



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

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

Basurto Luzuriaga, Marjorie Briggeth

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

Carrera Garcés, Fredy Patricio MSc. Ph.D.

26 de agosto de 2022

Reporte de verificación de contenido



Identical Words	248
Words with Minor Changes	7
Paraphrased Words	850
Omitted Words	2794

Firma:



FREDDY PATRICIO
CARRERA GARCÉS

Carrera Garcés, Freddy Patricio MSc. Ph.D.

C. C.: 0602031569

Director del proyecto de investigación



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de integración curricular, “Congelamiento del semen bovino para obtener el porcentaje de motilidad progresiva mayor o igual al 60% usando el equipo CASA” fue realizado por la señorita Basurto Luzuriaga, Marjorie Briggeth, 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, 26 de agosto del 2022

Firma:



FREDDY PATRICIO
CARRERA GARCÉS

Carrera Garcés, Freddy Patricio MSc. Ph.D.

C.C.: 0602031569

Director del proyecto de investigación



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERIA EN BIOTECNOLOGÍA**

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo, **Basurto Luzuriaga, Marjorie Briggeth**, con cédula de ciudadanía 2300581952, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **Congelamiento del semen bovino para obtener el porcentaje de motilidad progresiva mayor o igual al 60% usando 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, 26 de agosto del 2022

Firma:

Basurto Luzuriaga, Marjorie Briggeth

C.C.: 2300581952



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERIA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo, **Basurto Luzuriaga, Marjorie Briggeth**, con cédula de ciudadanía 2300581952, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **Congelamiento del semen bovino para obtener el porcentaje de motilidad progresiva mayor o igual al 60% usando el equipo CASA** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 26 de agosto del 2022

Firma:

Basurto Luzuriaga, Marjorie Briggeth

C.C.: 2300581952

Dedicatoria

Dedico el siguiente trabajo de titulación a mis padres Manuel Basurto y Marlene Luzuriaga, ya que, gracias a su apoyo incondicional, enseñanzas y valores me han permitido llegar hasta aquí.

Este trabajo de investigación, lo dedico también a mis hermanos, sobrinos, mi pareja y mis mascotas, quienes me han dado las fuerzas necesarias para superar todas las adversidades presentadas durante el tiempo de estudio. Además, dedico este trabajo de investigación a Dios que me ha brindado conocimiento y fuerzas para superar cada obstáculo.

Agradecimiento

Quiero expresar mis sinceros agradecimientos a mis padres quienes siempre me han apoyado con el paso de los años y nunca me han dejado sola, gracias infinitas, los amo mucho.

Agradezco también a todos quienes conforman la prestigiosa Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE - Santo Domingo, en especial al personal docente, quienes me han impartido sus conocimientos en las diferentes asignaturas.

Un reconocimiento especial a mi director de trabajo de integración curricular Fredy Carrera Ph.D., quien, en base a sus conocimientos impartidos y guía respectiva se pudo finalizar el presente trabajo de integración curricular. Además, al Ing. Andrés Vargas, gracias a su ayuda en el cuidado de los sementales y en la colecta de los eyaculados permitió la culminación de esta investigación.

Índice de Contenido

Carátula.....	1
Reporte de verificación de contenido	2
Certificación	3
Responsabilidad de autoría.....	4
Autorización de publicación	5
Dedicatoria	6
Agradecimiento	7
Índice de Contenido.....	8
Índice de Figuras	12
Índice de Tablas.....	13
Lista de Abreviatras	14
Resumen.....	15
Abstract.....	16
Capítulo I.....	17
Introducción.....	17
Planteamiento del problema.....	19
Justificación.....	20
Objetivos de la investigación	22
Objetivo general	22
Objetivos específicos	22
Capítulo II.....	23
Marco Teórico	23
Anatomía del aparato reproductor del macho bovino	23
Testículos	24
Epidídimo.....	24

Conducto deferente	25
Pene.....	25
Glándulas sexuales accesorias.....	25
Espermatogénesis	26
El semen bovino.....	27
Características del semen bovino	27
Evaluación del semen bovino	28
Examen macroscópico del semen bovino	28
Examen microscópico del semen bovino.....	29
Criopreservación del semen bovino	33
Historia e importancia.....	33
Dilutores para la congelación.....	34
Crioprotectores o diluyentes de congelación.....	34
Principales componentes de los diluyentes	34
Diluyente comercial Optixcell	35
Congelamiento del semen bovino	36
Método convencional.....	36
Método automático	36
Curvas de congelamiento de pajuelas	36
Daños producidos durante la crioconservación del semen	37
Capacitación prematura	37
Deshidratación celular extrema.....	37
Formación de cristales intracelulares	37

	10
Formación de especies reactivas de oxígeno (ROS)	37
Evaluación de la motilidad del semen bovino pos-congelado	37
<i>Análisis de motilidad considerando el equipo CASA</i>	38
Capítulo III.....	39
Metodología	39
Localización del área de investigación	39
Materiales usados en la investigación	40
Procedimiento	41
Limpieza y desinfección del laboratorio previo al congelamiento	41
Etiquetado, impresión y esterilización de las pajuelas	41
Preparación del laboratorio para la llegada del semen bovino	41
Preparación del medio con diluyente OptiXcell	42
Recolección del semen y llegada del semen bovino al laboratorio.....	42
Evaluación del semen bovino fresco	43
Envasado y congelamiento del semen	47
Descongelamiento de semen bovino	48
Evaluación del semen bovino descongelado.....	49
Capítulo IV.....	50
Diseño experimental	50
Factores y niveles	50
Tratamientos a comparar	50
Diseño aplicado en la investigación.....	51
Número de repeticiones y unidades experimentales	51
Parámetros y análisis estadístico	51

Capítulo IV	52
Resultados y discusión	52
Evaluación macroscópica del semen bovino.....	52
Variables cuantitativas.....	52
Variables cualitativas.....	54
Evaluación microscópica del semen bovino.....	56
Concentración.....	56
Motilidad y motilidad progresiva	57
Viabilidad	64
Morfología.....	67
Capítulo V	71
Conclusiones.....	71
Capítulo VI	72
Recomendaciones	72
Capítulo VII	73
Bibliografía	73

Índice de Figuras

Figura 1 <i>Aparato reproductor del macho bovino</i>	23
Figura 2 <i>Proceso de espermatogénesis</i>	26
Figura 3 <i>Morfología del espermatozoide (cabeza y cola)</i>	27
Figura 4 <i>Clasificación de la movilidad progresiva de los espermatozoides</i>	31
Figura 5 <i>Morfología del espermatozoide</i>	32
Figura 6 <i>Anomalías morfológicas de los espermatozoides</i>	32
Figura 7 <i>Fases de la criopreservación</i>	33
Figura 8 <i>Tipos de crioprotectores</i>	34
Figura 9 <i>Componentes del diluyente OptiXcell</i>	35
Figura 10 <i>Parámetros de angularidad y oscilación según el equipo CASA</i>	38
Figura 11 <i>Parámetros de velocidad según el equipo CASA</i>	38
Figura 12 <i>Mapa de la ubicación geográfica del área de investigación</i>	39
Figura 13 <i>Tinción eosina-negrosina para determinar la viabilidad de los espermatozoides</i> .45	45
Figura 14 <i>Tinción Farelly para determinar las normalidades y anormalidades de los espermatozoides</i>	46
Figura 15 <i>Comparación gráfica de las medias de motilidad total y motilidad progresiva medidas a dos tiempos (0 y 30 min) aplicando los factores de estudio</i>	60
Figura 16 <i>Comparación gráfica del porcentaje de espermatozoides vivos y muertos aplicando los factores de estudio</i>	66
Figura 17 <i>Comparación gráfica del porcentaje de espermatozoides normales y anormales aplicando los factores de estudio</i>	69

Índice de Tablas

Tabla 1 <i>Curva de congelamiento estándar de pajuelas (Curva lenta)</i>	36
Tabla 2 <i>Curva de congelamiento estándar de pajuelas (Curva rápida)</i>	36
Tabla 3 <i>Curva de congelamiento programada según el equipo DigitCool y utilizando el diluyente OptiXcell</i>	37
Tabla 4 <i>Materiales implementados en el trabajo de titulación</i>	40
Tabla 5 <i>Indicación según el color de la muestra seminal</i>	44
Tabla 6 <i>Curva 1 de congelamiento programado</i>	48
Tabla 7 <i>Curva 2 de congelamiento programado</i>	48
Tabla 8 <i>Factores de la investigación con sus respectivos niveles</i>	50
Tabla 9 <i>Tratamientos de la investigación</i>	50
Tabla 10 <i>Características macroscópicas cuantitativas de los dos toros Gyrholando evaluados previo a la congelación</i>	52
Tabla 11 <i>Características macroscópicas cualitativas de los dos toros Gyrholando evaluados previo a la congelación</i>	55
Tabla 12 <i>Concentración seminal promedio de los dos toros Gyrholando evaluados previo a la congelación</i>	56
Tabla 13 <i>Prueba de los efectos inter-sujetos de motilidad total y motilidad progresiva medidas a dos tiempos (0 y 30 min)</i>	58
Tabla 14 <i>Estadísticos descriptivos de motilidad total y motilidad progresiva medidas a dos tiempos (0 y 30 min)</i>	59
Tabla 15 <i>Prueba de los efectos inter-sujetos del porcentaje de espermatozoides vivos y muertos</i>	65
Tabla 16 <i>Estadísticos descriptivos del porcentaje de espermatozoides vivos y muertas</i>	65
Tabla 17 <i>Prueba de los efectos inter-sujetos del porcentaje de espermatozoides normales y anormales</i>	68
Tabla 18 <i>Estadísticos descriptivos del porcentaje de espermatozoides normales y anormales</i>	68

Lista de Abreviaturas

IA	Inseminación artificial
CS	Calidad del semen o calidad seminal
CASA	Computer Assisted Sperm Analysis
TmE	Tiempo de equilibrio
MAGAP	Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca
ROS	Reactive oxygen species o Especies reactivas de oxígeno
°C	Grado Celsius
mL	Mililitro
mM	Milimolar
cm	Centímetro
mm	Milímetro
µL	Microlitro
ADN	Ácido desoxirribonucleico
IMV	Instrumentos de Medicina Veterinaria
ISO	International Organization for Standardization
ALH	Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza
BCF	Frecuencia de batido
VCL	Velocidad curvilínea
VSL	Velocidad rectilínea
VAP	Velocidad media
LIN	Índice de linealidad
STR	Índice de rectitud
WOB	Índice de oscilación
C1A0	Curva 1 sin antioxidante
C1A1	Curva 1 con antioxidante
C2A0	Curva 2 sin antioxidante
C2A1	Curva 2 con antioxidante

Resumen

La falta de innovación en la producción ganadera ocasiona retrasos en este sector, sin embargo, la criopreservación se ha establecido como una alternativa innovadora que minimiza costos en las explotaciones. Por ello el objetivo principal de la presente investigación fue, evaluar el congelamiento del semen bovino para obtener el porcentaje de motilidad progresiva mayor o igual al 60% usando el equipo CASA. Dicha investigación se ejecutó en el Laboratorio de Biotecnología de Reproducción Animal en la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE-Santo Domingo; utilizando muestras de semen bovino de dos toros Gyrholando de 5 años; se trabajó con 8 tratamientos y 4 repeticiones, los parámetros de estudio fueron temperatura, pH, volumen, color, cuerpos extraños, concentración, motilidad total, motilidad progresiva, viabilidad y morfología, los resultados fueron evaluados utilizando el software estadístico IBM SPSS. Las muestras evaluadas mantuvieron una temperatura promedio de (31,30 a 31,75°C,); pH de (6,49 - 6,61) y volumen promedio de (6,49 - 6,61 y 8-4,73mL (toro 1-toro 2) respectivamente); mientras que su coloración se mantuvo dentro del rango aceptable de calidad; a la vez, la concentración seminal promedio fue 312 y 1080 10⁶esp./mL en los toros 1 y 2 consecuentemente; 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 uno con 5 Mm de vitamina C, así mismo, sus espermatozoides anormales post-descongelado fueron menores (54,62%). Sin embargo, no existió diferencia significativa entre la curva e interacción del semen con la curva-antioxidante.

Palabras claves: Criopreservación, semen bovino, calidad seminal, curva de congelamiento, vitamina C.

Abstract

The lack of innovation in livestock production causes delays in this sector; however, cryopreservation has been established as an innovative alternative that minimizes costs on farms. Therefore, the main objective of this research was to evaluate the freezing of bovine semen to obtain the percentage of progressive motility greater than or equal to 60% using CASA equipment. This research was carried out in the Laboratory of Biotechnology of Animal Reproduction at the University of the Armed Forces ESPE-Santo Domingo; using bovine semen samples from two 5-year-old Gyrholando bulls; 8 treatments and 4 replicates were used, the study parameters were temperature, pH, volume, color, foreign bodies, concentration, total motility, progressive motility, viability and morphology, the results were evaluated using IBM SPSS statistical software. The evaluated samples maintained an average temperature of (31.30 to 31.75°C,); pH of (6.49 - 6.61) and average volume of (6.49 - 6.61 and 8-4.73mL (bull 1-bull 2) respectively); while their coloration remained within the acceptable range of quality; at the same time, the average seminal concentration was 312 and 1080 106esp. /The mean percentages of total and progressive motility at the different times, as well as the percentage of live spermatozoa post-thaw were higher when curve one was applied with 5 Mm of vitamin C. Likewise, their abnormal spermatozoa post-thaw were lower (54.62%). However, there was no significant difference between the curve and the interaction of the semen with the curve-antioxidant.

Key words: Cryopreservation, bovine semen, semen quality, freezing curve, vitamin C.

C.

Capítulo I

Introducción

En la actualidad el ganado bovino en el Ecuador ha sido de gran importancia para la economía del país, ya que de este sector se deriva la producción de leche con un 48% de la producción total pecuaria y de carne con un 45%. Además, el sector ganadero proporciona una canasta básica y seguridad alimentaria a aproximadamente mil trecientos millones de individuos en el mundo (MAGAP, 2016; ONUAA, 2019). Sin embargo, el sector ganadero en el Ecuador tiene diversas limitantes, tales como, la falta de apoyo en el área financiera, la disminución de la mano de obra en el campo, pero en especial la falta de innovación para generar mayor producción de acuerdo a las necesidades del consumidor (Carrera et al., 2019).

Dentro de las explotaciones ganaderas ecuatorianas, el semental reproductor es uno de los componentes principales, ya que de este depende la calidad genética que mantengan las crías, las mismas que pueden ser obtenidas mediante la monta directa o con la utilización de tecnologías como la inseminación artificial (IA), en donde se deben aplicar una serie de técnicas biotecnológicas. Cabe considerar que el fracaso o éxito de una explotación dedicada a la reproducción, se basa en la salud del animal, tanto fenotípica como genotípicamente, siendo la calidad del semen (CS) uno de los factores más representativos en este tipo de explotaciones (Galina & Valencia, 2008).

Por otra parte, se considera que la criopreservación de semen bovino, es una de las mejores alternativas cuando se desea conservar espermatozoides, con la finalidad de asegurar una muestra espermática, mediante un largo periodo de tiempo, la cual debe mantener óptimas condiciones en el momento que se desee realizar la IA (Hammerstedt et al., 1990). Es importante resaltar, que la criopreservación se ha establecido como una alternativa que minimiza costos en el área de reproducción animal, debido a que en este caso no se debe destinar recursos económicos, para el manejo y mantenimiento del semental (Castelo et al., 2008).

A su vez, el uso y aplicación de la tecnología *in vitro*, dentro del área de reproducción tienden a fomentar la generación de alternativas que permiten mejorar los parámetros de calidad reproductiva, mediante el uso de la citometría de flujo o el sistema Computer Assisted Sperm Analysis (CASA), los cuales se han establecido como tecnologías esenciales en los procedimientos de criopreservación de semen, debido a que permiten estudiar diversas funciones y características morfológicas en las muestras espermáticas, con lo que se logra conocer la calidad y capacidad de fecundar del semen evaluado (Muiño, Evaluación de la motilidad y viabilidad del semen bovino mediante el uso de sistemas CASA y citometría de flujo: Identificación de subpoblaciones espermáticas, 2008). Es importante reconocer que la utilización de las mencionadas tecnologías, permiten generar una reevaluación de los protocolos de conservación y congelamiento ya establecidos, especialmente aquellos que fueron evaluados subjetivamente, permitiendo que se evalúen los diversos componentes de la muestra, como es el caso de los diluyentes, o incluso las técnicas de pos-descongelado y la temperatura correcta de congelación de las pajuelas.

Dentro del mismo marco de ideas, se conoce que el sistema CASA se utiliza con la finalidad de evaluar la CS mediante un sistema óptico computarizado, destacando parámetros como la motilidad total y progresiva del semen bovino fresco o descongelado, la angularidad tanto del movimiento, como del desplazamiento de la cabeza del espermatozoide, los cuales son de importancia para determinar si hay suficientes espermatozoides que puedan alcanzar el ovocito, donde un porcentaje del 60% al descongelar el semen, es idóneo para que se lleve mejores resultados en IA (Aires et al., 2003).

A su vez, en busca de minimizar daños en los gametos masculinos sometidos a la criopreservación, se utiliza la yema de huevo como una sustancia crioprotectora (Crespihlo et al., 2012), sin embargo, la contaminación bacteriana y la enorme variación de su composición, dificultan la utilización de los análisis desarrollados mediante equipos programados (Singh et al., 2012). Debido a la problemática antes mencionada, se ha creado

la opción de reemplazar los diluyentes de origen animal, por aquellos generados a base de liposomas, ya que estos últimos, conservan en su composición fosfolípidos destinados a brindar seguridad celular, disminuyendo la producción de daños criogénicos, se estima que uno de los mejores productos comerciales y más utilizados en el área de la criopreservación es OptiXcell, ya que concentra una alta cantidad de fosfolípidos en su composición (Bergeron & Manjunath, 2006). Cabe recalcar que los liposomas permiten que se genere unión entre las membranas espermáticas, a la vez que fomentan un equilibrio sobre el intercambio de colesterol y fosfolípidos, convirtiéndose en la mejor ventaja al momento de realizar la criopreservación (Röpke *et al.*, 2011; Ansari *et al.*, 2016).

Otro factor de gran importancia a nombrar, son los antioxidantes, pues estos son de gran ayuda en la criopreservación, al ser agentes que evitan el estrés oxidativo que se forma por causa del desbalance entre la producción y eliminación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante la exposición de la muestra sobre el congelado y descongelado del fluido espermático (Rodríguez & Nivia, 2017).

Por lo cual, se eligió el objetivo de investigar el efecto del diluyente OptiXcell y de un antioxidante sobre el eyaculado bovino utilizando dos curvas de congelamiento con el fin de alcanzar una motilidad progresiva mayor o igual al 60 por ciento (porcentaje ideal para la IA) pos-congelado mediante un análisis espermático asistido por computadora.

Planteamiento del problema

Mediante la criopreservación, los espermatozoides tienden a sufrir diversos cambios que pueden afectar su integridad, lo que repercute directamente con una baja proporción de fecundar los óvulos (González, 2004). Puesto que, la criopreservación se encuentra vinculada con técnicas basadas en generar cambios drásticos de temperatura, como es el caso de un shock de frío y calor, destinado a promover la generación y disolución de cristales de hielo, formados por la aplicación de congelación y descongelación, estos aspectos tienden a alterar la integridad de las células espermáticas en los niveles extrínseco e intrínseco (Watson, 2000).

Se conoce, que un congelamiento rápido, permite que se forme un choque térmico y por ende se construyen cristales de hielo a nivel intracelular, de forma contraria, cuando se realiza una congelación lenta, se produce una acumulación de sales, permitiendo un incremento de la presión osmótica, lo que ocasiona lesiones tanto en las proteínas, como en las lipoproteínas presentes en el espermatozoide (Hafez & Hafez, 2000). De forma general, se estima que del 40 a 50% de los espermatozoides sometidos a congelación y descongelación no sobreviven, mientras que el restante tiende a sufrir alteraciones que le impiden desarrollar la fecundación. Es por ello, que un protocolo destinado a la congelación espermática, debe enfocarse a conservar mayor cantidad de espermatozoides vivos, manteniendo una alta capacidad de fecundar, por medio de la aplicación de tiempos de temperatura equilibrados y adecuados, para asegurar que el espermatozoide no presente daños (Stornelli et al., 2005).

En la actualidad, se mantiene la controversia de identificar el tiempo de equilibrio adecuado que permita otorgar mayor calidad a las muestras espermáticas, luego de someterse a la congelación y descongelación de las mismas. Cabe recalcar, que en el Ecuador se han desarrollado varias investigaciones destinadas a evaluar la calidad del semen bovino, en donde se han medido las cualidades andrológicas del semental y la calidad espermática con diversos diluyentes, pero no hay reporte bibliográfico del congelamiento de semen bovino utilizando antioxidantes como la propuesta del presente estudio.

Justificación

Mediante la aplicación de varias investigaciones se ha logrado determinar que la CS luego de la congelación, varían según sea el tiempo de equilibrio (TmE) asignado, ya que dicho tiempo es aquel en donde los espermatozoides se mantienen en contacto con los diluyentes, sobre una temperatura de 5 °C, esta actividad se lleva a cabo antes de ser congelada la muestra, este tiempo es aprovechado por el crioprotector y los demás

componentes que conforman los diluyentes, para ingresar a la célula, y con ello permitir el equilibrio en las concentraciones (Díaz et al., 2015).

Según Patt y Nath (1969), el TmE permite alcanzar estabilidad en la membrana espermática, aportando hacia la tolerancia en el intercambio de líquidos, que se lleva a cabo en la congelación. Se estima que existen diferentes ventajas y desventajas del TmE, las cuales son mayores o menores dependiendo del diluyente utilizado, la concentración del azúcar, glicerol y velocidad de enfriamiento de la muestra (Salamon & Marwell, 2000).

En una investigación de Berndstone y Foote (1972), argumentan que el TmE dentro del rango de 3 a 5 minutos, bajo una temperatura de 5 o 25 °C, permite que el glicerol penetre en los espermatozoides de los bovinos (Muiño, Evaluación de la motilidad y viabilidad del semen bovino mediante el uso de sistemas CASA y citometría de flujo: Identificación de subpoblaciones espermáticas, 2008). Así mismo, se estima que un espermatozoide puede mantenerse a 5 °C durante 24 horas, antes del congelamiento sin afectar a su fertilidad (Purdy et al., 2010). Además, han expuesto que los tiempos de equilibrio 0, 2 y 4 horas a una temperatura de 5 °C, ocasionan los mejores resultados en la calidad del semen, sin embargo, otros autores mencionan que a las 4 horas de equilibrio han logrado conseguir mayor proporción de supervivencia de los gametos masculinos (Leite et al., 2010).

Por tal motivo, en este trabajo de investigación se pretende determinar la curva de congelamiento idónea con la aplicación del diluyente OptiXcell y vitamina C como antioxidante que permitan una motilidad progresiva de semen bovino mayor o igual al 60 por ciento (porcentaje ideal para la IA).

Objetivos de la investigación

Objetivo general

Congelar semen bovino Gyrholando para obtener el porcentaje de motilidad progresiva mayor o igual al 60% usando el equipo CASA.

Objetivos específicos

- 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 vitamina C.
- Analizar el semen bovino Gyrholando pos-congelado utilizando el equipo CASA.

Capítulo II

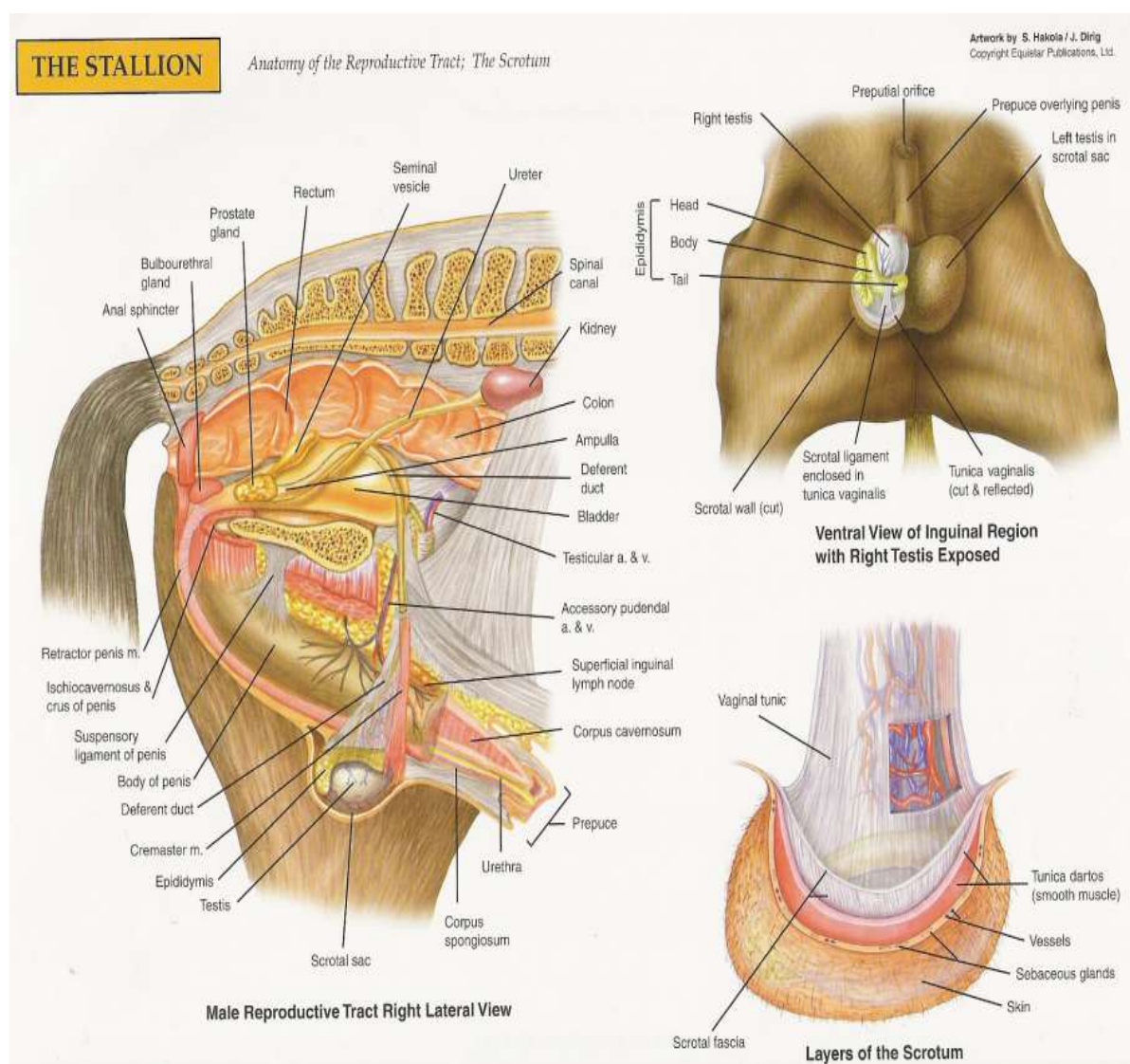
Marco Teórico

Anatomía del aparato reproductor del macho bovino

El aparato reproductor del macho bovino, se encuentra situado en la parte inferior del área abdominal específicamente bajo el recto, exteriormente se observa las partes genitales, como los testículos y el pene (Erales-Villamil et al., 2008), ver figura 1.

Figura 1

Aparato reproductor del macho bovino



Nota. Tomado de Fuentes (2020).

Como se observa en la figura 1, el aparato reproductor de un toro está formado por los testículos y diversos órganos sexuales que tienen la finalidad transportar a los

espermatozoides hasta el aparato sexual de la hembra, los principales órganos son los testículos, el epidídimo, el conducto deferente, el pene y las glándulas accesorias (Fuentes, 2020).

Testículos

Este desarrolla la función vital de producir espermatozoides y la generación de la hormona testosterona. Los testículos poseen una forma ovoide alargada, en los animales adultos puede medir de 12 a 16 centímetros (cm) de longitud y 6 a 8 cm de diámetro. Estos se ubican en la parte exterior y se mantienen cubiertos por el escroto, cuya función es termo-regular a este órgano, por medio de capas musculares sensibles a los cambios de temperatura y un músculo llamado Cremaster, el mismo que se expande frente al estímulo de calor y se contrae hacia el frío. Cabe considerar que el exceso de calor puede reducir la producción de espermatozoides (Dyce et al., 1999).

A su vez, los testículos contienen altas cantidades de tubos de forma delgada, alargados y retorcidos, llamados tubos seminíferos, los cuales son los responsables de producir espermatozoides (45 a 50 días), dichos tubos se mantienen cubiertos de las células intersticiales de Leydig, mismas que generan la hormona testosterona (McDonal, 1978).

Epidídimo

Este tiene una forma alargada, compacta y plana, conserva un diámetro aproximado de 70 a 500 milímetros (mm), el peso del mismo depende de la raza y tamaño del toro dicho órgano se encuentra unido al testículo, en el epidídimo es el lugar donde alcanzan su madurez los espermatozoides para continuar con la eyaculación, este órgano cumple la función de permitir la salida del esperma producido por los testículos, debido a que en esta zona los espermatozoides adquieren motilidad progresiva, también aquí se lleva a cabo la condensación del núcleo celular y se genera el almacenamiento de los espermatozoides, se considera que dicho transporte por medio del epidídimo, se lleva a cabo en 10 días aproximadamente. Se considera que el epidídimo puede almacenar hasta 4 mililitros (mL)

del fluido espermático, en donde existe una concentración de $3,55 \times 10^9$ espermatozoides/mL, considerado la mitad del volumen total (Dyce et al., 1999).

Conducto deferente

Este órgano se encarga de conectar a la cola del epidídimo con la uretra cerca de la próstata, su función principal es la emisión del semen al momento de generarse la eyaculación, mediante la transportación de los espermatozoides a través de diversas ondas peristálticas desde la parte inicial del epidídimo hasta su extremo final (Escamilla, 2005).

Pene

Este es considerado el órgano copulador, conserva una forma cilíndrica alargada, puede alcanzar un tamaño de 90 cm y un diámetro de 3 a 4 cm. Este órgano tiene las siguientes partes; raíz, cuerpo y glande. La raíz que forma parte de la parte fija del pene, se pliega sobre si misma formando una curvatura en forma de “S”, denominada curva sigmoidea (Cuaran & Burbano, 2014).

El pene se mantiene formado por cuerpos cavernosos fuertemente irrigados, este se encuentra recubriendo la uretra y las membranas que forman un cuerpo esponjoso, en donde se sitúa la raíz del pene, por ello se asume que el pene del toro es fibro-elástico y su tamaño como el diámetro tiende a variar durante el proceso de erección (Rodríguez, 2017).

Glándulas sexuales accesorias

Estas glándulas son compuestas por:

Vesículas seminales. Esta es una de las más grandes glándulas del aparato reproductivo, su función principal es generar fracción del líquido seminal. Estas desembocan en la uretra, generan una secreción gelatinosa que conforma del 30 a 50% del volumen del eyaculado, secreta fructosa por lo que se le atribuye ser la responsable de la nutrición espermática. Está formada por dos lóbulos con 10 o 12 cm de largo (Rodríguez et al., 2016).

Próstata. Esta glándula se encuentra ubicada en el cuello de la vejiga urinaria, en el macho bovino la próstata no tiene un gran tamaño, por lo cual su secreción es pequeña. Se

estima que su función principal es generar fluidos alcalinos, con la finalidad de neutralizar las condiciones acidas de la uretra y la vagina (Palma, 2012).

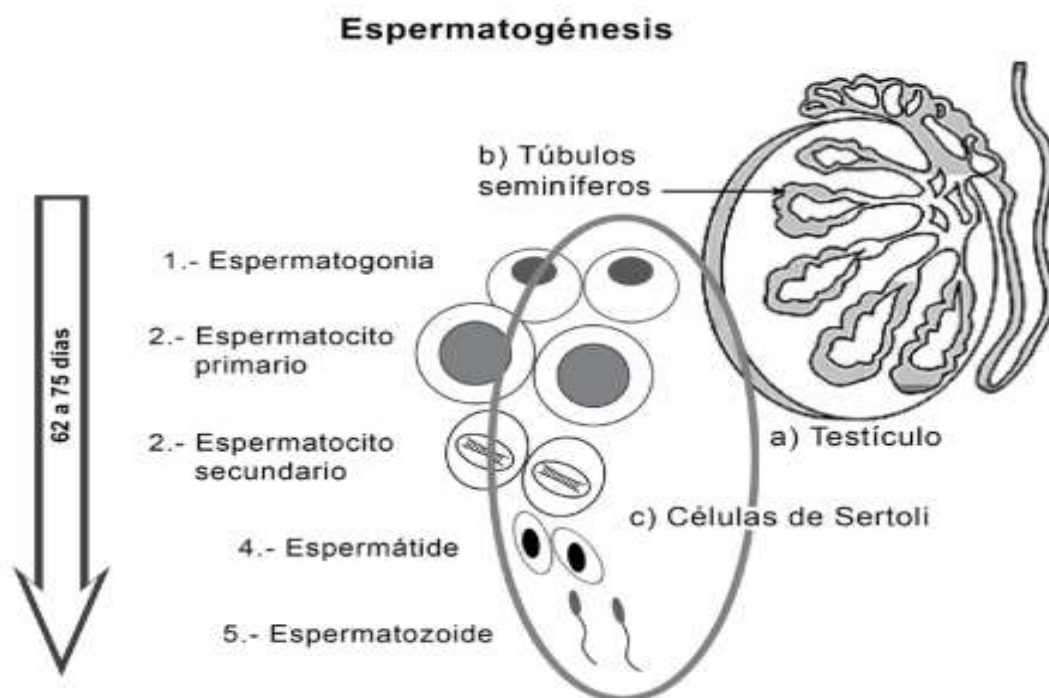
Glándulas de Cowper. También conocida como las glándulas uretrales, estas se ubican a los lados de la uretra, la función que cumplen es aparente a la de la próstata y los líquidos secretados, estas sirven de vehículo para el espermatozoide. Estas generan una secreción destinada a limpiar y lubricar la uretra en el momento del eyaculado (Konig & Liebich, 2002).

Espermatogénesis

Según Quintero y colaboradores (2015), la espermatogénesis es el proceso en donde se desarrolla la diferenciación celular, dentro del mencionado proceso ocurren diversas divisiones mitóticas y meióticas, a más de las distintas transformaciones citológicas que se generan hasta lograr la formación completa del espermatozoide, el mencionado proceso se realiza sobre los túbulos seminíferos a partir de la espermatogonias (Figura 2), la espermatogénesis está compuesta de tres fases (meiosis I, meiosis II y diferenciación), las mismas que se detallan a continuación:

Figura 2

Proceso de espermatogénesis



Nota. Tomado de Quintero y colaboradores (2015).

Como se muestra en la figura 2, la espermatogénesis tiene inicio en los tubos seminíferos, los mismos que se hayan ubicados en el área de los testículos, específicamente en las células de Sertoli, es allí en donde inicia la fase de proliferación de las espermatogonias, las cuales tienden a dividirse mitóticamente, en donde su resultado es la generación de los espermatoцитos primarios, por otra parte, en el proceso de meiosis I, el mencionado espermatoцитo se divide en dos partes, ocasionando la evolución de dos espermatoцитos secundarios, en este caso el contenido cromosómico pasa a convertirse de diploide a haploide. Mediante el proceso de meiosis II, el espermatoцитo secundario, se vuelve a dividir dando paso a la generación de dos espermátides hermanas, finalmente estas espermátides, luego de una diferenciación celular forman los espermatozoides (Quintero et al., 2015)

El semen bovino

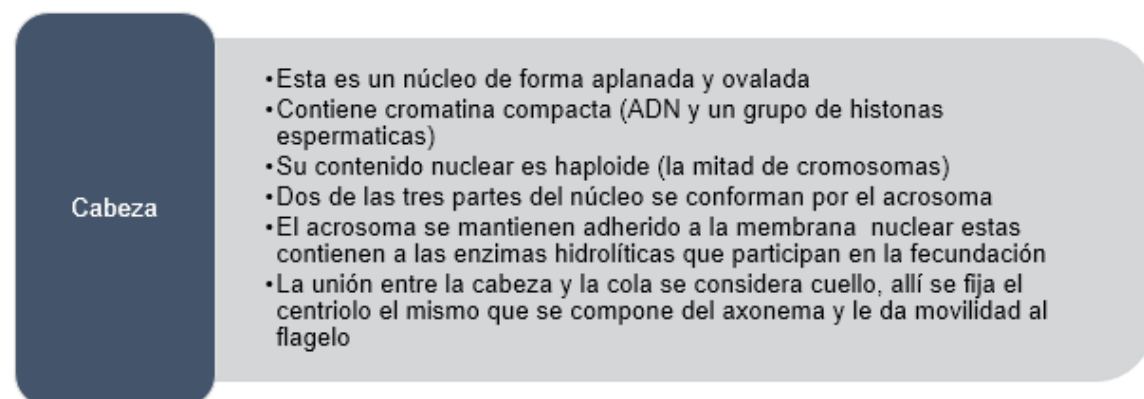
El semen se considera una suspensión celular líquida, la cual conserva a los gametos masculinos y a la vez formado por las secreciones que generan los órganos accesorios a esta suspensión que se denomina plasma seminal (Hafez & Hafez, 2002).

Características del semen bovino

En la figura 3, se exponen las principales características del semen bovino, considerando sus partes (Hafez & Hafez, 2002):

Figura 3

Morfología del espermatozoide (cabeza y cola)



Cola

- Esta tiene tres partes:
- 1. pieza intermedia; desde el cuello hasta el anillo citoplasmático (contienen nueve pares de microtúbulos, los cuales brindan estabilidad y movilidad)
- 2. pieza principal; desde el anillo hasta el extremo de la cola (contiene el axonema y la vaina fibrosa)
- 3. pieza terminal; se ubica tras la vaina fibrosa (contiene el axonema central)

Nota. Modificado de Hafez y Hafez (2002).

Membrana espermática. Esta contiene una estructura dinámica, permite el reconocimiento y transporte de moléculas. Con ello ayuda a que el espermatozoide, se adapte a sus procesos metabólicos aportando a que exista el reconocimiento del ovocito. Se estima que la membrana conserva la información que permite desarrollar un análisis de fertilidad sobre el macho (Hidalgo et al., 2017).

Evaluación del semen bovino

Examen macroscópico del semen bovino

Examen macroscópico del semen bovino, considerando sus características del componente:

Volumen del eyaculado. En condiciones normales es de 5-8 mL o 10 a 20 mL mediante un electro-eyaculador (Hafez & Hafez, 2002).

Color. Si el semen es de buena calidad, su color tiende a ser blanco, marfil o amarillento, sin embargo, al ser de mala calidad este asume una coloración transparente (Fresneda, 2004).

Olor. Este no debe contener un mal olor, caso contrario haría referencia a un proceso infeccioso (Páez-Barón & Corredor-Camargo, 2014).

Temperatura. 37 °C se conoce como la temperatura estándar, que proporciona CS, por lo cual se ha establecido como la temperatura comercial del semen (Bernardi et al., 2011).

pH. 6,4 a 7,8 (Crespilho et al., 2009).

Cuerpos extraños. Se consideran cuerpos extraños al polvo, tierra, heces y demás contaminantes, que promueven una alteración dentro de los parámetros de CS, de forma

general una extracción seminal, con presencia de cuerpos extraños es el resultado de un mal protocolo de extracción (Curbelo & Rodríguez, 2013).

Examen microscópico del semen bovino

Concentración. Según Hafez y Hafez (2002), la concentración de espermatozoides dentro de un mL de semen bovino es de 800 a 2000 millones. Se conoce que la mejor forma de evaluar la concentración espermática bovina, es por medio del recuento de los espermatozoides mediante el uso de un hemocitómetro, este instrumento se utiliza en los centros de inseminación artificial con la finalidad de evaluar gran variedad de muestras (Muiño et al., 2007).

En otros casos se utiliza un espectrofotómetro, el cual estima una cantidad indirecta de la CS, mediante la absorción de la luz. La identificación de la concentración espermática con ayuda del espectrofotómetro, es uno de los métodos más rápidos que existen, a la vez esta se desarrolla bajo un margen de error aceptable (Muiño, Evaluación de la motilidad y viabilidad del semen bovino mediante el uso de sistemas CASA y citometría de flujo: Identificación de subpoblaciones espermáticas, 2008).

Una de las mejores herramientas para evaluar la concentración espermática, es el fotómetro SDM1 este es un equipo compacto y exacto, tiene la ventaja de poder ser calibrado para diversas especies animales, su uso, limpieza y mantenimiento es muy fácil, la concentración de semen se muestra en millones de células sobre mL de semen (Arbiotech, 2022).

Motilidad. La motilidad es un requisito que debe cumplir el espermatozoide para lograr fecundar al ovocito, este se ha convertido en uno de los principales factores que determinan la calidad del semen. Por ello se estima que la motilidad expresa la viabilidad espermática y la capacidad celular, cabe considerar que un espermatozoide con baja motilidad, debe ser automáticamente descartado. A la vez, se conoce que a la motilidad no se la puede considerar como el único factor que determine la capacidad de fecundación del semen (Herold et al., 2004).

La motilidad espermática, ha sido estudiada desde el siglo XIX, como una opción de evaluación espermática, por ello se ha optado por la utilización del sistema CASA, el cual ha evolucionado tanto en tecnología como en accesibilidad económica, convirtiéndose en un equipo de uso industrial especialmente en bovinos, destinados a la IA (Holt & Van Look, 2004).

El sistema CASA, contiene un microscopio, que se mantiene conectado a una cámara de video, el cual muestra las imágenes digitales sobre un monitor, esta imagen se envía al ordenador en donde se capturan diversas fotografías en serie de cada campo, durante un segundo aproximadamente, en este caso el software analiza el recorrido o trayectoria en cada espermatozoide en la fracción de un segundo (Krause, 1995).

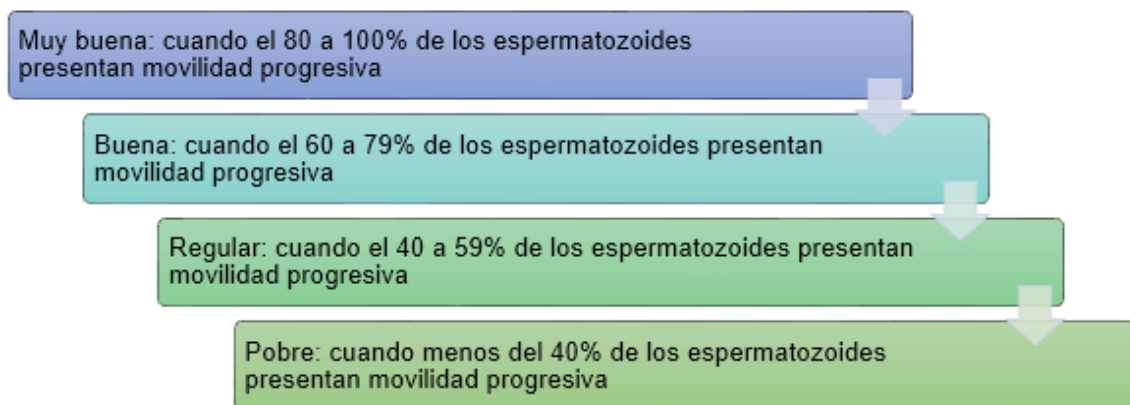
Porcentajes de motilidad masal y motilidad progresiva. En donde se considera la velocidad curvilínea, clasifica a los espermatozoides en estáticos, móviles (rápidos, medios y lentos) progresivos y no progresivos (Krause, 1995).

La motilidad masal. Esta es definida por el movimiento de forma de remolinos del total de espermatozoides evaluados, en este caso se evalúa mediante el uso de una escala comprendida de 0 a 5, dando la puntuación de 5, cuando existen remolinos rápidos y llenos de vigor, mientras que 0, se puntúa cuando no se observan movimientos (Ávalos et al., 2018).

La motilidad progresiva. Según Maroto (2020), para evaluarla se coloca una gota de semen en el portaobjetos, se agrega un cubre objetos, y se evalúa en el microscopio, en este caso los espermatozoides se mueven, rápido y recto en el área, esta se puede clasificar en (Figura 4):

Figura 4

Clasificación de la movilidad progresiva de los espermatozoides



Viabilidad. La viabilidad e integridad acrosomal se evalúa con diversas sustancias oxidativas, en este caso se visualiza la proporción de espermatozoides vivos o muertos, esta acción se realiza con ayuda de una tinción (**Muiño, Evaluación de la motilidad y viabilidad del semen bovino mediante el uso de sistemas CASA y citometría de flujo: Identificación de subpoblaciones espermáticas, 2008**). Se considera un semen de alta calidad aquel en donde se conserva de 40 a 50% de los espermatozoides recién descongelados, con motilidad progresiva y movimiento continuo y moderada velocidad (**Catena & Cabodevila, 2013**).

Tinción Eosina-Nigrosina. Esta también es conocida como el test de Williams Pollack, se considera la tinción supra vital principalmente es usada a nivel de laboratorios de espermogramas, se ha establecido como la mejor opción para identificar los espermatozoides vivos y muertos, estos últimos tienden a contener una permeabilidad en la membrana por lo que se logra teñir de color rojo o rosa con lo que se distingue tanto la cabeza como la cola del espermatozoide como un efecto directo de la eosina, mientras que los vivos se mantienen incoloros, por otra parte la nigrosina proporciona una coloración azulada en los espermatozoides vivos (Catena & Cabodevila, 2013).

Morfología espermática. Según Ávalos y colaboradores (2018), los espermatozoides normales de diferentes animales, suelen tener una cabeza simétrica, con forma ovalo con contorno regular, que muestra áreas claras cuando se tiñe, por ejemplo;

cubre más de un tercio del área del acrosoma la cabeza y el subacrosoma que cubre el resto de esta, a continuación, se detallan sus partes (Figura 5):

Figura 5

Morfología del espermatozoide

Cabeza	Parte media	Cola
<ul style="list-style-type: none"> • Mide de 3 a 8 μm de largo y de 2 a 4 μm de ancho 	<ul style="list-style-type: none"> • es recta y de contorno regular, se alinea con el eje longitudinal de la cabeza, alcanza un tamaño de 7 a 8 μm de longitud 	<ul style="list-style-type: none"> • Es única, delgada, no rizada, de contorno irregular, alcanza de 45-60 μm de largo

Nota. Modificado de Ávalos y colaboradores (2018).

Anormalidades morfológicas. El semen se considera de alta calidad, cuando este logra contener más del 70% de espermatozoides morfológicamente normales, con anomalías primarias menores del 10% y anomalías secundarias de máximo un 20%. El número total de espermatozoides no debe exceder el 30% (Gómez et al., 2005), en la figura 6, se describen las anomalías primarias y secundarias:

Figura 6

Anomalías morfológicas de los espermatozoides

Anormalidades Primarias	Anormalidades Secundarias
<input type="checkbox"/> Forma de cabeza: piriforme, lanceolada, angosta o estrecha <input type="checkbox"/> Acrosoma: desprendido, rugoso, pequeño <input type="checkbox"/> Tamaño de cabeza: microcefalia, macrocefalia <input type="checkbox"/> Cabeza desprendida <input type="checkbox"/> Doble cabeza <input type="checkbox"/> Cuello paraxial	<input type="checkbox"/> Espermatozoides con gota citoplasmática proximal <input type="checkbox"/> Espermatozoides con gota citoplasmática distal <input type="checkbox"/> Espermatozoide con cola enrollada <input type="checkbox"/> Espermatozoide con acrosoma desprendido

Nota. Modificado de Gómez y colaboradores (2005).

Tinción Farelly. Para realizar la evaluación morfológica espermática, una de las mejores opciones es la tinción Farelly Stain®, esta es una fijación con dos tipos de colorantes, la misma que consta de tres pasos (Eveline & Vaquero, 2006):

Se debe hacer frotis finos, diluir 10:100 y fijar al aire, en una placa y luego introducir en la formulación de FIX (solución de fijación) por 10 segundos. Después, colocar la formulación en el tinte A durante 20 segundos, luego lavar con agua destilada para eliminar el exceso de tinte, luego colocar en el tinte B durante 5 segundos, seguido de esto enjuagar nuevamente con agua destilada, luego dejar secar a temperatura ambiente. Para calcular la morfología, se debe contar al menos 200 espermatozoides, se observan los bordes de la cabeza y cola de azul, mientras que la cabeza es violeta.

Criopreservación del semen bovino

Historia e importancia

A inicios del siglo XX, el investigador ruso Ivanov precedió a inseminar a 500 yeguas. En 1913, este encontró un carnero muerto congelado en medio de la nieve, en este logró evidenciar que el semen congelado, contenía espermatozoides vivos, capaces de fertilizar, desde entonces comenzó a buscar la manera de permitir que los espermatozoides vivan más (Malama et al., 2017). La criopreservación tiene las siguientes fases (Figura 7):

Figura 7

Fases de la criopreservación



Nota. Modificado de Gálvez (2022).

Dentro de cada fase, se genera un efecto sobre la estructura de la membrana y el metabolismo celular, es por ello que el espermatozoide tiende a disminuir su viabilidad,

cabe recalcar que la criopreservación genera una alteración del ADN, en el espermatozoide (Gálvez, 2022).

Dilutores para la congelación

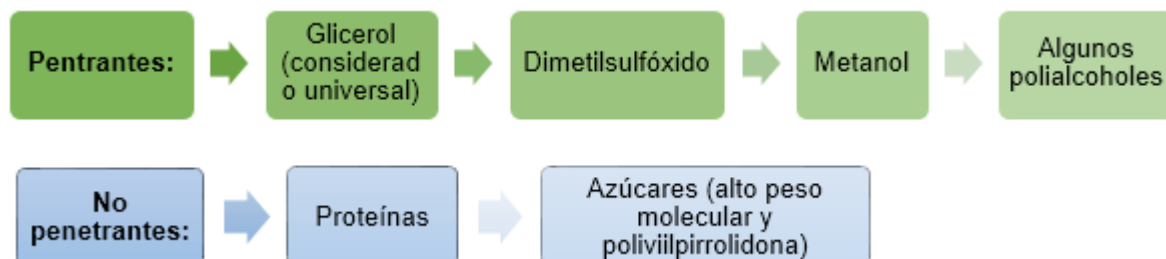
Estos son la solución acuosa que aumenta el volumen del líquido eyaculado, permite conservar la vitalidad de los espermatozoides y preserva la fertilidad, este debe cumplir ciertos requisitos relacionados con el pH, capacidad buffer, presión osmótica y fuerza iónica. A su vez los dilutores deben proporcionar una fuente básica de energía para la conservación de los espermatozoides, uno de los principales requisitos de los dilutores es que deben brindar protección a los espermatozoides, incluyendo la mitigación del crecimiento bacteriano (Gadea, 2003).

Crioprotectores o diluyentes de congelación

Esto tienden a proteger a los espermatozoides de diversos daños durante la criopreservación, estos pueden ser penetrantes (tienen capacidad de retener agua y permiten la generación de cristales) o no penetrantes (no permiten la formación de cristales, permite deshidratar a las células), como se describe en la figura 8 (Medeiros et al., 2002):

Figura 8

Tipos de crioprotectores



Nota. Modificado de Medeiros y colaboradores (2002).

Principales componentes de los diluyentes

Moléculas estabilizantes. Entre las moléculas estabilizantes se encuentran:

Yema de Huevo. Este se considera el componente principal en casi la totalidad de los diluyentes destinados a refrigerar y congelar, se estima que permite una conservación de espermatozoides bovinos a 5 °C (Salamon & Marwell, 2000).

Lecitina de Soja. Este es un crioprotector vegetal, considerado como una de las mejores alternativas al momento de no desear usar la yema de huevo, aparentemente no existen efectos citotóxicos o negativos que afecten a los espermatozoides (Salazar, 2016).

Quelantes. Estos reducen las concentraciones de calcio sobre la membrana plasmática, ya que, durante el congelamiento, se incrementa la absorción de calcio, dando inicio a la capacitación celular (Tapia & Tello, 2016).

Tampones. Estas sustancias amortiguan y estabilizan el pH interno (Tapia & Tello, 2016).

Antioxidantes. Este permite generar un bloqueo ante el estrés oxidativo de la membrana espermática, los principales componentes son la taurina, aminoácido sulfatado, glutatión, cisteamina entre otros (Salamon & Marwell, 2000).

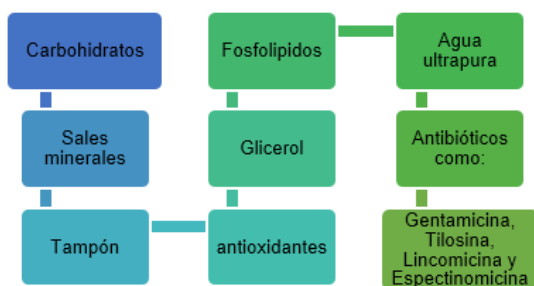
Vitamina C. Este se considera un componente anti-infeccioso y antitóxico, que trabaja conjuntamente con diversos antibióticos, creando defensas orgánicas, a la vez se utiliza para controlar manifestaciones anafilácticas (Megagro, 2021).

Diluyente comercial Optixcell

Este diluyente permite eliminar el uso de la yema de huevo, ya que este es propenso a permitir contaminación del semen, este producto no tiene partículas, permitiendo facilidad al momento de analizar sobre el microscopio o sistema CASA, a la vez que mejora la calidad de conservación de las muestras, en la figura 9, se describen sus componentes (IMV Technologies, 2020):

Figura 9

Componentes del diluyente OptiXcell



Nota. Tomado de IMV Technologies (2020).

Congelamiento del semen bovino

El proceso de congelación se lleva a cabo, mediante dos métodos:

Método convencional

En este caso las pajillas deben ser arregladas dentro de una gradilla metálica y ser introducidas en un refrigerador a 4 °C, por un lapso de cuatro horas, luego se retiran las muestras y se transfieren a una caja de poliestireno, que contenga nitrógeno líquido, estas deben ser ubicadas a 6 cm antes de alcanzar el nitrógeno, por un periodo de tiempo de 20 minutos, finalmente se introduce las pajillas al nitrógeno líquido y se almacenan dentro de un termo (Vasconcelos-Filho, 2010).

Método automático

En este caso, luego de envasar las pajillas se refrigeran y congelan mediante el protocolo estándar del equipo congelador (Vasconcelos-Filho, 2010).

Curvas de congelamiento de pajuelas

Las curvas de congelamiento pueden ser programadas según sea el equipo utilizado, de forma general las curvas más utilizadas en este medio son las siguientes (Tabla 1, 2 y 3):

Tabla 1

Curva de congelamiento estándar de pajuelas (Curva lenta)

Temperatura inicial (°C)	Temperatura objetivo (°C)	Velocidad de descenso °C/min	Tiempo total de congelamiento
T ambiente	5	-0,5	
5	5	0	Aproximadamente
5	-10	-5	4 horas y media
-10	-100	-40	TmE=4 h
-100	-140	-20	

Nota. Modificado de Vallecillo (2011).

Tabla 2

Curva de congelamiento estándar de pajuelas (Curva rápida)

Temperatura inicial (°C)	Temperatura objetivo (°C)	Velocidad de descenso °C/min	Tiempo total de congelamiento
T ambiente	5	-0,5	
5	5	0	Aproximadamente
5	-10	-5	2 horas y media
-10	-100	-40	TmE= 2 h
-100	-140	-20	

Tabla 3

Curva de congelamiento programada según el equipo DigitCool y utilizando el diluyente OptiXcell

Temperatura inicial (°C)	Temperatura objetivo (°C)	Velocidad de descenso °C/min	Tiempo total de congelamiento
T ambiente	4	-1	
4	4	0	Aproximadamente
4	-10	-5	3 horas y media
-10	-100	-40	T _{mE} =3 h
-100	-140	-20	

Nota. Modificado de IMV Technologies (2020).

Daños producidos durante la crioconservación del semen

Capacitación prematura

Esto sucede cuando existe una concentración alta de calcio, permitiendo la activación de las proteínas kinasas, ocasionando la disminución de temperatura, por lo que se genera una alteración en la membrana espermática, lo que provoca una reacción acrosómica (Quishpe, 2021).

Deshidratación celular extrema

Los espermatozoides son sometidos a una deshidratación, esto sucede cuando el enfriamiento se desarrolla de forma extremadamente lenta, lo que permite el colapso de la membrana (Quishpe, 2021).

Formación de cristales intracelulares

Es el resultado de la aplicación de bajas temperaturas de forma rápida, lo que evita que salgan los líquidos intracelulares, para que se formen los cristales en la parte interna del espermatozoide (Quishpe, 2021).

Formación de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Estos afectan al espermatozoide de forma tóxica, alterando su funcionalidad; el incremento de ROS se mantiene relacionado con la mortalidad directa de los espermatozoides (Quishpe, 2021).

Evaluación de la motilidad del semen bovino pos-congelado

Se estima que la motilidad progresiva del semen descongelado, se debe determinar dos veces, cuando recién este es descongelado y luego de dos horas siendo incubado a 37

°C, se considera que el semen de buena calidad debe tener de 40 a 50% de motilidad progresiva en la primera observación, mientras que en la segunda debe mantenerse entre 10 y 15%, cabe considerar que la norma ISO 9002, menciona que la motilidad progresiva en la primera observación debe ser de 25% y dos horas después bajo incubación debe ser de 15% (Catena & Cabodevila, 2013).

Análisis de motilidad considerando el equipo CASA

A continuación, se exponen los parámetros de la velocidad de los espermatozoides, para determinar la motilidad (Figura 11) y los parámetros de angularidad y oscilación de la cabeza según el equipo CASA (Figura 10).

Figura 10

Parámetros de angularidad y oscilación según el equipo CASA

ALH (Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza):	• Es el desplazamiento que efectúa la cabeza espermática en su trayectoria curvilínea de un lado a otro de la trayectoria media o lineal
BCF (Frecuencia de batido):	• Es la frecuencia con la que la trayectoria curvilínea atraviesa la trayectoria lineal o media en función del tiempo

Nota: Modificado de Muiño, Tamargo, Hidalgo y Peña (2007).

Figura 11

Parámetros de velocidad según el equipo CASA

VCL (Velocidad Curvilínea)	• Distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria real por unidad de tiempo
VSL (Velocidad rectilínea):	• Distancia recorrida por el espermatozoide entre el primer y el último punto de su trayectoria por unidad de tiempo
VAP (Velocidad Media):	• Distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de la trayectoria media
LIN (Índice de Linealidad):	• Es la relación porcentual entre la Velocidad Rectilínea y la Velocidad Curvilínea. LIN: $(VSL / VCL) \times 100$
STR (Índice de Rectitud):	• Es la relación porcentual entre la Velocidad Rectilínea y la Velocidad Lineal. STR: $(VSL / VAP) \times 100$
WOB (Índice de Oscilación):	• Es la relación porcentual entre la Velocidad Lineal y la Velocidad Rectilínea. WOB: $(VAP / VCL) \times 100$

Nota. Modificado de Muiño, Tamargo, Hidalgo y Peña (2007).

Capítulo III

Metodología

Localización del área de investigación

El trabajo de investigación se ejecutó en el Laboratorio de la Biotecnología de la Reproducción Animal de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE-Santo Domingo, la cual se encuentra ubicada en la parroquia Luz de América, a margen izquierdo del km 24 de la vía Santo Domingo-Quevedo.

En cuanto a la ubicación geográfica (figura 12) específica del área de investigación fue en las siguientes coordenadas:

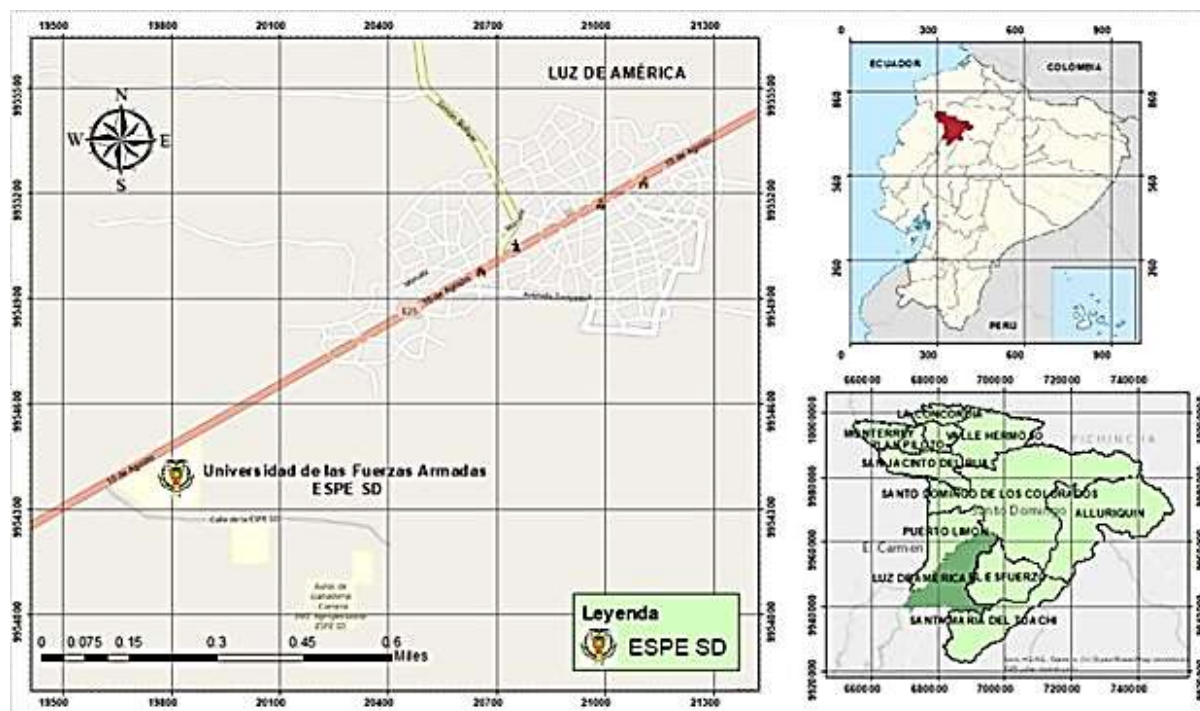
Latitud: $00^{\circ} 24' 36''$

Longitu: $79^{\circ} 18' 43''$

Altitud: 270 msnm

Figura 12

Mapa de la ubicación geográfica del área de investigación



Nota. Croquis representativo donde se desarrolló la parte experimental de la presente investigación

Materiales usados en la investigación

Tabla 4

Materiales implementados en el trabajo de titulación

Materiales	Equipos	Reactivos	Muestras
Cámaras lejas	Aspiradora	Agua bidestilada	Semen bovino de la raza Gyrholando de toros de 5 años.
Frascos de vidrio de 250 mL	Autoclave	Agua ultrapura	
Fundas ziploc	Baño María	Alcohol etílico (70%)	
Gradillas	Bidestilador	Diluyente OptiXcell	
Cámaras lejas	Cámara de flujo laminar	Eosina	
Jeringas de 1 mL	Envasadora y selladora	Nigrosina	
Manguera para llenado y succión	Equipo CASA	Nitrógeno líquido	
Marcadores		Pack de tinción Farely	
Jeringas de 1 mL	Autoclave	Vitamina C (5 mM)	
Pisetas	Estufa		
Placas cubre objetos y porta objetos	Fotómetro SDM1		
Placas Petri	Impresora de pajuelas		
Pisetas	Microscopio de contraste de fase		
Puntas para micropipetas (blancas, amarillas y azules)	Platina térmica		
Tijeras	Potenciómetro o pHmetro portátil		
Tubo de colecta graduado	Termo de nitrógeno líquido		
Microcubetas	Termómetro digital		
Micropipetas (5, 500 y 1000 μ L)	Equipo IceCube		
Micropipetas (10-100 μ L)			
Papel aluminio			
Pajuelas de 0,5 mL			
Papel kraft			
Pinzas			
Porta objetos			
Probeta de 100 mL			
Probeta de 50 mL			
Protector de vagina artificial			
Tubos de ensayo			
Vagina artificial			
Vasos de precipitación de 100, 250 y 500 mL			

Procedimiento

Limpieza y desinfección del laboratorio previo al congelamiento

La limpieza y desinfección se realizó de 24 a 48 horas antes de la congelación del semen bovino. Se aspiró las ventanas, piso, puertas y techo con la finalidad de eliminar partículas de polvo e insectos que entran al laboratorio. Luego, se desinfectó los mesones con alcohol al 70% y agua bidestilada (una vez por semana y dos días antes del congelamiento se limpió los mesones con hipoclorito de sodio al igual que el piso). Además, se limpió con jabón neutro y agua bidestilada los materiales a ocupar para el congelamiento (frascos de vidrios, probetas, vasos de precipitación, puntas de micropipetas, tubos de colecta, tubos de ensayo y porta objetos).

Una vez enjuagado los materiales con agua bidestilada, se procedió a envolverlos con papel kraft y autoclavarlos a 121 °C por 15 a 20 minutos (el material de plástico se autoclavó separado del de vidrio por 15 minutos y el de vidrio por 20 minutos). Por consiguiente, cada uno de los materiales se autoclavaron, además con la ayuda de unas pinzas y guantes se procedió a sacar el papel kraft. Por último, de forma inmediata se los colocaron en la estufa a 70 °C para su respectivo secado.

Etiquetado, impresión y esterilización de las pajuelas

El etiquetado, impresión y esterilización de las pajuelas se lo realizó 24 horas antes del congelamiento del semen bovino. Después, se utilizó 160 pajuelas para los diferentes tratamientos (20 pajuelas para cada tratamiento). La impresión de pajuelas, se ejecutó colocando en primer lugar, el timbre taquigráfico con la información de los toros a evaluar en el cilindro de la impresora de pajuelas. Luego, se impregnó 1,5 cm de pasta de tinta negra en el rodillo distribuidor y una gota de diluyente de tinta. Finalmente, se procedió a la impresión de las pajuelas.

Preparación del laboratorio para la llegada del semen bovino

Se agregó agua bidestilada en tres baños María, para mantener 3 diferentes temperaturas (30 °C conservar el semen en reposo; 32 °C para la preparación del diluyente; y 37°C para la evaluación de motilidad y viabilidad del semen). Posteriormente, se

prendieron tres platinas térmicas a 37°C y se colocó sobre una de ellas porta objetos, cubre objetos y puntas de micropipetas. Después se colocaron en los baños Marías, gradillas con tubos de ensayos esterilizados, respectivamente etiquetados y tapados con tapas de papel aluminio. Inmediatamente, se encendió el equipo CASA a 37 °C.

Preparación del medio con diluyente OptiXcell

El volumen total de la dilución madre se lo realizó a partir del cálculo entre la concentración, volumen y N° de dosis de pajuelas requeridas de 0,5 mL:

$$\text{Concentración total} = \text{Concentración del fotómetro} \left(\frac{10^6}{\text{mL}} \text{ espermatozoides} \right) * \text{Volumen (mL)}$$

$$\text{N° de dosis totales (pajuelas)} = \text{Concentración total} * \frac{0,5 \text{ mL} \rightarrow (1 \text{ dosis de } 0.50 \text{ ml})}{30 * 10^6 \text{ de espermatozoides}}$$

$$\text{Dilución madre total} = \text{N° de dosis totales (pajuelas)} * \frac{1}{2} \rightarrow \left(\frac{1 \text{ ml de volumen}}{2 \text{ pajillas de } 0.50 \text{ ml}} \right)$$

En base al cálculo de la dilución madre total, se procedió a dividir para 3, puesto que para la dilución con agua y diluyente OptiXcell es de 2:1, respectivamente. Por consiguiente, en una probeta se llenó la 2/3 partes de la dilución madre total con agua bidestilada o ultrapura y se la colocó a 32 °C en el baño María por 15-20 minutos (se debe tapar previamente la probeta con papel aluminio). Luego, en un frasco de vidrio de 250 mL (dependiendo del volumen se requirió la medida) se llenó la 1/3 parte de la dilución madre total con diluyente OptiXcell y se lo colocó a 32 °C en el baño María por 15-20 minutos (se debe tapar previamente el frasco con aluminio). Finalmente, el agua de la probeta se traspasó al frasco con el diluyente OptiXcell de forma cuidadosa y se homogenizó lentamente (todo este proceso se realizó dentro del baño María a 32 °C).

Recolección del semen y llegada del semen bovino al laboratorio

Para la extracción del semen se utilizaron vaginas artificiales identificadas para cada donador, 24 horas antes se esterilizaron a 36-37 °C. Además, se procedió a llenar las vaginas artificiales con agua a 45 °C, junto a su adicción de la protección térmica. Luego se transportó cada vagina artificial hasta el montadero. Se realizó dos montas falsas del bovino cuya finalidad es la de producir mayor excitación para elevar la concentración y motilidad

espermática. A continuación, se recolectó la tercera monta, desviando el pene del donador hacia la vagina artificial. Para ello, se protegió la muestra espermática de la luz solar. Después, se transportó la muestra recolectada hacia el laboratorio para su respectivo análisis y congelamiento.

Evaluación del semen bovino fresco

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. Los parámetros macroscópicos fueron evaluados basándose en el protocolo de Gómez y Migliorisi (2007):

Temperatura y pH. Se midió el pH y la temperatura con el pHmetro portátil que contiene también un medidor de temperatura. Para ello, previamente el sensor de temperatura se dejó en el baño María a 30 °C, específicamente en un tubo de ensayo con agua bidestilada, posteriormente para sumergirlo en la muestra, se lo limpió con papel toalla y se midió. En el caso del pH, se sacó del tubito con agua a el sensor, se lo enjuago con agua bidestilada y se lo secó para posteriormente sumergirlo en la muestra y hacer su respectiva medición.

Volumen. Se midió con la ayuda del tubo de colecta graduado (observación cualitativa).

Cuerpos extraños. Se describió por observación cualitativa, donde si había precipitado de cualquier partícula extraña al semen en el tubo de colecta, es positivo, caso contrario, negativo. Después de haber realizado la evaluación macroscópica, se colocó a la muestra en el baño María a 30 °C, ya que a esta temperatura los espermatozoides están en reposo. Cabe mencionar que esta evaluación fue rápida (menos del minuto), puesto que puede ocurrir un shock térmico en la muestra seminal, afectando a la motilidad y viabilidad de los espermatozoides.

Color. Se describió por observación cualitativa. Por ello, se determinó la coloración tomando en cuenta los parámetros observados en la tabla 5.

Tabla 5*Indicación según el color de la muestra seminal*

Color	Indicación
Blanco cremoso (tiende a tono mafil)	Semen normal
Amarillo intenso	Presencia de orina. En el caso de los bovinos, esta tonalidad se puede originar por la acentuada producción de lipocromo especial en la ampolla del conducto deferente. Es decir, por la riboflavina que se encuentra en las secreciones de las glándulas vesiculares, la cual se diferencia con la raza, alimentación y con el donador.
Verdoso	Infección bacteriana
Rojizo	Lesión en el aparato reproductor que indica presencia de sangre.

Nota. Información modifica de Gómez y Migliorisi (2007).

Evaluación microscópica del semen sin antioxidante y preparación de la

dilución 1:1. Para esta evaluación se requirió previamente la preparación de la dilución madre con agua y OptiXcell (2:1), puesto que para este tipo de evaluación se necesita de la dilución 1:1 entre el semen fresco y la dilución madre. Para ello, se colocó en un frasco de vidrio vacío de 250 mL a 32 °C, el mismo volumen del semen fresco de la dilución madre (traspasando de forma cuidadosamente e inclinada por las paredes del frasco), luego se tomó el semen extraído que se encontraba a 30 °C y se lo traspasó al frasco de vidrio con la dilución madre de igual volumen, se homogenizó lentamente (todo esto a 32 °C). Finalmente, preparada la dilución 1:1, se tomó y colocó 1 mL (1000 µL) en un tubo de ensayo, se lo tapó con papel aluminio y se lo transportó al baño María a 37 °C para su respectiva evaluación microscópica:

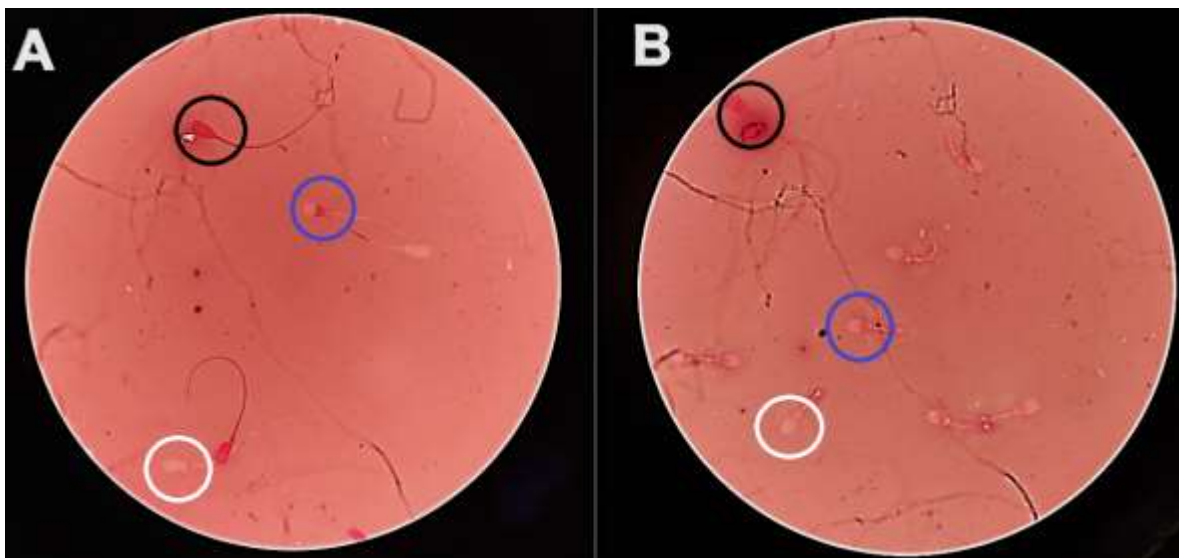
Concentración. Se colocaron 25 µL de la muestra seminal fresca en una microcubeta, previniendo la presencia de burbujas en el llenado, puesto que estas darán lecturas erróneas en el fotómetro SDM1. Luego, se colocó la microcubeta con el semen en la cámara del fotómetro y se cerró la cámara. Por último, se observó en la pantalla del equipo el resultado expresado en 10^6 espermatozoides/mL (Una concentración buena para congelar es a partir de 800×10^6 de espermatozoides/mL).

Motilidad. Se dejó por 1 a 2 minutos el tubo de ensayo en el baño María, para que se activen los espermatozoides, se tomó 10 μL de la dilución 1:1, se la colocó en la cámara Leja a 37 °C y se observó la motilidad con el microscopio del sistema CASA, tomando las medidas sin mucha diferencia significativa. Cabe mencionar que, se volvió analizar la motilidad después de 30 minutos.

Viabilidad. Del tubo de ensayo con la dilución 1:1, se tomó 20 μL y se colocó en un portaobjeto a 37 °C (al mismo tiempo que se midió la primera motilidad). Luego de 20 segundos, se mezcló la muestra con 10 μL de eosina y de igual forma con 10 μL de nigrosina. Posteriormente, se homogenizó y se realizó el frotis de la muestra con la ayuda de otro portaobjetos con borde liso (sin presencia de huecos) y se dejó secar la tinción de 3 a 5 minutos. Finalmente, se observó la presencia de espermatozoides vivos y muertos de la placa teñida en el microscopio con un lente de 100x y colocando una gota de aceite inmersión sobre dicha placa (figura 13). Cabe mencionar que, para obtener el porcentaje de espermatozoides vivos se contabilizó 200 entre vivos y muertos.

Figura 13

Tinción eosina-nigrosina para determinar la viabilidad de los espermatozoides



Nota. La imagen A muestra la evaluación de viabilidad del toro 1 y la imagen B del toro 2. Se contabilizó los espermatozoides como muertos aquellos de color rosado intenso (círculo

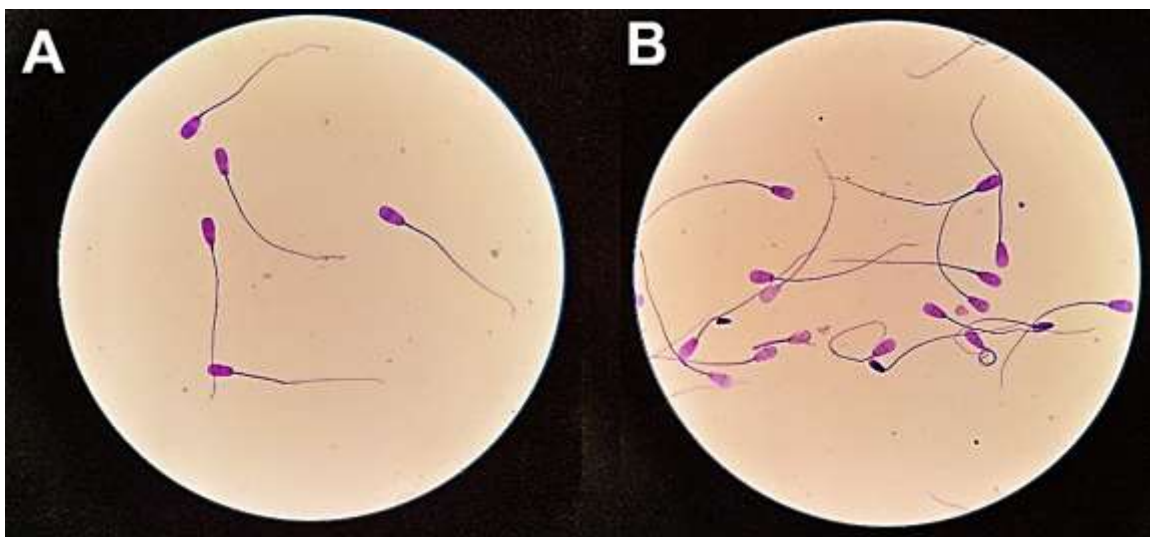
negro) y como espermatozoides vivos a los que están ligeramente teñidos (círculo azul) y los de color transparente o blanco (círculo blanco). Elaboración propia.

Morfología con tinción Farelly. Se tomó 20 μL de la dilución 1:1 y se la colocó en un portaobjetos, se homogenizó y se realizó un frotis con otro portaobjetos de borde liso y se dejó secar en la platina térmica. Posteriormente, se colocó 500 μL del fijador A por un minuto por toda la extensión de la muestra. Luego, se agregó 500 μL del colorante B por un minuto, tras pasado ese tiempo se lavó la placa con agua destilada y se secó con toalla absorbente los filos de la placa. De la misma forma, se agregó 500 μL del colorante C por un minuto, se lavó y se secó. Finalmente, se dejó secar la muestra teñida a 37 °C en la platina térmica (37 °C) por lo mínimo 12 horas. En el microscopio óptico se observaron las anomalías de los espermatozoides, usando el lente de 100x y colocando una gota de inmersión sobre la placa teñida (figura 14). Para determinar el porcentaje de anomalías en espermatozoides se contabilizó 200 espermatozoides totales (anormales y normales) y se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de anomalías} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de espermatozoides con anomalías} * 100\%}{200 \text{ espermatozoides totales (anormales y normales)}}$$

Figura 14

Tinción Farelly para determinar las normalidades y anomalías de los espermatozoides



Nota. La figura A muestra los espermatozoides del toro 1 y la figura B del toro 2. Elaboración propia.

Evaluación microscópica del semen con antioxidante y la preparación de la dilución total a envasar. Una vez calculado la dilución 1:1 y restado el mL de muestra que se analizó anteriormente, se procedió a colocar el complemento de la dilución madre a la dilución 1:1, en dos partes:

Para la primera dilución, del total de la dilución madre calculada anteriormente se dividió por dos, siendo la primera mitad que se debe añadir, para ello se tuvo que considerar restar el diluyente puesto en la dilución 1:1 previamente. Por ejemplo: Si la dilución 1:1 tuvo un total de 12 mL, en primer lugar, se le debe restar 1 mL (mL analizado anteriormente) quedando 11 mL en el frasco, de los 11 mL se dividió para 2 (dilución entre el semen y la dilución madre), teniendo que restar al final 5,5 mL al frasco con la dilución 1:1. Pero si, la dilución total calculada de la dilución madre fue de 54 mL, en primer lugar, a esta dilución se le resta 5,5 mL quedando 48,5 mL de dilución madre a añadir, de este total, la primera mitad sería 24,25 mL, siendo el volumen exacto a añadir a la dilución 1:1, teniendo un total de esta primera dilución de 35,25 mL. Además, cabe mencionar que, esta primera dilución se realizó a 32°C en el baño María por 5 minutos.

Para la segunda dilución, fue necesario una temperatura ambiente de 20°C. Se colocaron dos tubos previamente esterilizados, etiquetados (uno con antioxidante y otro sin antioxidante) y tapados con papel aluminio. Posteriormente, se procedió a colocar en los tubos la primera dilución por partes iguales, y al tubo etiquetado con antioxidante se le añadió vitamina C 5mM (182 µL) con la ayuda de una micropipeta por 5 minutos.

Finalmente, se colocó la mitad faltante de la dilución madre en partes iguales en los dos tubos y se esperó de 15 a 20 minutos antes de envasar en las pajuelas de 0,5 mL.

Posteriormente, se midió la motilidad, viabilidad y morfología del tubo con antioxidante, de la forma anteriormente descrita.

Envasado y congelamiento del semen

Luego de los 20 minutos, se procedió a envasar el semen en pajillas de 0,50 mL, para ello se tomó en cuenta el número total de dosis calculadas anteriormente y se dividió para dos, después se colocó las pajuelas requeridas para cada tratamiento en la tolva de la

envasadora y selladora MPP1, se oprimió el botón star y la máquina inicio el llenado con la manguera llenado/succión conectada al tubo de ensayo (esta manguera se cambió al momento que se realizó el otro llenado con el segundo tratamiento). Se ubicaron las pajuelas en los racks para luego llevarlos al Ice Cube. Para ello, con anterioridad se enchufó y se encendió el IceCube, además se programó la curva para el congelamiento del semen que se va a utilizar (tabla 6 o 7) y se esperó a que se calibrará a 20 °C. Se traspasó las pajuelas al IceCube y se dejó por el tiempo estipulado que da el IceCube. Una vez finalizado este proceso, se pasó las pajuelas con la ayuda de guantes y lo más rápido posible, a los termos de nitrógeno líquido a -196 °C para su respectiva criopreservación.

Tabla 6

Curva 1 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

Tabla 7

Curva 2 de congelamiento programado

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

Con la ayuda de pinzas y guantes, se seleccionó al azar una pajuela que estaba dentro del termo de nitrógeno líquido del lote donde están los tratamientos. Se colocó la pajuela en el baño María a 37 °C por 30-40 segundos. Luego, se secó la pajuela con papel toalla y se cortó con una tijera, un extremo de la pajuela. Se puso la muestra de la pajuela descongelada en un tubo de ensayo. Se dejó la dilución por un periodo de 30 segundos a 1

minuto y se tomó 10 μL de la muestra descongelada. Después, se ubicó a la muestra en la cámara Leja a 37 °C y se observó con el microscopio del sistema CASA (evaluación motilidad). Finalmente, se procedió de la misma forma con el resto de pajuelas criopreservadas con los diferentes tratamientos.

Evaluación del semen bovino descongelado

Se evaluó motilidad, viabilidad y morfología de igual manera que las evaluaciones microscópicas del semen bovino fresco.

Capítulo IV

Diseño experimental

Factores y niveles

En la tabla 8 se muestra los factores y niveles empleados en la investigación.

Tabla 8

Factores de la investigación con sus respectivos niveles

Factor	Niveles
Tipo de semen bovino	Pre-congelado Post-descongelado
Aplicación de la curva-antioxidante	Curva 1 sin antioxidante (C1A0) Curva 1 con anti oxidante (C1A1) Curva 2 sin antioxidante (C2A0) Curva 1 con antioxidante (C2A1)

Tratamientos a comparar

En la tabla 9 se muestra los tratamientos de la investigación, los cuales se obtuvieron al combinar los niveles de los dos factores.

Tabla 9

Tratamientos de la investigación

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

Diseño aplicado en la investigación

En la investigación se ocupó un Diseño Completamente Aleatorizado (DCA) bifactorial, para ello se consideró los factores expuestos en la tabla 8.

Número de repeticiones y unidades experimentales

En la investigación se desarrolló 4 repeticiones para los 8 tratamientos descritos en la tabla 9, por ende, el número de unidades experimentales de esta investigación fue de 32, donde se consideró las pajuelas pre-congeladas y post-descongeladas de los dos bovinos reproductores de la raza Gyrholando (donadores del semen).

Parámetros y análisis estadístico

Los datos de la evaluación macroscópica del semen fresco (temperatura, pH, volumen, color y cuerpos extraños) fueron organizados en una tabla en Microsoft Excel, donde los tres primeros parámetros (variables cuantitativas) se estimaron mediante un promedio de las medidas obtenidas durante los días de colecta del semen bovino Gyrholando.

En cuanto a los datos obtenidos de la evaluación microscópica, para la concentración del semen fresco de toros Gyrholando se realizó la misma organización de las variables cuantitativas de la evaluación macroscópica. Mientras que, para los datos de motilidad, viabilidad y morfología se organizaron y sometieron a una estadística descriptiva, donde se comparó los dos factores de estudio de la investigación, mediante tablas y gráficos de barra con media \pm error típico junto a intervalos de confianza del 95% utilizando el software estadístico IBM SPSS.

Capítulo IV

Resultados y discusión

Evaluación macroscópica del semen bovino

Variables cuantitativas

En la tabla 10 se muestra los parámetros cuantitativos obtenidos de la evaluación macroscópica del semen fresco de dos toros de la raza Gyrholando (Temperatura, pH y volumen) de aproximadamente 5 años de edad, pertenecientes a la Universidad de la Fuerzas Armadas ESPE-Santo Domingo.

Tabla 10

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

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

Nota. Los promedios fueron obtenidos con la herramienta Microsoft Excel.

De acuerdo a la literatura, para 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). Por ello, se puede mencionar que el volumen de eyaculado colectado con vagina artificial del toro 1 cumple con esta normalidad, ya que es de 8 mL, a diferencia del toro 2 que su volumen se encuentra entre el valor mínimo requerido para considerarlo normal. Puesto que, los sementales más jóvenes producen menor volumen de eyaculado, además, la elevada frecuencia de eyaculación de los bovinos disminuye el volumen promedio y cuando se realizan dos eyaculados consecutivamente, el segundo suele tener menor volumen. Por ende, si el volumen es reducido no es perjudicial, aunque si se acompañará de una concentración espermática baja podría serlo, puesto que de ello depende, el resultado de número de pajuelas a evaluar (Ax et al., 2000).

Sin embargo, hay que tener en cuenta, que el volumen del eyaculado de los bovinos no depende solo del método de extracción y de la edad, sino también del estado de salud del animal, factores ambientales, destreza del colector (operario) y las frecuencias de colecta a lo largo de cada extracción, por lo cual es muy variable. Es así que muchos autores difieren en cuál es el volumen medio idóneo del eyaculado de toros mayores a 2 años para considerarlo como una muestra de buena CS: de 4-8 mL (Hunter, 1987; Illera, 1984); de 5,1 para las razas Holstein y de 4,1 mL para la raza Jersey, respectivamente (Christensen et al., 1999); de 4,8 - 7,0 mL (Fuerst et al., 2006) y de 5,1 mL (Muiño, 2008).

En cuanto al pH de los sementales evaluados, se puede mencionar que de acuerdo al protocolo para la evaluación del semen en rumiantes de Gómez y Migliorisis (2007), se considera un pH normal del eyaculado bovino, entre 6,2 – 6,8. Al comparar este protocolo con los bovinos evaluados, se puede destacar que ambos rumiantes de raza Gyrholando cumplen con este parámetro, tal como se muestra en la tabla 10. Además, el pH de los bovinos varía principalmente según su alimentación; las raciones altas en carbohidratos no estructurales disminuyen el pH, a diferencia de las dietas ricas en carbohidratos estructurales, las cuales regulan el pH a su límite superior (Garay et al., 2012). Esto explica por qué los toros 2 y 1 no varían tanto su valor de pH (6,61 y 6,49, respectivamente), puesto que su tipo de alimentación (sales minerales, balanceado y melaza) fue la misma durante toda la investigación. Sin embargo, hay que destacar que un pH alcalino en los bovinos, indica que los toros posiblemente tengan una escasa fertilidad, puesto que este tipo de pH, muchas veces va acompañado de una disminución en concentración espermática y motilidad (Salisbury et al., 1978).

Con lo mencionado anteriormente, se puede decir que el semen de buena CS debe tener un pH neutro. Mientras que, el semen de mala CS abarca una cantidad proporcionalmente mayor de líquido proveniente de las glándulas uretrales y accesorias. Puesto que, las células espermáticas descomponen la fructosa del semen en ácido láctico, específicamente en ausencia de oxígeno (condiciones anaerobias), que usualmente existe en los estrechos tubos de recogida. Además, otro factor a tomar en cuenta es que el pH del

semen bovino disminuye con el tiempo, desde la colecta hasta su evaluación en el laboratorio (Ax et al., 2000).



Para el ganado bovino la temperatura corporal normal se encuentra ente 37,8 - 40,0 °C, puesto que, a este intervalo de temperatura, las actividades a nivel celular y las actividades bioquímicas funcionan con mayor eficiencia y eficacia; sin embargo el mantenimiento de la temperatura testicular se encuentra de 4 o 5 °C por debajo de la temperatura corporal, por ello al momento de la recolección del semen con la vagina artificial, la temperatura del eyaculado bovino es de aproximadamente 32-35 °C (Brito et al., 2002). Por esta razón, al momento que el semen llega al laboratorio, la temperatura disminuye por el descenso de temperatura transcurrido desde la colecta hasta el laboratorio (Brito et al., 2002). Comparando lo mencionado, con los resultados obtenidos de los toros Gyrholando (Toro 1 y toro 2), se puede apreciar que efectivamente este proceso se cumple, pues la temperatura de ambos es por debajo de los 32 °C, como se aprecia en la tabla 10.

Variables cualitativas

El color del semen bovino de los toros Gyrholando se apreció directamente en el tubo colector, por observación cualitativa, tal como se muestra en la tabla 11. Esta valoración se la realizó menos de los 3 minutos desde la colecta. Además, al mismo tiempo de la apreciación del color, se visualizó posibles irregularidades en cuanto a cuerpos extraños al final del tubo colector.

Tabla 11

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	

Nota. En la presente tabla se describe los parámetros de color y cuerpos extraños de los bovinos evaluados en la investigación, los cuales fueron descritos por observación cualitativa.

El color del eyaculado bovino de buena CS debe ser de un color blanco lechoso tendiendo a cremoso (Bhattacharyya et al., 2009). También, 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, por ende, también se considera un color normal. Sin embargo, este color no debe confundirse con un color amarillento debido a la presencia de orina, para ello, se debe diferenciar por el olor fuerte a amoníaco, el cual es espermicida (Hafez & Hafez, 2002). Por tal motivo, los eyaculados de los sementales 1 (blanco lechoso) y 2 (amarillo blanquecino sin olor a amoníaco), presentan un color de semen normal según la literatura. Además, según Ax y colaboradores (2000) mencionan que el color del semen tiene relación con la concentración espermática, donde si es traslúcido presenta menos de 250-400 millones de espermatozoides, si es lechoso indica aproximadamente de 400-750 millones de espermatozoides, y si es cremoso espeso mayor a 750 millones de espermatozoides.

Por otra parte, el eyaculado para su evaluación microscópica debe estar libre de pelo, tierra, pasto, heces y polvo, los cuales son indicativos de cuerpos extraños en la muestra. Estos cuerpos extraños usualmente se precipitan al fondo del tubo colector, como se observó en la muestra del toro 2 (tabla 11), que presento un precipitado negro al fondo del tubo, por ello se desechó el material extraño y se continuo con la evaluación. Cabe mencionar que, la presencia de estos cuerpos extraños en el eyaculado es debido a una mala técnica de colecta del semen (Ax et al., 2000).

Evaluación microscópica del semen bovino

Concentración

Las concentraciones espermáticas del semen bovino de los dos toros de la raza Gyrholando se puede apreciar en la tabla 12.

Tabla 12

Concentración seminal promedio de los dos toros Gyrholando evaluados previo a la congelación

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

Nota. En la presente tabla se describe el promedio de la concentración seminal de los bovinos evaluados en la investigación, los promedios fueron obtenidos con la herramienta Microsoft Excel.

El semen de los toros evaluados dentro del proceso de recolección tuvo las siguientes concentraciones espermáticas: para el toro 1 312×10^6 espermatozoides por mililitro (esp./mL), y para el toro 2 1080×10^6 esp./mL. Al comparar estos resultados con los estudios de Krause y Dittmar (1962) donde obtuvieron que la concentración del semen bovino fresco debe ser mayor a 800×10^6 esp./mL para considerarlo de buena CS y de 500×10^6 esp./mL para ser considerado un eyaculado de CS regular, además de ser el valor

mínimo para un proceso de congelamiento, ya que de este parámetro de evaluación depende el número de pajuelas a realizar.

En cuanto a literatura, menciona que la concentración espermática de los toros debe ser como mínimo aceptable de 200×10^6 esp./mL en jóvenes y de 750×10^6 esp./mL en los maduros (Hafez & Hafez, 2002). Aunque, la concentración no solo varía de acuerdo a la edad, sino por el método de extracción del semen, la época del año, desarrollo sexual, forma de alimentación, la condición corporal y el tamaño de los testículos. Por ello, Elhordoy y colaboradores (2010) destacaron que en toros de raza Hereford de un año y medio con baja condición corporal, una concentración promedio es de 370×10^6 esp./mL. Por tal motivo, se puede destacar que en esta investigación el toro 2 (1080×10^6 esp./mL) presentó parámetros normarles de concentración espermática e idóneos para la congelación, mientras que el toro 1 no cumplió con el mínimo aceptable (312×10^6 esp./mL), esto puede ser debido a que presento una ligera infección a nivel reproductivo.

Motilidad y motilidad progresiva

En la tabla 13 se puede apreciar que entre el tipo de semen (pre y post-descongelado) si existe diferencia significativa ($p < 0,05$) para lo motilidad total y progresiva a los tiempos 0 y 30 minutos. Sin embargo, para la curva-antioxidante y la interacción de tipo de semen y curva-antioxidante no existe diferencia significativa ($p > 0,05$) en los parámetros descritos en la tabla 13.

En cuanto a la tabla 14 y figura 15, se puede apreciar y observar las medias de los parámetros de motilidad total y progresiva a los tiempos 0 y 30 minutos evaluados en el equipo CASA, donde se permite destacar que, entre todos los tratamientos aplicados después de la congelación, la media con mejores resultados representa la curva uno con la aplicación del antioxidante (vitamina C 5 Mm). En cuanto al tiempo, los mejores resultados evaluados en el equipo CASA fueron observados en la evaluación a los 30 minutos tanto en la motilidad total y progresiva en todos los tratamientos.

Tabla 13

Prueba de los efectos inter-sujetos de motilidad total y motilidad progresiva medidas a dos tiempos (0 y 30 min)

Origen		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	Motilidad 0 min (%)	16301,572 ^a	7	2328,796	30,635	,000
	Motilidad progresiva 0 min (%)	15945,889 ^b	7	2277,984	23,246	,000
	Motilidad 30 min (%)	14100,293 ^c	7	2014,328	12,025	,000
	Motilidad progresiva 30 min (%)	12963,508 ^d	7	1851,930	9,469	,000
Intersección	Motilidad 0 min (%)	83634,365	1	83634,365	1100,204	,000
	Motilidad progresiva 0 min (%)	52096,692	1	52096,692	531,626	,000
	Motilidad 30 min (%)	95234,481	1	95234,481	568,521	,000
	Motilidad progresiva 30 min (%)	58931,736	1	58931,736	301,311	,000
Tipodesemen	Motilidad 0 min (%)	15660,960	1	15660,960	206,019	,000
	Motilidad progresiva 0 min (%)	15470,405	1	15470,405	157,869	,000
	Motilidad 30 min (%)	12918,272	1	12918,272	77,118	,000
	Motilidad progresiva 30 min (%)	12106,847	1	12106,847	61,901	,000
Curvaantioxidante	Motilidad 0 min (%)	244,336	3	81,445	1,071	,380
	Motilidad progresiva 0 min (%)	88,507	3	29,502	,301	,824
	Motilidad 30 min (%)	123,347	3	41,116	,245	,864
	Motilidad progresiva 30 min (%)	169,376	3	56,459	,289	,833
Tipodesemen * Curvaantioxidante	Motilidad 0 min (%)	396,276	3	132,092	1,738	,186
	Motilidad progresiva 0 min (%)	386,977	3	128,992	1,316	,292
	Motilidad 30 min (%)	1058,673	3	352,891	2,107	,126
	Motilidad progresiva 30 min (%)	687,285	3	229,095	1,171	,341
Error	Motilidad 0 min (%)	1824,412	24	76,017		
	Motilidad progresiva 0 min (%)	2351,880	24	97,995		
	Motilidad 30 min (%)	4020,302	24	167,513		
	Motilidad progresiva 30 min (%)	4694,025	24	195,584		
Total	Motilidad 0 min (%)	101760,349	32			
	Motilidad progresiva 0 min (%)	70394,461	32			
	Motilidad 30 min (%)	113355,077	32			
	Motilidad progresiva 30 min (%)	76589,269	32			
Total corregida	Motilidad 0 min (%)	18125,983	31			
	Motilidad progresiva 0 min (%)	18297,769	31			
	Motilidad 30 min (%)	18120,595	31			
	Motilidad progresiva 30 min (%)	17657,533	31			

a. R cuadrado = ,899 (R cuadrado corregida = ,870)

b. R cuadrado = ,871 (R cuadrado corregida = ,834)

c. R cuadrado = ,778 (R cuadrado corregida = ,713)

d. R cuadrado = ,734 (R cuadrado corregida = ,657)

Nota. Tomado del software estadístico IBM SPSS.

Tabla 14

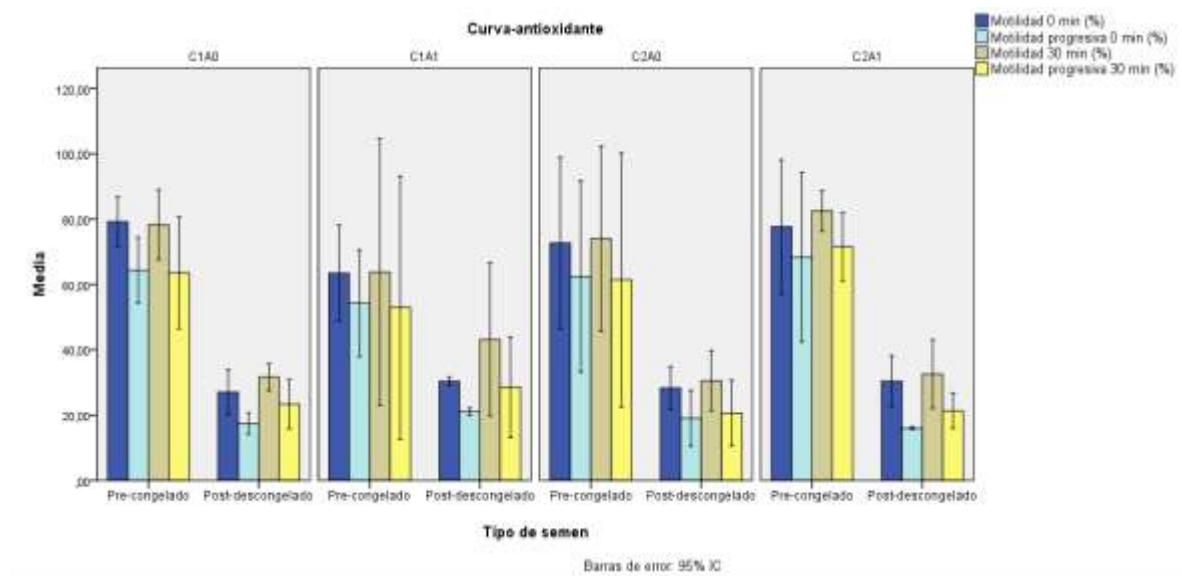
Estadísticos descriptivos de motilidad total y motilidad progresiva medidas a dos tiempos (0 y 30 min)

Variable dependiente			Media	Error típ.	Intervalo de confianza 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Motilidad 0 min (%)	Pre-congelado	C1A0	79,218	4,359	70,220	88,215
		C1A1	63,420	4,359	54,423	72,417
		C2A0	72,690	4,359	63,693	81,687
		C2A1	77,655	4,359	68,658	86,652
	Post-descongelado	C1A0	27,020	4,359	18,023	36,017
		C1A1	30,378	4,359	21,380	39,375
		C2A0	28,255	4,359	19,258	37,252
		C2A1	30,350	4,359	21,353	39,347
Motilidad progresiva 0 min (%)	Pre-congelado	C1A0	64,315	4,950	54,099	74,531
		C1A1	54,265	4,950	44,049	64,481
		C2A0	62,430	4,950	52,214	72,646
		C2A1	68,335	4,950	58,119	78,551
	Post-descongelado	C1A0	17,445	4,950	7,229	27,661
		C1A1	21,015	4,950	10,799	31,231
		C2A0	18,980	4,950	8,764	29,196
		C2A1	16,005	4,950	5,789	26,221
Motilidad 30 min (%)	Pre-congelado	C1A0	78,283	6,471	64,926	91,639
		C1A1	63,800	6,471	50,444	77,156
		C2A0	74,010	6,471	60,654	87,366
		C2A1	82,490	6,471	69,134	95,846
	Post-descongelado	C1A0	31,648	6,471	18,291	45,004
		C1A1	43,148	6,471	29,791	56,504
		C2A0	30,500	6,471	17,144	43,856
		C2A1	32,550	6,471	19,194	45,906
Motilidad progresiva 30 min (%)	Pre-congelado	C1A0	63,588	6,993	49,156	78,019
		C1A1	52,933	6,993	38,501	67,364
		C2A0	61,390	6,993	46,958	75,822
		C2A1	71,550	6,993	57,118	85,982
	Post-descongelado	C1A0	23,345	6,993	8,913	37,777
		C1A1	28,543	6,993	14,111	42,974
		C2A0	20,620	6,993	6,188	35,052
		C2A1	21,345	6,993	6,913	35,777

Nota. Tomado del software estadístico IBM SPSS.

Figura 15

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



Nota. Elaboración propia mediante el software estadístico IBM SPSS.

De acuerdo a la literatura, se menciona que la motilidad ha sido uno de los parámetros de evaluación más estudiados con respecto a la CS, ya que expresa de mejor manera la función espermática, por ello, es considerada como uno de los parámetros que mejor se correlacionan con la fertilidad (Shanis et al., 1989). Por tal motivo, este parámetro se valora mediante las propiedades del movimiento del semen según la relación de motilidad progresiva de los espermatozoides en la muestra (Hafez & Hafez, 2002).

Por otra parte, la motilidad puede verse afectada tanto por una inadecuada temperatura como por la presencia de compuestos extraños en el equipo de colecta (Álamo-Santana, 2007). Según, los datos reportados por Brito y colaboradores (2002), sobre la motilidad progresiva en bovinos, deben tener un rango de 58 y 60%; Christensen y colaboradores (1999) osilan datos de entre 62 y 64% para la progresiva. Sin embargo, en una investigación efectuada por Ribeiro y colaboradores (2014) mencionaron que la motilidad total y progresiva del semen bovino para una mejor evaluación de la CS, deben ser obtenidas de la cola del epidídimo, antes y después de la congelación, tal como se procedió en esta investigación. Además, Ribeiro y colaboradores (2014) reportaron que la

motilidad media del semen fresco bovino es de 74% y 70%, mientras que después de la congelación con el sistema CASA fue de 29 y 25%, respectivamente. Al compararlos con el valor del mejor tratamiento (C1A1) de esta investigación, se puede destacar que los resultados son similares, puesto que, a los 0 min, la motilidad total reportada por el sistema CASA del semen fresco fue de 63,42%, mientras que para la evaluación del post-descongelado fue de 30,38%, siendo la motilidad más alta, tal como se aprecia en la tabla 14. Sin embargo, el uso del equipo CASA tiene ciertos inconvenientes, tal como su optimización y análisis, lo cual hace que los resultados reportados por este equipo sean muy dispersos.

Lewis y Aitken (2005) reportaron en su estudio que el proceso de congelación del semen, afecta negativamente la integridad del ADN, lo cual provoca vulnerabilidad y susceptibilidad a modificaciones moleculares y epigenéticas. Además, la sobreproducción de ROS también provoca daños estructurales en las membranas de los espermatozoides, ya que disminuyen la motilidad y aumenta la peroxidación de lípidos (Hafez & Hafez, 2002). Para contrarrestar los efectos destructivos de las ROS, el plasma seminal tiene un sistema antioxidante que parece ser muy relevante para la protección del esperma. Las enzimas de defensa oxidativa de los espermatozoides incluyen predominantemente la superóxido dismutasa, la catalasa, el glutatión peroxidasa, la glutatión reductasa y antioxidantes de pequeñas moléculas como el ácido ascórbico y el α -tocoferol (Aitken & Baker, 2004; Sikka, 2004).

Las membranas de los espermatozoides de los mamíferos son particularmente ricas en ácidos grasos poliinsaturados (Aitken & Baker, 2004) y esta capacidad antioxidante en los espermatozoides puede ser insuficiente para prevenir las ROS durante el proceso de congelación-descongelación. Para controlar el nivel de ROS y promover la motilidad y supervivencia de los espermatozoides, numerosos antioxidantes han demostrado ser beneficiosos en el tratamiento de la infertilidad masculina (Sinclair, 2000).

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

vitamina C es un eliminador de radicales libres de origen natural y, como tal, su presencia ayuda a otros mecanismos a disminuir numerosos procesos de radicales libres perturbadores (Knight et al., 1993). Por tal motivo, la adición de vitamina C en un diluyente puede repercutir en el rendimiento óptimo del esperma, al reducir el daño celular gracias a su acción continua de eliminación de radicales. Puesto que, la vitamina C impide la formación de peróxido a través de reacciones con O_2^- y OH, así como evita que los compuestos oxidativos celulares formen productos hidroperóxidos como el ácido graso epoxi, los alcanos, los alquenos, los alca-natos, los hidroxialquenes y los aldehídos (malondialdehído) (Silva, 2006).

Beconi y colaboradores (1993) habían indicado que la presencia de 5 mM de ácido ascórbico en el diluyente de congelación ejercía un efecto positivo durante la congelación y descongelación del esperma bovino. Puesto que, el ácido ascórbico es un antioxidante no enzimático y, por tanto, está potencialmente implicado en la protección de las células contra el estrés oxidativo que sufren las células en este tipo de procedimientos (Anane & Creppy, 2001). Por tal motivo, se puede demostrar que efectivamente la aplicación de la vitamina C en el diluyente ayuda a la supervivencia de los espermatozoides en el proceso de congelación, por ello, los mejores resultados de esta investigación sobre de la motilidad total y progresiva del semen bovino post-descongelado a los dos tiempos fueron de los tratamientos con vitamina C (5mM).

Después de diluir el semen es fundamental permitir que éste se estabilice, para que las células espermáticas estén bien protegidas durante el proceso de congelación y descongelación. Para ello, se debe tener en cuenta que el equilibrado durante el proceso de congelación es indispensable para el mantenimiento de la motilidad y la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides (Leite et al., 2010). Algunas investigaciones en bovinos no observan efectos significativos del tiempo de equilibrado, en relación a la motilidad post-descongelado y a la tasa de fertilidad, sin embargo, resultados como los obtenidos por Dhani y Sahni (1993) demuestran que por lo menos 2 horas de equilibrio a 5 °C son necesarios para la congelación de semen bovino. Mientras que, Tuli y colaboradores

(1981), demuestran que el tiempo de equilibrado en relación a la motilidad post-descongelado da mejores resultados cuando el semen es sometido a un periodo de 4 horas a 5 °C.

Por otra parte, durante el descenso de la temperatura de la muestra seminal desde la temperatura ambiente (20-30 °C) hasta los 5 °C, se debe realizar a una velocidad uniforme, por ello se debe tener en cuenta una velocidad de enfriamiento óptima para cada tipo de célula, la cual dependerá de su tamaño, de su permeabilidad al agua y de su relación de superficie-volumen (Maxwell et al., 1995).

La congelación lenta produce una deshidratación celular progresiva, la cual provoca una mayor concentración intracelular de solutos lo que evita la formación de cristales intracelulares. Esto es debido a que mientras el medio extracelular se va congelando, las células espermáticas quedan atrapadas en canales de solución sin congelar (Amann y Pickett, 1987). Por lo contrario, en la congelación rápida no hay tiempo suficiente para que se desarrolle la deshidratación, ya que no se da el paso del agua intracelular al medio extracelular, por ello el agua intracelular de la célula espermática se congela en forma de microcristales. De manera que la rapidez de descongelación óptima para una célula dependerá de la toxicidad por efecto del diluyente y a su tolerancia relativa al daño por cristales de hielo (Hafez & Hafez, 2002).

En cuanto a la curva de congelamiento programada en el Ice Cube, se puede destacar que, una de las curvas de congelación convencional más usada con buenos resultados post-descongelado es la de 4°C a -10°C a una velocidad de 10°C/min, posterior de -10°C a -150°C a -40°C/min (Gil et al., 2000). En cambio, en sementales bovinos han dado buenos resultados un tipo de curva trifásica de 4 a -5°C a -5°C/min, luego de -5 a -110°C a -25°C/min, y finalmente de -110 a -140°C a -35°C/min (Purdy et al., 2010). Una vez alcanzada esta temperatura en el Ice Cube, las pajuelas se sumergen en nitrógeno líquido a -196 °C (Purdy et al., 2010).

En este estudio se utilizaron una combinación de las dos curvas mencionadas, efectuando un equilibrado medio de entre 2 a 4 horas. Se aplicaron dos curvas, las cuales

variaron en su descenso de temperatura ambiente (20°C) a 4°C a una velocidad lenta para la curva 2 (-0,5°C/min) y a una velocidad rápida para la curva 1 (-1°C/min). Mientras que para ambas curvas se estableció una temperatura de equilibrado de 3 horas a 4°C, posterior a ello, se aplicó de igual manera en ambas curvas las siguientes rampas de temperatura antes de sumergir las pajuelas en el termo de nitrógeno líquido: de 4°C a -10°C a una velocidad de -5°C/min, luego de -10°C a -100°C a -40°C/min y finalmente de -100°C a -140°C a -20°C/min, dando un total de congelamiento de 3 horas con 23 minutos para la curva 1 y para la curva 2 de 3 horas con 39 minutos. Por tal motivo, no hubo diferencia significativa entre las curvas, sin embargo, según los resultados analizados de motilidad total y progresiva en el equipo CASA, la mejor curva fue la 1, ya que proporciona mejores medias de supervivencia espermática.

Viabilidad

En la tabla 15 se puede apreciar que entre el tipo de semen (pre y post-descongelado) si existe diferencia significativa ($p < 0,05$) para el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos. Sin embargo, para la curva-antioxidante y la interacción de tipo de semen y curva-antioxidante no existe diferencia significativa ($p > 0,05$) en los parámetros descritos en la tabla 15.

En cuanto a la tabla 16 y figura 16, se puede apreciar y observar las medias de los parámetros del porcentaje de espermatozoides vivos y muertos evaluados por observación en el microscopio y por la tinción de eosina-nigrosina, donde se permite destacar que, entre todos los tratamientos aplicados después de la congelación, la media con mejores resultados representa la curva uno con la aplicación del antioxidante (vitamina C 5 Mm), puesto que la media de los espermatozoides vivos post-descongelado es la mayor de todos los tratamientos (41,88%), mientras que en la media de los espermatozoides muertos post-descongelado es la menor de todos los tratamientos (58,12%).

Tabla 15

Prueba de los efectos inter-sujetos del porcentaje de espermatozoides vivos y muertos

Origen		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	Vivos (%)	13726,617 ^a	7	1960,945	18,755	,000
	Muertos (%)	13726,617 ^b	7	1960,945	18,755	,000
Intersección	Vivos (%)	94015,320	1	94015,320	899,198	,000
	Muertos (%)	67115,320	1	67115,320	641,916	,000
Tipodesemen	Vivos (%)	12940,383	1	12940,383	123,767	,000
	Muertos (%)	12940,383	1	12940,383	123,767	,000
Curvaantioxidante	Vivos (%)	116,086	3	38,695	,370	,775
	Muertos (%)	116,086	3	38,695	,370	,775
Tipodesemen *	Vivos (%)	670,148	3	223,383	2,137	,122
	Muertos (%)	670,148	3	223,383	2,137	,122
Error	Vivos (%)	2509,313	24	104,555		
	Muertos (%)	2509,313	24	104,555		
Total	Vivos (%)	110251,250	32			
	Muertos (%)	83351,250	32			
Total corregida	Vivos (%)	16235,930	31			
	Muertos (%)	16235,930	31			

a. R cuadrado = ,845 (R cuadrado corregida = ,800)

b. R cuadrado = ,845 (R cuadrado corregida = ,800)

Nota. Tomado del software estadístico IBM SPSS.

Tabla 16

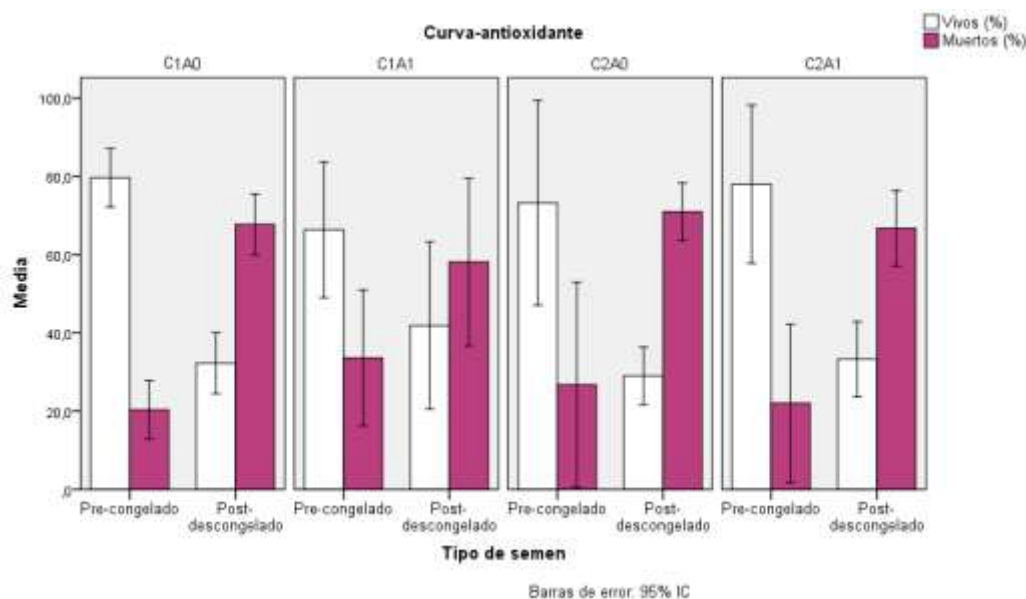
Estadísticos descriptivos del porcentaje de espermatozoides vivos y muertos

Variable dependiente			Media	Error típ.	Intervalo de confianza 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Vivos (%)	Pre-congelado	C1A0	79,625	5,113	69,073	90,177
		C1A1	66,375	5,113	55,823	76,927
		C2A0	73,250	5,113	62,698	83,802
		C2A1	78,000	5,113	67,448	88,552
	Post-descongelado	C1A0	32,250	5,113	21,698	42,802
		C1A1	41,875	5,113	31,323	52,427
		C2A0	29,000	5,113	18,448	39,552
		C2A1	33,250	5,113	22,698	43,802
Muertos (%)	Pre-congelado	C1A0	20,375	5,113	9,823	30,927
		C1A1	33,625	5,113	23,073	44,177
		C2A0	26,750	5,113	16,198	37,302
		C2A1	22,000	5,113	11,448	32,552
	Post-descongelado	C1A0	67,750	5,113	57,198	78,302
		C1A1	58,125	5,113	47,573	68,677
		C2A0	71,000	5,113	60,448	81,552
		C2A1	66,750	5,113	56,198	77,302

Nota. Tomado del software estadístico IBM SPSS.

Figura 16

Comparación gráfica del porcentaje de espermatozoides vivos y muertos aplicando los factores de estudio



Nota. Elaboración propia mediante el software estadístico IBM SPSS.

De acuerdo a la literatura, se considera 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). Como se puede destacar en la tabla 16, el tratamiento que cumple con este parámetro es la curva 1 con la aplicación del antioxidante, teniendo como media de porcentaje de vivos 41,88%, a pesar de que el semen pre-congelado (fresco) presentaba una media de 66,37%, el cual no se encontraba dentro del límite aceptable (70%) para considerar un semen de buena CS (Ax et al., 2000). Estos resultados son similares a los de Sandeep y colaboradores (2015), donde reportaron para toros de raza Murrah 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%.

Esto es debido a que el papel de 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 gracias a su continua acción de eliminación de radicales (Fanaei et al., 2014).

Además, hay que destacar que la viabilidad se relaciona con la motilidad, 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 (Hafez & Hafez, 2002).

Morfología

En la tabla 17 se puede apreciar que entre el tipo de semen (pre y post-descongelado) si existe diferencia significativa ($p < 0,05$) para el porcentaje de espermatozoides normales y anormales. Sin embargo, para la curva-antioxidante y la interacción de tipo de semen y curva-antioxidante no existe diferencia significativa ($p > 0,05$) en los parámetros descritos en la tabla 17.

En cuanto a la tabla 18 y figura 17, se puede apreciar y observar las medias de los parámetros del porcentaje de espermatozoides normales y anormales evaluados por observación en el microscopio y por la tinción de Farelly, donde se permite destacar que, entre todos los tratamientos aplicados después de la congelación, la media con mejores resultados representa la curva uno con la aplicación del antioxidante (vitamina C 5 Mm), puesto que la media de los espermatozoides normales post-descongelado es la mayor de todos los tratamientos (45,38%), mientras que en la media de los espermatozoides anormales post-descongelado es la menor de todos los tratamientos (54,62%).

Tabla 17

Prueba de los efectos inter-sujetos del porcentaje de espermatozoides normales y anormales

Origen		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	Normalidades (%)	3013,180 ^a	7	430,454	2,441	,049
	Anormalidades (%)	3013,180 ^a	7	430,454	2,441	,049
Intersección	Normalidades (%)	79152,258	1	79152,258	448,898	,000
	Anormalidades (%)	80852,258	1	80852,258	458,540	,000
Tipodesemen	Normalidades (%)	2803,133	1	2803,133	15,897	,001
	Anormalidades (%)	2803,133	1	2803,133	15,897	,001
Curvaantioxidante	Normalidades (%)	113,273	3	37,758	,214	,886
	Anormalidades (%)	113,273	3	37,758	,214	,886
Tipodesemen *	Normalidades (%)	96,773	3	32,258	,183	,907
	Anormalidades (%)	96,773	3	32,258	,183	,907
Error	Normalidades (%)	4231,813	24	176,326		
	Anormalidades (%)	4231,813	24	176,326		
Total	Normalidades (%)	86397,250	32			
	Anormalidades (%)	88097,250	32			
Total corregida	Normalidades (%)	7244,992	31			
	Anormalidades (%)	7244,992	31			

a. R cuadrado = ,416 (R cuadrado corregida = ,246)

Nota. Tomado del software estadístico IBM SPSS.

Tabla 18

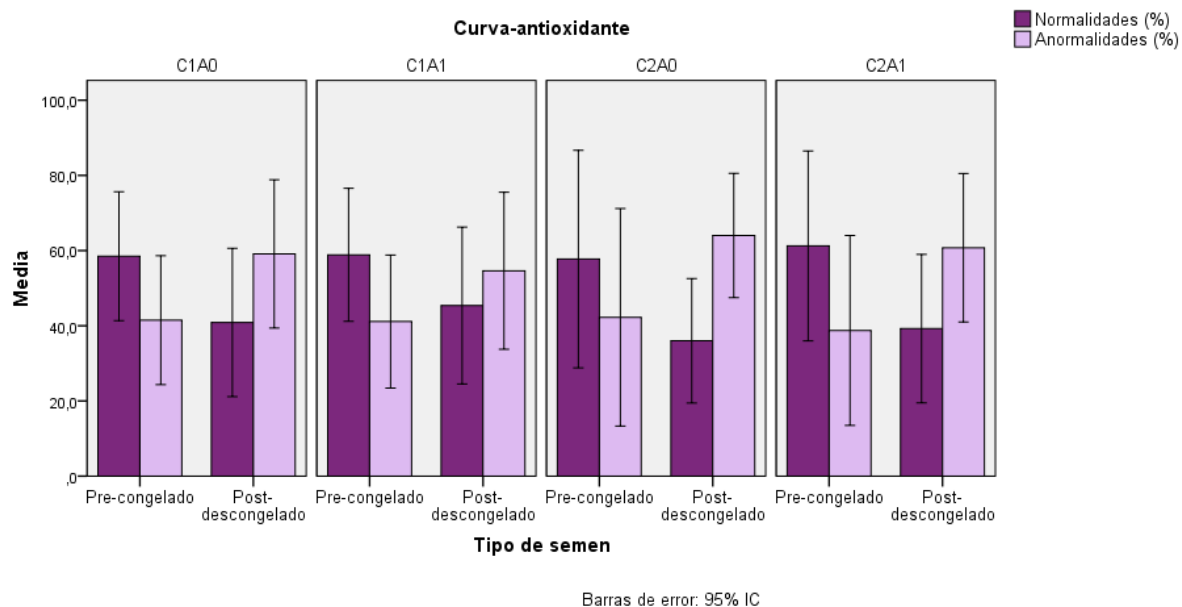
Estadísticos descriptivos del porcentaje de espermatozoides normales y anormales

Variable dependiente			Media	Error típ.	Intervalo de confianza 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Normalidades (%)	Pre-congelado	C1A0	58,500	6,639	44,797	72,203
		C1A1	58,875	6,639	45,172	72,578
		C2A0	57,750	6,639	44,047	71,453
		C2A1	61,250	6,639	47,547	74,953
	Post-descongelado	C1A0	40,875	6,639	27,172	54,578
		C1A1	45,375	6,639	31,672	59,078
		C2A0	36,000	6,639	22,297	49,703
		C2A1	39,250	6,639	25,547	52,953
Anormalidades (%)	Pre-congelado	C1A0	41,500	6,639	27,797	55,203
		C1A1	41,125	6,639	27,422	54,828
		C2A0	42,250	6,639	28,547	55,953
		C2A1	38,750	6,639	25,047	52,453
	Post-descongelado	C1A0	59,125	6,639	45,422	72,828
		C1A1	54,625	6,639	40,922	68,328
		C2A0	64,000	6,639	50,297	77,703
		C2A1	60,750	6,639	47,047	74,453

Nota. Tomado del software estadístico IBM SPSS.

Figura 17

Comparación gráfica del porcentaje de espermatozoides normales y anormales aplicando los factores de estudio



Nota. Elaboración propia mediante el software estadístico IBM SPSS.

El antioxidante ácido ascórbico se utiliza para proteger los espermatozoides durante el procedimiento de crioconservación y frente al exceso de ROS. Según Fanaei y colaboradores (2014) mencionan que las ROS son responsables de alteraciones metabólicas y del aumento de la tasa de liberación de compuestos intracelulares, por ejemplo, disminución acentuada de la motilidad espermática y no de la morfología. Sin embargo, la integridad de la membrana plasmática y acrosomal influye en la viabilidad de los espermatozoides, por lo que en el proceso de crioconservación podría verse afectada produciendo daños como hinchamiento y disrupción de la misma, alteración del flujo de calcio, cambios en la fluidez y en la actividad enzimática, los cuales pueden inducir a una capacitación espermática anticipada y mayor porcentaje de anomalías en el proceso de congelamiento (Thomas et al., 2001).

De acuerdo a la literatura, las anomalías morfológicas de las células espermáticas pueden tener un impacto negativo sobre la fertilización y el desarrollo embrionario (Hafez & Hafez, 2002). Por tal motivo, la incidencia de espermatozoides

anormales en el eyaculado bovino posee una relación directa con la fertilidad de los toros. Por ello, 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% (Gómez & Migliorisi, 2007). Comparando lo mencionado con este estudio, podemos destacar que los toros Gyrholando de la Universidad de las Fuerzas Armadas sede Santo Domingo superan las anomalías que requieren para ser toros de buena CS, pues poseen un porcentaje mayor al máximo aceptado de espermatozoides anormales en semen fresco.

Cabe mencionar que la edad, la raza, los efectos estacionales. Además de los repetidos y acumulados tratamientos de estrés en el proceso de congelamiento, influyen en las características del semen bovino, y deben prestarse atención al evaluar y clasificar los toros para los rasgos de la morfología espermática.

Capítulo V

Conclusiones

En cuanto a la evaluación macroscópica y anomalías presentes en el semen fresco y pos-descongelado, se concluye que los toros Gyrolando (toros 1 y 2) 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.

Capítulo VI

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.

Por último, se recomienda efectuar métodos de congelamiento más eficientes, como el uso de un congelador para reducir el tiempo y los gastos de nitrógeno líquido. Además, se aconseja tapar con papel aluminio el material donde se prepara el diluyente, para evitar contaminación o daños a la muestra espermática.

Capítulo VII

Bibliografía

- Aires, V. A., Hinsch, K. D., Mueller-Schloesser, F., Bogner, K., Mueller-Schloesser, S., & Hinsch, E. (2003). In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology*, 60(2), 269-279.
- Aitken, R., & Baker, M. (2004). Oxidative stress and male reproductive biology. *Reproduction, Fertility and development*, 16(5), 581-588.
- Álamo-Santana, D. (2007). *Crioconservación Viabilidad Espermática en la*. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.
- Amann, R., & Pickett, B. (1987). Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Journal of equine veterinary science*, 7(3), 145-173.
- Anane, R., & Creppy, E. (2001). Lipid peroxidation as pathway of aluminium cytotoxicity in human skin fibroblast cultures: prevention by superoxide dismutase + catalase and vitamins E and C. *Human & experimental toxicology*, 20(9), 477-481.
- Ansari, M., Rakha, B., Akhter, S., & Ashiq, M. (2016). OPTIXcell improves the postthaw quality and fertility of buffalo bull sperm. *Theriogenology*, 85(3), 528-532.
- Arbiotech. (2022). *Fotómetro SDM1 para medición de concentración espermática*.
<https://tienda.arbiotech.com.mx/product/fotometro-sdm-1-bovino/>
- Ávalos, A., González, J., Vargas, A., & Herrera, J. (2018). *Recolección y manipulación seminal*. México: Casa abierta al tiempo.
- Ax, R., Dally, M., Didion, B., Lenz, R., Love, C., Varner, D., . . . & Bellin, M. (2000). *Evaluación del semen* (Séptima ed.). Mexico: McGraw-Hill Interamericana.
- Beconi, M., Francia, C., Mora, N., & Affranchino, M. (1993). Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. *Theriogenology*, 40(4), 841-851.

- Bergeron, A., & Manjunath, P. (2006). New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Molecular reproduction and development*, 73(10), 1338-1344.
- Bernardi, S., Allende, R., Mazzeo, R., Monti, J., & Marini, P. (2011). Evaluación de los cambios ocasionados en espermatozoides bovinos por variaciones en el manejo de las dosis durante su manipulación en inseminación artificial. *InVet*, 13(2), 25-38.
- Bhattacharyya, H., Goswami, B., Bujarbaruah, K., Deka, B., & Biswas, R. (2009). Collection and characterization of semen in Mithun (*Bos frontalis*) bulls. *Theriogenology*, 72(5), 699-703.
- Brito, L., Silva, A., Rodrigues, L., Vieira, F., Deragon, L., & Kastelic, J. (2002). Effects of environmental factors, age and genotype on sperm production and semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* AI bulls in Brazil. *Animal reproduction science*, 70(3-4), 181-190.
- Carrera, C., Bacci, M., & Rojas, L. (2019). Innovación en la cadena de suministro, desde la perspectiva del productor de carne bovina. *Revista Espacios*, 40(37).
- Castelo, T., Frota, T., & Silva, A. (2008). Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. *Acta Veterinaria Brasilica*, 2(3), 67-75.
- Catena, M., & Cabodevila, J. (2013). Evaluación de semen bovino congelado. *Sitio Argentino de Producción Animal*, 1(3), 18-31.
- Christensen, P., Brockhoff, P., & Lehn-Jensen, H. (1999). The relationship between semen quality and the nonreturn rate of bulls. *Reproduction in domestic animals*, 34(6), 503-507.
- Crespilho, A. M., Sá Filho, M. F., Dell'Aqua Jr, J. A., Nichi, M., Monteiro, G. A., Avanzi, B. R., . . . & Papa, F. O. (2012). Comparison of in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or new lecithin based extenders. *Livestock Science*, 149(1-2), 1-6.

- Crespilho, A., Papa, F., Junior, A., & Dell'Aqua, A. (2009). Evaluation of frozen bovine semen: how do semen collection and processing centers evaluate the quality of commercialized samples? *Veterinaria y Zootecnia*, 16(2), 335-42.
- Cuaran, E., & Burbano, J. (2014). *Evaluación en la criopreservación de semen colectado directamente de epidídimos en bovinos por dos métodos (Laundering - Epididymis, Slicing - Testicles) en el laboratorio de biotecnología en reproducción de la carrera de medicina veterinaria*. <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/2871/1/T-UTC-00395.pdf>
- Curbelo, M., & Rodríguez, Z. (2013). *Relevamiento de laboratorios de procesamiento de semen bovino en Uruguay*. <https://bibliotecadigital.fvet.edu.uy/bitstream/handle/123456789/2167/FV-29987.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Dhami, A., & Sahni, K. (1993). Evaluation of different cooling rates, equilibration periods and diluents for effects on deep-freezing, enzyme leakage and fertility of taurine bull spermatozoa. *Theriogenology*, 40(6), 1269-1280.
- Díaz, R., Torres, M. A., Painemil, S., Martins, S. M., Andrade, A. F., Bravo, S., & Sepúlveda, N. (2015). Efecto del diluyente y tiempo de equilibrio sobre la motilidad e integridad de membrana post-descongelación de espermatozoides de carnero. *Spermova*, 1(5), 67-70.
- Dyce, K., Sack, W., & Wensing, C. (1999). *Anatomía veterinaria* (Segunda ed.). México: McGraw-Hill Interamericana.
- Elhordoy, D., Nan, E., Hernández, L., Hernández, S., & Acuña, R. (2010). *Testosterone concentration, scrotal circumference and seminal parameters in yearling Hereford bulls in Uruguay*. Santiago, Chile: In 26^o World Buiatrics Congress.
- Erales-Villamil, J., Ortega-Pacheco, A., Rodríguez-Buenfil, J., & Segura-Correa, J. (2008). Estado y alteraciones del aparato reproductor de vacas sacrificadas en el rastro de Umán, Yucatán. *Universidad y Ciencia*, 24(2), 111-116.

- Escamilla, A. (2005). *Aplicación de clorhidrato de xilacina (0.05 mg/kg) en toros como facilitador de la colecta de semen con el método de electroeyaculador*.
<https://core.ac.uk/download/pdf/80748356.pdf>
- Eveline, Á., & Vaquero, M. (2006). *Efecto de la disminución parcial del plasma seminal sobre la calidad biológica de semen bovino poscongelado*.
<https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/1d2e315c-9b85-40c1-a5d2-d38231e357c6/content>
- Fanaei, H., Khayat, S., Halvaei, I., Ramezani, V., Azizi, Y., Kasaeian, A., . . . & Akrami, M. (2014). Effects of ascorbic acid on sperm motility, viability, acrosome reaction and DNA integrity in teratozoospermic samples. *Iranian journal of reproductive medicine*, 12(2), 103–110.
- Fresneda, A. (2004). Espermiación inducida y crioconservación de semen de Cachama Blanca (*Piaractus brachipomus*). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 17(2), 46-52.
- Fuentes, C. (2020). *Anatomía y fisiología de la reproducción en machos*.
<https://www.agro.uba.ar/users/catala/C10%20MACHO.pdf>
- Fuerst, B., Schwarzenbacher, H., Perner, C., & Sölkner, J. (2006). Effects of age and environmental factors on semen production and semen quality of Austrian Simmental bulls. *Animal reproduction science*, 95(1-2), 27-37.
- Gadea, J. (2003). Review: Semen extenders used in the artificial insemination of swine. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 1(2), 17-27.
- Galina, C., & Valencia, J. (2008). *Reproducción de los animales domésticos*. México: LIMUSA.
- Gálvez, J. (2022). *Evaluación de dilutores a base de lecitina de soya y liposomas sobre la criopreservación de espermatozoides de toros*.
<https://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12996/5263/galvez-suasnabar-josue-amador.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Garay, L., Botero, J., & Londoño, L. (2012). Frecuencia de suplementación y pH ruminal en bovinos. *Revista Veterinaria y Zootecnia (On Line)*, 6(2), 125-133.
- Gil, J., Januskauskas, A., Håård, M., Håård, M., Johannisson, A., Söderquist, L., & Rodríguez-Mártinez, H. (2000). Functional sperm parameters and fertility of bull semen extended in Biociphos-Plus® and Triladyl®. *Reproduction in Domestic Animals*, 35(2), 69-77.
- Gómez, M., Girela, J., Fernández, P., & Romeo, A. (2005). Estudio de las alteraciones morfológicas de espermatozoides humanos con microscopia electrónica de barrido. *Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana*, 22(1), 59-66.
- Gómez, M., & Migliorisi, A. (2007). *Protocolo para la evaluación de semen en rumiantes*. Buenos Aires, Argentina: Protocolo para la evaluación de semen en rumiantes.
- González, R. (2004). *Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelação e crioprotectores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membranas do espermatozóide bovino*. Universidade de São Paulo.
- Hafez, E., & Hafez, B. (2000). *Reproducción e inseminación artificial en animales* (Séptima ed.). México: McGraw-hill.
- Hafez, E., & Hafez, B. (2002). *Reproducción e inseminación artificial en animales* (Séptima ed.). México: McGraw-Hill Interamericana.
- Hammerstedt, R., Graham, J., & Nolan, J. (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *Acta Veterinaria Brasilica*, 2(3), 67-75.
- Herold, F., Aurich, J., & Gerber, D. (2004). Epididymal sperm from the African buffalo (*Syncerus caffer*) can be frozen successfully with AndroMed and with TriladyITM but the addition of bovine seminal plasma is detrimental. *Theriogenology*, 61(1), 715–72.
- Hidalgo, C., Tamargo, C., & Diez, C. (2017). Análisis del semen bovino. *Boletín informativo del Serida*, 2(1), 39-43.
- Holt, W., & Van Look, J. (2004). Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory test of semen quality. *Reproduction*, 127(3), 527-535.

- Hunter, R. (1987). *Reproducción de los animales de Granja*. Editorial Acribia.
- Illera, M. (1984). *Endocrinología veterinaria y fisiología de la reproducción*. Madrid, España: COLIBAC.
- IMV Technologies. (2020). *OptiXcell ficha técnica*. <https://www.imv-technologies.es/producto/optixcell>
- Knight, J., Blaylock, R., & Searles, D. (1993). The effect of vitamins C and E on lipid peroxidation in stored erythrocytes. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 23(1), 51-56.
- Konig, H., & Liebich, H. (2002). *Órganos genitales masculinos. Anatomía de los animales domésticos* (Segunda ed.). Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- Krause, D., & Dittmar, J. (1962). Schema für die Beurteilung von Zuchtbullen hinsichtlich Gesundheit und Fruchtbarkeit. *Dt. tierärztl. Wochenschr*, 69, 353.
- Krause, W. (1995). The significance of computer-assisted semen analysis (CASA) for diagnosis in andrology and fertility prognosis. *Human Reproduction*, 10(2), 60-66.
- Leite, T. G., do Vale Filho, V. R., de Arruda, R. P., de Andrade, A. F., Emerick, L. L., Zaffalon, F. G., . . . & de Andrade, V. J. (2010). Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry. *Animal reproduction science*, 120(1-4), 31–38.
- Leite, T. G., do Vale Filho, V. R., de Arruda, R. P., de Andrade, A. F., Emerick, L. L., Zaffalon, F. G., & de Andrade, V. J. (2010). Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry. *Animal Reproduction Science*, 120(1-4), 31-38.
- Lewis, S., & Aitken, R. (2005). DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. *Cell and tissue research*, 322(1), 33-41.

- Malama, E., Zeron, Y., Janett, F., Siuda, M., Roth, Z., & Bollwein, H. (2017). Use of computer assisted sperm analysis and flow cytometry to detect seasonal variations of bovine semen quality. *Theriogenology*, 87(2), 79–90.
- Maroto, M. (2020). *Evaluación de la motilidad del semen fresco utilizando dos diluyentes comerciales en diferentes horas de extracción*. <https://iracbiogen.com/wp-content/uploads/2021/06/Evaluacion-de-la-motilidad-del-semen-fresco-utilizando-dos-diluyentes-comerciales-en-diferentes-horas-de-extraccion-Maroto.pdf>
- Maxwell, W., Landers, A., & Evans, G. (1995). Survival and fertility of ram spermatozoa frozen in pellets, straws and minitubes. *Theriogenology*, 43(7), 1201-1210.
- McDonal, L. (1978). *Reproducción y endocrinología veterinaria* (Segunda ed.). México: Nueva Editorial Interamericana, S.A.
- Medeiros, C., Forell, F., Oliveira, A., & Rodríguez, J. (2002). Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*, 57(1), 327-344.
- Megagro. (2021). *Max C*. <https://megagro.com.ec/product/max-c/>
- Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca. (2016). *El sector agropecuario ecuatoriano: análisis histórico y prospectiva a 2025*. <https://www.agricultura.gob.ec/biblioteca/>
- Muiño, R. (2008). Evaluación de la motilidad y viabilidad del semen bovino mediante el uso de sistemas CASA y citometría de flujo: Identificación de subpoblaciones espermáticas. *Animal Reproduction Science*, 1(4), 57-68.
- Muiño, R., Tamargo, C., Hidalgo, C., & Peña, A. (2007). Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Holstein bulls: effects of cryopreservation and between-bull variation. *Animal Reproduction Science*, 109(1), 29-37.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2019). *El papel de la FAO en la producción animal*. <http://www.fao.org/animal-production/es/>
- Páez-Barón, E., & Corredor-Camargo, E. (2014). Evaluación de la aptitud reproductiva del toro. *Ciencia y Agricultura*, 11(2), 49-59.

- Palma, G. (2012). Atlas de esquemas en 3D. *Revista de Medicina Veterinaria*, 2(7), 98-118.
- Patt, J. A., & Nath, J. (1969). Effects of diluents, equilibration time, and freezing rates on the storage of ram semen. *Cryobiology*, 5(6), 385-392.
- Purdy, P. H., Mocé, E., Stobart, R., Murdoch, W. J., Moss, G. E., Larson, B., . . . & Blackburn, H. D. (2010). The fertility of ram sperm held for 24h at 5 degrees C prior to cryopreservation. *Animal reproduction science*, 118(2-4), 231–235.
- Quintero, G., Bermúdez, R., & Castillo, J. (2015). Infertilidad masculina y fragmentación del ADN espermático: un problema actual TIP. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 18(2), 144- 151.
- Quishpe, J. (2021). *Evaluación de dos curvas de congelación programables para la crioconservación de semen de cuy (Cavia porcellus) en el Centro Experimental Uyumbicho*. <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/25416/1/UCE-FMVZ-SUB-QUISHPE%20JONATHAN.pdf>
- Ribeiro, A., Munita, L., Yumi, M., Mello, M., & 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.
- Rodríguez, G. (2017). *Anatomía del aparato reproductor del macho bovino (ISBN 218-0986-432)*. Lima, Perú: Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Rodríguez, J., Madrid-Bury, N., Urdaneta, A., Aranguren, J., & Quintero, A. (2016). Análisis morfométrico del epidídimo en toros jóvenes mestizos 5/8 Holstein y 5/8 Pardo Suizo con testículos pequeños. *Revista Científica FCV-LUZ*, 10(5), 23-32.
- Rodríguez, M., & Nivia, A. (2017). Efecto de la adición de antioxidantes sobre la motilidad espermática post-criopreservación y fertilidad del semen de peces. *Revista veterinaria*, 28(2), 157-164.
- Röpke, T., Oldenhof, H., Leiding, C., Sieme, H., Bollwein, H., & Wolkers, W. F. (2011). Liposomes for cryopreservation of bovine sperm. *Theriogenology*, 76(8), 1465-1472.

- Salamon, S., & Marwell, W. (2000). Storage of ram semen. *Ciencia de la Reproducción Animal*, 62(1), 77-111.
- Salazar, C. (2016). *Uso de lecitina en la alimentación animal: opinión científica de EFSA*. <https://nutrinews.com/uso-lecitina-la-alimentacion-animal-opinion-cientifica-efsa/>
- Salisbury, G., VanDemark, N., & Lodge, J. (1978). *Fisiología de la reproducción e inseminación artificial de los bóvidos* (Segunda ed.). Zaragoza Acribia.
- Sandeep, P., Malik, R., & Singh, G. (2015). Effect of vitamin c on the seminal and biochemical parameters of Murrah buffalo bull semen during different stages of freezing. *Haryana Vet*, 54(1), 15-18.
- Shanis, B., Check, J., & Bollendorf, A. (1989). Interpretation and misinterpretation of semen parameters. *Archives of andrology*, 23(3), 213-227.
- Sikka, S. (2004). Andrology lab corner: role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *Journal of andrology*, 25(1), 5-18.
- Silva, P. (2006). *Physiology of peroxidation process in mammalian*. Utrech University, Ridderprint, Ridderkerk.
- Sinclair, S. (2000). Male infertility: nutritional and environmental considerations. *Alternative medicine review: a journal of clinical therapeutic*, 5(1), 28-38.
- Singh, A. K., Singh, V. K., Narwade, B. M., Mohanty, T. K., & Atreja, S. K. (2012). Comparative Quality Assessment of Buffalo (*Bubalus bubalis*) Semen Chilled (5°C) in Egg Yolk-and Soya Milk–Based Extenders. *Reproduction in domestic animals*, 47(4), 596-600.
- Stornelli, M., Tittarelli, C., Savignone, C., & Stornelli, M. (2005). Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. *Analecta veterinaria*, 25.
- Tapia, D., & Tello, D. (2016). *Evaluación cuali-cuantitativa de espermatozoides de la cola del epidídimo en cuyes (Cavia porcellus) criollos y mejorados en dos edades reproductivas*. [https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/25404/1/TESIS Tapia-Tello.pdf](https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/25404/1/TESIS%20Tapia-Tello.pdf)

- Thomas, F., Leask, R., Srsen, V., Riley, S., Spears, N., & Telfer, E. (2001). Effect of ascorbic acid on health and morphology of bovine preantral follicles during long-term culture. *Reproduction (Cambridge, England)*, 122(3), 487–495.
- Tuli, R., Singh, M., & Matharoo, J. (1981). Effect of different equilibration times and extenders on deep freezing of buffalo semen. *Theriogenology*, 16(1), 99-104.
- Vallecillo, Á. (2011). *Caracterización reproductiva de toros de la raza marismeña como base a su conservación*.
http://www.uco.es/zootecniaygestion/img/pictorex/10_13_39_tesis.pdf
- Vasconcelos-Filho, W. (2010). *Eficiência da congelação automatizada na viabilidade de sêmen bovino*. Brasil: Instituto de Zootecnia, Universidad Federal Rural do Rio de Janeiro.
- Watson, P. F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 60–61, 481–492.