

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

“Comparación de la morfología del semen bovino fresco y criopreservado teñidos con Eosina/Nigrosina, Spermac y Farelly, para determinar la viabilidad y el porcentaje de motilidad progresiva con el equipo CASA”

Elaborado por:
Ariana Lizbeth Quintero Kajek
Director del Proyecto:
Dr. Fredy Carrera, Ph.D



Introducción

El sector ganadero aporta 40% del valor de la producción agrícola mundial, (FAO, 2019).

Los efectos negativos de la criopreservación en los espermatozoides incluyen, además del choque por frío, otros daños como el estrés osmótico y alteraciones en la fluidez y permeabilidad de la membrana (Watson, 1995).



El 50 % de los espermatozoides no sobreviven al proceso de congelación/descongelación (Hammerstedt, Graham, & Nolan, 1990).

En Ecuador, ganado vacuno con un total de 4,34 millones de cabezas, (INEC, 2020).



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



Objetivos

- Evaluar la viabilidad espermática pre-congelación y post-descongelación mediante tinción Eosina/Nigrosina de toros reproductores Girolando.
- Comparar la morfología espermática pre-congelación y post-descongelación de toros reproductores Girolando teñidos con Spermac y Farelly.
- Determinar el porcentaje de motilidad espermática total y progresiva pre-congelación y post-descongelación en toros reproductores Girolando mediante equipo CASA.



Métodos

Fresco



Donald



Toro 1

Girolando 3/4
5 años

Curva de congelamiento lento

Temperatura inicial (°C)	Temperatura Objetivo (°C)	Velocidad de Descenso °C/min
20	4	1
4	-10	5
-10	-100	40
-100	-140	20

Descongelado

Marcelo



Toro 2

Girolando 5/8
5 años



Tratamientos a comparar

Símbolo	Código	Tratamientos
T1	S1T1	Semental Toro 1, pre-congelación
T2	S1T2	Semental Toro 2, post-descongelación
T3	S2T1	Semental Toro 1, pre-congelación
T4	S2T2	Semental Toro 2, post-descongelación

Parámetros dependientes

- Motilidad a los 0 y 30 min %
- Motilidad progresiva 0 y 30 min %
- Viabilidad espermática (vivos y muertos %)
- Morfología espermática
- (normalidades y anormalidades %)
- Malformaciones primarias y secundarias %
- Tipo de malformación



METODOLOGÍA



Impresión de pajuelas

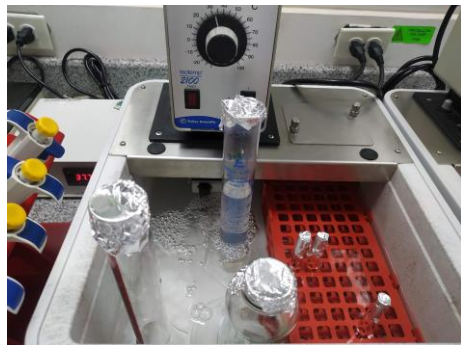
PREPARACIÓN:

Limpieza,
desinfección y
esterilización

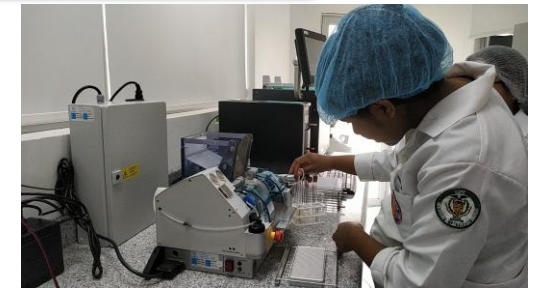


COLECTA DE
SEMEN

LABORATORIO DE
BIOTECNOLOGÍA
ANIMAL

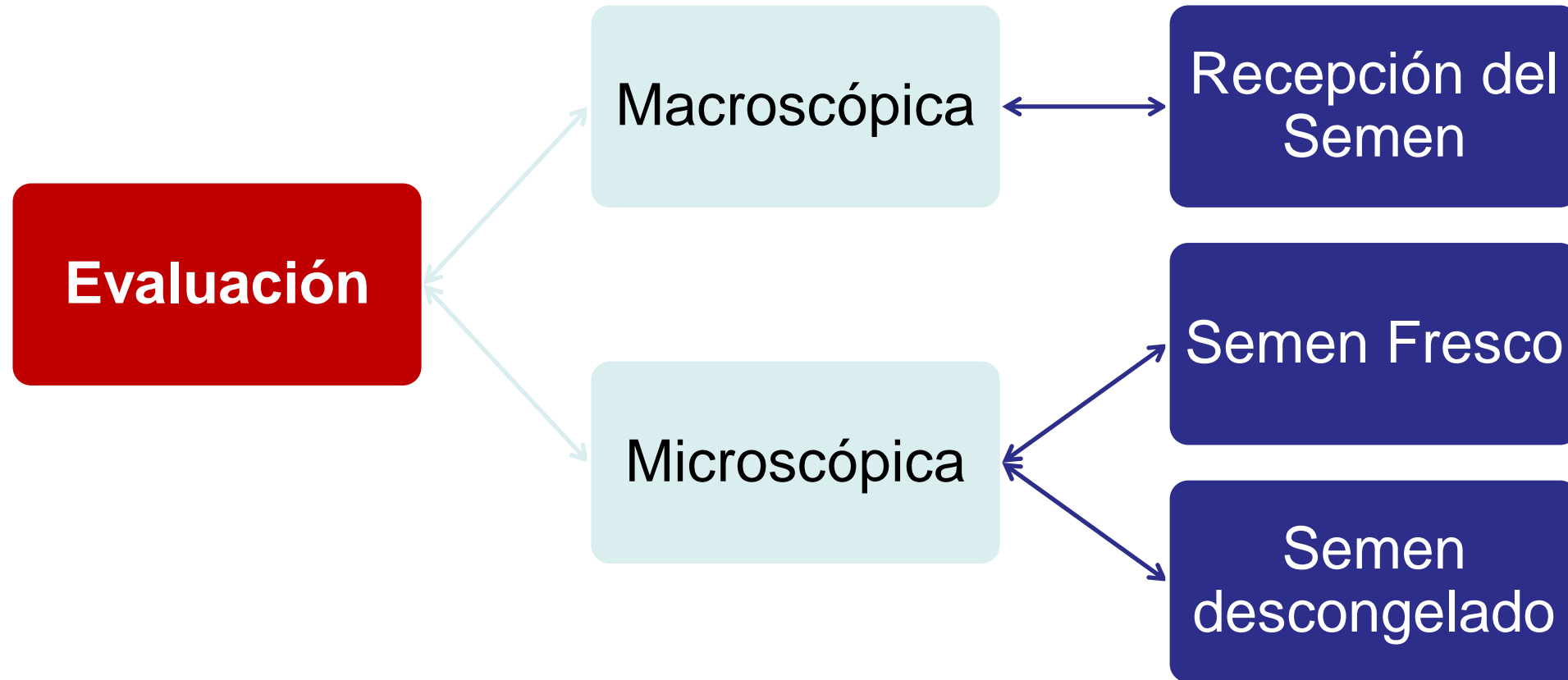


DILUYENTES



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

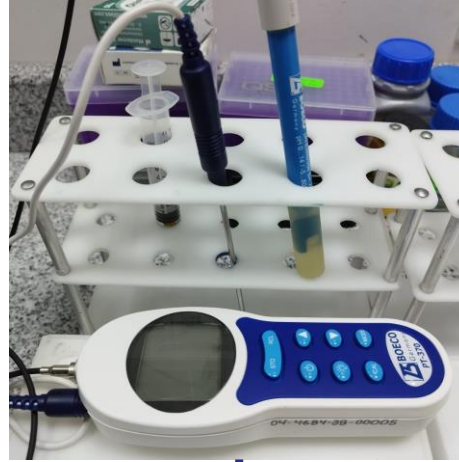
METODOLOGÍA



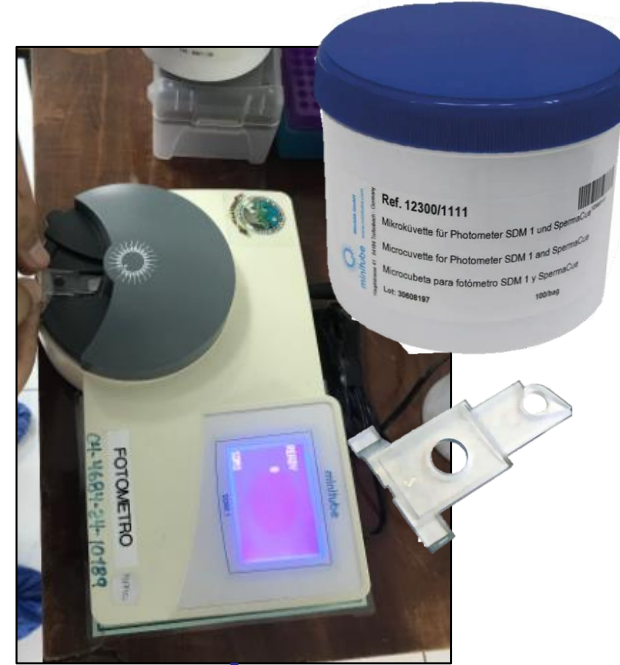
Evaluación macroscópica



- Volumen
- Color



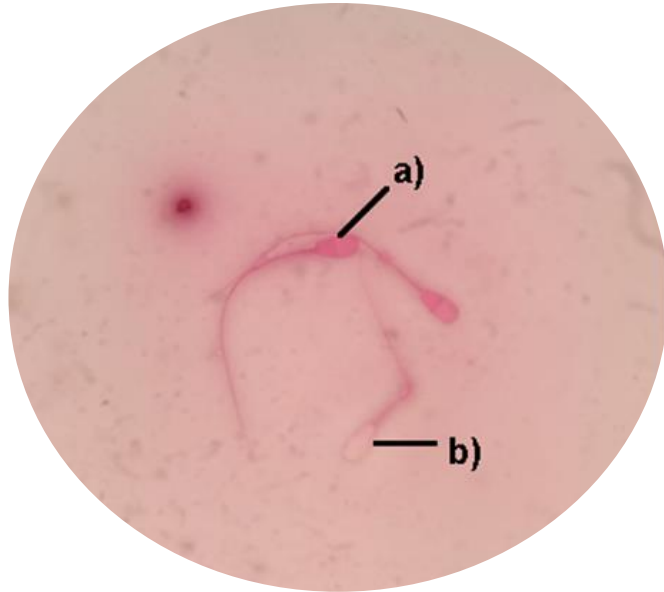
- pH
- Temperatura



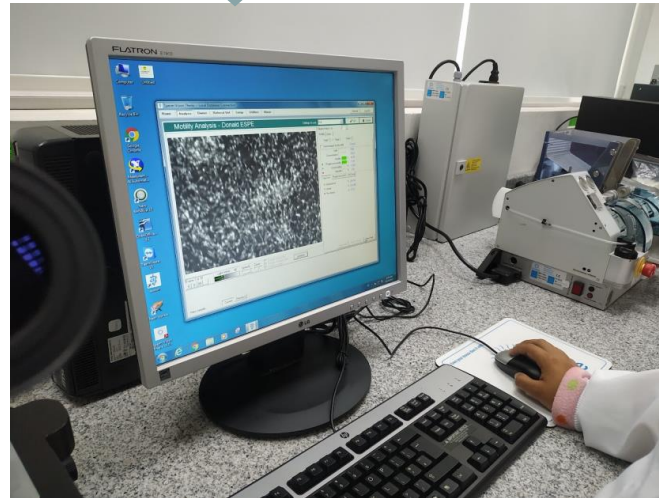
- Concentración espermática

Evaluación microscópica

Viabilidad

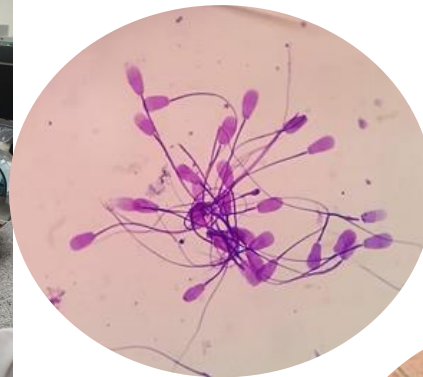


Motilidad



Equipo CASA

Morfología



Fareilly

Spermac



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

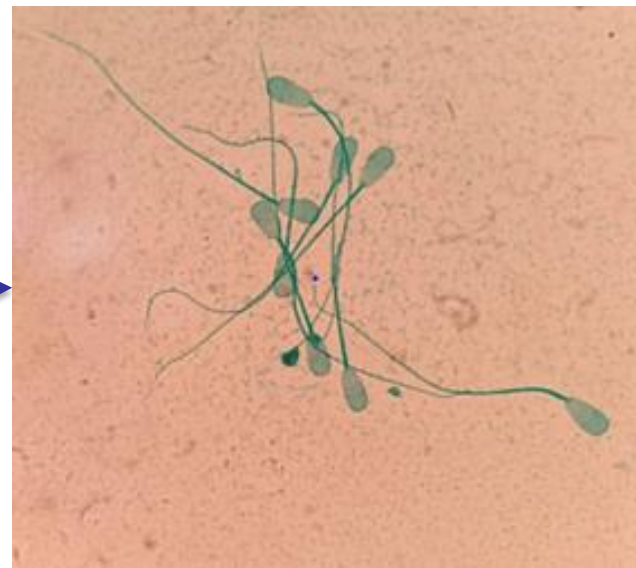


Morfología

Protocolo de morfología de Busch, Waberski & Escobar, (2010).



Tinción Farelly



Tinción Spermac



Morfología

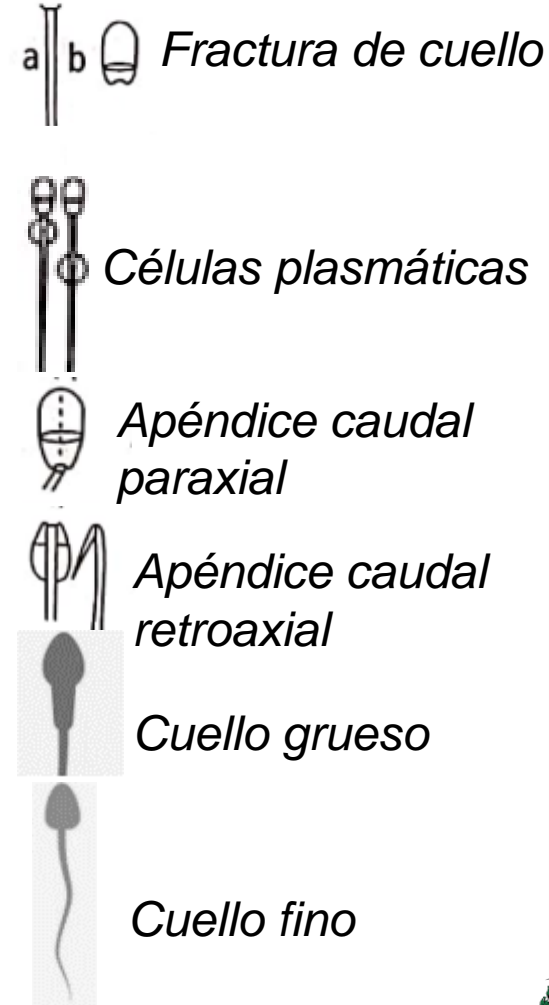
Alteraciones casquete cefálico %



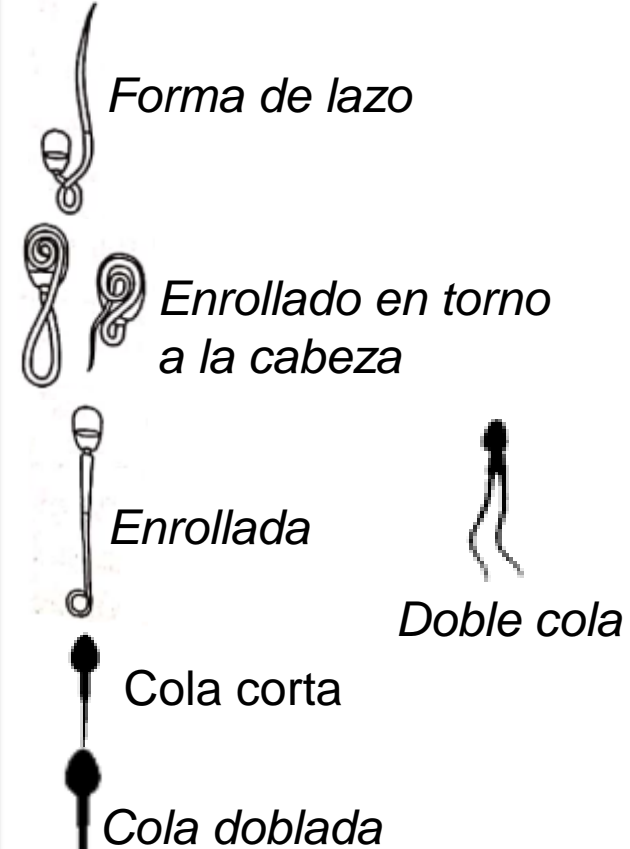
Alteraciones de la cabeza %



Alteraciones del cuello %



Alteraciones de las piezas principal y terminal %



Metodología

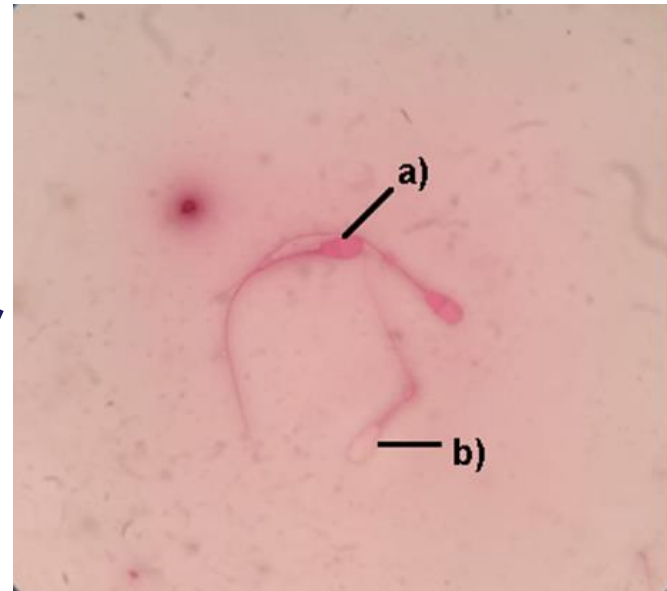
Viabilidad

Colorante Supravital

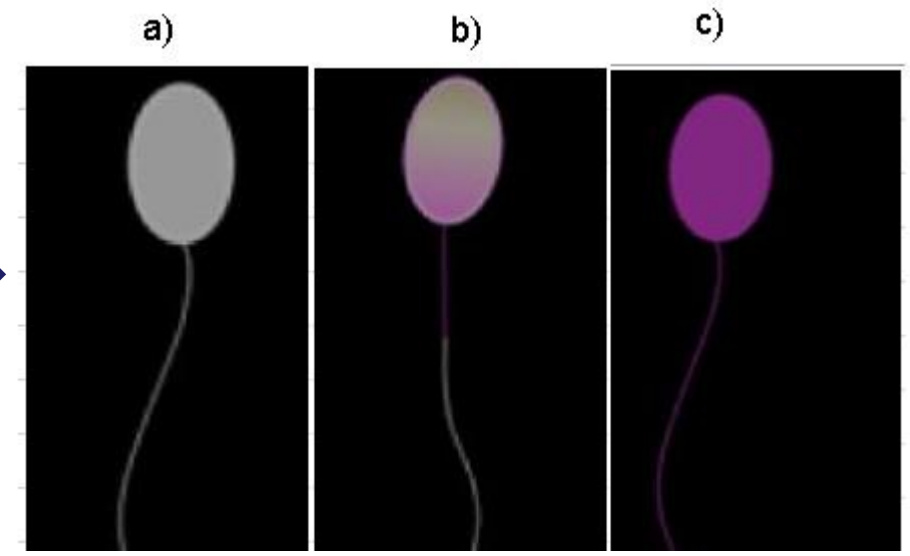


Nigrosina

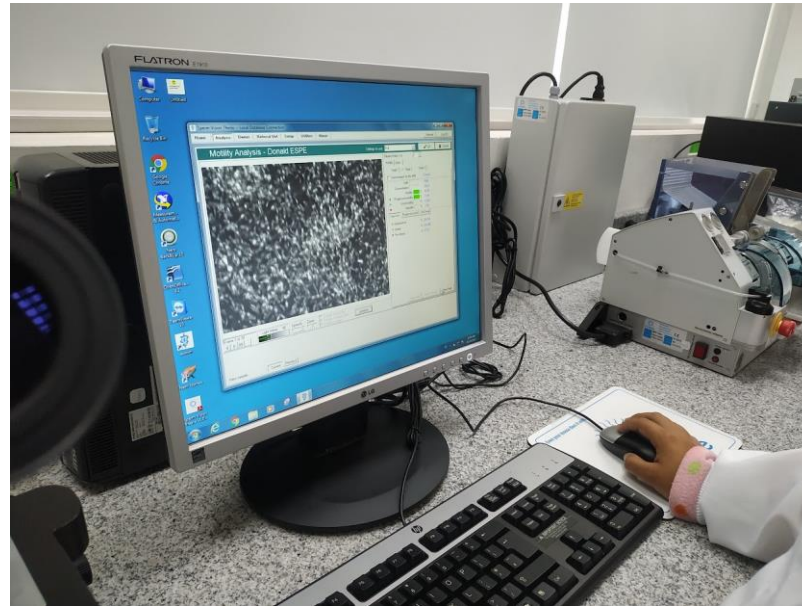
Eosina



% Espermatozoides vivos



Motilidad



- Motilidad a los 0 y 30 min %
- Motilidad progresiva 0 y 30 min %



Resultados y discusión

Características del semen	Donald	Marcelo
Volumen (mL)	4,73 ± 1,04 ^a	7,67 ± 1,86 ^b
Temperatura (°C)	31,75 ± 0,26 ^a	31,3 ± 0,21 ^a
pH	6,61 ± 0,02 ^a	6,49 ± 0,13 ^a
Color	Amarillo blanquecino	Amarillo blanquecino
Cuerpos extraños	Negativo (-)	Negativo (-)



Evaluación m	Parámetro	Espermatozoides frescos	Post-descongelación
	Toro	Motilidad (%)	75,31%±10,41 ^a
Motilidad progresiva (%)		62,96±12,54 ^a	18,68±3,18 ^b
Viabilidad espermática		75,31±10,41 ^a	36,81±10,97 ^b
Donald	Anormalidades (%)	41,38±13,72 ^a	58,94±11,24 ^b
Marcelo		312±93,07 ^b	

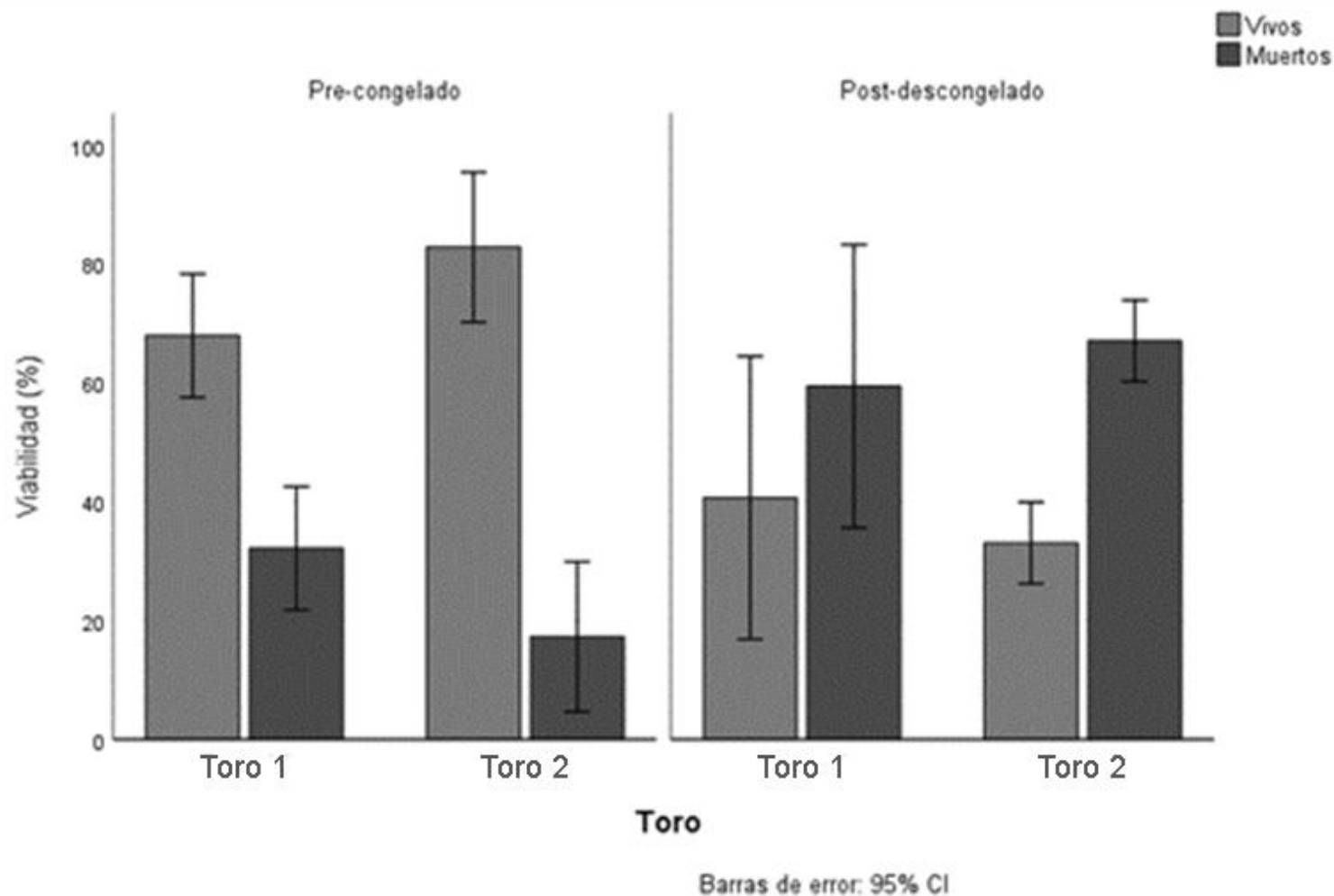


Calidad espermática en muestras colectadas por vagina artificial de 2 toros antes y después de la congelación

Parámetro	Espermatozoides frescos	Post-descongelación
Motilidad (%)	75,31%±10,41 ^a	29,69±3,76 ^b
Motilidad progresiva (%)	62,96±12,54 ^a	18,68±3,18 ^b
Viabilidad espermática	75,31±10,41 ^a	36,81±10,97 ^b
Anormalidades (%)	41,38±13,72 ^a	58,94±11,24 ^b



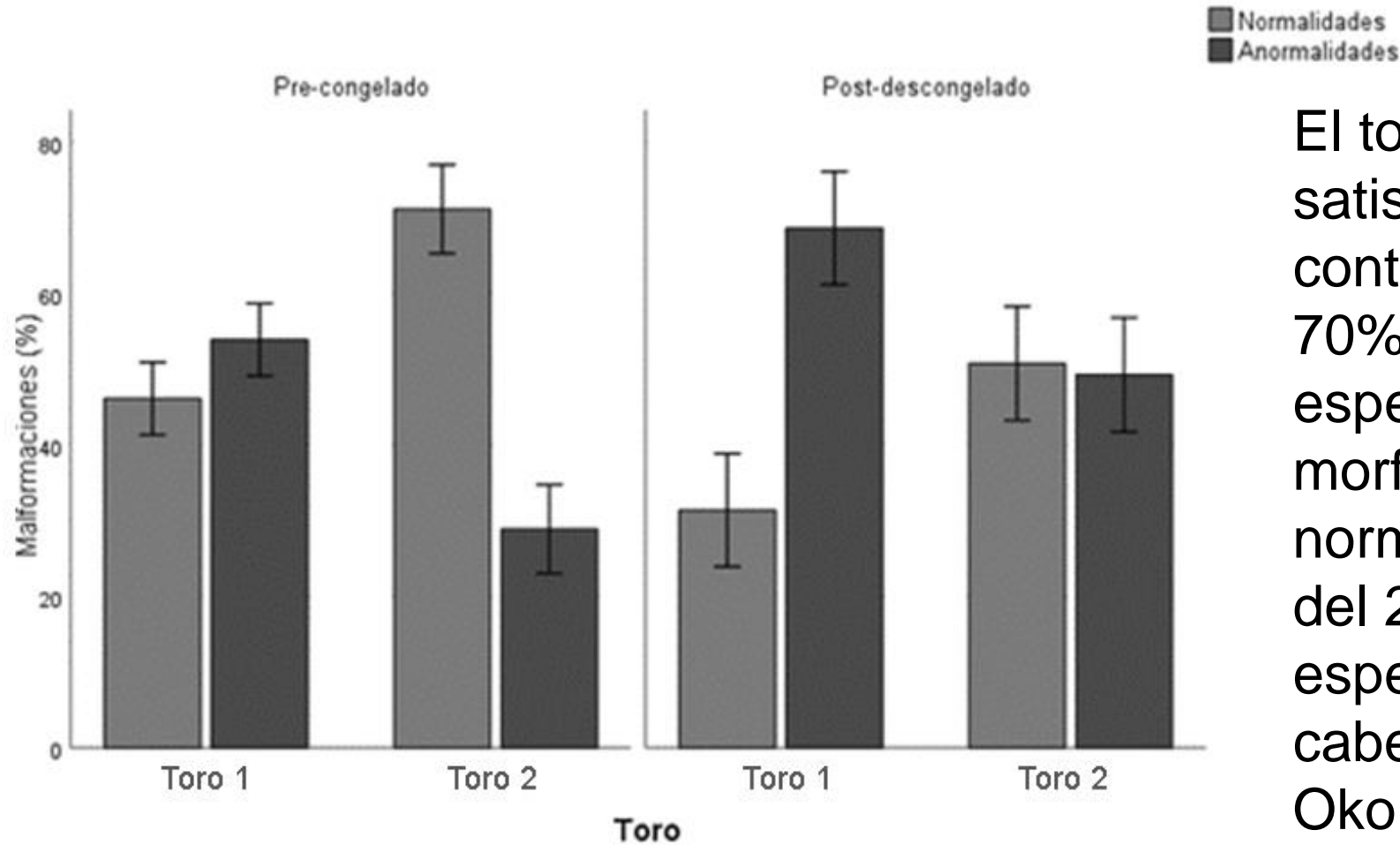
Viabilidad espermática



El congelamiento rápido y lento (Amann y Pickett, 1987). el congelamiento y descongelamiento va a depender de la célula, y su tolerancia al daño por cristales de hielo, a la toxicidad por efecto de la disolución (Hafez,2002).



Morfología espermática

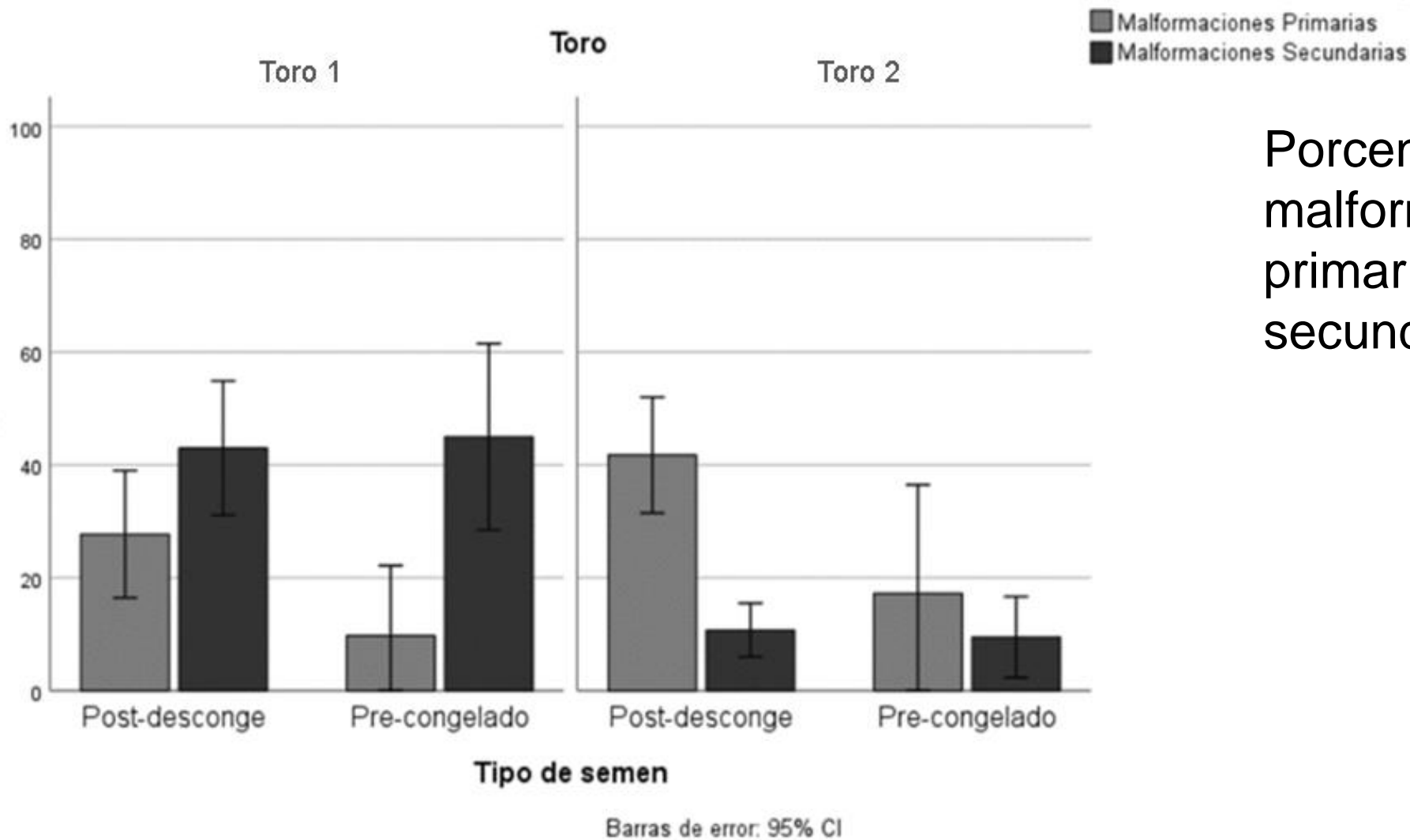


Barras de error: 95% CI

El toro clasificado como satisfactorio debe contener al menos un 70% de espermatozoides morfológicamente normales, con no más del 20% de espermatozoides con cabeza anormal (Bart & Oko, 1989).



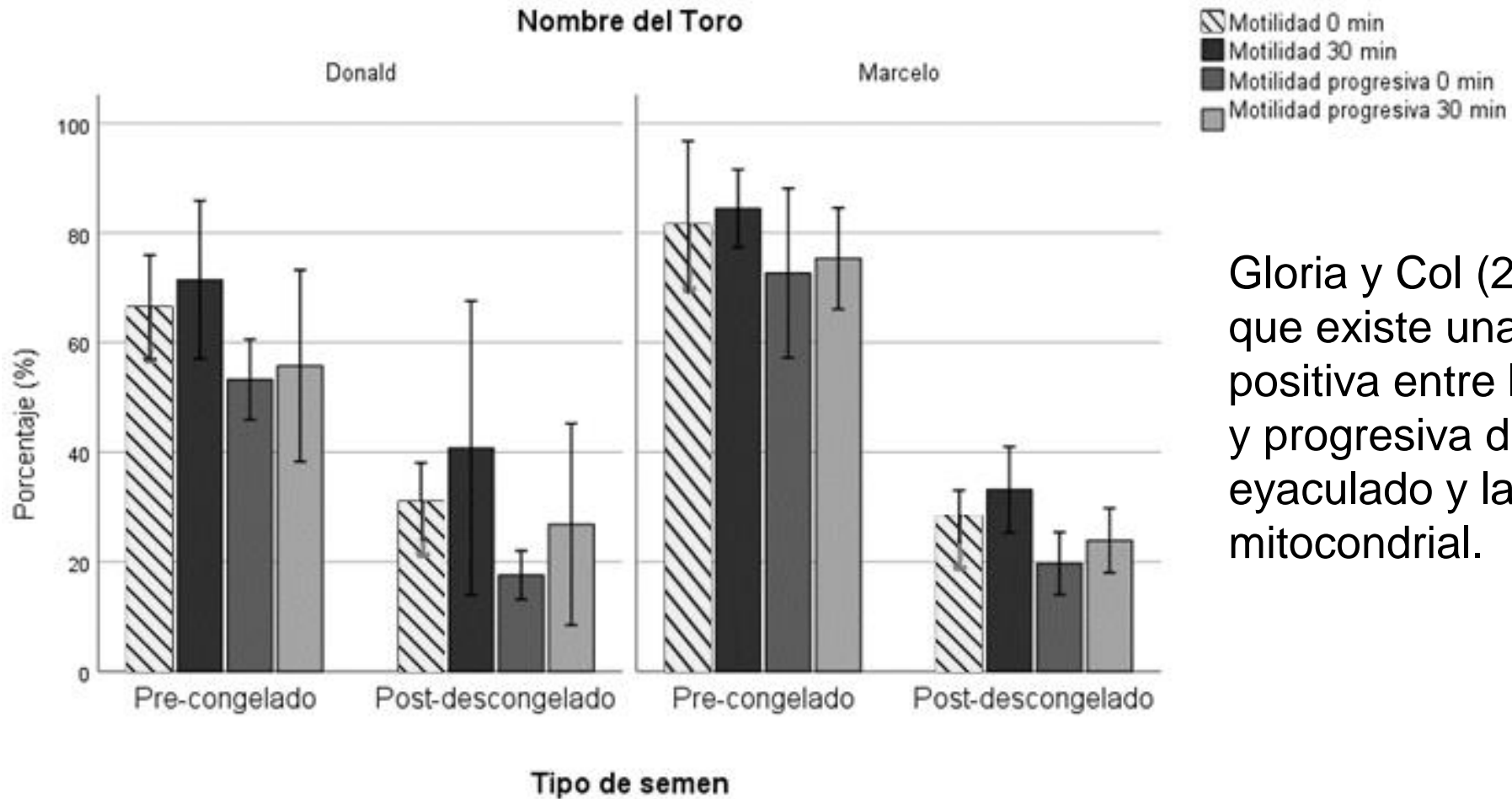
Morfología espermática



Porcentaje de malformaciones primarias y secundarias



Motilidad



Barras de error: 95% CI

Gloria y Col (2011) menciona que existe una correlación positiva entre la motilidad total y progresiva del semen eyaculado y la actividad mitocondrial.

Conclusiones

- ❑ Considerando los resultados sobre la calidad espermática pre-congelación obtenido de los toros Girolando de la hacienda Zoila Luz km 24, se podría concluir que los reproductores Donald y Marcelo necesitan un acondicionamiento debido a la baja concentración espermática de Marcelo y por el porcentaje de anomalías encontradas previo a la congelación en Donald.
- ❑ Las anomalías más frecuentes observadas en el semen bovino de Donald son las colas enrolladas o los plegamientos de pieza intermedia, considerando el porcentaje obtenido de anomalías, este puede comprometer la fertilidad del toro, ya que los espermatozoides defectuosos no poseen una motilidad normal y no alcanzan el ovocito.
- ❑ Las muestras de espermatozoides frescos presentaron resultados superiores en todos los parámetros realizados (Motilidad total y progresiva, viabilidad y morfología espermática) comparados con las muestras post-descongelación donde se redujo significativamente todos los parámetros de calidad espermática empleando la curva de congelación lenta ($0.5\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ de 20 a 4°C , seguido de $5\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ de 4 a -10°C , seguido de $40\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ de -10 a -100°C , seguido de $20\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ de -100 a -140°C).



reproductivo y la evaluación del semen, para poder clasificar de manera satisfactoria, cuestionable o insatisfactoria a los toros de la Hacienda Zoila Luz de la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE sede Santo Domingo, puesto que están altamente correlacionados con la fertilidad.

Un análisis de los puntos de equilibrio previo a la congelación empleando un congelador para optimizar los gastos de nitrógeno líquido.



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA