



“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”

Quintero Kajek, Ariana Lizbeth

Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

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

Dr. Carrera Garcés, Fredy Patricio Ph. D.

24 de agosto del 2022

Reporte de Verificación de Contenido



Tesina-Ariana Quintero.pdf

Scanned on: 12:44 August 24, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

Identical Words	76
Words with Minor Changes	1
Paraphrased Words	590
Omitted Words	232



FREDDY PATRICIO CARRERA GARCÉS

Carrera Garcés, Fredy Patricio Ph.D.
Director del Trabajo de Integración Curricular
C.C. 0602031569



Departamento de Ciencias de la Vida y Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular, **“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”**, fue realizado por la señorita **Quintero Kajek, Ariana Lizbeth**, el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas “ESPE”, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 24 de agosto del 2022

Firma



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

**Carrera Garcés, Fredy Patricio Ph. D.
Director de Trabajo de Integración Curricular
C.C. 0602031569**



Departamento de Ciencias de la Vida y Agricultura
Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Quintero Kajak, Ariana Lizbeth**, con cédula de ciudadanía 1718784778, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular **"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"** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas "ESPE", respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 24 de agosto del 2022

Firma:

Quintero Kajak, Ariana Lizbeth
C.C. 1718784778



Departamento de Ciencias de la Vida y Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo, **Quintero Kajek, Ariana Lizbeth**, con cédula de ciudadanía 1718784778, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas "ESPE" publicar el trabajo de integración curricular: **"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"** en el repositorio institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 24 de agosto del 2022

Firma:

Quintero Kajek, Ariana Lizbeth
C.C. 1718784778

Dedicatoria

Quiero dedicar este trabajo a mis padres por su esfuerzo por ver surgir a sus hijos y por darme las fortalezas para afrontar el mundo.

También a Andrés Velásquez por todo su apoyo incondicional a lo largo de mi carrera universitaria, por enseñarme que con dedicación y esfuerzo puedes lograr tus objetivos, por regalarme los momentos más felices de mi vida y a nuestra hija Sofía que nos llenó de alegría y bendiciones.

Agradecimientos

Agradezco a mi familia por todo el apoyo brindado a lo largo de mi carrera universitaria.

Agradezco a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE sede Santo Domingo y a sus docentes por el conocimiento brindado todos estos años.

Agradezco al Dr. Fredy Carrera y al Ing. Andrés Vargas, por haberme apoyado con sus conocimientos para el desarrollo de este trabajo.

Agradezco a todos mis compañeros con los que he compartido gratas experiencias.

Agradezco a Andrés Velásquez por ser un pilar fundamental en mi desarrollo como persona.

Ariana Quintero

Índice de contenido

Caratula _____	1
Reporte de Verificación de Contenido _____	2
Certificación _____	2
Responsabilidad de autoría _____	4
Autorización de publicación _____	5
Dedicatoria _____	6
Agradecimientos _____	7
Índice de contenido _____	8
Lista de Figuras _____	13
Lista de Tablas _____	15
Resumen _____	16
Abstract _____	17
Capítulo I: Introducción _____	18
Introducción _____	18
Planteamiento del problema _____	20
Justificación _____	21
Objetivos _____	21
<i>Objetivo General</i> _____	21
<i>Objetivos Específicos</i> _____	21
Hipótesis planteada _____	22
<i>Ha:</i> _____	22
Capítulo II: Marco teórico _____	23

Raza bovina: Girolando	23
<i>Rusticidad</i>	23
<i>Longevidad</i>	23
<i>Fertilidad</i>	23
<i>Ganancia de peso</i>	23
<i>Características</i>	23
Anatomía del aparato reproductor del macho	24
<i>Testículos</i>	24
<i>El escroto</i>	25
<i>Epidídimo</i>	25
<i>Conducto deferente</i>	26
<i>Glándulas accesorias</i>	26
<i>Uretra Masculina</i>	27
<i>Pene</i>	27
Recolección del semen bovino: vagina artificial	27
Morfología espermática	28
Estructura del espermatozoide del semen bovino	28
El acrosoma	29
<i>La espermatogénesis en los toros</i>	30
<i>Espermiación</i>	31
Alteraciones morfológicas del espermatozoide	32
<i>Alteraciones primarias</i>	32
<i>Alteraciones secundarias</i>	33
<i>Alteraciones terciarias</i>	33
Evaluaciones de la calidad seminal	34
<i>Tiempo de recolección</i>	34

	10
<i>Pruebas macroscópicas</i> _____	34
Color _____	34
Volumen _____	35
pH _____	35
Cuerpos extraños _____	35
<i>Pruebas microscópicas</i> _____	35
Motilidad masal _____	35
Motilidad individual progresiva _____	35
Viabilidad _____	35
Concentración espermática _____	36
Tinción eosina/nigrosina _____	36
Tinción Spermac _____	37
Tinción Farely _____	38
Crioconservación del semen bovino _____	39
<i>Factores que determinan la criosupervivencia de los espermatozoides</i> _____	39
<i>Diluyentes seminales</i> _____	40
<i>Diluyente comercial OptiXell®</i> _____	41
Ventajas _____	41
Capítulo III: Ubicación, materiales y métodos _____	42
Lugar de estudio (área política-geográfica y ecológica) _____	42
<i>Ubicación política</i> _____	42
<i>Ubicación geográfica</i> _____	42
<i>Ubicación ecológica</i> _____	43
Equipos _____	43
Insumos _____	44

Reactivos _____	44
Biológicos _____	45
Acondicionamiento del laboratorio _____	45
Diferenciación de los tratamientos _____	45
Preparación de la solución seminal _____	46
<i>Cálculo del número de dosis</i> _____	46
<i>Volumen del diluyente</i> _____	46
<i>Dilución madre total</i> _____	46
<i>Preparación del diluyente OptiXcell®</i> _____	46
Recolección del semen bovino _____	46
Evaluación espermática pre-congelación _____	46
<i>Evaluación macroscópica</i> _____	47
Temperatura y pH. _____	47
Volumen. _____	47
Color. _____	47
Cuerpos extraños. _____	47
<i>Evaluación microscópica</i> _____	47
Concentración _____	47
Evaluación de la motilidad _____	47
Viabilidad espermática por exclusión del colorante _____	48
Análisis de características morfológicas _____	49
<i>Realización de frotis.</i> _____	49
<i>Tinción Farelly.</i> _____	49
<i>Tinción Spermac</i> _____	49
Envasado de pajuelas y congelamiento _____	52

Post-descongelación del semen bovino _____	53
Evaluación paramétrica post-descongelación _____	53
Diseño experimental _____	54
<i>Factores del experimento</i> _____	54
<i>Tipo de diseño</i> _____	54
<i>Repeticiones</i> _____	54
<i>Características de las unidades experimentales</i> _____	55
<i>Parámetros dependientes</i> _____	55
Capítulo IV: Resultados y Discusión _____	56
Evaluación macroscópica pre-congelación _____	56
Evaluación microscópica pre-congelación y post-descongelación _____	57
Viabilidad espermática _____	59
Morfología espermática _____	61
Motilidad _____	65
Capítulo V: Conclusiones _____	68
Capítulo VII: Bibliografía _____	70

Lista de Figuras

Figura 1 Tracto reproductivo del toro _____	24
Figura 2 Comparación de los espermatozoides de animales de granja y otros vertebrados observando diferentes características estructurales como el tamaño y forma relativos. ____	28
Figura 3 Estructura del espermatozoide _____	29
Figura 4 El acrosoma _____	30
Figura 5 Representación esquemática de las etapas de espermatogénesis en los mamíferos _____	31
Figura 6 Bosquejos esquemáticos de algunas anomalías y deficiencias de los espermatozoides, testículo y pene _____	34
Figura 7 Tinción viabilidad eosina/nigrosina. A) espermatozoide muerto. B) espermatozoide vivo. _____	37
Figura 8 Células espermáticas, teñidas con Spermac _____	38
Figura 9 Espermatozoides teñidos con Farelly _____	39
Figura 10 Efectos perjudiciales de la congelación-descongelación en un espermatozoide_	40
Figura 11 Ubicación geográfica del estudio en investigación _____	42
Figura 12 Protocolo de recopilación de datos para expresar la viabilidad de los espermatozoides _____	48
Figura 13 Viabilidad espermática pre-congelación y post-descongelación mediante tinción Eosina/Nigrosina en toros reproductores Girolando _____	60
Figura 14 Porcentaje de normalidades y anomalías pre-congelado y post-congelado de toros reproductores Girolando. _____	62
Figura 15 Porcentaje de malformaciones primarias y secundarias de toros reproductores Girolando mediante tinción Farelly y Spermac. _____	63

Figura 16 Motilidad espermática total y progresiva a los 0 y 30 min pre y post-congelación en toros Girolando mediante equipo CASA. _____ **66**

Lista de Tablas

Tabla 1 Nomenclatura espermatoológica para diferenciar la información _____	36
Tabla 2 Razas de toro en estudio _____	45
Tabla 3 Indicación según el color de la muestra seminal _____	47
Tabla 4 Parámetros mínimos previos a la congelación _____	50
Tabla 5 Protocolo de recopilación de datos para expresar la morfología de los espermatozoides _____	50
Tabla 6 Curva de congelamiento lento _____	53
Tabla 7 Variables independientes y niveles empleados en el estudio del semen bovino de reproductores de cruce Girolando de la hacienda Zoila Luz Km.24. _____	54
Tabla 8 Tratamientos de análisis en el estudio del semen bovino de reproductores de cruce Girolando en la hacienda Zoila Luz km.24. _____	54
Tabla 9 Promedio de variables macroscópicas del eyaculado de los toros de la raza Girolando en la hacienda Zoila Luz km 24 _____	56
Tabla 10 Promedio de la concentración espermática de los toros de la raza Girolando en la hacienda Zoila Luz km 24. _____	58
Tabla 11 Parámetros de calidad espermática en muestras colectadas por vagina artificial de 2 toros Girolando antes y después de la congelación. _____	58
Tabla 12 Alteraciones específicas del espermatozoide pre-congelación _____	64
Tabla 13 Alteraciones específicas del espermatozoide post-congelación _____	65
Tabla 14 Porcentaje del tipo de anomalías pre-congelación y post-congelación _____	65

Resumen

En la presente investigación se comparó la morfología del semen bovino fresco y criopreservado teñidos con Eosina/Nigrosina, Spermac y Farelly donde se determinó el porcentaje de: viabilidad, motilidad progresiva con el equipo CASA y morfología espermática en dos toros de la raza Girolando de 5 años. Las muestras seminales se diluyeron 1:1 con OptiXcell® seguido se criopreservo en el Ice Cube con una curva de congelamiento lenta (0.5 °C·min⁻¹ de 20 a 4°C, 5 °C·min⁻¹ de 4 a -10°C, 40 °C·min⁻¹ de -10 a -100°C, 20 °C·min⁻¹ de -100 a -140°C). Se empleó un DCA para las variables dependientes de calidad seminal, la información obtenida de cada toro y entre estos fue analizada antes y después de la congelación espermática. Se encontró diferencia altamente significativa ($p < 0,05$) en el toro 1 y 2 para volumen ($7,67 \pm 1,86$ mL y $4,73 \pm 1,04$, respectivamente) y concentración espermática ($1168 \pm 467,34 \cdot 10^6$ esp./mL y $312 \pm 93,07$, concernientemente), en la evaluación microscópica, se observó diferencia significativa en la viabilidad pre-congelación ($75,31 \pm 10,41$) y post-descongelación ($38 \pm 11,2$) con disminución de células viables, en cuanto a la morfología espermática normal y anormal tanto en el semen fresco y post-descongelado, el toro 2 presenta mayor normalidad antes del congelado ($71,13 \pm 3,68$ %) frente al toro 1 ($46,13 \pm 3,01$ %). Se observó una considerable disminución en la motilidad total ($77,95 \pm 9,60$) y progresiva ($65,55 \pm 13,26$) tanto pre-congelado y post descongelado ($38,39 \pm 12,41$ y $26,37 \pm 8,20$). Los espermatozoides analizados en el estado de pre-congelación tuvieron resultados superiores en comparación con los espermatozoides en el estado de post-congelación para cada uno de los parámetros espermáticos que se estudiaron.

Palabras claves: viabilidad, motilidad progresiva, CASA, morfología, semen frescocongelado

Abstract

In the present investigation, the morphology of fresh and cryopreserved bovine semen stained with Eosin/Nigrosin, Spermac and Farelly was compared, where the percentage of viability, progressive motility with the CASA equipment and sperm morphology were determined in two 5-year-old Girolando bulls. Semen samples were diluted 1:1 with OptiXcell® followed by cryopreservation in the Ice Cube with a slow freezing curve (0.5 °C-min⁻¹ from 20 to 4°C, 5 °C-min⁻¹ from 4 to -10°C, 40 °C-min⁻¹ from -10 to -100°C, 20 °C-min⁻¹ from -100 to -140°C). A DCA was used for the dependent variables of semen quality, the information obtained from each bull and between bulls was analyzed before and after sperm freezing. Highly significant difference ($p < 0.05$) was found in bull 1 and 2 for volume (7.67 ± 1.86 mL and 4.73 ± 1.04 , respectively) and sperm concentration ($1168 \pm 467.34 \times 10^6$ sp. /mL and 312 ± 93.07 , respectively), in the microscopic evaluation, a significant difference was observed in pre-freezing (75.31 ± 10.41) and post-thawing (38 ± 11.2) viability with a decrease in viable cells, as for normal and abnormal sperm morphology in both fresh and post-thawed semen, bull 2 presented greater normality before freezing ($71.13 \pm 3.68\%$) compared to bull 1 ($46.13 \pm 3.01\%$). A considerable decrease in total (77.95 ± 9.60) and progressive (65.55 ± 13.26) motility was observed both pre-freezing and post-thawing (38.39 ± 12.41 and 26.37 ± 8.20). Spermatozoa analyzed in the pre-freeze state had superior results compared to spermatozoa in the post-freeze state for each of the sperm parameters studied.

Keywords: viability, progressive motility, CASA, morphology, fresh frozen semen.

Capítulo I: Introducción

Introducción

El sector ganadero atravesado una serie de cambios debido al crecimiento poblacional y el subsecuente incremento en la demanda de productos derivados de esta industria. Diversos países se han valido de cambios estructurales e innovaciones tecnológicas de gran relevancia para estar a la par del rápido crecimiento económico. Asimismo, el sector ganadero es de gran importancia en la producción agrícola a nivel global, aportando un 40% del valor del mercado mientras mantiene la seguridad alimentaria y la calidad de vida de más de 1 300 millones de individuos, es uno de los sectores con más rápido crecimiento en la economía agrícola (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2019).

En Ecuador predomina el ganado vacuno con un total de 4,34 millones de cabezas que a nivel nacional se encuentran distribuidas en las regiones del Litoral o Costa (41,24%), Sierra (49,11%), Amazonía (9,65%) (INEC, 2020). La mayor cantidad de cabezas de ganado vacuno (951 769) se encuentran en la provincia de Manabí, representando el 21,95% del ganado presente a nivel nacional seguido de la provincia de Chimborazo. Santo Domingo de los Tsáchilas en el año 2019 contaba con el 4% del ganado vacuno presente a nivel nacional y el 7% a nivel de la región Sierra (INEC, 2020). Esta región se encarga de la producción diaria de 3,5 millones de litros de leche, destinados al mercado nacional, debido a que las condiciones del clima favorecen la producción lechera de razas bovinas como Holstein, Jersey o *Brown swiss*. En cambio, en el litoral o costa se encuentran las especies bovinas para la producción cárnica como Brahman, Charolais Aberdeeen, y cruces de razas criollas con cebú y *Brown swiss* estas últimas con el objetivo de mejorar la calidad y el peso a la canal (Crespo, 2020).

El Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (MAGAP) ha realizado diversos programas para el mejoramiento genético desde el año 2011 con el apoyo de la Subsecretaría de Ganadería Sostenible. Cada mes realizan en promedio unas 80 inseminaciones artificiales en la provincia de Azuay, donde se busca gracias a la inseminación

artificial (IA) incrementar la producción lechera del ganado y disminuir los costos que incurren el mantenimiento del toro, la efectividad que se ha logrado es del 50 al 60 %. Un programa de IA ofrece ciertas ventajas ya que se puede prescindir de un toro y los gastos de manejo que normalmente incurre la tenencia de estos, se reduce drásticamente el contagio de enfermedades de carácter reproductivo y se logra mejorar la producción del animal (MAGAP, 2019).

Por ello, la criopreservación de semen y la IA tienen un impacto importante y positivo en la producción ganadera y la calidad del producto. Mediante el uso de semen criopreservado y la IA se pueden utilizar espermatozoides de los mejores toros reproductores para inseminar a miles de vacas en todo el mundo. Aunque en las últimas décadas las investigaciones se han enfocado mayormente en la criopreservación del esperma del toro, en comparación con otras especies, el conocimiento obtenido y las tecnologías desarrolladas aún poseen vacíos importantes que deben seguir siendo estudiados. La viabilidad espermática conseguida luego de la descongelación varía mucho entre reproductores, obteniendo niveles relativamente bajos y no ideales para los avances que se busca lograr en la ciencia fundamental de los gametos de mamíferos como en la biotecnología reproductiva (Ugur et al., 2019).

La crioconservación tiene por objetivo conservar la mayor cantidad posible de espermatozoides viables luego de la descongelación, manteniendo unos parámetros de calidad espermática similares a aquellos obtenidos previo a la congelación, especialmente en la integridad estructural, viabilidad, motilidad, integridad del ADN y la función biológica que se encuentra relacionada con la capacidad de fertilización. No obstante, aunque se realiza la criopreservación de esperma como parte del protocolo de rutina para una IA, únicamente el 50% de los espermatozoides logran sobrevivir el procedimiento de congelación y descongelación (Hammerstedt, Graham, & Nolan, 1990). Los espermatozoides sufren un choque por frío durante la criopreservación lo que afecta la función y la fertilidad de los espermatozoides (Hammerstedt, Graham, Nolan, 1990), causando que estos tengan una tasa

de supervivencia mucho menor luego de la descongelación y su longevidad dentro del tracto reproductivo de la hembra se vea afectada drásticamente. (Baust, Gao, & Baust, 2009).

Por otra parte, podemos tener efectos negativos en la osmolaridad, choques térmicos y alteraciones de las propiedades de la membrana como resultado de realizar una criopreservación de espermatozoides (Watson, 1995). Los avances en las técnicas de crioconservación han progresado lentamente. Además, se cree que la fertilidad bovina ha disminuido en las últimas décadas. Se ha informado que un intento de aumentar la criosupervivencia del espermatozoide de toro mediante la adición de colesterol a la membrana del espermatozoide de toro antes de la crioconservación produjo una motilidad modesta del 60 % y una viabilidad del 55 %, y que no se tradujo en un aumento de la fertilidad *in vivo* (Said, Gaglani, & Agarwal, 2010; Aitken, 1995). Por ello el objetivo principal del proyecto de investigación es la comparación morfológica 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.

Planteamiento del problema

En el desarrollo de la IA las dosis seminales deben conservar su capacidad fecundante después de la criopreservación (Hidalgo, Tamargo & Díez, 2005). La aplicación de la tecnología de criopreservación e IA ha contribuido al avance de la reproducción animal. No obstante, la mayor parte de los espermatozoides pierde su fertilidad al sufrir diversas alteraciones durante la criopreservación, motivo por el cual el uso rutinario del semen congelado y descongelado no es tan adecuado, de esta manera la criopreservación afecta la capacidad fecundante y reduce la vida útil de los espermatozoides. La variación en la criosupervivencia de los espermatozoides de diferentes toros e incluso con el toro individual es común en los centros de IA (Nagata, 2019).

Baust et al., (2019) resumió los factores estresantes que influyen en las células durante las etapas de enfriamiento y congelación de la siguiente manera: primero, durante el enfriamiento, las células están expuestas a muchos efectos dañinos que incluyen desacoplamiento metabólico, desequilibrio iónico, activación de proteasas, acidosis celular,

privación de energía, transición de fase de membrana, desestabilización del citoesqueleto y producción de radicales libres o especies reactivas de oxígeno, como segundo punto, durante el proceso de congelación, los espermatozoides están predispuestos a los efectos perjudiciales de la formación de cristales de hielo, hiperosmolaridad, alteraciones en el volumen celular y desnaturalización de proteínas.

Por ello, mediante la presente investigación se comparará la calidad del semen evaluando la morfología del eyaculado fresco y criopreservado mediante tinciones que permitirán identificar las principales anomalías generadas en el proceso de congelamiento y almacenamiento en nitrógeno líquido.

Justificación

La calidad del semen congelado en la producción ganadera es de suma importancia debido al uso masivo en programas de IA que generan elevados porcentajes de preñez, favoreciendo el valor económico en la producción de leche y carne, por lo que se recomienda hacer una valoración espermática, en especial de la morfología, motilidad progresiva y la viabilidad de los espermatozoides, lo cual permitirá calificar las dosis seminales como aptas para ser utilizadas, siempre y cuando cumplan con los valores mínimos exigidos en las características señaladas anteriormente.

El objetivo principal de esta investigación es mejorar la calidad del semen para obtener pajuelas con valores superiores a los establecidos lo cual incrementará la eficiencia reproductiva en programas de IA.

Objetivos

Objetivo General

Comparar 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.

Objetivos Específicos

- 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 torosreproductores 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.

Hipótesis planteada

Ha:

- Los indicadores de calidad espermática (viabilidad, morfología y motilidad) presentan diferencias significativas en semen fresco y congelado de toros de raza Girolando.

Capítulo II: Marco teórico

Raza bovina: Girolando

El Girolando es una raza de ganado bovino fue creado en Brasil siendo una de las mayores productoras de leche, esta raza es el resultado del cruce de Gir (*Bos indicus*) y Holstein (*Bos taurus*), la primera altamente resistente a enfermedades tropicales y altas temperaturas. (Sánchez et al.,2015). Esta raza se caracteriza por la producción lechera de Holstein y rusticidad heredada de Gir. La estandarización para la obtención de la raza: 3/8 Gir y 5/8 Holstein, convirtiéndole en una raza ideal para un ambiente tropical húmedo como el de la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas (Silvestri, 2020).

Rusticidad

Por su conformación muscular, esquelética, su disposición de autorregulación de la temperatura corporal, sus patas fuertes y rectas, su hábito de pastoreo,entre otras, son propiedades que le confieren gran adaptabilidad y resistencia a ambientes difíciles (Silvestri, 2020).

Longevidad

La raza girolando comienza su descendencia a los dos años y medio donde obtiene su primera cría, la máxima producción se logra a los diez años y continúa de manera productiva hasta los 15 años (Silvestri, 2020).

Fertilidad

La autorregulación de la temperatura corporal favorece al saco escrotal, proporcionando así una mayor producción de espermatozoides viables (Silvestri, 2020).

Ganancia de peso

Una de las ventajas de la raza girolando es el engorde de los machos en confinamiento con una ganancia promedio de más de 1 kg/día (Silvestri, 2020).

Características

- Vigor híbrido
- Disposición tranquila
- En climas cálidos buena producción de leche

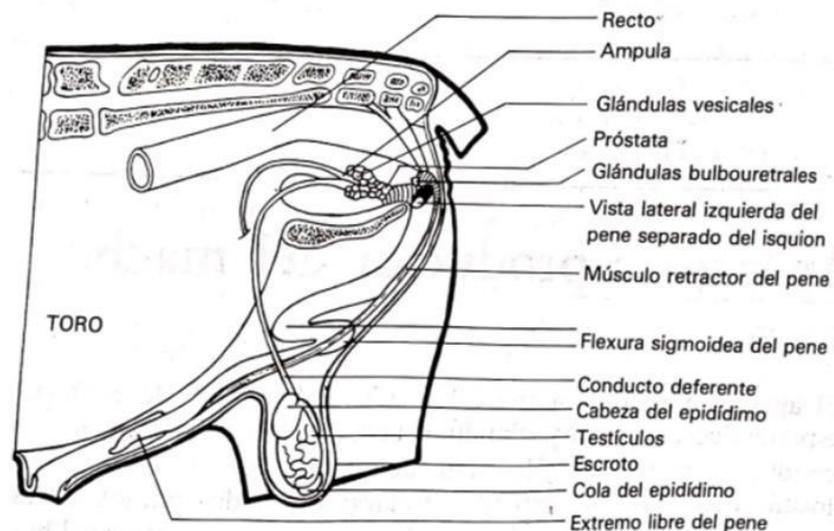
- Adaptabilidad
- Longevidad
- Fertilidad y facilidad de parto
- Rendimiento de carne

Anatomía del aparato reproductor del macho

El tracto reproductivo del toro consta de testículos, órganos sexuales secundarios y tres glándulas sexuales accesorias. Estos órganos trabajan en conjunto para la formación, maduración y transporte de los espermatozoides, que eventualmente se depositan en el tracto reproductivo femenino. Los órganos sexuales secundarios son el epidídimo, el conducto deferente y el pene. Las tres glándulas sexuales accesorias incluyen, la próstata, las vesículas seminales y la glándula bulbouretral (glándula de Cowper). Esta anatomía básicase ilustra en la figura 1 (Whittaker, 1999).

Figura 1

Tracto reproductivo del toro



Nota: Tomado de Hafez, (2002)

Testículos

Están ubicados fuera de la cavidad del cuerpo en el escroto y tiene dos funciones vitales: producir los espermatozoides y producir la hormona masculina testosterona. La

ubicación de los testículos en el exterior tiene una temperatura entre 4 y 5 grados por debajo de la temperatura corporal, esencial para la formación normal de los espermatozoides.

El escroto

El escroto protege de forma física a los testículos, además tiene capacidad para regular la temperatura para un correcto desarrollo de los espermatozoides. Esta regulación viene dada por la coordinación de dos músculos dartos y cremáster, el primero contrae la piel cuando la sensación térmica es de frío y la estira en momentos de calor, el segundo alarga o acorta a los testículos al cuerpo, todo dependiendo de la temperatura ambiental (Whittier, 1999).

Epidídimo

El epidídimo se encuentra firmemente adherido a un costado del testículo, siendo característico por ser compacto, aplanado y de estructura alargada. Su estructura se puede observar seccionada en cabeza, cuerpo y cola. Funciones principales del epidídimo:

- Absorción de fluidos excedentes aumentando la concentración de los espermatozoides
- Transporte de los espermatozoides en desarrollo desde el testículo hasta el conducto deferente
- Reabsorción de los espermatozoides en la cola del epidídimo si disminuye la actividad sexual.
- La maduración de los espermatozoides en desarrollo
- Acumulación de espermatozoides viables en la cola del epidídimo (Whittier, 1999).

El epidídimo sirve como salida para todos los espermatozoides producidos en el testículo y cualquier bloqueo de este conducto provocará esterilidad. El bloqueo temporal debido a la hinchazón después de una lesión o infección (epididimitis) provocará infertilidad a corto plazo. Si la hinchazón o infección da como resultado la formación de tejido cicatricial en el túbulo, puede bloquear permanentemente el paso de los espermatozoides. Si se

produce bloqueo en ambos epidídimos, el toro ya no será útil como reproductor (Gloobe,1989).

Conducto deferente

El conducto deferente emerge de la cola del epidídimo como un túbulo recto y pasa como parte del cordón espermático a través del anillo inguinal hacia la cavidad corporal. Los espermatozoides se transportan más a lo largo del tracto reproductivo hasta la región pélvica a través de los conductos deferentes mediante la contracción del tejido muscular liso que rodea este túbulo durante la eyaculación. Los toros se pueden esterilizar mediante la extirpación de una sección del conducto deferente (vasectomía) impidiendo el paso de los espermatozoides al exterior del cuerpo (Whittier, 1999).

Glándulas accesorias

Dos de las glándulas accesorias se encuentran en la región general donde los conductos deferentes se unen para convertirse en la uretra. Las secreciones de estas glándulas constituyen la mayor parte de la porción líquida del semen. Además, las secreciones activan los espermatozoides para volverse móviles. Las vesículas seminales constan de dos lóbulos de aproximadamente 4 a 5 pulgadas de largo, cada uno conectado a la uretra por un conducto. La glándula prostática está ubicada en el cuello de la vejiga urinaria donde desemboca en la uretra. La próstata es parcialmente pequeña en el toro, en semejanza con otras especies, y no genera un volumen de secreción muy grande (Whittier, 1999).

La tercera glándula accesoria, las glándulas de Cowper, son glándulas pequeñas y firmes ubicadas a ambos lados de la uretra. La secreción clara que a menudo gotea del pene durante la excitación sexual antes del servicio es producida en gran parte por estas glándulas y sirve para enjuagar y limpiar la uretra de cualquier residuo de orina que pueda ser dañino para los espermatozoides (Whittier, 1999).

Una de las glándulas accesorias puede infectarse ocasionalmente, dando como resultado muestras de semen que son amarillas, turbias y que contienen células de pus. No es raro en los toros que las vesículas seminales estén tan afectadas (vesiculitis seminal). El

tratamiento con antibióticos a veces es necesario, pero el tiempo generalmente corregirá el problema (Whittier, 1999).

Uretra Masculina

Los dos conductos deferentes eventualmente se unen en un solo tubo, la uretra, que es el canal que pasa a través del pene. El semen y la orina del tracto reproductivo y urinario, respectivamente, se valen de la uretra como un medio de transporte común (Whittier, 1999).

Pene

El ángulo sigmoideo es una estructura anatómica que proporciona un medio por el cual el pene se mantiene dentro de la funda, excepto durante el tiempo de servicio. Fuertes músculos retractores sostienen el pene en la configuración en forma de "S". En ocasiones, estos músculos son demasiado débiles para funcionar correctamente y una parte del pene y el revestimiento de la vaina sobresalen en todo momento; esto expone al macho al peligro de lesionarse y esta característica debe evitarse al seleccionar un toro de rebaño (Whittier, 1999).

El pene es el órgano de la copulación. El material de tipo esponjoso dentro del pene se llena de sangre durante la excitación sexual, lo que provoca la erección del órgano. El extremo del pene es el glande y es rico en nervios, que se estimulan durante la cópula para inducir la eyaculación. Pueden existir alteraciones del glande (figura 5) y deben detectarse durante un examen de fertilidad (Whittier, 1999).

Recolección del semen bovino: vagina artificial

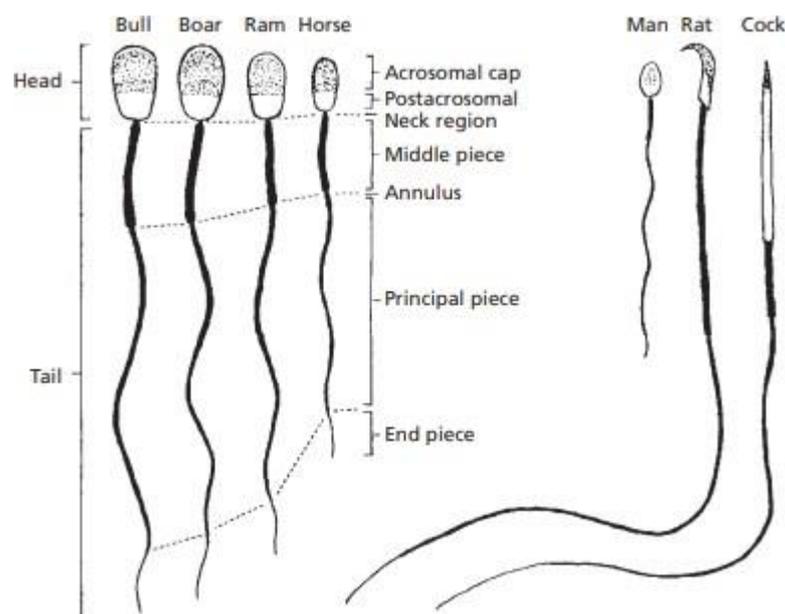
El semen recolectado por vagina artificial es más limpio y concentrado en comparación con las muestras recolectadas por electroeyaculación o por masaje. Sin embargo, la capacidad de producción espermática normal de un reproductor no es representativa con estos métodos puesto que el volumen y la densidad no se encuentran dentro de lo común; pero, con la técnica adecuada, a veces es posible que los eyaculados sean limpios y presenten una concentración espermática adecuada, especialmente si los toros han descansado sexualmente y tienen un buen manejo (Baracaldo, Barth & Bertrand, 2006).

Morfología espermática

El espermatozoide es una célula especializada, ha evolucionado de tal manera que es diferente al resto de tipos celulares, la particularidad encontrada es que esta posee una cabeza que conserva el material genético, una pieza intermedia que contiene mitocondrias, lo que permite dar movilidad al flagelo o cola, cabe destacar que existe una infinidad de diversidad morfológica en las especies (figura 2), por lo cual no son iguales, llevando a cabo cada uno de ellos procesos de capacitación y diferente reacción acrosomal dentro del aparato reproductor de la hembra (Reece & Rowe, 2017)

Figura 2

Comparación de los espermatozoides de animales de granja y otros vertebrados observando diferentes características estructurales como el tamaño y forma relativos.



Nota: Tomado de Reece & Rowe, (2017). Pg. 448.

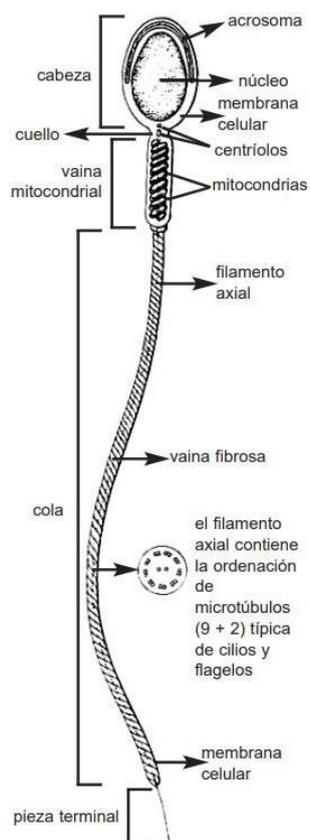
Estructura del espermatozoide del semen bovino

El espermatozoide normal suele tener una apariencia simétrica, con cabeza oval de contorno regular, al momento de realizar la tinción se observan zonas bien diferenciadas: como la zona acrosómica que ocupa más de la tercera parte de la cabeza, y la sub cromosómica que cubre el resto de la cabeza tiene un ancho aproximado entre 2 a 4 μm y una longitud de 3 a 8 μm .

La pieza intermedia mide aproximadamente 7 a 8 μm de longitud, es de contorno regular y recta. Se encuentra alineada de manera longitudinal con la cabeza. La cola tiene una longitud cercana de 45 a 60 μm , es de contorno irregular, delgada, única y no enrollada.

Figura 3

Estructura del espermatozoide



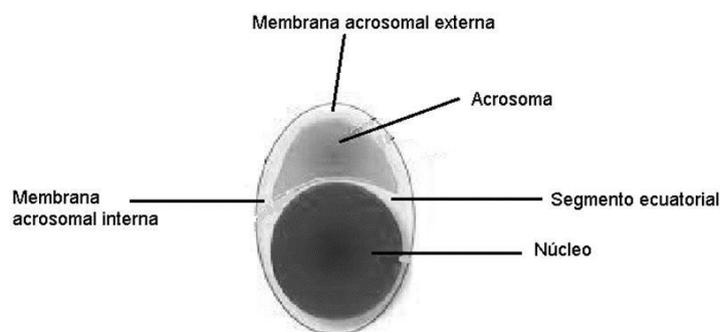
Nota: Tomado de Análisis del semen bovino (p.43), por Ordóñez, Tamargo & Monforte,(2005).

El acrosoma

En un espermatozoide sin malformaciones se puede distinguir el acrosoma (figura 4) en buen estado conformado por tres regiones: la membrana acrosomal interna y externa, el segmento ecuatorial. Existe una correlación de la baja fertilidad de un semental con el porcentaje de acrosomas ausentes o alterados. Para el análisis de la condición del acrosoma se puede emplear una serie de tinciones, eosina/nigrosina, spermac, triple tinciones, Giemsa, entre otras. (Hidalgo Ordóñez, Tamargo & Díez, 2005).

Figura 4

El acrosoma



Nota: elaboración propia

La espermatogénesis en los toros

En la espermatogénesis, se multiplican las células germinales del toro y se diferencian de forma cíclica en los túbulos seminíferos a espermatozoides (Staub & Johnson, 2018). La espermatogénesis está regulada por el eje hipotálamo-hipófisis-testículo, la duración del ciclo depende de cada especie (Rodríguez et al., 2018). La espermatogénesis presenta tres fases:

Espermatocitogénesis, ocurren varias divisiones mitóticas de las espermatogonias para producir espermatocitos primarios (figura 5)

Meiosis, comprende el intercambio y la duplicación de material genético mediante dos rondas de divisiones celulares que disminuyen la cantidad de cromosomas en los gametos (diploides) y producen cuatro células hijas haploides, espermatidas.

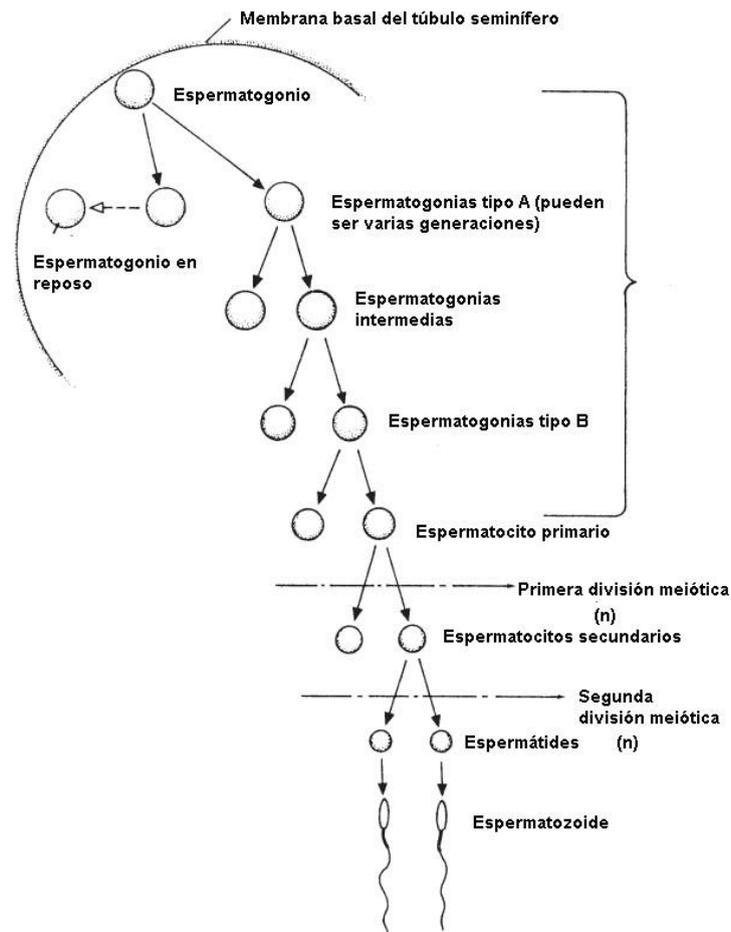
Espermioagénesis, ocurre la diferenciación de espermatidas redondas en espermatozoides completamente maduros liberados en la luz de los túbulos seminíferos. (Staub & Johnson, 2018).

En la espermioagénesis se dan cambios como: la formación del acrosoma con enzimas que ayudarán a la penetración del ovocito, este se observa desde la mitad de la superficie nuclear; b) concentración del núcleo; c) creación del cuello, la pieza intermedia y la cola y d) separación de gran parte del citoplasma (Rodríguez et al., 2018). En toros, la duración del ciclo del epitelio seminífero es de 13,5 días. La duración total de la espermatogénesis es de

61 días, es decir, 4,5 veces la duración del ciclo del epitelio seminífero. La onda espermatogénica se utiliza para describir la disposición espacial de las asociaciones celulares a lo largo de los túbulos (Staub & Johnson, 2018).

Figura 5

Representación esquemática de las etapas de espermatogénesis en los mamíferos



Nota: El cromosoma número ($2n$, diploide; n , haploide) también se muestra para cada etapa.

Modificado de Reece & Rowe, (2017). Pg 447.

Espermiación

Una vez finalizado la espermiogénesis, comienza la espermiación donde los espermatozoides se trasladan hacia el lumen de los túbulos seminíferos y de este punto son transportados hacia el epidídimo para su posterior maduración, para adquirir la capacidad fecundante y poder fertilizar al óvulo en el eyaculado (Rodríguez et al., 2018).

Alteraciones morfológicas del espermatozoide

En los protocolos de reproducción asistida para garantizar resultados beneficiosos, es importante el estudio de la morfología para una correcta selección de los espermatozoides.

Una clasificación estrictamente morfológica organiza las anomalías que puedan formarse en la cabeza, a nivel de acrosoma, en el cuello, en la pieza principal y terminal. También, según el órgano donde se originan se pueden diferenciar en anomalías primarias y secundarias, como anomalías producidas en los testículos, en el sistema ductal o por un mal manejo del semen bovino después de la colecta (Tamargo & Monforte, 2005).

En el presente estudio para la evaluación morfológica (figura 6) se tomó en cuenta las anomalías producidas en los testículos, y las generadas en el sistema ductal o por manejo del semen a partir de la colecta.

Para un criterio de evaluación se considera semen de buena calidad, aquel que presente más del 70% de espermatozoides normales. Las anomalías primarias deben ser menores al 10% y las anomalías secundarias menores al 20%. (Rodríguez et al., 2018).

Alteraciones primarias

Se originan durante la espermatogénesis en el testículo. Aquí se incluyen las deformaciones de la cabeza o del acrosoma, apéndices caudales para/retroaxiales, malformaciones de la pieza intermedia, así como las malformaciones dobles o múltiples (espermatozoides bicéfalos). Las alteraciones primarias se consideran de gran trascendencia en lo referente a etiología y consecuencias para la fertilidad del macho (Hafez, 2002).

- Forma de la cabeza: lanceolada, piriforme, angosta o estrecha.
- Acrosoma: desprendido, rugoso, pequeño.
- Tamaño de cabeza: microcefalia, macrocefalia.
- Cuello paraxial.
- Doble cabeza.
- Cabeza desprendida.

Alteraciones secundarias

Se producen durante el tránsito, maduración y depósito en el epidídimo. En la cola del epidídimo o durante la eyaculación desaparecen las gotas citoplasmáticas, que constituyen los residuos del citoplasma de los estadios previos indiferenciados de los espermatozoides. Las causas de la persistencia de las gotas plasmáticas pueden ser variadas. De forma típica, una frecuencia de cubrición demasiado elevada, debido al escaso tiempo de maduración en el epidídimo da como consecuencia un elevado porcentaje de espermatozoides con gotas plasmáticas adheridas en el eyaculado. También con frecuencias normales de cubrición se observan trastornos de la espermatogénesis como causa de una abundante presencia de gotas plasmáticas (Hafez, 2002). Las principales anomalías secundarias son:

- Casquete cefálico desprendido
- Fractura del cuello
- Desviaciones de la forma de la cola como lazos y enrollamientos
- Gotas citoplasmáticas
- Residuos del citoplasma de los estadios previos indiferenciados de los espermatozoides

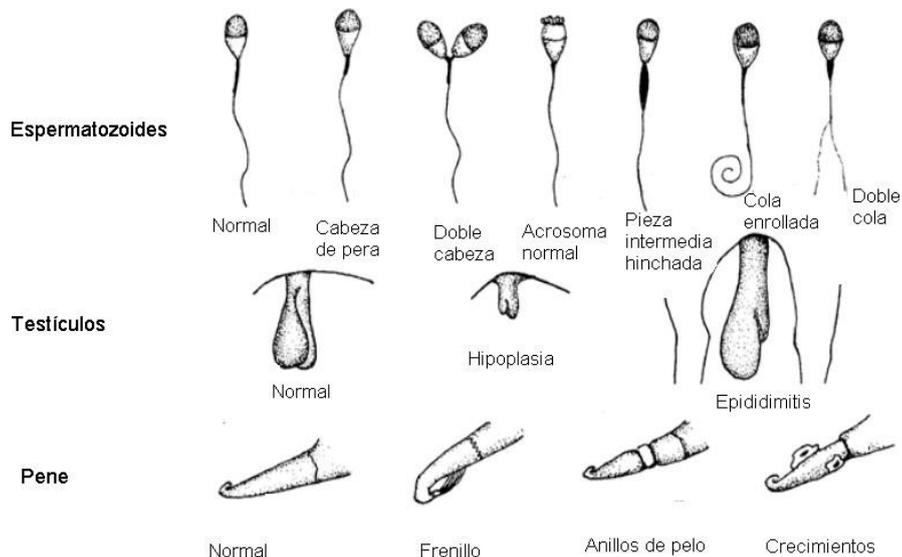
Alteraciones terciarias

Se originan durante la obtención del espermatozoide, o después de la misma, por defecto de influencias externas (Hafez, 2002).

- Disolución de casquetes cefálicos
- Enrollado de las colas
- Fracturas del cuello

Figura 6

Bosquejos esquemáticos de algunas anomalías y deficiencias de los espermatozoides, testículo y pene



Nota. Modificado de Whittier, (1999).

Evaluaciones de la calidad seminal

Se determinan los indicadores apreciables en el tubo de colecta a la vista del laboratorista deduciendo los siguientes criterios:

Tiempo de recolección

Este parámetro es importante, ya que una vez recolectada la muestra de semen al tiempo de 10 a 20 minutos a temperatura ambiente se coagula. La muestra de semen para análisis es homogénea, no contiene grumos o coágulos.

Pruebas macroscópicas

Color. Una vez ingresado el eyaculado al laboratorio, se observa la coloración o aspecto, donde los colores más comunes en el semen bovino son:

- Blanco
- Crema
- Amarillento
- Grisáceo
- Presencia de células sanguíneas (sangre)

El color del esperma que no se considera normal es el marrón, rosado y verde.

Volumen. Se lo realiza a través del tubo de colecta graduado. Es transcendental evitar la formación de burbujas o espuma que pueda interferir en la lectura del volumen real. Se debe considerar que un toro mayor a 2 años debe generar un eyaculado mínimo de 4 mL. El volumen de un semental puede variar de 2 y 12 mL (Gómez & Migliorisi, 2015).

pH. Se emplea un potenciómetro, donde el valor del pH adecuado del eyaculado está entre un 6,2-6,8 en la mayoría de los mamíferos (Gómez & Migliorisi, 2015).

Cuerpos extraños. Este parámetro se evalúa observando el tubo de colecta, para detectar partículas extrañas.

Pruebas microscópicas

Los indicadores para determinar son: viabilidad, motilidad, morfología, concentración espermática.

Motilidad masal. Es el movimiento en círculos del total de los espermatozoides de la muestra, la estimación por la onda de movimiento es el método más sencillo para calcular la motilidad en el semen fresco. La valoración de la motilidad con semen fresco (motilidad masal) o diluido y congelado-descongelado se mide la proporción de espermatozoides progresivos (motilidad progresiva).

Motilidad individual progresiva. El análisis de la movilidad es un parámetro esencial para tener una aproximación de la calidad espermática del semen evaluado, para ello se necesita un microscopio de contraste de fases con objetivos de 10X y 40X (aumentos), cabe destacar que la temperatura que debe tener el material es de 37°C. Se analiza el porcentaje de espermatozoides con un movimiento rectilíneo progresivo total de la muestra, siendo el mínimo valor aceptable del 50%. Muy bueno 80-100%; Bueno 60-79%; Regular 40-59%, Pobre menos del 40% (Gómez & Migliorisi, 2015).

Viabilidad. El protocolo más utilizado es donde se emplea técnicas de tinción vital permitiendo diferenciar espermatozoides vivos y muertos. La selectividad de la membrana plasmática es atribuida por su permeabilidad a los colorantes vitales; por lo cual se rigüe al

principio que aquellas células con membrana íntegra no pasan el colorante, mientras que si tiene daños entra el colorante (Gómez & Migliorisi, 2015).

Concentración espermática. La concentración indica la capacidad de los toros para producir esperma y también permite que un centro de IA controle la función de los testículos, se deben conocer las concentraciones para determinar el número de dosis de semen a congelar.

Se observa una correlación significativa entre la fertilidad del toro y el porcentaje de espermatozoides normales, variable importante en toros con baja concentración espermática, o dosis seminales diluidas sometidas a estrés por la congelación y descongelación, procesos en los cuales se disminuye el porcentaje de espermatozoides viables. En IA la fertilidad de un semental depende del porcentaje de espermatozoides normales que se empleen para inseminar (Hidalgo, Tamargo & Díez, 2005).

Tabla 1

Nomenclatura espermatoológica para diferenciar la información

Desviación referente a	Grado de la desviación escaso, medio, intenso	Completo
Volumen	Oligospermia (eyaculado de volumenreducido)	Aspermia (ausencia de eyaculado)
Concentración	Oligozoospermia (disminución de la concentración de espermatozoides)	Azoospermia (escasez de espermatozoides en el eyaculado)
Motilidad	Astenozoospermia (motilidad disminuida)	Akinozoospermia (todos los espermatozoides inmóviles) Necrozoospermia (todos los espermatozoides inmóviles y muertos en la prueba Supravital)
Morfología	Teratozoospermia	

Tinción eosina/nigrosina

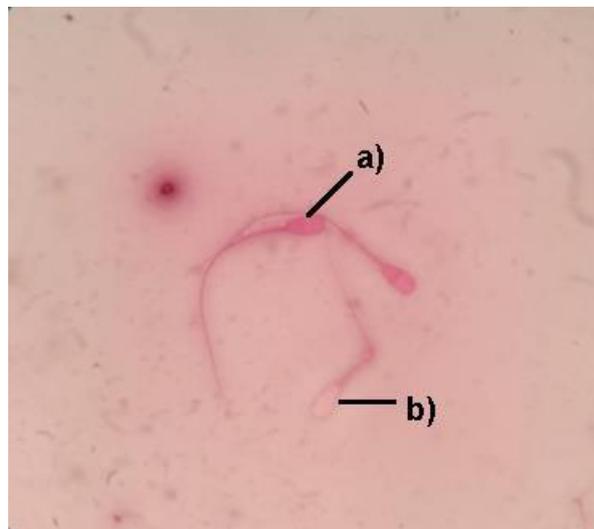
Esta tinción de eosina-nigrosina, se utiliza para observar la vitalidad de los espermatozoides, donde la eosina colorea la membrana plasmática dañada, mientras que las células vivas no absorben la mancha, la nigrosina crea un fondo oscuro, lo que simplifica la

evaluación, esta mancha no es adecuada para el análisis de espermatozoides congelados/descongelados que contienen glicerol (Minitube, 2021).

Todo espermatozoide móvil mantiene el potencial de membrana y obtiene la energía mediante el paso de ATP a ADP. Cuando el potencial de membrana se pierde, la eosina o colorante vital penetra dentro de las células y las tiñe, permitiendo de esta forma diferenciar los espermatozoides muertos de los vivos (figura 7) y consecuentemente la necrozoospermia verdadera de la falsa (González, 1989).

Figura 7

Tinción viabilidad eosina/nigrosina. A) espermatozoide muerto. B) espermatozoide vivo.



Nota: Archivo de la autora

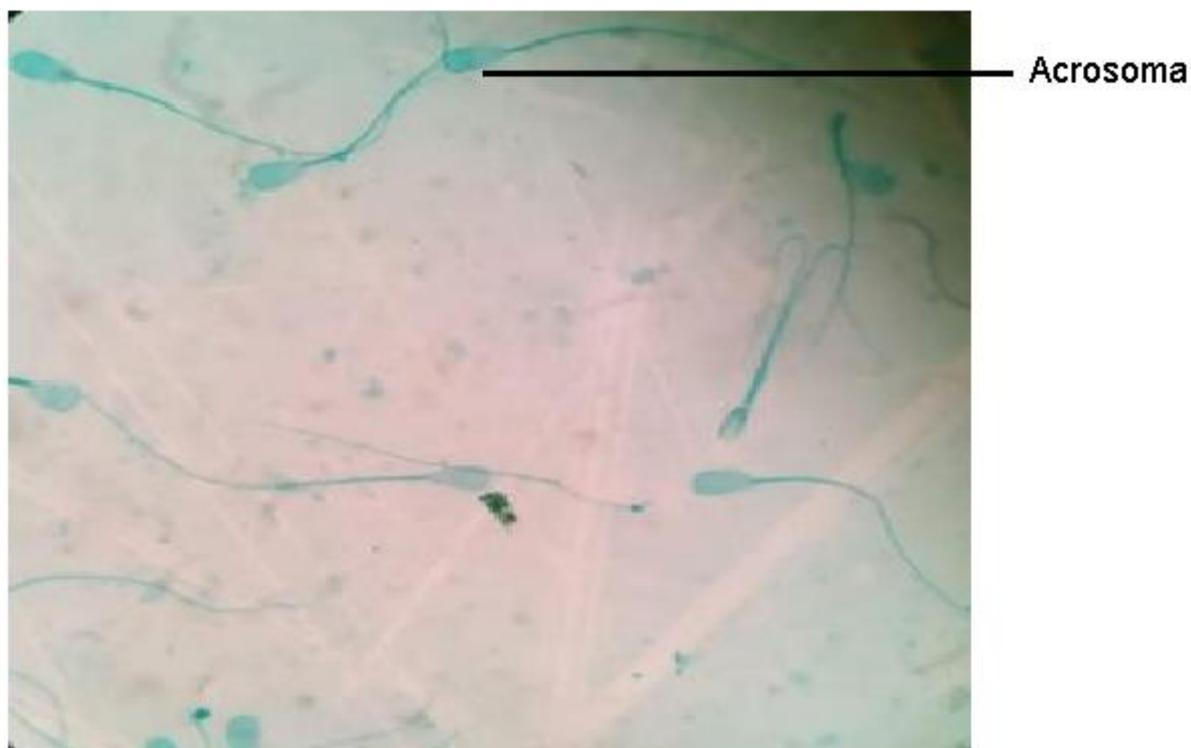
Tinción Spermac

La tinción Spermac es una prueba cualitativa, no automatizada, que facilita la distinción morfológicamente de los espermatozoides normales y anormales (figura 8), lo que permite visualizar claramente la cabeza, el acrosoma, la región ecuatorial, la pieza central y la cola, de modo que se puedan identificar las anomalías morfológicas de todas las regiones. La cabeza del espermatozoide aparece de color rojo, el acrosoma, la pieza central y la cola son verdes y la zona ecuatorial es verde pálido. La identificación de daños en la cabeza y el acrosoma, así como anomalías en la cola, se detecta fácilmente. La tinción

Spermac se puede utilizar para la teñir espermatozoides descongelado-congelado que contiene glicerol (Minitube, 2021).

Figura 8

Células espermáticas, teñidas con Spermac



Nota: El acrosoma es claramente visible. Archivo de la autora.

Tinción Farelly

Este es un kit de tinción para el diagnóstico de semen fresco y diluido de mamíferos y aves domésticas. El contraste de color azul-violeta permite una visualización diferencial de la cabeza, el acrosoma, el segmento ecuatorial, la pieza central y la cola de los espermatozoides (figura 9). Con esta tinción se observa una clara distinción entre morfológicamente intacto y espermatozoides anormales. La tinción de Farelly es adecuado para la tinción de espermatozoides diluidos, a menos que el diluyente contenga glicerol. Para semen congelado y descongelado se recomienda la tinción de Spermac.

Figura 9

Espermatozoides teñidos con Farrelly



Nota. Espermatozoides de toro de la raza Girolando, teñidos con Farrelly. Archivo de la autora.

Crioconservación del semen bovino

La criopreservación de semen es una técnica ampliamente utilizada para mantener y proteger la fertilidad en diversas ocasiones como tratamientos de infertilidad y malignidad (Ozkavukcu et al.,2008). La crioconservación de semen se utiliza para facilitar el almacenamiento y el transporte a largo plazo. Esto es de especial importancia para su uso en la IA de animales domésticos, incluidas las ovejas (Galarza et al., 2019).

Factores que determinan la criosupervivencia de los espermatozoides

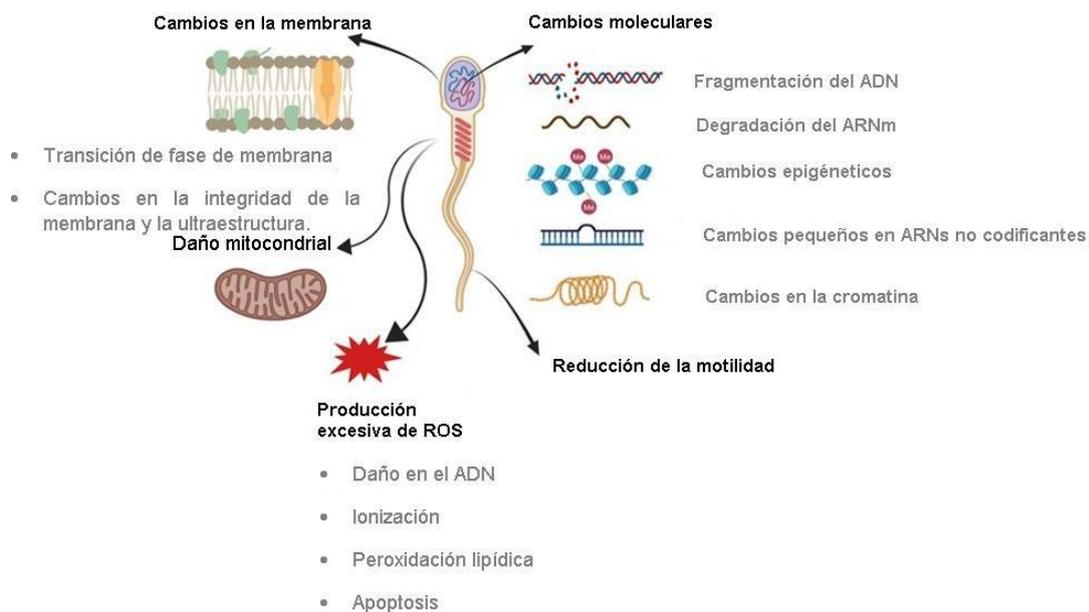
El desafío durante la crioconservación no es la capacidad de los espermatozoides para resistir el período de almacenamiento en nitrógeno líquido, sino cruzar la zona de temperatura intermedia entre $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Buranaamnuay et al., 2009). Las células deben pasar dos veces por estas temperaturas, primero durante el enfriamiento y luego durante la descongelación, lo que provoca efectos nocivos en la integridad de la membrana plasmática, el acrosoma y el núcleo del espermatozoide; función mitocondrial; y la motilidad de los espermatozoides (Medina-Robles, Duarte-Trujillo, & Cruz-Casallas,2020).

Durante el enfriamiento, las células están expuestas a muchos efectos dañinos que incluyen desacoplamiento metabólico, desequilibrio iónico, activación de proteasas, acidosis celular, privación de energía, transición de fase de membrana, desestabilización del citoesqueleto y producción de radicales libres o especies reactivas de oxígeno (ROS).

En cambio, en el proceso de congelación, los espermatozoides están predispuestos a los efectos perjudiciales de la formación de cristales de hielo, hiperosmolaridad, alteraciones en el volumen celular y desnaturalización de proteínas como se observa en la figura 10 (Uguret al., 2019).

Figura 10

Efectos perjudiciales de la congelación-descongelación en un espermatozoide



Nota. Se resumen los efectos morfológicos y fisiológicos de los procesos de congelación y descongelación en el espermatozoide de toro. Modificado de Ugur, et al., (2019).

Diluyentes seminales

Los diluyentes de semen se descubrieron y desarrollaron para proteger los espermatozoides de factores nocivos, como la congelación y el choque osmótico, el estrés oxidativo y el daño celular causado por los cristales de hielo. Los diluyentes de semen conservan el espermatozoide al estabilizar sus propiedades, incluida la morfología, la motilidad y la viabilidad del espermatozoide y la integridad de la membrana, del acrosoma y el ADN (Bustani & Baiee, 2021).

Diluyente comercial OptiXcell®

OptiXcell: Es el primer diluyente seminal sin proteína animal a base de liposomas sintetizados. Los liposomas reemplazaron a la yema de huevo de otros diluyentes, además, OptiXcell permite una conservación y preparación segura las dosis de semen fresco y congelado.

Ventajas

- Medios transparentes y sin partículas
 - Evaluación microscópica mejorada y CASA
 - Libre de proteínas animales
 - Evita el riesgo de transportar enfermedades como la influenza aviar por que se evitaproductos a base de huevo
 - Impide el transporte de microorganismos patógenos, toxinas y producción demetabolitos nocivos
 - Extensor de alta calidad
 - Larga vida útil
 - Soporta cambios de temperatura
 - El diluyente OptiXcell es óptimo para conservar los parámetros de movilidad del semen fresco
 - Bajo número de espermatozoides por pajuela presenta u alto rendimiento
- (MV, 2022)

Capítulo III: Ubicación, materiales y métodos

Lugar de estudio (área política-geográfica y ecológica)

Ubicación política

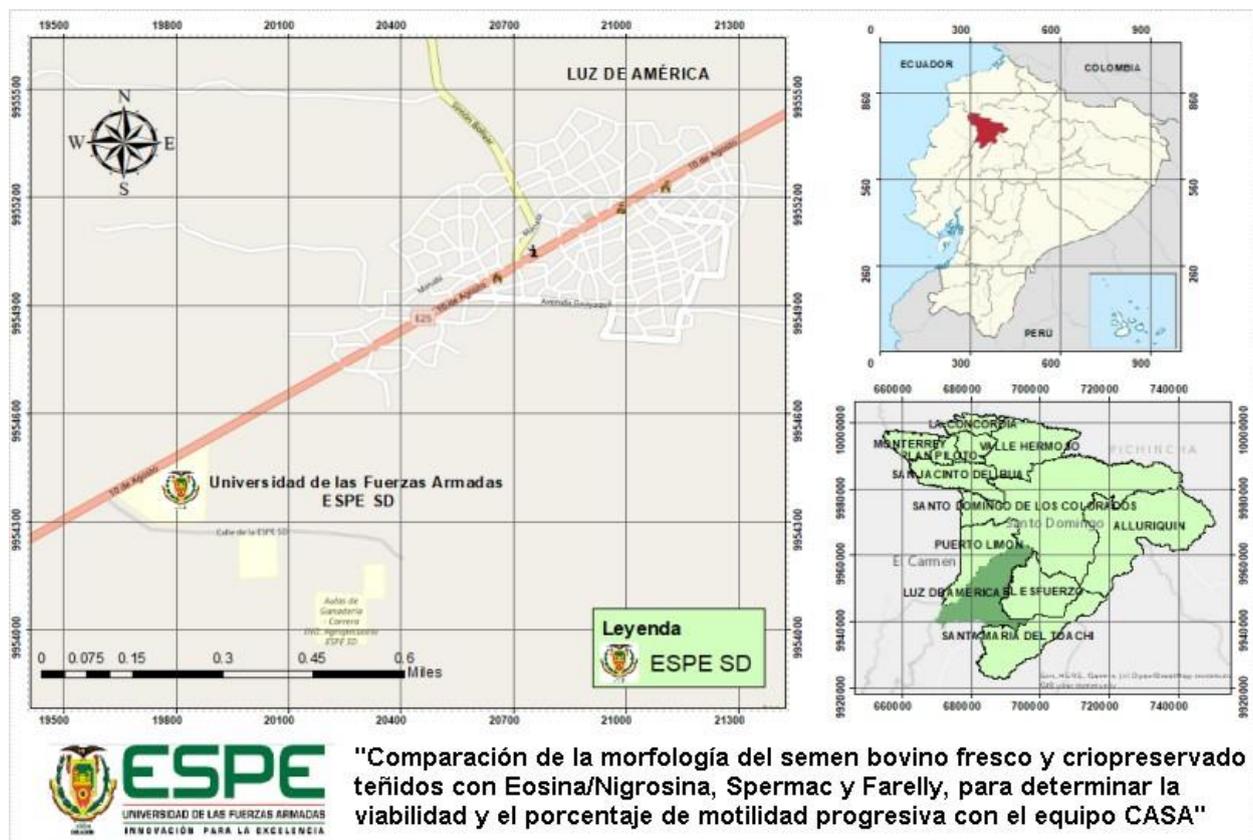
El estudio se realizó en la Hacienda “Zoila Luz” y la parte experimental en el laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal, ubicado en la vía Santo Domingo-Quevedo en el Km 24 margen izquierdo de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE Sede Santo Domingo. Provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, Cantón Santo Domingo, Parroquia Luz de América.

Ubicación geográfica

Geográficamente el sitio experimental se encuentra localizado en las coordenadas 00° 24' 44" Latitud Sur, 79° 18' 32" Longitud Oeste

Figura 11

Ubicación geográfica del estudio en investigación



Nota: Croquis del área de estudio. Modificado de Jacome y Zambrano (2021).

Ubicación ecológica

Zona de vida:	Bosque húmedo subtropical (b.h.S:T)
Altitud:	270 m.s.n.m
Temperatura:	23 – 25 °C
Precipitación:	2800 mm/año
Humedad relativa:	85 %
Heliofanía:	680 h luz/año
Suelos:	Franco limo arcillosos
Vegetación:	Predominan las pasturas, especies forestales, cultivos anuales y perennes

Equipos

- Microscopio de contraste de fase
- Platina térmica Slide Warmer XH-2001
- Micropipetas de 20-500 ul
- Baños María
- Incubador memmert
- Autoclave Tuttnaver
- Cámara de flujo laminar Haier
- Equipo CASA
- Equipo Ice Cube 14 M Minutibe
- Envasadora MPP1 Minutube
- Potenciometro PT-370 Boeco
- Estufa
- Fotómetro SDM1
- Termómetro digital

Insumos

- Cámaras lejas
- Fundas Zicploc
- Tanque de nitrógeno
- Micropuntas de micropipetas
- Cajas Petri
- Cubre y portaobjetos
- Nitrógeno líquido
- Gradillas
- Vagina artificial
- Frascos recolectores de semen graduados (Falcon)
- Papel absorbente
- Papel aluminio
- Pinzas anatómicas
- Jeringas 3 mL, 10 mL
- Guantes
- Probetas
- Vasos de precipitación
- Marcador indeleble
- Tijera
- Pajuelas de 0,5mL
- Tubos de ensayo

Reactivos

- Agua bidestilada
- Agua ultrapura
- Alcohol etílico (70%)
- Diluyente OptiXcell

- Diluyente de tinta
- Eosina
- Nigrosina
- Nitrógeno líquido
- Pack de tinción Farelly
- Pack de tinción Spermac
- Tinta negra
- Vitamina C como antioxidante (5 mM)

Biológicos

- Muestras de semen bovino de 2 toros de la raza Girolando de 5 años

Tabla 2

Razas de toro en estudio

Toro	Raza	Edad
Toro 1 (Donald)	Girolando 3/4	5 años
Toro 2 (Marcelo)	Girolando 5/8	5 años

Acondicionamiento del laboratorio

Se realizó la limpieza y desinfección de 24 a 48 horas antes previa a la congelación del semen bovino. Donde se aspiran las partículas de polvo, desinfecta con alcohol al 70% de los mesones y equipos. Esterilización del material de laboratorio (frascos de vidrios, probetas, vasos de precipitación, puntas de micropipetas, tubos de colecta, tubos de ensayo y portaobjetos) a 121°C por 15 a 20 min, seguido se conservó el material en la estufa a 70°C para su respectivo secado.

Diferenciación de los tratamientos

El etiquetado, impresión y esterilización de las pajuelas se realizó 24 horas antes del congelamiento del semen bovino, el etiquetado se realizó con la Envasadora MPP1 Minutube, donde se identificó el donador y los tratamientos fueron diferenciados empleando colores

distintivos permanentes. Para la esterilización de las pajuelas previo al envasado del semen, se colocaron los tratamientos en diferentes fundas ziploc y se dejó con UV en la cámara de flujo laminar por 12 horas.

Preparación de la solución seminal

Se empleó una disolución de 1:1, volumen total de eyaculado será igual al del diluyente estabilizado en baño María a 34°C.

Cálculo del número de dosis

$$N^{\circ} \text{dosis} = \frac{\text{Concentración } (10^6 \text{mL}^{-1} \text{espermatozoides}) * \text{Volumen (mL)}}{30 * 10^6 \text{ espermatozoides}}$$

Volumen del diluyente

$$\text{Vol. diluyente} = N^{\circ} \text{ dosis} * |\text{Vol. dosis(ml)} - \text{Vol. eyaculado(ml)}|$$

Dilución madre total

$$\text{Dilución madre total} = N^{\circ} \text{ de dosis totales (pajuelas)} * \frac{1}{2^n} = \left(\frac{1 \text{ mL de volumen}}{2 \text{ pajillas de 0,5 mL}} \right)$$

Preparación del diluyente OptiXcell®

El diluyente OptiXcell® se preparó de acuerdo con el protocolo de la casa comercial, para ello el volumen total de la dilución madre se realizó a partir del cálculo entre la concentración, volumen y N° de dosis de pajuelas requeridas de 0,5 mL.

Recolección del semen bovino

Para la extracción del semen bovino se emplearon vaginas artificiales para cada donador, las cuales previamente fueron esterilizadas 24 horas antes y conservadas a una temperatura de 36-37°C. Para la extracción se procedió a llenar las vaginas artificiales con agua a 45°C, junto a su adicción de la protección térmica, se trasladó la vagina para la extracción al montadero. Una vez obtenida la muestra espermática, se protegió de la luz solar para prevenir el shock térmico que daña a los espermatozoides.

Evaluación espermática pre-congelación

Una vez que la muestra espermática llegó al laboratorio (se registró la hora de llegada) se procedió a realizar la evaluación del semen, como se muestra a continuación:

Evaluación macroscópica

Temperatura y pH. Se midió el pH y la temperatura con el potenciómetro portátil que contiene también un medidor de temperatura. Para ello, previamente el sensor de temperatura se dejó en el baño María a 30°C

Volumen. Se midió el eyaculado directamente del tubo de colecta graduado.

Color. Se describió por observación cualitativa. Por ello, se determinó la coloración tomando en cuenta los parámetros observados en la tabla 3.

Tabla 3

Indicación según el color de la muestra seminal

Color	Indicación
Blanco cremoso	Semen normal
Amarillo intenso	Presencia de orina
Verdoso	Infección bacteriana
Rojizo	Presencia de sangre, puede indicar lesión en el aparato reproductor

Cuerpos extraños. Se describió por observación cualitativa, si había precipitado de cualquier partícula extraña al semen en el tubo de colecta, es positivo, caso contrario, negativo.

Evaluación microscópica

Concentración. La concentración espermática se determinó usando el fotómetro SDM1. Para ello, se tomó 25 µL de la muestra seminal fresca y se la colocó en la microcubeta impidiendo la formación de burbujas, para evitar lecturas erróneas. Se leyó (10^6 valores en espermatozoides/mL) por triplicado y se sacó un promedio. La concentración óptima para la congelación es 800×10^6 de espermatozoides/mL. La concentración de una pajuela de 0,5ml o 0,25ml varía de 20- 30 millones de espermatozoides totales por pajuela (Gómez & Migliorisi, 2007).

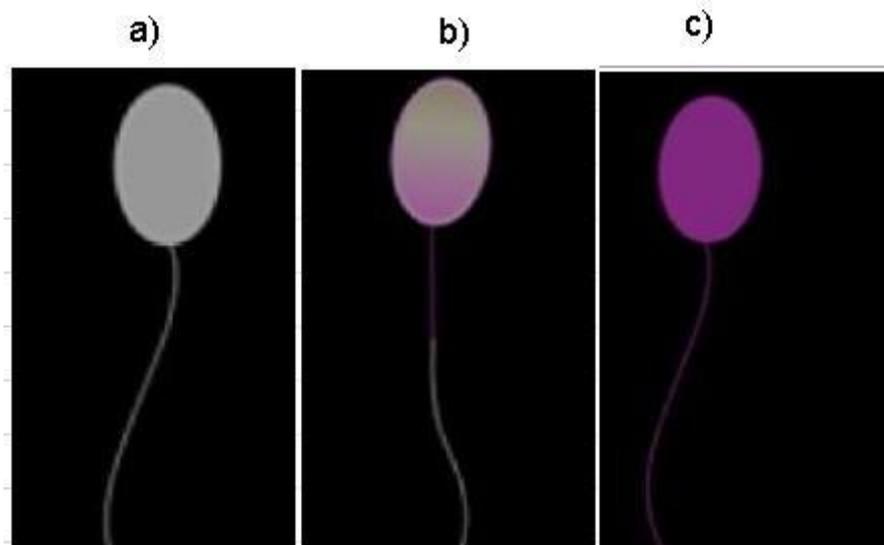
Evaluación de la motilidad. Se dejó la disolución de semen bovino a baño María a 37 °C, posteriormente se tomó 10 µL de la muestra y se colocó en una cámara Leja, seguido

se puso en la platina térmica (37°C) del microscopio del sistema CASA, se observó cuatro campos. Se midió a 0 min y a los 30 min. La clasificación de la motilidad es la siguiente: Muy bueno 80-100%; Bueno 60-79%; Regular 40-59%; Pésimo menos de 40%. El mínimo aceptable antes de la congelación es del 50%.

Viabilidad espermática por exclusión del colorante. Se colocó 20 μL de la muestra de semen diluida sobre un portaobjetos limpio a 37°C, desengrasado y precalentado, con 10 μL de eosina y 10 μL de nigrosina, posteriormente, se homogeneizó y se realizó el frotis de la muestra con la ayuda de un segundo portaobjetos de borde liso y precalentado. El tiempo de coloración hasta que se produce la desecación no debe exceder de 25 segundos. Cabe mencionar que, para obtener el porcentaje de espermatozoides vivos se contabilizó 200 espermatozoides, se consideró a los espermatozoides vivos a los de color blanco y los ligeramente teñidos, (a) y (b) ver figura 12.

Figura 12

Protocolo de recopilación de datos para expresar la viabilidad de los espermatozoides



Nota. Porcentaje de viabilidad espermática por eosina/nigrosina. Principio células muertas absorben la eosina. A) espermatozoide vivo. B) espermatozoide en proceso de muerte. C) espermatozoide muerto

Análisis de características morfológicas

Realización de frotis.

Se colocó 20µl del semen diluido sobre un portaobjetos limpio y desengrasado con alcohol al 70°C posteriormente se secó, se realizó el frotis con un segundo portaobjetos con borde liso de manera firme y pareja. Se dejó secar el frotis en una platina térmica, este proceso se realizó por duplicado.

Tinción Farelly.

Se empleó el protocolo de la casa comercial; donde se tomó 500µL del fijador A y se colocó sobre todo el frotis por 1 min, seguido se adiciono 500µL del colorante B por 1 min, pasado este tiempo se aclaró con agua destilada y se secó. Se agregó 500 µL del colorante C por 1 min, se lavó y se secó. Finalmente, se incubó la muestra teñida en una platina térmica (37°C) por 12 horas. Seguido el portaobjetos(frotis teñido) se analizó en un microscopio óptico a un aumento 100X con aceite de inmersión. Se contabilizaron 200 espermatozoides totales (anormales y normales), para determinar el porcentaje de anomalías siguiendo el protocolo de Busch, Waberski & Escobar, (2010) (tabla 5).

La muestra se observó en un microscopio óptico a un aumento 100X con aceite de inmersión. Para determinar el porcentaje de anomalías en espermatozoides se contabilizó 200 espermatozoides totales (anormales y normales), siguiendo el protocolo de Busch, Waberski & Escobar, (2010) (tabla 5).

Tinción Spermac

Se adiciono 500 µL de fijador sobre el frotis y se dejó reposar por 5 min, seguido se eliminó el exceso del fijador y se incubó en la placa térmica a 35°C por 15 min, posteriormente se aclaró con agua destilada, se añadió 500 µL del colorante A por 1 min y se lavó, se añadió el 500 µL colorante B por 1 min y se lavó, se añadió 500 µL colorante C por 1 min y se aclaró, seguido se dejó secar en la platina térmica por 12 horas a 37°C. Finalmente, se incubó la muestra teñida en una platina térmica (37°C) por 12 horas. La muestra se observó en un microscopio óptico a un aumento de 100X con aceite de inmersión. Para determinar el porcentaje de anomalías en espermatozoides se contabilizó 200 espermatozoides totales

(anormales y normales), siguiendo el protocolo de Busch, Waberski & Escobar, (2010) (tabla5).

Se evaluó:

- Porcentaje de normalidades y anormalidades
- Malformaciones primarias y secundarias
- El tipo de daño que presenta el espermatozoide bovino

Tabla 4

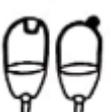
Parámetros mínimos previos a la congelación

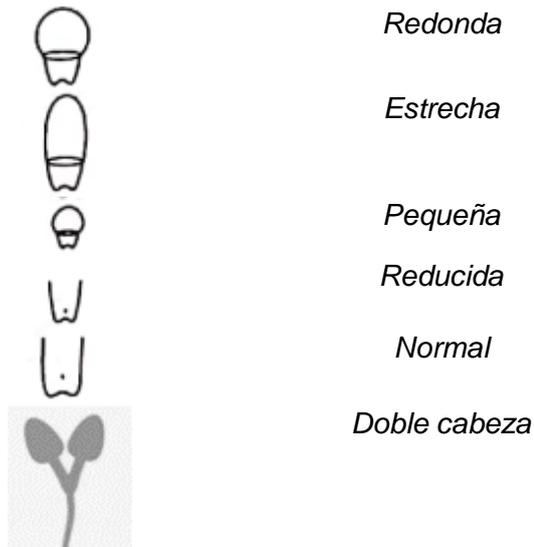
Uso	Motilidad	Motilidad progresiva	Concentración (esp/mm ³)	Espermatozoides normales	Viabilidad
Congelación	70%	70%	750.000	70%	70 %

Nota. Parámetro mínimos pre-congelación tomado de Gómez & Migliorisi, (2007).

Tabla 5

Protocolo de recopilación de datos para expresar la morfología de los espermatozoides

<i>Especie animal:</i>	
Alteraciones casquete cefálico	Porcentaje
	<i>Acrosoma normal</i>
	<i>Acrosoma en disolución</i>
	<i>Acrosoma disuelto</i>
	<i>Granuloma acrosómico persistente</i>
	<i>Deformado</i>
Alteraciones de la cabeza	Porcentaje:
	<i>Normal</i>



Redonda

Estrecha

Pequeña

Reducida

Normal

Doble cabeza

Alteraciones del cuello

Porcentaje:

Fractura de cuello



Células plasmáticas



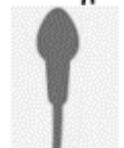
Apéndice caudal paraxial



Apéndice caudal retroaxial



Cuello grueso



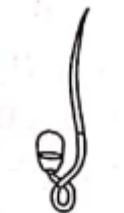
Cuello fino

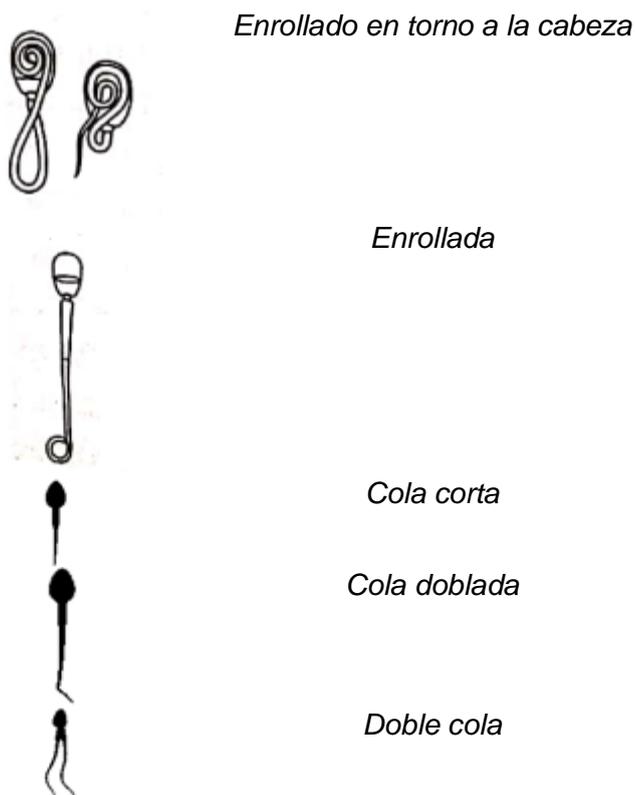


Alteraciones de las piezas principal y terminal

Porcentaje:

Forma de lazo





Nota. Examen morfológico control de calidad del espermatozoides conservado protocolo de Busch, Waberski & Escobar, (2010).

Envasado de pajuelas y congelamiento

Se llenó las pajuelas de 0,50 mL con semen diluido, para ello se tomó en cuenta el número total de dosis calculadas anteriormente y se dividió para dos, luego se colocó las pajuelas requeridas para cada tratamiento en la envasadora y selladora MPP1. Seguido se llevó las pajuelas al Ice Cube para su congelación. Además, se programó la curva para el congelamiento del semen que se va a utilizar (tabla 6) y se esperó a que se equilibrara a 20°C. Una vez concluido el proceso se trasladó las pajuelas, de manera inmediata al termo de nitrógeno líquido (-196°C) para su criopreservación.

Tabla 6*Curva de congelamiento lento*

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

Nota. En el presente estudio se empleó una curva de congelamiento lento, establecido en el protocolo de laboratorio de Basurto (2022).

Post-descongelación del semen bovino

Se tomó al azar dos pajuelas de cada tratamiento dentro del termo de nitrógeno, donde se elevó solo hasta la boca del termo para evitar el shock térmico, seguido se colocó la pajuela a baño María a 37°C por 1 min, seguido se colocó dentro de un tubo de ensayo y se colocó 10 µL de la muestra en una cámara Leja para su posterior evaluación con el sistema CASA (Evaluación de la motilidad).

Evaluación paramétrica post-descongelación

Para la estimación de calidad espermática post-descongelación se procedió a descongelar 2 pajuelas por tratamiento totalmente al azar, donde se evaluó motilidad, y motilidad individual progresiva a los 0 y 30 min, posteriormente se evaluó la viabilidad, y morfología espermática.

Diseño experimental

Factores del experimento

Tabla 7

Variables independientes y niveles empleados en el estudio del semen bovino de reproductores de cruce Girolando de la hacienda Zoila Luz Km.24.

Factor	Niveles
Semen bovino	S1= Toro 1
	S2= Toro 2
Tratamiento	T1= Pre-congelación
	T2=Post-descongelación

Los tratamientos son el resultado de la combinación de los niveles de las variables independientes en estudio, los cuales se presentan en la tabla 8.

Tabla 8

Tratamientos de análisis en el estudio del semen bovino de reproductores de cruce Girolando en la hacienda Zoila Luz km.24.

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

Tipo de diseño

Para el análisis estadístico se usó un DCA dispuesto en arreglo factorial 2 x 2 (2 donadores (semen) por tipo de semen (Precongelación -post-descongelación).

Repeticiones

Cada tratamiento tuvo 4 repeticiones

Características de las unidades experimentales

El estudio comprende 16 unidades experimentales, siendo pajuelas de diferente donador y pre-congelación y post-descongelación, las pajuelas se mantuvieron en congelación a -196°C .

Parámetros dependientes

- Motilidad total 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 en el espermatozoide %

Capítulo IV: Resultados y Discusión

Se empleó un DCA mediante un modelo lineal generalizado multivariado para las variables dependientes de la evaluación seminal, los datos obtenidos de cada toro y entre los toros fueron analizados antes y después de la criopreservación espermática. Los resultados fueron presentados empleando la media y la desviación estándar de cada tratamiento estudiado. La normalidad se determinó con la prueba Shapiro-Wilk ($n < 50$). Para la comparación de los tratamientos se aplicó Tukey, con un nivel de significancia $p < 0,05$. Todos los análisis fueron realizados usando los programas InfoStat versión 2008 y IBM SPSS Statistics versión 28.0.1.1.

Evaluación macroscópica pre-congelación

Previo a la preparación de las pajuelas para la congelación, se realizó un análisis inicial del semen bovino para la verificación de los rangos normales. Las variables de estudio fueron temperatura, pH, volumen y concentración. Los sementales 1 y 2 no presentaron diferencia significativa en temperatura y pH (tabla 9), en el protocolo de Gómez & Migliorisi, (2015), menciona que el pH adecuado de los reproductores es 6,2-6,8, tanto el toro 1 y toro 2 están dentro del parámetro.

Tabla 9

Promedio de variables macroscópicas del eyaculado de los toros de la raza Girolando en la hacienda Zoila Luz km 24

Características del semen	Toro 1	Toro 2
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 (-)

Nota. Los datos corresponden a Media ± Desv. Est. (n=3). a, b, c los datos con la misma letra son significativamente similares ($p > 0,05$). Fuente. Elaboración propia mediante InfoStat versión 2008.

El volumen mínimo de eyaculado para toros mayores a 2 años es de 4 mL, en este caso existe diferencia significativa en el toro 2 al presentar un mayor volumen de eyaculado ($7,67 \pm 1,86$ mL), en comparación con el volumen de eyaculado del toro 1 ($4,73 \pm 1,04$) el cual entra dentro del rango establecido, en cambio el semental 2 cumple con este requisito mínimo. Según Hafez (2002) el volumen de eyaculado varía entre los toros, por factores como: raza, condición del animal, alimentación, edad, manejo del operario y número de extracciones. Cabe mencionar que el tiempo de descanso entre los toros fue de 2 días, lo cual estaría influenciado en la cantidad de volumen del toro 1.

Por otro lado, se analizó el color promedio de las muestras seminales, donde predominó el amarillo blanquecino, estos resultados obtenidos no son consistentes con los presentados por los autores Jacome y Zambrano (2021) quienes analizaron a los mismos toros, el color promedio que predominó fue el blanco cremoso. Asimismo, Viotti, (2011) menciona que el color del semen bovino es blanco marfil, o grisáceo y se considera normal, cabe destacar que la muestra de semen bovino se vuelve amarilla cuando se mezcla con orina. Corneo (1940) demostró que el color amarillo del semen bovino se origina por una marcada producción de un lipocromo ubicado en el conducto deferente, cuya presencia varía de acuerdo con la raza, individuo y alimentación, asimismo mencionó que el color amarillo en la muestra seminal no compromete la fertilidad del semental.

Evaluación microscópica pre-congelación y post-descongelación

De la concentración espermática depende el número de pajuelas antes de la congelación por lo cual no hay una medida post-descongelación (tabla 10), El toro 1 presentó mayor concentración espermática ($1168 \pm 467,34 \times 10^6$ esp./mL) que se ubica en el rango muy bueno, en cambio el toro 2 está dentro de lo regular, en el estudio de Jacome y Zambrano (2021) sobre los mismos sementales la concentración promedio fue de 988×10^6 /mL para el toro 1 y 677×10^6 /ml para el toro 2, en comparación con los presentes resultados hubo una disminución de la mitad en la concentración espermática en el toro 2, estos resultados estarían influenciados por factores como la alimentación, el acondicionamiento del animal, entre otros.

Tabla 10

Promedio de la concentración espermática de los toros de la raza Girolando en la hacienda Zoila Luz km 24.

Toro	Concentración (10⁶ esp./mL)
Toro 1	1168±467,34 ^a
Toro 2	312±93,07 ^b

Nota. Los datos corresponden a Media ± Desv. Est. (n=3). a, b, c los datos con la misma letra son significativamente similares ($p > 0,05$). Fuente. Elaboración propia mediante InfoStat versión 2008.

Las muestras de espermatozoides frescos presentaron mejores resultados ($p < 0,05$) en los parámetros evaluados de motilidad total y motilidad progresiva, viabilidad espermática (Tinción con eosina/ nigrosina), y Morfología (anormalidades con Tinción Farelly y Spermac) comparado con los resultados post-descongelación (tabla 11).

Tabla 11

Parámetros de calidad espermática en muestras colectadas por vagina artificial de 2 toros Girolando 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

Nota. Los datos corresponden a Media ± Desv. a, b, c los datos con la misma letra son significativamente similares ($p > 0,05$). Fuente. Elaboración propia mediante InfoStat versión 2008.

En un estudio realizado por Ribeiro y colaboradores (2014) mostraron que los parámetros de calidad seminal bovina obtenida de la cola del epidídimo antes y después de la congelación son superiores, donde se obtuvo una la motilidad media de espermatozoides frescos de 74%, después de la congelación con los métodos convencional y automatizado

presentó un 29% y 25%, respectivamente. Estos resultados son similares con los obtenidos en el presente estudio, donde de un 75% de motilidad baja a 29,69 % después de la congelación.

Muiño, (2008) indica que el uso de sistemas CASA presenta algunos inconvenientes, como el uso, optimización de los equipos y análisis empleados, lo cual provoca que los resultados para los mismos parámetros sean muy dispares. Lo que concuerda con el estudio realizado por Jacome y Zambrano (2021) sobre los mismos toros Girolando al obtener una motilidad total de 71,64% post descongelación con diluyente Andromed y un tratamiento de 2 mg de metil- β -ciclodextrina, asimismo en este estudio los autores no encontraron diferencia significativa pre y post descongelación en la morfología, podemos destacar que el diluyente y los tratamientos fueron distintos lo que justificaría estas diferencias.

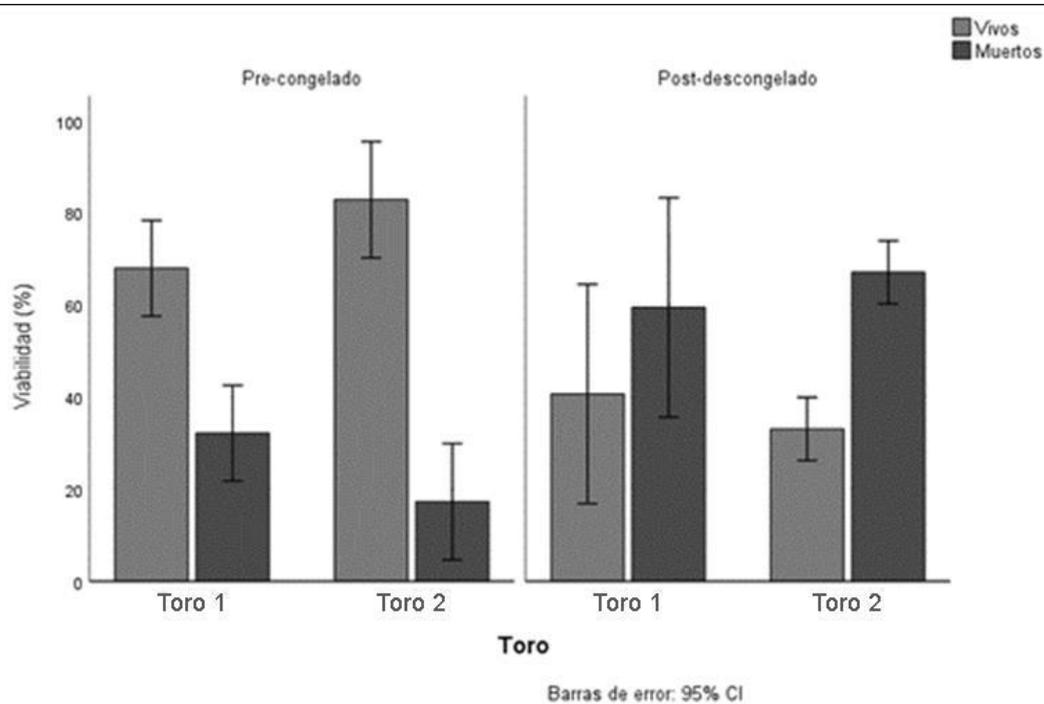
Viabilidad espermática

Las muestras de espermatozoides frescos ($75,31 \pm 10,41$) obtuvieron resultados superiores ($p < 0,05$) en la viabilidad espermática (figura 13) comparados con los espermatozoides post-descongelados ($38 \pm 11,21$), los presentes resultados indican que hubo una disminución de menos del 60% de células viables en cuanto al método de criopreservación.

Figura 13

Viabilidad espermática pre-congelación y post-descongelación mediante tinción

Eosina/Nigrosina en toros reproductores Girolando



Nota. Elaboración propia mediante IBM SPSS Statistics versión 28.0.1.1.

Los reproductores 1 y 2 presentaron diferencias significativas, donde el toro 2 presenta un mayor porcentaje de viabilidad ($82,75 \pm 7,92$) frente al toro 1, estando dentro del 70% aceptable, en cambio existe una considerable disminución de la vitalidad post-descongelamiento de un $40,63 \pm 14,95$ y $33 \pm 4,30$ para toro 1 y toro 2, respectivamente.

Como se observa existe una marcada disminución de la viabilidad entre la pre-congelación y post-descongelación, esto se puede explicar según el tipo de congelamiento que se esté llevando a cabo, en el presente estudio se empleó una curva lenta, provocando una deshidratación celular progresiva lo que aumenta los solutos intracelulares impidiendo la formación de cristales intracelulares, en cambio en el congelamiento rápido, no hay suficiente tiempo para que se produzca la deshidratación y el agua que queda forma pequeños microcristales que no dañan la célula (Amann y Pickett, 1987).

Entonces la disminución de la viabilidad podría estar dada por la descongelación rápida llevada a cabo, puesto que en la descongelación rápida impide el daño por disolución,

pero se produce el daño mecánico por cristales de hielo, en cambio en la descongelación lenta ocurre un daño por disolución, por ello el congelamiento y descongelamiento va a depender de la célula, y a su tolerancia por toxicidad por efecto de la disolución y al daño por cristales de hielo(Hafez,2002). Asimismo, Gürler y colaboradores (2016) demostraron que en el proceso crioconservación, los cambios de temperatura y el estrés osmótico deterioran la viabilidad de los espermatozoides bovinos debido a la lesión de la membrana plasmática.

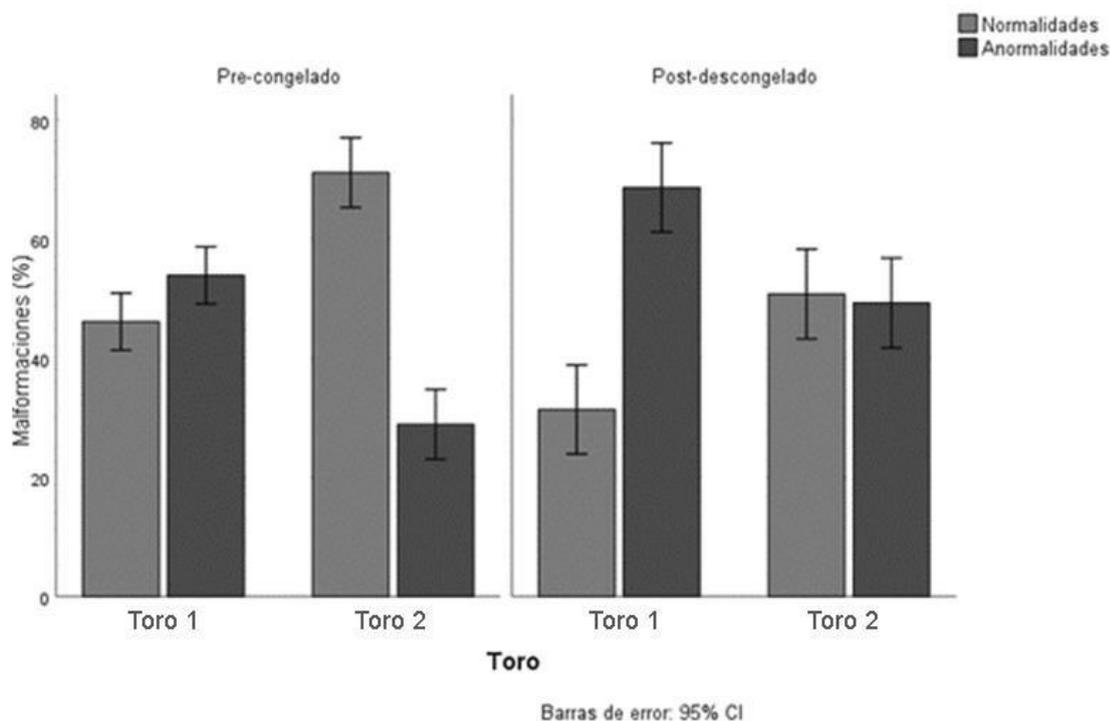
La relación entre la viabilidad espermática y la capacidad fecundante de las pajuelas seminales presenta discrepancias entre autores. Estudios realizados mediante citometría de flujo de Christensen y col. (2005) mencionan una correlación elevada entre la capacidad fecundante y la viabilidad espermática de las pajuelas mientras se respeta la concentración mínima de espermatozoides, en contraste Graham, (2001) menciona que la viabilidad está pobremente relacionada con la fertilidad se debe considerar más parámetros (motilidad, tasas de penetración al ovocito).

Morfología espermática

Se observó diferencia significativa, en las normalidades y anormalidades (figura 14) en el pre-congelado y post-descongelado en los toros 1 y 2, asimismo se aprecia que el toro 2 tiene mayor normalidad antes del congelado ($71,13 \pm 3,68$) frente al toro 1 ($46,13 \pm 3,01$). También se observa una disminución en las normalidades pre y post-congelado. Asimismo, no se halló diferencia significativa entre las curvas de congelamiento con respecto a la normalidades y anormalidades. Rodríguez.H y col. (1997) mencionan que una malformación primaria es la que afecta la integridad del acrosoma, una indicación de que está intacto, es esencial para la fertilización y la posterior penetración de los espermatozoides en la zona pelúcida.

Figura 14

Porcentaje de normalidades y anomalías pre-congelado y post-congelado de toros reproductores Girolando.



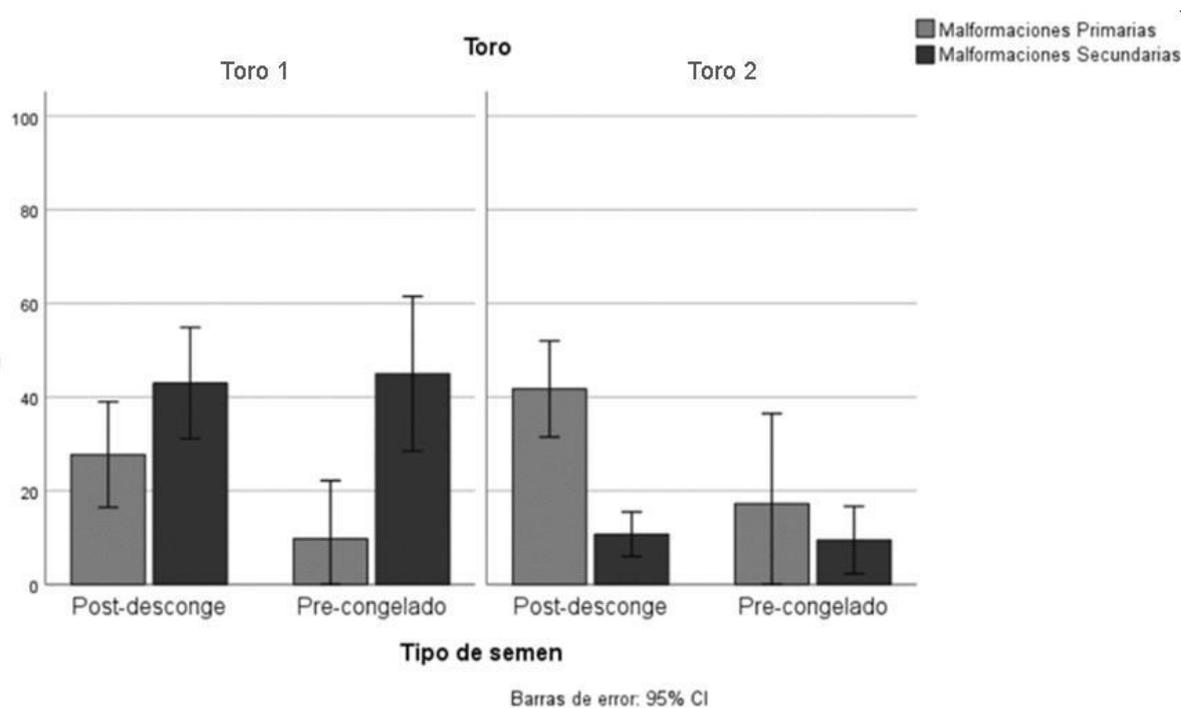
Nota. Elaboración propia mediante IBM SPSS Statistics versión 28.0.1.1.

El mayor porcentaje de malformación primarias se observa en el toro 2 (Farely $31 \pm 16,63$ y Spermac $28 \pm 17,66$), en cambio el mayor porcentaje de malformaciones secundarias corresponde al toro 2 (Farely $37,50 \pm 3,51$ y Spermac $10,50 \pm 3,11$). Se ha aceptado generalmente que el semen de 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). Dado que la espermatogénesis en los toros requiere casi 61 días, seguida de la maduración del epidídimo durante aproximadamente 11 días (Bart & Oko, 1989). La mayoría de las anomalías espermáticas reflejan alteraciones previas (Bart & Oko, 1989). En ese sentido, la morfología espermática refleja en gran medida el estado de salud de los túbulos seminíferos y, en menor medida, de los epidídimos, lo que concuerda con los resultados puesto que el tiempo de descanso de

las extracciones seminales fueron de 2 días. Muiño (2008) menciona que las malformaciones primarias comprometen la fertilidad directamente.

Figura 15

Porcentaje de malformaciones primarias y secundarias de toros reproductores Girolando mediante tinción Farelly y Spermac.



Nota. Elaboración propia mediante IBM SPSS Statistics versión 28.0.1.1.

En un estudio realizado por Menon et al., (2011) demostraron que no había diferencia significativa en los espermatozoides morfológicamente normales o anormales, de acuerdo con la edad, raza, y circunferencia escrotal, pero destacaron que el defecto en la cola era más frecuente en los toros Angus y Hereford en comparación con otras razas.

Como se observa en la tabla 12, se encontró diferencia significativa en las alteraciones del casquete cefálico siendo el toro 1 ($4,50 \pm 6,61$) el que presentó menor porcentaje frente al toro 2 ($11,75 \pm 11$) y en las alteraciones de las piezas principal y terminal siendo toro 1 ($40,50 \pm 12,66$) el que presentó mayores incidencias frente al toro 2 ($6,25 \pm 2,63$), pre-congelación. Los espermatozoides inmóviles o con una motilidad anormal generalmente tienen anomalías en las piezas principales y terminales como resultado de defectos en la espermatogénesis (Bart & Oko, 1989). En consecuencia, tales anomalías

generalmente se asocian con subfertilidad en el toro. La anomalía del reflejo de la pieza intermedia distal, un defecto que se desarrolla en el epidídimo, se parece a una cola en forma de bucle con una gotita encerrada dentro del bucle. Un alto porcentaje de espermatozoides con gotas citoplasmáticas proximales se considera un defecto de la espermatogénesis que da como resultado una alteración de la fertilidad (Bart & Oko, 1989).

Las anomalías en el semen bovino, como los plegamientos de la pieza intermedia y las colas enrolladas si son abundantes en el eyaculado pueden llegar afectar la fertilidad del toro, con los resultados de la tabla 12 y Tabla 13, se explica cómo hay una disminución en cuanto a la motilidad y motilidad progresiva comprometiendo el proceso del espermatozoide para llegar al ovocito.

Tabla 12

Alteraciones específicas del espermatozoide pre-congelación

Toros	Alteraciones casquete cefálico (%)	Alteraciones de la cabeza (%)	Alteraciones del cuello (%)	Alteraciones de las piezas principal y terminal (%)
toro 1	4,50±6,61 ^a	1±1,41 ^a	8,75±4,11 ^a	40,50±12,66 ^a
toro 2	11,75±11 ^b	2,25±1,26 ^a	7±2,16 ^a	6,25±2,63 ^b

Nota: Datos obtenidos empleando el protocolo de Busch, Waberski & Escobar, (2010).

Como se aprecia en la tabla 13. Se encontró diferencia significativa post-descongelación en las alteraciones del casquete cefálico y las alteraciones de las piezas principal y terminal, siendo el toro 2 mayores incidencias en el primero y el toro 1 presentó mayores incidencias en el segundo, respectivamente.

Tabla 13

Alteraciones específicas del espermatozoide post-congelación

Toros	Alteraciones casquete cefálico (%)	Alteraciones de la cabeza (%)	Alteraciones del cuello (%)	Alteraciones de las piezas principal y terminal (%)
Toro 1	18,25±6,24 ^a	4,50±1,91 ^a	7,50±2,38 ^a	41,25±8,85 ^a
Toro 2	32,25±5,68 ^b	5±1,41 ^a	6±2,58 ^a	9,75±2,50 ^b

Nota: Datos obtenidos empleando el protocolo de Busch, Waberski & Escobar, (2010).

Las alteraciones del casquete cefálico y las alteraciones de las piezas principal y terminal pre-congelación y post-descongelación mostraron diferencia significativa, observándose un aumento de estos después de la congelación.

Tabla 14

Porcentaje del tipo de anomalías pre-congelación y post-congelación

Tratamiento	Alteraciones casquete cefálico (%)	Alteraciones de la cabeza (%)	Alteraciones del cuello (%)	Alteraciones de las piezas principal y terminal (%)
Pre-congelación	8,13±9,25 ^a	1,63±1,41 ^a	7,88±3,18 ^a	23,38±20,17 ^a
Post-descongelación	25,25±9,30 ^b	4,75±1,58 ^b	6,75±2,43 ^a	25,50±17,88 ^a

Nota. Datos obtenidos empleando el protocolo de Busch, Waberski & Escobar, (2010).

Motilidad

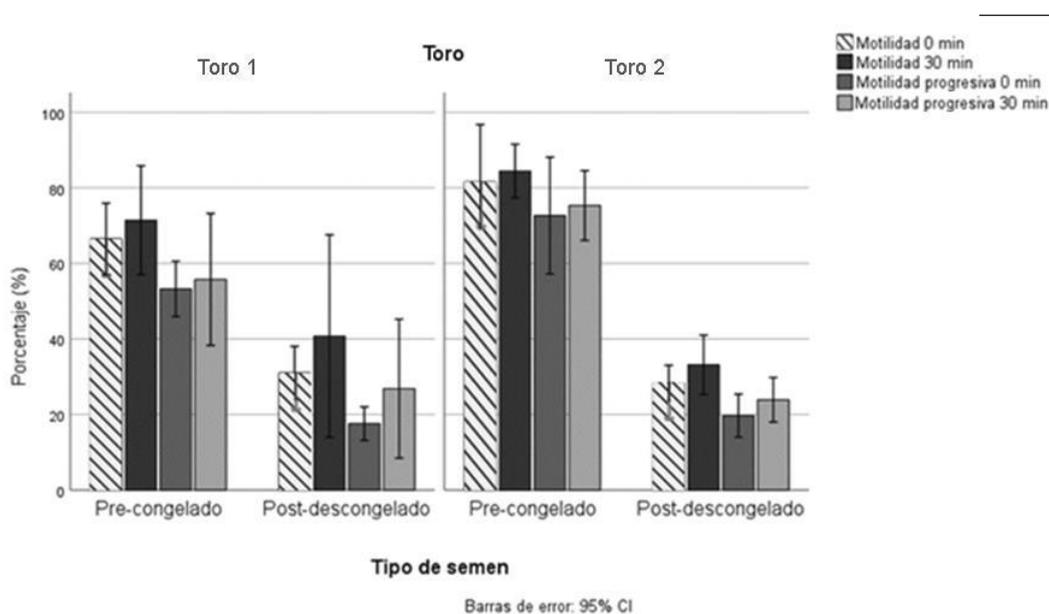
Los espermatozoides previo a la congelación a los 0 min la motilidad (figura 15) total fue de (74,02±10,92 %) y progresiva (62,96±12,54%) es menor en comparación a los 30 min(77,95 ± 9,60% y 65,55±13,26 %, respectivamente). Se observó una considerable disminución en la motilidad total (77,95±9,60) y progresiva(65,55±13,26) tanto pre-congelado

y post descongelado ($38,39 \pm 12,41$ y $26,37 \pm 8,20$) donde el toro 2 presenta una mayor motilidad total y progresiva previo a la congelación frente al toro 1.

Gloria y Col (2011) mencionan que existe una correlación positiva entre la motilidad total y progresiva del semen eyaculado y la actividad mitocondrial. Asimismo, en un estudio realizado por Lewis & Aitken (2005) determinó que la congelación-descongelación afecta negativamente la integridad del ADN, haciéndolo vulnerable y susceptible a modificaciones moleculares y epigenéticas, que afectan el desarrollo del embrión. McCarthy y col. (2005) demostraron que las especies reactivas de oxígeno (ERO) producían un daño en los espermatozoides del *Macaco rhesus* puesto que a medida que aumentaba la concentración de ERO, disminuye la motilidad y aumentaba la peroxidación de lípidos, asimismo el daño del ADN podría estar relacionado a los mecanismos que ocurren en la criopreservación; como roturas en la doble cadena.

Figura 16

Motilidad espermática total y progresiva a los 0 y 30 min pre y post-congelación en toros Girolando mediante equipo CASA.



Nota. Elaboración propia mediante IBM SPSS Statistics versión 28.0.1.1.

Por último, la criopreservación de semen está influenciada por varios factores y se sabe que daña los espermatozoides de varias maneras. Dichos daños conducen a una disminución en las tasas de viabilidad, motilidad y morfología espermática. Por tanto, no sorprende que en el presente estudio los valores de los parámetros espermáticos después de la descongelación fueran más bajos que el análisis en espermatozoides frescos.

Capítulo V: Conclusiones

Se concluye:

- 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 1 y 2 necesitan un acondicionamiento debido a la baja concentración espermática del toro 2 y por el porcentaje de anomalías encontradas previo a la congelación en el toro 1.
- Las anomalías más frecuentes observadas en el semen bovino del toro 1 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.
- El espermatozoide de la muestra pre-congelación obtuvo mejores resultados en todos los parámetros de calidad espermática 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 $20\text{ a }4^{\circ}\text{C}$, seguido de $5\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ de $4\text{ a }-10^{\circ}\text{C}$, seguido de $40\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ de $-10\text{ a }-100^{\circ}\text{C}$, seguido de $20\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ de $-100\text{ a }-140^{\circ}\text{C}$

Capítulo VI: Recomendaciones

Se recomienda:

- Un protocolo general para evaluar estado físico, la integridad del tracto 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.

Capítulo VII: Bibliografía

- Aitken, R. J. (1995). Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reproduction, Fertility and Development*, 7(4), 659-668.
- Amann, R. P., & Pickett, B. W. (1987). Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Journal of equine veterinary science*, 7(3), 145-173.
- Baracaldo, M. I., Barth, A. D., & Bertrand, W. (2006). Steps for freezing bovine semen: from semen collection to the liquid nitrogen tank. IVIS.
- Baust, J. G., Gao, D., & Baust, J. M. (2009). Cryopreservation: An emerging paradigm change. *Organogenesis*, 5(3), 90-96.
- Busch, W., Waberski, D., & Escobar, J. E. (2010). Manual de inseminación artificial de los animales domésticos y de explotación zootécnica (No. 636.08245 B8M3).
- Bustani, G. S., & Baiee, F. H. (2021). Semen extenders: An evaluative overview of preservative mechanisms of semen and semen extenders. *Veterinary World*, 14(5), 1220.
- Christensen, P., Boelling, D., Pedersen, K. M., Korsgaard, I. R., & Jensen, J. (2005). Relationship between sperm viability as determined by flow cytometry and nonreturn rate of dairy bulls. *Journal of andrology*, 26(1), 98-106.
- Contreras, L. (2017). Inseminación Artificial en Bovinos: Problemáticas y Actualidad. *Revista electrónica: Engormix*.
- Corneo, G. (1940). The so-called "yellow semen" in the bull. *Fecondazione artificiale degli animali domestici*, 2(6, 7), 4-19.
- Crespo, C. C. (2020). EVALUACIÓN DE SEMEN BOVINO UTILIZANDO MEDIOS COMERCIALES DE CRIOPRESERVACIÓN, PROVINCIA DE MORONA SANTIAGO, ECUADOR (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Córdoba).
- Deutscher, G. H. (1980). G80-536 Reproductive Trace Anatomy and Physiology of the Bull.

Gallardo, J., & Vargas, C. (2015). *Evaluación de tres diluyentes para criopreservar semen bovino de toros cruce Sahiwal (Bos taurus) en el trópico húmedo* (Doctoral dissertation, Tesis de Ingeniero Agropecuario. Santo Domingo de los Tsáchilas, Ecuador: Univ. de las Fuerzas Armadas).

Galarza, D. A., López-Sebastián, A., Woelders, H., Blesbois, E., & Santiago-Moreno, J. (2019). Two-step accelerating freezing protocol yields a better motility, membranes and DNA integrities of thawed ram sperm than three-steps freezing protocols. *Cryobiology*, *91*, 84-89.

Gloobe, H. (1989). Anatomía aplicada del bovino (No. 91). Bib. Orton IICA/CATIE.

Gloria, A., Contri, A., De Amicis, I., Robbe, D., & Carluccio, A. (2011). Differences between epididymal and ejaculated sperm characteristics in donkey. *Animal reproduction science*, *128*(1-4), 117-122.

Gómez, M., & Migliorisi, A. L. (2007). Protocolo para la evaluación de semen en rumiantes. *Cátedra Reproducción Animal Facultad de Cs. Veterinarias–UNLP. Buenos Aires, Argentina*.

Gürler, H., Malama, E., Heppelmann, M., Calisici, O., Leiding, C., Kastelic, J. P., & Bollwein, H. (2016). Effects of cryopreservation on sperm viability, synthesis of reactive oxygen species, and DNA damage of bovine sperm. *Theriogenology*, *86*(2), 562-571.

Graham, J. K. (2001). Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Animal reproduction science*, *68*(3-4), 239-247.

Hafez, E. S. E. (2002). *Reproducción e inseminación artificial en animales*. McGraw-Hill Interamericana.

Hammerstedt, R. H., Graham, J. K., & Nolan, J. P. (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *Journal of andrology*, *11*(1), 73-88.

Hidalgo Ordóñez, C. O., Tamargo Miguel, C., & Díez Monforte, C. (2005). Análisis del semen bovino. *Tecn Agro*, *2*, 39-43.

Hidalgo Ordóñez, C. O., Tamargo Miguel, C., & Díez Monforte, C. (2005). Análisis del semen bovino. *Tecn Agro*, *2*, 39-43.

Hidalgo Ordóñez, C. O., Tamargo Miguel, C., & Díez Monforte, C. (2005). Análisis del semen bovino. *Tecn Agro*, 2, 39-43.

IMV, 2022. OptiXell PROTEIN-FREE MEDIUM FOR BOVINE SEMEN. Obtenido de: <https://www.imv-technologies.com/documents/OPTIXCELL-FY-ENG.pdf>

Instituto Nacional de Estadística y Censos - INEC, ESPAC 2020

Jácome, A., Ismael, A., & Zambrano Montesdeoca, Á. A. (2021). Evaluación de la aplicación de metil-β-ciclodextrina más colesterol en la criopreservación de semen bovino. Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE. Santo Domingo-Ecuador.

Menon, A. G., Barkema, H. W., Wilde, R., Kastelic, J. P., & Thundathil, J. C. (2011). Associations between sperm abnormalities, breed, age, and scrotal circumference in beef bulls. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 75(4), 241-247.

Muiño Otero, R. (2008). Evaluación de la motilidad y viabilidad del semen bovino mediante el uso de sistemas CASA y citometría de flujo: identificación de subpoblaciones espermáticas. Univ Santiago de Compostela.

Nagata, M. B., Egashira, J., Katafuchi, N., Endo, K., Ogata, K., Yamanaka, K., ... & Yamashita, K. (2019). Bovine sperm selection procedure prior to cryopreservation for improvement of post-thawed semen quality and fertility. *Journal of animal science and biotechnology*, 10(1), 1-14.

Organizacion de las Naciones Unidas para la Alimentacion y la Agricultura. (10 de febrero de 2019). El papel de la FAO en la producción animal. Recuperado el 19 de mayo de 2020, de <http://www.fao.org/animal-production/es/>

Reece, W. O., & Rowe, E. W. (2017). *Functional anatomy and physiology of domestic animals*. John Wiley & Sons.

Ribeiro-Peres, A., Munita-Barbosa, L., Yumi-Kanazawa, M., Mello-Martins, M. I., & Ferreira de Souza, F. (2014). Criopreservación de espermatozoides bovinos extraídos de la cola del epidídimo utilizando los métodos convencional y automatizado. *Archivos de medicina veterinaria*, 46(1), 31-38.

Rodriguez, A., Gonzales, A., Vargas, K., Herrera, A. (2018). *Recolección y manipulación seminal in vitro*. Ciudad de México. Universidad Autónoma Metropolitana

Rodriguez-Martinez, H., Larsson, B., Zhang, B. R., & SODERQUIST, L. (1997). In vitro assessment of viability and fertilizing capacity of bull spermatozoa. *The Journal of reproduction and development*, 43(1), 1-11.}

Said, T. M., Gaglani, A., & Agarwal, A. (2010). Implication of apoptosis in sperm cryoinjury. *Reproductive biomedicine online*, 21(4), 456-462.

Sánchez, J. F. D. L. T., Méndez, Á. F., Andrade, D. M. G., Sánchez, A. L., Velasco, H. L., Martínez, C. E. I., ... & Llaven, A. O. (2015). *Reproducción animal: Temas selectos sobre biotecnología de la reproducción animal*. Divulgación Universitaria.

Silvestri, 2020. Girolando, Double Purpose Dairy Cattle. Obtenido de: <https://desilvestri.com.co/en/2020/11/04/girolando-double-purpose-dairy-cattle/>

Staub, C., & Johnson, L. (2018). Spermatogenesis in the bull. *Animal*, 12, s27-s35.

Ugur, M. R., Saber Abdelrahman, A., Evans, H. C., Gilmore, A. A., Hitit, M., Arifiantini, R. I., ... & Memili, E. (2019). Advances in cryopreservation of bull sperm. *Frontiers in veterinary science*, 6, 268.

Viotti, G. (2011). Procesamiento de semen bovino para la inseminación artificial.

Watson, P. F. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*, 7(4), 871-891.

Whittier, J. (1999). Reproductive anatomy and physiology of the bull.