipos de Laboratorio.....	43
3.2.5.	Reactivos.....	43
3.3.	DISEÑO:.....	43
3.3.1.	Diseño Experimental.....	43
3.4.	METODOLOGÍA. ....	45
3.4.1.	Preparación del Montadero. ....	45
3.4.2.	Limpieza y Desinfección del Laboratorio.....	45
3.4.3.	Impresión de Pajuelas.....	46
3.4.4.	Uso de los Diluyentes. ....	47
3.4.5.	Preparación de los Diluyentes.....	47
3.4.6.	Armado de la Vagina Artificial.....	49
3.4.7.	Preparación del Laboratorio.....	49
3.4.8.	Recolección de Semen Bovino. ....	49
3.4.9.	Evaluación de Semen Fresco. ....	51
3.4.10.	Protocolo de Congelación Seminal.....	53
3.4.11.	Descongelamiento de la Pajuela.....	54
3.4.12.	Evaluación Microscópica de Semen Congelado.....	54
IV.	RESULTADOS.....	56
4.1.	EVALUACIÓN MACROSCÓPICA PRE CONGELACIÓN.....	56
4.1.1.	Volumen Seminal.....	56
4.1.2.	Color Seminal. ....	56

4.1.3.	Olor. ....	56
4.1.4.	Cuerpos Extraños. ....	57
4.1.5.	pH. ....	57
4.1.6.	Concentración Espermática. ....	57
4.2.	EVALUACIÓN MICROSCÓPICA PRE CONGELACIÓN Y POST DESCONGELACIÓN. ....	57
4.2.1.	Motilidad Total. ....	57
4.2.2.	Motilidad Progresiva. ....	59
4.2.3.	Motilidad Local. ....	60
4.2.4.	Velocidad Curvilínea de Espermatozoide (VCL) ....	62
4.2.5.	Velocidad Media de Espermatozoides (VAP) ....	63
4.2.6.	Velocidad Rectilínea de Espermatozoides (VSL) ....	65
4.2.7.	Índice de Linealidad de Espermatozoides (LIN) ....	66
4.2.8.	Índice de Rectitud de Espermatozoides (STR) ....	67
4.2.9.	Frecuencia de Batida de Espermatozoides (BCF) ....	69
4.2.10.	Amplitud Media del Desplazamiento Lateral de la Cabeza de Espermatozoides (ALH) ....	70
4.2.11.	Viabilidad. ....	71
4.2.12.	Morfología. ....	72
4.2.13.	Test Host. ....	73
V.	DISCUSIÓN ....	75
5.1.	EVALUACIÓN MACROSCÓPICA DE LOS EYACULADOS EN SEMEN FRESCO Y DESCONGELADO. ....	75
5.2.	EVALUACIÓN MICROSCÓPICA DE LOS EYACULADOS EN SEMEN FRESCO Y DESCONGELADO. ....	76
VI.	CONCLUSIONES ....	82
VII.	RECOMENDACIONES. ....	83
VIII.	BIBLIOGRAFÍA ....	84
IX.	ANEXOS ....	90

## ÍNDICE DE FIGURAS.

<b>Nº de Figuras.</b>	<b>Título.</b>	<b>Pág.</b>
Figura 1.	Mapa del lugar de la investigación.....	19
Figura 2.	Referencia cartográfica para la ubicación de la investigación.....	20
Figura 3.	Impresora de pajuelas.....	25
Figura 4.	Secado de pajuelas.....	25
Figura 5.	Esterilización y almacenamiento con rayos UV.....	25
Figura 6.	Preparación de diluyentes.....	27
Figura 7.	Vagina artificial para extracción seminal.....	28
Figura 8.	Monta y recolección de semen.....	29
Figura 9.	Influencia del tiempo y la influencia de los diluyentes en el porcentaje de motilidad total de espermatozoides de semen fresco y congelado/descongelado.....	37
Figura 10.	Influencia del tiempo y la influencia de los diluyentes en el porcentaje de motilidad progresiva de espermatozoides de semen fresco y congelado/descongelado.....	38
Figura 11.	Influencia del tiempo y la influencia de los diluyentes en el porcentaje de motilidad local de espermatozoides de semen fresco y congelado/descongelado.....	40
Figura 12.	Influencia del tiempo y la influencia de los diluyentes en la velocidad curvilínea (VCL) de espermatozoides de semen fresco y congelado/descongelado.....	41
Figura 13.	Influencia del tiempo y la influencia de los diluyentes en la velocidad media (VAP) de los espermatozoides de semen fresco y congelado/descongelado.....	43
Figura 14.	Influencia del tiempo y la influencia de los diluyentes en la velocidad rectilínea (VSL) de los espermatozoides de semen fresco y congelado/descongelado.....	44
Figura 15.	Influencia de los diluyentes en el índice de linealidad (LIN) de los espermatozoides de semen fresco y congelado/descongelado.....	45

Figura 16.	Influencia de los diluyentes y el tiempo en el índice de rectitud (STR) de los espermatozoides de semen fresco y congelado/descongelado.....	47
Figura 17.	Influencia de los tratamientos en la frecuencia de batida (BCF) de los espermatozoides.....	48
Figura 18.	Influencia del tiempo en la amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) del espermatozoide de semen fresco y congelado/descongelado.....	49
Figura 19.	Influencia del diluyente y los tratamientos en el porcentaje de viabilidad de los espermatozoides.....	50
Figura 20.	Influencia de los tratamientos en el porcentaje de viabilidad de los espermatozoides.....	51
Figura 21.	Influencia de los diluyentes en el porcentaje de funcionalidad de la membrana plasmática de los espermatozoides de semen fresco y congelado/descongelado.....	52

## ÍNDICE DE CUADROS.

N° de Cuadros.	Título.	Pág.
Cuadro 1.	Análisis estadístico.....	23
Cuadro 2.	Evaluación macroscópica de los eyaculados.....	73
Cuadro 3.	Promedio de la influencia del tiempo en el porcentaje de motilidad total espermática.....	73
Cuadro 4.	Promedio de la influencia de los diluyentes en el porcentaje de motilidad total espermática.....	74
Cuadro 5.	ANOVA de la motilidad total espermática.....	74
Cuadro 6.	Promedio de la influencia del tiempo en el porcentaje de motilidad progresiva espermática.....	75
Cuadro 7.	Promedio de la influencia de los diluyentes en el porcentaje de motilidad progresiva espermática.....	75
Cuadro 8.	ANOVA de la motilidad progresiva espermática.....	76
Cuadro 9.	Promedio de la influencia del tiempo en el porcentaje de motilidad local espermática.....	77
Cuadro 10.	Promedio de la influencia de los diluyentes en el porcentaje de motilidad local espermática.....	77
Cuadro 11.	ANOVA de la motilidad local espermática.....	77
Cuadro 12.	Promedio de la influencia del tiempo en la velocidad curvilínea (VCL) espermática.....	78
Cuadro 13.	Promedio de la influencia de los diluyentes en la velocidad curvilínea (VCL) espermática.....	78
Cuadro 14.	ANOVA de la velocidad curvilínea (VCL) espermática.....	79
Cuadro 15.	Promedio de la influencia del tiempo en la velocidad media (VAP) espermática.....	80
Cuadro 16.	Promedio de la influencia de los diluyentes en la velocidad media (VAP) espermática.....	80
Cuadro 17.	ANOVA de la velocidad media (VAP) espermática.....	80
Cuadro 18.	Promedio de la influencia del tiempo en la velocidad rectilínea (VSL) espermática.....	81

Cuadro 19.	Promedio de la influencia de los diluyentes en la velocidad rectilínea (VSL) espermática.....	81
Cuadro 20.	ANOVA de la velocidad rectilínea (VSL) espermática.....	82
Cuadro 21.	Promedio de la influencia del diluyente en el índice de linealidad (LIN) de los espermatozoides.....	83
Cuadro 22.	ANOVA del índice de linealidad (LIN) de espermatozoides.....	83
Cuadro 23.	Promedio de la influencia del diluyente en el índice de rectitud (STR) de los espermatozoides.....	84
Cuadro 24.	Promedio de la influencia del tiempo en el índice de rectitud (STR) de los espermatozoides.....	84
Cuadro 25.	ANOVA del índice de rectitud (STR) de los espermatozoides.....	85
Cuadro 26.	Promedio de la influencia de los tratamientos en la frecuencia de batida (BCF) de los espermatozoides.....	86
Cuadro 27.	ANOVA de la frecuencia de batida (BCF) de los espermatozoides.....	86
Cuadro 28.	Promedio de la influencia del tiempo en la amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) de los espermatozoides.....	87
Cuadro 29.	ANOVA de la amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) de los espermatozoides.....	88
Cuadro 30.	Promedio de la influencia de los diluyentes en el porcentaje de viabilidad de los espermatozoides.....	88
Cuadro 31.	Promedio de la influencia de los tratamientos en el porcentaje de viabilidad de los espermatozoides.....	89
Cuadro 32.	ANOVA de la viabilidad espermática.....	89
Cuadro 33.	Promedio de la influencia de los tratamientos en el porcentaje de morfología de los espermatozoides.....	90
Cuadro 34.	ANOVA de la morfología espermática.....	90
Cuadro 35.	Promedio de la influencia de los diluyentes en el porcentaje de funcionalidad de membrana plasmática (Host) de los espermatozoides.....	91
Cuadro 36.	ANOVA de la funcionalidad de la membrana plasmática (Host).....	91

Cuadro 37.	Evaluación microscópica de semen fresco y congelado/descongelado en la primera extracción (motilidad-Teutón).....	92
Cuadro 38.	Evaluación microscópica de semen fresco y congelado/descongelado en la segunda extracción (motilidad-Teutón).....	93
Cuadro 39.	Evaluación microscópica de semen fresco y congelado/descongelado en la tercera extracción (motilidad-Teutón).....	94
Cuadro 40.	Evaluación microscópica de semen fresco y congelado/descongelado en la cuarta extracción (motilidad-Teutón).....	95
Cuadro 41.	Evaluación microscópica de semen fresco y congelado/descongelado en la primera extracción (motilidad-Manuelito).....	96
Cuadro 42.	Evaluación microscópica de semen fresco y congelado/descongelado en la segunda extracción (motilidad-Manuelito).....	97
Cuadro 43.	Evaluación microscópica de semen fresco y congelado/descongelado en la tercera extracción (motilidad-Manuelito).....	98
Cuadro 44.	Evaluación microscópica de semen fresco y congelado/descongelado en la cuarta extracción (motilidad-Manuelito).....	99
Cuadro 45.	Evaluación microscópica de semen fresco y congelado/descongelado en la primera extracción (viabilidad-teutón).....	100
Cuadro 46.	Evaluación microscópica de semen fresco y congelado/descongelado en la segunda extracción (viabilidad-Teutón).....	100
Cuadro 47.	Evaluación microscópica de semen fresco y congelado/descongelado en la tercera extracción (viabilidad-Teutón).....	101
Cuadro 48.	Evaluación microscópica de semen fresco y congelado/descongelado en la cuarta extracción (viabilidad-Teutón).....	102
Cuadro 49.	Evaluación microscópica de semen fresco y congelado/descongelado en la primera extracción (viabilidad-Manuelito).....	103
Cuadro 50.	Evaluación microscópica de semen fresco y congelado/descongelado en la segunda extracción (viabilidad-Manuelito).....	104
Cuadro 51.	Evaluación microscópica de semen fresco y congelado/descongelado en la tercera extracción (viabilidad-Manuelito).....	105

Cuadro 52.	Evaluación microscópica de semen fresco y congelado/descongelado en la cuarta extracción (viabilidad-Manuelito).....	105
Cuadro 53.	Evaluación microscópica de semen fresco y congelado/descongelado en la primera extracción (morfología-Teutón).....	106
Cuadro 54.	Evaluación microscópica de semen fresco y congelado/descongelado en la segunda extracción (morfología-Teutón).....	107
Cuadro 55.	Evaluación microscópica de semen fresco y congelado/descongelado en la tercera extracción (morfología-Teutón).....	108
Cuadro 56.	Evaluación microscópica de semen fresco y congelado/descongelado en la cuarta extracción (morfología-Teutón).....	108
Cuadro 57.	Evaluación microscópica de semen fresco y congelado/descongelado en la primera extracción (morfología-Manuelito).....	109
Cuadro 58.	Evaluación microscópica de semen fresco y congelado/descongelado en la segunda extracción (morfología-Manuelito).....	110
Cuadro 59.	Evaluación microscópica de semen fresco y congelado/descongelado en la tercera extracción (morfología-Manuelito).....	111
Cuadro 60.	Evaluación microscópica de semen fresco y congelado/descongelado en la cuarta extracción (morfología-Manuelito).....	111
Cuadro 61.	Evaluación microscópica de semen congelado/descongelado en la primera extracción (test host-Teutón).....	112
Cuadro 62.	Evaluación microscópica de semen congelado/descongelado en la segunda extracción (test host-Teutón).....	113
Cuadro 63.	Evaluación microscópica de semen congelado/descongelado en la tercera extracción (test host-Teutón).....	113
Cuadro 64.	Evaluación microscópica de semen congelado/descongelado en la cuarta extracción (test host-Teutón).....	114
Cuadro 65.	Evaluación microscópica de semen congelado/descongelado en la primera extracción (test host-Manuelito).....	114
Cuadro 66.	Evaluación microscópica de semen congelado/descongelado en la segunda extracción (test host-Manuelito).....	115
Cuadro 67.	Evaluación microscópica de semen congelado/descongelado en la tercera extracción (test host-Manuelito).....	115

Cuadro 68.	Evaluación microscópica de semen congelado/descongelado en la cuarta extracción (test host-Manuelito).....	116
------------	--	-----

## ÍNDICE DE ANEXOS.

<b>Nº de Anexo.</b>	<b>Título.</b>	<b>Pág.</b>
Anexo 1.	Resultado de los exámenes de Brucelosis de los reproductores antes de empezar el estudio.....	70
Anexo 2.	Resultado de los exámenes de Leptospira de los reproductores antes de empezar el estudio.....	71
Anexo 3.	Certificado de registro del toro donador Teutón.....	72
Anexo 4.	Datos obtenidos de la evaluación macroscópica del semen fresco....	73
Anexo 5.	Datos de la influencia del tiempo y los diluyentes en la motilidad total de espermatozoides.....	73
Anexo 6.	Datos de la influencia del tiempo y los diluyentes en la motilidad progresiva de los espermatozoides.....	75
Anexo 7.	Datos de la influencia del tiempo y los diluyentes en la motilidad local de los espermatozoides.....	76
Anexo 8.	Datos de la influencia del tiempo y los diluyentes en la velocidad curvilínea (VCL) de los espermatozoides.....	78
Anexo 9.	Datos de la influencia del tiempo y los diluyentes en la velocidad media (VAP) de los espermatozoides.....	79
Anexo 10.	Datos de la influencia del tiempo y los diluyentes en la velocidad rectilínea (VSL) de los espermatozoides.....	81
Anexo 11.	Datos de la influencia del tiempo y los diluyentes en el índice de linealidad (LIN) de los espermatozoides.....	82
Anexo 12.	Datos de la influencia del tiempo y los diluyentes en el índice de rectitud (STR) de los espermatozoides.....	84
Anexo 13.	Datos de la influencia de los tratamientos en la frecuencia de batida (BCF) de los espermatozoides.....	85
Anexo 14.	Datos de la influencia del tiempo en la amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) de los espermatozoides.....	87
Anexo 15.	Datos de la influencia de los diluyentes y los tratamientos en el porcentaje de viabilidad de los espermatozoides.....	88
Anexo 16.	Datos de la influencia de los tratamientos en el porcentaje de morfología de los espermatozoides.....	90

Anexo 17.	Datos de la influencia de los diluyentes en el porcentaje de funcionalidad de membrana plasmática (HOST) de los espermatozoides.....	91
Anexo 18.	Datos obtenidos del sistema CASA al evaluar el semen fresco y congelado/descongelado.....	92
Anexo 19.	Datos obtenidos del sistema CASA al evaluar el semen fresco y congelado/descongelado.....	93
Anexo 20.	Datos obtenidos del sistema CASA al evaluar el semen fresco y congelado/descongelado.....	94
Anexo 21.	Datos obtenidos del sistema CASA al evaluar el semen fresco y congelado/descongelado.....	95
Anexo 22.	Datos obtenidos del sistema CASA al evaluar el semen fresco y congelado/descongelado.....	96
Anexo 23.	Datos obtenidos del sistema CASA al evaluar el semen fresco y congelado/descongelado.....	97
Anexo 24.	Datos obtenidos del sistema CASA al evaluar el semen fresco y congelado/descongelado.....	98
Anexo 25.	Datos obtenidos del sistema CASA al evaluar el semen fresco y congelado/descongelado.....	99
Anexo 26.	Datos de la evaluación microscópica de los reproductores.....	100
Anexo 27.	Datos de la evaluación microscópica de los reproductores.....	100
Anexo 28.	Datos de la evaluación microscópica de los reproductores.....	101
Anexo 29.	Datos de la evaluación microscópica de los reproductores.....	102
Anexo 30.	Datos de la evaluación microscópica de los reproductores.....	103
Anexo 31.	Datos de la evaluación microscópica de los reproductores.....	104
Anexo 32.	Datos de la evaluación microscópica de los reproductores.....	105
Anexo 33.	Datos de la evaluación microscópica de los reproductores.....	105
Anexo 34.	Datos de la morfología del semen fresco y congelado/descongelado.....	106
Anexo 35.	Datos de la morfología del semen fresco y congelado/descongelado.....	107
Anexo 36.	Datos de la morfología del semen fresco y congelado/descongelado.....	108

Anexo 37.	Datos de la morfología del semen fresco y congelado/descongelado.....	108
Anexo 38.	Datos de la morfología del semen fresco y congelado/descongelado.....	109
Anexo 39.	Datos de la morfología del semen fresco y congelado/descongelado.....	110
Anexo 40.	Datos de la morfología del semen fresco y congelado/descongelado. ....	111
Anexo 41.	Datos de la morfología del semen fresco y congelado/descongelado.....	111
Anexo 42.	Datos de la funcionalidad de membrana (TEST HOST) en semen congelado/descongelado.....	112
Anexo 43.	Datos de la funcionalidad de membrana (TEST HOST) en semen congelado/descongelado.....	112
Anexo 44.	Datos de la funcionalidad de membrana (TEST HOST) en semen congelado/descongelado.....	113
Anexo 45.	Datos de la funcionalidad de membrana (TEST HOST) en semen congelado/descongelado.....	114
Anexo 46.	Datos de la funcionalidad de membrana (TEST HOST) en semen congelado/descongelado.....	114
Anexo 47.	Datos de la funcionalidad de membrana (TEST HOST) en semen congelado/descongelado.....	115
Anexo 48.	Datos de la funcionalidad de membrana (TEST HOST) en semen descongelado.....	115
Anexo 49.	Datos de la funcionalidad de membrana (TEST HOST) en semen congelado/descongelado.....	116
Anexo 50.	Tratamiento para leptospirosis en los toros Brown swiss y Patua ( <i>Bos taurus</i> ).....	117
Anexo 51.	Suministro de sal mineral a los toros destinados a la investigación (Brown swiss).....	117
Anexo 52.	Extracción seminal Brown swiss y Patua.....	117
Anexo 53.	Impresión de pajuelas.....	118

Anexo 54.	Recepción del semen bovino en el laboratorio.....	118
Anexo 55.	Dilución de semen bovino ( <i>Bos taurus</i> ).....	118
Anexo 56.	Análisis de viabilidad espermática.....	119
Anexo 57.	Diseño de curva de congelación en el equipo Ice Cube.....	119
Anexo 58.	Póster divulgativo ESPE Investiga.....	120

## RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar la eficiencia de dos diluyentes caseros Triladyl y EYC y un diluyente comercial Andromed evaluados a diferentes tiempos de análisis en semen fresco y congelado/descongelado. Se utilizó semen de las razas Brown swiss y Patua (*Bos taurus*), colectados con vagina artificial, diluido y envasado en pajuelas de 0,5 ml, con una concentración de  $30 \times 10^6$  espermatozoides, las pajuelas fueron congeladas en el Ice Cube con una curva de congelamiento que duró 7 minutos con 13 segundos. Las pajuelas con contenido seminal fueron llevadas al termo banco de 45 kg a una temperatura de  $-196 \text{ }^\circ\text{C}$  durante un tiempo determinado. Se evaluó motilidad total con el sistema CASA, viabilidad espermática, morfología espermática y funcionalidad de membrana (test HOST) pre y post congelación. Los datos fueron analizados con pruebas de significación de Duncan con el 95% de confiabilidad. En conclusión los tres diluyentes utilizados muestran diferencias significativas en cuanto al tiempo de análisis luego de la extracción y descongelamiento del semen bovino, obteniendo mejores resultados a la hora cero. El diluyente Andromed preserva de mejor manera las células espermáticas tanto en semen fresco como descongelado seguido por EYC y Triladyl.

Palabras Claves:

- **DILUYENTES**
- **SEMEN**
- **CÉLULA ESPERMÁTICA**

## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the efficiency of three dilutants, two home made (Triladyl and EYC) and one commercial (Andromed). The dilutants were evaluated in fresh and frozen semen. The evaluated semen strows were from Browns swiss and Patua bulls collected using an artificial vagina and stored in 0.5 ml straw. The concentration was  $30 \times 10^6$  sperms/cc. The straws were frozen in 7 minutes using an Ice Cube. The straws were stored in a thermos. There determinated variables were: motility, viability, morphology and membrane functionality, using the CASA system. The data were analized using the ANOVA procedure and the means were separated using the Duncan method at 95% confidence. In conclusion, from the times the semen was evaluated, the time 0 hours the best, because it was better in all evaluated parametres. The Andromed dilutant was the one that preserve better the morphological and physiological characteristics.

Key words:

- **DILUTANTS**
- **SEMEN**
- **SPERMATIC CELL**

## EVALUACIÓN DE DOS DILUYENTES CASEROS Y UN DILUYENTE COMERCIAL PARA CRIOPRESERVAR SEMEN BOVINO DE LAS RAZAS BROWN SWISS Y PATUA (*Bos taurus*) EN EL TRÓPICO HÚMEDO

### I. INTRODUCCIÓN

El proceso de criopreservación es una técnica que permite la viabilidad del material biológico por tiempo indefinido (Ramos, 1996). La criopreservación es el proceso en el cual células o tejidos son congelados a muy bajas temperaturas, generalmente entre -80 °C y -196 °C (el punto de ebullición del nitrógeno líquido) para disminuir las funciones vitales de una célula y poderla mantener en condiciones de vida suspendida por mucho tiempo. A esas temperaturas, cualquier actividad biológica, incluidas las reacciones bioquímicas que producirían la muerte de una célula, quedan efectivamente detenidas. Esta tecnología constituye una alternativa para el establecimiento de bancos genéticos, los cuales ayudan a mantener la biodiversidad y asegurar la conservación física de una especie (Cloud *et al.*, 1990; Medina-Robles *et al.*, 2006). Una de las cuestiones importantes relacionadas con la eficiencia de las técnicas de criopreservación es la velocidad de reducción de la temperatura durante el congelamiento. El tipo de curva utilizada durante la congelación tiene influencia directa en el grado de las lesiones celulares, debido a procesos de deshidratación y formación de cristales de hielo intracelulares (Moore *et al.*, 2006).

La criopreservación de semen es una importante biotecnología reproductiva, que busca promover la conservación del germoplasma por tiempo indeterminado. Esta biotecnología, cuando se asocia a la inseminación artificial, representa un mecanismo eficiente para la promoción y difusión de material genético de excelente calidad. La criopreservación de semen proporciona una economía para el productor, al reducir los costos de alimentación y transporte de los reproductores, así como los riesgos de transmisión de enfermedades sexualmente transmisibles (Castelo *et al.*, 2008). Entre los agentes crioconservantes los más utilizados son el DMSO y el

glicerol. Es necesario contar con adecuados diluyentes que nos permitan mediante su composición emplearlos de una manera fácil y objetiva (Gadea, 2003); el empleo del diluyente correcto para la criopreservación de semen bovino permite obtener un material genético en óptimas condiciones para lograr una fecundación y con esto generar una mejora sustancial al sector pecuario, que este crezca y de paso mejorar genéticamente su hato ganadero. Esto es muy importante ya que la inseminación artificial es beneficiosa en la ganadería, sea para el propósito de carne o leche y un objetivo que buscó esta investigación fue conocer y comparar la eficiencia de diluyentes comercial y de preparación casera en criopreservación de semen bovino con sus respectivos pasos de preparación.

Según el INEC, en el 2013 existe un total de 46 171 bovinos nacidos (machos y hembras) en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, lo que se considera bajo comparado con las otras provincias, teniendo en cuenta el índice de reproducción de otras provincias el índice que presenta Santo Domingo es bajo, es posible que se deba al desconocimiento de biotécnicas reproductivas como la inseminación artificial (I.A.) y transferencia de embriones (T.E.), en donde la implementación y el éxito esperado de las mismas no han brindado una solución sustancial ya que por desconocimiento de estas biotecnologías el material genético (semen) utilizado en la I.A. ha sido introducido a nuestro país sin considerar ciertas condiciones de calidad del material seminal, así como factores ambientales relevantes para lograr el éxito esperado tales como: clima y topografía, condiciones del animal que incluyen manejo, alimentación, ciclo reproductivo lo que genera pérdida genética y un retroceso en los avances ya obtenidos con semen de toros adaptados al medio.

Este bajo índice reproductivo ganadero en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, no contribuye al crecimiento del hato ganadero en cantidad y calidad genética lo que genera que la producción pecuaria en la zona no se intensifique; para impedir esa pérdida genética se realizó esta investigación con el fin evaluar dos diluyentes caseros y un diluyente comercial con el objetivo de criopreservar semen

bovino de la raza Brown swiss y Patua (*Bos taurus*), para identificar que tipo de diluyente es el indicado para toros que están adaptados a nuestro medio. Además este proyecto contribuye al conocimiento en el área ya que no existe estudio alguno sobre la criopreservación del eyaculado de la raza Patua (*Bos taurus*) a nivel local.

Para esta investigación se emplearon dos toros, un ejemplar de la raza Brown swiss otro de la raza Patua (*Bos taurus*), de cada toro se obtuvieron 4 eyaculados mediante la técnica de colecta con vagina artificial, de cada eyaculado una fracción fue diluida ya sea con uno de los diluyentes caseros (Triladyl ó Yema de Huevo Citrato (EYC)) o diluyente comercial (Andromed), y se evaluaron parámetros espermáticos tanto en semen fresco a distintos tiempos (hora 0, 1 y 2), como en semen congelado/descongelado. Se considera como unidad experimental a la fracción de semen colectada por vagina artificial diluido en uno de los diluyentes empleados en este estudio, donde se realizó una evaluación macroscópica (volumen, color, pH, y presencia de cuerpos extraños) y microscópica (concentración, motilidad, viabilidad y morfología espermática), obteniendo los mejores resultados con el diluyente comercial Andromed.

El diluyente comercial Andromed utilizado para dilución y criopreservación ha dado buenos resultados en esta investigación, al nutrir y preservar la viabilidad del espermatozoide bovino. Los diluyentes caseros utilizados en este estudio EYC y Triladyl, demostraron ser buenos en la preservación de semen fresco en base a los parámetros evaluados. Investigaciones realizadas muestran buenos resultados en la utilización de diluyentes a base de proteína animal, sin embargo al sustituir la yema de huevo por la lecitina de soya representan en este estudio una mejora en los resultados obtenidos en lo que respecta a motilidad y la viabilidad espermática post descongelación, teniendo en cuenta que el costo de los diluyentes que se utilizaron son similares, no obstante Andromed (diluyente a base de lecitina de soya), posee una ventaja respecto al Triladyl y EYC por su fácil preparación y procesamiento de semen (Fukui, Kohno, Togari, Hiwasa, & Okabe, 2008).

La investigación fue realizada en el Laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE-IASA II, en la ciudad de Santo

Domingo. Los resultados obtenidos en esta investigación indican que el uso de los diluyentes Andromed, EYC y Triladyl, permiten mantener la viabilidad espermática para su uso en IA, lo que representa una potencial herramienta a usar a nivel productivo local para mejorar y potenciar el uso de esta biotecnología reproductiva en reproductores de buen nivel genético en nuestros hatos ganaderos.

Para esta investigación se ha planteado los siguientes objetivos:

### **1.1. OBJETIVO GENERAL:**

- ✓ Evaluar dos diluyentes caseros (Triladyl y EYC) y un diluyente comercial (Andromed) para criopreservar semen bovino de la raza Brown swiss y Patua (*Bos taurus*) en el trópico húmedo.

## **1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- ✓ Determinar parámetros de motilidad del semen pre y post descongelación con el fin de evaluar la efectividad de los distintos diluyentes de un eyaculado de toros de raza Brown swiss y Patua (*Bos taurus*).
- ✓ Evaluar los diluyentes utilizados en parametros de morfología, concentración, viabilidad y funcionalidad de membrana (test HOST) a nivel espermático.

## **II. REVISIÓN DE LITERATURA.**

### **2.1. MÉTODOS PARA LA COLECCIÓN DE SEMEN.**

Existen varios métodos de colección de semen bovino, entre los cuales se mencionan los siguientes:

- 1). Vagina artificial.
- 2). Electroeyaculador.

### **2.1.1. Colección de Semen con Vagina Artificial (VA)**

El eyaculado obtenido con VA es considerado como una muestra de semen representativa por parte del toro en el momento de la extracción, similar a lo que sucede en la monta natural; donde existe dos aspectos importantes a considerar: el estímulo del animal y la higiene (Galina *et al.*, 2006).

Para realizar la extracción del eyaculado con VA antes de la monta hay que lavar con agua limpia, secar el vientre y la zona prepucial, además se debe recortar los pelos del prepucio con una longitud no mayor de 2 cm, se debe estimular previamente al toro mediante la monta falsa, que consiste en permitir al semental montar sobre la vaca/maniquí y desviar el pene sin ofrecerle la vagina. Después de algunos segundos de intento de búsqueda de la vagina, el animal desciende sin haber eyaculado, a continuación en un segundo intento de monta se desvia la punta del pene hacia la entrada de la VA permitiendo que este penetre el dispositivo previamente preparado simulando la temperatura y presión de una vagina natural con lo que se permite que el toro se lance hacia delante en un empuje pélvico final que se acompaña de la eyaculación. El objetivo de la monta falsa en el bovino es para mejorar la calidad del semen en cuanto a volumen, concentración espermática y motilidad (Galina *et al.*, 2006).

### **2.1.2. Colección de Semen por Electroeyaculación (EE)**

El electroeyaculador estimula los nervios pélvicos simpáticos y parasimpáticos del animal impulsando mediante voltaje con el fin de inducir la erección peneana y eyaculación. Se debe lubricar el cilindro del electroeyaculador

para introducirlo por el ano en la región rectal ocupando la cavidad pélvica. Los nervios sacros que causan erección y eyaculación están localizados en la región sacro-pélvica. El estímulo aplicado, que corresponden a impulsos eléctricos de bajo voltaje debe ser intermitente y, su intensidad aumentada paulatinamente hasta obtener el eyaculado (Galina *et al.*, 2006).

## **2.2. EVALUACIÓN MACROSCÓPICA DEL SEMEN FRESCO**

La evaluación macroscópica se realiza inmediatamente de haber sido colectada la muestra, para obtener los valores que van a determinar si la muestra obtenida es suficiente para ser destinadas a IA en sus distintas modalidades y el número de dosis que podemos lograr de esta. Los valores más importantes que determinan la producción de dosis de semen son: el volumen, la motilidad individual (MI), la concentración espermática y la morfología espermática (Rosenberger, 1981).

### **2.2.1. Volumen**

El volumen es medido en el tubo de colección. Los materiales deben ser estériles, en especial si la muestra se va a utilizar para refrigeración, congelación o cultivo. Para el volumen existen algunos valores de referencia tanto para el semen obtenido con VA como para las recolecciones con EE; estos valores han sido establecidos basándose en experiencias con VA, que el eyaculado de un toro joven tiene en promedio un volumen mayor de 2 ml, mientras que un toro adulto tiene un volumen mayor de 4 ml. Las pruebas con EE indican como valores normales de 5 a 7 ml o volúmenes superiores La medida de volumen se expresa en mililitros (ml). (Rosenberger, 1981).

### **2.2.2. Color**

La aparición de colores u olores no característicos de un eyaculado en buen estado puede ser debido a alteraciones patológicas del aparato genital o a la mezcla del semen con orina o sangre durante la eyaculación, por eso es recomendable anotar el color y el olor del eyaculado inmediatamente realizada la colecta. En el toro el color del eyaculado depende de su contenido de riboflavina, siendo normalmente blanquecino, marfil hasta amarillento. La coloración rojiza del semen proveniente de un eyaculado indica mezcla con sangre fresca; un color pardo señala la presencia de sangre más vieja (hemolizada), denominándose ambos tipos como hemospermia. Los eyaculados con muy pocos espermatozoides tienen una coloración amarillo-verdoso. Una coloración gris de un eyaculado indica contaminación. El pus en el eyaculado se reconoce frecuentemente por los flóculos denominándose este piospermia (Rosenberger, 1981).

### **2.2.3. pH**

El pH normal del semen bovino es cercano a la neutralidad, con valores que van de 6,7 a 7. La presencia de un aumento del pH, es decir un eyaculado seminal con tendencia a la alcalinidad, es indicador de alteraciones de tipo inflamatorio de uno de los órganos genitales, lo que podría corresponder a afecciones patológicas en el animal. (Jeyendran, Van Ven, Pérez, Grabo y Zaneveld, 1984).

## **2.3. EVALUACIÓN MICROSCÓPICA DEL SEMEN FRESCO**

La evaluación microscópica incluye observaciones como concentración espermática, motilidad, viabilidad y morfología espermática. Para ello se requiere un, fotómetro, sistema CASA o un microscopio con contraste de fase, una platina termorregulable para mantener el portaobjeto a 37°C, pipetas de vidrio, porta objetos y cubre objetos (Barth, 1997).

### **2.3.1. Motilidad Espermática evaluada con Computer Assisted Semen Analysis (CASA).**

El sistema CASA permite evaluar la calidad seminal, asistido por computación, el cual involucra una cámara de video conectado a un microscopio de interfase y a una computadora que toma las imágenes de movimientos espermáticos (O'Conors, 2000).

Según O'conors (2000), el equipo conocido como CASA, es un sistema óptico computarizado que utiliza una luz estroboscópica a una velocidad de 1/1000 de segundo para visualizar el movimiento de los espermatozoides. Una cámara de video recopila en tiempo real 60 imágenes por segundo generando una imagen digitalizada determinado la velocidad de las células espermáticas.

La motilidad analizada por el sistema CASA es el resultado de una captura de imágenes de espermatozoides en movimiento utilizando un microscopio con una lente de 100 ó 200X, estas imágenes se guardan para su posterior análisis, la información obtenida es transferida a un procesador matemático que fragmenta la motilidad espermática en diversos descriptores de la motilidad individual, progresiva y total que caracterizan la linealidad, la angularidad del movimiento espermático y el desplazamiento de la cabeza del espermatozoide (O'Conors, 2000).

Según Mortimer (1997) los tres parámetros de velocidad curvilínea (VCL), velocidad media (VAP) y velocidad rectilínea (VSL) determinan el movimiento espermático, para evaluaciones adicionales se determinaron los parámetros de índice de rectitud (STR), índice de linealidad (LIN) que corresponden al resultado de las relaciones porcentuales de estas velocidades.

Es importante elegir el diluyente y dilución correcta, evitando concentraciones altas que interfieran en la reconstrucción de la trayectoria de las células espermáticas, lo que puede ocasionar cierta sobre posición de trayectorias distintas, de modo que sean interpretados como una sola (Mortimer, 1997). Entre los

principales factores de los que depende el resultado final de la prueba se han señalado: temperatura del semen, volumen analizado, tipo de cámara utilizada, tiempo entre la recogida y el análisis, concentración espermática de la muestra, diluyente utilizado, patologías existentes, tipo de objetivo utilizado, iluminación del microscopio y el área de las partículas (Verstegen *et al.*, 2002).

### **2.3.2. Viabilidad Espermática**

Según Muiño *et al.* (2005) la ruptura de la membrana plasmática está claramente asociada con la pérdida de viabilidad celular, pero una membrana plasmática intacta no siempre indica que la célula sea viable. Los daños que pueden producirse después del proceso de congelación/descongelación son: modificaciones en su organización, permeabilidad y composición lipídica. Las membranas espermáticas que pueden verse afectadas por la criopreservación incluyen la membrana plasmática, la membrana externa del acrosoma y las membranas mitocondriales. Una de las tinciones utilizadas no fluorescentes es eosina nigrosina que permite diferenciar entre espermatozoides vivos (no teñidos) y muertos (teñidos con un color rojizo por la penetración de eosina al interior del espermatozoide al existir pérdida de la integridad de la membrana plasmática).

### **2.3.3. Morfología Espermática**

El espermatozoide tiene la única función de fertilizar al ovocito (Mc. Donald, 1991). El espermatozoide bovino mide aproximadamente 75 micrones de largo y tiene una carga haploide de cromosomas (1n cromosoma, Hafez, 1986). Esta célula espermática está estructurada de tres partes principales: cabeza, cuello y cola (Hafez, 1986; Mc. Donald, 1991). La cabeza del espermatozoide contiene el material genético necesario para transmitir los caracteres hereditarios y mide 8-10 micrones de largo, 4-5 micrones de ancho y 0.5 micrones de grosor (Salisbury *et al.*, 1978; Hafez, 1986; Mc. Donald, 1991). El cuello del espermatozoide es una estructura corta (0.4-1.5 micrones de largo) ubicada entre la cabeza y la pieza intermedia

(Salisbury *et al.*, 1978). La cola del espermatozoide está dividida en tres partes bien diferenciadas: la pieza media, la pieza principal y la pieza terminal (Mc. Donald, 1991). Con todos sus componentes mide 45-50 micrones de largo (Salisbury *et al.*, 1978). Toda modificación de la estructura normal del espermatozoide es considerada como anomalía espermática. Las anomalías se han clasificado en primarias y secundarias (Spitzer, 2000) según la estructura anatómica en la que se generan.

Para los bovinos es considerado como alteración espermática a las atípicas o defectos espermáticos primarios y secundarios; sin embargo, este sistema ha tenido diferentes significados e interpretaciones por los evaluadores. Un defecto primario es el que se origina dentro del testículo durante la espermatogénesis; mientras que un defecto secundario es un defecto que se origina dentro del epidídimo (Barth, 1997).

Las fallas en la espermatogénesis ocasionadas dentro del testículo provocan anomalías espermáticas primarias. Estas anomalías incluyen espermatozoides con poco desarrollo, espermatozoides dobles y defectos de cabeza, entre ellos: protuberancia acrosómica, cabeza piriforme, cabeza estrecha o delgada, espermatozoides microcefálicos, y cabezas libres. La mayoría de los defectos de la cola del espermatozoide también son considerados anomalías primarias, entre ellas están el defecto en la pieza media, presencia de gota citoplasmática proximal, cola enrollada, y colas accesorias (Hafez, 1989; Chenoweth, 1997).

Las anomalías espermáticas secundarias se originan dentro del epidídimo y son las siguientes: cabeza ancha, membranas del acrosoma separadas y dobladas, cabezas normales libres, implantación abaxial de la cola, gota citoplasmática distal, colas con flexiones suaves, enrollamiento en la porción terminal de la cola (Chenoweth, 1997; Spitzer, 2000).

Según Chenoweth (1997) el 70% de los espermatozoides bovinos evaluados deben ser normales, el nivel de tolerancia máximo para los defectos de cabeza es de 15% - 20%, mientras que el nivel de tolerancia para los defectos de acrosoma y cola es de 25%.

#### **2.3.4. Concentración Espermática**

La concentración de espermatozoides se expresa como el número de espermatozoides por ml. La determinación de la concentración espermática se lleva a cabo utilizando un fotómetro calibrado para semen bovino, desarrollado para la medición de concentración de células espermáticas (Bearden *et al.*, 1982).

### **2.4. CONSERVACIÓN DEL SEMEN BOVINO Y DILUYENTES**

El diluyente preserva las características funcionales de las células espermáticas y mantiene el nivel de fertilidad de los espermatozoides, además permite aumentar el volumen del eyaculado hasta obtener las dosis necesarias, (Gadea, 2003).

Los primeros medios utilizados para diluir el semen fueron principalmente las soluciones salinas o azucaradas con el fin de aumentar el volumen del semen más que siendo utilizadas como conservadoras de él (Salisbury, 1982). Por años se ha descubierto, investigado y evaluado muchos medios para la dilución de semen, especialmente semen bovino, los cuales antes de la década de 1950 solo permitían conservar su viabilidad por 1 ó 2 y en ocasiones hasta 4 días a temperaturas de 4°C aproximadamente en estado líquido o inclusive a temperatura ambiente de 15 a 25°C (Sorensen, 1984). En la actualidad el medio más común de almacenamiento es por congelación con nitrógeno líquido, el cual alcanza una temperatura de -196 °C (Sorensen, 1984).

### **2.5. TIPOS DE DILUYENTES**

### **2.5.1. Diluyente de Yema de Huevo Fosfatada**

Este medio, contiene lo siguiente di-Sodio hidrogenofosfato dodecahidrato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O} = 2,0 \text{ g}$ ), Fosfato de Potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4 = 0,2 \text{ g}$ ) y agua destilada = 100 ml. Luego se añade yema de huevo con una concentración del 20% al 50% con un pH final de 6,8 a 7. La dificultad que se tiene con este diluyente a base de yema de huevo es la formación de grumos al no permitir una observación confiable especialmente con el sistema CASA ya que confunde estos grumos con las células espermática (Derivaux, 1982).

### **2.5.2. Diluyente de Yema de Huevo Citratada**

Un medio que contiene citrato sódico asegura de mejor manera la fertilidad y la viabilidad espermática que un medio que contiene como base un fosfato, debido a que el espermatozoide contiene ácido cítrico. La solución de este medio citrato contiene 2,9 g de  $\text{Na}_3\text{O}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  en 100 ml de agua destilada (medio isotónico), a esta solución se añade de 20% a 50% de yema de huevo. El citrato a diferencia del fosfato ejerce una acción dispersante sobre los grumos de grasa de la yema de huevo (Derivaux, 1982).

### **2.5.3. Adiciones Empleadas en Diluyentes**

#### **2.5.3.1. Glucosa y fructosa**

Para favorecer la viabilidad espermática es necesario la adición de cualquier de estos dos tipos de hexosas: glucosa o fructosa un medio de dilución manteniendo

la presión osmótica y el balance electrolítico para el medio (diluyente) (Derivaux, 1982).

### **2.5.3.2. Agentes antimicrobianos**

Existe la posibilidad de que el eyaculado contenga algunos patógenos y de que otras fuentes que contribuyan a la contaminación de este. El número de organismos contaminantes por ml puede variar entre no detectables y varios millones; algunos de los organismos contaminantes presentes en una muestra de eyaculado no pueden ser patógenos, pero compiten con los espermatozoides por nutrientes y pueden producir sustancias resultantes de un proceso metabólico que tienen efectos adversos sobre la viabilidad de los espermatozoides. En 1946 se descubrió el efecto benéfico de añadir antibióticos a los diluyentes de semen dentro de los más empleados para contrarrestar efectos adversos están: Sulfonamidas, penicilinas, estreptomicinas y polimixinas (Derivaux, 1982).

### **2.5.4. Concentrados Comerciales para la Elaboración de Diluyentes**

#### **2.5.4.1. El universal de IMV**

Este concentrado comercial es fabricado en Francia, llamado también “Concentrado buffer EUROPHOS bovino” contiene ácido cítrico, carbohidratos, buffer de iones hidrogenados, un antibiótico llamado “antibióticos CSS” equivalente a 60 mg de tilosina, 300 mg de gentamicina y 180/360 mg. de lincospectina; y glicerol (Manual de Universal de IMV, 1995).

#### **2.5.4.2. Triladyl**

Fabricado por el laboratorio Minitube en Alemania, es un concentrado comercial basado en Tris (Hidroxi-metil aminometano, un amortiguador sintético), contiene agua bidestilada, fructosa, ácido cítrico y glicerol, también lleva en su formulación los siguientes antibióticos: tilosina 5 mg, gentamicina 25 mg, espectinomicina 30 mg y lincomicina 15 mg por cada 100 ml (Manual de Triladyl, 1993).

Para su preparación se adiciona tres partes de agua bidestilada, una parte de yema de huevo y una parte del concentrado comercial. Cabe mencionar que este diluyente a base de proteína animal es el más empleado para diluir y congelar semen bovino en la actualidad, pero no para análisis espermático en el sistema CASA debido a los grumos de grasa de la yema de huevo que dificulta la lectura espermática (Manual de Triladyl, 1993).

#### **2.5.4.3. Biladyl**

Fabricado en Alemania por laboratorios minitube; este diluyente está constituido por una fracción “A”, una “B” (con glicerol) y una “C” con antibióticos. (Catálogo Minitube, 2003).

#### **2.5.4.4. Andromed**

Diluyente comercial a base de lecitina de soya libre de compuestos de origen animal, para dilución y congelación de semen bovino. Andromed ha logrado tasas de no retorno hasta de 2,6% mayores que los diluyentes convencionales preparados a base de yema de huevo (del 67,85% con los preparados a base de yema de huevo contra un 70,45% con el diluyente sin yema de huevo (Salisbury, 1978).

Las ventajas del diluyente que no contiene yema de huevo es que no tiene ingredientes de origen animal, no existe riesgo de contaminación bacteriana, tiene

altas tasas de concepción, incrementa tasa de no retorno, contiene una fórmula antibiótica estandarizada y lo más importante es fácil de preparar, ahorra tiempo, donde solo se debe diluir el contenido de una botella de Andromed (200 ml) en 800 ml de agua pura para preparar un litro de diluyente. Este diluyente permite evaluar las características de los espermatozoides en el microscopio fácilmente, ya que no se observan los grumos de la yema de huevo o las burbujas de la leche. Por lo tanto se puede implementar un mejor estándar de selección espermática (Salisbury, 1982).

## **2.6. EVALUACIÓN MICROSCÓPICA DE SEMEN**

### **CONGELADO/DESCONGELADO**

Catena y Cabodevila (1999) manifiestan que para evaluar semen resulta esencial contar con un microscopio de calidad, preferentemente con adaptación para contraste de fase, una platina térmica y un baño María. Entre las características microscópicas en la evaluación seminal postcongelación podemos señalar:

#### **2.6.1. Motilidad Individual (MI)**

El porcentaje de motilidad progresiva y el vigor son determinados inmediatamente después de descongelado el semen y luego de dos horas de incubación. La evaluación de la MI en semen fresco es importante para la identificación de eyaculados que pudieran estar por debajo del 50 %, por lo que deberían desecharse aquellas muestras. Esto significa que si la motilidad individual es baja en semen fresco, disminuirá en el proceso de congelación y descongelación. La valoración del porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva después del proceso de congelación es de gran importancia ya que una fertilidad óptima se produce cuando el número de espermatozoides móviles en progresión postcongelación varía entre 5 a 15 millones por unidad o dosis dependiendo del nivel de fertilidad del toro (Salisbury, Vandemark y Lodge, 1978).

### **2.6.2. Viabilidad Post Descongelación.**

La viabilidad espermática post descongelación se determina mediante el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva y el vigor espermático; se recomienda un examen directo de acrosoma (Catena y Cabodevila, 1999).

### **2.6.3. Morfología Espermática**

Los toros que van a utilizarse en inseminación artificial deben producir semen que no contengan excesivo número de espermatozoides morfológicamente anormales. La vigilancia continua del semen de cada toro con recuentos morfológicos mensuales es recomendable (Davies, Hall, Hibbit y Moore, 1975).

### **2.6.4. Test Hiposmotico (Hyposmotic Swelling Test - HOST)**

La integridad y el buen funcionamiento de la membrana plasmática de los espermatozoides es fundamental para la fertilización, es necesario para los espermatozoides tener una membrana plasmática íntegra ya que les permite movilizarse por el tracto reproductor femenino. Para poder fertilizar el ovocito el espermatozoide debe capacitarse, hiperactivarse y experimentar la reacción acrosomal, procesos que involucran a la membrana plasmática. Determinar el funcionamiento de la membrana plasmática permite conocer la capacidad fecundante de los espermatozoides, la prueba consiste en colocar los espermatozoides en una solución hipoosmótica (Jeyendran *et al.*, 1984).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS:**

#### **3.1. UBICACIÓN GEOGRÁFICA:**

##### **3.1.1. Ubicación Política.**



### 3.1.2. Ubicación Ecológica:

<b>Clima:</b>	Trópico, sub trópico, cálido.
<b>Temperatura media anual:</b>	23,6°C.
<b>Precipitación media anual:</b>	2 980 mm/año.
<b>Heliofanía media anual:</b>	660 horas/luz/año.
<b>Humedad relativa:</b>	91%.
<b>Pluviosidad:</b>	800 – 1.800 mm anuales.
<b>Altitud:</b>	550 msnm

### 3.2. MATERIALES Y REACTIVOS:

#### 3.2.1. Materiales de Campo

- ✓ Vagina artificial y protector, tubos de colecta graduados.

#### 3.2.2. Materiales Biológicos

- ✓ Eyaculado de dos toros de raza Brown swiss y Patua (*Bos taurus*), huevos frescos de gallina.

#### 3.2.3. Materiales de Laboratorio

- ✓ Tips, puntas de 0,5 – 100 – 1000 microlitros, erlenmeyer, tubos de ensayo, vasos de precipitación 25, 50 y 100 ml, pipetas boeco, cubre y porta objetos, gradillas, placas para contraste de fase, piseta, cámara leja, tubos de llenado-succión mpp1, pajuelas de 0,5 ml, conos recolectores de semen, microcubetas, mandil, guantes quirúrgicos.

### **3.2.4. Equipos de Laboratorio**

- ✓ Termómetro digital, fotómetro SpermaCue, platina térmica, autoclave manual Tuttnauer 2540 MK y automática Tuttnauer 2540 E, baño María Fisher scientific B14, esterilizadora Memmert D-91126 y Shuwabac KFR6, refrigeradora, microscopio de contraste de fase D-22297, fuentes de poder HT50 y HT007, microscopio triocular Olympus BX41TF, cámara fotográfica con lente incorporado al microscopio E-330-ADUT-2X, equipo CASA (Computer Assited Sperm Analysis), impresora de pajuelas, envasadora MPP UNO, Ice cube 14S , termo banco 45 kg.

### **3.2.5. Reactivos**

- ✓ Agua ultra pura, glicerol, citrato de sodio, estreptomycin, penicilina, yema de huevo, andromed, triladyl, eosina, nigrosina, aceite de cedro, solución hipoosmótica, HOST formol, nitrógeno líquido, alcohol etílico.

## **3.3. DISEÑO:**

### **3.3.1. Diseño Experimental**

- ✓ Esquema Bifactorial AxB conducido en Diseño Completamente al Azar.

#### **3.3.1.1. Factores a probar**

- ✓ Factor A: Diluyente casero (Yema de huevo y citrato), diluyente casero (Triladyl), diluyente comercial (Andromed).
- ✓ Factor B: Semen bovino de la raza Brown swiss (*Bos taurus*), semen bovino de la raza Patua (*Bos taurus*).

### **3.3.1.2. Tratamientos a comparar**

- ✓ T1= Diluyente casero 1 (Yema de huevo y citrato) con semen bovino de la raza Brown swiss.
- ✓ T2= Diluyente casero 1 (Yema de huevo y citrato) con semen bovino de la raza Patua.
- ✓ T3= Diluyente casero 2 (Triladyl) con semen bovino de la raza Brown swiss.
- ✓ T4= Diluyente casero 2 (Triladyl) con semen bovino de la raza Patua.
- ✓ T5= Diluyente comercial (Andromed) con semen de la raza Brown swiss.
- ✓ T6= Diluyente comercial (Andromed) con semen de la raza Patua.

### **3.3.1.3. Tipo de diseño**

- ✓ Esquema Bifactorial AxB conducido en un DCA.

### **3.3.1.4. Repeticiones**

- ✓ Cuatro repeticiones (tiempo).

### **3.3.1.5. Características de la unidad experimental**

- ✓ 24 unidades experimentales, cada unidad experimental contiene 1 ml de diluyente (casero o comercial) más 0,5 ml de semen de toro de raza Brown swiss y Patua (*Bos taurus*).

### **3.3.1.6. Análisis estadístico**

Cuadro 1. Análisis estadístico

Fuente de variación	G.L.
A	2
B	1
AxB	2
Error	15
Total	23

### 3.4. METODOLOGÍA.

#### 3.4.1. Preparación del Montadero.

Se niveló la superficie del área de monta con arena para uniformizar el terreno, se realizó una aspersion con agua sobre la superficie del montadero una hora antes para evitar que las partículas de polvo se contaminen los eyaculados.

#### 3.4.2. Limpieza y Desinfección del Laboratorio

La limpieza y desinfección del laboratorio se realizó 24 horas antes del proceso de evaluación del semen. Se aspiró el piso, se utilizó alcohol al 70% para limpiar los mesones de madera, los mesones de cerámica se limpiaron con

hipoclorito de sodio en dilución 5:1 y al final se desinfectó el piso con la solución antes mencionada.

### 3.4.3. Impresión de Pajuelas

Para la identificación de las pajuelas se utilizó la impresora AHDR, se colocó 120 pajuelas totalmente estériles, se colocó el sello de caucho en la impresora para distinguir las pajuelas entre donadores y número de salto, se impregnó 2,0 cm de pasta de tinta negra en el rodillo distribuidor. Y se procedió a la impresión de las pajuelas.



Figura 3. Impresora de pajuelas



Figura 4. Secado de pajuelas



Figura 5. Esterilización con rayos UV y almacenamiento de pajuelas usadas en este estudio

#### **3.4.4. Uso de los Diluyentes.**

Para la investigación se utilizó dos diluyentes caseros y un diluyente comercial (Triladyl, EYC y Andromed respectivamente), la preparación de los diluyentes se realizó un día antes a la extracción de semen bovino, dejándolos en refrigeración a una temperatura de 4°C. El cálculo de la cantidad de diluyente utilizado, se realizó teniendo en cuenta la concentración espermática de cada eyaculado.

#### **3.4.5. Preparación de los Diluyentes.**

##### **3.4.5.1. Diluyente comercial: Andromed**

Para la preparación del diluyente comercial se vertió agua destilada en el baño María, luego se encendió y se gradúo a 35°C, se colocó un erlenmeyer con 40 ml de agua ultra pura, en una probeta se vertió 10 ml de diluyente Andromed y se colocó los dos envases al mismo tiempo en el baño María.

Después de 20 minutos se agregó el diluyente al agua ultra pura (relación 4:1) y se dejó en baño María durante cinco minutos para luego retirar y agitar durante

diez minutos, hasta que alcance una temperatura ambiente y se colocó la dilución en refrigeración un día antes de su uso.

#### **3.4.5.2. Diluyente casero 1: Triladyl**

Se vertió agua destilada en el baño María y se graduó a 35°C, continuando con el proceso se vertió 37,5 ml de agua ultra pura en un erlenmeyer 12,5 ml de yema de huevo fresco, a ésta solución se agregó 12,5 ml de diluyente Triladyl (relación 3:1), se mezcló y se colocó en baño Maria por 10 minutos a una temperatura de 35 °C, se homogenizó con el agitador magnético durante 10 minutos hasta que tenga la temperatura del ambiente y finalmente se colocó la dilución en refrigeración un día antes de su uso.

#### **3.4.5.3. Diluyente casero 2: EYC**

Se colocó en un erlenmeyer 40 ml de solución de citrato de sodio al 2,9%, luego se agregó al erlenmeyer 10 ml de yema de huevo fresco, se homogenizó la dilución utilizando el agitador magnético durante cinco minutos, se agregó 500 unidades de penicilina/ml y 1 mg de estreptomicina/ml, se homogenizó con el agitador magnético durante 10 minutos. De la solución de 50 ml de diluyente se separó en dos fracciones de 25 ml cada una, en la primera fracción de 25 ml de diluyente se retiró 1,5 ml de diluyente y se reemplazó por 1,5 ml de glicerol, para evaluar semen fresco; en la segunda fracción de 25 ml de diluyente se retiró 5,5 ml de diluyente y se reemplazó por 5,5 ml de glicerol, para evaluar semen congelado/descongelado.

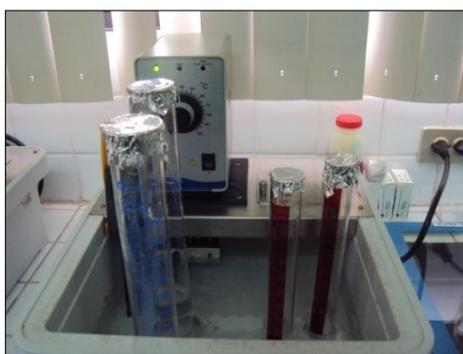


Figura 6. Preparación de diluyentes

#### **3.4.6. Armado de la Vagina Artificial.**

Se limpió los cobertores con alcohol al 70%, se esterilizó las vaginas artificiales en agua hervida para luego ser colocadas en la estufa a una temperatura de 36°C, se procedió a armar la vagina introduciendo en el tubo de látex la camisa de extremo a extremo, en el extremo cercano a la válvula se selló con una liga, se llenó la vagina artificial con agua temperada a 40 °C, se colocó en el extremo opuesto el cono de recolección y el tubo de recolección y finalmente se adicionó la protección térmica.



Figura 7. Vagina artificial para extracción seminal

#### **3.4.7. Preparación del Laboratorio.**

Una vez limpio y desinfectado el laboratorio se llenó el baño María con agua destilada y se graduó a una temperatura de 29°C en el que se colocaron las gradillas con tubos de ensayo tapados y estériles, se encendió la platina térmica a 37°C, y se ubicaron porta objetos y cubre objetos, se encendió el microscopio de contraste de fase y la platina térmica del equipo CASA a 37°C.

#### **3.4.8. Recolección de Semen Bovino.**

Antes de iniciar con la colecta de semen se cepilló y se bañó a los sementales con el fin de que estuvieran libres de contaminantes. Para la colecta del semen se utilizó una vaca maniquí, previamente entrenada. A la vaca en mención se la bañó previo a su utilización con la finalidad de evitar que las partículas de polvo contaminen el semen extraído. Igual procedimiento se realizó con los toros, poniendo mucho énfasis en el área prepucial, a la cual se cortó los pelos de esta zona para evitar la contaminación. Se preparó el equipo de recolección de semen, todo el material del laboratorio que se utilizó en la colecta estuvo esterilizado, de ahí que tanto el material de vidrio como de látex se los mantuvo en estufa a 36°C temperatura.

Se realizó una o dos montas falsas al semental, con el fin de mejorar la concentración y motilidad espermática. En la siguiente monta el operador desvió el pene con la vaina prepucial en dirección a la vagina artificial evitando la penetración en la vaca maniquí; la muestra obtenida (semen) se la evaluó para determinar el color, la presencia de cuerpos extraños y el volumen del eyaculado.

Es necesario proteger al tubo de colecta graduado para evitar la ruptura del mismo y el daño espermático que ocasiona la radiación solar o la temperatura del ambiente. Las muestras fueron trasladadas al laboratorio, en donde se colocó en gradillas, dentro del baño María cuya temperatura fue de 29°C.



Figura 8. Monta y recolección de semen

### **3.4.9. Evaluación de Semen Fresco.**

El análisis del semen fresco se evaluó de manera macro y microscópica, de acuerdo al siguiente detalle:

#### **3.4.9.1. Evaluación macroscópica de semen fresco.**

**Volumen.-** se midió el volumen en tubos de ensayo graduados, luego de la colecta seminal.

**Color.-** se determinó subjetivamente el color de la muestra habiendo sido lechoso, cremoso, amarillento, dependiendo de las circunstancias.

**Olor.-** se evaluó el olor de la muestra de semen característico, si es de un olor desagradable la muestra puede contener bacterias u otro contaminante (desechar).

**Cuerpos extraños.-** se determinó la presencia de cuerpos extraños mediante la observación visual de la muestra.

**pH.-** se determinó su alcalinidad o salinidad mediante el pH portátil.

#### **3.4.9.2. Evaluación microscópica del semen fresco**

##### **3.4.9.2.1. Evaluación de la concentración espermática**

Con una pipeta se tomó 14 µl del eyaculado se llenó la microcubeta del fotómetro y se realizó la lectura de la concentración espermática expresada en  $10^6$  espermatozoides.

#### **3.4.9.2.2. Evaluación de la motilidad con el equipo CASA (Computer Assited Sperm Analysis)**

Se llenó la cámara leja con muestra seminal 1/100, la muestra fue leída con el equipo CASA para su respectivo análisis, se registró y se guardó la información en el equipo para lecturas y análisis posteriores.

#### **3.4.9.3.3. Evaluación de la viabilidad**

Se tomó 14  $\mu$ l de la muestra y se agregó 7  $\mu$ l de eosina y 10  $\mu$ l de nigrosina, se homogenizó, luego se realizó un frotis, se dejó secar al ambiente por 5 minutos, se observó con lente de inmersión. Se contaron 100 espermatozoides para obtener el porcentaje de viabilidad, siendo considerados los espermatozoides vivos aquellos que tienen una coloración transparente y los muertos una coloración púrpura.

#### **3.4.9.3.4. Evaluación de morfología**

Se tomó 14  $\mu$ l de la muestra y se agregó 7  $\mu$ l de eosina y 10  $\mu$ l de nigrosina, se homogenizó y se realizó un frotis, luego se dejó secar al ambiente por 5 minutos, se observó con el lente de inmersión. Se contaron 100 espermatozoides y se obtuvo el porcentaje de espermatozoides normales y anormales; entre estos se evaluaron, macrocéfalos, microcéfalos, cabeza piriforme, cabezas sueltas, cola muñón, cola suelta, cola doblada, cola doble, cola enrollada, gota citoplasmática proximal y distal.

#### **3.4.9.3.5. Evaluación del test HOST**

Se colocó en un tubo de ensayo 1 ml de solución hipoosmótica a 37°C y 25 µl de semen y se agregó 200 µl de solución HOST formol, se tomó 12 µl de la muestra y se observó con un lente de 40X. Se contó 100 espermatozoides, se consideró positivos aquellos que muestran una torsión helicoidal de la cola.

### **3.4.10. Protocolo de Congelación Seminal**

#### **3.4.10.1. Protocolo para congelamiento de semen.**

Se imprimió las pajuelas vacías con la siguiente identificación: nombre del ejemplar, nombre del laboratorio, registro del animal y fecha de impresión.

Con el cálculo de concentración se determinó la cantidad de diluyente a agregar (Yema de huevo y citrato, Triladyl o Andromed), utilizando la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Concentración del eyaculado} * \text{volumen}}{30'000.000}$$

Total /2= cantidad de diluyente que se añade.

Se homogenizó la muestra, luego se realizó el llenado de las pajuelas para ser colocadas en refrigeración a una temperatura de 4°C durante 120 minutos y luego fueron llevadas al Ice Cube.

La curva de congelación que se utilizó para el Ice Cube fue la estándar, con los siguientes tiempos.

- ✓ 2 minutos con 48 segundos de 4°C a -10°C.
- ✓ 2 minutos con 25 segundos de -10°C a -100°C.
- ✓ 2 minutos de -100°C a -140°C.

Las pajuelas con contenido seminal fueron llevadas al Termo banco de 45 kg a una temperatura de -196°C durante un tiempo determinado.

### **3.4.11. Descongelamiento de la Pajuela**

Se graduó el baño María a 37°C, se colocó tubos de ensayo tapados y estériles, se encendió la platina térmica, se depositó las placas cobre y porta objetos sobre la misma, se tomó una pajuela del semen criopreservado y se colocó en el baño María a 37°C durante cuarenta segundos, se retiró y se cortó un extremo de la pajuela que contiene el semen criopreservado, se vació el contenido de la pajuela en el tubo de ensayo y se dejó en baño María por 5 minutos aproximadamente.

### **3.4.12. Evaluación Microscópica de Semen Congelado**

#### **3.4.12.1. Evaluación de la motilidad con el equipo CASA (Computer Assited Sperm Analysis)**

Se llenó la cámara leja con muestra seminal diluida 1/100, la muestra fue leída con el equipo CASA para su respectivo análisis, se registró y se guardó la información en el equipo para lecturas posteriores.

#### **3.4.12.2. Evaluación de la viabilidad**

Se tomó 14 µl de la muestra y se agregó 7 µl de eosina y 10 µl de nigrosina, se homogenizó, luego se realizó un frotis, se dejó secar al ambiente por 5 minutos y se observó con lente de inmersión. Se contaron 100 espermatozoides, para obtener el porcentaje de viabilidad, los espermatozoides vivos tienen una coloración transparente y los muertos una coloración púrpura.

### **3.4.12.3. Evaluación de morfología**

Se tomó 14  $\mu\text{l}$  de la muestra y se agregó 7  $\mu\text{l}$  de eosina y 10  $\mu\text{l}$  de nigrosina, se homogenizó y se realizó un frotis, luego se dejó secar al ambiente por 5 minutos y se observó con el lente de inmersión. Se contó 100 espermatozoides, se obtuvo el porcentaje de espermatozoides normales y anormales entre estos se evaluó, macrocéfalos, microcéfalos, cabeza piriforme, cabezas sueltas, cola muñón, cola suelta, cola doblada, cola doble, cola enrollada, gota citoplasmática proximal y distal.

### **3.4.12.5. Evaluación del test HOST**

Se colocó en un tubo de ensayo 1 ml de solución hipoosmótica a 37°C y 25  $\mu\text{l}$  de semen y se agregó 200  $\mu\text{l}$  de solución HOST formol, se tomó 12  $\mu\text{l}$  de la muestra y se observó con un lente de 40X. Se contó 100 espermatozoides, se consideró positivos aquellos que muestran una torsión helicoidal de la cola.

#### **IV. RESULTADOS.**

##### **4.1. EVALUACIÓN MACROSCÓPICA PRE CONGELACIÓN.**

###### **4.1.1. Volumen Seminal.**

No se observó diferencia de volumen de eyaculados entre los toros donadores, el promedio de volumen del eyaculado para Teutón (Brown swiss) fue de 4,25 ml y para Manuelito (Patua) fue de 3,75 ml (Anexo 4).

###### **4.1.2. Color Seminal.**

El color del eyaculado seminal tanto para Brown swiss como Patua fue lechoso-cremoso (Anexo 4).

###### **4.1.3. Olor.**

El olor del eyaculado de los animales muestreados es el característico de un semen de un toro en buen estado de salud (Anexo 4).

#### **4.1.4. Cuerpos Extraños.**

Mediante observación se determinó que no existe presencia de cuerpos extraños en los eyaculados de los toros.

#### **4.1.5. pH.**

No existe diferencia en el pH de los eyaculados de los toros, tampoco hubo diferencia del pH en los eyaculados de las distintas repeticiones. La media de pH fue de 7 (Anexo 4).

#### **4.1.6. Concentración Espermática**

La concentración espermática promedio para Teutón (Brown swiss) fue de  $750 \times 10^6$  y la concentración espermática promedio para Manuelito (Patua) fue de  $761,5 \times 10^6$  espermatozoides por mililitro (Anexo 4).

### **4.2. EVALUACIÓN MICROSCÓPICA PRE CONGELACIÓN Y POST DESCONGELACIÓN.**

#### **4.2.1. Motilidad Total.**

En la figura 9a se presentan los resultados obtenidos de la influencia del tiempo en el porcentaje de motilidad total de espermatozoides de semen fresco y congelado/descongelado.

En la figura 9b se presentan los resultados obtenidos de la influencia de los diluyentes en el porcentaje de motilidad total de espermatozoides de semen fresco y congelado/descongelado.

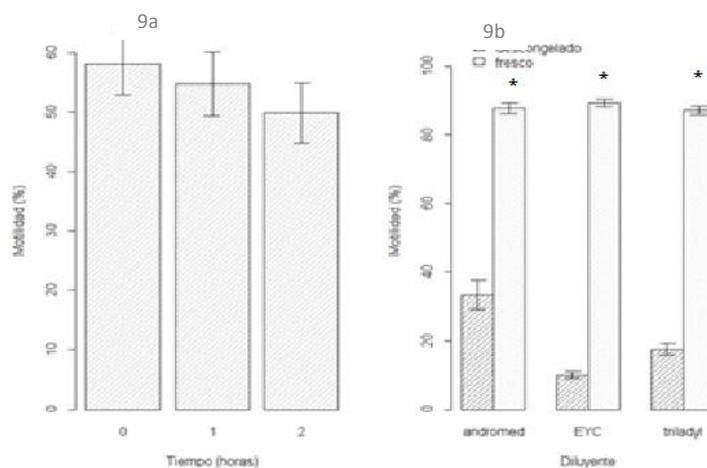


Figura 9. Influencia del tiempo e influencia de los diluyentes en el porcentaje de motilidad total de espermatozoides de semen fresco y congelado/descongelado

<sup>a, b</sup> misma letra indica que no hay diferencia estadística, letras distintas existe diferencia estadística ( $p < 0,005$ ); \* indica que hay diferencia estadística entre variables dentro de un mismo diluyente.

El resultado de la figura 9a informa que mientras avanza el tiempo en el semen fresco y congelado/descongelado la motilidad tiende a descender, no existiendo diferencia entre los tiempos evaluados para las muestras, teniendo como resultado promedio para la hora cero 58%, a la hora uno 55% y dos horas 50% de motilidad total.

En la figura 9b se muestra que en semen fresco no existe diferencia significativa en el porcentaje de motilidad de los espermatozoides entre los distintos diluyentes, teniendo como resultado promedio en semen fresco una motilidad para Andromed 89%, EYC 90%, Triladyl 88% respectivamente. Existe diferencia en el porcentaje de motilidad de los espermatozoides de las muestras congelada/descongelada, observándose diferencia significativa entre los tres diluyentes evaluados, obteniendo un mayor porcentaje de motilidad en Andromed (33%), seguido por Triladyl (19 %) y EYC (11%) respectivamente. El coeficiente de variación es de 15,98 (Anexo 5).

#### 4.2.2. Motilidad Progresiva

En la figura 10a se presentan los resultados obtenidos de la influencia del tiempo en el porcentaje de motilidad progresiva de espermatozoides de semen fresco y congelado/descongelado.

En la figura 10b se presentan los resultados obtenidos de la influencia de los diluyentes en el porcentaje de motilidad progresiva de espermatozoides de semen fresco y congelado/descongelado.

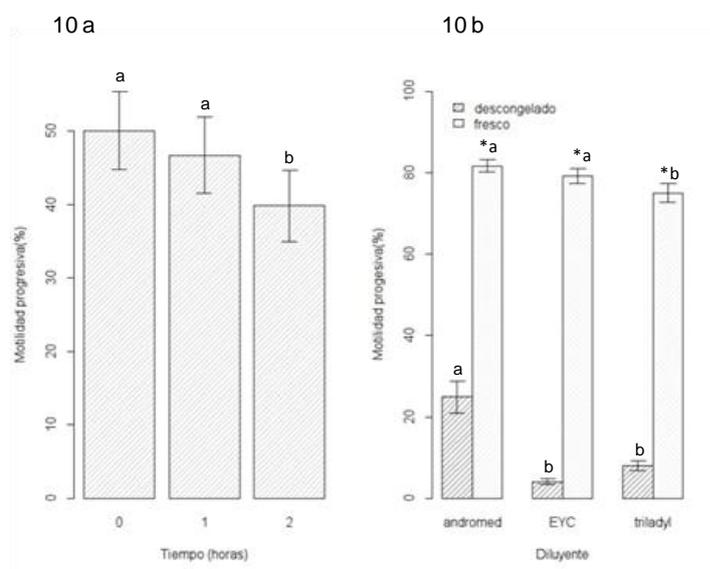


Figura 10. Influencia del tiempo e influencia de los diluyentes en el porcentaje de motilidad progresiva de espermatozoides de semen fresco y congelado/descongelado

<sup>a, b</sup> misma letra indica que no hay diferencia estadística, letras distintas existe diferencia estadística ( $p < 0,005$ ); \* indica que hay diferencia estadística entre variables dentro de un mismo diluyente.

El resultado de la figura 10a muestra que el porcentaje de motilidad progresiva no es diferente entre los tiempos evaluados, obteniendo un porcentaje a la hora cero 50%, a la hora uno 47% y a dos horas 39% de motilidad progresiva espermática en cuanto al tiempo de espera luego de haber extraído o descongelada la muestra.

La figura 10b muestra que en general la motilidad progresiva es mayor en semen fresco que en semen descongelado para los tres diluyentes evaluados. En semen fresco no existe diferencia en el porcentaje de motilidad progresiva entre los diluyentes evaluados, los valores obtenidos del porcentaje de motilidad progresiva para Andromed fue de 82%, EYC 80%, Triladyl 78% respectivamente. En semen congelado/descongelado existe diferencia en motilidad progresiva entre Andromed y EYC, también entre Andromed y Triladyl, pero no existe diferencia entre EYC y Triladyl, hay mayor porcentaje de motilidad progresiva en semen descongelado en Andromed 25%, seguido por Triladyl 10%, y finalmente EYC 5%. . El coeficiente de variación es de 18,75 (Anexo 6).

#### **4.2.3. Motilidad Local**

En la figura 11a se presentan los resultados obtenidos de la influencia del tiempo en el porcentaje de motilidad local de espermatozoides de semen fresco y congelado/descongelado.

En la figura 11b se presentan los resultados obtenidos de la influencia de los diluyentes en el porcentaje de motilidad local de espermatozoides de semen fresco y congelado/descongelado.

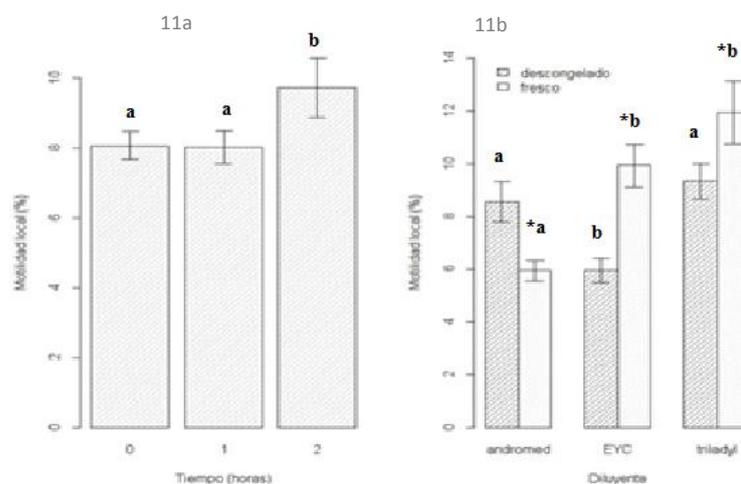


Figura 11. Influencia del tiempo e influencia de los diluyentes en el porcentaje de motilidad local de espermatozoides de semen fresco y congelado/descongelado

a, b misma letra indica que no hay diferencia estadística, letras distintas existe diferencia estadística ( $p < 0,005$ ); \* indica que hay diferencia estadística entre variables dentro de un mismo diluyente.

En la figura 11a se observa que mientras avanza el tiempo de espera en evaluación de semen fresco y descongelado la motilidad local porcentual aumenta, no existe diferencia entre cero y una hora después de extraer o descongelar la muestra, pero si existe diferencia entre cero y dos horas y también existe diferencia entre una y dos horas luego de haber sido extraída o descongelada la muestra, teniendo como resultado a la hora cero 8% a la hora uno 7,9% y dos horas 9,8% de porcentaje de motilidad local.

En la figura 11b se muestra que en semen fresco no existe diferencia en el porcentaje de motilidad local de los espermatozoides entre EYC y Triladyl, no así con Andromed que presenta una menor motilidad al ser comparados con los otros diluyentes usados, los resultados son los siguientes para Andromed 6%, EYC 10%, Triladyl 12%. Si existe diferencia en la motilidad de los espermatozoides de una muestra congelada/descongelada, siendo iguales para Andromed y Triladyl siendo ambos superiores respecto a EYC; hay mayor porcentaje de motilidad local en

Triladyl, seguido por Andromed y finalmente EYC, los porcentajes en semen congelado/descongelado son para Triladyl 9,7%, Andromed 8,7% y EYC 6%. El coeficiente de variación es de 42,17 (Anexo 7).

#### 4.2.4. Velocidad Curvilínea de Espermatozoide (VCL)

En la figura 12a se presentan los resultados obtenidos de la influencia del tiempo en la velocidad curvilínea de espermatozoides de semen fresco y congelado/descongelado.

En la figura 12b se presentan los resultados obtenidos de la influencia de los diluyentes en la velocidad curvilínea de espermatozoides entre semen fresco y congelado/descongelado.

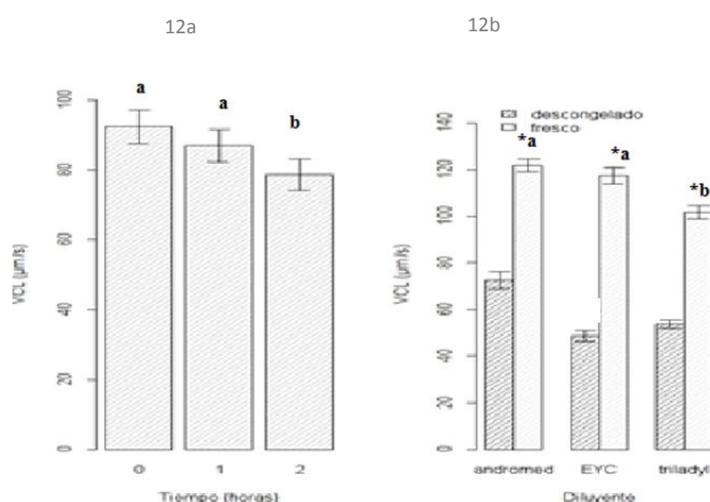


Figura 12. Influencia del tiempo e influencia de los diluyentes en la velocidad curvilínea (VCL) de espermatozoides de semen fresco y congelado/descongelado

a, b misma letra indica que no hay diferencia estadística, letras distintas existe diferencia estadística ( $p < 0,005$ ); \* indica que hay diferencia estadística entre variables dentro de un mismo diluyente.

En la figura 12a se observa que la velocidad curvilínea de los espermatozoides presenta diferencia entre cero, dos horas, y no hay diferencia entre cero y una hora y no hay diferencia entre uno y dos horas, la velocidad curvilínea es a la hora cero 92  $\mu\text{m/s}$ , a la hora uno 89  $\mu\text{m/s}$  y dos horas 79  $\mu\text{m/s}$ .

La figura 12b muestra que el semen fresco presenta mayor VCL que semen descongelado no importando el diluyente utilizado; en semen fresco no existe diferencia significativa alguna en la velocidad curvilínea del espermatozoide para Andromed y EYC, no obstante ambos diluyentes son significativamente diferentes respecto a Triladyl, los resultados son para Andromed 123  $\mu\text{m/s}$ , EYC 118  $\mu\text{m/s}$  y Triladyl 103  $\mu\text{m/s}$ . Para semen congelado/descongelado hay mayor velocidad curvilínea del espermatozoide con el diluyente Andromed (73  $\mu\text{m/s}$ ), seguido de Triladyl (55  $\mu\text{m/s}$ ) y EYC (50  $\mu\text{m/s}$ ), no existe diferencia entre Triladyl y EYC, pero si hay diferencia entre Andromed y Triladyl, también hay diferencia entre Andromed y EYC. El coeficiente de variación es de 13,43 (Anexo 8).

#### **4.2.5. Velocidad Media de Espermatozoides (VAP)**

En la figura 13a se presentan los resultados obtenidos de la influencia del tiempo en la velocidad media (VAP) de espermatozoides de semen fresco y congelado/descongelado.

En la figura 13b se presentan los resultados obtenidos de la influencia de los diluyentes en la velocidad media (VAP) de espermatozoides de semen fresco y congelado/descongelado.

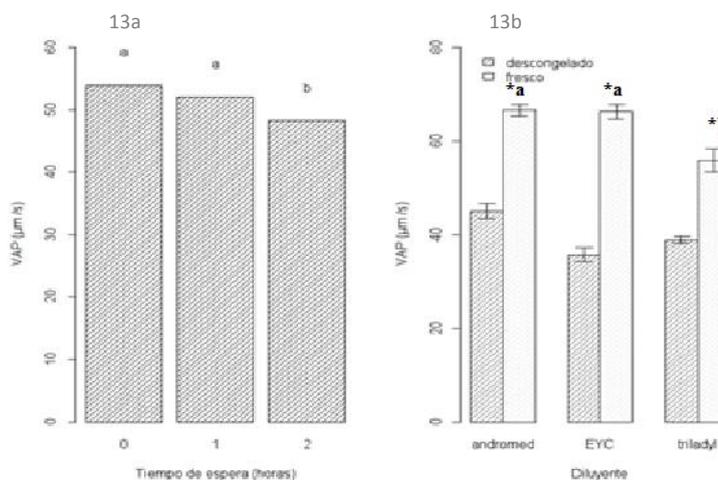


Figura 13. Influencia del tiempo e influencia de los diluyentes en la velocidad media (VAP) de los espermatozoides de semen fresco y congelado/descongelado

<sup>a, b</sup> misma letra indica que no hay diferencia estadística, letras distintas existe diferencia estadística ( $p < 0,005$ ); \* indica que hay diferencia estadística entre variables dentro de un mismo diluyente.

La figura 13a indica que en la velocidad media de los espermatozoides no existe diferencia en la velocidad entre cero y una hora, existe diferencia entre cero y dos horas y diferencia entre una y dos horas, existe mayor VAP a las cero horas luego de haber extraído o descongelado la muestra, la velocidad media es a la hora cero 54 µm/s, a la hora uno 52 µm/s y dos horas 49 µm/s.

Los resultados de la figura 13b muestra que existe diferencia significativa a favor de semen fresco que para semen descongelado; para semen fresco no existe diferencia alguna para VAP entre Andromed y EYC, siendo ambos superiores y estadísticamente significativos respecto de Triladyl, siendo los valores obtenidos para Andromed 67 µm/s, EYC 66 µm/s y Triladyl 58 µm/s. Para semen congelado/descongelado existe diferencia entre los diluyentes utilizados en este estudio, de los valores obtenidos existe mayor velocidad curvilínea del

espermatozoide con el diluyente Andromed 48  $\mu\text{m/s}$ , seguido de Triladyl 40  $\mu\text{m/s}$  y EYC 38  $\mu\text{m/s}$ . El coeficiente de variación es de 14,07 (Anexo 9).

#### 4.2.6. Velocidad Rectilínea de Espermatozoides (VSL)

En la figura 14a se presentan los resultados obtenidos de la influencia del tiempo en la velocidad rectilínea (VSL) de espermatozoides de semen fresco y congelado/descongelado.

En la figura 14b se presentan los resultados obtenidos de la influencia de los diluyentes en la velocidad rectilínea de espermatozoides de semen fresco y congelado/descongelado.

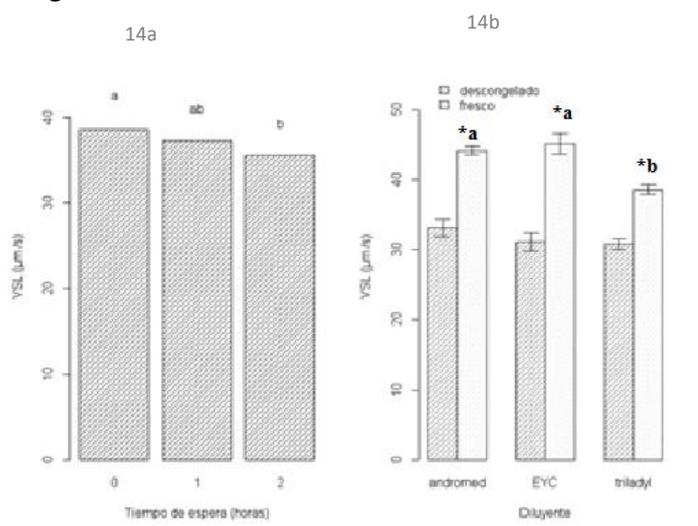


Figura 14. Influencia del tiempo e influencia de los diluyentes en la velocidad rectilínea (VSL) de los espermatozoides de semen fresco y congelado/descongelado

a, b misma letra indica que no hay diferencia estadística, letras distintas existe diferencia estadística ( $p < 0,005$ ); \* indica que hay diferencia estadística entre variables dentro de un mismo diluyente.

El resultado de la figura 14a informa que existe diferencia entre la hora cero y dos horas, no hay diferencia entre cero y una hora, tampoco entre una hora y dos

horas luego de haber sido extraído o congelado/descongelado la muestra, los resultados son: a la hora cero 39  $\mu\text{m/s}$ , a la hora uno 38  $\mu\text{m/s}$  y dos horas 36  $\mu\text{m/s}$  respectivamente.

La figura 14b indica que hay diferencia significativa entre semen fresco vs descongelado para los tres diluyentes evaluados; para semen fresco si bien no existe diferencia entre Andromed y EYC, ambos son diferentes respecto a Triladyl, los resultados son para Andromed 45  $\mu\text{m/s}$ , EYC 46  $\mu\text{m/s}$ , y Triladyl 39  $\mu\text{m/s}$ . Para semen congelado/descongelado no existe diferencia entre los diluyentes utilizados, teniendo como resultado Andromed 34  $\mu\text{m/s}$ , EYC 31  $\mu\text{m/s}$  y Triladyl 31  $\mu\text{m/s}$ . El coeficiente de variación es de 13,25 (Anexo 10).

#### 4.2.7. Índice de Linealidad de Espermatozoides (LIN)

En la figura 15 se presentan los resultados obtenidos de la influencia de los diluyentes en el índice de linealidad de los espermatozoides de semen fresco y congelado/descongelado.

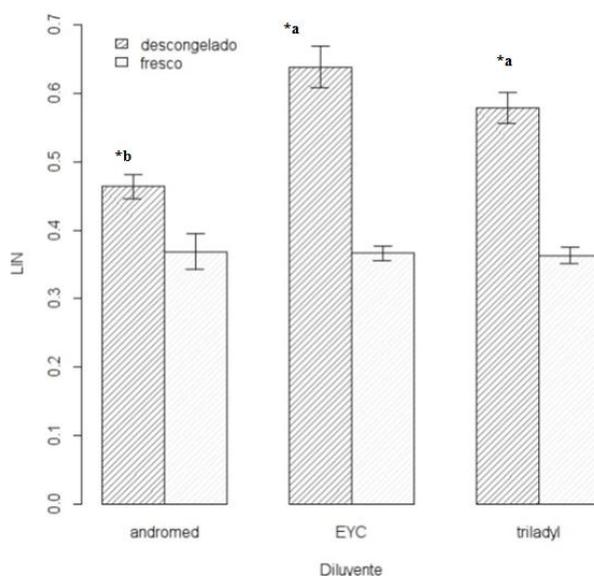


Figura 15. Influencia de los diluyentes en el índice de linealidad (LIN) de los espermatozoides de semen fresco y congelado/descongelado

<sup>a, b</sup> misma letra indica que no hay diferencia estadística, letras distintas existe diferencia estadística ( $p < 0,005$ ); \* indica que hay diferencia estadística entre variables dentro de un mismo diluyente.

En la figura 15 se observa que existe diferencia en lo que respecta a LIN a favor de semen descongelado que para semen fresco; en semen fresco no existe diferencia entre diluyentes, el índice de linealidad en Andromed es: 0,37; EYC 0,38, y Triladyl 0,37. En semen congelado/descongelado no existe diferencia entre EYC y Triladyl, siendo ambos superiores y diferentes de lo obtenido para Andromed; el índice de linealidad es mayor con EYC 0,63 seguido por Triladyl 0,59 y finalmente Andromed 0,49. El coeficiente de variación es de 21,55 (Anexo 11).

#### **4.2.8. Índice de Rectitud de Espermatozoides (STR)**

En la figura 16a se presentan los resultados obtenidos de la influencia de los diluyentes en el índice de rectitud de los espermatozoides de semen fresco y congelado/descongelado.

En la figura 16b se presentan los resultados obtenidos de la influencia del tiempo en el índice de rectitud de los espermatozoides de semen fresco y congelado/descongelado.

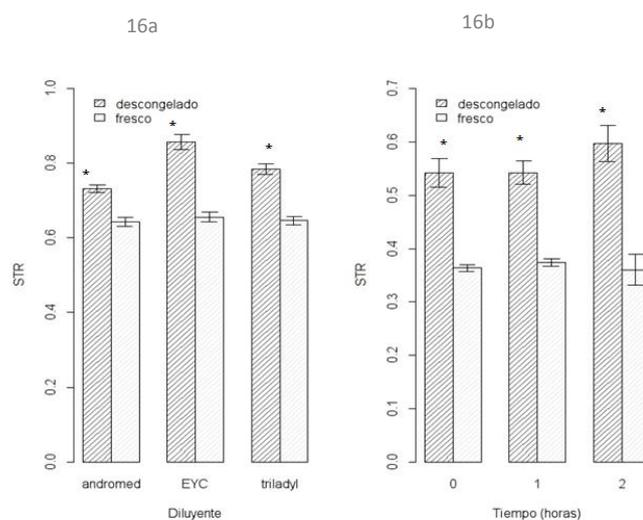


Figura 16. Influencia de los diluyentes e influencia del tiempo en el índice de rectitud (STR) de los espermatozoides de semen fresco y congelado/descongelado

a, b misma letra indica que no hay diferencia estadística, letras distintas existe diferencia estadística ( $p < 0,005$ ); \* indica que hay diferencia estadística entre variables dentro de un mismo diluyente.

En la figura 16a se muestra que existe diferencia entre semen fresco vs descongelado siendo superior en este último; en semen fresco no existe diferencia entre diluyentes, el índice de rectitud es en Andromed 0,66; EYC 0,67, y Triladyl 0,66 respectivamente. En semen congelado/descongelado existe diferencia entre los tres diluyentes utilizados, el índice de rectitud es mayor con el diluyente EYC 0,9 seguido por Triladyl 0,8 y finalmente Andromed 0,78.

El resultado de la figura 16b se observa que hay diferencia entre semen fresco vs descongelado siendo mayor para este último en los tres periodos evaluados; para semen fresco no existe diferencia entre cero, una y dos horas luego de haber colectado la muestra, obteniendo como promedio a la hora cero 0,38, a la hora uno 0,39 y dos horas 0,37. Para semen congelado/descongelado no existe diferencia entre los tiempos evaluados, obteniendo como valor promedio en lo que respecta a STR

para la hora cero 0,55, a la hora una 0,55 y dos horas 0,6. El coeficiente de variación es de 9,09 (Anexo 12).

#### 4.2.9. Frecuencia de Batida de Espermatozoides (BCF)

En la figura 17 se presentan los resultados obtenidos en la influencia de los tratamientos (semen fresco y semen congelado/descongelado) en la frecuencia de batida de los espermatozoides.

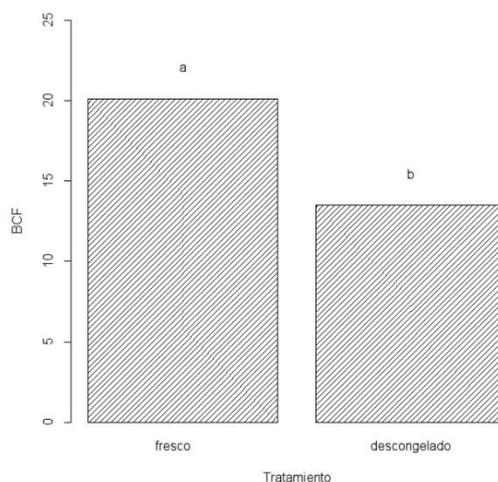


Figura 17. Influencia de los tratamientos en la frecuencia de batida (BCF) de los espermatozoides

a, b misma letra indica que no hay diferencia estadística, letras distintas existe diferencia estadística ( $p < 0,005$ ); \* indica que hay diferencia estadística entre variables dentro de un mismo diluyente.

El resultado de la figura 17 se observa una diferencia estadística a favor de semen fresco que para semen descongelado, en donde la frecuencia de batida del espermatozoide para semen fresco fue de 20 Hz y para descongelado fue de 14Hz. El coeficiente de variación es de 34,25 (Anexo 13).

#### 4.2.10. Amplitud Media del Desplazamiento Lateral de la Cabeza de Espermatozoides (ALH)

En la figura 18 se presentan los resultados obtenidos de la influencia de tiempo en la amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide de semen fresco y congelado/descongelado.

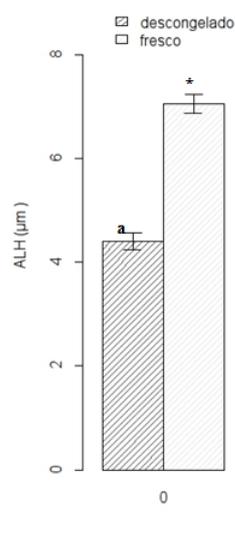


Figura 18. Influencia del tiempo en la amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) del espermatozoide de semen fresco y congelado/descongelado

<sup>a, b</sup> misma letra indica que no hay diferencia estadística, letras distintas existe diferencia estadística ( $p < 0,005$ ); \* indica que hay diferencia estadística entre variables dentro de un mismo diluyente.

El resultado de la figura 18 muestra diferencia entre semen fresco y descongelado para ALH en cero y una hora no así para las dos horas evaluadas; para semen fresco a medida que avanza el tiempo la ALH disminuye, siendo diferentes entre los diluyes evaluados; para semen descongelado hay diferencia significativa entre cero y una hora, y no se encontró diferencia significativa entre cero y dos horas y una y dos horas, los valores promedios obtenidos para semen fresco a la hora cero

7,1  $\mu\text{m}$ , a la hora uno 6,2  $\mu\text{m}$  y dos horas 5,1  $\mu\text{m}$ . En semen congelado/descongelado los valores obtenidos son en promedio: a la hora cero 4,5  $\mu\text{m}$ , a la hora uno 4,9  $\mu\text{m}$ , y dos horas 4,7  $\mu\text{m}$ . El coeficiente de variación es de 16,22 (Anexo 14).

#### 4.2.11. Viabilidad.

En la figura 19a se presentan los resultados obtenidos de la influencia de los diluyentes en el porcentaje de viabilidad de los espermatozoides de semen fresco y congelado/descongelado.

En la figura 19b se presentan los resultados obtenidos de la influencia del tratamiento (semen fresco y semen congelado/descongelado) en el porcentaje de viabilidad de los espermatozoides.

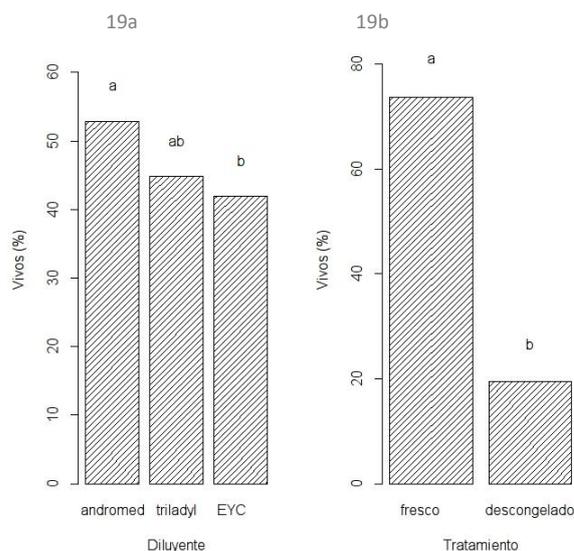


Figura 19. Influencia del diluyente e influencia de los tratamientos en el porcentaje de viabilidad de los espermatozoides

<sup>a, b</sup> misma letra indica que no hay diferencia estadística, letras distintas existe diferencia estadística ( $p < 0,005$ ); \* indica que hay diferencia estadística entre variables dentro de un mismo diluyente.

En la figura 19a se observa que existe diferencia en el porcentaje de espermatozoides vivos entre los diluyentes Andromed y EYC, no existe diferencia entre Andromed y Triladyl y tampoco existe diferencia entre EYC y Triladyl, los resultados son para Andromed 53%, Triladyl 46% y EYC 42% de viabilidad espermática.

El resultado de la figura 19b se observa que existe diferencia en el porcentaje de viabilidad espermática de semen fresco vs descongelado, los porcentajes de viabilidad obtenidos para semen fresco fue de 75 % y para semen descongelado fue de 20%. El coeficiente de variación es de 24,71 (Anexo 15).

#### 4.2.12. Morfología.

En la figura 20 se presentan los resultados obtenidos en la influencia del tratamiento (semen fresco y semen congelado/descongelado) en el porcentaje de morfología de los espermatozoides.

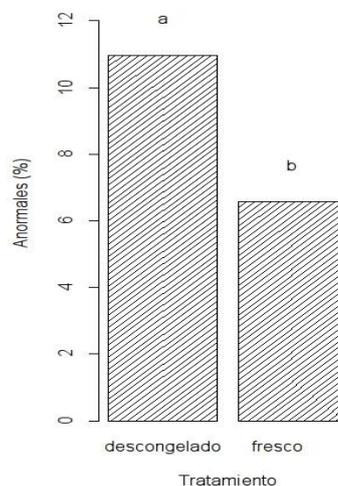


Figura 20. Influencia de los tratamientos en el porcentaje de morfología de los espermatozoides

a, b misma letra indica que no hay diferencia estadística, letras distintas existe diferencia estadística ( $p < 0,005$ ); \* indica que hay diferencia estadística entre variables dentro de un mismo diluyente.

En la figura 20 se observa que la presencia de anomalías presentes en el semen descongelado es mayor y significativamente diferente respecto al semen fresco, el porcentaje de anomalías espermáticas para semen descongelado es de 11% y para semen fresco es de 6,5% respectivamente. El coeficiente de variación es de 4,46 (Anexo 16).

#### 4.2.13. Test Host.

En la figura 21 se grafican los resultados obtenidos en la influencia de los diluyentes en el porcentaje de funcionalidad de la membrana plasmática de los espermatozoides de semen fresco y congelado/descongelado evaluados por HOST.

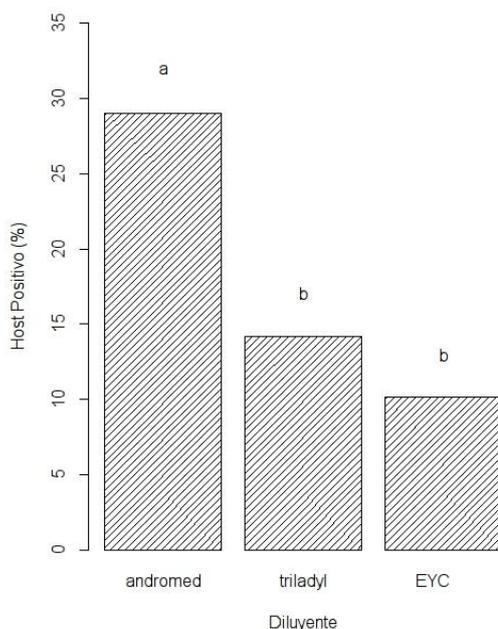


Figura 21. Influencia de los diluyentes en el porcentaje de funcionalidad de la membrana plasmática de los espermatozoides de semen congelado/descongelado

<sup>a, b</sup> misma letra indica que no hay diferencia estadística, letras distintas existe diferencia estadística ( $p < 0,005$ ); \* indica que hay diferencia estadística entre variables dentro de un mismo diluyente.

El resultado de la figura 21 muestra que existe diferencia en cuanto al porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática íntegra entre Andromed y Triladyl, diferencia entre Andromed y EYC, no existe diferencia entre Triladyl y EYC en cuanto al porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática íntegra, los resultados son para Andromed 28% , Triladyl 14% y EYC 11% . El coeficiente de variación es de 10,21 (Anexo 17).

## **V. DISCUSIÓN**

### **5.1. EVALUACIÓN MACROSCÓPICA DE LOS EYACULADOS EN SEMEN FRESCO Y DESCONGELADO.**

El volumen promedio de los eyaculados extraídos con vagina artificial para Teutón (Brown swiss) fue de 4,25 ml y el volumen promedio para Manuelito (Patua) fue de 3,75 ml los que están dentro de los parámetros establecidos por Rosenberger 1981, quien señala que para el volumen existen algunos valores de referencia tanto para el semen obtenido con vagina artificial como para las recolecciones con electroeyaculador; se ha señalado basándose en experiencias con vagina artificial que el eyaculado de un toro joven tiene en promedio un volumen mayor de 2 ml, mientras que un toro adulto tiene un volumen mayor de 4 ml.

Los toros de la investigación no estuvieron bajo ningún tipo de estrés por lo que el volumen de los eyaculados estuvieron dentro de lo mencionado por Rosenberger (1981). Echeverry J. (2003) señala que en general todos los factores estresantes (alto o baja temperatura, alimentación, enfermedades, dolor, cambios bruscos de ambiente) actúan a través del mismo mecanismo endócrino: el estrés baja la secreción de LH por la pituitaria, disminuyendo la testosterona disponible para las células germinales en crecimiento, lo cual conlleva a baja producción espermática.

En relación al color de los eyaculados obtenidos para este estudio tanto para Teutón (Brown swiss) como para Manuelito (Patua) fue lechoso-cremoso, lo que se encuentra dentro de lo establecido categóricamente por Krause y Dittmar (1962), como bueno para cremoso y regular para lechoso, las muestras obtenidas con una coloración lechoso-cremoso de estos toros jóvenes fueron libres de hemospermia (sangre en el eyaculado) y libres de piospermia (pus en el eyaculado) lo que según Rosenberger 1981, descarta la presencia de lesiones u infecciones del aparato genital de los animales evaluados.

El pH seminal es otro parámetro de importancia en la evaluación seminal rutinaria, en este estudio tanto para Teutón (Brown swiss) como Manuelito (Patua) se obtuvieron valores de pH cercanos a 7, lo que coincide con lo descrito por Jeyendran, Van der Ven, Pérez, Grabo y Zaneveld (1984) en donde indican que el pH normal del semen bovino es cercano a la neutralidad, de 6,7 a 7.

## **5.2. EVALUACIÓN MICROSCÓPICA DE LOS EYACULADOS EN SEMEN FRESCO Y DESCONGELADO.**

La concentración espermática promedio para Teutón (Brown swiss) fue de  $750 \times 10^6$  y para Manuelito (Patua) fue de  $761,5 \times 10^6$  los que están dentro de los parámetros regulares establecidos categóricamente por Krause & Dittmar (1962) quienes determinan que un eyaculado con concentraciones mayores a  $800 \times 10^6$  espermatozoides por mililitro (espermatozoides/ml) es considerado como bueno y mayores a  $500 \times 10^6$  (espermatozoides/ml) es considerado un eyaculado de calidad regular.

Mientras avanza el tiempo de espera en semen fresco y congelado/descongelado la motilidad total desciende, en la investigación se tuvo como resultado a la hora cero 58%, la hora uno 55% y dos horas 50% de motilidad total, estos datos corroboran lo obtenido en otros estudios en los que se evaluaron diferentes velocidades de descongelación para el semen bovino (Aamdal y Andersen, 1968; Robbins y col., 1972; 1976; Alquimist y Wiggin, 1973a, b; Pickett y Berdston, 1974; Rodríguez y col., 1975; Dhami y col., 1992; Nur y col., 2003), en donde se pudo observar que si la velocidad de descongelación y tiempo de espera para el análisis es rápida, existe un mayor porcentaje de espermatozoides móviles, obteniendo a la hora cero un porcentaje de motilidad mayor que a la hora uno y dos horas tanto para semen fresco como para semen congelado/descongelado.

En la evaluación de motilidad total en pre congelación las diluciones no presentaron diferencias entre diluyentes ya que se obtuvo en Andromed un 89%, EYC un 90% y en Triladyl un 88%. Según Gadea 2003, el diluyente preserva las características funcionales de las células espermáticas y mantiene el nivel de fertilidad adecuado, basándonos en la investigación el diluyente Andromed preserva de mejor manera las características funcionales obteniendo como resultado en semen congelado/descongelado motilidad total de 33%. Mientras Galina y Valencia (2006), manifiestan que el semen puede tener una motilidad espermática por arriba del 50% luego de ser descongelado, pero si los espermatozoides presentan lesiones en la membrana plasmática, en el acrosoma, en el núcleo o en otro compartimento celular, puede no ser completamente expresado inmediatamente después de la descongelación.

La evaluación de la motilidad progresiva (MP) en semen fresco es uno de los parametros más importantes para la identificación de eyaculados con capacidad fecundante en donde se establece que valores  $< 50\%$  de MP no son buenos por lo que no debería ser utilizado en programas de IA, ni menos ser destinados a ser criopreservados (Salisbury, Vandemark y Lodge, 1978) lo que no ocurrió con las muestras seminales recolectadas en esta investigación. En semen fresco existe diferencia significativa en la motilidad progresiva debido a la influencia de los diluyentes crioprotectores obteniendo un mejor resultado de porcentaje de motilidad progresiva con Andromed (82%). Si la MP es muy baja en semen fresco, esta tenderá a disminuir aún más en la evaluación post-congelación. En semen congelado/descongelado existe mayor porcentaje de motilidad progresiva en Andromed (25%); la valoración exacta del porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva después de la congelación es de gran importancia ya que es un indicador de la acción crioprotectora del diluyente (Salisbury, Vandemark y Lodge, 1978). En la investigación la motilidad progresiva a la hora cero es mayor teniendo como resultado 50%, de motilidad progresiva espermática respecto de los otros periodos evaluados, lo que indica que la potencial capacidad fecundante de esa pajueta es mayor.

A medida que transcurre el tiempo de espera para semen fresco y descongelado la motilidad local porcentual aumenta, no existe diferencia significativa entre cero y una hora después de extraer o descongelar la muestra, obteniendo un menor porcentaje de motilidad local a la hora cero 8%. El efecto beneficioso de Andromed parece más probable que fuese debido a un mayor efecto protector de las membranas espermáticas por parte de los lípidos de soya que de la yema de huevo del diluyente EYC y Triladyl, en semen fresco la influencia de Andromed disminuye el porcentaje de motilidad local, obteniendo como resultado en semen fresco una motilidad para Andromed del 6%, EYC del 10%, Triladyl del 12%, para semen descongelado ocurre que la influencia de EYC disminuye el porcentaje de motilidad local, dando como resultado en Andromed un 8,7%, EYC un 6% y para Triladyl un 9,7% no obstante Müller-Schlösser *et al.* (2001) no encontraron diferencias significativas en la motilidad post-descongelación, en comparación de diluyentes Andromed, Triladyl y EYC.

Probablemente estos resultados manifiestan que la diferencia entre estos tres tipos de diluyentes en lo que se refiere a su capacidad de criopreservación del espermatozoide es baja como lo demuestran los resultados obtenidos; pero también podrían estar relacionados con diferencias entre las distintas razas de toros utilizadas en la investigación. Los resultados del presente estudio demostraron que Andromed elaborado a base de proteína vegetal (lecitina de soya) preserva de mejor manera a los espermatozoides seguido por EYC y Triladyl (Pickett y Berndtson, 1978).

Las velocidades del movimiento de las células espermáticas (VSL, VAP y VCL) son parámetros de motilidad que nos sirven como indicativos de la fertilidad del macho; existe mayor VCL a la hora cero luego de haber extraído o descongelado la muestra, la velocidad media es a la hora cero de 92  $\mu\text{m/s}$ , para semen fresco, se obtiene mayor VCL con el diluyente Andromed (123  $\mu\text{m/s}$ ) que para los otros diluyentes utilizados. Para semen congelado/descongelado existe mayor VCL del espermatozoide con el diluyente Andromed (73  $\mu\text{m/s}$ ) lo que concuerda con los estudios de Catena y Cabodevila, (1999) donde manifiestan que luego de la

incubación a  $-196^{\circ}\text{C}$  los valores en el vigor espermático disminuyen respectivamente.

En lo que respecta a velocidad media de los espermatozoides (VAP), existe mayor VAP a la hora cero luego de haber extraído o descongelado la muestra, la velocidad media es de  $54\ \mu\text{m/s}$ , a la hora uno  $52\ \mu\text{m/s}$  y dos horas  $49\ \mu\text{m/s}$ , en donde Quintero-Moreno, (2003) manifiestan que existen sub poblaciones de espermatozoides con diferente velocidad. Para semen fresco no existe diferencia alguna en la velocidad media del espermatozoide, obteniendo como mejor resultado Andromed ( $67\ \mu\text{m/s}$ ). Para semen congelado/descongelado existe mayor velocidad media del espermatozoide con el diluyente Andromed ( $48\ \mu\text{m/s}$ ), seguido de Triladyl ( $40\ \mu\text{m/s}$ ) y EYC ( $38\ \mu\text{m/s}$ ) respectivamente, lo que se explicaría debido a las sub poblaciones de espermatozoides existentes con diferente velocidad descritos por Quintero-Moreno, (2003) al evaluar Andromed y Triladyl, así como Andromed y EYC.

En semen fresco la velocidad rectilínea (VSL) es mayor a la hora cero ( $39\ \mu\text{m/s}$ ), luego de haber sido extraído o congelado/descongelado la muestra. Para semen fresco no existe diferencia alguna en la velocidad del espermatozoide, obteniendo como mejor resultado Andromed ( $45\ \mu\text{m/s}$ ). Para semen congelado/descongelado existe mayor velocidad curvilínea del espermatozoide con el diluyente Andromed ( $34\ \mu\text{m/s}$ ), Dorado *et al.* (2010) menciona que el periodo crítico se encuentra en el proceso de congelación, por lo tanto según lo mencionado por Liu *et al.*, (1991); Vázquez *et al.*, (1999) los espermatozoides con una elevada VSL tienen más posibilidades de contactar con el ovocito, mientras que los que presentan más VCL que VSL se asocian con unos bajos niveles de fertilización, en la investigación los valores de VCL son mayores que los de VSL.

Según Brogliatti (2005) la dirección de la trayectoria espermática se mide a través de dos cocientes como son la Linealidad (LIN) y la Rectilinealidad (STR). La linealidad es el cociente entre el VSL/VCL mientras que la rectilinealidad es el cociente entre VSL/VAP. Ambas relacionan, ya sea la velocidad promedio o la velocidad real, con la velocidad recorrida en dos puntos. En la investigación no

existe diferencia en semen fresco entre diluyentes, el índice de linealidad es mayor en Andromed (0,37), para semen descongelado el índice de linealidad es mayor con EYC (0,63). No existe diferencia en semen fresco entre diluyentes, el índice de rectitud es en Andromed (0,66), EYC (0,67), y Triladyl (0,66), en semen descongelado el índice de rectitud es mayor con EYC (0,9) seguido por Triladyl (0,8) y finalmente Andromed (0,78), en donde Holt y Van Look, (2004) mencionan que estas características identifican subpoblaciones con mejor velocidad.

Existe diferencia entre tratamientos en lo que respecta a la frecuencia de batida del espermatozoide en donde es mayor en semen fresco (20Hz) y menor en semen descongelado (14Hz), esta característica del movimiento espermático nos permite saber cómo es la dirección del movimiento y ha sido correlacionada como un factor que incrementa la tasa de fertilidad, por lo tanto valores de vigorosidad altos incrementan la tasa de fertilidad (Brogliatti, 2005), por lo que comparativamente el semen fresco presenta mejores características fecundantes que el semen descongelado.

Existe diferencia en lo que respecta a amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide en semen fresco entre cero y dos horas y entre una y dos horas después de extraída la muestra obteniendo como resultado mayor amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide a la hora cero en semen fresco (7,1  $\mu\text{m}$ ), mientras que para semen descongelado no existe diferencia en la amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide, para semen descongelado a la hora cero (4,5  $\mu\text{m}$ ). Shanis *et al.* (1989) sugieren que tanto el BCF como el ALH tienen una gran importancia en la penetración en el ovocito. Estos autores observan que en presencia de moco cervical, el ALH disminuye mientras que el BCF aumenta para ayudar a la penetración de la célula espermática en dicho moco, en la investigación los valores de BCF son mayores que los de ALH.

Thomas *et al.* (1998), asegura que durante el proceso de criopreservación se produce una disminución del 50% de la viabilidad espermática, en la investigación la disminución superó el 50%; existe diferencia en la viabilidad espermática de semen fresco y congelado/descongelado, existe mayor porcentaje de espermatozoides vivos

obteniendo 75 % en semen fresco mientras que en semen descongelado el valor fue de 20%, lo que hace una diferencia del 55% lo cual esta por encima de lo planteado por Thomas *et al* (1998) siendo estos datos corroborados por Dorado *et al.* (2010) en el que menciona que el periodo crítico se encuentra en el proceso de congelación.

Las anomalías de una muestra seminal están directamente relacionadas con capacidad fértil y mayores tasas de retorno del animal, ya que a mayor número de anomalías pre y post-congelación disminuye la capacidad fértil de los espermatozoides (Davies, Hall, Hibbit y Moore, 1975). Correa *et al.*, (1997), afirman que la integridad de la membrana plasmática se ve afectado por el proceso de congelación existiendo diferencia significativa en el porcentaje de anomalías espermáticas entre descongelado y fresco, el porcentaje de anomalías para semen descongelado es de 11% y para semen fresco es de 6,5% de anomalías espermáticas, lo que resultó no haber diferencia en cuanto a la utilización de los diluyentes ya que se determinó que la influencia de los crioprotectores no modificaron la morfología de la célula espermática.

La determinación del funcionamiento de la membrana plasmática es un parámetro indicador de la capacidad fecundante de los espermatozoides (Jeyendran *et al.*, 1984). Existe diferencia en cuanto al porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática íntegra entre Andromed y Triladyl, y también existe diferencia entre Andromed y EYC, obteniendo como resultado Andromed 28%, Triladyl 14% y EYC 11% en semen congelado/descongelado.

## VI. CONCLUSIONES

Los toros (*Bos taurus*) utilizados en la investigación presentaron características similares en cuanto a volumen, pH, y concentración espermática.

En cuanto a la motilidad espermática evaluada mediante el sistema CASA esta fue mayor para Andromed seguido por EYC para semen fresco, mientras que para semen congelado/descongelado Andromed ofrece mejor protección a las células espermáticas.

El eficiente uso y fácil preparación de Andromed, hacen que la lectura espermática en el sistema CASA sea óptima obteniendo resultados totalmente confiables, al no contener partículas de yema de huevo como los diluyentes Triladyl y EYC.

En cuanto a la viabilidad espermática luego del proceso de descongelación el diluyente que mayor porcentaje de supervivencia celular proporcionó fue Andromed, ya que se obtuvo mayor cantidad de células espermáticas vivas.

La funcionalidad de la membrana plasmática de las células espermáticas (test Host) fue mayor con el diluyente Andromed en el descongelamiento celular.

## **VII. RECOMENDACIONES.**

Los toros seleccionados para las posteriores investigaciones deben tener una alimentación adecuada a base de pasto, agua y sales minerales, además deben estar totalmente libre de enfermedades y con esto se puede lograr muestras de semen con valores normales y confianza en su uso en programas de IA.

Para la preparación de los diluyentes se debe realizar 24 horas previo al proceso de extracción seminal, debido al limitado tiempo entre la colecta de semen y su dilución para así asegurar una buena viabilidad espermática; y utilizar yema de huevo fresco para la preparación del diluyente Triladyl y EYC.

Es recomendable filtrar el contenido de yema de huevo en la preparación de Triladyl y EYC, para evitar grumos que dificulten la lectura en el sistema CASA evitando con este proceso la lectura errónea del sistema CASA en donde lea los grumos de yema de huevo como células espermáticas muertas proporcionando tasas bajas en cuanto a la motilidad.

Realizar en lo posterior investigaciones en la que se comparen diluyentes a base de proteína vegetal, ya que Andromed a base de lecitina de soya ofreció los mejores resultados en cuanto a criopreservación celular respecto del uso de proteínas animales en la preparación de diluyentes seminales.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Aamdal, J.; Andersen, k. 1968. Fast thawing of bull semen frozen in straws. VI int. Congr. Anim. Reprod. & ai (abstr) 11:973.
- Almquist, J.; Wiggin, H. 1973a. Effect of different combinations of freezing and thawing rates upon survival of bull spermatozoa in us plastic straws. A.i. digest 21, 10–11.
- Almquist, J.; Wiggin, H. 1973b. Survival of bull spermatozoa frozen and Thawed by different methods in plastic straws. A.i. digest 21, 12–13.
- Barth, A. 1997. Evaluación del potencial buen estado de reproducción del toro. En "la terapia actual en gran animal. Teriogenología.
- Bearden, H.; Fuquay, J. 1982. Reproducción animal aplicada. Editorial el manual moderno, México, DF, México.
- Brogliatti, G. 2005. Inseminación artificial a tiempo fijo.
- Catena, M.; Cabodevila, J. 1999. Evaluación del semen bovino. Simposio Internacional de reproducción bovina (uncpba). Tandil.taurus. 1(3):18-31.
- Castelo, T.; Frota, T.; Silva, a. 2008. Consideraciones sobre la criopreservación de semen de caprinos. Acta vet bras 2, 67-75.

- Chenoweth, P. 1997. Clinical reproductive anatomy and physiology of the bull. En: youngquist: current therapy in large animal theriogenology. Saunders, 1ª edición, pag. 217.
- Cloud, J.; Miller, W.; Levanduski, M. 1990. Cryopreservation of sperm as a means to store salmonid germ plasm and to transfer genes from wild to hatchery populations. *The progressive fish culturist*. 52:51-53.
- Correa, J.; Zavos, P. 1997. Preparación y recuperación de espermatozoides bovinos congelados descongelados a través de técnicas de selección de espermatozoides empleados en técnicas de reproducción asistida. *Theriogenology* 31, 341-346.
- Davies, D.; Hall, G.; Hibbit, H.; Moore, H. 1975. La eliminación de las vesículas seminales del jabalí y los efectos sobre las características del semen.
- Derivaux, J. 1982. Reproducción de los animales domésticos, 2º edición. Zaragoza, España. Editorial acribia: pp. 167 – 193.
- Dhami, A.; Sahni, K.; Mohan, G. 1992. Effect of various cooling rates (from 30 °c to 5 °c) and thawing temperatures on the deep-freezing of *bos taurus* and *bos bubalis* semen. *Theriogenology* 38, 565–574.
- Catálogo minitube. 2003. [www.minitube.de](http://www.minitube.de), [mexico@minitube.com](mailto:mexico@minitube.com) minitube, México. 40 medicina veterinaria y zootecnia.

- Dorado, J.; Molina, I.; Muñoz, a. 2010. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from florida goats. *Theriogenology*. 74: 795-804.
- Echeverry, J. 2003. Las situaciones de estrés en los toros: efectos en la reproducción. *El cebú* n° 331 pag. 52-57. French straws. *J. Anim sci.* 42, 145-155.
- Fukui, Y.; Kohno, H.; Togari, T.; Hiwasa, M.; Okabe, K. 2008. Fertility after artificial insemination using a soybean - based semen extender in sheep.
- Gadea, J. 2003. *Revista española de investigación agrícola* 1 (2): pp. 17-27.
- Galina, C.; Valencia, J. 2006. Colección del semen bovino. Pag. 217-219. *Reproducción de animales domésticos*.
- Hafez, E. 1986. *Reproducción e inseminación artificial en los animales*. 4 ed. Edt.interamericana. México. P. 160-163.
- Holt, W.; Van Look, J. (2004) concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory test of semen quality. *Reproduction* 127:527-535.

Jeyendran, R.; Van der ven, H.; Pérez-Peláez, M.; Grabo, B.; y Zaneveld, L. 1984. Desarrollo de un ensayo para evaluar la integridad funcional de la membrana del espermatozoide humano y su relación con otras características del semen. *J. Reprod. Fertil.*, 70, 219-228.

Krause; Dittmar. 1962. La reproducción e inseminación artificial de los bovinos. Zaragoza, esp. Ed. Acribia: pp.419 – 517.

Manual de uso y preparación del diluyente triladyl. 1993. Laboratorios minitube.

Manual de uso y preparación del diluyente universal inv. 1995. Laboratorios universal de inv.

Medina-Robles, V.; Velasco-Santamaría, Y.; Cruzcasallas, P. 2006. Los bancos de recursos genéticos y su papel en la conservación de la biodiversidad. *Revista orinoquía*. 10: 71-77.

Mcdonald, L. 1991. Reproducción y endocrinología veterinaria. 4º edición. Interamericana/mcgraw-hill, México.

Moore, A.; Squires, E.; Bruemmer, J.; Graham, J. 2006. Effect of cooling rate and cryoprotectant on the cryosurvival of equine spermatozoa. *J equine vet sc* 26, 215-218.

Mortimer, S. 1997. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Human repr. Update*, 3(5): 403-439.

Muiño, R.; Fernández, M.; Areán, H.; Viana, J.; López, M.; Fernández, A.; Peña, A. 2005. Nuevas tecnologías aplicadas al proceso y evaluación del semen bovino en centros de inseminación artificial. *Itea vol 101 (3)*. 175-191.

Muller-Schlosser, F. (2001). Avances con el uso de diluyentes libres de yema de huevo en la congelación de semen bovino. *Vi simposio internacional de reproducción animal, córdoba, argentina*.

Nur, Z.; Dogan, I.; Soylu, M. 2003. Effect of different thawing procedures on the quality of bull semen. *Revue med. V<sup>et</sup>*. 154, 487-490.

O'conors, A. 2000. Comparación de la evaluación por ordenador de movilidad de espermatozoides con laboratorio de prueba estándar. *J de ciencia animal* 53 pag. 1.368.

Pickett, B.; Berndtson. 1978. Principios y técnicas de congelación espermatozoides. En: *fisiología de la reproducción y la inseminación artificial de ganado*. Segunda edición. Gwsalsibury, nl vandemark y jr logia (eds.), whfreeman& co., san francisco. Pp. 494-554.

Quintero-Moreno, 2003. Estudio sobre la dinámica de poblaciones espermáticas en semen de caballo cerdo y conejo; tesis doctoral de la universidad autónoma de barcelona-españa.

- Ramos, S. 1996. Anotaciones sobre inseminación artificial. Facultad de medicina Veterinaria. Universidad de la salle. Santa fé de bogotá. 92 p.
- Rodriguez, O.; Berndtson, W.; Ennen, B.; Pickett, B. 1975. Effect of rates of freezing, thawing and level of glycerol on the survival of bovine spermatozoa in straws. *J. Anim. Sci.* 41, 129–135.
- Rosenberger, G. 1981. Exploración clínica de los bovinos. Editorial Hemisferio sur. Buenos aires, república argentina.
- Salisbury, G.; Vandermark, N.; Lodge, J. 1978. Fisiología de Reproducción e inseminación artificial de los bóvidos.
- Salisbury, G.; Vandermark, N.; Lodge, J. 1982. Fisiología de la Reproducción e inseminación artificial de los bóvidos. 2 ed. Zaragoza, españa. Acribia. P. 419-565
- Shanis, B.; Check, I.; Bolendorf, A. 1989. Interpretation and Misinterpretation of semen parameters. *Archiv. Androl.*, 23, 213-227
- Sorensen, M. 1984. Reproducción animal. Ed. Mcgraw-hill: pp 117 – 192.
- Spitzer, J. 2000. Evaluación de la salud reproductiva del toro: estado actual. Ithaca new york.

- Thomas, C.; Garner, D.; Dejarnette, J.; Marshall, C. 1998. Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. *Biol reprod*, v.58, p.786-793.
- Vázquez, J.; Blanco, O.; Roca J., Lucas, W.; Martínez, E. 1999. Relationship between the in vivo fertilizing capacity and computer-assisted motility assessment in boar semen. *Abstr. 3rd conf. Europ. Soc. Dom. Anim. Reprod., angers. France.*, 91.
- Verstegen, J. and Onclin, K. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*. 57: 149-179.