

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE CUENCA

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

Trabajo de grado previo a la obtención del Título de
Médico Veterinario Zootecnista

**“EVALUACIÓN DE DOS DILUYENTES PARA LA CRIOCONSERVACIÓN
DE SEMEN BOVINO: YEMA DE HUEVO VS LECHE DESCREMADA”.**

AUTORA: Samantha Vanessa Carpio Chuchuca

DIRECTOR: Dr. Froilan Patricio Garnica Marquina

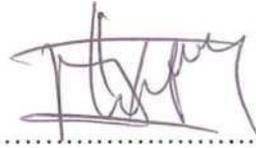
Cuenca – Ecuador

2015

**“EVALUACIÓN DE DOS DILUYENTES PARA LA CRIOCONSERVACIÓN
DE SEMEN BOVINO: YEMA DE HUEVO VS LECHE DESCREMADA”.**

CERTIFICADO

El presente trabajo sobre “Evaluación de dos diluyentes para la crío conservación de semen bovino: yema de huevo vs leche descremada”, realizado por la alumna Samantha Vanessa Carpio Chuchuca fue revisado en su totalidad, autorizando su presentación.



.....
Dr. Patricio Garnica

DIRECTOR DE TRABAJO DE GRADO

DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD

El contenido que se emite en el presente tema de investigación, así como sus resultados, conclusiones, y recomendaciones son de exclusiva responsabilidad de la autora Carpio Chuchuca Samantha Vanessa y autorizo a la Universidad Politécnica Salesiana el uso de la misma para fines académicos.

Cuenca, 09 de febrero de 2015



Carpio Chuchuca Samantha Vanessa

AUTORA

DEDICATORIA

El presente trabajo de investigación quiero dedicar primeramente a Dios y a mi Madre Santísima del Cielo, por darme la oportunidad de poder culminar mis estudios; y de esta de manera lograr un sueño anhelado. Luego quiero dedicar a mi papi Segundo y a mi mami Silvia, a mis hermanas Cecilia, Verónica, Valeria y mi sobrina Valentina por haberme dado el cariño y apoyo en todo momento para poder realizar mi trabajo.

Samantha Vanessa Carpio Chuchuca

AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer a la Universidad Politécnica Salesiana, por la acogida que me supo dar; mediante sus representantes, en especial al Director de Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia de igual manera a los docentes que trabajaron conmigo el tiempo de permanencia en la universidad; por el apoyo dado e impartir sus conocimientos.

Además quiero agradecer a mis papitos, a mis hermanas y a mi sobrina por el amor, cariño, apoyo, paciencia, consejos y ayuda brindada durante el proceso de realización de mi trabajo de investigación, ya que sin ellos este trabajo no hubiese sido posible.

De la misma forma quiero agradecer a mi Director de Tesis por la forma en cómo supo guiarme para realizar un buen trabajo, así mismo agradezco a mis compañeros y amigos, y todas esas personas que de manera desinteresada estuvieron a mi lado durante el proceso de formación en la universidad y en la realización del trabajo investigativo.

ÍNDICE

RESUMEN.....	14
ABSTRACT.....	15
I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
A. TEMA	16
B. INTRODUCCIÓN.....	16
C. JUSTIFICACIÓN.....	17
D. OBJETIVOS	18
OBJETIVO GENERAL.....	18
OBJETIVO ESPECÍFICOS	18
II. MARCO TEÓRICO	19
2.1 SEMEN BOVINO.....	19
2.1.1 DEFINICIÓN DE ESPERMATOZOIDE.....	20
2.1.2 ESTRUCTURA DEL ESPERMATOZOIDE.....	20
2.2 COLECCIÓN DE SEMEN BOVINO	21
2.3 MÉTODO DE LA VAGINA ARTIFICIAL.....	21
2.4 PROCEDIMIENTO PARA LA EXTRACCIÓN DE SEMEN BOVINO MEDIANTE LA VAGINA ARTIFICIAL.....	22
2.5 ÁREA DE TRABAJO Y RECOLECCIÓN DE SEMEN.....	22
2.6 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA VAGINA ARTIFICIAL	23
2.7 EVALUACIÓN DEL SEMEN BOVINO.....	23
2.7.1 CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS	23
2.7.1.1 VOLUMEN.....	24
2.7.1.2 DENSIDAD Y COLOR.....	24
2.7.1.3 COLOR	25
2.7.1.4 OLOR.....	26
2.7.2 CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS	26

2.7.2.1 Motilidad masal.....	26
2.7.2.2 Motilidad individual.....	27
2.7.2.3 Morfología	28
2.7.2.4 Concentración espermática	29
2.8 CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN BOVINO	29
2.8.1 PRINCIPIOS BÁSICOS PARA LA CRIOCONSERVACIÓN DEL SEMEN BOVINO	31
2.8.2 DILUYENTES.....	32
2.8.1.1 Características que deben tener los diluyentes.....	32
2.8.1.2 Componentes de los diluyentes.....	33
2.8.1.3 Yema de huevo.....	33
2.8.3 CRIOPROTECTORES.....	34
2.8.3.1 FUNCIÓN DE LOS CRIOPROTECTORES EN LOS DILUYENTES.....	34
2.9 EFECTOS DAÑINOS DE LA CRIOCONSERVACIÓN SOBRE EL ESPERMATOZOIDE.....	36
2.10 CONCENTRADOS COMERCIALES PARA LA ELABORACIÓN DE DILUYENTES.....	36
2.10.1 TRILADYL.....	36
2.10.2 ANDROMED.....	37
III. DISEÑO HIPOTÉTICO	38
HIPÓTESIS.....	38
3.1 Hipótesis alternativa H_a	38
3.2 Hipótesis nula H_0	38
3.3 Variables.....	38
Variable independiente.....	38
Variables dependientes.....	38
3.3.1 Operacionalización de variables	39
3.4 Indicadores	40

IV. POBLACIÓN Y MUESTRA.....	41
4.1 POBLACIÓN	41
4.2 MUESTRA	41
V. MARCO METODOLÓGICO	42
5.1 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	42
ESQUEMA DE TRATAMIENTOS	43
5.2 DELIMITACIÓN.....	43
5.2.1 Temporal	43
5.2.2 Espacial	43
5.2.2.1 Croquis	44
5.2.3 Académica.....	44
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	45
6.1 MÉTODO	45
6.1.1 Método Experimental	45
6.2 PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO	45
6.2.1 Identificación del toro donante.....	45
6.2.2 Preparación del toro donante.....	46
6.2.3 Excitación pre coital.....	46
6.2.4 Colecta de las muestras	46
6.2.5 Análisis macroscópico del semen	47
6.2.6 Análisis microscópico del semen	47
6.2.7 Dilución del semen.....	47
6.2.8 Dilución final de las muestras	47
6.2.9 Refrigeración de las muestras	48
6.2.10 Análisis de las muestras	48
6.2.11 Empaquetado del semen.....	49
6.2.12 Congelamiento de las pajuelas	49

6.2.13 Descongelamiento de las pajuelas.....	49
6.3 EQUIPOS Y MATERIALES.....	50
6.4 MARCO LOGÍSTICO.....	53
6.4.1 RECURSOS FINANCIEROS.....	53
6.5 RECURSOS HUMANOS.....	55
VII. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	56
7.1 RESULTADOS.....	56
7.1.1 VALORES PROMEDIO DE LOS ANÁLISIS MACROSCÓPICO Y MICROSCÓPICO DEL SEMEN FRESCO.....	56
7.1.2 VALORES PROMEDIO DE LOS ANÁLISIS MICROSCÓPICOS DEL SEMEN DILUIDO ANTES DE LA CRIOCONSERVACIÓN.....	57
7.1.3 PORCENTAJE DE MOTILIDAD INDIVIDUAL DE LOS ESPERMATOZOIDES POST DESCONGELACIÓN.....	57
7.1.4 PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES VIVOS POST DESCONGELACIÓN.....	60
7.1.5 PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES MUERTOS POST DESCONGELACIÓN.....	62
7.2 DISCUSIÓN.....	65
VIII. CONCLUSIONES.....	66
IX. RECOMENDACIONES.....	67
X. BIBLIOGRAFÍA.....	68
XI. ANEXOS.....	71

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro N° 1: clasificación y densidad del semen	25
Cuadro N° 2: clasificación de mortalidad en masa del semen.....	27
Cuadro N 3: evaluación descriptiva de la motilidad individual	28
Cuadro N° 4: crio protectores	35
Cuadro N° 5: variable independiente.....	39
Cuadro N° 6: variables dependientes.....	40
Cuadro N° 7: esquema del tratamiento	42
Cuadro N° 8: equipos y materiales de oficina	50
Cuadro N° 9: equipos y materiales de campo.....	51
Cuadro N° 10: equipos y materiales de laboratorio.....	52
Cuadro N° 11: costo total de la investigación	54
Cuadro N° 12: resultados de los análisis macroscópico y microscópico del semen fresco	56
Cuadro N° 13: resultados de los análisis microscópicos del semen diluido.....	57
Cuadro N°14: porcentaje de motilidad individual obtenidos en los dos tratamientos	57
Cuadro N° 15: motilidad individual de los espermatozoides post descongelación para un t de student	58
Cuadro N° 16: t de student para el factor motilidad individual post descongelación	59
Cuadro N° 17: porcentaje de espermatozoides vivos post descongelación obtenidos en los dos tratamientos.....	60
Cuadro N° 18: porcentaje de espermatozoides vivos post descongelación para un t de student	61
Cuadro N° 19: t de student para el factor porcentaje de espermatozoides vivos post descongelación	61
Cuadro N° 20: porcentaje de espermatozoides muertos post descongelación obtenidos en los dos tratamientos	62

Cuadro N° 21: porcentaje de espermatozoides muertos post descongelación para un t de student	63
Cuadro N°22: t de student para el factor porcentaje de espermatozoides muertos post descongelación	64
Cuadro N°23: toma de datos de análisis de semen fresco	71
Cuadro N° 24: toma de datos de análisis de semen diluido	72
Cuadro N° 25: toma de datos de análisis microscópico de pajuelas T1 post descongelación	73
Cuadro N° 26: toma de datos de análisis microscópico de pajuelas T2 post descongelación	74

ÍNDICE DE GRAFICOS

Gráfico N°1: porcentaje de motilidad individual post descongelación obtenidos en los dos tratamientos.....	58
Gráfico N°2: porcentaje espermatozoides vivos post descongelación obtenidos en los dos tratamientos.....	60
Gráfico N°3: porcentaje espermatozoides muertos post descongelación obtenidos en los dos tratamientos.....	63

RESUMEN

El presente trabajo realizado tuvo como finalidad estudiar el semen bovino crio conservado con dos tipos de diluyentes. Para realizar este trabajo se utilizó el semen de un toro donante mestizo Holstein y como diluyentes se utilizó el concentrado estéril comercial Triladyl con yema de huevo (T1) y Triladyl con leche descremada (T2). Para el desarrollo de este trabajo investigativo se utilizó seis eyaculados recolectados en dos días distintos, y diluidos con los dos tipos de diluyentes, los cuales se empacaron en pajuelas de 0,5 cc y se crio conservaron en nitrógeno líquido a -196°C . Posteriormente se descongelaron las pajuelas que corresponden a las muestras de los tratamientos, siendo 10 pajuelas por cada tratamiento, y en total fueron descongeladas 20 pajuelas. Una vez descongeladas las pajuelas se realizó el análisis microscópico de motilidad individual, determinación de espermatozoides vivos y muertos. Las variables analizadas en este trabajo investigativo fueron porcentaje de motilidad individual, y porcentajes de espermatozoides vivos y muertos. Los resultados se analizaron con una t de student. Según la t de student con T1 se lograron los mayores porcentajes de motilidad individual y espermatozoides vivos; y menor porcentaje de espermatozoides muertos en comparación con T2.

ABSTRACT

This work aimed to study the cryo-preserved bovine semen with two types of diluents. To perform this job semen from a donor mestizo Holstein bull was used as diluents Triladyl commercial sterile concentrate was used with egg yolk (T1) and Triladyl with skim milk (T2). For the development of this research work six ejaculates collected at two different days was used and diluted with two types of diluents, which of packaged in 0.5 cc straws and cryo preserved in liquid nitrogen at - 196 ° C. Afterwards the straws that correspond to samples of the treatments were thawed, 10 being straws per treatment, and in total 20 Straws were thawed. Once thawed straws microscopic analysis of individual motility, determination of live and dead spermatozoa was performed. The variables analyzed in this research work were percentage of individual motility, and percentage of live and dead sperm. The results were analyzed with t student. According to the t student with the highest percentage of T1 individual motility and live sperm were achieved; and lower percentage of dead sperm compared to T2.

I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A. TEMA

“EVALUACIÓN DE DOS DILUYENTES PARA LA CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN BOVINO: YEMA DE HUEVO VS LECHE DESCREMADA”.

B. INTRODUCCIÓN

La posibilidad de poder mantener el semen congelado ha provocado un alto desarrollo en el campo de la reproducción bovina, especialmente si hablamos de la inseminación artificial.

Pero el hecho de mantener semen congelado durante muchos años, no es el punto relevante sino que la importancia radica en que los espermatozoides pueden sobrevivir y mantener su vitalidad durante muchos años.

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 la clave para obtener un semen de excelente calidad y en las mejores condiciones para obtener unos altos niveles de fecundación con la inseminación artificial.

Además decimos que la dilución tiene como objetivo aumentar el volumen total de eyaculado, de esta manera es posible que tan solo con un eyaculado podamos obtener un mayor número de pajuelas para la inseminación artificial, para varias hembras; y

lo más relevante que le proporciona a los espermatozoides un ambiente óptimo para que conserven su vitalidad y poder de fecundación.

C. JUSTIFICACIÓN

Los diluyentes son sustancias con la capacidad de aumentar el volumen de eyaculado y proporcionar un medio adecuado para la sobrevivencia y poder de fecundación de los espermatozoides.

Los primeros medios utilizados para diluir el semen fueron principalmente las soluciones salinas o azucaradas para aumentar el volumen del semen para su empleo inmediato más bien que como conservadoras de él.

Durante varios años se ha ido investigando y comprobando varias sustancias que tengan la capacidad de proporcionar un medio adecuado para la crio conservación del semen.

A lo largo de este proceso se ha determinado que para que una sustancia sea considerada como un diluyente para el semen bovino esta debe tener la capacidad de nutrir, amortiguar y proteger las células espermáticas.

Actualmente existen en el mercado varios diluyentes comerciales, que pueden ser utilizados para la crio conservación de semen bovino, así también se pueden utilizar sustancias elaboradas a nivel de campo que resultan económicas.

Es por ello que mediante este trabajo de investigación se pretende evaluar dos diluyentes a base de ingredientes de origen animal, para observar la vitalidad y sobrevivencia de los espermatozoides.

D. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar dos diluyentes para la crío conservación de semen bovino: yema de huevo y leche descremada.

OBJETIVO ESPECÍFICOS

Congelar el semen bovino utilizando un diluyente con yema de huevo.

Congelar el semen bovino utilizando un diluyente con leche descremada.

Comparar la supervivencia espermática post-descongelación utilizando dos diluyentes.

Comparar la mortalidad espermática post-descongelación utilizando dos diluyentes.

Determinar el porcentaje de movilidad individual de los espermatozoides post-descongelación.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 SEMEN BOVINO

“Suspensión celular líquida que contienen los gametos masculinos (espermatozoides) y las secreciones de los órganos accesorios sexuales del aparato reproductor masculino, y se mezclan en el momento de la eyaculación”. (CRUZ Valenzuela, 2009)¹

El semen lo forman dos principales constituyentes: el plasma seminal y los espermatozoides.

Plasma seminal: es una mezcla de líquidos secretados por las glándulas vesiculares, conductos deferentes y otras glándulas sexuales accesorias. Tiene tres funciones principales: 1) actúa como vehículo para los espermatozoides, transportándolos desde el sistema reproductor del macho durante la eyaculación, 2) sirve de activador a los espermatozoides, previamente no móviles, y 3) proporciona un medio rico en nutrientes, tamponado, que colabora en mantener la supervivencia de los espermatozoides después de depositarse estos en el aparato genital de la hembra. (PEÑA, y otros, 2008)²

¹ CRUZ Valenzuela, Jose Luis. 2009.. *Manual de Evaluación de Semen en Bovinos*. [En línea] 07 de noviembre de 2009.
<http://cdigital.uv.mx/bitstream/12345678/147/1/JOSe%20NICOLaS%20ANGELINO%20OLIVERA.pdf>.

² PEÑA, Johanna Marcela Buitrago y SÁNCHEZ, luz Marina Pérez. 2008. *Comparación de dos diluyentes para la criopreservación de semen ovino*. [En línea] 22 de noviembre de 2008.
<http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/10185/5987/1/T14.08%20B868c.pdf>.

2.1.1 DEFINICIÓN DE ESPERMATOZOIDE

“Gametos masculinos que se forman en los túbulos seminíferos de los testículos. Son células alargadas consistentes con cabeza aplanada portadora de núcleo y una cola que es el aparato necesario para la motilidad celular.” (CRUZ Valenzuela, 2009). Op.Cit. p. 21

Un espermatozoide es una célula haploide que constituye el gameto masculino en los animales. Los espermatozoides se forman en el interior de los testículos. Las paredes de estos túbulos se encuentran tapizadas de espermatogonias, las cuales se dividen primero mitóticamente y luego por meiosis para originar las células haploides, llamadas espermátidas, que, por diferenciación (espermiogénesis), se convierten finalmente en espermatozoides. (MONTERO, 2008)³

2.1.2 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 del espermatozoide en el testículo. Esta estructura en forma de casquete, contiene varias enzimas hidrolíticas incluyendo proacrosina, hialuronidasa, esterases y ácidohidrolasa, que participan en el proceso de fecundación. Un cuello une la cabeza del espermatozoide con la cola (flagelo), la cual se subdivide en los segmentos medio, principal y caudal. (MUÑOZ, 2011)⁴

³ MONTERO, Alicia. 2008. *Definición y Estructura Del Espermatozoide*. [En línea] 28 de noviembre de 2008. [Citado el: 29 de noviembre de 2013.] <http://es.scribd.com/doc/8481761/Definicion-y-Estructura-Del-Espermatozoide>.

⁴ MUÑOZ, Oscar Vera. 2011. *Fisiología de los espermatozoides bovinos*. [En línea] 16 de junio de 2011. [Citado el: 29 de noviembre de 2013.] http://www.avpa.ula.ve/libro_desarrollosost/pdf/capitulo_40.pdf.

2.2 COLECCIÓN DE SEMEN BOVINO

El proceso de colección de semen se puede realizar mediante dos métodos como son la vagina artificial y el electro eyaculador.

*El proceso de colecta debe ser higiénico y evitando el shock térmico de los espermatozoides. La colecta se realiza con vagina artificial (VA) o por electro eyaculación. Los toros *Bos taurus* (“mansos”) se pueden colectar con vagina artificial con la ayuda de una vaca en celo, mientras que los toros *indicus* deben ser colectados por medio de la EE para proteger a los operarios. (ESCOBAR, 2011)⁵*

“Las condiciones de trabajo para colectar semen de bovino, el estado de salud del animal y la experticia del personal especializado que opera, son factores que deben tomarse en cuenta para mejorar la calidad del semen.” (MUÑOZ, y otros, 2006)⁶

2.3 MÉTODO DE LA VAGINA ARTIFICIAL

La vagina artificial consiste en un tubo cilíndrico de plástico rígido y resistente, de siete centímetros de diámetro y 35–40 centímetros de largo, recubierto internamente por una camisa de goma que se dobla sobre los extremos del cilindro formando una cámara que se llena con agua caliente (45–46 ° C) y aire, con el fin de proveer el estímulo adecuado de temperatura y presión, lográndose así la eyaculación. (MORILLO, 2012).⁷

⁵ ESCOBAR, Claudia Jiménez. 2011. *Técnicas de congelación y sexado del semen bovino y su importancia en reproducción*. [En línea] 11 de julio de 2011. [Citado el: 29 de noviembre de 2013.] <http://www.docentes.unal.edu.co/cjimeneze/docs/8209.pdf>.

⁶ MUÑOZ, Oscar Vera y Muñoz, M. Gladys. 2006. *Cómo mejorar la colección, manejo y calidad microbiológica del semen*. [En línea] 04 de diciembre de 2006. [Citado el: 29 de noviembre de 2013.] http://www.avpa.ula.ve/docuPDFs/libros_online/manual-ganaderia/seccion6/articulo19-s6.pdf.

⁷ MORILLO, M. 2012. *Evaluación del potencial reproductivo del macho bovino*. Maracay, VE, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias. pp. 23-28.

2.4 PROCEDIMIENTO PARA LA EXTRACCIÓN DE SEMEN BOVINO MEDIANTE LA VAGINA ARTIFICIAL

En el procedimiento de extracción de semen en los bovinos, para la monta del semental se utiliza señuelos que pueden ser una vaca en celo, un macho bovino o un maniquí.

Dos aspectos importantes que se deben tomar en cuenta para la extracción de semen son la higiene y un buen estímulo para el semental.

El método más común que se utiliza para la estimulación del semental es la monta falsa que consiste que el semental realice una monta sobre el señuelo que estemos utilizando, pero desviamos el pene tomándolo con la mano el prepucio y no le ofrecemos la vagina, el semental después de unos intentos de búsqueda de la vagina va a descender.

En el siguiente intento de monta del semental, tomamos el pene pero nunca su mucosa sino el prepucio y colocamos la punta del pene en la vagina artificial y entonces el semental realiza un salto hacia adelante conocido como golpe de riñón el cual va acompañado de la eyaculación.

2.5 ÁREA DE TRABAJO Y RECOLECCIÓN DE SEMEN

El área de recolección de semen debe contar con un puesto de monta, piso sólido y anti resbalante, defensas de seguridad y un ambiente de trabajo acorde con la actividad que se realiza (evitar ruidos y distracciones), además debe estar ubicado cerca del laboratorio. Para proceder a la recolección del eyaculado con el animal y la vagina artificial, previamente preparados, un operador diestro se coloca del

lado derecho del toro, al momento del intento de monta desvía el pene tomando prepucio con la mano izquierda hacia el lado derecho impidiendo todo contacto con la monta. Con la mano derecha, sosteniendo la vagina artificial, se coloca el extremo lubricado por delante del pene, y como respuesta al estímulo (presión y temperatura) semejante a la vagina de la vaca en celo, el toro penetra la vagina en toda su extensión, realizando lo que se conoce como golpe de lomo. La eyaculación del bovino se considera monofásica y sumamente violenta (segundos), después de la eyaculación el animal desmonta casi inmediatamente, entonces, se procede a retirar el tubo graduado (conteniendo el eyaculado), protegiéndolo debidamente de la luz solar directa, cambios drásticos de temperatura (choque térmico) y contaminación, se identifica la muestra y se entrega en el laboratorio para su procesamiento inmediato. (MORILLO, 2012). Op. Cit. p. 23

2.6 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA VAGINA ARTIFICIAL

El método de la vagina artificial tiene como principal desventaja de requerir el uso de animales dóciles y entrenados. La universalidad del uso de esta técnica responde al hecho de que se obtienen eyaculados muy limpios y con una baja contaminación cuando se realiza correctamente. El equipamiento base es de muy bajo costo, amén de observar toda la cadena de reflejos de excitación y libido sexual. (PEZZONE, 2008).⁸

2.7 EVALUACIÓN DEL SEMEN BOVINO

2.7.1 CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS

Las características macroscópicas a evaluar en semen de bovinos son: volumen, color, olor, densidad macroscópica.

⁸ PEZZONE, N. 2008. *Técnicas de extracción de semen en animales domésticos*. Extraído el 19 de agosto de 2014 desde <http://www.latinpedia.net/Ciencia/animal/Tecnicas-de-extraccion-de-semen-en-animales-domesticos-ad462.htm>

2.7.1.1 VOLUMEN

“Se mide directamente en la graduación en mililitro (ml) del tubo de centrifuga o recipiente colector.” (CRUZ Valenzuela, 2009) Op. Cit. p. 44

“Normalmente dicho valor, para el eyaculado de toros, es de aproximadamente 2 ml en animales jóvenes y en animales adultos \geq a 4 ml, llegando hasta 12 ml.” (AGÜERO, 2012)⁹

2.7.1.2 DENSIDAD Y COLOR

“La concentración espermática o densidad: es el número de espermatozoides por mm³ o cc. La concentración normal del bovino es de 800-1200 millones espermatozoides por centímetros cúbicos (ml) o sea 0,8-1,2 millones por mm³”. (CRUZ Valenzuela, 2009) Op. Cit. p. 44

⁹ AGÜERO, Gloria. 2012. *Evaluación de las Características Seminales de Sementales Bovinos mediante el Analizador Seminal Computarizado (CASA)*. [En línea] 12 de abril de 2012. [Citado el: 28 de noviembre de 2013.] http://saber.ucv.ve/jspui/bitstream/123456789/3292/1/T026800002626-0-Tesis_Final_Gloria_Aguero-000.pdf.

Cuadro N°1: Clasificación densidad y color del semen

Muy buena (MB):	Semen cremoso, granular con 750 a 1,000 millones de espermatozoides/ml o más.
Buena (B):	Semen lechoso con 400 a 750 millones de espermatozoides/ml
Suficiente (S):	Semen semejante a leche descremada con 250 a 400 millones de espermatozoides/ml
Pobre (P):	Semen translúcido con menos de 250 millones de espermatozoides/ml

Fuente: ANGELINO José, Manual de evaluación de semen en bovinos. (2009)

2.7.1.3 COLOR

Esta característica se evalúa por medio de la visualización en el laboratorio. El color del eyaculado depende del contenido de riboflavina, siendo normalmente desde blanquecino marfil hasta amarillento. Una coloración rojiza, indica la mezcla con sangre fresca; si el color es pardo, indica la presencia de sangre más vieja (hemolizada), denominándose ambos tipos como hemospermia. Una coloración gris indica contaminación. Los eyaculados sin espermatozoides tienen una coloración amarillo-verdosa y son de apariencia acuosa. El pus en el eyaculado se reconoce frecuentemente por la presencia de flóculos, denominándose piospermia. (AGüERO, 2012). Op. Cit. p. 6

2.7.1.4 OLOR

“Las muestras de semen recolectadas higiénicamente, de toros sanos y fértiles, tienen un débil olor sui géneris.” (AGÜERO, 2012). Op. Cit. p. 6

2.7.2 CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS

Las características microscópicas a evaluar en el semen de bovinos son: motilidad masal, motilidad individual, vitalidad, morfología, concentración espermática.

2.7.2.1 Motilidad masal

Por movimiento de masa se entiende, el movimiento en onda de todos los espermatozoides, observado en los eyaculados densos. Para su evaluación se toma una gota del semen a examinar (gota de semen íntegro) con una pipeta, se coloca la gota sobre un portaobjeto a 37°C y se observa en campo claro (aumento 10X), sin colocar el cubre objeto. (AGÜERO, 2012). Op. Cit. p. 7

Cuadro N° 2: Clasificación de motilidad en masa del semen

Muy bueno	Movimientos masivo muy marcado y rápidos	70-100%
Bueno	Movimientos en masa aparente, pero moderados	50-69%
Suficiente	Ondas en movimientos apenas apreciables	30-49%
Pobre	No hay ondas, semen sin movimiento	Menos De 30%

Fuente: ANGELINO José, Manual de evaluación de semen en bovinos. (2009)

2.7.2.2 Motilidad individual

La motilidad es una manifestación de viabilidad espermática y de integridad celular.

La motilidad individual de una muestra de semen se expresa como el porcentaje de células móviles bajo un campo microscópico. Esta prueba de la motilidad debe hacerse con la ayuda de un microscopio óptico (aumento 100X) a una temperatura de 37°C. El semen no diluido, está demasiado concentrado como para hacer la determinación exacta de la motilidad individual, por lo cual se diluye con una solución isotónica de NaCl- al 0,9%, para poder observar individualmente a los espermatozoides. (AGÜERO, 2012). Op. Cit. p. 8

Cuadro N° 3: Evaluación descriptiva de la motilidad individual

Muy Buena (MB)	80 - 100% con motilidad progresiva.
Buena (B):	60 - 79% con motilidad progresiva.
Regular (R)	40 - 59% con motilidad progresiva.
Pobre (P)	< 40% con motilidad progresiva.

Fuente: ANGELINO José, Manual de evaluación de semen en bovinos. (2009)

2.7.2.3 Morfología

Es muy importante que los espermatozoides además de tener una buena motilidad progresiva, los espermatozoides tengan que ser morfológicamente normales.

Por tanto, se ha de tener muy presente que las muestras de semen con un porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales inferior al 70% han de descartarse para la congelación.

Se han establecido distintas clasificaciones de las anomalías espermáticas atendiendo a distintos criterios: a) dependiendo de si se originan en el testículo (anomalías mayores) o a lo largo del tránsito epididimal o tras la eyaculación (anomalías menores); b) de si están asociadas a infertilidad o no (primarias o secundarias, respectivamente); o c) de la región espermática implicada (anomalías de la cabeza, de la pieza intermedia o de la pieza principal). Cualquier anomalía, primaria

o secundaria, si afecta a un número elevado de espermatozoides, puede llegar a comprometer la fertilidad del semen. (OTERO, 2008)¹⁰

2.7.2.4 Concentración espermática

La concentración de espermatozoides se expresa como el número de espermatozoides por ml. La determinación de la concentración zoospermica se lleva a cabo en forma simple mediante métodos semejantes al recuento de glóbulos rojos realizado en hematología.

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”. (OLEGARIO, 2007)¹¹

2.8 CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN BOVINO

La crio conservación es una técnica mediante la cual el material biológico puede ser mantenido viable por tiempo indefinido.

¹⁰ OTERO, Rodrigo MUIÑO. 2008. *Evaluación de la motilidad y viabilidad del semen bovino mediante el uso de sistemas casa y citometría de flujo : identificación de subpoblaciones espermáticas*. [En línea] 27 de marzo de 2008. [Citado el: 28 de noviembre de 2013.] http://dspace.usc.es/bitstream/10347/2406/1/9788497509886_content.pdf.

¹¹ OLEGARIO. 2007. *Analisis del semen bovino*. [En línea] 24 de marzo de 2007. [Citado el: 12 de diciembre de 2014.] <http://www.serida.org/pdfs/1495.pdf>.

La crio preservación 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 crio preservación 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 sexualmente transmisibles. (CASTELO, 2008).¹²

“La posibilidad de preservar el semen mediante su congelación abrió una nueva dimensión al empleo de la inseminación artificial, otorgándole más potencia aún a esta valiosa biotecnología reproductiva”. (ROLDÁN., 2006)¹³

“Varias tasas de enfriamiento y descongelación han sido ensayadas en la crio conservación seminal de diferentes especies sin que se haya determinado con exactitud una curva estándar”. (PEÑA-MARTÍNEZ, 2004)¹⁴

“Esto se debe principalmente a que los resultados dependen de factores tales como el diluyente, el crio protector usado y el tamaño del sistema de empaque; así como también de la calidad seminal, parámetro altamente variable entre individuos”. (LANDSVERK, 2000).¹⁵

¹² CASTELO, TS. 2008. *Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos*. Acta Vet Bras 2, 67-75.

¹³ ROLDÁN., Raúl Roberto. 2006. *A 50 años del inicio del semen congelado*. [En línea] 3 de septiembre de 2006. [Citado el: 29 de noviembre de 2013.] http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/inseminacion_artificial/59-inicio_semen_congelado.pdf.

¹⁴ PEÑA-MARTÍNEZ A. I. 2004. *Canine fresh and cryopreserved semen evaluation*. Anim Reprod Sci.82: 209-24.

¹⁵ LANDSVERK, K. 2000. Packaging and distribution – Their impact on fertility. In: Johnston LA and Gutherie HD. (Editors). IV International Conference on Boar semen preservation. Maryland, USA. 137-139

Dentro de la crio conservación del semen bovino debemos tener en cuenta que lo importante es lograr obtener un buen diluyente para asegurar la vitalidad de dichos espermatozoides.

La sobrevivencia después de la crio conservación de muchos tipos de células, incluyendo los espermatozoides, es fuertemente dependiente de la tasa de congelación y descongelación, y especialmente de la temperatura a la cual las células son enfriadas antes de su introducción en nitrógeno líquido.

2.8.1 PRINCIPIOS BÁSICOS PARA LA CRIOCONSERVACIÓN DEL SEMEN BOVINO

Desde el descubrimiento del glicerol como agente crio protector efectivo y del establecimiento de las técnicas básicas de crio preservación, el semen de una variedad de especies se congela y utiliza con éxito en la inseminación artificial. Sin embargo, y con excepción de los bóvidos, la utilización generalizada de semen congelado no se ha extendido a las otras especies domésticas (HOLT, 2000).¹⁶

El proceso de crio preservación incluye 5 etapas: Dilución, refrigeración, adición del crio protector, congelación y descongelación. Mientras que algunas fases son relativamente inocuas, otras son muy estresantes, como es el caso de la refrigeración y la congelación.

¹⁶ HOLT, WV. 2000. *Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences.* Theriogenology 53, 47-58. Obtenida de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10735061>

2.8.2 DILUYENTES

“Por diluyente entendemos la solución acuosa que permite aumentar el volumen del eyaculado hasta conseguir las dosis necesarias, preservar las características funcionales de las células espermáticas y mantener el nivel de fertilidad adecuado”. (CARBALLO, 2009)¹⁷

“El diluyente que se añade para congelación generalmente es del tipo TRIS (buffer), El diluyente debe contener sustancias iónicas o no iónicas que mantengan la osmolalidad del medio (TRIS), una fuente de lipoproteína de alto peso molecular (yema de huevo, leche descremada), una fuente de energía como fructosa o glucosa, y un crioprotector”. (ESCOBAR, 2011). Op. Cit. p. 2

2.8.1.1 Características que deben tener los diluyentes

- *Deben ser isotónicos al semen (tener la misma concentración de iones libres).*
- *Capacidad amortiguadora (evitar cambios de pH al neutralizar los ácidos producidos por el metabolismo de los espermatozoides).*
- *Proteger a los espermatozoides de las lesiones producidas por el choque térmico.*
- *Proporcionar nutrientes para el metabolismo de los espermatozoides.*
- *Controlar contaminantes microbianos.*
- *Los espermatozoides deben estar protegidos contra daño durante la congelación y descongelación.*
- *Debe preservar la vida de los espermatozoides con un mínimo de efecto sobre la fertilidad (CARBALLO, 2009). Op. Cit. p. 9*

¹⁷ CARBALLO, Daniel M. 2009. *Comparación de dos diluyentes comerciales para criopreservar semen de bovino bajo condiciones de campo en el trópico húmedo*. [En línea] 7 de enero de 2009. [Citado el: 28 de noviembre de 2013.] <http://cdigital.uv.mx/bitstream/12345678/65/1/DanielMCarballoGuerrero.pdf>.

2.8.1.2 Componentes de los diluyentes

- a. **Azúcares:** son componentes importantes en los diluyentes, ya que pueden actuar como fuente de energía para los espermatozoides durante su almacenamiento, como es el caso de la glucosa y de la fructuosa, o bien como crioprotector ya que también actúan manteniendo o incrementando la presión osmótica de manera extracelular en el espermatozoide, lo que permite mantener la integridad de la membrana espermática al almacenamiento por un largo período.
- b. **Sustancias buffer o amortiguadores:** actúan dando estabilidad a la membrana, ya que mantienen la tonicidad total del diluyente, lo cual es importante cuando el semen es almacenado por largos periodos de tiempo. El Tris [Tris(Hidroxymethyl)aminomethane] es usado como el principal componente en el diluyente para la congelación de semen de toro, siendo predominante una buena capacidad buffer, diurética y actividad osmótica; así como una baja toxicidad a una alta concentración.
- c. **Sustancias orgánicas:** son las que previenen el choque por enfriamiento, por ejemplo la yema de huevo por medio de sus lipoproteínas, fosfolípidos y lecitinas. (FERNADEZ, 2013)¹⁸

2.8.1.3 Yema de huevo

La yema de huevo es un ingrediente comúnmente utilizado para la congelación ya que preserva la motilidad e integridad de las membranas del acrosoma y mitocondrias del espermatozoide, además es un buffer osmótico. También se ha notado que la yema de huevo protege durante la congelación; ya que se adhiere a la membrana y la recubre, esta facultad de protección se adjudica a la gran densidad de la fracción de lipoproteínas. Idem., p. 40

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.

¹⁸ FERNADEZ, Filiberto. 2013. *Evaluación de dos diluyentes para la conservación de semen ovino: yema de huevo vs lecitina de soya.* [En línea] 5 de julio de 2013. [Citado el: 28 de noviembre de 2013.] http://www.academia.edu/4366411/EVALUACION_DE_DOS_DILUYENTES_PARA_LA_CONSERVACION_DE_SEMEN_OVINO_YEMA_DE_HUEVO_VS_LECITINA_DE_SOYA.

Las lipoproteínas de baja densidad (LDLs) contenidas en la yema de huevo fueron definidas como ingredientes activos. La adición de LDLs de otras fuentes fracasó por no producir la misma protección que la yema de huevo. Esto fue probablemente porque las LDLs de la yema de huevo contienen componentes, proteínas particularmente que trabajan en conjunto para proporcionar protección a los espermatozoides. Idem., p 45

2.8.1.4 Leche descremada

“Las micelas de las caseínas y la lactosa presente en la leche descremada, son las principales responsables de disminuir los daños por enfriamiento y congelación ya que secuestran proteínas (BSP)* presentes en el plasma seminal que tras la eyaculación inducen la pérdida de colesterol y fosfolípidos de las membranas plasmáticas.” (ALMENAR, 2007)¹⁹

2.8.3 CRIOPROTECTORES

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 (FERNANDEZ, 2013). Op. Cit. p. 9

2.8.3.1 FUNCIÓN DE LOS CRIOPROTECTORES EN LOS DILUYENTES

La función de los crioprotectores es la de proteger a las células de las lesiones producidas por la congelación.

¹⁹ ALMENAR, Cristina. 2007. *Nuevos protocolos para la criconservación de espermatozoides macho cabrio*. [En línea] diciembre de 2007. [Citado el: 12 de diciembre de 2013.] http://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/12583/TesisMaster_CristinaTomas.pdf?sequence=1.

En la actualidad existen muchos tipos de protectores que se agrupan según las posibilidades de penetración o no en las membranas celulares. Se cree que los crio protectores actúan reduciendo la cantidad de hielo presente a cualquier temperatura durante la congelación, moderando así los cambios en la concentración de solutos.

Cuadro N° 4: Crio protectores permeables de bajo peso molecular, crio protectores no permeables de bajo peso molecular, crio protectores no permeables de alto peso molecular.

CRIOPROTECTORES Y SOLUCIONES PARA CONGELACIÓN		
CPBP¹	CNPBP²	CNPAP³
Glicerol	Galactosa	Polivinilpirrolidona
Etilenglicol	Glucosa	Alcohol Polivinilico
1,2 Propanediol	Sacarosa	Almidón Hidroxietilico
DMSO	Tretalosa	Hialuronidato de Sodio
2,3 Butanediol	Lactosa	Otros Polímeros
Metanol	Manosa	
Otros Alcoholes	Otros Azucares	

Fuente: VALLECILLO Ángel, Caracterización reproductiva de toros de la raza marismeña como base a su conservación. (2011).

Los crio protectores incrementan la probabilidad de supervivencia celular, pero a determinadas concentraciones resultan tóxicos para las células, por ello, debe establecerse un equilibrio entre la mínima cantidad necesaria que provea protección celular durante el proceso de congelación-descongelación, y la máxima cantidad que no presente efectos tóxicos para las mismas.

2.9 EFECTOS DAÑINOS DE LA CRIOCONSERVACIÓN 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 estrés osmótico y la formación de hielo intracelular producen una disminución de la viabilidad espermática. Esto se ve reflejado en la motilidad, capacitación espermática e integridad acrosomal. Una de las principales características de los espermatozoides crio preservados es la disminución de la proporción de células móviles. La motilidad post descongelamiento se reduce a valores entre 40 a 50%. (RAMONEZ, 2013)²⁰

2.10 CONCENTRADOS COMERCIALES PARA LA ELABORACIÓN DE DILUYENTES

2.10.1 TRILADYL

Triladyl® es un concentrado estéril para la preparación de un diluyente con yema de huevo para la congelación de semen bovino en un solo paso. Triladyl® se presta también para la congelación de semen de otros rumiantes por ejemplo ovino, caprino, ciervo etc. Su contenido en antibióticos corresponde al estándar de la UE: EC norma 88/407. Composición: TRIS, Ácido cítrico, Azúcar, Tampones, Glicerina, Antibióticos, Agua de extrema pureza. 100 ml del diluyente preparado contienen (unidades activas) Tilosina 5,7 mg, Gentamicina 28,6 mg, Spectinomycin 34,3 mg, Lincomicina 17,2 mg. (MINITUBE, 2012)²¹

²⁰ RAMONEZ, Juan Carlos. 2013. *Evaluación de dos agentes crioprotectores no permeables y un diluyente comercial (triladyl) en la congelación de semen bovino*. [En línea] 22 de noviembre de 2013. [Citado el: 10 de diciembre de 2014.] <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/4535/1/Tesis.pdf>.

²¹ MINITUBE. 2012. *Manual- Triladyl- Diluyente de semen bovino*. [En línea] 22 de mayo de 2012. [Citado el: 15 de enero de 2014.] http://www.minitube.de/var/StorageMinitube/Datenblaetter/13500-0250_BiladylTriladyl_es_140623.pdf.

2.10.2 ANDROMED

Andromed es un diluyente sin yema de huevo para semen bovino.

“Sus beneficios son: sin ingredientes de origen animal, sin riesgo de contaminación microbiológica, protocolos de producción eficiente, altas tasas de fertilidad, amplio rango de aplicación, estándar GMP de producción Minitube”. (MINITUBE, 2014)²²

“AndroMed® contiene fosfolípidos, TRIS, ácido cítrico, azúcares, antioxidantes, tampones, glicerina, agua de altísima pureza y antibióticos, de acuerdo a la Directiva de la UE 88/407 (Tilosina, Gentamicina, Espectinomicina, Lincomicina).” (MINITUBE, 2014). Idem., 1

²² MINITUBE. 2014. *Andromed diluyente de sin yema de huevo para semen bovino*. [En línea] 23 de junio de 2014. [Citado el: 15 de diciembre de 2014.] http://www.minitube.de/var/StorageMinitube/Datenblaetter/13503-0200_AndroMed_es_140623.pdf.

III. DISEÑO HIPOTÉTICO

HIPÓTESIS

3.1 Hipótesis alternativa H_a

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

3.2 Hipótesis nula H_o

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

3.3 Variables

Variable independiente

Diluyentes para la crio conservación del semen bovino

Variables dependientes

- Supervivencia espermática post-descongelación del semen bovino
- Mortalidad espermática post descongelación del semen bovino
- Motilidad individual espermática post-descongelación del semen bovino

3.3.1 Operacionalización de variables

Cuadro N° 5: Variable Independiente

- Diluyentes para la crío conservación del semen bovino

CONCEPTO	CATEGORÍAS	INDICADORES	ÍNDICE
Diluyentes para la crío conservación de semen bovino	Físicas: cantidad empleada	Volumen	mililitros
	Química: fuente de lipoproteína utilizada	Sustancia utilizada	componente

Cuadro N° 6: Variables dependientes

- Supervivencia espermática post-descongelación del semen bovino
- Mortalidad espermática post descongelación del semen bovino
- Motilidad individual espermática post-descongelación del semen bovino

CONCEPTO	CATEGORÍAS	INDICADORES	ÍNDICE
Supervivencia espermática post-descongelación del semen bovino	Espermatozoides vivos	Cantidad de espermatozoides vivos	Porcentaje (%)
Mortalidad espermática post-descongelación del semen bovino	Espermatozoides muertos	Cantidad de espermatozoides muertos	Porcentaje (%)
Motilidad individual espermática post-descongelación del semen bovino	Movimiento individual de espermatozoides	Porcentaje de espermatozoides con movilidad Grado de movilidad Dirección de movimiento	Porcentaje (%)

3.4 Indicadores

Porcentaje de espermatozoides vivos y muertos

Porcentaje de motilidad individual

IV. POBLACIÓN Y MUESTRA

4.1 POBLACIÓN

El trabajo de investigación se realizó con un toro mestizo de 24 meses de edad del cual se obtuvo seis eyaculados diferentes, los cuales fueron utilizados para realizar las pruebas macroscópicas y microscópicas, así como para la congelación de las pajuelas y sus posteriores análisis post descongelación.

4.2 MUESTRA

Se utilizaron los seis eyaculados para realizar el congelamiento del semen y empajuelado, pero la muestras que se utilizaron fueron diez pajuelas por cada tratamiento y luego el descongelamiento de las mismas.

V. MARCO METODOLÓGICO

5.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

En este trabajo de investigación se utilizó T de Student ya que este diseño se utiliza para comparar datos.

Cuadro N° 7: Tratamientos

REPETICIONES	T2 (diluyente con yema de huevo)	T1 (diluyente con leche descremada)
1	T2R3	T1R2
2	T2R5	T1R4
3	T2R4	T1R3
4	T2R2	T1R5
5	T2R1	T1R1
6	T2R6	T1R8
7	T2R10	T1R6
8	T2R7	T1R10
9	T2R9	T1R9
10	T2R8	T1R7

ESQUEMA DE TRATAMIENTOS

TRATAMIENTO 2 (diluyente con yema de huevo)

T2R3	T2R5	T2R4	T2R2	T2R1
T2R6	T2R10	T2R7	T2R9	T2R8

TRATAMIENTO 1 (diluyente con leche descremada)

T1R2	T1R4	T1R3	T1R5	T1R1
T1R8	T1R6	T1R10	T1R9	T1R7

5.2 DELIMITACIÓN

5.2.1 Temporal

La presente investigación tuvo una duración de seis meses.

5.2.2 Espacial

La presente investigación se realizó en la parroquia Cumbe del cantón Cuenca de la provincia del Azuay y en los laboratorios de biotecnología de la reproducción de la Universidad Politécnica Salesiana.

5.2.2.1 Croquis



Fuente: Directorio Cartográfico, Dices.net. (2014)

5.2.3 Académica

El área de la investigación fue la Reproducción Bovina y va enfocado a la biotecnología de la reproducción.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 MÉTODO

6.1.1 Método Experimental

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 de investigación para la verificación de las hipótesis planteadas en la investigación para llegar a obtener conclusiones, y además porque los resultados obtenidos son temporales, ya que están a disposición de futuras investigaciones las cuales pueden modificar dichos resultados.

6.2 PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

6.2.1 Identificación del toro donante

El reproductor donante de semen fue seleccionado bajo los parámetros de condición corporal, evaluación de las patas y pezuñas, evaluación de la libido, órganos sexuales accesorios, prepucio, pene, escroto, testículos, epidídimo.

El reproductor donante es un toro mestizo Holstein, llamado StefanoCC, con fecha de nacimiento el 27 de junio del 2012, con condición corporal 4, y con un estado de salud aparente normal.

6.2.2 Preparación del toro donante

El toro donante permaneció en la propiedad de la investigadora encargada, en la parroquia Cumbe.

Durante algunos meses permaneció en entrenamiento para la colección de semen.

Previo a los días de colección de semen, se preparó al toro donante, en donde se cortó el vello prepucial y se realizó un lavado del prepucio.

6.2.3 Excitación pre coital

Antes de la colecta de semen como preparación del toro, se realiza la excitación pre coital que consiste en darle algunas vueltas antes que realice la monta con esto se logra que el toro se excite.

6.2.4 Colecta de las muestras

Para la colecta de semen se utilizó una vagina artificial. Las muestras que se colectaron fueron 6 eyaculados del semental, las cuales se hicieron 3 por día, las colectas las realizó el mismo operario, por la mañana por dos días consecutivos.

6.2.5 Análisis macroscópico del semen

Una vez recolectado el semen, se analizó: color, olor, pH, volumen. El volumen se determinó observando en el tubo colector cuantos mililitros hay de eyaculado. El olor y color se analizó directamente en el tubo colector, para determinar el pH se utilizó las tiras de papel tornasol.

6.2.6 Análisis microscópico del semen

El análisis microscópico que se realiza inmediatamente después de la colecta es la motilidad masal, la cual se realiza tomando una gota de muestra de semen y se coloca sobre un portaobjeto que está sobre una placa térmica a 37°C, y se lleva al microscopio y se analiza de acuerdo a los remolinos que se observa.

6.2.7 Dilución del semen

Cada muestra de semen colectado se diluyó con el diluyente Triladyl con yema de huevo y con Triladyl con leche descremada, en una relación 1:1, es decir por cada ml de semen un ml de diluyente. En esta investigación como se utilizó dos diluyentes, y para que las muestras estuvieran en las mismas condiciones se dividió cada eyaculado en dos partes iguales y se realizó la dilución.

6.2.8 Dilución final de las muestras

Una vez colectadas todas las muestras de semen, se hizo la dilución de todas las muestras, en una relación 1:10, es decir juntamos todas las muestras diluidas,

sumamos el volumen y añadimos el volumen equivalente a 10 veces más de diluyente.

6.2.9 Refrigeración de las muestras

Una vez hecha la dilución final, se refrigeró las muestras a 4 °C y se dejó reposar por 3 horas.

6.2.10 Análisis de las muestras

Después de haber dejado reposar 3 horas las muestras, se realizó el análisis microscópico de motilidad individual y espermatozoides vivos y muertos. Y el análisis macroscópico de concentración.

Para determinar la motilidad individual, se toma una gota de la muestra y se coloca sobre un portaobjeto que está sobre una placa térmica a 37°C, se coloca un cubreobjetos y se lleva al microscopio, se observa y se determina el porcentaje de motilidad de acuerdo al avance que tienen los espermatozoides y en que dirección lo hacen.

Para determinar la concentración, se utilizó la cámara de Neubauer, para lo cual se utilizó una gota de la muestra de semen diluido y se colocó en la cámara de Neubauer y luego se realizó el conteo de cinco cuadrantes. Se sumó el total de espermatozoides y una fórmula abreviada basta con aumentar 7 ceros y obtenemos la concentración.

Para la determinación de vivos y muertos es preciso realizar una coloración del semen; luego contar unos 100 espermatozoides e ir anotando. Para esta investigación

se utilizó la tinción de tinta china, la cual consiste en tomar una gota de la muestra de semen y colocar en un portaobjeto que se encuentra sobre la placa térmica a 37° C, luego se coloca una gota de tinta china y se realiza un frotis, y luego se observa al microscopio, y el resultado es que los están vivos no se colorean en cambio los que están muertos si se colorean.

6.2.11 Empaquetado del semen

Después de haber dejado reposar la muestra de semen por tres horas se procedió a empacar las muestras en pajuelas de 0.5 cc. Cabe recalcar que el semen debe permanecer a una temperatura de 5 °C como estuvo refrigerado durante el proceso de empaquetado en las pajuelas.

6.2.12 Congelamiento de las pajuelas

Una vez que todas las muestras están empaquetadas en las pajuelas, se realizó la congelación de las pajuelas en la máquina ICE CUBE, la cual debe estabilizarse a una temperatura de -5 °C en 30 minutos, después de este tiempo introducimos las pajuelas y esperamos 5 minutos para que alcance la temperatura de -120 °C. De esta forma el ICE CUBE se encargó de crio conservar el semen a -120 °C, y luego se trasladó al termo con nitrógeno líquido a -196 °C.

6.2.13 Descongelamiento de las pajuelas

Las pajuelas al estar crio conservadas pueden pasar por tiempo indefinido en nitrógeno líquido. Pero como en esta investigación se requiere realizar análisis post descongelación se procedió a descongelar las pajuelas para realizar las pruebas

microscópicas requeridas como son la motilidad individual y espermatozoides vivos y muertos. Para lo cual se realiza el mismo procedimiento indicado anteriormente en el análisis microscópico antes del congelamiento.

6.3 EQUIPOS Y MATERIALES

Los equipos y materiales que se utilizaron en la investigación se clasificaron de acuerdo su naturaleza en equipos y materiales de oficina, de campo y de laboratorio.

Cuadro N° 8: Equipos y materiales de oficina

Cantidad	Descripción
1	Lápiz
1	Bolígrafo
1	Cuaderno de toma de datos
1	Cámara digital
1	Tablet
1	Computadora
1	Paquete de hojas de papel bond

Cuadro N° 9: Equipos y materiales de campo.

Cantidad	Unidad de medida	Descripción
		Materiales Físicos
1	Par	Botas
1	Unidad	Overol
1	Unidad	Vagina artificial
2	Unidad	Mangas
2	Unidad	Conos
6	Unidad	Tubos recolectores
1	Unidad	Baño maría
1	Unidad	Termómetro
1	Unidad	Microscopio
1	Unidad	Caja de guantes
5	Unidad	Guantes de ginecología
2	Unidad	Vasos de precipitación
1	Unidad	Caja de porta objetos
1	Unidad	Caja de cubre objetos
1	Unidad	Porta tubos colectores
6	Unidad	Micro pipetas
2	Unidad	Envases estériles
1	Unidad	Termo de refrigeración
		Materiales químicos
2	Unidad	Frascos de diluyente Triladyl
10	Volumen/ litros	Agua caliente
250	Volumen / ml	Yema de huevo
250	Volumen / ml	Leche descremada
5	Fundas	Hielo

Cuadro N° 10: Equipos y materiales de laboratorio

Cantidad	Unidad de medida	Descripción
		Materiales físicos
2	Unidad	Matraz erlenmeyer
1	Pliego	Papel filtro
1	Unidad	Varilla de vidrio
20	Unidad	Pajuelas
2	Unidad	Vaso de precipitación
1	Unidad	Cámara de frio a 5°C
1	Unidad	Empacadora de pajuelas
1	Unidad	Cámara de crio conservación de semen.
1	Unidad	Termo de nitrógeno liquido
1	Unidad	Placa térmica
1	Caja	Portaobjetos
1	Caja	Cubreobjetos
1	Unidad	Baño maría
1	Unidad	Termómetro
1	Unidad	Microscopio
1	Paquete	Toallas desechables
1	unidad	tijeras
1	Unidad	Cámara de neubauer
		Materiales químicos
20	Gotas	Tinta china
5	Litros	Agua caliente
10	Mililitros	NaCl
2000	mililitros	Agua estéril

6.4 MARCO LOGÍSTICO

6.4.1 RECURSOS FINANCIEROS

Cuadro N° 11: Costo total de la investigación

CONCEPTO	UNIDAD	PRECIO UNITARIO	CANTIDAD	VALOR EFECTIVO	VALOR FINANCIADO
MATERIALES FISICOS					
Vagina artificial		\$150,00	1	\$150,00	\$150,00
Microscopio		\$250,00	2	\$500,00	\$500,00
Micro pipeta		\$200,00	1	\$200,00	\$200,00
Cámara de neubauer		\$1.000,00	1	\$1.000,00	\$1.000,00
Matraz erlenmeyer (1000ml)		\$20,00	2	\$40,00	\$40,00
Varilla de vidrio		\$10,00	1	\$10,00	\$10,00
Conos		\$50,00	2	\$100,00	\$100,00
Tubos colectores		\$50,00	6	\$300,00	\$300,00
Termómetro		\$5,00	1	\$5,00	\$5,00
Baño maria		\$600,00	1	\$600,00	\$600,00
Guantes	caja	\$5,00	1	\$5,00	\$5,00
Guantes de ginecología	caja	\$5,00	1	\$5,00	\$5,00
Vasos de precipitación		\$15,00	2	\$30,00	\$30,00
Porta objetos	caja	\$14,75	1	\$14,75	\$14,75
Cubre objetos	caja	\$14,75	1	\$14,75	\$14,75
Porta tubos colectores		\$6,00	1	\$6,00	\$6,00
Envases estériles		\$5,00	2	\$10,00	\$10,00
Termo de refrigeración		\$11,50	1	\$11,50	\$11,50
Cámara de frío		\$1.000,00	1	\$1.000,00	\$1.000,00
Empacadora de pajuelas		\$1.000,00	1	\$1.000,00	\$1.000,00
Cámara de criopreservación		\$1.500,00	1	\$1.500,00	\$1.500,00
Termo de nitrógeno líquido		\$600,00	1	\$600,00	\$600,00
Placa térmica		\$890,00	1	\$890,00	\$890,00
Toallas desechables	paquete	\$6,00	1	\$6,00	\$6,00
Tijeras		\$1,00	1	\$1,00	\$1,00
Mangas		\$60,00	2	\$120,00	
Papel filtro	pliego	\$1,00	2	\$2,00	
Pajuelas		\$5,00	20	\$100,00	
MATERIALES QUIMICOS					
NaCl	mililitros	\$0,10	10	\$1,00	\$1,00
Diluyente Triladyl	frascos	\$70,00	3	\$210,00	
Tinta china	gotas	\$0,50	20	\$10,00	
Agua caliente	litros	\$0,30	15	\$4,50	\$4,50
Yema de huevo		\$0,25	25	\$6,25	
Leche descremada	litro	\$2,00	1	\$2,00	
Hielo	fundas	\$2,00	5	\$10,00	
Agua estéril	mililitros	\$0,01	2000	\$20,00	\$20,00
OTROS					
Mano de obra		\$150,00	1	\$150,00	
Transporte		\$100,00	1	\$100,00	
Impresiones		\$40,00	1	\$40,00	
Empastado		\$20,00	3	\$60,00	
			SUBTOTAL	\$8.834,75	\$8.024,50
			TOTAL	\$810,25	

6.5 RECURSOS HUMANOS

- **Director de tesis**

Dr. Patricio Garnica

- **Investigador Responsable**

Samantha Vanessa Carpio Chuchuca

VII. RESULTADOS Y DISCUSIONES

7.1 RESULTADOS

7.1.1 VALORES PROMEDIO DE LOS ANÁLISIS MACROSCÓPICO Y MICROSCÓPICO DEL SEMEN FRESCO

Cuadro N° 12: Resultados de los análisis macroscópico y microscópico de semen fresco

DESCRIPCIÓN	ANÁLISIS MACROSCÓPICO					ANÁLISIS MICROSCÓPICO
	VOLUMEN	OLOR	COLOR	PH	CONCENTRACIÓN	MOTILIDAD MASAL
EYACULADO	4,67	Suigeneris	Blanco- Cremoso	7,83	1,17 millones/ml	80%

En el cuadro expuesto se puede apreciar los valores promedio de los análisis macroscópicos y microscópicos de los seis eyaculados que se obtuvo, dichos datos son hechos con el semen fresco.

7.1.2 VALORES PROMEDIO DE LOS ANÁLISIS MICROSCÓPICOS DEL SEMEN DILUIDO ANTES DE LA CRIOCONSERVACIÓN

Cuadro N°13: Resultados de los análisis microscópicos de semen diluido.

DESCRIPCIÓN	ANÁLISIS MICROSCÓPICO		
	MOTILIDAD INDIVIDUAL	VIVOS	MUERTOS
SEMEN DILUIDO CON TRILADYL CON YEMA DE HUEVO	80%	82,50%	17,50%
SEMEN DILUIDO CON TRILADYL CON LECHE DESCREMADA	72,50%	77,50%	22,50%

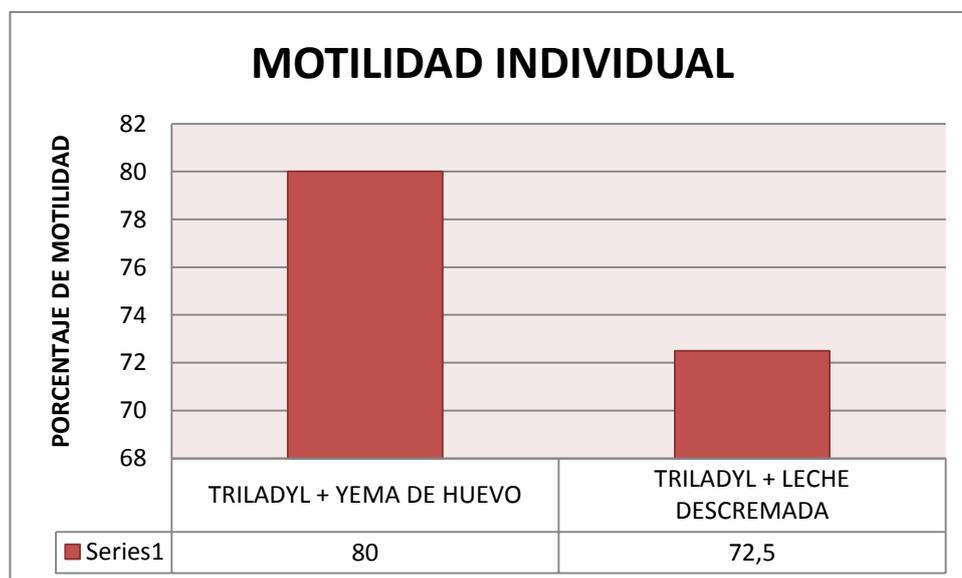
En este cuadro se aprecia los valores de motilidad individual, vivos y muertos que se realizó en el semen diluido antes del proceso de crío conservación.

7.1.3 PORCENTAJE DE MOTILIDAD INDIVIDUAL DE LOS ESPERMATOZOIDES POST DESCONGELACIÓN.

Cuadro N° 14: Porcentajes de motilidad individual obtenidos en los dos tratamientos.

TRATAMIENTO	PORCENTAJE (%)
	Motilidad individual
TRILADYL + YEMA DE HUEVO (T1)	80 %
TRILADYL + LECHE DESCREMADA(T2)	72,5 %

Gráfico N° 1: Porcentajes de motilidad individual obtenidos en los dos tratamientos.



En el Gráfico 1 se puede observar el porcentaje promedio de motilidad individual de los espermatozoides post descongelación, como se puede apreciar el tratamiento del diluyente Triladyl con yema de huevo se obtuvo un porcentaje de 80% de motilidad individual, en cambio con el tratamiento de Triladyl con leche descremada se obtuvo un porcentaje de 72,5 % de motilidad individual.

Cuadro N° 15: Motilidad individual de los espermatozoides post descongelación para un T de student

S²d	0,69
Sd	0,83
t	9,04

Cuadro N° 16: T DE STUDENT para el factor motilidad individual post descongelación.

T CALCULAR	T TABULAR	
	5%	1%
9,04 **	2,262	3,250

CV	1,09%
-----------	--------------

De acuerdo a la tabla de t de student, el porcentaje de motilidad individual de los espermatozoides post descongelación, estadísticamente es altamente significativa entre los dos tratamientos.

En la tabla de t de student para el porcentaje de motilidad individual de los espermatozoides post descongelación, t calcular es mayor a t tabular al 5% y al 1%, por lo tanto aceptamos la hipótesis alternativa que dice que el semen bovino crio preservado no mantiene los mismos porcentajes de supervivencia, mortalidad y motilidad individual post- congelación utilizando los dos diluyentes.

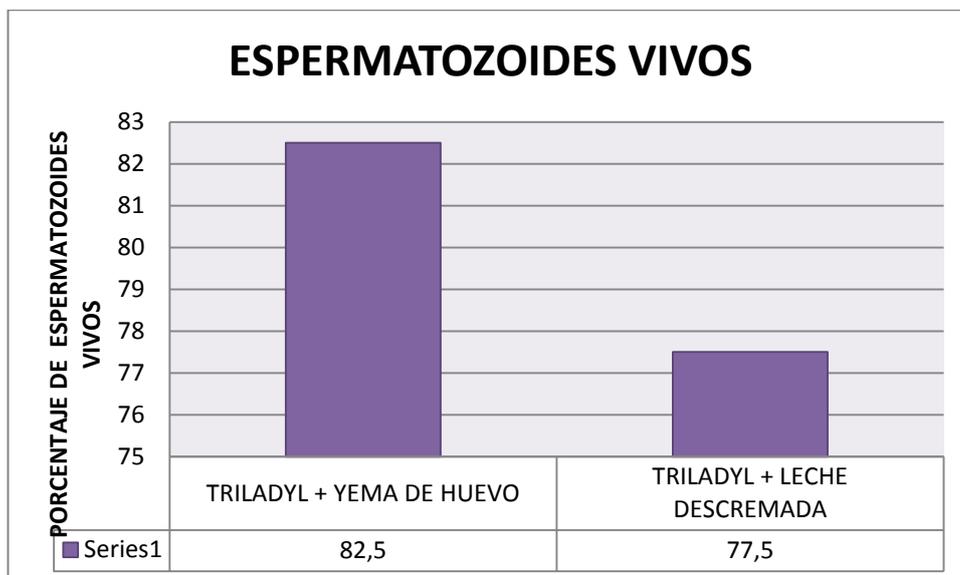
El coeficiente de variación (CV) es de 1,09%, que está dentro de los rangos permitidos para este tipo de investigación, por lo tanto nos dice que los datos son confiables.

7.1.4 PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES VIVOS POST DESCONGELACIÓN

Cuadro N° 17: Porcentaje de espermatozoides vivos post descongelación obtenidos en los dos tratamientos.

TRATAMIENTO	PORCENTAJE (%)
	Espermatozoides vivos
Triladyl + yema de huevo (T1)	82,5 %
Triladyl + leche descremada (T2)	77,5 %

Gráfico N° 2: Porcentaje de espermatozoides vivos post descongelación obtenidos en los dos tratamientos.



En el Gráfico 2 se observa los porcentajes promedios de la supervivencia de los espermatozoides post descongelación, como se aprecia en el grafico nos dice que el tratamiento de Triladyl con yema de huevo tuvo un 82,5 % de supervivencia de los espermatozoides post descongelación, en cambio el tratamiento de Triladyl con leche descremada tuvo un 77,5 % de supervivencia de los espermatozoides.

Cuadro N° 18: t de student para el porcentaje de espermatozoides vivos post descongelación.

S²d	1,67
Sd	1,29
t	3,88

Cuadro N° 19: t de student para el factor porcentaje de espermatozoides vivos post descongelación.

T CALCULAR	T TABULAR	
	5%	1%
3,88 **	2,262	3,250

CV	1,61%
-----------	--------------

Según la tabla de t de student, el porcentaje espermatozoides vivos post-descongelación es altamente significativo entre los dos tratamientos.

En la tabla de t de student se demuestra que para el porcentaje de espermatozoides vivos post descongelación, el valor de t calcular estadísticamente es mayor al valor de t tabular al 5% y al 1%, por lo tanto aprobamos la hipótesis alternativa que dice que el semen bovino crio preservado no mantiene los mismos porcentajes de supervivencia, mortalidad y motilidad individual post- congelación utilizando los dos diluyentes.

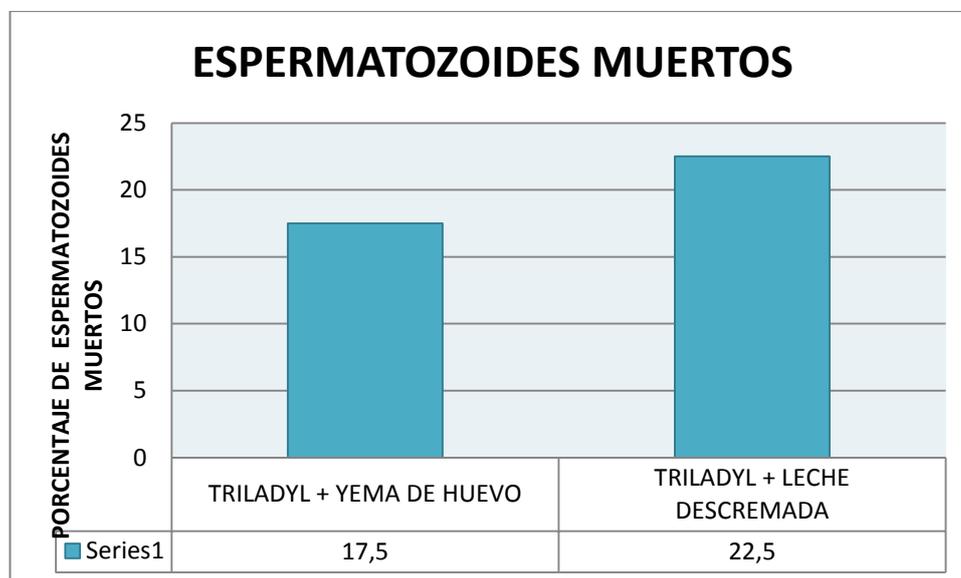
El coeficiente de variación (CV) es de 1,61 %, que está dentro de los rangos permitidos para este tipo de investigación, lo que equivale a que los datos son confiables.

7.1.5 PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDEOS MUERTOS POST DESCONGELACIÓN

Cuadro N° 20: Porcentaje de espermatozoides muertos post descongelación obtenidos en los dos tratamientos.

TRATAMIENTO	PORCENTAJE (%)
	Espermatozoides muertos
Triladyl + yema de huevo (T1)	17,5 %
Triladyl + leche descremada (T2)	22,5 %

Gráfico N° 3: Porcentaje de espermatozoides muertos post descongelación obtenidos en los dos tratamientos.



En el gráfico 3 se observa los porcentajes de mortalidad de los espermatozoides post descongelación, que se obtuvo en los dos tratamientos, en donde con el tratamiento Triladyl con yema de huevo se obtuvo un 17,5 % de mortalidad en cambio con el tratamiento de Triladyl con leche descremada se obtuvo una mortalidad de 22,5 %.

Cuadro N°21: t de student para el porcentaje de espermatozoides muertos post descongelación.

S^2d	1,11
Sd	1,05
t	-4,76

Cuadro N° 22: t de student para el factor porcentaje de espermatozoides muertos post descongelación.

T CALCULAR	T TABULAR	
	5%	1%
-4,76 NS	2,262	3,250

CV	5,25%
-----------	--------------

Según la tabla de t de student, los porcentajes de mortalidad de los espermatozoides entre los dos tratamientos son no significativos entre los dos tratamientos.

En la tabla de t student observamos que t calcular es negativo (-4,76), es decir es estadísticamente menor a t tabular al 5 % y al 1%, por lo tanto aprobamos la hipótesis nula que dice que el semen bovino crio preservado mantiene los mismos porcentajes de supervivencia, mortalidad y motilidad individual post- congelación utilizando los dos diluyentes.

El coeficiente de variación (CV) es de 5,25 % que está dentro de los rangos de esta investigación, lo que nos indica que los datos son confiables.

7.2 DISCUSIÓN

Según Ramón en el 2013 dice que la baja viabilidad de los espermatozoides post descongelamiento se debe a cambios de temperatura, estrés osmótico, formación de hielo intracelular y toxicidad, lo que se traduce en la utilización de un mal diluyente. Y que otro parámetro que se ve afectado es la motilidad individual post descongelamiento reduciéndose a 40- 50%. Pero según mi investigación se evaluó si los porcentajes de motilidad individual, espermatozoides vivos y muertos post descongelación eran iguales o diferentes entre los dos tratamientos, Triladyl con yema de huevo (T1) y Triladyl con leche descremada (T2). Obteniendo para la motilidad individual los porcentajes de 80% para T1 y 72,5 % para T2, entonces podemos decir que al utilizar un buen diluyente y manejando los parámetros adecuados de descongelación se puede obtener altos porcentajes de motilidad individual post descongelación. Según Fernández en el 2013 dice que la yema de huevo contiene lipoproteínas de baja densidad que protegen los espermatozoides del enfriamiento es por ello que los porcentajes de espermatozoides vivos fueron de 82,5 % para T1 y 77, 5 % para T2, tanto que para Almenar en el 2007 nos dice algo similar que al utilizar leche descremada estamos disminuyendo los daños por enfriamiento y congelación es por ello que los porcentajes de espermatozoides muertos fueron de 17, 5% para T1 y 22,5 % para T2. De acuerdo a la tabla de t de student, para la motilidad individual t calcular (9,04) es mayor a t tabular al 5% (2,262) y al 1% (3,250); para el porcentaje de espermatozoides vivos t calcular (3,88) es mayor a t tabular al 5% (2,262) y al 1% (3,250); y para el porcentaje de espermatozoides muertos t calcular (-4,76) es menor a t tabular al 5% (2,262) y al 1% (3,250). Por lo tanto los porcentajes de motilidad individual, espermatozoides vivos y muertos fueron diferentes entre los dos tratamientos, a pesar de utilizar ingredientes que poseen similitudes entre ellos.

VIII. CONCLUSIONES

Al culminar dicho trabajo investigativo se concluye indicando que el toro donante de semen fue muy dócil al momento de la manipulación para la colecta de semen, colaborando durante las seis colectas requeridas, en las cuales no hubo ningún inconveniente ni contratiempo que afectara la colecta de las muestras. Además el lugar facilitó para que se implementara un laboratorio para los análisis requeridos inmediatamente después de la colecta de semen.

Por lo tanto se puede decir que el procedimiento de criconservación de semen bovino que implica la colecta, análisis, dilución, refrigeración, congelamiento y post descongelamiento de las muestras se realizaron sin ningún inconveniente ya que se contaron con los equipos y materiales necesarios.

Después de realizados los análisis correspondientes a las muestras podemos concluir diciendo que el tratamiento T1 (Triladyl con yema de huevo) fue mejor porque se obtuvo en la motilidad individual el 80%, el 82,5 % de espermatozoides vivos y el 17,5 % de espermatozoides muertos mientras que con el tratamiento T2 (Triladyl con leche descremada) se obtuvo 72,5 % de motilidad individual, 77,5 % de espermatozoides vivos y el 22,5 % de espermatozoides muertos, siendo notable la diferencia estadísticamente entre los dos tratamientos.

IX. RECOMENDACIONES

- En base a los resultados se recomienda utilizar el concentrado Triladyl con yema de huevo porque mantiene los mejores porcentajes de motilidad individual y de espermatozoides vivos.
- Se recomienda seguir investigando este tema utilizando diferentes ingredientes.
- Para la colecta de semen se debe utilizar un toro donante con buen estado de salud.
- Realizar una preparación previa como entrenamiento.
- Para la colecta de semen se debe utilizar un toro como maniquí o una vaca en buen estado de salud.
- Realizar una excitación previa
- Que los implementos y materiales sean los más limpio posibles para evitar contaminación del semen
- Ser muy estrictos en lo que se refiere a mantener el semen a una temperatura adecuada.

X. BIBLIOGRAFÍA

AGÜERO, Gloria. 2012. *Evaluación de las Características Seminales de Sementales Bovinos mediante el Analizador Seminal Computarizado (CASA)*. [En línea] 12 de abril de 2012. [Citado el: 28 de noviembre de 2013.] http://saber.ucv.ve/jspui/bitstream/123456789/3292/1/T026800002626-0-Tesis_Final_Gloria_Aguero-000.pdf.

ALMENAR, Cristina. 2007. *Nuevos protocolos para la criconservación de espermatozoides macho cabrío*. [En línea] diciembre de 2007. [Citado el: 12 de diciembre de 2013.] http://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/12583/TesisMaster_CristinaTomas.pdf?sequence=1.

CARBALLO, Daniel M. 2009. *Comparación de dos diluyentes comerciales para criopreservar semen de bovino bajo condiciones de campo en el trópico húmedo*. [En línea] 7 de enero de 2009. [Citado el: 28 de noviembre de 2013.] <http://cdigital.uv.mx/bitstream/12345678/65/1/DanielMCarballoGuerrero.pdf>.

CASTELO TS, TR FROTA, AR SILVA. 2008. *Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos*. Acta Vet Bras 2, 67-75.

CRUZ Valenzuela, José Luis. 2009. *Manual de Evaluación de Semen en Bovinos*. [En línea] 07 de noviembre de 2009. <http://cdigital.uv.mx/bitstream/12345678/147/1/JOSE%20NICOLAS%20ANGELINO%20OLIVERA.pdf>.

ESCOBAR, Claudia Jiménez. 2011. *Técnicas de congelación y sexado del semen bovino y su importancia en reproducción*. [En línea] 11 de julio de 2011. [Citado el: 29 de noviembre de 2013.] <http://www.docentes.unal.edu.co/cjimeneze/docs/8209.pdf>.

FERNADEZ, Filiberto. 2013. *Evaluación de dos diluyentes para la conservación de semen ovino: yema de huevo vs lecitina de soya*. [En línea] 5 de julio de 2013. [Citado el: 28 de noviembre de 2013.]

http://www.academia.edu/4366411/EVALUACION_DE_DOS_DILUYENTES_PARA_LA_CONSERVACION_DE_SEMEN_OVINO_YEMA_DE_HUEVO_VS_LECITINA_DE_SOYA.

HOLT, WV. 2000. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology* 53, 47-58. Obtenida de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10735061>

LANDSVERK, K. 2000. Packaging and distribution - Their impact on fertility. In: Johnston LA and Gutherie HD. (Editors). IV International Conference on Boar semen preservation. Maryland, USA. 137-139

MINITUBE. 2012. Manual- Triladyl- Diluyente de semen bovino. [En línea] 22 de mayo de 2012. [Citado el: 15 de enero de 2014.] http://www.minitube.de/var/StorageMinitube/Datenblaetter/13500-0250_BiladylTriladyl_es_140623.pdf.

MINITUBE. 2014. Andromed diluyente de sin yema de huevo para semen bovino. [En línea] 23 de junio de 2014. [Citado el: 15 de diciembre de 2014.] http://www.minitube.de/var/StorageMinitube/Datenblaetter/13503-0200_AndroMed_es_140623.pdf.

MONTERO, Alicia. 2008. *Definición y Estructura Del Espermatozoide*. [En línea] 28 de noviembre de 2008. [Citado el: 29 de noviembre de 2013.] <http://es.scribd.com/doc/8481761/Definicion-y-Estructura-Del-Espermatozoide>.

MORILLO, M., Salazar, S. y Castillo, E. (2012). *Evaluación del potencial reproductivo del macho bovino*. Maracay, VE, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias. pp. 23-28.

MUÑOZ, Oscar Vera y Muñoz, M. Gladys. 2006. *Cómo mejorar la colección, manejo y calidad microbiológica del semen*. [En línea] 04 de diciembre de 2006. [Citado el: 29 de noviembre de 2013.] http://www.avpa.ula.ve/docuPDFs/libros_online/manual-ganaderia/seccion6/articulo19-s6.pdf.

MUÑOZ, Oscar Vera. 2011. *Fisiología de los espermatozoides bovinos*. [En línea] 16 de junio de 2011. [Citado el: 29 de noviembre de 2013.] http://www.avpa.ula.ve/libro_desarrollosost/pdf/capitulo_40.pdf.

OLEGARIO. 2007. *Análisis del semen bovino*. [En línea] 24 de marzo de 2007. [Citado el: 12 de diciembre de 2014.] <http://www.serida.org/pdfs/1495.pdf>.

OTERO, Rodrigo MUIÑO. 2008. *Evaluación de la motilidad y viabilidad del semen bovino mediante el uso de sistemas casa y citometría de flujo: identificación de subpoblaciones espermáticas*. [En línea] 27 de marzo de 2008. [Citado el: 28 de noviembre de 2013.] http://dspace.usc.es/bitstream/10347/2406/1/9788497509886_content.pdf.

PEÑA, JOHANNA MARCELA BUITRAGO y SÁNCHEZ, LUZ MARINA PÉREZ. 2008. *Comparación de dos diluyentes para la crío preservación de semen ovino*. [En línea] 22 de noviembre de 2008. <http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/10185/5987/1/T14.08%20B868c.pdf>.

PEÑA-MARTÍNEZ A. I. 2004. *Canine fresh and cryopreserved semen evaluation*. Anim Reprod Sci. 82: 209-24.

PEZZONE, N. (2008, Julio 02). *Técnicas de extracción de semen en animales domésticos*. Extraído el 19 de junio de 2013 desde <http://www.latinpedia.net/Ciencia/animal/Tecnicas-deextracción-de-semen-en-animales-domesticos-ad462.htm>

RAMONEZ, Juan Carlos. 2013. *Evaluación de dos agentes crioprotectores no permeables y un diluyente comercial (triladyl) en la congelación de semen bovino*. [En línea] 22 de noviembre de 2013. [Citado el: 10 de diciembre de 2014.] <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/4535/1/Tesis.pdf>.

ROLDÁN., Raúl Roberto. 2006. *A 50 años del inicio del semen congelado*. [En línea] 3 de septiembre de 2006. [Citado el: 29 de noviembre de 2013.] http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/inseminacion_artificial/59-inicio_semen_congelado.pdf.

XI. ANEXOS

ANEXO N° 1

Cuadro N° 23: Toma de Datos de análisis de semen fresco

DESCRIPCIÓN	ANALISIS					
	MACROSCÓPICO					MICROSCÓPICO
SEMEN FRESCO	VOLUMEN	OLOR	COLOR	PH	CONCENTRACIÓN	MOTILIDAD MASAL
1	4ml	suigeneris	Blanco-cremoso	9	1,22 millones/ml	80%
2	6ml	suigeneris	Blanco-cremoso	8	1,22 millones/ml	80%
3	5ml	suigeneris	Blanco-cremoso	8	1,22 millones/ml	80%
4	3ml	suigeneris	Blanco-cremoso	8	1,12 millones/ml	80%
5	5ml	suigeneris	Blanco-cremoso	7	1,12 millones/ml	80%
6	5ml	suigeneris	Blanco-cremoso	7	1,12 millones/ml	80%

ANEXO N° 2

Cuadro N° 24: toma de datos de análisis de semen diluido

DESCRIPCIÓN		ANÁLISIS MICROSCÓPICO		
TRATAMIENTO	DÍA DE EXTRACCIÓN	MOTILIDAD INDIVIDUAL	ESPERMATOZOIDES VIVOS	ESPERMATOZOIDES MUERTOS
Semen diluido con Triladyl con yema de huevo	1	80%	80%	20%
Semen diluido con Triladyl con leche descremada	1	70%	75%	25%
Semen diluido con Triladyl con yema de huevo	2	80%	85%	15%
Semen diluido con Triladyl con leche descremada	2	75%	80%	20%

ANEXO N° 3**Cuadro N° 25:** toma de datos de análisis microscópico de pajuelas (T1) post descongelación.

DESCRIPCIÓN		ANALISIS MICROSCÓPICO		
PAJUELAS (T1)	DÍAS DE EXTRACCIÓN	MOTILIDAD INDIVIDUAL	ESPERMATOZOIDES VIVOS	ESPERMATOZOIDES MUERTOS
1	1	80%	80%	20%
2	1	80%	80%	20%
3	1	80%	80%	20%
4	1	80%	80%	20%
5	1	80%	80%	20%
6	2	80%	85%	15%
7	2	80%	85%	15%
8	2	80%	85%	15%
9	2	80%	85%	15%
10	2	80%	85%	15%

ANEXO N° 4**Cuadro N° 26:** toma de datos de análisis microscópico de pajuelas (T2) post descongelación

DESCRIPCIÓN		ANALISIS MICROSCÓPICO		
PAJUELAS (T2)	DÍAS DE EXTRACCIÓN	MOTILIDAD INDIVIDUAL	ESPERMATOZOIDES VIVOS	ESPERMATOZOIDES MUERTOS
1	1	70%	75%	25%
2	1	70%	75%	25%
3	1	70%	75%	25%
4	1	70%	75%	25%
5	1	70%	75%	25%
6	2	75%	80%	20%
7	2	75%	80%	20%
8	2	75%	80%	20%
9	2	75%	80%	20%
10	2	75%	80%	20%

ANEXO N° 5: Fotografías

Foto N° 1: Preparación de material de colección de semen



Foto N°2: Mantenimiento de diluyentes a Baño María



Foto N° 3: Microscopio para análisis de semen



Foto N° 4: Preparación de maniquí



Foto N° 5: Excitación pre coital del toro donante



Foto N° 6: Colección de semen



Foto N° 7: Excitación pre coital del toro donante para las siguientes colectas



Foto N° 8: dilución del semen



Foto N° 9: Análisis de semen



Foto N° 10: Placa térmica



Foto N° 11: Refrigeración del semen diluido



Foto N° 12: Análisis microscópico de semen antes de congelar



Foto N° 13: Empacado de semen



Foto N° 14: congelación de pajuelas



Foto N° 15: introducción de pajuelas en nitrógeno líquido



Foto N° 16: descongelado de pajuelas



Foto N° 17: Análisis de semen post descongelación



Foto N° 18: Análisis de semen post descongelado

