

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE CUENCA

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

*Trabajo de titulación previo
a la obtención del título de
Médico Veterinario Zootecnista*

TRABAJO EXPERIMENTAL:

**EVALUACIÓN DE DOS DILUYENTES PARA LA CRIOCONSERVACIÓN
DE SEMEN BOVINO: LECHE ENTERA Y AGUA DE COCO**

AUTOR:

CARLOS MAURICIO BARRERA BARRERA

TUTOR:

Dr. FROILAN PATRICIO GARNICA MARQUINA

CUENCA - ECUADOR

2020

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Yo, Carlos Mauricio Barrera Barrera con documento de identificación N° 0106150022, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana, la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autor del trabajo de titulación: **EVALUACIÓN DE DOS DILUYENTES PARA LA CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN BOVINO: LECHE ENTERA Y AGUA DE COCO**, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: *Médico Veterinario Zootecnista*, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autor me reservo los derechos morales en la obra citada. En concordancia suscribimos este documento en el momento que hago la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad politécnica Salesiana.

Cuenca, noviembre del 2020



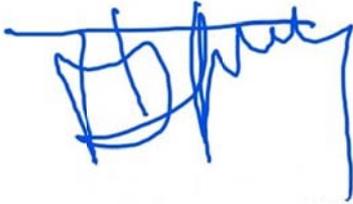
Carlos Mauricio Barrera Barrera

C.I. 0106150022

CERTIFICACIÓN

Yo declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **EVALUACIÓN DE DOS DILUYENTES PARA LA CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN BOVINO: LECHE ENTERA Y AGUA DE COCO**, realizado por Carlos Mauricio Barrera Barrera, obteniendo el *Trabajo Experimental*, que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, noviembre de 2020

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'F. Garnica Marquina', written over a faint grid background.

Dr. Froilán Patricio Garnica Marquina

C.I. 0101650299

DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD

Yo, Carlos Mauricio Barrera Barrera con documento de identificación N° 0106150022, autor del trabajo de titulación: **EVALUACIÓN DE DOS DILUYENTES PARA LA CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN BOVINO: LECHE ENTERA Y AGUA DE COCO**, certifico que el total contenido del *Trabajo Experimental*, es de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Cuenca, noviembre de 2020



Carlos Mauricio Barrera Barrera

C.I. 0106150022

DEDICATORIA

A Dios, el que me ha fortalecido a continuar cuando estado punto de caer, por ello con toda humildad y de corazón dedico primeramente mi trabajo a Dios.

De igual manera dedico este trabajo a mis Padres Hernán y Martha, que han sabido formarme con buenos sentimientos, hábitos y valores, lo cual me han ayudado a salir adelante en momentos difíciles.

A mis hermanos Manuel y María de igual manera a mis sobrinos y amigos por estar siempre presentes y acompañándome en todo momento.

AGRADECIMIENTO

El principal agradecimiento a Dios quien ha sido mi guía y mi fortaleza para seguir adelante.

A mi familia por su comprensión y estímulo constante además de su apoyo incondicional a lo largo de mis estudios.

A mis docentes académicos: Dr. Patricio Garnica, Dr. Juan Masache, Dra. Mónica Brito, Ing. Mauricio Salas, Ing. Pedro Webster, Dr. Cristhian Sagbay, por compartir cada uno de sus conocimientos y experiencias ayudándome a crecer académica y humanamente, de igual modo a la Dra. Mónica Espadero por su colaboración y apoyo en la investigación de laboratorio, a mis amigos que de una y otra forma me ayudaron en todo este proceso de estudio.

De igual forma a mi docente tutor Dr. Patricio Garnica, por el apoyo y la colaboración en la ejecución de este trabajo investigativo, contribuyendo con todo su conocimiento para la culminación del estudio.

Índice general

| | |
|--|----|
| RESUMEN | 13 |
| ABSTRACT | 15 |
| 1 INTRODUCCIÓN | 16 |
| 1.1 Problema | 17 |
| 1.2 DELIMITACIÓN | 18 |
| 1.2.1 Temporal..... | 18 |
| 1.2.2 Espacial..... | 18 |
| 1.2.3 Ubicación..... | 18 |
| 1.2.4 Académica | 19 |
| 1.3 Explicación del problema..... | 19 |
| 1.4 OBJETIVOS | 19 |
| 1.4.1 Objetivo General..... | 19 |
| 1.4.2 Objetivos Específicos. | 19 |
| 1.5 Hipótesis | 20 |
| 1.5.1 Hipótesis alternativa | 20 |
| 1.5.2 Hipótesis nula | 20 |
| 1.6 Fundamento teórico | 20 |
| 2 REVISIÓN Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y DOCUMENTAL | 22 |
| 2.1 Crio preservación de semen bovino..... | 22 |
| 2.1.1 Principios básicos de la crio preservación..... | 22 |
| 2.1.2 Métodos de crio preservación..... | 25 |
| 2.1.3 Efectos dañinos de la crio preservación sobre el espermatozoide..... | 25 |
| 2.2 Crio protectores..... | 26 |
| 2.3 Diluyentes | 27 |
| 2.3.1 Requisitos de los diluyentes | 27 |
| 2.3.2 Diluyentes utilizados. | 28 |
| 2.3.3 Leche entera..... | 28 |
| 2.3.4 Agua de coco | 29 |
| 2.3.5 Yema de huevo | 30 |
| 2.4 Generalidades del Toro | 31 |
| 2.4.1 Testículos..... | 31 |
| 2.4.2 Epidídimo | 31 |
| 2.4.3 Glándulas accesorias..... | 32 |
| 2.4.4 Vesículas seminales..... | 32 |
| 2.4.5 Próstata | 33 |
| 2.4.6 Órganos de evacuación del semen..... | 33 |
| 2.4.7 Pene | 34 |

| | | |
|--------|---|----|
| 2.4.8 | Prepucio | 34 |
| 2.5 | Fisiología del semental bovino: | 34 |
| 2.5.1 | Espermatogénesis. | 34 |
| 2.5.2 | Espermatozoides | 34 |
| 2.5.3 | Semen | 35 |
| 2.6 | Evaluación del toro reproductor | 35 |
| 2.6.1 | Examen clínico y físico general..... | 36 |
| 2.6.2 | Órganos sexuales accesorios | 37 |
| 2.6.3 | Prepucio y pene | 37 |
| 2.6.4 | Escroto | 37 |
| 2.6.5 | Testículos | 37 |
| 2.6.6 | La circunferencia escrotal..... | 38 |
| 2.6.7 | Epidídimo | 38 |
| 2.6.8 | Evaluación seminal | 38 |
| 2.7 | Inseminación artificial | 38 |
| 2.7.1 | Ventajas de la inseminación artificial..... | 39 |
| 2.7.2 | Desventajas de la inseminación artificial | 40 |
| 2.8 | Método de colecta de semen | 40 |
| 2.8.1 | Colección de semen por vagina artificial | 40 |
| 2.9 | Valoración del semen. | 41 |
| 2.9.1 | Examen macroscópico | 41 |
| 2.9.2 | Volumen | 41 |
| 2.9.3 | pH | 42 |
| 2.9.4 | Color | 42 |
| 2.10 | Examen microscópico..... | 43 |
| 2.10.1 | Motilidad | 43 |
| 2.10.2 | Motilidad masal | 43 |
| 2.10.3 | Concentración | 43 |
| 2.10.4 | Morfología celular | 43 |
| 2.11 | Métodos de dilución final | 44 |
| 2.12 | Concentración Espermática | 44 |
| 2.13 | Congelación de semen | 44 |
| 2.14 | Descongelamiento del semen..... | 45 |
| 3 | MATERIALES Y MÉTODOS | 46 |
| 3.1 | Materiales físicos | 46 |
| 3.2 | Materiales químicos | 48 |
| 3.3 | Materiales biológicos | 48 |
| 3.4 | MÉTODO | 48 |
| 3.4.1 | Selección y tamaño de muestra | 48 |
| 3.4.2 | Toma de muestra | 49 |

| | | |
|--------|---|----|
| 3.4.3 | Toma y registro de datos | 49 |
| 3.5 | Diseño estadístico | 49 |
| 3.6 | Operacionalización de variables..... | 50 |
| 3.6.1 | Variables dependientes: (Motilidad, supervivencia, mortalidad y morfología) | 50 |
| 3.6.2 | Variables independientes: (Diluyentes: leche entera y agua de coco)..... | 51 |
| 3.6.3 | Procedimiento | 51 |
| 3.7 | Parámetros microscópicos analizados con semen puro | 52 |
| 3.7.1 | Motilidad individual | 52 |
| 3.7.2 | Motilidad masal | 52 |
| 3.7.3 | Concentración espermática..... | 52 |
| 3.8 | Elaboración de los diluyentes | 54 |
| 3.9 | Análisis microscópico del semen diluido | 56 |
| 3.10 | Parámetros evaluados: | 56 |
| 3.10.2 | Morfología..... | 57 |
| 3.11 | Dilución final de las muestras..... | 57 |
| 3.12 | Refrigeración de las muestras | 58 |
| 3.13 | Empaquetado del semen | 58 |
| 3.14 | Congelamiento de las pajuelas..... | 58 |
| 3.15 | Descongelamiento de las pajuelas | 58 |
| 3.16 | Consideraciones éticas | 59 |
| 4 | Resultados y Discusiones | 60 |
| 4.1 | Análisis del semen para la congelación | 60 |
| 4.2 | Análisis pre-congelación del semen con leche entera y agua de coco..... | 60 |
| 4.3 | Valores “t” de student para factor motilidad individual pre-congelación..... | 62 |
| 4.4 | Valores “t” de student para el factor de espermatozoides vivos pre-congelación | 63 |
| 4.5 | Valores “t” de student para el factor de espermatozoides muertos pre-congelación | 64 |
| 4.6 | Valores “t” de student para el factor de espermatozoides normales pre-congelación | 64 |
| 4.7 | Valores “t” de student para el factor de espermatozoides anormales pre-congelación..... | 65 |
| 4.8 | Análisis post-descongelación del semen con leche entera y agua de coco | 66 |
| 4.9 | Valores “t” de student para factor motilidad individual post-descongelación..... | 67 |
| 4.10 | Valores “t” de student para el factor de espermatozoides vivos post-descongelación..... | 68 |
| 4.11 | Valores “t” de student para el factor de espermatozoides muertos post descongelación | 69 |
| 4.12 | Valores “t” de student para el factor de espermatozoides normales post- descongelación. | 70 |
| 4.13 | Valores “t” de student para el factor de espermatozoides anormales post- descongelación | 71 |
| 5 | CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES..... | 73 |
| 5.1 | Conclusiones | 73 |
| 5.2 | Recomendaciones | 74 |
| 6 | Bibliografía..... | 75 |
| 7 | Anexos..... | 83 |
| 7.1 | Fotografías | 83 |

| | |
|-----------------|----|
| 7.2 Datos | 94 |
|-----------------|----|

Índice de tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Datos Meteorológicos..... | 18 |
| Tabla 2. Materiales de oficina | 46 |
| Tabla 3. Materiales campo..... | 46 |
| Tabla 4. Materiales de laboratorio | 47 |
| Tabla 5. Materiales químicos..... | 48 |
| Tabla 6. Materiales biológicos..... | 48 |
| Tabla 7. Variables dependientes | 50 |
| Tabla 8. Variables independientes | 51 |
| Tabla 9. Elaboración de los diluyentes | 55 |
| Tabla 10. Cantidades de diluyentes utilizados..... | 55 |
| Tabla 11. Evaluación de volumen, olor, color, pH del semen fresco. | 60 |
| Tabla 12. “t” de student para el factor motilidad individual pre-congelación..... | 62 |
| Tabla 13. “t” de student para el factor de espermatozoides vivos pre-congelación | 63 |
| Tabla 14. “t” de student para el factor de espermatozoides muertos pre-congelación | 64 |
| Tabla 15. “t” de student para el factor de espermatozoides normales pre-congelación | 64 |
| Tabla 16. “t” de student para el factor de espermatozoides anormales pre-congelación | 65 |
| Tabla 17. “t” de student para el factor motilidad individual post-descongelación..... | 67 |
| Tabla 18. “t” de student para el factor de espermatozoides vivos post-descongelación | 68 |
| Tabla 19. “t” de student para el factor de espermatozoides muertos post-descongelación | 69 |
| Tabla 20. “t” de student para el factor de espermatozoides normales post-descongelación | 70 |
| Tabla 21. “t” de student para el factor de espermatozoides anormales post-descongelación | 71 |

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Análisis porcentual de los parámetros de concentración espermática, motilidad masal e individual, vitalidad y morfología pre-congelación. | 60 |
| Figura 2. Análisis porcentual de los parámetros de motilidad individual, vitalidad y morfología post-descongelación..... | 66 |

Anexos

Índice de fotografías

| | |
|---|----|
| Foto 1. Preparación del toro donante..... | 83 |
| Foto 2. Preparación de la vaca..... | 83 |
| Foto 3. Excitación pre-coital | 84 |
| Foto 4. Vagina artificial armada lista para la colección de semen | 84 |
| Foto 5. Colección del semen..... | 85 |
| Foto 6. Semen colectado en tubos graduados..... | 85 |
| Foto 7. Evaluación macroscópica del semen..... | 86 |
| Foto 8. Dilución del semen..... | 86 |
| Foto 9. Refrigeración del semen diluido | 87 |
| Foto 10. Análisis microscópico del semen pre-congelación | 87 |
| Foto 11. Empacado del semen..... | 88 |
| Foto 12. Congelación de las pajuelas | 88 |
| Foto 13. Descongelación de las pajuelas | 89 |
| Foto 14. Análisis del semen post-descongelación..... | 89 |
| Foto 15. Diluyentes utilizados | 90 |

Índice de Cuadros

| | |
|--|----|
| Cuadro 1. Análisis macroscópico del semen fresco | 94 |
| Cuadro 2. Análisis microscópico pre-congelación del semen con leche entera..... | 95 |
| Cuadro 3. Análisis microscópico post-descongelación del semen con leche entera | 96 |
| Cuadro 4. Análisis microscópico pre-congelación del semen con agua de coco | 97 |
| Cuadro 5. Análisis microscópico post-descongelación del semen con agua de coco | 98 |

RESUMEN

En el trabajo de investigación se utilizó semen de un bovino donante mestizo Charolais, utilizando dos tipos de diluyentes: leche entera y agua de coco; diluidos en un medio con crioprotector como el glicerol. Este estudio se realizó en el Cantón Paute. Se utilizó un bovino, éste se sometió a un proceso de pre evaluación, posterior a esto se colectó 10 eyaculados dos veces en la semana, se diluyó el semen en los diferentes tratamientos. Luego se envasó en pajillas de 0,5 ml, selladas con perlas y se criopreservaron en nitrógeno líquido a -196 °C. Se evaluaron parámetros macroscópicos: volumen 6,2 ml; pH 6,72; color blanco cremoso y un olor “sui generis”; Los valores con el diluyente a base de leche entera en pre-congelación son: motilidad masal (80%), motilidad individual (64%), vivos (69.5%); muertos (30,5 %), normal (81,5%); anormal (18,5 %) y post- descongelación: motilidad individual (23,5 %), vivos (30 %) y muertos (70 %); normal (70,5 %) y anormal (29,5 %). Con el diluyente agua de coco en pre- congelación: motilidad masal (80%); motilidad individual (45,5 %), vivos (55%), muertos (45%), normal (74,5%) y anormales (25,5 %) y los valores en post-descongelación: motilidad individual (14%), vivos (19,5%), muertos (80,5%); normales (66 %) y anormales (34%). Mediante un análisis “t” de student se determinó que el diluyente de origen animal mostró ser estadísticamente significativo.

ABSTRACT

In the research work, semen from a mestizo Charolais donor bovine was used, using two types of diluents: whole milk and coconut water; diluted in a cry protective medium such as glycerol. This study was conducted in Canton Paute. A bovine was used, this one was submitted to a process of pre evaluation, after these 10 ejaculates were collected twice a week, the semen was diluted in the different treatments. It was then packed in 0.5 ml straws, sealed with pearls and cryogenically stored in liquid nitrogen at -196 °C. Macroscopic parameters were evaluated: volume 6.2 ml; pH 6.72; creamy white color and a "sui generis". The values with the pre- frozen whole milk diluent are: mass motility (80%), individual motility (64%), alive (69.5%); dead (30.5%), normal (81.5%); abnormal (18.5%) and post-thaw: individual motility (23.5%), alive (30%) and dead (70%); normal (70.5%) and abnormal (29.5%). With the pre-frozen coconut water diluent: mass motility (80%); individual motility (45.5%), alive (55%), dead (45%), normal (74.5%) and abnormal (25.5%) and the values in post-thaw: individual motility (14%), alive (19.5%), dead (80.5%); normal (66%) and abnormal (34%). By means of a "t" for student analysis, it was determined that the diluent of animal origin showed to be statistically significant.

1 INTRODUCCIÓN

La aplicación de esta biotecnología reproductiva permite poder mantener el semen congelado, siendo importante la supervivencia de los espermatozoides durante periodos más largos para alcanzar la fecundación en la hembra bovina, de tal manera que pueda usarse para múltiples inseminaciones y así lograr el mayor aprovechamiento.

Es por ello que cuando se pretende crio preservar el semen bovino, se debe poner especial atención en los medios en los cuales se va a realizar su dilución y los crio protectores que se va a utilizar ya que son clave para poder obtener un semen de excelente calidad y en las mejores condiciones para obtener unos altos niveles de fecundación con la inseminación artificial.

La congelación y descongelación de semen de toro conduce al daño o la muerte de aproximadamente el 30% de los espermatozoides, reduciendo el porcentaje de espermatozoides móviles aproximadamente en un 50% (Chaveiro, Machado, Frijters, Engel, y Woelders, 2006, p. 1876).

Con el fin de evitar el daño durante el proceso de congelamiento, se han desarrollado numerosos diluyentes en base a amortiguadores de pH (tris, ácido cítrico), azúcares de bajo peso molecular (fructuosa, glucosa) que pasan a través de la membrana celular sirviendo como fuente de energía para el espermatozoide, agentes protectores de membrana (yema de huevo, leche descremada) que contienen macromoléculas que protegen contra el shock por frío, y agentes crio protectores permeables glicerol, polialcoholes y no permeables trehalosa y sacarosa; los primeros son sustancias de bajo peso molecular que atraviesan la membrana plasmática, evitando la formación intracelular de cristales de hielo y la excesiva deshidratación causada por la congelación lenta (Medeiros, Forel, Oliveira, y Rodrigues, 2002; Medina, Sanchez, Velasco, y Cruz, 2007).

“Los agentes no permeables tienen un alto peso molecular y son útiles cuando se aplican velocidades rápidas de congelación, estos provocan una deshidratación y una interacción específica con la membrana fosfolipídica, mejorando la restauración post-descongelación del espermatozoide” (Aisen, Quintana, Medina, Morello, y Venturino , 2005, p. 240).

El crioprotector permeable más frecuentemente utilizado es el glicerol que tiene que ser usado en bajas concentraciones (menos de 4%) debido a su toxicidad potencial (Buhr, Fiser, Bailey, y Curtis, 2001, p. 962).

Por esta razón se ha investigado la utilización de otros agentes crioprotectores menos dañinos tales como los agentes no permeables. Dentro de los agentes crioprotectores no permeables, vemos que los azúcares juegan un papel importante en la viabilidad espermática durante la congelación y descongelación. Los azúcares tales como la trehalosa favorecen la excreción de agua fuera de la célula a fin de disminuir la formación de cristales de hielo intracelular, manteniendo la presión osmótica del extensor y teniendo un papel crioprotector (Chen, Nakamura, y Wada, 2004, p. 1108).

1.1 Problema

El crecimiento de la ganadería en el Ecuador ha llevado a los ganaderos a implementar nuevas biotecnologías para tener una mayor genética y por ende un mayor aprovechamiento del material genético que puede aportar un toro a su descendencia ya sea en carne, leche o doble propósito. En la actualidad los mercados son más exigentes por lo que se debemos tratar de abastecer la demanda con productos de calidad.

Una de las biotecnologías que debemos utilizar para aprovechar la genética que nos puede aportar un toro es la crio conservación del semen, ya que de esta manera podemos mantener el material genético de un toro por tiempo indefinido siempre y cuando haya la temperatura y el medio adecuado para que puedan sobrevivir los espermatozoides.

Por esta razón la presente investigación se basa en la utilización de dos diluyentes para la crio conservación de semen bovino a base de leche entera y agua de coco; que son productos

de fácil acceso y económicos, comparado con los diluyentes comerciales que resultan costosos y no todo ganadero tiene la posibilidad de conseguirlo.

1.2 DELIMITACIÓN

1.2.1 Temporal

El proceso investigativo tuvo una duración de 400 horas, distribuidas en el proceso experimental y escrito.

1.2.2 Espacial

La investigación se realizó en el laboratorio de la Universidad Politécnica Salesiana, el cual se encuentra ubicada en la provincia del Azuay Cantón Paute.

1.2.3 Ubicación

La presente investigación se efectuó en el laboratorio de la Universidad Politécnica Salesiana ubicada en el cantón Paute, Nor-Oriente de la provincia del Azuay – Ecuador.

Tabla 1. *Datos Meteorológicos*

| Descripción | Denominación |
|-------------|----------------------|
| Ubicación | Paute |
| Altitud | 2.300 msnm |
| Longitud | 261,43km |
| Latitud | 1 ° 46 min 59.99 seg |
| Temperatura | Variables 15-26 °C |
| Humedad | 60-70 % |
| Hora luz | 12 % |

Fuente: Google maps 2019

1.2.4 Académica

El principal interés de este estudio experimental está orientado a la crío preservación de semen, esta biotecnología reproductiva nos proporciona: conocimientos que serán de aporte a la Carrera de Medicina Veterinaria; además economía para el productor, disminución de costos de alimentación, riesgos de transmisión de enfermedades, para un apropiado manejo dentro de sistemas de producción animal.

1.3 Explicación del problema

Como ya hemos mencionado anteriormente, considerando la importancia de la crío preservación de espermatozoides para la reproducción; se emplea dos diluyentes: agua de coco y leche entera que nos permitirá comparar la supervivencia, morfología, motilidad individual y mortalidad espermática pre-congelación y post-descongelación.

Por lo que es necesario realizar un estudio investigativo para aprovechar un manejo apropiado a los animales e incrementar la productividad.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo General.

- Evaluar dos diluyentes para la crío conservación de semen bovino leche entera y agua de coco.

1.4.2 Objetivos Específicos.

- Congelar el semen bovino utilizando como diluyente el agua de coco.
- Congelar el semen bovino utilizando como diluyente la leche entera.
- Comparar la supervivencia espermática pre-congelación y post-descongelación utilizando dos diluyentes.

- Comparar la mortalidad espermática pre-congelación y post-descongelación utilizando dos diluyentes.
- Comparar la morfología espermática pre-congelación y post-descongelación utilizando dos diluyentes.
- Determinar el porcentaje de movilidad individual de los espermatozoides pre-congelación y post-descongelación.

1.5 Hipótesis

1.5.1 Hipótesis alternativa

- El semen bovino crio conservado no mantiene los mismos porcentajes de supervivencia, mortalidad, morfología y motilidad individual pre-congelación y post- descongelación utilizando los dos diluyentes.

1.5.2 Hipótesis nula

- El semen bovino crio conservado mantiene los mismos porcentajes de supervivencia, mortalidad, morfología y motilidad individual pre-congelación y post-descongelación utilizando los dos diluyentes.

1.6 Fundamento teórico

Lo que se pretende aportar con el presente trabajo experimental es información confiable que determine los porcentajes de: supervivencia, mortalidad, morfología y motilidad individual pre-congelación y post-descongelación, utilizando los dos diluyentes en semen bovino crio conservado; además comparar la eficacia protectora en la crio preservación.

Se considera que la congelación de material seminal nos permite recuperar espermatozoides viables gracias a los diluyentes y crio protectores, para poder ser aplicados en programas de IA.

El objetivo principal de la criopreservación es el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad celular por un período prolongado de tiempo. Para lo cual, es necesario mantener el semen a temperaturas inferiores a -130°C para detener completamente los procesos metabólicos (Medeiros et al., 2002).

La criopreservación de cualquier material biológico se efectúa indispensablemente dentro de una solución que otorgue propiedades fisicoquímicas favorables para la sobrevivencia durante la congelación y descongelación (Vila, 1984). Cuando la suspensión alcanza temperaturas entre -5 y -10°C se forman núcleos de hielo, que se distribuyen aleatoriamente en el medio extracelular. La membrana plasmática del espermatozoide constituye una barrera que detiene la formación de hielo dentro de la célula (Vila y García, 1983; Holt, 2000).

Como sabemos, el proceso de refrigeración forma parte del proceso de congelación del semen; sin embargo, también puede utilizarse como método de conservación a tiempo indeterminado para lo que necesita medios diluyentes adecuados que deben contener componentes específicos, es decir, una solución tampón, sales, azúcares y sustancias que aporten una cierta protección de la membrana contra el descenso de temperatura.

2 REVISIÓN Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y DOCUMENTAL

2.1 Crio preservación de semen bovino

La criopreservación de semen es una importante biotecnología reproductiva, que busca promover la conservación del germoplasma masculino por tiempo indeterminado. Esta biotecnología, cuando se asocia a la inseminación artificial, representa un mecanismo eficiente para la promoción y difusión de material genético de excelente calidad. La criopreservación de semen proporciona una economía para el productor, al reducir los costos de alimentación y transporte de los reproductores, así como los riesgos de transmisión de enfermedades (Castelo, 2008, p. 65).

Una de las cuestiones importantes relacionadas con la eficiencia de las técnicas de criopreservación es la velocidad de reducción de la temperatura durante el congelamiento. El tipo de curva utilizada durante la congelación tiene influencia directa en el grado de las lesiones celulares, debido a procesos de deshidratación y formación de cristales de hielo intracelulares (Moore, Squires, Bruemmer, y Graham, 2006, p. 216).

La criopreservación de semen de animales domésticos ofrece muchas ventajas en los sistemas de producción, particularmente en los programas de mejoramiento genético. El proceso de criopreservación produce un daño celular que disminuye el porcentaje de espermatozoides viables (Quinn, White y Clelard, 1969, p. 209). Consecuentemente, es de esperar que cuando se utiliza la inseminación artificial con semen congelado la fertilidad obtenida es menor en comparación a cuando se utiliza semen fresco (Watson, 2000, p. 482).

2.1.1 Principios básicos de la crio preservación

El objetivo principal de la criopreservación es el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad celular por un período prolongado de tiempo. Para lo cual, es necesario mantener el semen a temperaturas inferiores a -130°C para detener completamente los procesos

metabólicos (Medeiros, et al., 2002, p. 328). La supervivencia a la congelación es el producto de numerosos factores que interaccionan entre sí (Boiso, 2001, p. 128). La criopreservación de material biológico tiene lugar usualmente en una solución acuosa, con diferentes solutos presentes. Las propiedades fisicoquímicas que rigen los eventos a los cuales está sometida la solución durante la congelación derivan de la concentración de solutos disueltos en ella. El punto de congelación de la solución es inversamente proporcional a la concentración de solutos presentes (Vila, 1984, p. 228).

Cuando una suspensión celular es enfriada y alcanza temperaturas entre -5 y -10°C se forman núcleos de hielo distribuidos aleatoriamente en el medio extracelular que darán lugar a regiones en fase cristalina. El hielo en el espacio extracelular coexiste con el agua líquida intracelular gracias a la membrana plasmática que constituye la barrera que detiene el crecimiento cristalino dentro de la célula (Vila, 1984, p. 229).

La cristalización en el medio extracelular da lugar a hielo puro, dejando los solutos progresivamente más concentrados en la fracción líquida. Este proceso recibe el nombre de crioconcentración. La fracción líquida se hace hipertónica y en respuesta a la diferencia de gradientes de concentración, la célula se deshidrata (Boiso, 2001, p. 129).

En un proceso programado de enfriamiento, a medida que el sistema de refrigeración extrae calor la temperatura baja hasta que alcanzado el punto eutéctico, la fase líquida remanente y los solutos solidifican (García y Carretero, 1985, p. 44). El punto eutéctico refleja la máxima concentración de solutos que puede alcanzarse justo antes de que agua y solutos solidifiquen conjuntamente (Grossmann y Santaló, 1991, p. 88).

Al ocurrir la cristalización, durante la transición de una a otra fase hay una liberación de energía en forma de calor latente de solidificación. Este eleva transitoriamente la temperatura de la muestra. Como el sistema de refrigeración continúa extrayendo calor y la temperatura de

la cámara continúa descendiendo la muestra rápidamente se enfría. Sin embargo, este proceso de aumento y disminución rápida de la temperatura es perjudicial para las células. Para evitar los efectos dañinos del sobre enfriamiento, se realiza la inducción de nucleación de cristales (denominado habitualmente seeding) a una temperatura ligeramente superior que la de la nucleación espontánea de la solución (Boiso, 2001, p. 130).

Consecuentemente, se produce una inadecuada deshidratación y el agua que aún se encuentra en el interior de la célula forma cristales de hielo, que tienen un efecto letal para la célula (Mazur, 1984, p. 126). Por el contrario, si la velocidad es demasiado lenta, la deshidratación será extrema pudiendo llegar al colapso celular (Boiso, 2001, p. 131). La deshidratación severa produce la desnaturalización de macromoléculas y una reducción excesiva del tamaño celular hasta el colapso irreversible de la membrana plasmática (Mazur, 1984, p. 127). Por tanto, la velocidad de congelamiento debe ser lo suficientemente rápida para reducir el tiempo de exposición del espermatozoide a condiciones hiperosmóticas y al mismo tiempo, debe ser lo suficientemente lenta para permitir que ocurra la deshidratación celular.

Mazur (1984) postula que la lesión celular crioinducida podría explicarse también por la acción combinada de factores físicos. Los factores físicos a los que se refiere son el estrés osmótico y la presión que sufren las células en sus membranas por la expansión del hielo. Esta presión produce una deformación celular que a bajas temperaturas resulta letal. Las membranas celulares son las estructuras que sufren mayor daño en los procesos de criopreservación, debido a la pérdida de fluidez de sus componentes lipídicos. La transición de lípidos fluidos a sólidos se presenta a temperaturas entre 10 y 16°C alterando todas las funciones de la membrana y confiriéndole un alto grado de fragilidad (Grossmann y Santaló, 1991, p. 89).

2.1.2 Métodos de crio preservación.

De acuerdo con la velocidad de enfriamiento y descongelación los métodos de congelación pueden clasificarse en protocolos de congelación lenta con descongelación rápida, congelación rápida con descongelación lenta, congelación ultrarápida y vitrificación. En los dos primeros, la adición del crioprotector suele hacerse por pasos, y el descenso de la temperatura se realiza lentamente, en un congelador programable. La descongelación lenta se lleva a cabo también mediante el uso del congelador programable, mientras que la descongelación rápida se hace rápidamente a temperatura ambiente o en un baño maría a 30°C, para evitar la recrystalización (Boiso, 2001, p. 132).

2.1.3 Efectos dañinos de la crio preservación sobre el espermatozoide.

La reducción de la capacidad fecundante está relacionada a dos razones puntuales, una baja viabilidad post descongelamiento y un trastorno subletal en una proporción de espermatozoides sobrevivientes. La baja viabilidad se debe a factores como: cambio de temperatura, estrés osmótico, la formación de hielo intracelular y la toxicidad. El cambio de temperatura produce un estrés en la membrana, posiblemente relacionado con un cambio de fase en los lípidos (Watson, 2000, p. 483).

Las lesiones producidas por el congelamiento de las membranas antes y durante el congelamiento sólo se invierten parcialmente después del descongelamiento. Las proteínas integrales de la membrana son agrupadas por la separación de la fase lipídica, y esto puede alterar su función, especialmente la función de las proteínas de canales iónicos. Es por eso por lo que la permeabilidad de la membrana aumenta después del congelamiento (Watson, 2000, p. 484). La regulación de calcio es claramente afectada y altera la función celular. En casos severos, es incompatible con la viabilidad celular (Bailey y Buhr, 1994, p. 46). Como ya se mencionó anteriormente el estrés osmótico y la formación de hielo intracelular producen una disminución de la viabilidad espermática. Finalmente, la toxicidad de algunas sustancias como

el glicerol también produce la muerte de los espermatozoides. Un porcentaje de los espermatozoides sobrevivientes presenta un daño funcional que está relacionado con la calidad de la membrana, daños oxidativos, integridad de los receptores de membrana e integridad de la estructura nuclear. Una de las principales características de los espermatozoides criopreservados es la disminución de la proporción de células móviles (Watson, 2000, p. 485).

2.2 Crio protectores

Los agentes crioprotectores son los que tienen la finalidad de proteger a los espermatozoides durante la fase de cristalización debido a las bajas temperaturas, el glicerol es la sustancia más empleada debido a los resultados obtenidos. La eficiencia protectora del glicerol ha sido atribuida a su capacidad de “atrapar” el agua y ayuda a que solo se lleguen a formar pequeños cristales de hielo (Salamon y Maxwell, 1995, p. 185).

El glicerol entra rápidamente en las células, pero su acción crioprotectora es extracelular como intracelular, la penetración de glicerol en el espermatozoide o su subsecuente difusión fuera del espermatozoide después de la inseminación, puede ocasionar daños particularmente cuando la difusión es muy rápida. El glicerol por otra parte también actúa como un diluyente y baja el grado de disociación de las sales, así mismo disminuye la presión osmótica en el medio frío.

La compensación para el efecto de la “hipotensión”, el incremento en la concentración de los componentes de los diluyentes y el uso de medios hipertónicos también son atribuidas al glicerol. La presión osmótica del diluyente, no solo puede ser basada en la concentración de sus componentes, sino que tiene que ser tomada en cuenta la habilidad de estos componentes que penetran a la célula espermática, y así cambiar el balance osmótico intracelular y extracelular. Así el glicerol actúa osmóticamente debido a su habilidad de penetrar a los

espermatozoides de carneros, también tiene la habilidad de que impide la enucleación y el desarrollo de cristales de hielo, así como un efecto bacteriostático.

A pesar de que el glicerol es el crioprotector más empleado por sus buenos resultados, ha demostrado que disminuye la fertilidad cuando el semen aplicado es almacenado a 5° C, ya que acelera la reacción acrosomal del espermatozoide, con consecuencias negativas. El uso del glicerol es generalmente recomendado solo para la Criopreservación del semen y no para su almacenamiento (Morrier, Castonguay, y Bailey, 2002, p. 347).

2.3 Diluyentes

Por diluyente entendemos a la solución acuosa que permite aumentar el volumen del eyaculado hasta conseguir las dosis necesarias y preservar las características funcionales de las células espermáticas manteniendo el nivel de fertilidad adecuado (Maqueda, 2020).

2.3.1 Requisitos de los diluyentes

- Abastecer nutriente como fuente de energía
- Proteger a las células espermáticas del shock térmico
- Proporcionar un amortiguador para prevenir los cambios dañinos en el pH
- Mantener la presión osmótica adecuada y el equilibrio electrolítico
- Inhibir el crecimiento bacteriano
- Aumentar el volumen del semen para múltiples inseminaciones
- Proteger las células espermáticas durante la conservación (Hafez y Hafez, 2002, p. 122).
- Proporcionar la capacidad tampón contra productos metabólicos

- Los medios diluyo-conservadores de esperma para uso en inseminación artificial, deben cumplir la exigencia de una fácil preparación y ser interesantes en el aspecto económico (Pérez y Pérez, 1986, p. 223).

2.3.2 Diluyentes utilizados.

La preparación de los diluyentes requiere de detalles y mucha atención en especial en la manipulación de reactivos o sustancias que van a ser utilizadas en la elaboración de este, alteraciones en la composición o contaminación puede perjudicar la calidad del diluyente preparado en función del tiempo de duración de este y la adaptabilidad con los espermatozoides (Paolomino, 2001, pp. 3-10).

2.3.3 Leche entera

2.3.3.1 Características

La leche es un producto que se utiliza como diluyente ya que proporciona un medio isotónico, mantiene la viabilidad espermática y su uso se difundió inicialmente en el semen bovino, en ovino se utiliza para semen fresco y refrigerado ya que se han tenido resultados variables en la congelación.

La leche es un líquido orgánico con propiedades biológicas para la conservación de los espermatozoides, pues posee capacidad amortiguadora, bactericida, de una viscosidad adecuada y abundancia de carbohidratos que son utilizados para proporcionar energía, además de lactosa que le confiere su propiedad crioprotectora (Balcázar y Porras, 2009).

Composición de la leche: La lactosa es el carbohidrato característico de la leche. Es un disacárido compuesto por glucosa y galactosa. La materia grasa está constituida fundamentalmente por triglicéridos muy distintos que forman una mezcla compleja; la leche también contiene pequeñas cantidades de otros lípidos, como fosfolípidos, colesterol, ácidos grasos libres y diglicéridos. Alrededor de las cuatro quintas partes de las proteínas de la leche

son caseínas que, a su vez, están constituidas por una mezcla de aproximadamente 10 proteínas diferentes. El resto corresponde esencialmente a las llamadas proteínas del suero y además hay algunas otras proteínas minoritarias, como las enzimas. Los minerales no equivalen exactamente al contenido de sales. Los principales son K, Ni, Mg, Cl y fosfato. La leche contiene muchos otros elementos en cantidades traza (Walstra, 2001).

Según Almenar (2007), las micelas de las caseínas y la lactosa presente en la leche, son las principales responsables de disminuir los daños por enfriamiento y congelación ya que secuestran proteínas presentes en el plasma seminal que tras la eyaculación inducen la pérdida de colesterol y fosfolípidos de las membranas plasmáticas.

2.3.4 Agua de coco

El Coco (*Cocos nucifera L.*) nos ofrece diversas posibilidades de uso, puesto que todas sus partes tales como raíz, tallo, hojas, inflorescencias y frutas se utilizan para fines de artesanía, alimentos, nutrición, agroindustrial, medicinal y biotecnologías, entre otros. Uno de sus principales usos existentes en Brasil, y con gran perspectiva, es su uso internacional de agua de Coco (Aragáo, 2000, p. 18).

El agua de coco (endospermo líquido) se comienza a formar en el interior de la fruta, en pequeña cantidad, A partir del segundo mes después de la apertura natural de la inflorescencia, alcanzando su volumen máximo alrededor del sexto mes de edad, dependiendo de la especie, varía 300 a 600 ml (Aroucha , Souza , Aroucha , y Vianni , 2005, p. 83).

El agua de coco es un material natural de gran potencial biológico y su utilización abarca muchas áreas, como la industria cosmética, alimenticia, médica y biotecnológica. En esta última zona, el agua de coco ha presentado muy buenos resultados que demuestran su eficacia como un medio para la preservación de los folículos pre-antrales, así como la conservación seminal, a través tanto de la refrigeración y criopreservación, en las diversas especies

estudiadas, lo que lo hace un dilutor alternativo, e importante para la difusión de programas de conservadores en la inseminación artificial, ya que tiene un costo beneficio favorable en comparación con otros dilutores en la relación de mercado (Barros y Toniolli, 2011, p. 401).

2.3.4.1 Composición Básica

El agua de coco corresponde al 25% del peso de la fruta, y su composición básica es 95.5 % de agua, 4 % de carbohidratos, 0,1 % de grasa, 0,02 % de calcio, 0,01 % de fósforo, 0,5 % de hierro, y aminoácidos, vitamina C, vitaminas del grupo B y minerales (Aragáo,2000, p. 19).

2.3.5 Yema de huevo

Un importante componente de los medios de refrigeración y congelación para la criopreservación de semen de diversas especies. Las propiedades protectoras de la yema de huevo sobre los espermatozoides durante la congelación fueron descubiertas por primera vez por Philips en 1939. Posteriormente se encontró que la yema de huevo tenía al menos dos factores activos, proteger contra el daño al enfriamiento y ayuda manteniendo la viabilidad. La yema de huevo de gallina ha sido utilizada convencionalmente en medios de criopreservación de semen, probablemente por su amplia disponibilidad (Bathgate, Maxwell, y Evans, 2006, p. 68).

La adición de la yema de huevo al diluyente tiene un efecto benéfico sobre el porcentaje de motilidad, particularmente luego de un rápido enfriamiento del semen a 10 y 5 grados centígrados, ya que las lipoproteínas de baja densidad actúan como crioprotectores contribuyendo con dos factores: uno de los cuales protege contra el shock de frío (factor de resistencia) y un segundo que mantiene una viabilidad (factor de conservación) (Fiser y Fairfull, 1986, p. 518). Se cree que la fosfatidilicolina (lectina) de las LDL (lipoproteínas de baja

densidad) es uno de los responsables de esta protección, contra el golpe de frío y congelación (Watson, 1995, p. 892).

2.4 Generalidades del Toro

“Los órganos reproductivos del macho de los animales domésticos comprenden de testículos, epidídimos, conductos deferentes, glándulas accesorias, y órganos de evacuación del semen” (Hafez y Hafez, 2002, p. 8).

2.4.1 Testículos

En el bovino los testículos están colocados en la región inguinal, en posición vertical. Presentan una forma oval, bastante alargada, de alrededor de 10 a 15 cm de largo y 5 a 8,5 cm de diámetro. Su peso se estima individualmente en 250 a 300 g y en conjunto unos 500 g. El tamaño del testículo depende de la edad, de la raza y del desarrollo corporal. Se estima aproximadamente en un 0,09% del peso vivo del animal. Su eje longitudinal es vertical (Rutter y Russo, 2006, p. 117).

2.4.1.1 Control de la temperatura

El flujo arterial es enfriado a medida que desciende por el cordón espermático por numerosas venas pequeñas, las que en su conjunto forman el llamado “Plexo Pampiniforme”. Una vez que la arteria penetra en el testículo, corre a lo largo de su borde posterior hasta alcanzar el polo caudal del mismo. Desde allí se dirige hacia el borde posterior y comienza a ramificarse; las pequeñas arterias penetran en el parénquima del órgano y alcanzan el mediastino testicular (Salomon, Evans, y Maxwell, 1990).

2.4.2 Epidídimo

Consiste en un único, largo y compacto tubo arrollado, con un soporte de elementos de tejido conjuntivo que lo fija al testículo. Presenta un diámetro que varía entre 70 y 500 mm; Su peso es diverso en función de las grandes diferencias existentes entre los tamaños de los animales,

siendo de 1 gr en el ratón, 4 gr en el hombre y 20 a 30 gr en el carnero. Con respecto a su longitud es de 2 m en el cobayo, 7 m en el hombre, 40 m en el toro, 50 a 60 m en el carnero y 80 m en el padrillo (Hafez y Hafez, 2002, p. 7).

Convencionalmente está dividido en tres regiones:

- Cabeza: ubicada en el polo proximal del testículo y formada por 13 a 15 conductos eferentes.
- Cuerpo: corre por el borde medial y posterior del testículo.
- Cola: situada en el polo distal del mismo y almacena una importante cantidad de espermatozoides.
- Los conductos eferentes y el canal epididimario están completamente rodeados por fibras musculares lisas circulares que se engruesan a nivel de la cola y comprenden también fibras longitudinales del mismo tipo. Esta musculatura presenta contracciones peristálticas regulares cada 2-10 segundos que aseguran el transporte de los espermatozoides en el epidídimo (Galina y Valencia, 2008, p. 30).

2.4.3 Glándulas accesorias

Las principales glándulas anexas del aparato reproductor de los animales son las siguientes:

- Glándulas vesiculares, también llamadas vesículas seminales.
- Glándulas bulbouretrales o de Cowper.
- Próstata (Hafez y Hafez, 2002, pp.7-8).

2.4.4 Vesículas seminales

Las Vesículas Seminales consisten en un par de glándulas genitales ubicadas en el piso de la pelvis a ambos lados del cuello de la vejiga. Se denominan de tal manera porque anteriormente se creía que eran reservorios de semen. Estas glándulas segregan un líquido claro que tiene como función acrecentar el volumen del eyaculado, aportar nutrientes y servir como buffer al semen. Alrededor del 50% del volumen total del semen es aportado por estas

estructuras. Son lobuladas y miden de 10 a 15 cm de largo y 2 a 4 cm de diámetro (Hafez y Hafez, 2002, p. 7).

2.4.5 Próstata

Con respecto a la Próstata, esta se encuentra hacia caudal de las anteriores y sus secreciones se vierten junto al semen en el momento de la eyaculación por medio de numerosos conductos que se abren hacia la uretra pelviana, en lateral del colículo seminal. Es la única glándula accesoria del macho constante en todas las especies de animales domésticos, y su cuerpo mide 2,5 cm de ancho por 1 a 1,5 cm de grosor, lo que la hace palpable por el recto. La porción diseminada rodea a la uretra pelviana y está cubierta por el músculo uretral (Hafez y Hafez, 2002, p. 8).

2.4.6 Órganos de evacuación del semen

2.4.6.1 Conducto Deferente

Comunica la cola del epidídimo con la uretra pelviana. Ascende por la cara medial de la binza, acompañando a la arteria y vena espermáticas, músculo cremáster externo y tunicas vaginales derivadas del peritoneo, tiene una capa lisa gruesa en su pared. Penetra al abdomen por el trayecto inguinal; a nivel de la cada dorsal de la vejiga urinaria se dilata formando la ampolla del conducto deferente (Hafez y Hafez, 2002, p. 7).

2.4.6.2 Uretra

Comienza en el orificio uretral interno, en el extremo caudal del cuello de la vejiga y llega hasta el orificio uretral externo en la punta del pene. Revestida por un musculo esquelético capaz de continuar la ola de contracción eyaculativa. Alberga al colículo seminal de la uretra craneodorsal y recibe las secreciones de las glándulas vesiculares y el esperma proveniente de las ámpulas. Además, las aberturas de los conductos prostáticos vacían su contenido en esta sección de la uretra antes y durante la eyaculación (Popesko, 1998, p. 46).

2.4.7 Pene

El pene es el órgano copulador del macho. Posee una forma cilíndrica, y mide 90 cm de largo y de ancho 3 a 4 cm. Presenta tres porciones: raíz, cuerpo y glande. Dos raíces que se insertan en la base de la tuberosidad isquiática dan origen al pene y convergen para formar la porción dorsal del cuerpo de este. En ventral se ubica la uretra, rodeada de tejido eréctil (cuerpo cavernoso) (Hafez y Hafez, 2002, p. 10).

2.4.8 Prepucio

Recorre sagital y ventralmente la pared abdominal desde la zona prepúbica hasta la región umbilical y por lo tanto mide aproximadamente 40 cm de largo y 3 cm de diámetro, con amplias variaciones según las especies animales. El prepucio es un pliegue invaginado de la piel que rodea la extremidad libre del pene cuando éste no está en erección. De esta forma, el exterior de este está constituido por los estratos normales de la piel y su interior se encuentra recubierto de una membrana mucosa (Rutter y Russo, 2006, p. 113).

2.5 Fisiología del semental bovino:

2.5.1 Espermatogénesis.

Se denomina función exocrina del testículo o espermatogénesis al proceso gracias al cual tiene lugar la formación y almacenamiento de los espermatozoides a partir de las espermatogonias en el tubo seminífero bajo el gobierno de las gonadotropinas hipofisarias en acción sinérgica con los andrógenos. La duración total del ciclo partiendo de la espermatogonia hasta la formación del espermatozoide tiene una duración aproximada de 65, 49 y 38 días en el toro, carnero y cerdo respectivamente (Gallina y Valencia, 2008, p. 70).

2.5.2 Espermatozoides

El espermatozoide es considerado la célula más especializada de todas, ha evolucionado hasta llegar a ser diferente de los demás tipos celulares, la particularidad de tener una cabeza la cual contiene la información genómica, una pieza media con mitocondrias que da movilidad al flagelo, son características que dan una diversidad morfológica entre las especies, no todos los espermatozoides son iguales y no todos llevan los procesos de capacitación y reacción acrosomal al mismo tiempo dentro del aparato reproductor de la hembra. Por ello es importante

conocer los procesos que sufren los espermatozoides desde su producción hasta los cambios bioquímicos que desencadenan la interacción con el ovocito para dar lugar a la fertilización (Ávalos, Gonzáles, Vargas, y Herrera, 2018, p. 7).

2.5.2.1 Estructura del espermatozoide

Los espermatozoides maduros son células alargadas consistentes de una cabeza aplanada portadora del núcleo y una cola que contiene el aparato necesario para la movilidad celular. La célula espermática está cubierta en su totalidad por la membrana plasmática. El extremo anterior del núcleo espermático está cubierto por el acrosoma, un delgado saco membranoso de doble capa estrechamente adherido al núcleo durante las últimas etapas de la formación de espermatozoide en el testículo. Esta estructura en forma de casquete, contiene varias enzimas hidrolíticas incluyendo procrastina, hialuronidasa, esterases y ácido hidrolasa, que participan en el proceso de fecundación. Un cuello une la cabeza del espermatozoide con la cola, la cual se subdivide en los segmentos medio, principal y caudal (Hafez y Hafez, 2002, p. 98).

2.5.3 Semen

Los espermatozoides junto con las secreciones de las vesículas seminales, próstata y glándulas bulbouretrales constituyen el semen. La porción líquida de dicha suspensión se forma durante la eyaculación, se llama plasma seminal. El semen puro inalterado normalmente aparece como un fluido ligeramente amarillento blanquecino, lechoso con aspecto cremoso cuya consistencia depende del número de espermatozoides, células degeneradas, gránulos lipóideos, corpúsculos hialinos y concreciones (Herman, Mitchell, y Doak, 2003, p. 75).

2.6 Evaluación del toro reproductor

Una evaluación de la salud reproductiva (BSE) es un procedimiento relativamente rápido y económicamente prudente para evaluar toros en su fertilidad potencial. Elaborar una BSE implica una completa evaluación de todos los factores que contribuyen a un potencial reproductivo normal. Se recomienda a los veterinarios que sean tan exhaustivos como las tecnologías actuales lo permitan y que sigan consistentemente un procedimiento rutinario y estándar. La predicción de cuáles toros serían los menos exitosos en impregnar vacas representa el mayor valor del sistema actual. Esto significa que basados en la historia y en la información

recogida al momento de la evaluación, los toros son categorizados como por encima o por debajo de los mínimos establecidos para las características conocidas que más afectan la fertilidad (Jiménez, 2002, p. 1)

2.6.1 Examen clínico y físico general.

2.6.1.1 Evaluación del estado de salud general del animal

Realizar un examen clínico general incluye un examen de las condiciones físicas del macho, con especial interés de los genitales externos e internos evaluados por palpación o inspección, también el sistema locomotor, fundamentalmente tren posterior, el estado puede ser considerado bueno malo o irregular, basado en el examen visual del desarrollo corporal y peso del animal (Rutter y Russo, 2006, p. 76).

2.6.1.2 La condición corporal

Toros muy delgados o gordos no tienen buena aptitud reproductiva, ya que requerirán de mayor esfuerzo para montar y caminar si están muy gordos, o pueden debilitarse durante el encaste si están muy flacos (Duchens, 1999, p. 5).

2.6.1.3 Evaluación de patas y pezuñas

La búsqueda de lesiones o mala conformación que pudieran conducir a cojera, ruptura de ligamentos y meniscos o pérdida de la estabilidad, ya que muchos animales no montan a las hembras por dolor o imposibilidad anatómica de sus miembros en el momento del salto.

El toro debe caminar, trotar, ver, oler y tener la capacidad de detectar y servir hembras en celo. Cualquier factor que afecte una de estas actividades traerá como consecuencia una menor eficiencia reproductiva, muchos de los problemas que se encuentran en los toros, tienen una alta heredabilidad (Bavera, 2005, p. 12).

2.6.1.4 Capacidad del servicio y la libido

La capacidad de servicio se determina el número de montas que se realiza un toro en un determinado periodo de tiempo. Un toro con buena capacidad de servicio va a heredar esta característica a su descendencia, en hembras se expresa con celos más largos y manifiestos, esto a su vez ayuda a que el toro pueda repetir el servicio en un mayor número, produciendo

alto porcentaje de concepción y el porcentaje de preñez también incrementa (Puignau, 2000, p. 78).

2.6.2 Órganos sexuales accesorios

La evaluación de las glándulas sexuales accesorias se realiza por palpación rectal. Se palparán las ampollas de los ductos deferentes, las glándulas seminales y la próstata. En los toros jóvenes, el desarrollo de estas glándulas es indicativo de la función testicular, ya que todas son andrógeno-dependientes. La lesión más común es la vesiculitis, la cual cuando va acompañada de leucocitos en el semen, es característica de enfermedades infecciosas (Angelino, 2009, p. 18).

2.6.3 Prepucio y pene

El prepucio debe ser palpado para descartar la presencia de adherencias, heridas o hematomas. Anormalidades en el pene son motivo de descalificación, como hipoplasia del glande, duplicación parcial o total del pene, persistencia del frenillo del pene, ausencia total de la flexura sigmoidea, la cual se detectaría por la presencia de un pene corto (Fernández de Córdova y De la Barrera, 2009, p. 56).

2.6.4 Escroto

Se debe realizar por la parte posterior y observar el escroto. La temperatura ambiental debe ser cálida para evitar que el escroto se contraiga y se obtenga una idea falsa de su forma. La piel debe estar libre de lesiones o heridas que pudieran comprometer la salud de los testículos. Existen diferentes formas de escroto el de cuello bien definido, generalmente permiten un buen desarrollo testicular; el escroto de cuello muy corto podría causar problemas con el mecanismo termorregulador del testículo, causando patologías testiculares (Rutter y Russo, 2006, p. 118).

2.6.5 Testículos

Machos con testículos de tamaño y forma diferente, deben ser observados con reserva. Cualquier asimetría es un indicador de lesiones, anormalidades anatómicas o enfermedades testiculares. Generalmente, el testículo derecho es ligeramente más pequeño que el izquierdo. El descenso incompleto de los testículos es conocido como criptorquidia (Fernández de Córdova y De la Barrera, 2009, p. 57).

2.6.6 La circunferencia escrotal

Debe ser siempre medida. Existe una correlación entre el peso de los testículos y la circunferencia escrotal y entre el peso de los testículos y la producción de espermatozoides, de manera tal, que, al escoger animales con una circunferencia escrotal mayor, indirectamente se hace selección por producción de espermatozoides (Hafez y Hafez, 2002, p. 16).

2.6.7 Epidídimo

Se debe comenzar por la cola para continuar con el cuerpo, en la cara interna del testículo y terminar en la cabeza. Se debe buscar inflamaciones, engrosamientos, aplasias, malformaciones. Cualquier alteración debe ser vista con reserva por parte del evaluador y desechar el animal que se esté evaluando. Es importante recordar que es en el epidídimo donde se acumulan los espermatozoides, los cuales serán eyaculados en algún momento y si el órgano está en malas condiciones, es lógico pensar que el toro presentará problemas de fertilidad (Albaracín, Gonzáles, y Calderon, 2001, p. 82).

2.6.8 Evaluación seminal

Cuando se realiza la evaluación seminal es importante tomar en cuenta la edad, raza, estado nutricional, actividad sexual, método de colección, época y estado de salud del animal. La evaluación del semen es la principal parte del examen andrológico para verificar el potencial generando para la compra y venta de reproductores antes del inicio de la monta o inseminación artificial (Palma, 2001, p. 23).

El semen debe ser evaluado por volumen, medido directamente en el tubo colector, color, olor, motilidad, concentración y morfología espermática. Las muestras de semen pueden ser obtenidas por vagina artificial o por electro eyaculación, las últimas tienen la misma calidad que las primeras, pero el volumen, pH y concentración pueden variar debido a que pudieran ser más diluidas por tener mayor cantidad de secreciones de las glándulas accesorias (Rutter y Russo, 2006, p. 125).

2.7 Inseminación artificial

“La inseminación artificial puede definirse como la biotecnología para la aplicación de

semen en el tracto genital de una hembra en el momento efectivo para la fecundación” (Giraldo, 2007, p. 51).

La inseminación artificial (artificial insemination, AI) es la técnica individual más importante creada para el mejoramiento genético de animales, debido a que unos pocos machos seleccionados producen suficientes espermatozoides para inseminar miles de hembras al año (Hafez y Hafez, 2002).

Para que una IA sea exitosa deben considerarse muchos factores, sin embargo, el más importante es el medio de conservación, ya que de ello depende la viabilidad de los espermatozoides. Actualmente los métodos de conservación el semen debe estar muy bien protegido ya que durante este proceso diversos factores pueden alterar los resultados, algunos de ellos pueden ser la dilución, el enfriamiento, la congelación y la descongelación (Vishwanath y Shannon, 2000, p. 23).

2.7.1 Ventajas de la inseminación artificial

Robson y Aguilar (2004) indican que las ventajas de la inseminación artificial son:

- **Mejoramiento genético:** permite aumentar el número de crías por toro y por año. En un servicio natural se utiliza un 3 a 4 % de toros, lo que significa que un toro puede servir entre 25 a 35 vacas por servicio. En la I.A. de un solo eyaculado se pueden obtener 240 pastillas.
- **Fácil transporte de material genético:** resulta más económico transportar semen que el toro.
- **Conservación prolongada del semen:** durante muchos años, aún después de muerto el animal.
- **Reducción o eliminación de toros de los rodeos.**

- Prevención y control de enfermedades: la I.A. elimina el contacto directo entre el macho y la hembra, con lo que se previenen enfermedades de transmisión venérea (Vibriosis y Tricomoniasis) y otras.
- Mantenimiento de registros seguros (p. 3).

2.7.2 Desventajas de la inseminación artificial

Galina, Salteil, y Valencia (1986) manifiesta las siguientes:

- El costo inicial de equipo
- Las enfermedades pueden difundirse cuando se utilizan sementales enfermos.
- La consanguinidad tiende a incrementarse cuando se utilizan sementales de una sola línea genética durante muchos años.
- Implica de un dominio de la técnica. Es necesario que el técnico inseminador sea entrenado en una empresa especializada que cuente con bastante experiencia.
- Requiere una muy buena elección del celo (capacitar personal) (pp. 57-59).

2.8 Método de colecta de semen

Cualquiera que sea el método que se vaya a utilizar para colectar semen bovino, es indispensable la limpieza para no contaminarle semen, el manejo adecuado que incluyen colecta, preparación sexual, estimulación sexual, aumentan la cantidad y calidad del semen obtenido (Herman, et al., 2003, p. 75).

2.8.1 Colección de semen por vagina artificial

La vagina artificial modificada consta de un tubo de PVC de 20 cm de largo por 4 cm de diámetro. La vagina artificial contiene aire a presión y agua caliente que debe mantenerse entre 38 a 40 °C. La vagina artificial se cubre con una frazadilla eléctrica para mantener una

temperatura constante y se colocó dentro de un maniquí (Bravo, Flores, Garnica, y Ordoñez, 1997, p. 619).

El uso de la vagina artificial montada dentro de un maniquí, más natural y confiable, es el que le ofrece una muestra de semen más fisiológica. Esta vagina artificial similar para el de una oveja pero que simula el cérvix mediante un resorte espiral, este era un requisito para obtener el semen, porque las alpacas o llamas penetran el cérvix y depositan el semen en el útero (Fernandez, 1993, p. 307).

2.9 Valoración del semen.

Para considerar a un toro como apto reproductivo, asumiendo que es un animal clínicamente sano, debe cumplir con tres requisitos básicos, como son: buena libido, buen estado clínico reproductivo y buena calidad espermática.

Las técnicas usadas para valoración seminal solamente proporcionan una estimación sobre el potencial de fertilización de los espermatozoides. Siendo el semen con grandes probabilidades de fecundación el que sea distribuido y separado. La evaluación de un solo eyaculado no permite emitir un juicio sobre el semen, solo luego de varias evaluaciones se evitarán interpretaciones erróneas (Hafez y Hafez, 2002, p. 43).

2.9.1 Examen macroscópico

La evaluación tradicional consiste en la exanimación física o macroscópica del semen que es la primera fase de análisis antes de empezar en si el procesamiento en el interior del laboratorio en el cual se toman en cuenta parámetros como: apariencia, color, aspecto, olor, volumen, Ph (Rutter y Russo, 2006, p. 72).

2.9.2 Volumen

El volumen del eyaculado es principalmente aportado por las vesículas seminales y glándula prostática, con un pequeño aporte de las glándulas bulbouretrales y el epidídimo. El volumen

del líquido seminal es esencial para obtener el número total de espermatozoides y células no espermáticas en el eyaculado (Sarabia, 2015, p.15).

Rutter y Russo (2006) mencionan que, el volumen de eyaculado tiene un rango entre 2 y 12 cm, con un promedio entre 4 y 6 cm, se mide en el tubo colector graduado, y varía fisiológicamente en función de varios factores

- Edad
- Raza
- Preparación sexual
- Tamaño testicular y características individuales
- Frecuencia de recolección
- Método de colección (p. 75).

2.9.3 pH

El pH del semen varía normalmente en un rango muy estrecho (7,2 - 8,0), pocos son los trastornos capaces de alterarlo. Se ha sugerido que un pH elevado (> 8) puede considerarse un signo de infección seminal si se asocia a otros síntomas y signos de sospecha, mientras que un pH disminuido ($< 7,2$) se observa cuando existe un déficit de la función de las vesículas seminales, en especial en pacientes con el síndrome de ausencia funcional de los conductos eyaculadores (Padrón, Fernández, y Gallardo, 1998, pp. 81-90).

2.9.4 Color

Se consideran normales los colores que van del blanco al amarillento, siendo patológicos los colores rosado, amarronado y verdoso (Gómez y Migliorisi, 2015, p. 1).

2.10 Examen microscópico

2.10.1 Motilidad

Depende de factores intrínsecos (estructura del flagelo, actividad enzimática), y de factores extrínsecos (composición bioquímica del medio extracelular en el que se encuentra el espermatozoide, plasma seminal, moco cervical, etc.). En la valoración de la motilidad espermática hay un aspecto cuantitativo, o porcentaje de espermatozoides con movilidad, y un aspecto cualitativo, o velocidad y direccionalidad de los espermatozoides (Rutter y Russo, 2006, p. 74).

2.10.2 Motilidad masal

Se evalúa observando el tubo de recolección y detectando la presencia o no de movimiento masal o de remolinos. Se considera como positiva o negativa (Gómez y Migliorisi, 2015, p. 2).

2.10.3 Concentración

Existe una variabilidad muy grande en la concentración de un eyaculado a otro, y de un toro a otro, siendo importante conocer el número de espermatozoides por eyaculado, ya que de este parámetro depende el número de hembras a inseminar.

La concentración puede calcularse por varios métodos a partir de la muestra de semen. Entre estos métodos, destacan la espectrofotometría, la colorimetría, la citometría de flujo y el uso de cámara de recuento celular, como las de Bürker, Neubauer o Thoma (Hidalgo, Tamargo, y Diéz, 2015, p. 40).

2.10.4 Morfología celular

La morfología del semen significa el estudio de la forma del esperma, midiéndose el porcentaje del esperma normal y anormal clasificándolas como primarias o secundarias, dependiendo si el defecto ocurre durante la formación de la célula, en la espermatogénesis en el testículo, dentro del epidídimo o en el laboratorio (Galina y Valencia, 2008, p. 73).

2.11 Métodos de dilución final

La dilución debe planificarse de manera que el número de espermatozoides presentes en un envase adecuado para su manejo e inseminación debe ser suficiente, debe ser mezclado inmediatamente después de la eyaculación en relación 1:1, la dilución depende de la concentración inicial. La concentración y motilidad de los espermatozoides en las muestras de semen colectadas, determina el rango o grado de dilución, pero no determinan una fertilidad garantizada (Rutter y Russo, 2006, p. 126).

2.12 Concentración Espermática

El número de pajuelas debe asignarse en función de la calidad original del semen, la edad del toro y de su ritmo de colecta. Con toros muy fértiles puede utilizarse concentraciones extremadamente bajas de 5 – 8 millones de espermatozoides totales por pajuela, siempre que el toro tenga un ritmo de colecta continuo (2 eyaculados por sema). Como dato referencial en Francia se utilizan:

15 millones de espermatozoides en toros elite.

20 millones en toros estándar.

23 millones en toros de testaje (fertilidad desconocida) (Hafez y Hafez, 2002, p. 122).

2.13 Congelación de semen

Desde el descubrimiento del glicerol como agente crioprotector (CP) efectivo y del establecimiento de las técnicas básicas de criopreservación, el semen de varias especies se congela y utiliza con éxito en la IA. Sin embargo, y con excepción de los bóvidos, la utilización generalizada de semen congelado no se ha extendido a otras especies domésticas (Holt, 2000, p. 18).

La baja fertilidad del semen crio conservados es atribuida a cambios ultraestructurales, bioquímicos y funcionales que sufre una porción significativa de las células espermáticas y que conducen a un transporte insuficiente de y pérdida de viabilidad en el tracto genital. Los cambios ultraestructurales afectan principalmente a las membranas, debido a la reordenación

de lípidos membranosos durante la congelación –descongelación, alterando las asociaciones lípido-lípido y lípido proteínas (Herman, Mitchell y Doak, 2003, p. 64).

El nitrógeno líquido es el refrigerante de elección para conservar semen por largos periodos de tiempo y a bajas temperaturas, existe gran variedad de tanques almacenadores, varían en tamaño y con centrales de almacenamiento de varios cientos de miles de pajillas, y con reserva de nitrógeno hasta por 6 meses, la pérdida del nivel de nitrógeno en estos tanques refrigerantes puede ser letal para el espermatozoide, aunque aparentemente el semen está congelado (Palma, 2001, p. 23).

2.14 Descongelamiento del semen

La descongelación es el proceso por el cual una sustancia que se ha solidificado por la pérdida de calor cambia al estado de líquido con la ganancia de energía procedente del medio que le rodea. Existen diversos procesos para realizar el cambio de estado en las dosis seminales criopreservadas bovinas. La ganancia de temperatura se realiza sumergiendo la pajuela dentro de un termo atemperado a 37°C, 30 seg. En estudios de mayor precisión se utilizaba la inmersión en baños termostatzados a 56°C, 12 seg (Thilmant, 1997), en la especie porcina. Aunque diversos autores proponen una descongelación rápida a 52°C, 12 seg para envases de semen porcino de 0'5 ml (Sellés, Gadea, Romar , Matás , y Ruiz , 2003, p. 68).

La viabilidad post-descongelación se determina mediante el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva y el vigor espermático. Durante la congelación-descongelación los daños que se producen en la membrana pueden no ser completamente expresados inmediatamente después de la descongelación. Por ello, el semen debe ser incubado a 37°C, 2 h en una evaluación conocida como prueba de termorresistencia o de incubación. El semen descongelado de buena calidad normalmente tiene 40-50% de espermatozoides con motilidad progresiva. Después de 2 h de incubación, estos valores disminuyen un 10-15% (Catena y Cabodevila, 1999, p. 24).

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales físicos

Tabla 2. *Materiales de oficina*

| Descripción | Cantidad | Unidad de medida |
|---------------------|----------|------------------|
| Hojas de papel bond | 1 | Resma |
| Esferos | 2 | Unidad |
| Marcadores | 2 | Unidad |
| Libreta de campo | 1 | Unidad |
| Carpetas | 2 | Unidad |
| Computadora | 1 | Unidad |
| Tinta de impresión | 1 | Unidad |
| Grapadora | 1 | Unidad |
| Cámara digital | 1 | Unidad |
| Calculadora | 1 | Unidad |

Fuente. El autor

Tabla 3. *Materiales campo*

| Descripción | Unidad de medida | Cantidad |
|----------------------|------------------|----------|
| Manga | Unidad | 1 |
| Overol | Unidad | 1 |
| Botas | Par | 1 |
| Gorra | Unidad | 1 |
| Vagina artificial | Unidad | 1 |
| Embudo | Unidad | 1 |
| Tijera | Unidad | 1 |
| Jabón | Unidad | 1 |
| Toalla de secado | Paquete | 1 |
| Suero fisiológico | Frasco (ml) | 1 |
| Equipo de venoclisis | Litro | 1 |
| Gel lubricante | Unidad | 1 |
| Papel aluminio | Unidad | 1 |
| Tubos colectores | Unidad | 1 |

| | | |
|---------------------|--------|---|
| Termómetro | Unidad | 1 |
| Termo | Unidad | 1 |
| Guantes quirúrgicos | Caja | 1 |
| Fuente: El autor | | |

Tabla 4. *Materiales de laboratorio*

| Descripción | Unidad de medida | Cantidad |
|--------------------------------|------------------|----------|
| Mandil | Unidad | 1 |
| Microscopio | Unidad | 1 |
| Portaobjetos | Caja | 1 |
| Cubreobjetos | Caja | 1 |
| Micropipetas | Unidad | 2 |
| Vaso de precipitación (250 ml) | Unidad | 4 |
| Cámara de Neubauer | Unidad | 1 |
| Papel filtro | Unidades | 20 |
| Placa térmica | Unidad | 1 |
| Termo de nitrógeno líquido | Unidad | 1 |
| Cámara de refrigeración | Unidad | 1 |
| Pajillas | Unidad | 200 |
| Perlas de sellado | Unidad | 200 |
| Cooler | Unidad | 1 |
| Gradilla | Unidad | 1 |
| Tiras Ph | Unidad | 20 |

3.2 Materiales químicos

Tabla 5. *Materiales químicos*

| Descripción | Unidad de medida | Cantidad |
|---------------|------------------|----------|
| Leche entera | Litro | 1 |
| Agua de coco | MI | 50 |
| Glicerol | MI | 50 |
| Yema de huevo | Unidad | 20 |
| Agua caliente | Litros | 20 |
| Eosina | MI | 50 |
| Nigrosina | MI | 50 |

3.3 Materiales biológicos

Tabla 6. *Materiales biológicos*

| Descripción | Cantidad |
|---------------|----------|
| Bovino macho | 1 |
| Hembra bovino | 1 |

Fuente: El autor

3.4 MÉTODO

El método de investigación que se aplicó en este trabajo de investigación fue el inductivo experimental porque permitió estudiar el fenómeno bajo condiciones especiales planteadas, y además es inductivo ya que éste permite observar hechos anteriores sobre el tema.

3.4.1 Selección y tamaño de muestra

El siguiente trabajo investigativo se realizó con un toro mestizo de 24 meses de edad del cual se obtuvo 10 eyaculados diferentes, los cuales fueron utilizados para realizar las pruebas macroscópicas y microscópicas pre-congelación y post-descongelación.

3.4.2 Toma de muestra

Se manejaron 10 eyaculados para realizar el análisis macroscópico y microscópico pre-congelación y post-descongelación las muestras seminales fueron divididas en partes iguales para cada diluyente.

3.4.3 Toma y registro de datos

Se utilizó fichas de registro en las cuales se anotaron datos importantes como procedencia, hacienda, propietario, nombre, edad, sexo, peso, color de pelaje, número de arete proporcionado por el MAG (Ministerio de Agricultura y Ganadería).

3.5 Diseño estadístico

En el presente trabajo de investigación se utilizó una “t” de student, que nos permitió evaluar dos diluyentes para la crio conservación de semen bovino leche entera y agua de coco, la significación será del 1% y 5% respectivamente.

3.6 Operacionalización de variables

3.6.1 Variables dependientes: (Motilidad, supervivencia, mortalidad y morfología)

Tabla 7. *Variables dependientes*

| Concepto | Categoría | Indicadores | Índice |
|---|---------------|--|-------------|
| Este estudio fue diseñado para evaluar la Viabilidad espermática: motilidad, morfología, vitalidad; de los espermatozoides del semen crio conservado, permitiendo saber el número de espermatozoides con características óptimas para la fecundación. | Motilidad | Indica la concentración y la viabilidad de los espermatozoides. | Porcentajes |
| | Supervivencia | Cantidad de espermatozoides vivos. | Porcentajes |
| | Mortalidad | Cantidad de espermatozoides muertos. | Porcentajes |
| | Morfología | Determina la forma de los espermatozoides y su probable capacidad de fecundar. | Porcentajes |

3.6.2 Variables independientes: (Diluyentes: leche entera y agua de coco)

Tabla 8. *Variables independientes*

| Concepto | Categoría | Indicadores | Índice |
|--|-----------------|-------------|----------|
| Estos medios permiten aumentar el volumen del eyaculado, en medios nutritivos proporcionando viabilidad espermática. | Química | Volumen | Militros |
| | • Agua de coco | 83 | ml |
| | • Leche entera | 83 | ml |
| | • Glicerol | 7 | ml |
| | • Yema de huevo | 10 | ml |
| | • Gentamicina | 3 | mg/ml |

Fuente: El autor

3.6.3 Procedimiento

3.6.3.1 Identificación del toro donante

El reproductor donante de semen fue un toro mestizo Charolais, con condición corporal Cuatro, con muy buena capacidad de monta y aparentemente sano.

3.6.3.2 Preparación del toro donante

Previo a la colección del semen se cortó el vello prepucial, se realizó un lavado con abundante agua y jabón con pH neutro y se introdujo una solución fisiológica toda la parte interna del prepucio, seguidamente se prosiguió a realizar el secado.

3.6.3.3 Excitación pre-coital

Se efectuó la excitación pre coital; con montas falsas para esto debemos tener una vaca que este en celo o sin celo, con esto logramos elevar la libido del semental.

3.6.3.4 Colecta de semen

Para la colecta del semen se utilizó una vagina artificial, inmediatamente se procedió a obtener las muestras del semen, realizando 10 eyaculados del semental, dos veces en la semana.

Los tubos con el semen se introdujeron en un termo a 37 °C con el objetivo de mantener la temperatura hasta llegar al laboratorio.

3.6.3.5 Análisis macroscópico del semen

Una vez recolectado el semen se analizó: volumen, pH, color, olor.

El volumen y demás parámetros fueron observados directamente desde el tubo colector ya que obtuvimos un promedio de 6.2 ml del eyaculado, un color blanco cremoso y un olor "sui generis".

pH: Este parámetro se evaluó sobre una tira de papel tornasol indicadora de pH se colocó una gota de semen sin diluir y se procedió a dar lectura con un valor de 6.72

3.7 Parámetros microscópicos analizados con semen puro

3.7.1 Motilidad individual

Este parámetro fue analizado antes de la dilución con los diluyentes, se tomó una gota de semen puro y se colocó sobre un portaobjetos y un cubreobjetos precalentados a 37°C sobre una placa térmica; se observó bajo el microscopio con objetivo de 40x y, de esta forma, se evaluó el porcentaje de motilidad individual de acuerdo con el avance de forma rectilínea progresiva, siendo estos los que atraviesan el campo de observación, lo cual nos arrojó un valor del (80%); este análisis tuvo como fin comparar la influencia que tiene cada diluyente en la motilidad individual con la dilución la cual explicaremos más adelante.

3.7.2 Motilidad masal

Este parámetro se evaluó antes de la dilución, lo cual se colocó una gota de semen puro en un portaobjetos precalentado a 37 ° C en la placa térmica, se observó al microscopio a un aumento de 10X sin cubreobjetos apreciando un valor de (80%).

3.7.3 Concentración espermática

Se tomó una muestra de semen puro y se realizó una dilución 1:200; es decir una parte de semen y 200 partes de agua, dejamos por cinco minutos hasta que mueran los espermatozoides homogenizados bien y colocamos una gota en la cámara de Neubauer. Seguidamente se procedió

el respectivo conteo de cinco cuadrantes.

El procedimiento para el conteo del número de espermatozoides y la cantidad de pajillas a crio conservar se realizó de la siguiente manera

Cálculo para el conteo de espermatozoides en la cámara de Neubauer.

Leche entera

$N \cdot 5 \cdot 10 \cdot 200 \longrightarrow$ Fórmula.

$N \longrightarrow$ Número de espermatozoides en cinco cuadrantes.

$5 \longrightarrow$ Número de cuadrantes contados.

$10 \longrightarrow$ Profundidad de la cámara 1mm^3 .

$200 \longrightarrow$ Factor de dilución.

$45 \cdot 5 \cdot 10 \cdot 200 \longrightarrow 450.000$

$450.000 \cdot \frac{1\text{cuadrante}}{0.1\text{mm}^3} \cdot \frac{1000\text{mm}^3}{\text{ml}} = 45 \cdot 10^7 \longrightarrow$ Número de espermatozoides en 1 ml.

$45 \cdot 10^7 \cdot 3 = 135 \cdot 10^7 \longrightarrow$ Número de espermatozoides en 3 ml.

Datos para calcular el número de pajuelas.

Volumen del semen 3ml

Motilidad individual 64 %

Normalidad 81%

$1'350.000.000 \times 0,64 \times 0,81$

$\frac{699.840.000}{30.000.000}$

\longrightarrow Número de espermatozoides por pajuela

699.840.000

$\frac{699.840.000}{30.000.000} = 23 \text{ pajuelas}$

Necesitamos 11.5 ml de diluyente, como tenemos en la dilución inicial 6 ml, posteriormente se requirió 5.5 ml de diluyente.

Agua de coco

$45 \times 5 \times 10 \times 200 \rightarrow 450.000 \rightarrow$ Fórmula.

$$\frac{450.000 * 1 \text{ cuadrante} * 1000 \text{ mm}^3}{0.1 \text{ mm}^3 \quad \text{ml}} = 45 \times 10^7 \rightarrow$$
 Número de espermatozoides en 1 ml.

$45 \times 10^7 * 3 = 135 \times 10^7 \rightarrow$ Número de espermatozoides en 3 ml.

Datos para calcular el número se pajuelas.

Volumen 3ml

Motilidad individual 45 %

Normalidad 74 %

$$\frac{1'350.000.000 \times 0,45 \times 0,74}{30.000.000} \rightarrow \text{Número de espermatozoides por pajuela}$$

$$\frac{449.550.000}{30.000.000} = 15 \text{ pajuelas}$$

Necesitamos 7,5 ml de diluyente, como tenemos en la dilución inicial 6 ml, posteriormente se requirió 1.5 ml de diluyente.

El valor de motilidad masal fue de (80%), la motilidad individual con semen puro (80%) y la concentración espermática fue de $45 (x10^7 \text{ spz/ml})$; se realizó el análisis solamente en pre-congelación con el semen puro ya que con el semen diluido no utiliza para analizar dichos parámetros, siendo los mismos valores tanto para la leche entera y el agua de coco.

3.8 Elaboración de los diluyentes

Los diluyentes empleados para la dilución de la muestra fueron elaborados de la siguiente forma: Diluyente leche entera: Para su preparación se adquirió un litro de leche entera con la marca comercial la lechera. Es una leche que ha sido sometida al proceso UHT (Ultra High Temperature, esterilización a 140°C) para obtener un producto libre de bacterias sin perder sus propiedades nutritivas y sin preservantes.

Diluyente agua de coco: Para la elaboración del diluyente de agua de coco se utilizó agua de coco (fruto con 6 meses de maduración) y de color negro, ya que tiene mejores propiedades nutritivas.

Una vez sacada el agua de coco se sometió a un proceso de filtrado con el fin de eliminar las impurezas que podrían alterar la investigación, de igual manera que la leche se colocó en baño maría a 37 °C.

A continuación, explicaremos el cálculo y la cantidad de diluyente de leche entera y agua de coco que se utilizó.

Para el cálculo de los diluyentes está basado en 100 ml, se procedió de la siguiente manera, como podemos observar en la tabla 9.

Tabla 9. *Elaboración de los diluyentes*

| Elaboración diluyente leche entera | | Elaboración diluyente agua de coco | |
|------------------------------------|---------|------------------------------------|---------|
| Leche entera | 83 ml | Agua de coco | 83 ml |
| Glicerol | 7 ml | Glicerol | 7 ml |
| Yema de huevo | 10 ml | Yema de huevo | 10 ml |
| Gentamicina | 3 mg/ml | Gentamicina | 3 mg/ml |

Fuente: Autor

Tabla 10. *Cantidades de diluyentes utilizados*

| | | | |
|---------------|---------|---------------|---------|
| Leche entera | 7 ml | Agua de coco | 3.7 ml |
| Glicerol | 0.6 ml | Glicerol | 0.31 ml |
| Yema de huevo | 0.85 ml | Yema de huevo | 0.45 ml |
| Gentamicina | 34.5 mg | Gentamicina | 22.5 mg |

Fuente: Autor

2.2 Proceso para la dilución del semen

El volumen del eyaculado fue 6ml dividimos en dos partes iguales una para cada diluyente; el antibiótico que utilizamos es la gentamicina con una concentración de 40 mg/ml; se agregó la tercera parte de la dosis total es decir 11,5 mg para los 3ml de semen puro para la leche entera y la mitad de la dosis total del antibiótico para el agua de coco 11.25mg para los 3ml de semen puro por unos 5 minutos para proseguir con la dilución.

Cada muestra de semen colectada se realizó la dilución 1:1; es decir por cada mililitro de semen un mililitro de diluyente, pero sin el glicerol ni la yema de huevo.

3.9 Análisis microscópico del semen diluido

Se realizó una dilución inicial del semen y se procedió a realizar el análisis de la motilidad individual, supervivencia, morfología y mortalidad espermática.

3.10 Parámetros evaluados:

3.10.1.1 Motilidad individual

La motilidad individual con semen diluido en leche entera es de (64%) comparado a un (80%) de motilidad individual que tuvo con el semen puro, lo cual se puede determinar que el diluyente a base de leche entera afecta en gran medida la motilidad individual; post-descongelación una motilidad individual de (23,5 %). A diferencia del diluyente empleado agua de coco pre-congelación se describen valores motilidad individual (45,5%) con la dilución, comparado a un (80%) de motilidad individual que tuvo con el semen puro, aquí se puede ver que diluyente a base de agua de coco afecta aún más la motilidad individual post-descongelación (14%).

3.10.1.2 Vitalidad

Se tomó una gota de semen diluido y se la colocó sobre un portaobjeto precalentado a 37°C sobre una placa térmica. Se agregó una gota del colorante de eosina, se homogenizó la mezcla y luego se agregó una gota de nigrosina y se realizó el frotis.

Se observó al microscopio sin cubreobjetos con aumento 40x se inició el conteo de espermatozoides vivos (sin coloración) y espermatozoides muertos (teñidos de rosa). Se contabilizó como mínimo 3 campos en los que se contó 100 espermatozoides en total y se estimó el porcentaje respectivo de vivos y muertos. Con el mismo frotis y bajo el mismo principio se realizó el conteo de espermatozoides normales/anormales los cuales se evaluaron en porcentajes. El mismo procedimiento se realizó tanto en la leche entera como en el agua de coco.

En el análisis pre-congelación con diluyente leche entera: vivos (69,5%) y muertos (30,5%) y post-descongelación vivos (30%) y muertos el (70%); y en el análisis pre-congelación del semen con agua de coco vivos (55%) y muertos (45%) y post-descongelación vivos (19,5%) y muertos (80,5%).

3.10.2 Morfología

Los valores encontrados durante el análisis fueron: leche entera en pre-congelación se consiguió un valor morfológico normal de (81,5%) y anormal (18,5%) y post-descongelación normal (70,5%) y anormal (29,5%). En cambio, empleando el diluyente agua de coco en el análisis pre-congelación; normales (74,5%) y anormales (25,5%) post-descongelación normales (66%) y anormales (34%).

3.11 Dilución final de las muestras

El volumen del eyaculado fue 6ml dividimos en dos partes iguales una para el diluyente; leche entera con un volumen de 8,5 ml y la otra para el agua de coco 4,5 ml. Esto es el total de diluyente a utilizar más los 3ml de semen a cada diluyente respectivamente.

Como ya se realizó la dilución 1:1 es decir por cada 3 ml de semen agregamos 3 ml de diluyente nos falta agregar el restante y se lo hizo de la siguiente manera.

Luego de su respectivo análisis la dilución inicial se mantuvo refrigerada durante dos horas; el glicerol se mantuvo refrigerado a 4 °C, de esta manera resulta ser menos tóxico para los espermatozoides y de igual forma se adicionó una hora antes de la crio conservación, para el diluyente leche entera; gentamicina 23mg; glicerol 0,60 ml; leche entera 4ml y yema de huevo 0,85 ml; en cuanto al agua de coco se adicionó: gentamicina 11.25mg; glicerol 0,31 ml; agua de coco 0.7ml y yema de huevo 0,45 ml; con esto completamos el volumen total para el número de pajuelas de cada diluyente descrita en la concentración.

3.12 Refrigeración de las muestras

Una vez hecha la dilución final se procedió a refrigerar las muestras a 4 °C en una gradilla, previo a esto dejamos reposar a temperatura ambiente 10 minutos para evitar un cambio brusco en la temperatura ya que el semen diluido se encontraba a 37 °C. Se dejó reposar por un tiempo de 3 horas.

3.13 Empaquetado del semen

Cumplido las 3 horas de enfriamiento a 4°C, se envasó manualmente las pajillas de 0.5 cc a una concentración de 30×10^6 . Las pajuelas fueron selladas utilizando unas perlas que resultan muy eficaces. Cabe recalcar que en todo el proceso del empaquetado las pajuelas se deben mantener a la misma temperatura de 4 °C para evitar choques térmicos en los espermatozoides.

3.14 Congelamiento de las pajuelas

Se utilizó un cooler, con dos estructuras para la leche y el agua de coco hechas con una sierra con dientes de punta de acero, con esto evitamos que se resbalen las pajuelas, en el cual se colocó a 8 cm de nitrógeno líquido.

La crio conservación se realizó en distintos tiempos de congelamiento para disminuir el cambio exagerado de temperatura al espermatozoide, comenzamos colocando las pajuelas a 12cm del nitrógeno líquido durante 5 minutos y tapamos el cooler, luego bajamos a 8cm del nitrógeno líquido durante 5 minutos más y nuevamente tapamos. Completado este tiempo las pajuelas se volcán directamente al nitrógeno líquido, de aquí ya se pueden pasar al termo criogénico con temperaturas de -196°C.

3.15 Descongelamiento de las pajuelas

Como esta investigación se basa en al análisis post-descongelación, después de 10 minutos se procedió a descongelar las pajuelas en agua limpia a una temperatura de 37 °C por 40 segundos. Luego secamos y cortamos la pajuela para el correspondiente análisis microscópico del semen, para lo cual se realizó el mismo procedimiento indicado anteriormente en el análisis pre-congelación.

3.16 Consideraciones éticas

El bienestar animal es una ciencia que, basándose en la etología, la zoología, la fisiología y otras ciencias, intenta averiguar cómo afectan a los animales las condiciones ambientales que se le suministran, para intentar que puedan adaptarse a ellas de la mejor forma posible (Blasco, 2011).

“El bienestar en un término muy amplio, como el buen estado físico y mental de los animales” (Brambel, 1965).

3.16.1.1 Cinco libertades

- El hambre, la sed y la desnutrición.
- El miedo y la angustia.
- El sufrimiento físico y térmico.
- El dolor, la enfermedad y las contusiones.
- Manifestar su comportamiento normal (Appleby, 2008, p. 450).

Es la obligación de todo propietario del ganado, darle un trato adecuado, definiéndolo como el conjunto de medidas para disminuir la tensión, sufrimiento y traumatismos y dolor en los animales, durante su captura, traslado, exhibición, aprovechamiento y sacrificio (Durán, s.f., p. 105).

4 Resultados y Discusiones

4.1 Análisis del semen para la congelación

Los valores encontrados para “t” de student para el análisis de semen para la congelación se puede observar en la tabla número 11.

Tabla 11. *Evaluación de volumen, olor, color, pH del semen fresco.*

| <i>Evaluación de volumen, olor, color, pH del semen fresco</i> | | | |
|--|------|----------------|----------------|
| Volumen (ml) | pH | Color | Olor |
| 6,2 | 6,72 | Blanco cremoso | “suis generis” |

De acuerdo con la tabla 11, observamos que el semen fresco: presenta un pH de 6,72 y un volumen promedio de eyaculado de 6,2 ml; color blanco cremoso y olor “suis generis”.

Según Carpio (2015) menciona que: el semen es de color lechoso, la cual difiere con el estudio presente ya que presenta un color blanco cremoso, en cambio su concentración espermática es de 400 a 700 millones/ ml siendo de muy buena calidad, este dato coincide con la concentración espermática que nos arrojó en cada eyaculado en el estudio presente.

4.2 Análisis pre-congelación del semen con leche entera y agua de coco

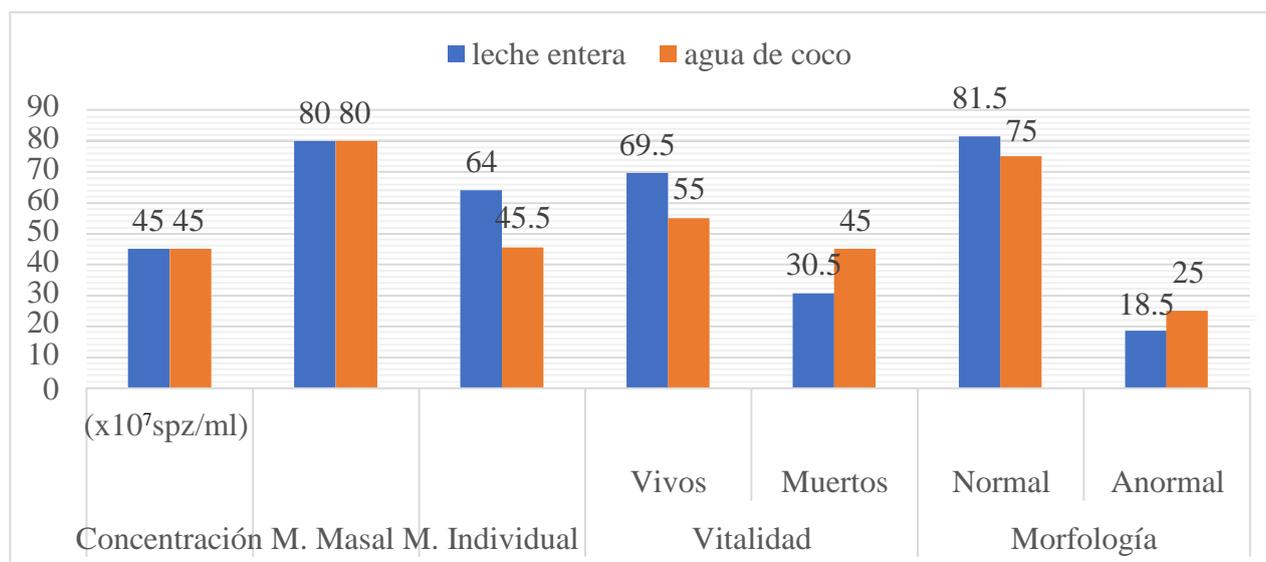


Figura 1. Análisis porcentual de los parámetros de concentración espermática, motilidad masal e individual, vitalidad y morfología pre-congelación.

De acuerdo con la figura 1, observamos que el análisis seminal pre-congelación con leche entera y agua de coco, presenta una concentración de 45×10^7 de espermatozoides por mililitro, siendo iguales ya que la muestra fue dividida en dos partes proporcionales para que estén en las mismas condiciones; la motilidad masal del 80 por ciento en ambos casos por la razón anterior; la motilidad individual para la leche entera fue del 64 por ciento y en el agua de coco fue de 45,5 por ciento.

En lo que refiere a vitalidad tenemos: vivos 69,5 por ciento para leche entera y de 55 por ciento para agua de coco; muertos 30,5 por ciento para leche y agua de coco 45 por ciento.

La capacidad de los espermatozoides de conservar las características funcionales, morfológicas y de capacitación se ven reflejadas en la viabilidad, siendo esta una valoración muy importante al momento de realizar una inseminación artificial, concordando lo que señala Trejo, Meza, Antonio, Cotera y Antonio (2013) indicando que el uso de diluyente a base de agua de coco en congelación de semen tiene un efecto benéfico en la movilidad y viabilidad de los espermatozoides en relación con otros diluyentes naturales como es la leche, discrepando con el estudio presente ya que el agua de coco tiene menos efectos positivos en la congelación de semen comparado con la leche entera.

Además, una morfología normal del 81,5 por ciento para leche entera y de 75 por ciento para agua de coco.

De igual manera una morfología anormal del 18,5 por ciento para leche entera y de 25 por ciento para agua de coco. Hafez y Hafez (2002) exponen que, si la proporción de anormalidades espermáticas antes de la congelación es más del 20 por ciento, nos encontramos ante un semen de baja fertilidad. Discrepando del estudio presente en lo que refiere al diluyente a base de agua de coco que fue del 25 por ciento y coincidiendo para el diluyente a base de leche entera que fue del 18,5 por ciento.

Sepulveda, Celis, Torres, Rodríguez, y Corredor (2018) exponen que en la morfología espermática se ha encontrado que la composición bioquímica de la membrana plasmática es afectada por el contenido de fosfolípidos y colesterol, es por ello que las características bioquímicas del diluyente poseen un rol importante en la viabilidad del semen; los machos de la investigación evidenciaron un desempeño alto para la preservación del espermatozoide, ya que las muestras se encontraban aptas al entrar en contacto con el medio dilución, parte de esta protección se encuentra directamente relacionada con el medio diluyente, concordando ya que los diluyentes tienen efecto en la morfología y vitalidad de los espermatozoides, ya que tuvo mejores resultados en el estudio presente la leche entera a diferencia del agua de coco.

4.3 Valores “t” de student para factor motilidad individual pre-congelación

Los valores encontrados para “t” de student para el factor motilidad individual pre-congelación para la investigación presente se puede observar en la tabla número 12.

Tabla 12. “t” de student para el factor motilidad individual pre-congelación

| | T Tabular | |
|------------|-----------|------|
| T Calcular | 5 | 1 |
| 7,83 ** | 2,26 | 3,25 |

CV= 4,31 por ciento

De acuerdo con la tabla 12, el porcentaje de motilidad individual pre-congelación de los espermatozoides, estadísticamente es altamente significativo 7,83.

Para el porcentaje de motilidad individual de los espermatozoides pre-congelación, t calcular (7,83) es mayor que t tabular al 5 por ciento (2,26) y al 1 por ciento (3,23). Por lo tanto, aceptamos la hipótesis alternativa que dice que el semen bovino crio conservado no mantiene los mismos porcentajes de supervivencia, mortalidad, morfología y motilidad individual pre- congelación y post-descongelación utilizando los dos diluyentes.

El coeficiente de variación es de 4,31 por ciento, encontrándose dentro de los rangos permitidos para este tipo de investigación, siendo confiables los datos.

4.4 Valores “t” de student para el factor de espermatozoides vivos pre-congelación

Los valores encontrados para “t” de student para el factor de espermatozoides vivos pre-congelación para la investigación presente se puede observar en la tabla número 13.

Tabla 13. “t” de student para el factor de espermatozoides vivos pre-congelación

| T Calcular | T Tabular | |
|------------|-----------|------|
| | 5 | 1 |
| 7,66 ** | 2,26 | 3,25 |

CV= 3,04 por ciento

De acuerdo con la tabla 13, el porcentaje de espermatozoides vivos pre-congelación, estadísticamente es altamente significativo 7,66.

Para el porcentaje de los espermatozoides vivos pre-congelación, t calcular (7,66) es mayor que t tabular al 5 por ciento (2,26) y al 1 por ciento (3,25). Por lo tanto, aceptamos la hipótesis alternativa que dice que el semen bovino crio conservado no mantiene los mismos porcentajes de supervivencia, mortalidad, morfología y motilidad individual pre-congelación y post-descongelación utilizando los dos diluyentes.

El coeficiente de variación es de 3,04 por ciento, encontrándose dentro de los rangos permitidos para este tipo de investigación, siendo confiables los datos.

Aguilar (2015) indica que en un experimento con semen fresco de cerdo diluido con agua de coco la motilidad espermática fue de un 90% de vivos y un 10% de muertos a las 12 horas y un 80% de vivos y un 20% de muertos a las 36 horas post-descongelamiento. Discrepando de la investigación presente ya que se obtuvo resultados con el agua de coco del 55% de espermatozoides vivos.

4.5 Valores “t” de student para el factor de espermatozoides muertos pre-congelación

Los valores encontrados para “t” de student para el factor de espermatozoides muertos pre-congelación para la investigación presente se puede observar en la tabla número 14.

Tabla 14. “t” de student para el factor de espermatozoides muertos pre-congelación

| T Calcular | T Tabular | |
|------------|-----------|------|
| | 5 | 1 |
| 7,66 ** | 2,26 | 3,25 |

CV= 5,01 por ciento

De acuerdo con la tabla 14, el porcentaje de espermatozoides muertos pre-congelación, estadísticamente es altamente significativo 7,66.

Para el porcentaje de los espermatozoides muertos pre-congelación, t calcular (7,66) es mayor que t tabular al 5 por ciento (2,26) y al 1 por ciento (3,25). Por lo tanto, aceptamos la hipótesis alternativa que dice el semen bovino crio conservado no mantiene los mismos porcentajes de supervivencia, mortalidad, morfología y motilidad individual pre-congelación y post-descongelación utilizando los dos diluyentes.

El coeficiente de variación es de 5,01 por ciento, encontrándose dentro de los rangos permitidos para este tipo de investigación, siendo confiables los datos.

4.6 Valores “t” de student para el factor de espermatozoides normales pre-congelación

Los valores encontrados para “t” de student para el factor de espermatozoides normales pre-congelación para la investigación presente se puede observar en la tabla número 15.

Tabla 15. “t” de student para el factor de espermatozoides normales pre-congelación

| T Calcular | T Tabular | |
|------------|-----------|------|
| | 5 | 1 |
| 4,12 ** | 2,26 | 3,25 |

CV= 2,17 por ciento

De acuerdo con la tabla 15, el porcentaje de espermatozoides normales pre-congelación, estadísticamente es altamente significativo 4,12.

Para el porcentaje de espermatozoides normales pre-congelación, t calcular (4,12) es mayor que t tabular al 5 por ciento (2,26) y al 1 por ciento (3,25). Por lo tanto, aceptamos la hipótesis alternativa que dice que el semen bovino crio conservado no mantiene los mismos porcentajes de supervivencia, mortalidad, morfología y motilidad individual pre-congelación y post-descongelación utilizando los dos diluyentes.

El coeficiente de variación es de 2,17 por ciento, encontrándose dentro de los rangos permitidos para este tipo de investigación, siendo confiables los datos.

4.7 Valores “t” de student para el factor de espermatozoides anormales pre-congelación

Los valores encontrados para “t” de student para el factor de espermatozoides anormales pre-congelación para la investigación presente se puede observar en la tabla número 16.

Tabla 16. “t” de student para el factor de espermatozoides anormales pre-congelación

| | T Tabular | |
|------------|-----------|------|
| T Calcular | 5 | 1 |
| 4,12 ** | 2,26 | 3,25 |

CV= 7,72 por ciento

De acuerdo con la tabla 16, el porcentaje de espermatozoides anormales pre-congelación, estadísticamente es altamente significativo 4,12.

Para el porcentaje de los espermatozoides anormales pre-congelación, t calcular (4,12) es mayor que t tabular al 5 por ciento (2,26) y al 1 por ciento (3,25). Por lo tanto, aceptamos la hipótesis alternativa que dice el semen bovino crio conservado no mantiene los mismos porcentajes de supervivencia, mortalidad, morfología y motilidad individual pre-congelación y post-descongelación utilizando los dos diluyentes.

El coeficiente de variación es de 7,72 por ciento, encontrándose dentro de los rangos permitidos para este tipo de investigación, siendo confiables los datos.

4.8 Análisis post-descongelación del semen con leche entera y agua de coco

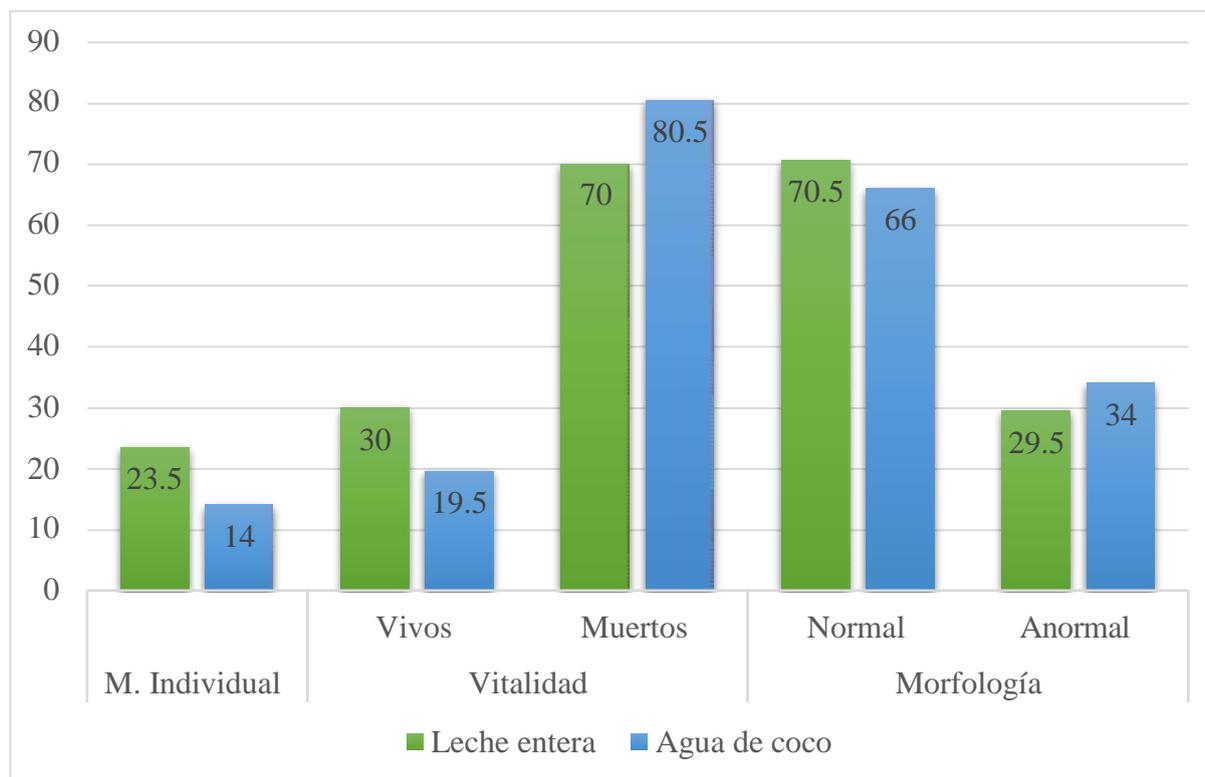


Figura 2. Análisis porcentual de los parámetros de motilidad individual, vitalidad y morfología post-descongelación.

Como podemos apreciar en la figura 2, observamos que el análisis de semen post-descongelación con leche entera y agua de coco, presenta una motilidad individual del 23,5 por ciento para leche entera y 14 por ciento para agua de coco; Parada y Ariza (2019) mencionan que en estudio realizado encontraron una motilidad individual del 55 por ciento con el agua de coco.

En lo que refiere vitalidad tenemos vivos 30 por ciento para leche entera y de 19,5 por ciento para agua de coco; muertos 70 por ciento para leche entera y de 80,5 por ciento para agua de coco. Bergeron y Manjunath (2006) afirman que la leche entera es tan eficiente al almacenar semen a 4°C o al congelarlo, los lípidos aparentan no ser el constituyente responsable de la protección espermática entregada por la leche. Los constituyentes de la leche

con mayor efecto protector aparentan ser las micelas de caseína. De hecho, se ha demostrado que micelas de caseína aisladas desde la leche pueden proteger semen de potro, chivo, carnero y toro durante su almacenamiento a 4 - 5°C.

Además, una morfología normal del 70,5 por ciento para leche entera y de 66 por ciento para agua de coco. Galarza (2013) menciona que la proporción de espermatozoides normales post-descongelación debe tener un mínimo de 70 por ciento. Coincidiendo con el estudio presente para leche entera, ya que del 71 por ciento y discrepando para el agua de coco que fue del 66 por ciento.

Una morfología anormal del 29,5 por ciento para leche entera y de 34 por ciento para agua de coco. Estas diferencias entre diluyentes se deben a que el diluyente a base de leche entera y agua de coco no brindan los requerimientos nutricionales idóneos para mantener su integridad morfológica.

Cabe señalar que aquí no fue tomada en cuenta los parámetros de concentración espermática y motilidad masal ya que el semen se encontraba diluido.

4.9 Valores “t” de student para factor motilidad individual post-descongelación

Los valores encontrados para “t” de student para el factor motilidad individual post-descongelación para la investigación presente se puede observar en la tabla número 17.

Tabla 17. “t” de student para el factor motilidad individual post-descongelación.

| | T Tabular | |
|------------|-----------|------|
| T Calcular | 5 | 1 |
| 4,67 ** | 2,26 | 3,25 |

CV= 10,85 por ciento

En relación con la tabla 17, el porcentaje de motilidad individual post-descongelación de los espermatozoides, estadísticamente es altamente significativo 4,67.

Para el porcentaje de motilidad individual de los espermatozoides post-descongelación, t calcular (4,67) es mayor que t tabular al 5 por ciento (2,26) y al 1 por ciento (3,25). Por lo tanto, aceptamos la hipótesis alternativa que dice que el semen bovino crio conservado no mantiene los mismos porcentajes de supervivencia, mortalidad, morfología y motilidad individual pre-congelación y post-descongelación utilizando los dos diluyentes.

El coeficiente de variación es de 10,85 por ciento, encontrándose dentro de los rangos permitidos para este tipo de investigación, siendo confiables los datos.

Parada y Ariza (2019) resaltan que la motilidad individual post-descongelación con agua de coco no se afectó tanto, teniendo en cuenta que la gran mayoría de espermatozoides tenía una motilidad progresiva hacia adelante, pero algunos tenían una motilidad progresiva en forma circular, este último es consecuencia del choque térmico, discrepando con el estudio presente ya que si se obtuvo efectos negativos en cuanto a la motilidad progresiva hacia adelante, pero concordando con la motilidad progresiva en forma circular.

4.10 Valores “ t ” de student para el factor de espermatozoides vivos post-descongelación

Los valores encontrados para “ t ” de student para el factor de espermatozoides vivos post-descongelación para la investigación presente se puede observar en la tabla número 18.

Tabla 18. “ t ” de student para el factor de espermatozoides vivos post-descongelación

| | T Tabular | |
|------------|-----------|------|
| T Calcular | 5 | 1 |
| 5,55 ** | 2,26 | 3,25 |

CV= 7,64 por ciento

De acuerdo con la tabla 17, el porcentaje de espermatozoides vivos post-descongelación, estadísticamente es altamente significativo 5,55.

Para el porcentaje de espermatozoides vivos post-descongelación, t calcular (5,55) es mayor que t tabular al 5 por ciento (2,26) y al 1 por ciento (3,25). Por lo tanto, aceptamos la hipótesis alternativa que dice que el semen bovino crio conservado no mantiene los mismos porcentajes de supervivencia, mortalidad, morfología y motilidad individual pre-congelación y post-descongelación utilizando los dos diluyentes.

El coeficiente de variación es de 7,64 por ciento, encontrándose dentro de los rangos permitidos para este tipo de investigación, siendo confiables los datos.

4.11 Valores “t” de student para el factor de espermatozoides muertos post descongelación

Los valores encontrados para “t” de student para el factor de espermatozoides muertos post-descongelación para la investigación presente se puede observar en la tabla número 19.

Tabla 19. “t” de student para el factor de espermatozoides muertos post-descongelación

| T Calcular | T Tabular | |
|------------|-----------|------|
| | 5% | 1% |
| 5,55 ** | 2,26 | 3,25 |

CV= 2,51 por ciento

De acuerdo con la tabla 19, el porcentaje de espermatozoides muertos post-descongelación, estadísticamente es altamente significativo 5,55.

Para el porcentaje de los espermatozoides muertos post-descongelación, t calcular (5,55) es mayor que t tabular al 5 por ciento (2,26) y al 1 por ciento (3,25). Por lo tanto, aceptamos la hipótesis alternativa que dice el semen bovino crio conservado no mantiene los mismos porcentajes de supervivencia, mortalidad, morfología y motilidad individual pre-congelación y post-descongelación utilizando los dos diluyentes.

El coeficiente de variación es de 2,51 por ciento, encontrándose dentro de los rangos permitidos para este tipo de investigación, siendo confiables los datos.

Parada y Ariza (2019) mencionan que en la fase de post descongelación con agua de coco se desarrolló una respuesta negativa al proceso de congelación, ya que al momento de la observación los espermatozoides no tuvieron una sobrevivencia adecuada, ya que en su gran mayoría no resistieron al choque térmico, coincidiendo con el estudio presente.

A su vez Ferreira (1993) indica que la mayor sobrevivencia de los espermatozoides en el agua de coco, parece estar asociada a algunas sustancias que señala que son soluciones acidas y estériles, aminoácidos, azúcares, sales, proteínas, vitaminas y minerales contenidas en la composición bioquímica del agua de coco, esa sustancia, es un factor fisicoquímico que parece favorecer la motilidad del semen. Concordando parcialmente del estudio presente ya que las sustancias nutritivas que aportan el agua de coco si ayuda a una buena sobrevivencia a los espermatozoides, pero discrepando de la investigación realizada ya que se pudo constatar una baja sobrevivencia espermática con el agua de coco.

4.12 Valores “t” de student para el factor de espermatozoides normales post-descongelación

Los valores encontrados para “t” de student para el factor de espermatozoides normales post-descongelación para la investigación presente se puede observar en la tabla número 20.

Tabla 20. “t” de student para el factor de espermatozoides normales post-descongelación

| | T Tabular | |
|------------|-----------|------|
| T Calcular | 5 | 1 |
| 2,38 * | 2,26 | 3,25 |

CV= 2,77 por ciento

De acuerdo con la tabla 20, el porcentaje de espermatozoides normales post-descongelación, estadísticamente es parcialmente significativo 2,38 por ciento.

Para el porcentaje de espermatozoides normales post-descongelación, t calcular (2,38) es mayor que t tabular al 5 por ciento (2,26) y menor al 1 por ciento (3,25). De tal manera aceptamos la hipótesis alternativa al 5 por ciento y rechazamos la hipótesis al 1 por ciento.

El coeficiente de variación es de 2,77 por ciento, encontrándose dentro de los rangos permitidos para este tipo de investigación, siendo confiables los datos.

4.13 Valores “ t ” de student para el factor de espermatozoides anormales post-descongelación

Los valores encontrados para “ t ” de student para el factor de espermatozoides anormales post-descongelación para la investigación presente se puede observar en la tabla número 21.

Tabla 21. “ t ” de student para el factor de espermatozoides anormales post-descongelación

| | T Tabular | |
|------------|-----------|------|
| T Calcular | 5 | 1 |
| 2,38 * | 2,26 | 3,25 |

CV= 5,96 por ciento

De acuerdo con la tabla 21, el porcentaje de espermatozoides anormales post-descongelación, estadísticamente es parcialmente significativo 2,38.

Para el porcentaje de los espermatozoides anormales post-descongelación, t calcular (2,38) es mayor al 5 por ciento (2,26) y menor que t tabular al 1 por ciento (3,25). Por lo tanto, aceptamos la hipótesis alternativa al 5 por ciento y rechazamos la hipótesis al 1 por ciento.

El coeficiente de variación es de 5,96 por ciento, encontrándose dentro de los rangos permitidos para este tipo de investigación, siendo confiables los datos.

CUADRO DE COSTOS DE LA INVESTIGACION

| CONCEPTO | UNIDAD | PRECIO UNITARIO | CANTIDAD | VALOR EFECTIVO |
|----------------------------|---------|--------------------|----------|-----------------|
| MATERIALES FISICOS | | | | |
| Vagina artificial | | \$300,00 | 1 | \$300,00 |
| Microscopio | | \$1000,00 | 1 | \$1000,00 |
| Micro pipeta | | \$200,00 | 2 | \$400,00 |
| Cooler | | \$ 8,00 | 1 | \$8,00 |
| Tiras de pH | | \$0,60 | 10 | \$6,00 |
| Sierras | | \$2,00 | 2 | \$4,00 |
| Suero fisiológico | | \$1,50 | 10 | \$15,00 |
| Embudo | | \$1,00 | 2 | \$2,00 |
| Gradilla | | \$6,00 | 1 | \$6,00 |
| Papel aluminio | | 2,00 | 1 | \$2,00 |
| Cámara de neubauer | | \$100,00 | 1 | \$100,00 |
| Tubos colectores | | \$1,00 | 20 | \$20,00 |
| Termómetro | | \$5,00 | 1 | \$5,00 |
| Guantes de exploración | Caja | \$9,00 | 1 | \$9,00 |
| Guantes de ginecología | Caja | \$16,00 | 1 | \$16,00 |
| Vasos de precipitación | | \$5,00 | 4 | \$20,00 |
| Porta objetos | Caja | \$8,00 | 1 | \$8,00 |
| Cubre objetos | Caja | \$5,00 | 1 | \$5,00 |
| Pajillas | | \$50,00 | 300 | \$50,00 |
| Perlas de sellado | | \$20,00 | 300 | \$20,00 |
| Termo de nitrógeno líquido | | \$800,00 | 1 | \$800,00 |
| Placa térmica | | \$100,00 | 1 | \$100,00 |
| Toallas desechables | paquete | \$4,00 | 1 | \$4,00 |
| Tijeras | | \$1,00 | 1 | \$1,00 |
| Manga | | \$50,00 | 1 | \$50,00 |
| Papel filtro | Pliego | \$8,00 | 2 | \$16,00 |
| Eosina | ml | \$12,00 | 1 | \$12,00 |
| Nigrosina | ml | \$15,00 | 1 | \$15,00 |
| Tinta china | Gotas | \$1,00 | 1 | \$1,00 |
| Agua caliente | Litros | \$0,50 | 20 | \$10,00 |
| Leche entera | Litro | \$2,00 | 1 | \$2,00 |
| Agua de coco | Litro | \$5,00 | 1 | \$5,00 |
| Glicerol | MI | \$12,00 | 1 | \$12,00 |
| Gentamicina | MI | \$3,00 | 10 | \$30,00 |
| Yema de huevo | Unidad | \$0,25 | 10 | \$2,50 |
| Lubricante | Litro | \$8,00 | 1 | \$8,00 |
| Jabon neutrón | Unidad | \$6,00 | 1 | \$6,00 |
| TOTAL | | | | \$3.070, |

5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

El estudio permitió comprobar que la leche entera es mejor diluyente en cuanto a la crioconservación de semen bovino; en lo que refiere a: motilidad individual, morfología, supervivencia y mortalidad; obteniendo vivos (69,5 %) y muertos (30,5 %) pre-congelación y post-descongelación vivos (30 %) y muertos el (70 %) en comparación con el agua de coco.

La leche entera como diluyente en semen fresco no altera las propiedades físicas y químicas de los espermatozoides frente al diluyente a base de agua de coco. En cuanto a la motilidad se encontró que para el agua de coco fue inferior a la leche entera.

Se determinó valores correspondientes a las muestras de los tratamientos con los dos diluyentes, se puede concluir que la leche entera fue mejor; se obtuvo en la motilidad masal valores de (80 %); motilidad individual de (64 %) pre congelación y post-descongelación una motilidad individual de (23,5 %); morfología un valor normal de (81,5 %) y anormal (18,5 %) pre congelación y post-descongelación normal (70,5 %) y anormal (29,5 %) siendo notable la diferencia estadística entre los dos tratamientos.

5.2 Recomendaciones

Se recomienda utilizar yema de huevo por su alto contenido de lipoproteínas de baja densidad contribuyendo en la protección para la crio conservación y ayuda a mantener la integridad de la membrana celular obteniendo así mejores resultados de vitalidad espermática.

Se debe mantener una asepsia adecuada, para evitar contaminación en materiales e implementos a utilizar en la investigación.

Previamente realizar ejercicios de falsas montas del toro, para obtener buena calidad seminal.

Se recomienda seguir probando nuevos diluyentes de origen animal y vegetal para obtener mejores resultados en la vitalidad espermática.

6 Bibliografía

- Aguilar, J. (2015). *Evaluación del uso de agua de coco (Cocos nucifera L.) como diluyente natural en inseminación artificial en cerdas*. (Tesis pregrado). Universidad San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Aisen, E., Quintana, M., Medina, V., Morello, H., y Venturino, A. (2005). Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. *Cryobiology*, 50(3), 239-249.
- Albaracín, I., Gonzáles, E., y Calderon, R. (2001). *Inseminación artificial y Andrología Veterinaria. Tomo I*. La Habana: Félix Varela.
- Almenar, C. (2007). *NUEVOS PROTOCOLOS PARA LA CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE MACHO CABRÍO*. (Tesis pregrado). Universidad Politécnica de Valencia, Valencia.
- Amann, R., y Pickett, B. (1987). Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Science* (7), 145-176.
- Angelino, J. (2009). *Manual de evaluación de semen en bovinos*. Veracruz: Universidad de Veracruz.
- Appleby, M. C. (2008). *Science of animal welfare. In: Long distance transport and welfare of farm animals*. Wallingford, UK: CABI.
- Aragão, W. (2000). *Importancia Do Coqueiro-Anão Verde*. Aracaju: Embrapa.
- Aroucha, E., Souza, C., Aroucha, M., y Vianni, P. (2005). Características Físicas E Químicas Da Agua De Coco Anão Verde E Anão Vermelhoem Diferentes Estádios De Maturagáo. *Caatinga*, 18, 82-87.
- Ávalos, A., Gonzáles, J., Vargas, A., y Herrera, J. (2018). *Recolección y manipulación seminal in vitro*. México: UAM.

Bailey, J., y Buhr, M. (1994). Cryopreservation alters the Ca⁺⁺ flux of bovine spermatozoa. *Can. J. Anim. Sci.*, 74, 45-51.

Balcázar, J., y Porras, A. (12 de Julio de 2009). *Manual de prácticas en manejo reproductivo de ovinos y caprinos*. Recuperado de Unam: http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/licenciatura/coepa/archivos/manuales_2013/Manual%20de%20Practicas%20de%20Profundizacion%20en%20Reproduccion%20Animal%20Ovinos%20y%20Caprinos.pdf

Barros, T., y Toniolli, R. (2011). Uso Potencial Da Agua De Coco Natecnologia De Semen. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 35(4), 400-407.

Bathgate, R., Maxwell, W., y Evans, G. (2006). Studies on the effect of supplementing Boar Semen Cryopreservation Media with diferrent Avian Egg Wolk Types on in Vitro Post-Thaw Sperm Quality. *Reproduction in Domestic Animals*, 41(1), 68-73.

Bavera, G. (2005). Examen reproductivo en toros. Curso de produccion bovina de carne. *Sirio de Producción Animal*, 12-22.

Bergeron, A., y Manjunath, P. (2006). New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Mol. Reprod. Dev.*, 73(10), 1338 – 1344.

Blasco, A. (2011). *Ética y bienestar animal*. Madrid, España: Ediciones Akal.

Boiso, I. (2001). Principios básicos de criobiología. *Iberoamericana de Fertilidad*, 18(4), 127-131.

Brambel, F. (1965). *Report of the Technical Committe to enquire into the welfare of animal kept under intensive livestock husbandry systems*. London: Command Report.

Bravo, P., Flores, U., Garnica, J., y Ordoñez, C. (1997). Collection of semen and artificial insemination of alpacas. *Theriogenology*, 47, 619-626.

- Buhr, M., Fiser, P., Bailey, J., y Curtis, E. (2001). Cryopreservation in Different Concentrations of Glycerol Alters Boar Sperm and Their Membranes. *Journal of Andrology*, 22(6), 961-969.
- Carpio, S. (2015). *Evaluación de dos diluyentes para la crioconservación de semen bovino: yema de huevo vs leche descremada*. (Tesis pregrado). UPS, Cuenca.
- Castelo, T. (2008). Considerações sobre a criopreservação do sêmen. *Acta Veterinaria Brasilica*, 2, 65-75.
- Catena, M., y Cabodevila, J. (06 de Agosto de 1999). Evaluación de semen bovino congelado. *Sitio Argentino de Producción Animal*, 1(3), 18-31.
- Chaveiro, A., Machado, L., Frijters, A., Engel, B., y Woelders, H. (2006). Improvement of parameters of freezing medium and freezing protocol for bull sperm using two osmotic supports. *Theriogenology*, 65(9), 1875-1890.
- Chen, F., Nakamura, T., y Wada, H. (2004). Desarrollo de nuevas soluciones de conservación de órganos en la Universidad de Kioto. *Yonsei Medical Journal*, 45(4), 1107-1114.
- Duchens, M. (1999). Examen de fertilidad para selección en otros de carne. *TECNO VET*, 5.
- Durán, F. (s.f.). *Producción ganadera en estabulación*. Bogota, Colombia: Grupo Latino.
- Fernández de Córdova y de Barrera, L. (2009). *Reproducción aplicada en el ganado bovino lechero*. México: Trillas.
- Fernandez, S. (1993). Manipulación de las funciones reproductivas en Camélidos Sudamericanos. *Cien. Repro. Animal*, 33, 307-323.
- Ferreira, J. (1993). El agua de coco como dilutor del semen caprino. *Rev Fac Agron (Luz)*, 3(3), 269-72.

- Fiser, P., y Fairfull, R. (1986). The effects of rapid cooling (cold shock) of ram semen, photoperiod, and egg yolk in diluents on the survival of spermatozoa before and after freezing. *Cryobiology*, 23(6), 518-24.
- Galarza, D. (2013). *Eficacia de dos diluyentes: tris + lectina de soya (AndroMed) y tris + yema de huevo (Triladyl), en la crioconservación de semen de toro de la raza Jersey en Cuenca - Ecuador*. (Maestría). Universidad de Cuenca, Cuenca.
- Galina, C., Salteil, A., y Valencia, J. (1986). *Reproducción Animales Domésticos*. México: Limusa S.A.
- Galina, C., y Valencia, J. (2008). *Reproducción de animales domésticos*. México: LIMUSA.
- García, J., y Carretero, F. (1985). Lesión celular crioinducida. *Clin Hematol*, 7, 43-60.
- Giraldo, J. (2007). Una mirada al uso de la inseminación artificial en bovinos. *REVISTA LASALLISTA DE INVESTIGACIÓN*, 4(1), 51-57.
- Gómez, V., y Migliorisi, L. (2015). Protocolo para la evaluación de semen en rumiantes. *Sitio Argentino de Producción Animal*, 1-9.
- Grossmann, M., y Santaló, J. (1991). Aspectes teòrics de la congelació de gàmetes i d'embrions. *Treb Soc Cat Biol*, 42, 87-108.
- Hafez, E., y Hafez, B. (2002). *Reproducción e Inseminación Artificial en animales*. México D.F.: McGraw-Hill Interamericana.
- Herman, H., Mitchell, J., y Doak, G. (2003). *The artificial inseminations and embryo transfer of dairy and beef cattle*. New Jersey: Pearson Jere. Mitchell, Gordon A. Doak, Harry. Herman.

- Hernández, J., y Ortega, A. (2009). *Manual de inseminación artificial en bovinos*. México, México D.F: UNAM.
- Hidalgo, O., Tamargo, C., y Diéz, C. (2015). Análisis del semen bovino. *Boletín informativo del SERIDA* (2), 39-43.
- Holt, W. (2000). Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci*, 62, 3-22.
- Jiménez, C. (2002). EVALUACIÓN DE LA SALUD REPRODUCTIVA DEL TORO. *Sitio Argentino de Producción Animal*, 1-5.
- Maqueda, L. (23 de julio de 2020). Conservación de la calidad del Semen: Diluyentes, Empaque, Temperatura y Transporte. *Engormix*. Recuperado de: <https://www.engormix.com/porcicultura/articulos/conservacion-semen-diluyentes-empaque-temperatura-y-transporte-t25879.htm>
- Mazur, P. (1984). Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol* (247), 125-142.
- Medeiros, C., Forel, F., Oliveira, A., y Rodrigues, J. (2002). Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*, 57(1), 327-344.
- Medina, V., Sanchez, E., Velasco, Y., y Cruz, P. (2007). Crioconservación de semen bovino usando un congelador programable (CL-8800) y determinación de su calidad postdescongelación por medio un sistema de análisis espermático asistido por computador (CASA). *Orinoquia*, 11(1), 75-86.
- Moore, A., Squires, E., Bruemmer, J., y Graham, J. (2006). Effect of cooling rate and cryoprotectant on the cryosurvival of equine spermatozoa. *J Equine Vet Sc*, 26, 215-218.

- Morrier, A., Castonguay, F., y Bailey, J. (2002). Glycerol addition and conservation of fresh and cryopreserved ram spermatozoa. *Canadian Journal Animal*, 347-356.
- Nudes, J. (1993). El agua de coco como dilutor del semen caprino. *Revista Científica, FCV-LUZ*, 3, 269-270.
- Padrón, R., Fernández, G., y Gallardo, M. (1998). Interpretación del análisis seminal. *Rev Cubana Endocrinol*, 9(1), 81-90.
- Páez, E., & Corredor, E. (2014). Evaluación de la aptitud reproductiva del toro. *Ciencia y Agricultura*, vol. 11(núm. 2), 49-59.
- Palma, G. (2001). *Biología de la reproducción*. Argentina: INTA.
- Paolomino, L. (2001). Conservación del semen caprino en diluyentes yema citrato y leche descremada. *Revista Veterinaria Perú*, 12, 3-10.
- Parada, D., y Ariza, R. (2019). Efecto de dos diluyentes (agua de coco vs andromed®) en la crioconservación. *tesis pregrado*. Universidad Cooperativa de Colombia, Arauca.
- Parks, J., y Graham, J. (1992). Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Therio*, 209-222.
- Pérez, C., y Pérez, F. (1986). *Reproducción animal. Inseminación artificial y trasplante de embriones*. Madrid, España: Científico-médica.
- Polge, C., Smith, A., y Parkes, S. (1949). Revival of Spermatozoa after Vitrification and Dehydration at Low Temperatures. *Nature*, 666-667.
- Popesko, P. (1998). *Atlas de anatomía topográfica de los animales domésticos*. Barcelona: Masson.

- Puignau, J. (2000). *Evaluación y elección de biotipos de acuerdo a los sistemas de producción*. Uruguay: IICA.
- Quinn, P., White, I., y Clelard, R. (1969). Chemical and ultrastructural changes in ram spermatozoa after washing, cold shock and freezing. *J ReprodFertil.*, 18(2), 209-220.
- Robson, C., y Aguilar, D. (2004). Inseminación Artificial en Bovinos. *Sitio Argentino de Producción Anima*, 1-30.
- Rutter, B., y Russo, A. (2006). *Bases para la evaluación de la aptitud reproductiva del toro*. Buenos Aires: Agro-Vet.
- Salamon, S., y Maxwell, W. (1995). Almacenamiento congelado de semen de carnero I. Procesamiento, congelación, descongelación y fertilidad después de la inseminación cervical. *Ciencia de reproducción animal*, 185-249.
- Salomon, S., Evans, G., y Maxwell, W. (1990). *Inseminación artificial de ovejas y cabras*. Zaragoza: Acribia.
- Sarabia, L. (12 de Junio de 2015). ESPERMIOGRAMA, *Según los criterios de OMS 2012*. Recuperado de [scribd.com: https://es.scribd.com/doc/98228428/ESPERMIOGRAMASegun-los-criterios-de-la-OMS-5%C2%AA-Edicion](https://es.scribd.com/doc/98228428/ESPERMIOGRAMASegun-los-criterios-de-la-OMS-5%C2%AA-Edicion)
- Sellés, E., Gade, J., Romar , R., Matás , C., y Ruiz , S. (2003). Analysis of in vitro fertilizing capacity to evaluate the freezing procedures of boar semen and to predict the subsequent fertility. *Reprod Dom Anim*, 38, 68-72.
- Sepulveda, K., Celis, D., Torres, A., Rodríguez, Y., y Corredor, L. (2018). EFECTO DE UN DILUYENTE A BASE DE AGUA DE COCO EN LA MORFOMETRÍA Y MOTILIDAD ESPERMÁTICA DE SEMEN OVINO. *Sennova*, 45(33), 38-43.

- Thilmant, P. (1997). Congélation du Sperme de Verrat en Paillette de 0.5 ml. Résultats ur le Terrain. *Ann Méd Vét*, 141, 457-462.
- Trejo, A., Meza, V., Antonio, C., Cotera, J., y Antonio, C. (2013). Agua de coco (cocus nucifera) como diluyente para semen fresco de conejo en la Inseminación Artificial. *Arch Zootec*, 238(62), 299-302.
- Vila, L. (1984). Principios químico-físicos de la criopreservación de material biológico. *Biol Clin Hematol*, 6(5), 227-236.
- Vishwanath, R., y Shannon, P. (2000). Almacenamiento de semen bovino en estado líquido y congelado. *Ciencia de reproducción animal*, 62, 23-53.
- Walstra, P. (2001). *Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos*. Zaragoza: Acribia.
- Watson, P. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *semen. Anim. Repro. Sci*, 60-61, 481-492.

7 Anexos

7.1 Fotografías



Foto 1. Preparación del toro donante



Foto 2. Preparación de la vaca



Foto 3. Excitación pre-coital



Foto 4. Vagina artificial armada lista para la colección de semen



Foto 5. Colección del semen



Foto 6. Semen colectado en tubos graduados



Foto 7. Evaluación macroscópica del semen



Foto 8. Dilución del semen



Foto 9. Refrigeración del semen diluido



Foto 10. Análisis microscópico del semen pre-congelación



Foto 11. Empacado del semen



Foto 12. Congelación de las pajuelas



Foto 13. Descongelación de las pajuelas



Foto 14. Análisis del semen post-descongelación



Foto 15. Diluyentes utilizados

7.2 Datos

Cuadro 1. *Análisis macroscópico del semen fresco*

| Análisis Macroscópico del semen fresco | | | | |
|--|--------------|----------------|----------------|------|
| Eyaculado | Volumen (ml) | Olor | Color | pH |
| 1 | 8 | “suis generis” | Blanco cremoso | 6,9 |
| 2 | 8 | “suis generis” | Blanco cremoso | 6,7 |
| 3 | 6 | “suis generis” | Blanco cremoso | 6,5 |
| 4 | 7 | “suis generis” | Blanco cremoso | 6,8 |
| 5 | 8 | “suis generis” | Blanco cremoso | 6,8 |
| 6 | 5 | “suis generis” | Blanco cremoso | 6,9 |
| 7 | 5 | “suis generis” | Blanco cremoso | 6,5 |
| 8 | 4 | “suis generis” | Blanco cremoso | 6,8 |
| 9 | 6 | “suis generis” | Blanco cremoso | 6,6 |
| 10 | 5 | “suis generis” | Blanco cremoso | 6,7 |
| Media | 6,2 | | | 6,72 |

Cuadro 2. *Análisis microscópico pre-congelación del semen con leche entera*

| Análisis microscópico pre-congelación del semen con leche entera | | | | | | | |
|--|---------------------------|----------|---------------|-----------|---------|------------|---------|
| Eyaculado | Concentración | M. Masal | M. Individual | Vitalidad | | Morfología | |
| | | | | Vivos | Muertos | Normal | Anormal |
| | (x10 ⁷ spz/ml) | (%) | (%) | (%) | (%) | (%) | (%) |
| 1 | 45 | 80 | 60 | 65 | 35 | 80 | 20 |
| 2 | 45 | 80 | 65 | 70 | 30 | 80 | 20 |
| 3 | 45 | 80 | 60 | 65 | 35 | 80 | 20 |
| 4 | 45 | 80 | 70 | 75 | 25 | 85 | 15 |
| 5 | 45 | 80 | 60 | 70 | 30 | 85 | 15 |
| 6 | 45 | 80 | 70 | 75 | 25 | 80 | 20 |
| 7 | 45 | 80 | 65 | 70 | 30 | 80 | 20 |
| 8 | 45 | 80 | 60 | 65 | 35 | 85 | 15 |
| 9 | 45 | 80 | 60 | 65 | 35 | 80 | 20 |
| 10 | 45 | 80 | 70 | 75 | 25 | 80 | 20 |
| Media | 45 | 80 | 64 | 69,5 | 30,5 | 81,5 | 18,5 |

Cuadro 3. *Análisis microscópico post-descongelación del semen con leche entera*

| Análisis microscópico post- descongelación del semen con leche entera | | | | | |
|---|-------------------|-----------|-------------|------------|-------------|
| Eyaculados | M. Individual (%) | Vitalidad | | Morfología | |
| | | Vivos (%) | Muertos (%) | Normal (%) | Anormal (%) |
| 1 | 20 | 30 | 70 | 70 | 30 |
| 2 | 25 | 35 | 65 | 70 | 30 |
| 3 | 25 | 35 | 65 | 70 | 30 |
| 4 | 15 | 25 | 75 | 75 | 25 |
| 5 | 20 | 25 | 75 | 75 | 25 |
| 6 | 20 | 20 | 80 | 65 | 35 |
| 7 | 25 | 30 | 70 | 75 | 25 |
| 8 | 25 | 30 | 70 | 70 | 30 |
| 9 | 30 | 35 | 65 | 70 | 30 |
| 10 | 30 | 35 | 65 | 65 | 35 |
| Media | 23,5 | 30 | 70 | 70,5 | 29,5 |

Cuadro 4. *Análisis microscópico pre-congelación del semen con agua de coco*

| Análisis microscópico pre-congelación del semen con agua de coco | | | | | | | |
|--|--|--------------|-------------------|-----------|-------------|------------|-------------|
| | Concentración (x10 ⁷ spz/ml) | M. Masal (%) | M. Individual (%) | Vitalidad | | Morfología | |
| | | | | Vivos (%) | Muertos (%) | Normal (%) | Anormal (%) |
| 1 | 45 | 80 | 50 | 55 | 45 | 75 | 25 |
| 2 | 45 | 80 | 45 | 60 | 40 | 80 | 20 |
| 3 | 45 | 80 | 55 | 50 | 50 | 70 | 30 |
| 4 | 45 | 80 | 40 | 55 | 45 | 70 | 30 |
| 5 | 45 | 80 | 45 | 55 | 45 | 80 | 20 |
| 6 | 45 | 80 | 50 | 60 | 40 | 75 | 25 |
| 7 | 45 | 80 | 40 | 60 | 40 | 75 | 25 |
| 8 | 45 | 80 | 40 | 60 | 40 | 70 | 30 |
| 9 | 45 | 80 | 45 | 45 | 55 | 80 | 20 |
| 10 | 45 | 80 | 45 | 50 | 50 | 70 | 30 |
| Media | 45 | 80 | 45,5 | 55 | 45 | 74,5 | 25,5 |

Cuadro 5. *Análisis microscópico post-descongelación del semen con agua de coco*

| Análisis microscópico post-descongelación del semen con agua de coco | | | | | |
|--|-------------------|-----------|-------------|------------|-------------|
| | M. Individual (%) | Vitalidad | | Morfología | |
| | | Vivos (%) | Muertos (%) | Normal (%) | Anormal (%) |
| 1 | 10 | 15 | 85 | 65 | 35 |
| 2 | 10 | 20 | 80 | 70 | 30 |
| 3 | 20 | 25 | 75 | 60 | 40 |
| 4 | 15 | 20 | 80 | 60 | 40 |
| 5 | 20 | 25 | 75 | 70 | 30 |
| 6 | 10 | 15 | 85 | 65 | 35 |
| 7 | 10 | 15 | 85 | 65 | 35 |
| 8 | 15 | 20 | 80 | 70 | 30 |
| 9 | 10 | 15 | 85 | 65 | 35 |
| 10 | 20 | 25 | 75 | 70 | 30 |
| Media | 14 | 19,5 | 80,5 | 66 | 34 |