

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**“Congelamiento del semen bovino para obtener el porcentaje de motilidad progresiva mayor o igual al 60% usando el equipo CASA”**

Elaborado por:  
Basurto Luzuriaga, Marjorie Briggeth

Directora del Proyecto:  
Carrera Garcés, Fredy Patricio MSc. Ph.D.



# Introducción

En la actualidad el ganado bovino en el Ecuador ha sido de gran importancia para la economía del país, este sector se deriva la producción de leche 48% y carne 45%

Sin embargo, los espermatozoides tienden a sufrir diversos cambios que pueden afectar la integridad en el proceso de producir la criopreservación



Sin embargo, la falta de innovación en la producción ocasiona retrasos en el sector ganadero

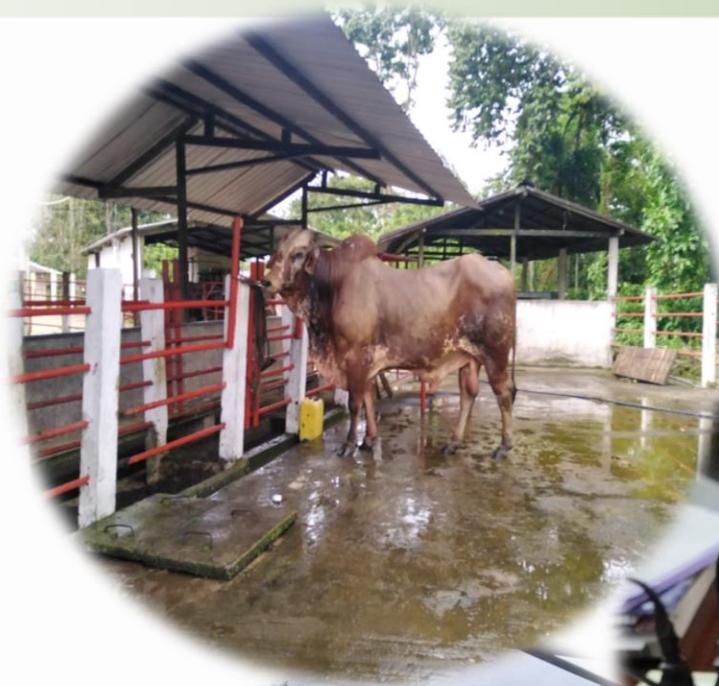
Dentro de esta la criopreservación se ha establecido como una alternativa que minimiza costos en el área de reproducción animal

Utilización de tecnologías como la inseminación artificial es una de las mejores alternativas de innovación

La calidad del semen es uno de los factores más representativos en esta técnica



# Objetivos



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



# Objetivos

## Principal

**Congelamiento del semen bovino para obtener el porcentaje de motilidad progresiva mayor o igual al 60% usando el equipo CASA**



-Analizar el semen bovino fresco de la raza Gyrholando utilizando el equipo CASA



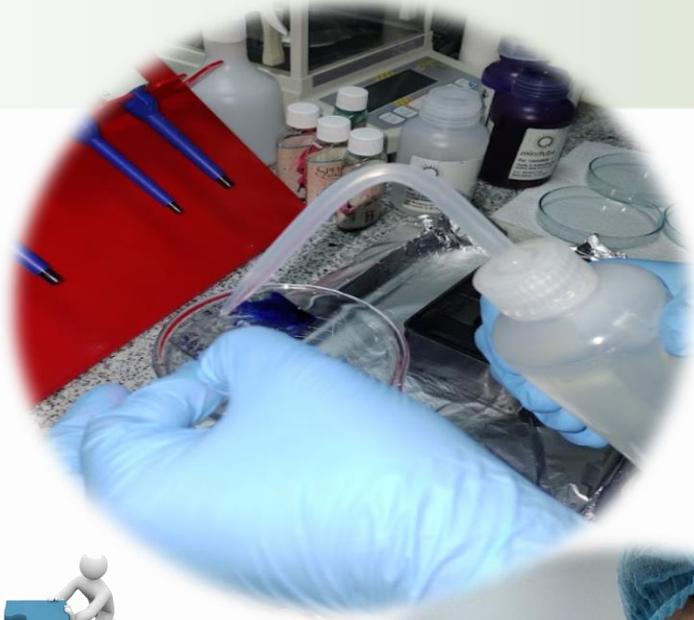
-Criopreservar el semen bovino fresco de la raza Gyrholando utilizando el diluyente OptiXcell con y sin la combinación de vitamina C



-Analizar el semen bovino Gyrholando pos-congelado utilizando el equipo CASA



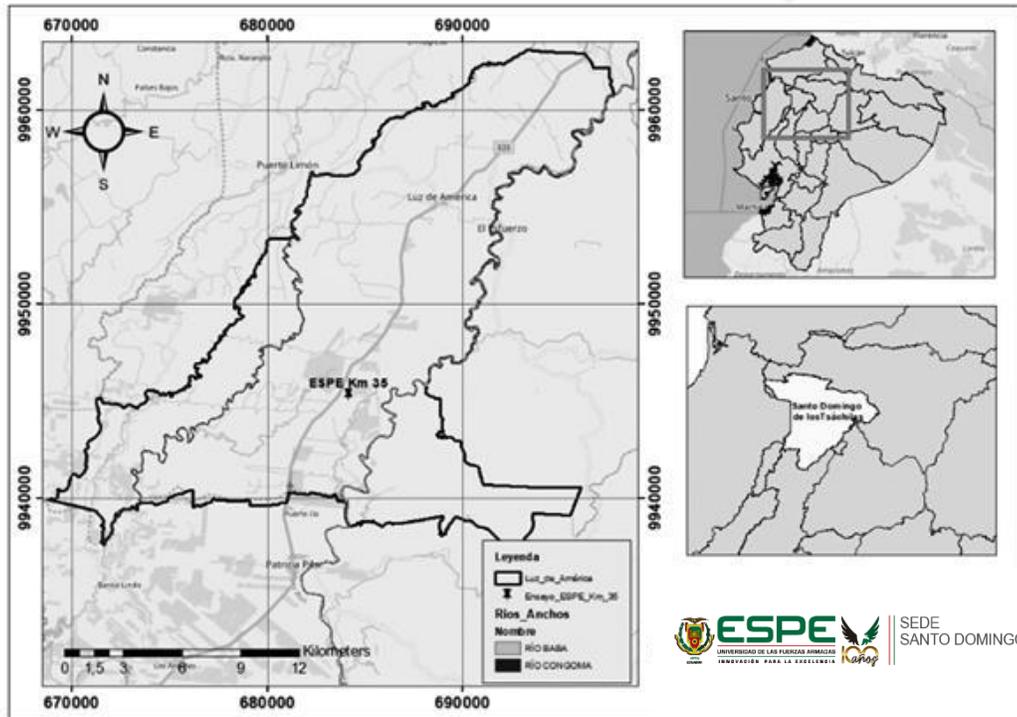
# Metodología



# Metodología

## Localización del Área de Investigación

Se ejecutó en el Laboratorio de la Biotecnología de la Reproducción Animal de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE-Santo Domingo



## Muestras

Semen bovino de la raza Gyrholando de toros de 5 años.

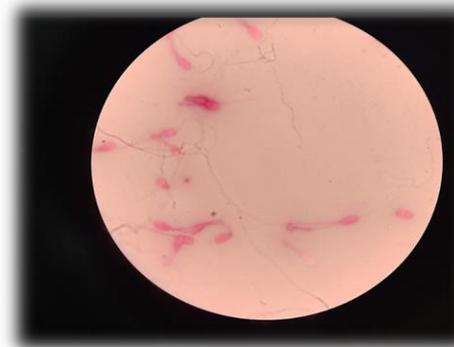
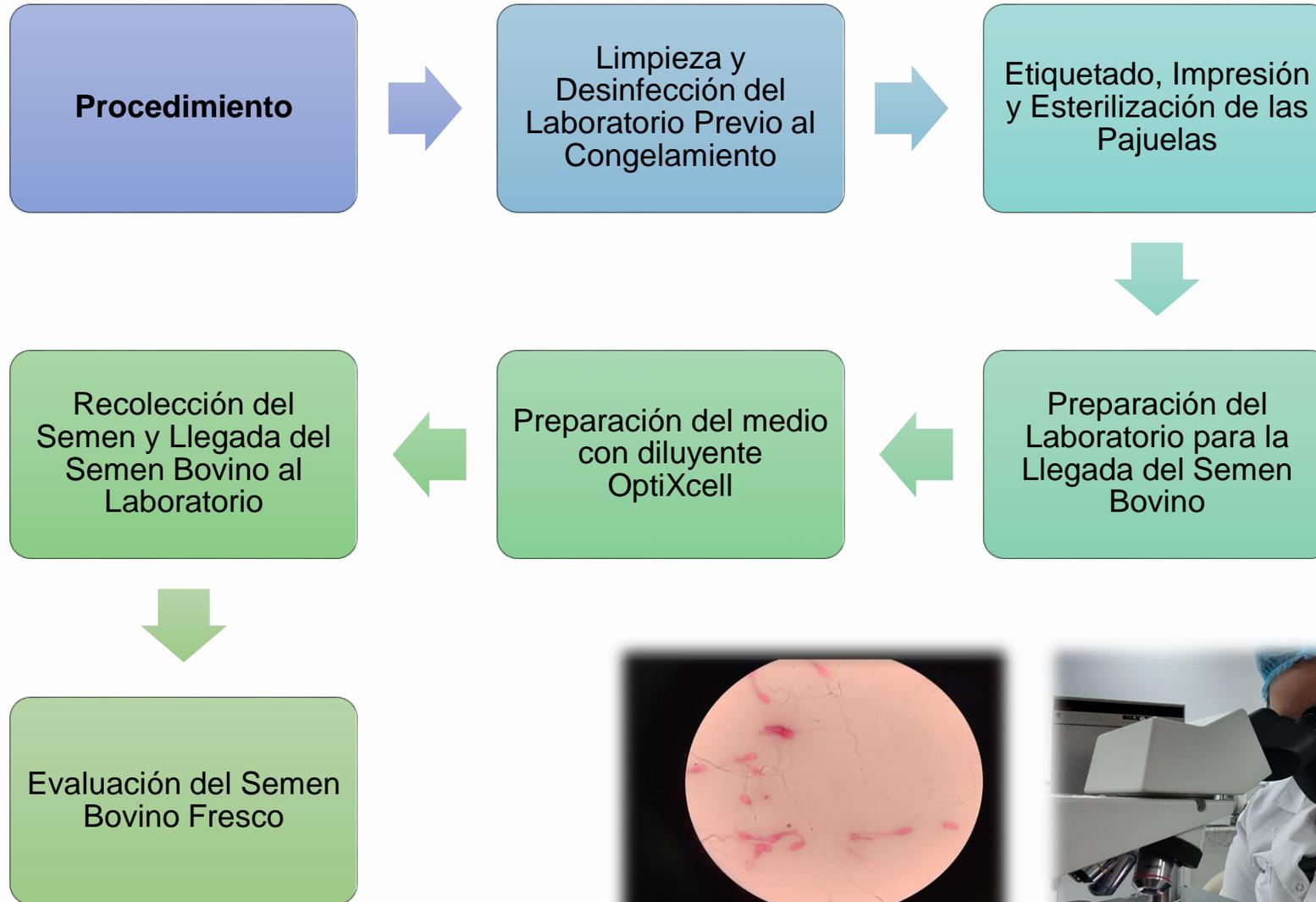
“DONALD”



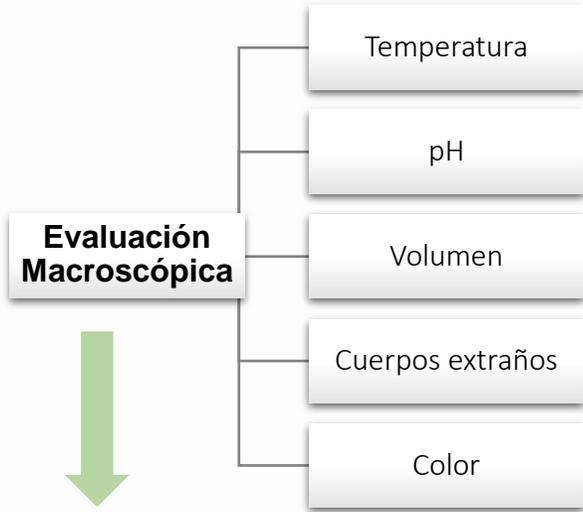
“MARCELO”



# Metodología



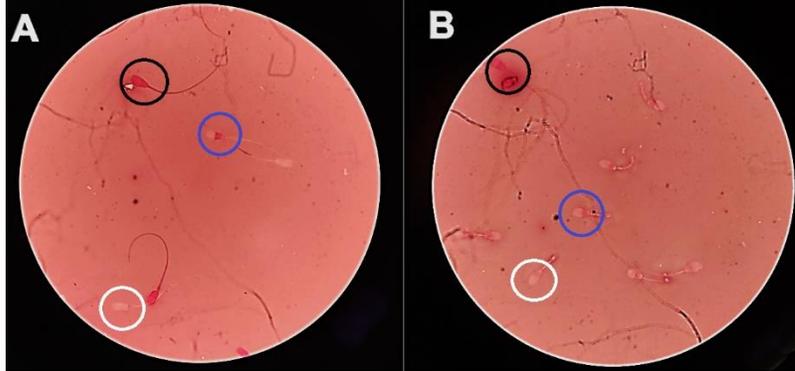
# Metodología



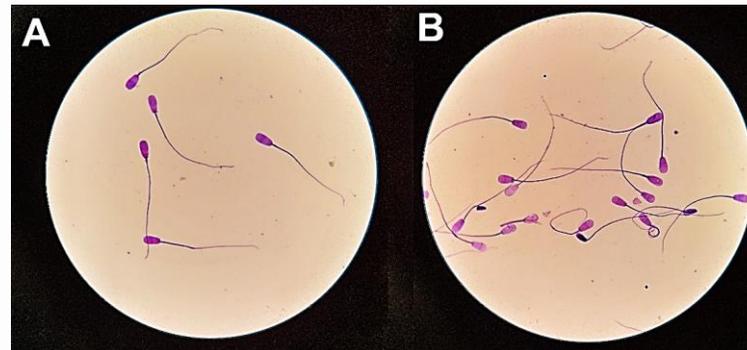
**Evaluación Microscópica del Semen Sin Antioxidante y Preparación de la Dilución 1:1**



→ A= Toro 1



Tinción eosina-negrosina



Tinción Farelly

→ B= Toro 2



# Metodología

Evaluación Microscópica del Semen con Antioxidante y la Preparación de la Dilución Total a Envasar



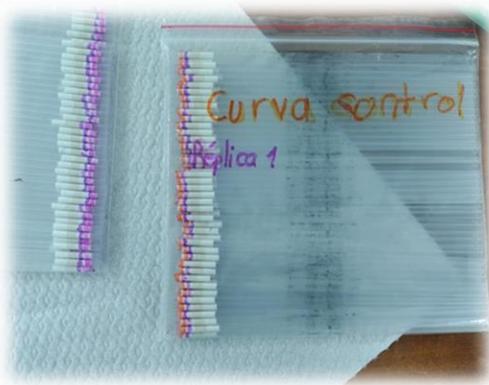
Envasado y Congelamiento del Semen

Curva 1 de congelamiento programado.

Curva 2 de congelamiento programado.

Temperatura inicial (°C)	Temperatura objetivo (°C)	Velocidad de descenso (°C/min)	Tiempo (min)
20	4	-1	16
4	4	0	180
4	-10	-5	2,80
-10	-100	-40	2,25
-100	-140	-20	2,00

Temperatura inicial (°C)	Temperatura objetivo (°C)	Velocidad de descenso (°C/min)	Tiempo (min)
20	4	-0,5	32
4	4	0	180
4	-10	-5	2,80
-10	-100	-40	2,25
-100	-140	-20	2,00



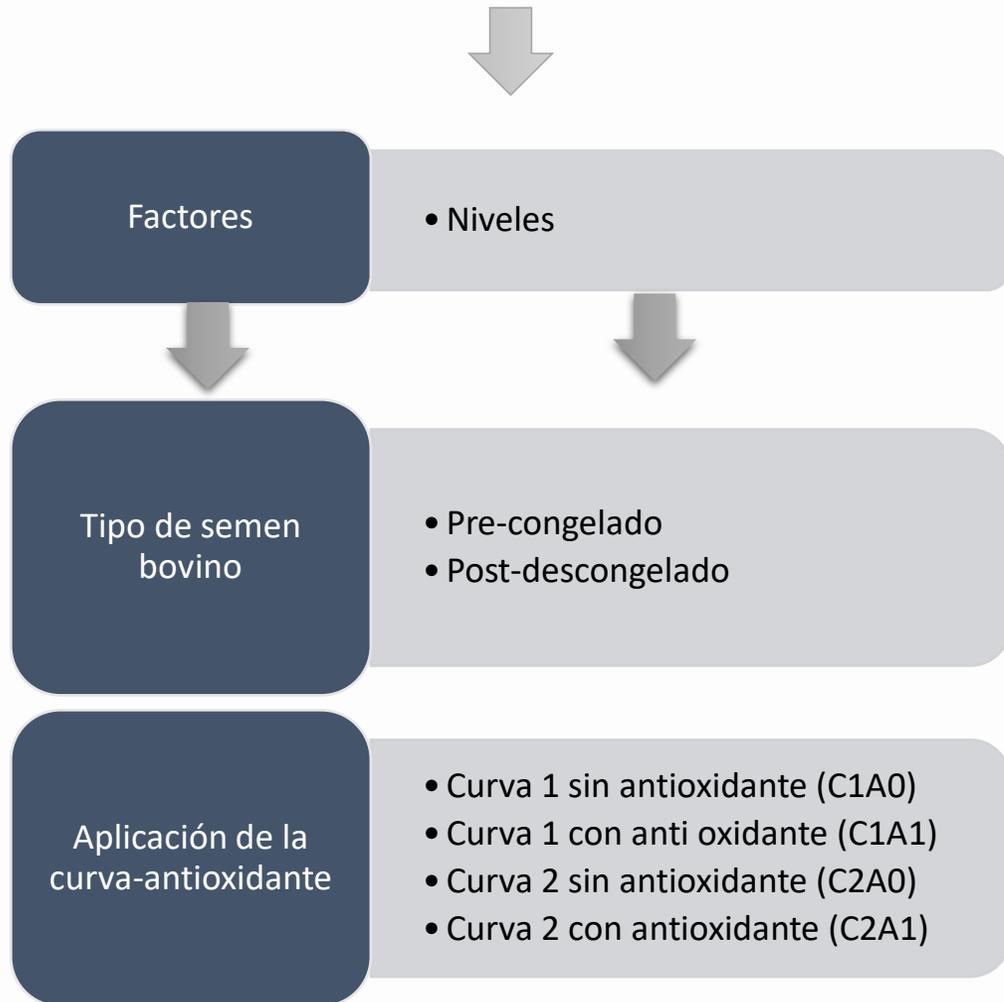
Descongelamiento de Semen Bovino



Evaluación del Semen Bovino Descongelado



## Diseño experimental



## Tratamientos a comparar

N° de tratamiento	Descripción del tratamiento
T1	Semen bovino pre-congelado con la aplicación de C1A0
T2	Semen bovino post-descongelado con la aplicación de C1A0
T3	Semen bovino pre-congelado con la aplicación de C1A1
T4	Semen bovino post-descongelado con la aplicación de C1A1
T5	Semen bovino pre-congelado con la aplicación de C2A0
T6	Semen bovino post-descongelado con la aplicación de C2A0
T7	Semen bovino pre-congelado con la aplicación de C2A1
T8	Semen bovino post-descongelado con la aplicación de C2A1



# Metodología

Diseño aplicado en la investigación fue Completamente Aleatorizado (DCA) bifactorial



- 4 repeticiones
- 8 tratamientos
- 32 unidades experimentales

Parámetros de estudio

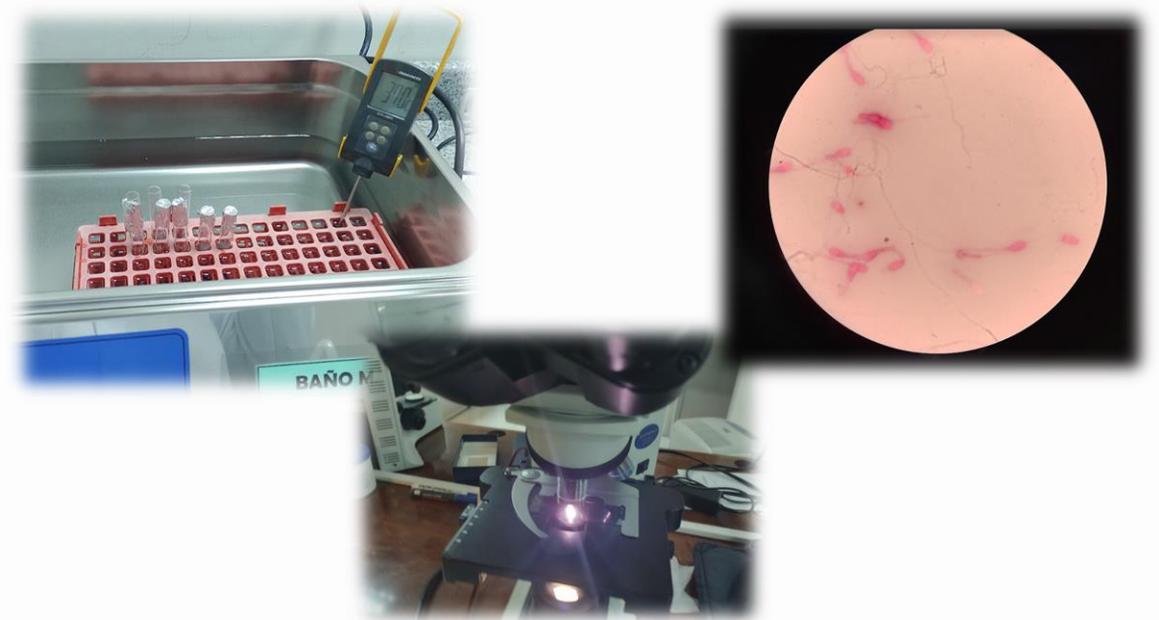


- Temperatura
- pH
- Volumen
- Color
- Cuerpos extraños
- Concentración
- Motilidad total
- Motilidad progresiva
- Viabilidad
- Morfología

Análisis estadístico



- Intervalos de confianza del 95%
- Utilizando el software estadístico IBM SPSS



# Resultados y discusión



## Evaluación macroscópica del semen bovino

Toro	Edad	Promedio		
		Temperatura (°C)	pH	Volumen (mL)
1	5 años	31,75	6,49	8,00
2	5 años	31,30	6,61	4,73



En el ganado bovino la temperatura corporal normal se encuentra entre 37,8 - 40,0 °C, sin embargo, la temperatura del eyaculado bovino es de aproximadamente 32-35°C (Brito et al., 2002)

Según Gómez y Migliorisi (2007), un pH normal del eyaculado bovino, es de 6,2 – 6,8

Los toros mayores de 2 años, el volumen de eyaculado bovino colectado con la vagina artificial en condiciones normales es de 4-8 mL y de 10-20 mL mediante un electro-eyaculador (Hafez & Hafez, 2002)

## Características macroscópicas cualitativas de los dos toros Gyrholando evaluados previo a la congelación



Toro	Color	Cuerpos extraños	Muestra seminal recolectada
1	Blanco cremoso	Negativo	
2	Amarillo blanquecino	Positivo	

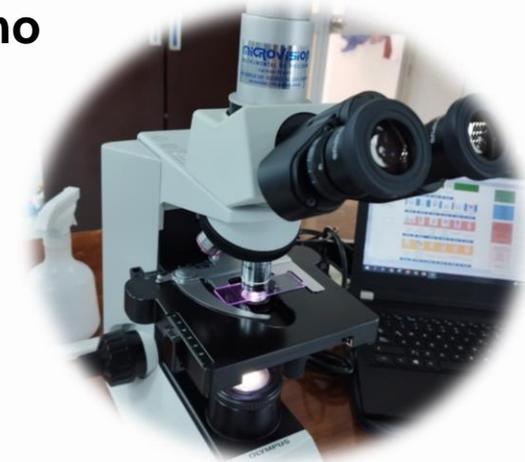
El color del eyaculado bovino de buena CS debe ser de un color blanco lechoso tendiendo a cremoso (Bhattacharyya et al., 2009)

La presencia de estos cuerpos extraños en el eyaculado es debido a una mala técnica de colecta del semen (Ax et al., 2000)

Los bovinos pueden producir un eyaculado de color amarillo por la presencia inofensiva de riboflavina por las glándulas vesiculares y ampollas del conducto deferente, lo cual no tiene ningún tipo de significación clínica (Hafez & Hafez, 2002)

## Evaluación microscópica del semen bovino

Toro	Promedio de la concentración espermática ( $10^6$ esp./mL)
1	312
2	1080



### Krause y Dittmar (1962)

Una concentración del semen bovino fresco debe ser mayor a  $800 \times 10^6$  esp./mL para considerarlo de buena CS y de  $500 \times 10^6$  esp./mL para ser considerado un eyaculado de CS regular



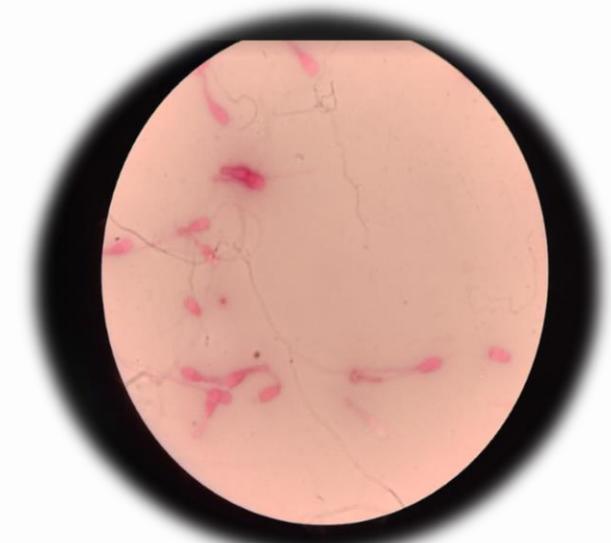
### Hafez y Hafez, (2002)

La concentración espermática de los toros debe ser como mínimo aceptable de  $200 \times 10^6$  esp./mL en jóvenes y de  $750 \times 10^6$  esp./mL en los maduros



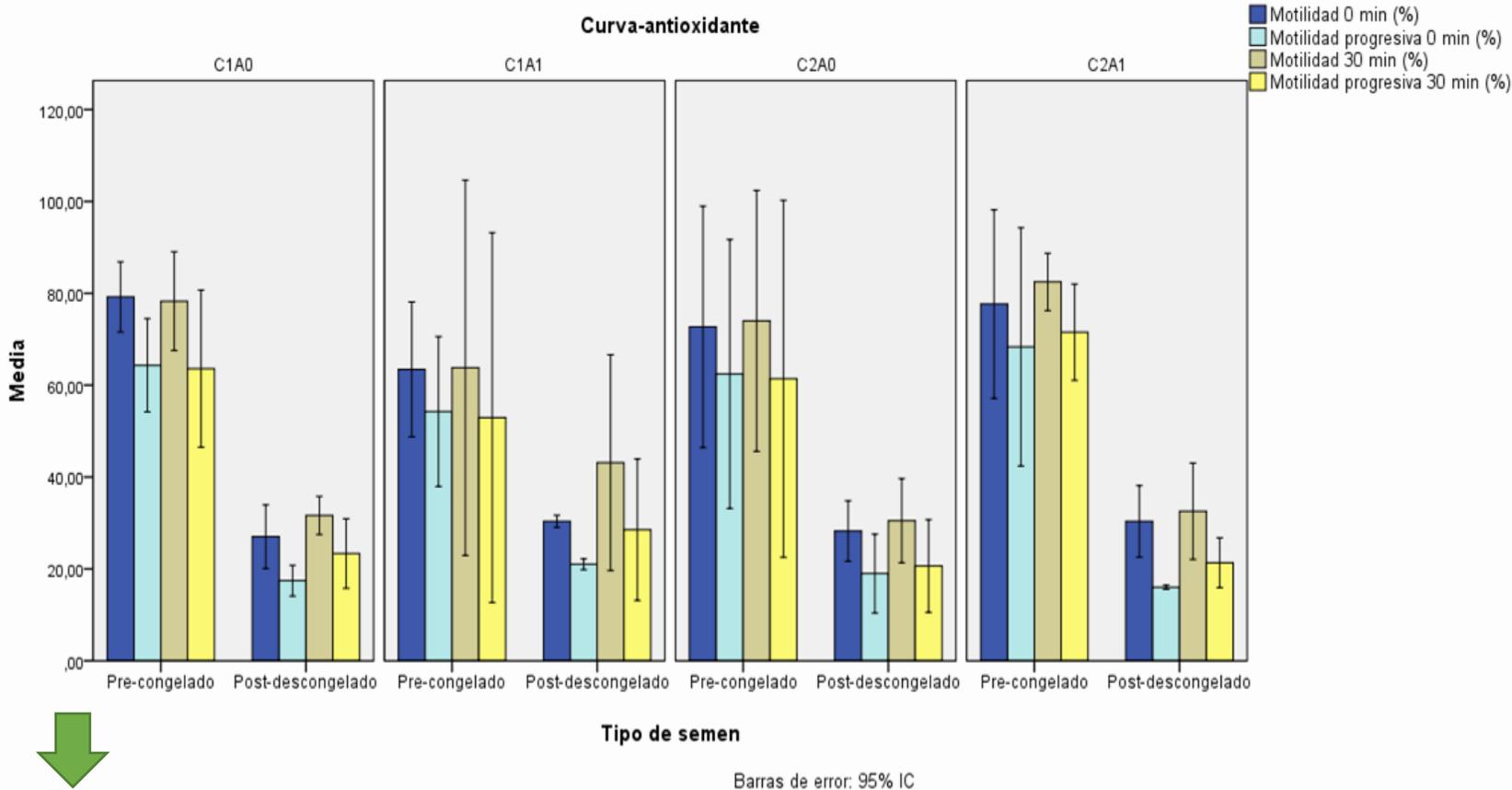
### Elhordoy et al. (2010)

destacaron que en toros de raza Hereford de un año y medio con baja condición corporal, una concentración promedio es de  $370 \times 10^6$  esp./mL



# Resultados y discusión

## Motilidad y motilidad progresiva



Comparación gráfica de las medias de motilidad total y motilidad progresiva medidas a dos tiempos (0 y 30 min) aplicando los factores de estudio.

La motilidad progresiva en bovinos, deben tener un rango de 58 y 60% (Brito et al. ,2002)

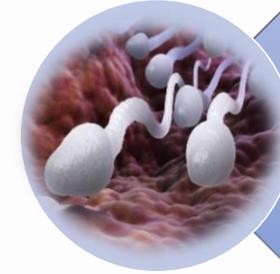
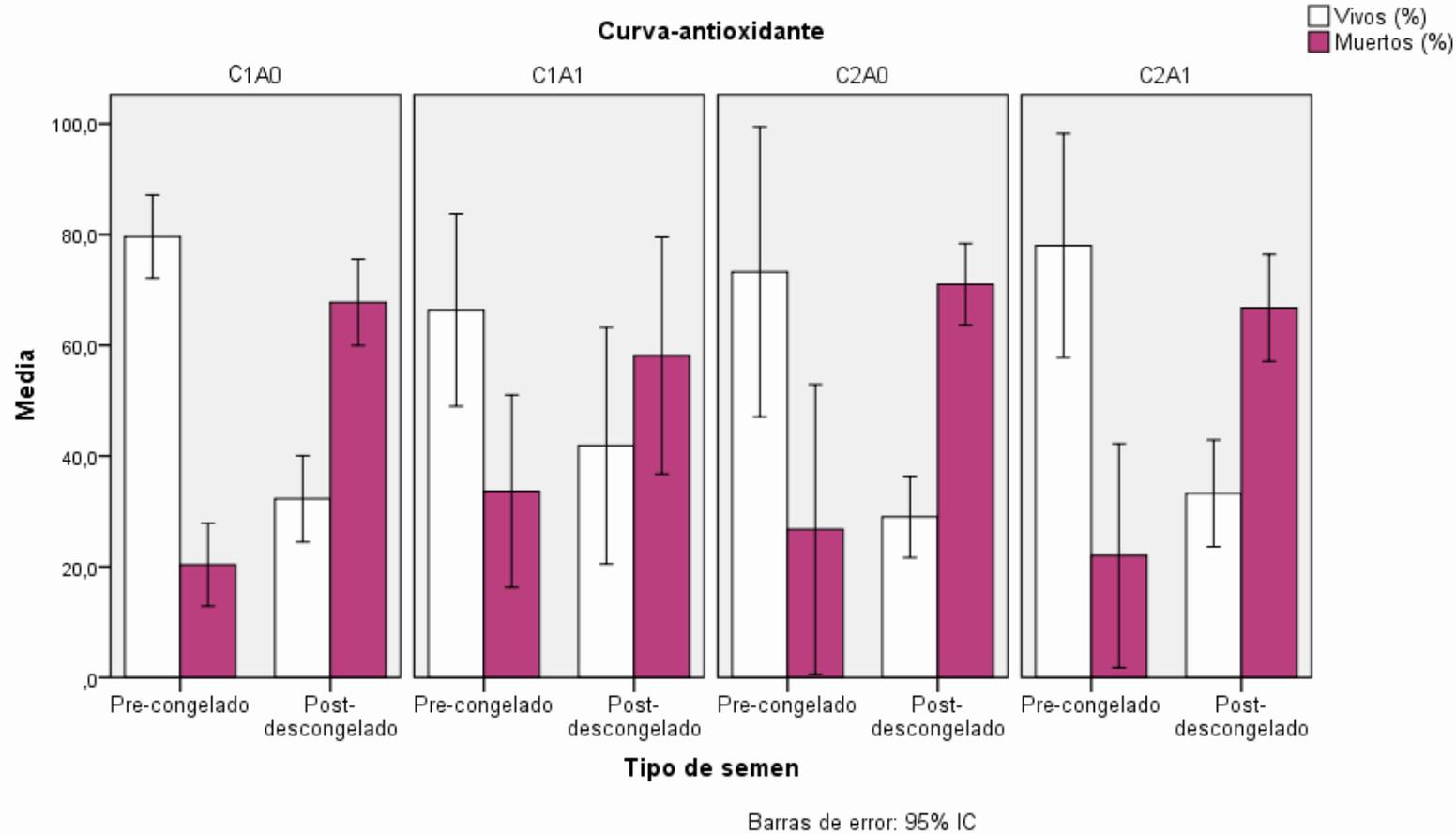
El proceso de congelación del semen, afecta negativamente la integridad del ADN, lo cual provoca vulnerabilidad y susceptibilidad a modificaciones moleculares y epigenéticas (Lewis & Aitken, 2005)

El ácido ascórbico (vitamina C) no sólo es eficaz como antioxidante no enzimático, sino que también es un eliminador de Especies Reactivas de Oxígeno hidrosoluble (ROS) de gran potencia (Silva, 2006)

Las características espermáticas de semen bovino la motilidad en precongelación de estos oscila entre 80% y 70%; mientras que en post-congelación después de 12 a 24 horas se encuentra en rangos de entre 75% a 60% (Anchatuña, 2017)

# Resultados y discusión

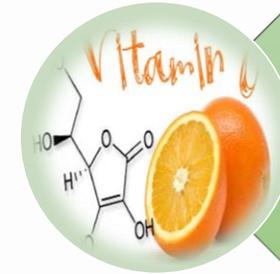
## Viabilidad



Un semen de alta calidad aquel en donde se conserva del 40 a 50% de los espermatozoides recién descongelados, con motilidad progresiva y movimiento continuo y moderada velocidad (Catena & Cabodevila, 2013)



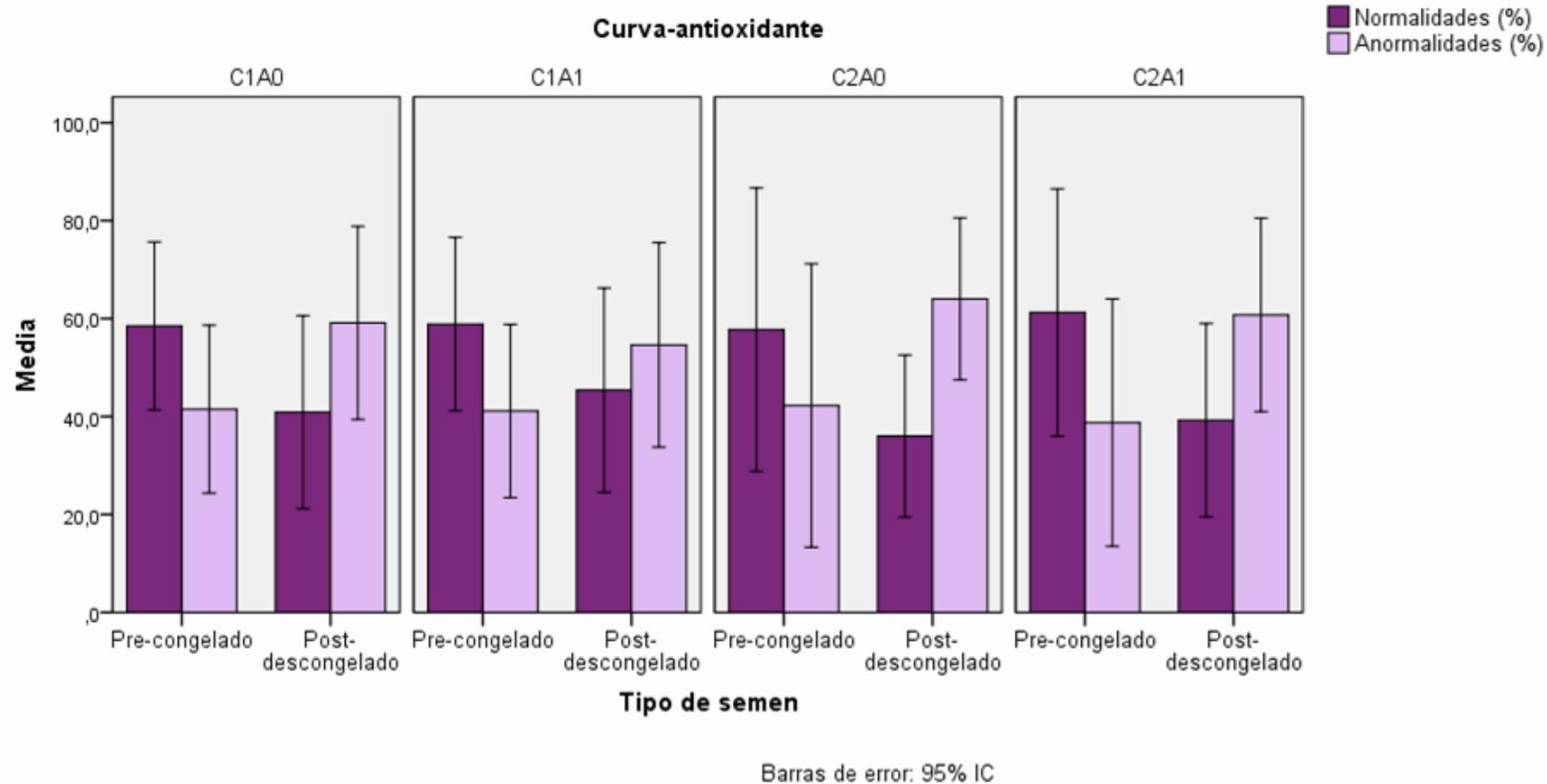
Los toros de raza Murrah producen un 48,21% de espermatozoides vivos post-descongelado aplicando una curva de congelamiento programada en Ice cube y vitamina C de 2,5 mM, siendo el porcentaje de vivos pre-descongelado de 76,21% (Sandeep et al., 2015)



La vitamina C en la mejora de los efectos adversos de las ROS y del nitrógeno mejora el rendimiento óptimo de los espermatozoides y su supervivencia al reducir el daño celular (Pafdayatt et al., 2003).



## Morfología



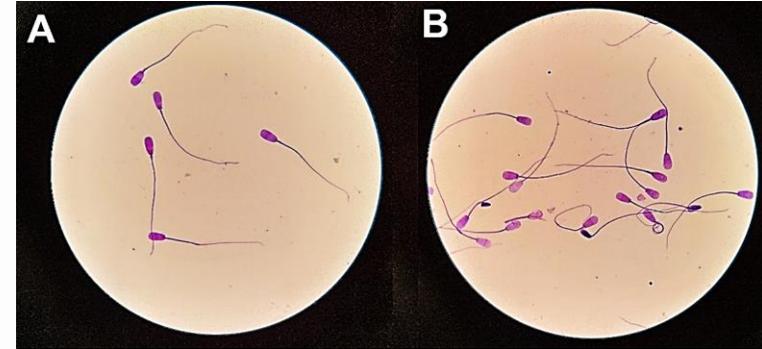
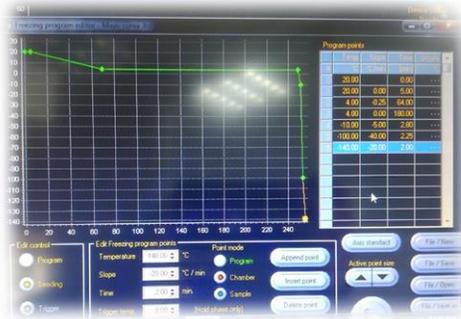
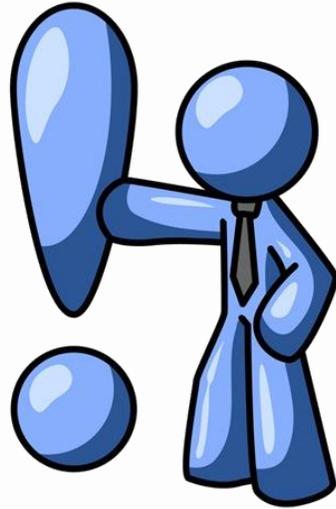
(Saacke, 2008)

Las anomalías morfológicas de las células espermáticas pueden tener un impacto negativo sobre la fertilización y el desarrollo embrionario

(Söderquist et al., 1991)

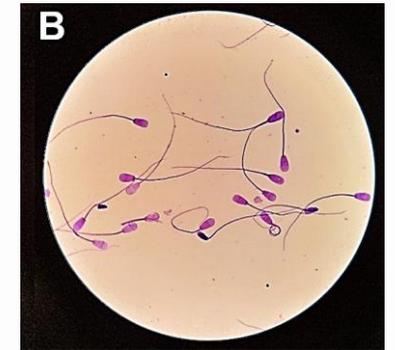
El límite de referencia o nivel de aceptación de las malformaciones totales pre-descongelado debe ser de aproximadamente 25%, con un rango que vaya de 20 a 30%

# Conclusiones



# Conclusiones

En cuanto a la evaluación macroscópica y anomalías presentes en el semen fresco y pos-descongelado, se concluye que los toros Gyrolando (Marcelo y Donald) de la Universidad de las Fuerzas Armadas sede Santo Domingo, no poseen características de buena CS, por lo cual no son aptos para procesos de inseminación artificial, ya que necesitan de mantenimiento previo para mejorar sus características macroscópicas y microscópicas



La media de los porcentajes de motilidad total y progresiva a los diferentes tiempos, al igual que el porcentaje de espermatozoides vivos del post-descongelado fueron mayores al aplicar la curva 1 con 5 mM de vitamina C; sin embargo, no existe diferencia significativa entre la curva e interacción del semen con la curva-antioxidante. Esto es debido a que, la vitamina C en conjunto con una curva de congelamiento lenta mejoran los efectos adversos de las ROS y del nitrógeno, lo cual produce un rendimiento más óptimo de los espermatozoides y su supervivencia al reducir el daño celular gracias a su continua acción de eliminación de radicales

La motilidad del semen debe ser menor al porcentaje de viabilidad, puesto que, si hay mayor motilidad que viabilidad, quiere decir que muchos espermatozoides muertos se mueven, lo cual no tiene sentido. A diferencia de la viabilidad, que, si puede ser mayor, puesto que puede haber espermatozoides vivos, pero no motiles

# Recomendaciones

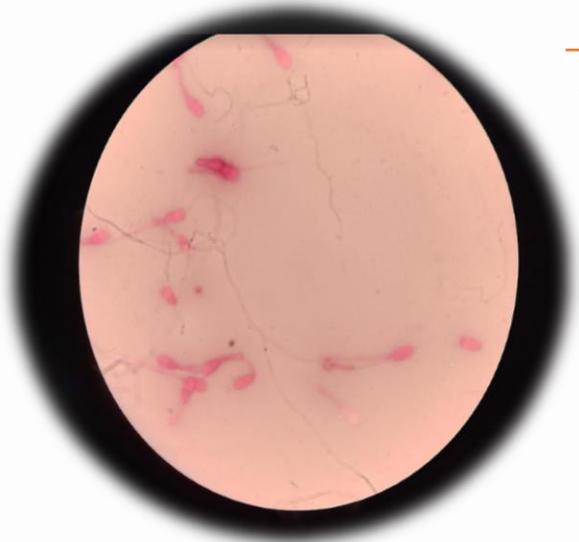
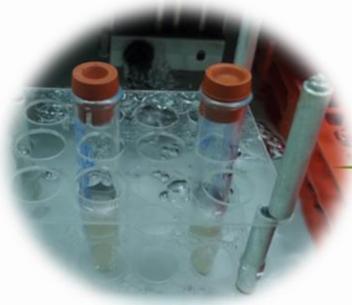


## Recomendaciones

Para una mejor apreciación del tiempo de equilibrado y la aplicación del antioxidante en los procesos de congelamiento, se requiere emplear de 5 a 10 donadores de diferente raza, los cuales tengan previamente una alimentación suplementada durante mínimo dos meses continuos previo a la congelación y un buen estado de salud evaluado por un perfil reproductivo en un laboratorio, para que cumplan con los límites de referencia óptimos de una buena CS

Se recomienda efectuar métodos de congelamiento más eficientes, como el uso de un congelador para reducir el tiempo y los gastos de nitrógeno líquido

Se aconseja tapar con papel aluminio el material donde se prepara el diluyente, para evitar contaminación o daños a la muestra espermática



*Muchas  
Gracias!*

