



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
CARRERA DE INGENIERÍA ZOOTÉCNICA

**“CRIO-PRESERVACIÓN Y VIABILIDAD ESPERMÁTICA DE
SEMEN DE BOVINOS CHAROLAIS POST-DESCONGELACIÓN
CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE TREHALOSA”**

TRABAJO DE TITULACIÓN
TIPO: TRABAJO EXPERIMENTAL

Trabajo de titulación presentado para optar al grado académico de:
INGENIERA ZOOTECNISTA

Autora: YESENIA CATHERINE HERNÁNDEZ BARRIGA

Director: Dr. Antonio Nelson Duchi Duchi. PhD.

RIOBAMBA – ECUADOR

2019

DERECHOS DE AUTOR

©2019, Yesenia Catherine Hernández Barriga

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
CARRERA INGENIERÍA DE ZOOTÉCNICA

El tribunal del trabajo de titulación certifica que: El trabajo de investigación Tipo Trabajo Experimental, “CRIO-PRESERVACIÓN Y VIABILIDAD ESPERMÁTICA DE SEMEN DE BOVINOS CHAROLAIS POST-DESCONGELACIÓN CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE TREHALOSA”, de responsabilidad del Srta. Yesenia Catherine Hernández Barriga, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del trabajo de titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Dr. Alex Arturo Villafuerte Gavilánez. Msc

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Dr. Nelson Antonio Duchi Duchi. Ph.D.

DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Dr. Cesar Antonio Camacho León. Msc

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Yesenia Catherine Hernández Barriga, soy responsable de las ideas, doctrinas, resultados expuestos en este trabajo de titulación y el patrimonio intelectual del trabajo de titulación de tipo trabajo experimental pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

YESENIA CATHERINE HERNÁNDEZ BARRIGA

AGRADECIMIENTO

Al culminar mi carrera como Ing. Zootecnista, quiero agradecer primeramente a Dios, por cada una de las bendiciones otorgadas para poder lograr mi tan añorada meta.

A mis amados padres José Vicente y Manuelita Concepción, que confiaron en mí y a pesar de todas las adversidades nunca me dejaron sola y hoy podemos disfrutar este gran logro, que los llena de mucho orgullo y gratificación por toda la confianza depositada en mí.

También extendo mis sinceros agradecimientos al GAD Provincial de Morona Santiago, que en ese momento se encontraba a cargo del Msc. Marcelino Chumpi y en la Dirección de Desarrollo Productivo, Turístico y Económico al Dr. Cid Calle y a todos los técnicos quienes fueron de gran apoyo en el trabajo de campo realizado en las instalaciones de dicha institución.

A todos y cada uno de los docentes que fueron mi guía, en todo mi camino durante mi formación profesional en especial, Dr. Nelson Duchi D. Director de mi investigación, por su acertada orientación; al Dr. Cesar Camacho L., Asesor de la misma por su gran apoyo para avanzar paso a paso en la elaboración de la investigación.

A mis amigos y familiares que estaban presentes con una palabra de aliento cuando estaba a punto de desmayar.

Yesenia Hernández B.

DEDICATORIA

El logro obtenido es dedicado a:

A mis padres, hermanos y tíos que siempre estuvieron con el apoyo emocional y moral para lograr mi meta. El cual no ha sido un camino tan fácil a pesar de haber tropiezos pero nos mantuvimos juntos, por eso motivo todo mi esfuerzo es dedicado hacia ellos.

De manera muy especial a mis sobrinos Rosita, Anthony y Vladimir, con el mensaje que cuando uno se lo propone algo a pesar de todos los obstáculos se los puede lograr, y porque han llenado mi vida de amor convirtiéndome en un ejemplo para ellos.

Yesenia Hernández B.

CONTENIDO GENERAL

Portada	i
Derechos de Autor	ii
Certificación	iii
Declaración de autenticidad	iv
Agradecimiento	v
Dedicatoria	vi
Tabla de contenido	vii
Índice de tablas	xv
Índice de gráficos	xvii
Índice de fotografías	xxi
Índice de ilustraciones	xxiii
Índice de anexos	xxiv
Resumen	xxv
Abstract	xxvi

INTRODUCCIÓN	1
---------------------	----------

CAPITULO I

1. MARCO REFERENCIAL

1-1. ORIGEN DE LA RAZA CHAROLAIS	3
1.1. Características físicas del Charolais.	3
1.2. Características funcionales	4

2-1.	GANADERIA BOVINA EN MORONA SANTIAGO	4
2.1.	Producción bovina y consumo per cápita.	4
3-1.	HISTORIA DE LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL	5
3.1.	Difusión de la inseminación artificial	5
3.2.	Avances en la inseminación artificial	6
4-1.	HISTORIA DE LA CONGELACION DE SEMEN	8
4.1.	Criopreservación de semen	8
5-1.	PRINCIPIOS BÁSICOS DE LA CRIOPRESERVACIÓN	9
5.1.	Agentes crioprotectores (ACP)	9
5.1.1.	<i>Permeables o intracelulares.</i>	10
5.1.2.	<i>No Permeables</i>	10
5.2.	Descripción de Trehalosa.	10
6-1.	ESPERMATOGÉISIS	11
6.1.	Efectos dañinos de la criopreservación sobre el espermatozoide.	12
6.2.	Procesos metabólicos de los espermatozoides.	13
7-1.	CRIOPRESERVACION DE SEMEN	14
7.1.	Métodos de criopreservación	15
7.2.	Protocolos para congelación de semen	16
8-1.	DILUYENTES DE SEMEN	18
8.1.	Diluyentes comerciales	18
8.1.1.	<i>Tris o Hidroximetil amino metano</i>	18
8.1.2.	<i>Ácido cítrico</i>	19
8.1.3.	<i>Fructosa</i>	19
8.1.4.	<i>Yema de huevo</i>	19
8.1.5.	<i>Glicerol</i>	19

8.1.6.	<i>Tilosina</i>	19
8.1.7.	<i>Gentamicina</i>	19
8.1.8.	<i>Estreptomicina</i>	20
8.1.9.	<i>Agua destilada</i>	20
8.2.	Diluyentes no comerciales.	20
8.2.1.	<i>Yema de huevo</i>	20
8.2.2.	<i>Glicerol</i>	20
8.2.3.	<i>Trehalosa</i>	20
8.2.4.	<i>Tris (Tham)</i>	20
8.2.5.	<i>Fructosa</i>	21
8.2.6.	<i>Ácido cítrico</i>	21
8.2.7.	<i>Agua destilada</i>	21
8.2.8.	<i>Penicilina</i>	21
8.2.9.	<i>Estreptomicina</i>	21
9-1.	EVALUACIÓN DEL SEMEN	21
9.1.	Características Macroscópicas.	22
9.1.1.	<i>Volumen</i>	22
9.1.2.	<i>Color</i>	22
9.1.3.	<i>Olor</i>	22
9.1.4.	<i>Aspecto</i>	23
9.1.5.	<i>pH .</i>	23
9.2.	Características Microscópicas	23
9.2.1.	<i>Motilidad masal</i>	23
9.2.2.	<i>Motilidad individual</i>	24
9.2.3.	<i>Concentración</i>	25

9.2.3.1.	<i>Método Manual (hemocitómetro o cámara de Neubauer).</i>	25
9.2.4.	<i>Determinación de células vivas y muertas.</i>	26
9.2.5.	<i>Daños de la membrana.</i>	27
9.2.5.1.	<i>Morfología espermática</i>	27
9.2.5.2.	<i>Anormalidades del espermatozoide</i>	29
10-1.	MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE SEMEN	30
10.1.	Vagina artificial	30
10.1.1.	<i>Procedimiento para la extracción del semen mediante la vagina artificial</i>	30
10.1.2.	<i>Área de trabajo y recolección del semen</i>	30
10.2.	Electroeyaculador	30
10.2.1.	<i>Efectividad del equipo de electroeyaculación.</i>	31
10.2.2.	<i>Precauciones a tener el momento de la colecta.</i>	31
10.2.3.	<i>Respuesta individual de los toros al estímulo.</i>	31
10.3.	Colecta de semen por medio de masajes.	31

CAPITULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS

1-2.	LOCALIZACIÓN Y DURACIÓN	33
2-2.	UNIDADES EXPERIMENTALES	34
3-2.	MATERIALES, EQUIPOS E INSTALACIONES	34
3.1.	Materiales	34
3.2.	Equipos	35
3.3.	Reactivos	35

3.4.	Instalaciones	36
4-2.	TRATAMIENTO Y DISEÑO EXPERIMENTAL	36
4.1.	Esquema del experimento	37
5-2.	TRATAMIENTOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL	37
5.1.	Macroscopicas	38
5.2.	Microscopicas	38
6-2.	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	39
6.1.	Campo	39
6.1.1.	<i>Limpieza de toro</i>	39
6.1.2.	<i>Armado de la vagina artificial</i>	40
6.1.3.	<i>Volumen total por eyaculado (ml)</i>	41
6.1.4.	<i>Color</i>	41
6.1.5.	<i>Olor</i>	42
6.1.6.	<i>Aspecto</i>	42
6.2.	Laboratorio	43
6.2.1.	<i>Pesaje de los reactivos.</i>	43
6.2.2.	<i>Elaboración de diluyentes.</i>	43
1)	Preparación de diluyente (Comercial) con Trehalosa (0 mEq/l)	44
a.	Preparación de diluyente parte A	44
b.	Preparación de diluyente parte B	45
2)	Elaboración de diluyente con Trehalosa (25 mEq/l)	46
3)	Elaboración de Trehalosa (50 mEq/l)	47
6.2.3.	<i>Motilidad masal</i>	48
6.2.4.	<i>Motilidad individual (%)</i> .	48
6.2.5.	<i>pH</i>	49

6.2.6.	<i>Morfología espermática (%)</i> .	49
6.2.7.	<i>Conteo de células vivas y muertas (%)</i> .	50
6.2.8.	<i>Concentración espermática de semen fresco (ml)</i> .	51
6.2.9.	<i>Conservación de semen fresco</i>	53
6.2.10.	<i>Cálculo del número de pajuelas y volumen de diluyente</i> .	53
6.2.11.	<i>Empajillado y sellado</i> .	54
6.2.12.	<i>Congelación y conservación</i> .	56
6.2.13.	<i>Descongelado</i> .	57
6.2.14.	<i>Motilidad Progresiva</i> .	58
6.2.15.	<i>Concentración espermática post-descongelación</i> .	59

CAPITULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

1-3.	CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS	60
1.1.	Volumen total por eyaculado (ml)	60
1.2.	Color	60
1.3.	Olor	61
1.4.	Aspecto	61
1.5.	pH	62
2-3.	CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS	64
2.1.	Motilidad Masal	64
2.2.	Motilidad Individual	64
2.2.1.	<i>Semen Fresco</i>	64

2.2.2.	<i>Semen Diluido (Pre Congelamiento)</i>	64
2.2.3.	<i>Semen descongelado</i>	67
2.3.	Determinación de células vivas y muertas	70
2.3.1.	<i>Semen Fresco</i>	70
2.3.2.	<i>Semen diluido (pre congelamiento)</i>	71
2.3.3.	<i>Semen descongelado</i>	73
2.4.	Concentración espermática	76
2.4.1.	<i>Semen Fresco</i>	76
2.4.2.	<i>Semen Diluido (Pre Congelamiento)</i>	77
2.4.3.	<i>Semen Descongelado</i>	77
2.5.	Daños de membrana	78
2.5.1.	<i>Semen Fresco</i>	78
2.5.2.	<i>Semen diluido (pre congelamiento)</i>	78
2.5.3.	<i>Semen descongelado</i>	79
2.6.	Morfología espermática	79
2.6.1.	<i>Semen fresco</i>	79
2.6.2.	<i>Semen diluido (pre congelamiento)</i>	79
2.6.3.	<i>Semen descongelado</i>	84
2.7.	Anormalidades del espermatozoide.	88
2.7.1.	<i>Semen fresco</i>	88
2.7.2.	<i>Semen diluido (pre congelamiento)</i>	90
2.7.3.	<i>Semen descongelado</i>	91
	EVALUACIÓN ECONÓMICA.	95
	CONCLUSIONES	98

RECOMENDACIONES	99
BIBLIOGRAFÍA	100
Anexos	

INDICE DE TABLAS

Tabla 1-1..	Protocolo estándar para congelación de semen bovino.	16
Tabla 2-1..	Aspecto de los espermatozoides vistos en el microscopio.	23
Tabla 3-1..	Clasificación de la motilidad masal en eyaculados bovinos.	24
Tabla 4-1..	Escala basada en el porcentaje de células móviles.	25
Tabla 5-1..	Escala basada en la velocidad de movimiento de las células móviles.	25
Tabla 6-2..	Condiciones meteorológicas del laboratorio de biotecnología reproductiva bovina del GAD Provincial de Morona Santiago.	33
Tabla 7-2..	Esquema del experimento.	37
Tabla 8-2..	Esquema del análisis de varianza (ADEVA).	39
Tabla 9-2..	Clasificación del color y concentración de semen bovino.	42
Tabla 10-2..	Escala colorimétrica de semen bovino.	42
Tabla 11-2..	Motilidad progresiva post-descongelado.	58
Tabla 12-3..	Características de semen fresco de bovinos Charolais.	63
Tabla 13-3..	Características físicas y morfológicas de semen diluido de bovinos Charolais con diferentes concentraciones de trehalosa.	93
Tabla 14-3..	Características físicas y morfológicas de semen post-descongelado de bovinos Charolais con diferentes concentraciones de trehalosa.	94

- Tabla 15-3..** Análisis de producción de semen post-descongelado de bovinos Charolais con diferentes concentraciones de trehalosa. 96
- Tabla 16-3..** Número de pajuelas obtenidas de bovinos Charolais por tratamiento con diferentes concentraciones de trehalosa. 97

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-3.	Color de semen fresco de Bovinos Charolais.	60
Gráfico 2-3.	Olor de semen fresco de Bovinos Charolais.	61
Gráfico 3-3.	Aspecto o consistencia de semen fresco de Bovinos Charolais.	61
Gráfico 4-3.	Motilidad individual de semen diluido de Bovinos Charolais evaluado a las 0 horas (pre-congelado) con diferentes concentraciones de Trehalosa.	65
Gráfico 5-3.	Tendencia de la Regresión de la motilidad progresiva 0 horas (pre-congelación), mediante la utilización de diferentes concentraciones de Trehalosa.	66
Gráfico 6-3.	Motilidad progresiva de semen diluido de Bovinos Charolais evaluado a las 2 horas (pre-congelación) con diferentes concentraciones de Trehalosa.	66
Gráfico 7-3.	Tendencia de la Regresión de la motilidad progresiva 2 horas (pre-congelación), mediante la utilización de diferentes concentraciones de Trehalosa.	67
Gráfico 8-3.	Motilidad individual de semen post-descongelado de Bovinos Charolais evaluado a las 0 horas (crio-preservado) con diferentes concentraciones de Trehalosa.	68
Gráfico 9-3.	Tendencia de la Regresión de la motilidad progresiva 0 horas (post-congelación), mediante la utilización de diferentes concentraciones de Trehalosa.	69
Gráfico 10-3.	Motilidad individual de semen post-descongelado de Bovinos Charolais evaluado a las 2 horas (crio-preservado) con diferentes concentraciones de Trehalosa.	69

Gráfico 11-3.	Tendencia de la Regresión de la motilidad progresiva 2 horas (post-congelación), mediante la utilización de diferentes concentraciones de Trehalosa.	70
Gráfico 12-3.	Células vivas de semen diluido de Bovinos Charolais (pre-congelado) con diferentes concentraciones de Trehalosa.	71
Gráfico 13-3.	Tendencia de la Regresión de células vivas (pre-congelación), mediante la utilización de diferentes concentraciones de Trehalosa.	72
Gráfico 14-3.	Células muertas de semen diluido de Bovinos (pre-congelado) con diferentes concentraciones de Trehalosa.	72
Gráfico 15-3.	Tendencia de la Regresión de células muertas (pre-congelación), mediante la utilización de diferentes concentraciones de Trehalosa.	73
Gráfico 16-3.	Células vivas de semen post-descongelado de Bovinos Charolais (crio-preservado) con diferentes concentraciones de Trehalosa.	74
Gráfico 17-3.	Tendencia de la Regresión de células vivas (post-congelación), mediante la utilización de diferentes concentraciones de Trehalosa.	75
Gráfico 18-3.	Células muertas de semen post-descongelado de Bovinos Charolais (crio-preservado) con diferentes concentraciones de Trehalosa.	75
Gráfico 19-3.	Tendencia de la Regresión de células muertas (post-congelación), mediante la utilización de diferentes concentraciones de Trehalosa.	76
Gráfico 20-3.	Concentración espermática de pajuelas de 0,5 ml, en semen diluido de Bovinos Charolais (crio-preservado) con diferentes concentraciones de Trehalosa.	77
Gráfico 21-3.	Concentración espermática de pajuelas de 0,5 ml, en semen post-descongelado de Bovinos Charolais (crio-preservado) con diferentes concentraciones de Trehalosa.	78

Gráfico 22-3.	Morfología de la cabeza de semen diluido de Bovinos Charolais (pre congelado) con diferentes concentraciones de Trehalosa.	80
Gráfico 23-3.	Tendencia de la Regresión de morfología de la cabeza (pre-congelación), mediante la utilización de diferentes concentraciones de Trehalosa.	81
Gráfico 24-3.	Morfología de la cola de semen diluido de Bovinos Charolais (pre congelado) con diferentes concentraciones de Trehalosa.	81
Gráfico 25-3.	Tendencia de la Regresión de morfología de la cola (pre-congelación), mediante la utilización de diferentes concentraciones de Trehalosa.	82
Gráfico 26-3.	Espermatozoides Normales en semen diluido de Bovinos Charolais (pre congelado) con diferentes concentraciones de Trehalosa.	83
Gráfico 27-3.	Tendencia de la Regresión de espermatozoides normales (pre-congelación), mediante la utilización de diferentes concentraciones de Trehalosa.	84
Gráfico 28-3.	Morfología de la cabeza en semen post-descongelado de Bovinos Charolais (crio-preservado) con diferentes concentraciones de Trehalosa.	84
Gráfico 29-3.	Tendencia de la Regresión de Morfología de la cabeza en semen post-descongelado de Bovinos Charolais (crio-preservado) con diferentes concentraciones de Trehalosa.	85
Gráfico 30-3.	Morfología de la cola en semen post-descongelado de Bovinos Charolais (crio-preservado) con diferentes concentraciones de Trehalosa.	86
Gráfico 31-3.	Tendencia de la Regresión de Morfología de la cola en semen post-descongelado de Bovinos Charolais (crio-preservado) con diferentes concentraciones de Trehalosa.	87

Gráfico 32-3.	Espermatozoides Normales en semen post-descongelado de Bovinos Charolais (crio-preservado) con diferentes concentraciones de Trehalosa.	87
Gráfico 33-3.	Tendencia de la Regresión de Espermatozoides Normales en semen post-descongelado de Bovinos Charolais (crio-preservado) con diferentes concentraciones de Trehalosa.	88
Gráfico 34-3.	Anormalidades de cabeza en semen fresco de Bovinos Charolais.	89
Gráfico 35-3.	Anormalidades de la parte media en semen fresco de Bovinos Charolais.	89
Gráfico 36-3.	Anormalidades de cola en semen fresco de Bovinos Charolais.	90
Gráfico 37-3.	Anormalidades de la cabeza de semen diluido de Bovinos Charolais (pre congelado) con diferentes concentraciones de Trehalosa.	90
Gráfico 38-3.	Anormalidades de la cola de semen diluido de Bovinos Charolais (pre congelado) con diferentes concentraciones de Trehalosa.	91
Gráfico 39-3.	Anormalidades de la cabeza de semen post-descongelado de Bovinos Charolais (crio-preservado) con diferentes concentraciones de Trehalosa.	92
Gráfico 40-3.	Anormalidades de la cola de semen post-descongelado de Bovinos Charolais (crio-preservado) con diferentes concentraciones de Trehalosa.	92

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 1-1.	Bovino Charolais en la Provincia de Morona Santiago.	3
Fotografía 2-1.	Cámara de Neubauer.	26
Fotografía 3-1.	Cámara de Neubauer mirada en el microscopio con lente de 40x.	26
Fotografía 4-1.	Morfología espermática.	29
Fotografía 5-2.	Limpieza del prepucio del toro.	39
Fotografía 6-2.	Armado de vagina artificial.	40
Fotografía 7-2.	Llenado de vagina artificial.	40
Fotografía 8-2.	Volumen de eyaculado.	41
Fotografía 9-2.	Pesaje de reactivos.	43
Fotografía 10-2.	Motilidad masal.	48
Fotografía 11-2.	Motilidad individual.	48
Fotografía 12-2.	Pehachimetro utilizado para la presente investigación.	49
Fotografía 13-2.	Morfología espermática.	50
Fotografía 14-2.	Conteo de células vivas y muertas.	51
Fotografía 15-2.	Cámara central para conteo de semen fresco en cámara de Neubauer.	52

Fotografía 16-2.	Agregando diluyente al vaso de precipitación, para el empajillado.	54
Fotografía 17-2.	Llenado de pajuelas.	54
Fotografía 18-2.	Conservación de la cámara de aire.	55
Fotografía 19-2.	Microesferas para sellado de pajuelas.	55
Fotografía 20-2.	Proceso de refrigeración y estabilización de pajuelas.	56
Fotografía 21-2.	Proceso de congelación de pajuelas con vapor de nitrógeno.	57
Fotografía 22-2.	Descongelado de pajuelas.	57
Fotografía 23-2.	Motilidad progresiva de semen descongelado.	58
Fotografía 24-2.	Cuadrantes extremos de la cámara de Neubauer.	59

LISTA DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1-1.	Estructura de la molécula de Trehalosa.	11
Ilustración 2-1.	Proceso de la espermatogénesis.	12
Ilustración 3-1.	Pasos para congelación TWO-STEP.	17
Ilustración 4-1.	Pasos para congelación ONE-STEP.	17
Ilustración 5-1.	Estructura del espermatozoide bovino.	28

INDICE DE ANEXOS

SEMEN DILUIDO

- Anexo 1.** Motilidad progresiva 0 horas (Puntos).
- Anexo 2.** Motilidad progresiva 2 horas (Puntos).
- Anexo 3.** Células vivas (%).
- Anexo 4.** Células muertas (%).
- Anexo 5.** Morfología de la cabeza (%).
- Anexo 6.** Morfología de la cola (%).
- Anexo 7.** Espermatozoides normales (%).
- Anexo 8.** Concentración espermática 10^6 (0,5 ml).
- Anexo 9.** Correlación de semen diluido

SEMEN DESCONGELADO

- Anexo 10.** Motilidad progresiva 0 horas (Puntos).
- Anexo 11.** Motilidad progresiva 2 horas (Puntos).
- Anexo 12.** Células vivas (%).
- Anexo 13.** Células muertas (%).
- Anexo 14.** Morfología de la cabeza (%).
- Anexo 15.** Morfología de la cola (%).
- Anexo 16.** Espermatozoides normales (%).
- Anexo 17.** Concentración espermática 10^6 (0,5 ml).
- Anexo 22.** Correlación de semen post-descongelado.

RESUMEN

La presente investigación se realizó para evaluar la viabilidad espermática de semen fresco y descongelado de bovinos Charolais con diferentes concentraciones de trehalosa. Se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva Bovina del Gobierno Autónomo Descentralizado Provincial de Morona Santiago, y una segunda descongelación en el Laboratorio de Biotecnología De La Reproducción Animal en la Facultad de Ciencias Pecuarias de la ESPOCH. Con un reproductor de la raza Charolais al cual se le extrajo 8 eyaculados con vagina artificial, con un intervalo de colecta de 4 días, el tiempo de duración de la investigación fue de 60 días. Se utilizó un diseño completamente al azar, analizando únicamente el efecto de la Trehalosa. Para el (T25) se utilizó 25 mEq/litro solución, para el (T50) 50 mEq/ litro solución y un tratamiento control (T0) diluyente comercial. Dando como resultado para semen fresco fueron: color muy bueno, olor dulzón como leche fresca, aspecto muy bueno, volumen de eyaculado de $6,24 \text{ ml} \pm 0,36$; motilidad masal $2,75 \text{ puntos} \pm 0,16$; pH $6,88 \pm 0,08$; motilidad individual $70,38 \% \pm 4,26$; células vivas $88,97 \% \pm 1,72$; células muertas $11,03 \% \pm 1,72$; espermatozoides normales $79,03 \% \pm 0,55$, y una concentración espermática $650,00 \text{ ml } 10^6 \pm 5,81$. Para semen diluido se obtuvo una motilidad inicial 0 horas (Puntos) para el (T0) $4,67 \pm 0,62$; (T25) $3,67 \pm 0,62$ y (T50) $0,67 \pm 0,62$, células vivas, (%) (T0) $90,67 \pm 4,97$ seguido del (T25) $78,92 \pm 4,97$ y (T50) $57,33 \pm 4,97$, células muertas, (%). (T0) $9,33 \pm 4,97$, (T25) $21,08 \pm 4,97$, (T50) $42,67 \pm 4,97$, espermatozoides normales (%), (T0) $91,83 \pm 1,16$, (T25) $87,92 \pm 1,16$, (T50) $83,92 \pm 1,16$, concentración espermática ($0,5 \text{ ml} / 10^6$) (T0) $32,33 \pm 2,78$, (T25) $31,33 \pm 2,78$, (T50) $32,16 \pm 2,78$ y para semen descongelado se alcanzó en motilidad inicial 0 horas (Puntos) en el (T0) $3,88 \pm 0,31$; (T25) $2,50 \pm 0,23$ y (T50) $0,31 \pm 0,23$, células vivas (%) (T0) $65,16 \pm 1,73$; (T25) $56,27 \pm 1,73$ y (T50) $38,16 \pm 1,73$, células muertas (%) (T0) $34,84 \pm 1,73$, (T25) $43,73 \pm 1,73$, (T50) $61,84 \pm 1,73$, espermatozoides normales (%) (T0) $90,58 \pm 0,76$, (T25) $85,00 \pm 0,76$, (T50) $79,11 \pm 0,76$, concentración espermática ($0,5 \text{ ml} / 10^6$) (T0) $33,34 \pm 2,94$, (T25) $32,84 \pm 2,94$ (T50) $32,96 \pm 2,94$. Se concluyó que la viabilidad espermática en semen fresco y descongelado en la investigación se obtuvo el mejor resultado con (T0) seguido del (T25) y finalmente (T50) los cuales se pueden utilizar en la inseminación artificial. Recomendamos orientar la investigación al post-descongelado para obtener un semen de mejor calidad en bovinos, y evitar el fracaso en la preñez de las vacas, y a su vez evitar la pérdida de material genético muy importante en la mejora genética.

PALABRAS CLAVE: <REPRODUCCIÓN ANIMAL><SEMEN BOVINO CHAROLAIS><CRIO-CONGELACIÓN DE SEMEN><DILUYENTE CON TREHALOSA><CARRERA DE INGENIERÍA ZOOTÉCNICA><GOBIERNO AUTÓNOMO DESCENTRALIZADO><MORONA SANTIAGO (PROVINCIA)>

ABSTRACT

This investigation was carried out to evaluate the sperm viability of fresh and thawed semen from Charolais cattle with different concentrations of Trehalose. It was developed in the Bovine Reproductive Biotechnology Laboratory of the Provincial Autonomous Decentralized Government of Morona Santiago, and a second thaw in the Biotechnology of Animal Reproduction in the School of Animal Sciences Laboratory of the Higher Polytechnic School of Chimborazo. With a breeder of the Charolais race, which was extracted eight ejaculates with artificial vagina, with a collection interval of 4 days, the duration of the investigation was 60 days. A completely randomized design was used, analyzing only the effect of Trehalose. For the (T25) 25 mEq/liter solution was used, for the (T50) 50 mEq/liter solution and a control treatment (T0) commercial diluent. Resulting in fresh semen were: very good color, sweet smell like fresh milk, very good appearance, volume of ejaculate of $6,24 \text{ ml} \pm 0,36$. Mass motility (points) $2,75 \pm 0,16$. pH $6,88 \pm 0,08$. Individual motility (%) $70,38 \pm 4,26$. Live cells (%) $88,97 \pm 1,72$. Dead cells (%) $11,03 \pm 1,72$. Normal sperm (%) $79,03 \pm 0,55$, and a sperm concentration $650,00 \text{ ml } 106 \pm 5,81$. For diluted semen an initial motility 0 hours (points) was obtained in (T0) $4,67 \pm 0,62$; (T25) $3,67 \pm 0,62$ and (T50) $0,67 \pm 0,62$. Living cells (%) (T0) $90,67 \pm 4,97$ followed by (T25) $78,92 \pm 4,97$ and (T50) $57,33 \pm 4,97$. Dead cells (%) (T0) $9,33 \pm 4,97$; (T25) $21,08 \pm 4,97$; (T50) $42,67 \pm 4,97$. Normal sperm (%) (T0) $91,83 \pm 1,16$; (T25) $87,92 \pm 1,16$; (T50) $83,92 \pm 1,16$. Sperm concentration (0,5 ml 106) (T0) $32,33 \pm 2,78$; (T25) $31,33 \pm 2,78$; (T50) $32,16 \pm 2,78$ and for thawed semen the initial motility was reached 0 hours (%) in the (T0) $3,88 \pm 0,31$; (T25) $2,50 \pm 0,23$ and (T50) $0,31 \pm 0,23$. Living cells (%) (T0) $65,16 \pm 1,73$; (T25) $56,27 \pm 1,73$ and (T50) $38,16 \pm 1,73$. Dead cells (%) (T0) $34,84 \pm 1,73$; (T25) $43,73 \pm 1,73$; (T50) $61,84 \pm 1,73$. Normal sperm (%) (T0) $90,58 \pm 0,76$; (T25) $85,00 \pm 0,76$; (T50) $79,11 \pm 0,76$. Sperm concentration (0.5 ml 106) (T0) $33,34 \pm 2,94$; (T25) $32,84 \pm 2,94$ (T50) $32,96 \pm 2,94$. It was concluded that the sperm viability in fresh and thawed semen in the investigation obtained the best result with (T0) followed by (T25) and finally (T50) which can be used in artificial insemination. We recommend guiding the research to post-thawing to obtain semen of better quality in cattle and avoid the failure in the pregnancy of the cows, and in turn, avoid the loss of genetic material significant in genetic improvement.

KEYWORDS: <ANIMAL REPRODUCTION><CHAROLAIS BOVINE SEMEN><SEMEN CRYO-FREEZING><TREHALOSE DILUENT><ZOOTECNICA ENGINEERING DEGREE>AUTONOMOUS DECENTRALIZED GOVERNMENT><MORONA SANTIAGO (PROVINCE)>.

INTRODUCCIÓN

La provincia de Morona Santiago al ser una de las más fructíferas del oriente ecuatoriano en el área de reproducción especialmente en la raza Charolais, que se ha venido desarrollando desde hace varios años atrás, es por ello que se realizó el presente trabajo de titulación en esta provincia con animales de alta calidad genética, donde se utilizan en su mayoría las biotecnologías reproductivas, como la inseminación artificial y la transferencia de embriones; en la actualidad se está realizando el proceso de valoración y conservación de semen bovino de los mejores reproductores, para ejecutar mejoras genéticas en los bovinos criollos de la provincia.

Dentro de la utilización de biotecnologías para la mejora genética y reproducción de los animales, se requiere la evaluación de la calidad seminal de los reproductores que se vayan a utilizar, para de esta manera poder predecir en forma rápida y segura la capacidad fecundante del reproductor.

Las características que se evalúan en el semen antes y después del descongelado son: volumen, concentración espermática, morfología, motilidad masal e individual, células vivas y muertas, color, olor, pH, la mismas que se encuentran relacionadas con el potencial fecundante del macho.

La criopreservación de semen bovino a más de ser una forma de conservación, ofrece muchas ventajas en los sistemas de explotación, dentro de los programas de mejoramiento genético como: mejora de la raza, cruces entre razas, rusticidad, incremento en la producción lechera y cárnica entre otras.

El cuanto a la utilización de semen fresco y montas naturales frente al semen congelado, este favorece la fertilidad de las hembras, es por eso que, se lo ha venido utilizando desde varios años atrás; logrando así solucionar los acontecimientos negativos que se asocian a su uso como: escaso rendimiento reproductivo, elevado nivel de consanguinidad entre animales, alta concentración espermática en la monta natural, desperdicio de material genético, etc.

La Trehalosa, es un azúcar que se encuentra presente en numerosos organismos como bacterias, algas, levaduras, hongos, insectos invertebrados y plantas, los cuales presentan la característica de sobrevivir en casi total desecación, pudiendo soportar cambios de temperaturas y luego poder recuperar sus funciones vitales al rehidratarse.

De esta forma la Trehalosa es un buen estabilizante de las membranas, cuando se presentan rápidos cambios físicos y morfológicos por las variaciones de temperatura, los cuales ocurren durante el proceso de congelación, y al ser combinados con otros azúcares mejora la criopreservación de células vivas y alimentos.

La aplicación de métodos asociados con la biotecnología, para la crioconservación de semen bovino, hará que el mejoramiento genético de los animales se vea influenciado en los resultados finales; para un mejor desempeño de la calidad seminal, al no presentar ninguna alteración en la morfología de los espermatozoides antes y después de la conservación. Siendo así que tanto el vigor como la motilidad del semen antes y después del proceso de congelación se mantengan, para que la eficiencia al momento de la inseminación se vea reflejada en los resultados, al obtener crías de buena calidad genética, de acuerdo al propósito de la raza, lo que contribuirá al incremento de ingresos económicos, en beneficio de las explotaciones que utilizan estas biotecnologías.

En ésta investigación se evaluó el efecto de la Trehalosa en diferentes concentraciones en la crio-preservación de espermatozoides de machos Charolais y posteriormente la valoración físico, química y morfológica del semen, y de las células espermáticas. Por consiguiente se plantearon los siguientes objetivos:

- Evaluar la viabilidad espermática de semen fresco y descongelado de bovinos Charoláis con diferentes concentraciones de Trehalosa.
- Adicionar diferentes concentraciones de Trehalosa (25 y 50 mEq/l sol) para la criopreservación semen de bovinos Charoláis.
- Realizar un espermatograma para evaluar el comportamiento de los espermatozoides en el post-descongelado de semen.
- Determinar los costos al utilizar un diluyente con Trehalosa y un diluyente comercial.

CAPITULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1-1. ORIGEN DE LA RAZA CHAROLAIS

La raza Charolais es originaria de las regiones del centro oeste y sudoeste de Francia, en las antiguas provincias francesas de Charolles y de Niemen, en donde se observó por primera vez el ganado vacuno con una capa blanca. En los siglos XVI y XVII, fue conocido y aceptado en los mercados franceses. Hasta la actualidad no se conoce la genealogía de origen de estos animales (González, 2017, p. 1).

1.1. Características físicas del Charolais.



Fotografía 1.1. Bovino Charolais en la Provincia de Morona Santiago.

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

Los bovinos Charolais poseen un color blanco o blanco cremoso, la mayoría de los animales presentan cuernos, en la actualidad se realiza descorné en animales jóvenes para facilitar el manejo cuando son adultos, (Fotografía 1-1). Una de sus características más destacables es su musculatura, sumamente desarrollada, que se encuentra en las extremidades anteriores y posteriores siendo esta la más vistosa y también el lomo y dorso. (González, 2017, p. 1).

Con respecto a la selección de un toro apto para la reproducción, se debe tomar en cuenta varias condiciones entre las que tenemos: (Vajta & Kuwayama 2006, p. 24.)

Buena libido.

a. Buen estado clínico reproductivo.

b. Buena calidad espermática.

1.2. Características funcionales

El ganado Charolais en su mayoría son empleados para explotaciones intensivas, las hembras alcanzan buenos pesos en diferentes condiciones ambientales, van desde 560 a 950 Kg, mientras que los machos se destacan muy bien en cruzamientos, son de gran tamaño llegando a pesar entre 900 a 1250 Kg. La eficiencia reproductora la raza ha mostrado una tasa de preñez de 81 %, tasa de supervivencia de 96 %, así como una tasa de destete de 78 %. (González, 2017, p. 1).

Una de las cualidades más importantes en esta raza, es la cárnica, puesto que tiene una canal sin exceso de grasa de cobertura y una carne ligeramente veteadada, derivándose del charoláis una carne de primera, apreciada por el consumidor por su excelente, sabor, color y terniza. (Jaramillo, 2014, p. 23).

2-1. GANADERIA BOVINA EN MORONA SANTIAGO

2.1. Producción bovina y consumo per cápita.

Morona Santiago es la provincia que posee mayor masa ganadera registrada en la amazonia, con un número aproximado de 229.205 mil cabezas de ganado bovino, de los cuales 31.064 corresponden a ganado lechero, 2.821 bovinos Charolais y alrededor de 195.320 de ganado criollo. (Revista Asociación Charolais Morona Santiago, 2015, p 4.).

El Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (MAGAP) argumenta que la producción cárnica ecuatoriana de carne bovina es de alrededor de 200 mil toneladas métricas, lo que significa que nuestro país puede cubrir con satisfacción la demanda nacional de este producto. (MAGAP, 2017, 1).

El consumo per cápita de carne de res en Ecuador es bajo un estimado de 10 kg/persona/año, (ESPOL, 2016, p. 7). Mientras que el consumo de carne en países productores como en Brasil, Argentina y Estados Unidos es de 36, 63 y 26 kg/persona/año, respectivamente (Castillo, 2015, p. 2). En la actualidad la demanda de carne de alta calidad, es relativamente baja, posiblemente debido a la ausencia de información y conocimiento de los consumidores. (ESPOL, 2016, p. 7).

3-1. HISTORIA DE LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

La conservación de semen favorece el uso más eficiente y prolongado de los espermatozoides para programas de mejoramiento genético (Colas, 1984, p. 688). Los animales seleccionados son expuestos a períodos de intensa actividad, tolerando movimientos entre predios que conllevan a condiciones de estrés (transporte, cambios de ambiente y de alimentación, etc.), riesgo físico y sanitario, que en muchas ocasiones afectan la calidad seminal (Olivera *et al.*, 2005, p.2).

La inseminación artificial (IA) es el método de mejora genética de mayor difusión entre los ganaderos del mundo, la cual posee un gran impacto en el avance genético poblacional y un costo reducido (Brogliatti *et al.*, 2008, p. 1).

3.1. Difusión de la inseminación artificial

En 1926 en Dinamarca se fundó la primera asociación de inseminación artificial y comenzaron a investigar en bovinos, en 1938, J. Perry, nativo de Nueva Jersey, USA, estableció la primera cooperativa de inseminación artificial en el Colegio Estatal de Agricultura de Nueva Jersey (Felice *et al.*, 2012, p. 47).

En la década de 1940, el Comité de Industria Animal registró la raza Santa Gertrudis, como una nueva raza del resultado directo de la inseminación artificial en bovinos. Durante ese período, los científicos se dieron cuenta de que el semen recolectado de los toros podía ser guardado, congelado en una solución a base de yema de huevo que contenía antibióticos y químico. (Hernández *et al.*, 2004, p. 20)

En vacunos la inseminación se fue desarrollando lentamente a partir del uso de semen congelado. En 1958 nace en San Ramón, el primer ternero por inseminación artificial. A fines de la década del 60 con el uso de termos, la técnica comienza a tener mayor difusión. (Jaime, 2004, p. 1).

3.2 Avances en la inseminación artificial

Viabilidad espermática e integridad del acrosoma en semen congelado de toros nacionales.

En la evaluación de la membrana espermática e integridad del acrosoma como método para predecir la fertilidad en toros, se ha trabajado con cuatro toros (2 Hosltein y 2 Brown Swiss) del Banco Nacional de Semen, Lima-Perú. Se ha realizado la evaluación de integridad acrosomal y de membrana espermática, motilidad, espermatozoides vivos, volumen y concentración durante los procesos de refrigeración, congelación y descongelación de 10 eyaculados por animal. (Cabrera *et al.*, 2012, p. 1).

En donde, en el semen fresco sin diluir se ha obtenido un volumen de 4,33 ml, concentración espermática de $922,5 \times 10^6$ ml, y 78,5 % de espermatozoides vivos. La motilidad individual progresiva en semen diluido fue de 82,7 a 86,0 % con diferencia significativa entre toros ($p < 0,05$). En la integridad de acrosoma en semen refrigerado 59,3 a 69,2 % con diferencia estadística entre toros. (Cabrera *et al.*, 2012, p. 2).

El porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto se ha visto disminuido de 65,2 % en semen refrigerado a 48,6 % en semen congelado-descongelado, sin diferencias estadísticas entre toros. Siendo así que no se encontró una correlación significativa entre motilidad con integridad de membrana espermática o integridad de acrosoma. (Cabrera *et al.*, 2012, p. 3).

Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides de toros.

La integridad de la membrana plasmática (MP) y membrana acrosomal (MA) han sido dos de los parámetros de valoración seminal más estudiados por su rol preponderante como límite celular y por ser responsable de hacer efectivas las interacciones entre células, tanto en términos de integridad morfológica, como funcional. (Rubio *et al.*, 2009, p. 1).

El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de la criopreservación sobre el porcentaje de vitalidad (VIT), acrosomas dañados (DAR), y la integridad estructural y funcional de la MP y MA de espermatozoides provenientes de 5 eyaculados frescos y 5 pajuelas descongeladas de 4 toros mediante frotis teñidos con eosina-nigrosina. (Rubio *et al.*, 2009, p. 1).

La integridad funcional de estas membranas fue evaluada mediante los tests osmóticos (HOST y ORT). Todos los valores de calidad espermática estudiados fueron afectados significativamente por la criopreservación (VIT, DAR, ORT y HOST). (Rubio *et al.*, 2009, p. 1).

El proceso de congelación-descongelación causó un marcado efecto perjudicial sobre la integridad estructural y funcional de la MP y MA de los espermatozoides evaluados ($P < 0,05$). Sin embargo, se pudo demostrar como los espermatozoides resisten de manera diferente los efectos nocivos de la criopreservación. (Rubio *et al.*, 2009, p. 1).

Así mismo, el estudio confirma que el daño criogénico puede ocurrir indistintamente sobre la integridad estructural y funcional MP y MA, lo que afectaría la capacidad fecundante de las muestras seminales destinadas a Inseminación Artificial. (Rubio *et al.*, 2009, p. 1).

Efecto de la trehalosa en la fragmentación del ADN en el espermatozoide bovino.

La fragmentación del ADN del semen bovino diluido y refrigerado a 5-7°C, así también las variaciones que pueden observarse sobre el mismo indicador por efecto del agregado de trehalosa. Se realizó tres tratamientos: Control (temperatura ambiente). (Salinas, 2014, p. 2).

Refrigerado y Trehalosa. El análisis se lo hizo a través del tiempo, usándose como parámetros temporales: 0, 6, 12, 24, 48 y 72 horas. A través de este estudio se buscó conocer durante cuánto tiempo es posible utilizar una determinada muestra de semen refrigerado para un programa de inseminación artificial a tiempo fijo (IATF), sin que el ADN de la misma se vea deteriorado comprometiendo la tasa de concepción del mencionado programa. (Salinas, 2014, p. 2).

En cada tiempo y tratamiento se evaluó el nivel de fragmentación del ADN expresándose en forma de porcentaje. Los resultados obtenidos marcaron una tendencia ascendente para los tres tratamientos, mostrando diferencias significativas recién a partir de las 12 horas. (Salinas, 2014, p. 2).

En el tratamiento control a temperatura ambiente se observaron los mayores niveles de fragmentación mientras que en el tratamiento con trehalosa se observaron los niveles más bajos, en correlación con su acción criopreservante. (Salinas, 2014, p. 2).

4-1. HISTORIA DE LA CONGELACION DE SEMEN.

El primer reporte de criopreservación de semen, fue realizado por Spallanzani en el año de 1776, quien observó que cuando los espermatozoides humanos, caballo y rana eran enfriados en nieve hasta 30 minutos se volvían inactivos y podían ser reactivados a temperatura corporal 37 °C; la reducción de la temperatura fue empleada para deprimir la actividad metabólica y prolongar la vida activa del espermatozoide. (Bwanga, 1991, 431).

Un siglo después Mantegazza en 1866, observó que el espermatozoide de humano sobrevivió congelado a -17 °C, éste fue uno de los primeros reportes de recuperación de células de mamíferos después de haber sido expuestas a bajas temperaturas en un punto de congelación. (Bwanga, 1991, 431).

Algunos investigadores lograron recuperar espermatozoides de varias especies después de congelarlos en solución de glicerol como agente crioprotector. El gran descubrimiento de la acción crioprotectora del glicerol abrió una era exitosa en la criopreservación no solo de gametos de varias especies, sino también de otras células y tejidos. (Ávila *et al.*, 2006, p. 291).

Los reportes de fertilidad de toros con espermatozoides congelados, condujeron a un intenso desarrollo, en la siguiente década con métodos de criopreservación, que pudieran ser aplicados en programas de inseminación y mejorar la genética existente. (Ávila *et al.*, 2006, p. 291).

4.1 Criopreservación de semen.

La criopreservación es el proceso en el cual las células son congeladas a muy bajas temperaturas, generalmente entre - 80 °C y - 196 °C (punto de ebullición del nitrógeno líquido), para disminuir las funciones vitales de la célula u organismo y poderlo mantener en condiciones de vida suspendida, en cualquier actividad biológica por largos periodos de tiempo, incluidas las reacciones bioquímicas que producirían la muerte de una célula. (Ochoa, 2011, p.40).

La criopreservación es la interrupción del metabolismo por un tiempo determinado, durante el cual las células se encuentran en un estado de latencia. Los momentos más críticos y sensibles de la criopreservación es el momento de la congelación y descongelación. (Rivera, 2013, p. 2).

En esos momentos sucede una infinidad de procesos fisicoquímicos, manejados por las diferencias de temperatura y transporte de agua entre las células y el medio, consecuentemente,

es de esperar que cuando se utiliza inseminación artificial con semen congelado la fertilidad es menor en comparación a cuando se utiliza semen fresco. (Watson, 2000, p.92).

5-1. PRINCIPIOS BÁSICOS DE LA CRIOPRESERVACIÓN.

El objetivo principal de la criopreservación es mantener la viabilidad y funcionalidad celular por un período prolongado de tiempo, siendo necesario mantener el semen a temperaturas inferiores a -130 °C, consiguiendo así detener completamente los procesos metabólicos (Medeiros *et al.*, 2002, p. 327).

La criopreservación se efectúa básicamente dentro de una solución que otorgue propiedades físico-químicas favorables para la sobrevivencia durante la congelación y descongelación (Vila, 1996, p. 11). Cuando la suspensión alcanza temperaturas entre - 5 y - 10 °C se forman núcleos de hielo, que se distribuyen aleatoriamente en el medio extracelular. (Boiso, 2001, p. 1).

La membrana plasmática del espermatozoide constituye una barrera que detiene la formación de hielo dentro de la célula, mientras que 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 crio-concentración. (Boiso, 2001, p. 2).

5.1. Agentes crioprotectores (ACP).

Los crioprotectores son sustancias hidrosolubles y de baja toxicidad, que disminuyen el punto auténtico de una solución dada, en el cual la composición solidifica como un elemento puro. El descenso del punto auténtico implica que se alcanzará una concentración de solutos a una temperatura menor, de forma que la célula estará más deshidratada (Ávila *et al.*, 2006, p. 300).

Los crioprotectores difieren en la velocidad para penetrar los tejidos, el grado de protección al cristal del agua que contienen y la toxicidad química que pueden tener sobre las células. El grado de protección a las células está directamente vinculado al grado de asociación que tengan con el agua molecular. (Belascoain *et al.*, 2010, p. 10).

Los crioprotectores se dividen en dos categorías, permeables o intracelulares y los no permeables o extracelulares.

5.1.1. Permeables o intracelulares.

Son sustancias de bajo peso molecular y una mayor permeabilidad, que ayudan a atravesar la membrana plasmática, donde reemplazan el agua intracelular la cual tienen la función de evitar la formación intracelular de cristales de hielo, así como evitar la excesiva deshidratación causada por la congelación lenta (Aisen *et al.*, 2002, p.1806).

Entre los más utilizados se encuentran el glicerol, el etilenglicol y dimetilacetamida (DMA), siendo el glicerol el que ha mostrado mejores resultados en estudios de criopreservación en relación a la motilidad progresiva post-descongelado (Watson, 2000, p. 93).

La dimetilacetamida (DMA) como agente crioprotector, es utilizado en la criopreservación por su naturaleza altamente hidrofílica y su bajo tamaño molecular, el mismo que ha sido usado para espermatozoides de aves (Blanco *et al.*, 2000, p. 1168) y mamíferos como el koala y el canguro (Mc Clean *et al.*, 2008), siendo el agente crioprotector más usado en la criopreservación de espermatozoides de peces (Tiersch *et al.*, 2004, p 4. Vuthiphandchai *et al.*, 2009, p. 138. Yang *et al.*, 2010, p. 213).

5.1.2. No Permeables

Son sustancias de alto peso molecular muy útiles para la congelación rápida por su gran velocidad, ya que la acción crioprotectora está asociada con la actividad deshidratante y su interacción específica con la membrana fosfolipídica. Los productos más utilizados en la congelación de semen son: sacarosa, rafinosa, fructosa, trehalosa y lactosa, son azúcares que brindan un medio hipertónico causando la deshidratación celular antes de la congelación (Aisen *et al.*, 2002, p. 1805).

5.2. Descripción de Trehalosa.

La trehalosa, es un oligosacárido no reductor constituido por dos unidades de glucosa unidas por un enlace: α (11); es muy estable al calentamiento y al medio ácido, como se observa en la ilustración 1-1. (Ramos *et al.*, 2009, p. 4).

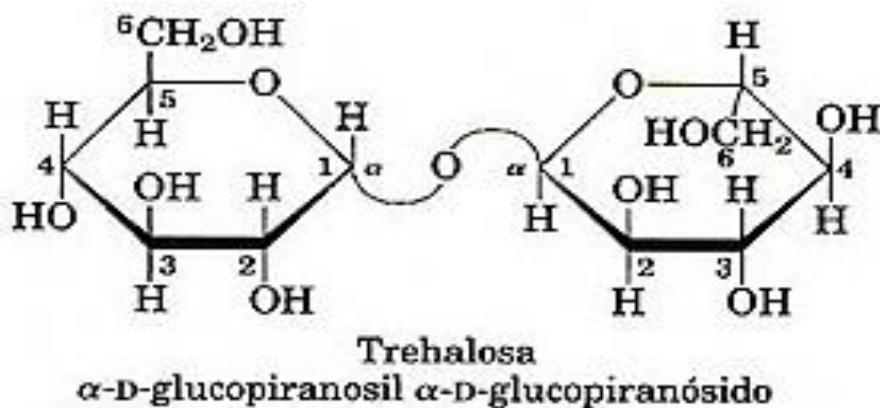


Ilustración 1-1. Estructura de la molécula de Trehalosa.

Este azúcar se encuentra presente en numerosos organismos como bacterias, algas, levaduras, hongos, insectos, invertebrados y plantas, los cuales tienen en común la propiedad de sobrevivir en estado de casi total desecación, pudiendo soportar condiciones extremas de altas o bajas temperaturas, salinidad, radiación y luego recuperar las funciones vitales al rehidratarse (Mascorro *et al.*, 2005, p. 195).

La trehalosa puede contribuir a la estabilidad de las membranas que parecen menos vulnerables a los rápidos cambios físicos y morfológicos que ocurren durante el rápido proceso de congelación, es así que en combinación con la sacarosa mejoran la criopreservación de semen bovino criopreservados en un medio conformado por tris y yema de huevo. (Woelders *et al.*, 1997, p. 105).

La trehalosa cuenta con la propiedad de interactuar con los lípidos de membrana, limitando la fase de transición, al ser un azúcar que no provee a los espermatozoides de fuente de energía, actúa a nivel extracelular manteniendo la presión osmótica y la integridad de membrana, y por tales motivos, podría ser útil para el almacenamiento de semen. (Stornelli *et al.*, 2005, p. 55).

La trehalosa promueve la deshidratación celular, reduciendo el efecto negativo del flujo de agua de la membrana durante la congelación y la formación de cristales de hielo. (Yildiz *et al.*, 2000, p. 85).

6-1. ESPERMATOGÉNESIS

Es el proceso biológico de la transformación de las células germinales en espermatozoides en los túbulos seminíferos de los testículos. Este proceso se realiza por divisiones mitóticas, como

la duplicación de cromosomas, recombinación genética, reducción y división meiótica, hasta producir espermátides haploides y la diferenciación terminal de las espermátides. (Knobil, 2003, p. 20).

La espermatogénesis incluye dos fases, la espermatocitogénesis, en la cual las espermatogonias sufren división celular hasta transformarse en espermátides y la espermiogénesis, en la que las espermátides sufren cambios morfológicos progresivos y se transforman en espermatozoides, como se observa en la ilustración 2-1. (Hafez, 2000, p. 48).

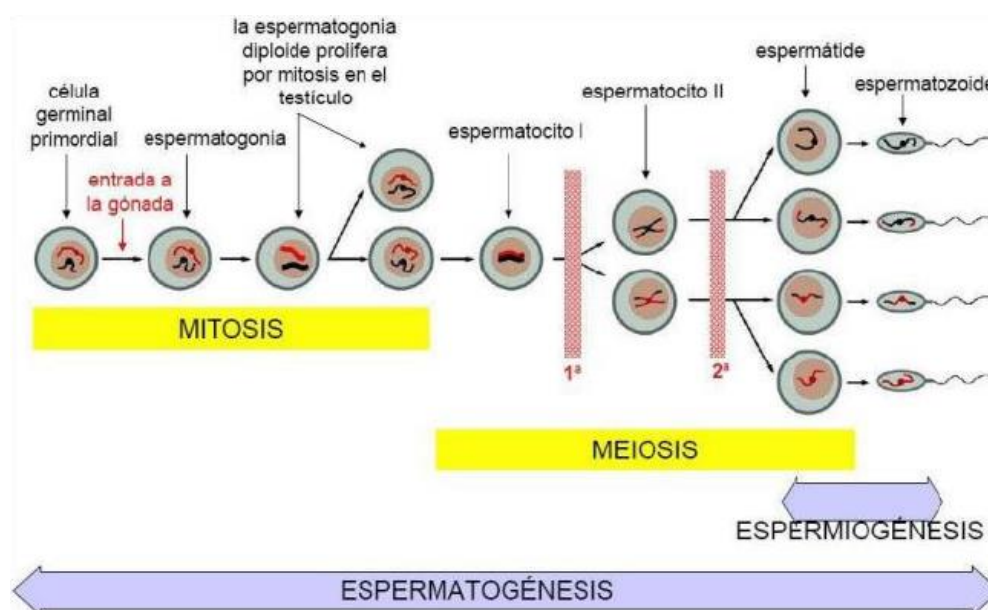


Ilustración 2-1. Proceso de la Espermatogénesis.

Fuente: Navarro, 2018.

6.1. Efectos dañinos de la criopreservación sobre el espermatozoide.

Si bien la criopreservación garantiza la supervivencia de los espermatozoides, una elevada y variable proporción del proceso de congelación - descongelación afecta la integridad de la membrana plasmática (MP) y acrosomal (MA), por tanto en lo referente a la morfología como a la funcionalidad, lo cual suele ocasionar daños irreversibles y causar muerte celular e infertilidad. (Rubio *et al.*, 2009, p. 6).

Actualmente la técnica de congelación se ha estandarizado y el semen se almacena indefinidamente en nitrógeno líquido a $-198\text{ }^{\circ}\text{C}$, manteniendo una fecundación aceptable en las tasas de fertilización luego de la descongelación. (Chaverio *et al.*, 2006, p. 1876).

La reducción de la capacidad fecundante está relacionada a dos razones puntuales, una baja viabilidad posdescongelación y un trastorno subletal en una proporción de espermatozoides sobrevivientes. La baja viabilidad se debe a factores como: cambio de temperatura, 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. 93).

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 que la permeabilidad de la membrana aumenta después del congelamiento. (Watson, 2000, p. 94).

La regulación de calcio es claramente afectada y altera la función celular. En casos severos, es incompatible con la viabilidad celular. 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. (Bailey *et al.*, 2000, p. 2).

Una de las principales características de los espermatozoides criopreservados es la disminución de la proporción de células móviles. La motilidad post-descongelamiento se reduce a valores entre 40 a 50 %. (Molinia *et al.*, 1994, p. 115).

Los espermatozoides en semen fresco (8 % -24 %) tienen membranas plasmáticas débiles o con fugas y se someten a fragmentación durante la congelación y descongelación de los procesos, lo que resulta en una disminución de su número. (Morillo *et al.*, 2012, p. 28).

6.2. Procesos metabólicos de los espermatozoides.

La energía requerida para la motilidad proviene de reservas intracelulares de Adenocin Tri-fosfato (ATP) cuyo empleo está regulado por la concentración endógena del monofosfato de adenosina cíclico (AMPC), compuesto que también interviene directamente sobre la motilidad de los espermatozoides (Hoskins& Casillas, 1973, p. 454).

Los espermatozoides degradan los azúcares, glucosa, fructosa, ácido láctico bajo condiciones anaerobias. Esta actividad glucolítica o más correctamente fructolítica, dado que la fructosa es el principal azúcar del semen, permite a los gametos sobrevivir en las condiciones anaerobias,

característica que es importante de considerar durante el almacenamiento para fines de inseminación artificial. (Garner & Hafez, 2000, p. 56).

El espermatozoide utiliza una variedad de sustratos en presencia de oxígeno, cadena respiratoria que le permite emplear el lactato y el piruvato resultantes de la fructólisis de los azúcares, generando dióxido de carbono y agua. Esta vía oxidativa, que se localiza en las mitocondrias, es mucho más eficiente en producir energía. (Garner y Hafez, 2000, p. 57).

Aunque gran parte del ATP, es empleado como fuente de energía para la actividad de motilidad espermática, parte de ésta es destinada al mantenimiento de la integridad de los procesos que intervienen en el transporte activo que se dan a nivel de las membranas del espermatozoide, procesos de transporte activo cuya función es la de mantener la concentración de los componentes iónicos vitales para la célula espermática. (Garner y Hafez, 2000, p. 57).

De existir ausencia de sustratos exógenos para generar energía (White, 1980, p. 25), los espermatozoides hacen uso de sus reservas intracelulares de plasmalógeno, pero siendo útil sólo a corto plazo.

7-1. CRIOPRESERVACION DE SEMEN

La criopreservación del semen es la técnica más antigua y que más se ha difundido, con el empleo de la Inseminación Artificial como parte de la reproducción asistida, la refrigeración del espermatozoide es un método sencillo que de manera exitosa ha permitido ampliar el tiempo de viabilidad del espermatozoide, reduciendo la tasa metabólica y por lo tanto prolonga la supervivencia de las células. (Serrano, 2016, p. 4).

La crioconservación es una técnica mediante la cual el material biológico puede ser mantenido viable por tiempo indefinido (Ramos, 2013, p. 47) por medio de la congelación de la célula espermática a muy bajas temperaturas -196 °C.

La criopreservación genera una disminución en su metabolismo celular hasta una etapa de inactividad celular (Watson, 2000, p. 92), permitiendo de este modo mantener la biodiversidad y asegurar la conservación física de la especie (Cloud *et al*, 1990, p. 23).

Un criopreservante debe proveer a la célula una serie de características: proporcionar nutrientes como fuente de energía; protección del efecto perjudicial del enfriamiento rápido; propiciar taponamiento para evitar variaciones del pH, mantener la presión osmótica y el equilibrio electrolítico apropiado; inhibir el crecimiento bacteriano; proteger a la células espermáticas durante a congelación. (Ramos, 2013, p. 25).

Un gran número de protocolos de congelación se han desarrollado, principalmente a las diferencias observadas entre especies, como respuesta a las tasas de congelación y descongelación empleadas, las técnicas y procedimientos actuales deben ser validados empleando el semen de la especie de interés, para de esta forma lograr su conservación a largo plazo sin afectar significativamente su capacidad fecundante. (Woelders *et al.*, 1997, p. 105).

Varias tasas de enfriamiento y descongelación han sido ensayadas en la crioconservación seminal de diferentes especies sin poder determinar con exactitud una curva estándar. (Hochi, 1996, p. 47). Se debe principalmente a los resultados que dependen de factores tales como el diluyente, el crioprotector usado y el sistema de empaque; así como también de la calidad seminal, parámetro altamente variable entre individuos. (Landsverk, 2000, p. 138)

7.1. Métodos de criopreservación

De acuerdo a la velocidad de enfriamiento y descongelación los métodos de congelación se pueden clasificar en protocolos de congelación lenta con descongelación rápida; congelación rápida con descongelación lenta; congelación ultrarrápida y vitrificación (Boiso, 2001, p. 1).

Por otro lado la descongelación lenta se lleva a cabo también mediante el uso del congelador programable, mientras que la descongelación rápida se hace a temperatura ambiente o en un baño maría a 30°C, para evitar la recristalización (Boiso, 2001, p. 3), como se aprecia en la tabla 1.1 y las curvas de congelación en las ilustraciones 3.1 y 4.1.

La congelación ultrarrápida se utiliza generalmente para la congelación de embriones, (Trounson, 1986, p. 5). La cual implica la rápida deshidratación celular, utilizando altas concentraciones de crioprotector, seguida de la inmersión en nitrógeno líquido, mientras que la vitrificación (Rall & Fahy, 1985, p. 67) se basa en la congelación rápida en una mezcla de crioprotectores utilizados en muy altas concentraciones que a bajas temperaturas aumentan su viscosidad formando un vidrio, sin formación de hielo.

7.2. Protocolos para congelación de semen

Tabla 1-1. Protocolo estándar para congelación de semen bovino.

	Tasa de la rampa de la refrigeración	Temperatura de equilibrio	Tiempo de equilibrio	Tasa de rampa de congelación 1	Temperatura inicial de rampas de congelación 2	Tasa de rampa de congelación 2	Temperatura final de congelación
Bovino 1	- 0,25 °C /min	+ 5 °C	120 min.	- 5 °C/min.	- 20 °C	- 15 °C/min	- 100 °C
Bovino 2	- 0,25 °C /min	+ 5 °C	180 min.	- 5 °C/min.	- 20 °C	- 15 °C/min	- 100 °C
Bovino 3	- 0,25 °C /min	+ 4 °C	120 min.	- 5 °C/min.	- 20 °C	- 20 °C/min	- 100 °C
Bovino 4	- 0,50 °C /min	+ 5 °C	180 min.	- 5 °C/min.	- 20 °C	- 30 °C/min	- 100 °C
Bovino 5	- 0,40 °C /min	+ 5 °C	90 min.	- 5 °C/min.	- 20 °C	- 30 °C/min	- 100 °C
Bovino 6	- 0,30 °C /min	+ 4°C	120 min.	- 10 °C/min	- 20 °C	- 15 °C/min	- 100 °C

Fuente: Manual de instrucciones CRYGEN HSE portátil. 2017.

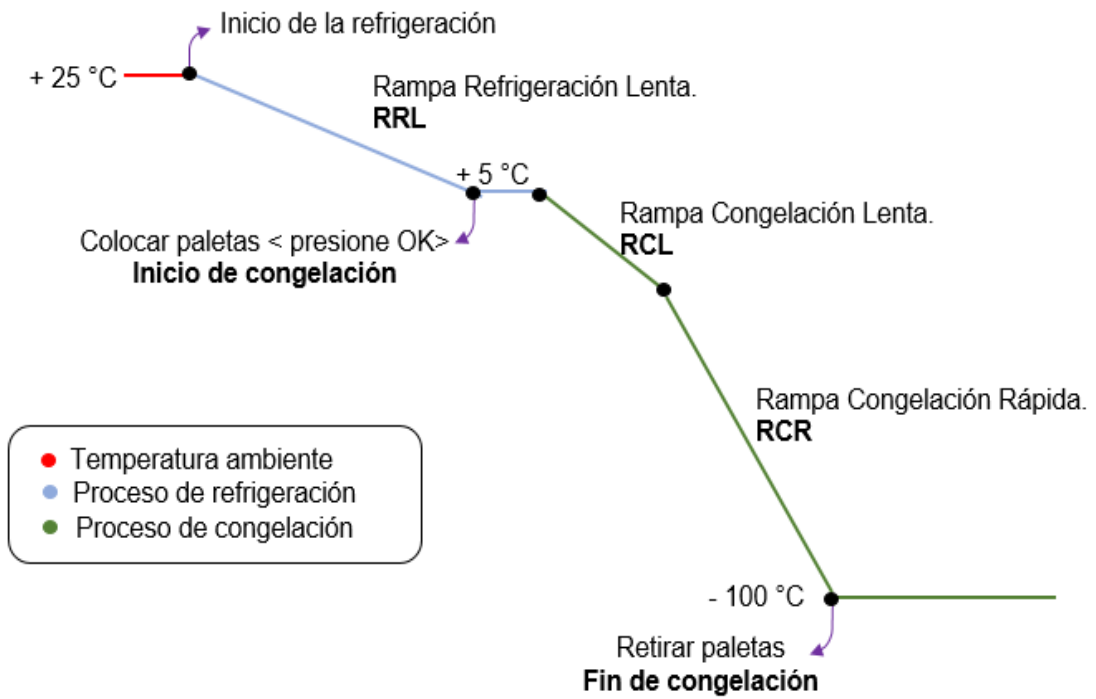


Ilustración 3-1. Paso para congelación TWO-STEP.

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

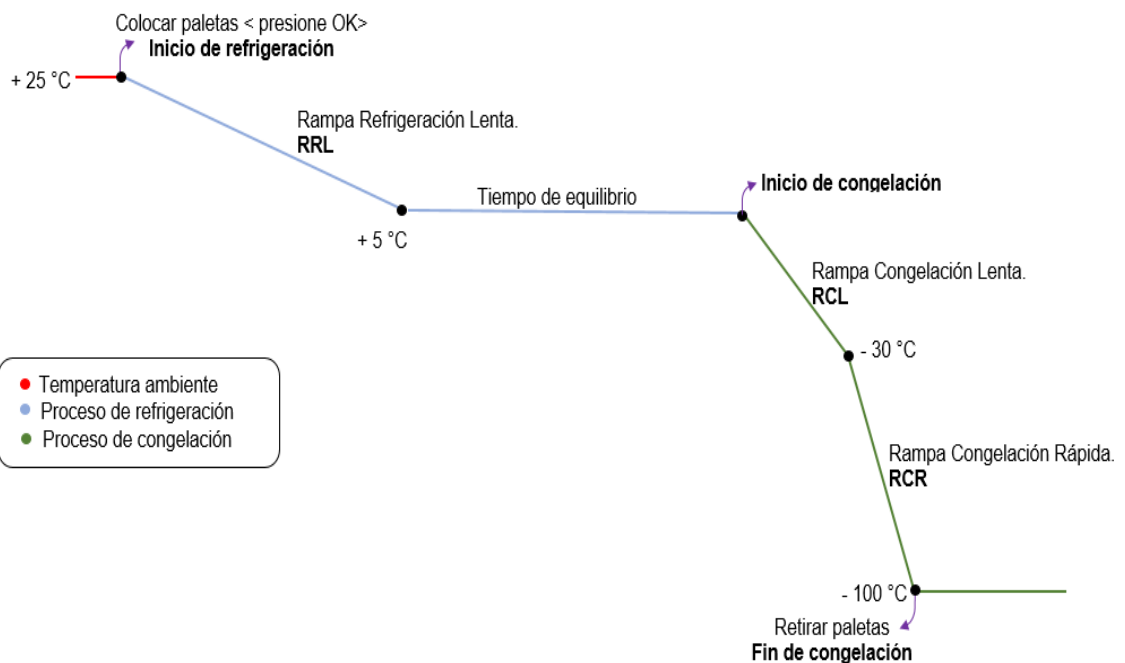


Ilustración 4-1. Paso para congelación ONE-STEP.

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

8-1. DILUYENTES DE SEMEN

El diluyente que generalmente se agrega para la congelación debe contener TRIS (buffer), sustancias iónicas o no iónicas que mantengan la osmolalidad del medio (TRIS), una fuente de lipoproteína de alto peso molecular (yema de huevo o leche descremada), una fuente de energía como fructosa o glucosa, y un crioprotector. (Jiménez, 2010, p. 34).

Los diluyentes por lo general puede tener dos presentaciones: en el caso de una fracción el glicerol viene al 7%, solo se añade el diluyente al semen lo más rápido posible, cuando son dos fracciones, una fracción es simplemente buffer (Fracción A) y la otra contiene el crioprotector que generalmente es glicerol al 14% (fracción B), hay que tomar en cuenta que la primera fracción se debe añadir a temperatura ambiente y la segunda fracción a 4 - 5 °C. (Jiménez, 2010, p. 34).

Una vez diluido el semen debe empezar una curva de frío lenta para que éste llegue a 5 °C en un lapso de 2 horas, una vez se ha logrado los 5 °C, se debe añadir la fracción B, se añade a la misma temperatura, para que inicie el periodo de equilibrio que puede durar de 2 - 24 horas y se realiza a 5 °C, en este periodo el crioprotector penetra las membranas del espermatozoide, para protegerlo de los daños que se pueden generar durante la congelación y descongelación. (Jiménez, 2010, p. 34).

Una vez alcanzado el equilibrio, se congela el semen con vapores de nitrógeno líquido (-120 °C) por un lapso de 10 minutos y luego se sumergen las pajillas en el nitrógeno líquido para ser almacenado en el termo crioprotector. (Jiménez, 2010, p. 34).

8.1. Diluyentes comerciales

Un diluyente es una solución acuosa que permite el aumento del volumen de eyaculado, se debe manejar las dosis adecuada que ayudará a preservar las características funcionales de las células espermáticas y mantener el nivel de fertilidad adecuado (Gadea, 2003, p. 1).

Un diluyente comercial se encuentra compuesto de:

8.1.1. *Tris o Hidroximetil amino metano*

Es un elemento buffer por excelencia que compone cualquier tipo de diluyente, es el nombre abreviado del compuesto orgánico conocido como tris amino metano, se utiliza ampliamente en

bioquímica y biología molecular, en particular para preparar disoluciones tampón. (Newth, 1999, p. 5).

8.1.2. *Ácido cítrico*

Esta poderosa sustancia posee propiedades conservantes, es fácilmente soluble en agua, éter y etanol, posee propiedades antioxidantes, además de ser un regulador de la acidez. (QuimiNet, 2013, p. 1).

8.1.3. *Fructosa*

La fructosa es una fuente de energía para las células, las cuales la procesan para obtener energía a través de un proceso llamado respiración aeróbica, que significa la quema de fructosa en las mitocondrias en presencia de oxígeno para producir ATP, la molécula de energía celular. (Pérez, 2017, p. 2).

8.1.4. *Yema de huevo*

Las propiedades a través de las lipoproteínas, fosfolípidos y lecitinas, aportan protección. Deben ser huevos del día (con menos de 24 horas de puesto, se los lava con agua jabonosa, se los sumerge 5 minutos en alcohol y se les saca la yema). (Serrano, 2016, p. 3).

8.1.5. *Glicerol*

Posee un aspecto de líquido viscoso, no tiene color, pero si un olor característico, además de un sabor dulzón, es un compuesto higroscópico, lo que quiere decir que tiene la capacidad de ceder o absorber la humedad presente en el medio ambiente que lo rodea, es fácilmente soluble en agua, y se descompone en ebullición, además es anticongelante. (Méndez, 2010, p. 1).

8.1.6. *Tilosina*

Es un antibiótico que actúa frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas, su acción se realiza interfiriendo la producción de proteínas. (Vecol, 2018, p. 35).

8.1.7. *Gentamicina*

Es un antibiótico amino-glucósido de amplio espectro. Actúa sobre bacterias gramnegativas aerobias, incluyendo enterobacteriáceas, también actúa sobre estafilococos. (Vecol, 2018, p. 35).

8.1.8. *Estreptomicina*

Antibiótico indicado en el tratamiento de las infecciones bacterianas, actúa sobre bacterias Gram negativas y algunas Gram positivas. (Vecol, 2018, p. 35).

8.1.9. *Agua destilada*

Es aquella en cuya composición, se le han eliminado las impurezas e iones mediante destilación, la conductividad del agua destilada es casi nula, carece de muchos iones que producen la conductividad, habitualmente cloruros, calcio, magnesio y fluoruros. (Pérez, *et al.*, 2015. P 2).

8.2. Diluyentes no comerciales.

8.2.1. *Yema de huevo*

Las propiedades a través de las lipoproteínas, fosfolípidos y lecitinas, aportan protección. Deben ser huevos del día (con menos de 24 horas de puesto, se los lava con agua jabonosa, se los sumerge 5 minutos en alcohol y se les saca la yema). (Serrano, 2016, p. 3).

8.2.2. *Glicerol*

Posee un aspecto de líquido viscoso, no tiene color, pero sí un olor característico, además de un sabor dulzón, es un compuesto higroscópico, lo que quiere decir que tiene la capacidad de ceder o absorber la humedad presente en el medio ambiente que lo rodea, es fácilmente soluble en agua, y se descompone en ebullición, además es anticongelante. (Méndez, 2010, p.1).

8.2.3. *Trehalosa*

Es muy resistente a la congelación, es crioprotector ayuda a evitar la formación de cristales, sobre todo en presencia de proteínas. (García, 2012, p. 1).

8.2.4. *Tris (Tham)*

Es un elemento buffer por excelencia que compone cualquier tipo de diluyente, es el nombre abreviado del compuesto orgánico conocido como tris amino metano, se utiliza ampliamente en bioquímica y biología molecular, en particular para preparar disoluciones tampón. (Newth, 1999, p. 5).

8.2.5. Fructosa

La fructosa es una fuente de energía para las células, las cuales la procesan para obtener energía a través de un proceso llamado respiración aeróbica, que significa la quema de fructosa en las mitocondrias en presencia de oxígeno para producir ATP, la molécula de energía celular. (Pérez, 2017, p. 2).

8.2.6. Ácido cítrico

Esta poderosa sustancia posee propiedades conservantes, es fácilmente soluble en agua, éter y etanol, posee propiedades antioxidantes, además de ser un regulador de la acidez. (QuimiNet, 2013, p. 1).

8.2.7. Agua destilada

Es aquella en cuya composición, se le han eliminado las impurezas e iones mediante destilación, la conductividad del agua destilada es casi nula, carece de muchos iones que producen la conductividad, habitualmente cloruros, calcio, magnesio y fluoruros. (Pérez *et al.*, 2014, p. 2).

8.2.8. Penicilina

Es un antibiótico que ayuda a combatir un amplio espectro de bacterias, entre ellas diplococos, estreptococos, estafilococos, pseudomonas y hemophilus y neisserias. (Fernández, 2013, p. 1).

8.2.9. Estreptomina

Antibiótico indicado en el tratamiento de las infecciones bacterianas, actúa sobre bacterias Gram negativas y algunas Gram positivas (Vecol, 2018, p. 35).

9-1. EVALUACIÓN DEL SEMEN

Es un punto muy importante para la mejora genética de los animales y certificar la aptitud reproductiva en un toro para conocer las características tanto genéticas como conductuales que transmitirá a su progenie. (Vajta & Kuwayama, 2006, p. 24).

9.1. Características Macroscópicas.

9.1.1. Volumen

El volumen del eyaculado se determina en recipientes calibrados en mililitros (ml). Los bovinos, en condiciones normales presentan un buen volumen eyaculado, al estar conformado por una fracción rica en espermatozoides; los cuales son almacenados en la cola del epidídimo, junto con las secreciones de las glándulas prostáticas y bulbouretrales; y la fracción pobre que está formada principalmente por gel seminal procedente de las glándulas vesiculares (Samper, 2009, p. 5).

Cuando los toros se encuentran en un programa de colecciones con vagina artificial, como en los centros de inseminación artificial, la densidad y el volumen del eyaculado puede proveer alguna información en cuanto a la capacidad de producción de espermatozoides. No obstante cuando se colectan varios milímetros de un semen concentrado con razonable facilidad se puede inferir que el toro en cuestión, es capaz de producir buenos eyaculados. (Tribulo *et al.*, 2014, p. 24).

9.1.2. Color

El semen posee una coloración blanquecina o ligeramente amarillenta y su opacidad está en función de la concentración espermática.

Los eyaculados muy buenos con apariencia granulosa tienen una concentración de 750 a 1.000 millones o más de espermatozoides por mililitro, eyaculado de buena calidad seminal y coloración lechoso con 400 a 750 millones de espermatozoides por ml, un semen regular es como leche aguada con 250 a 400 millones de espermatozoides por ml y el malo, es un semen translúcido y acuoso con menos de 250 millones de espermatozoides por ml. (Hajarian, *et al.*, 2011, p. 4).

9.1.3. Olor

El semen fresco de toro tiene un olor típico producto de la espermia, por lo general es un poco dulzón, recordando el de leche fresca; muchas veces se encuentra enmascarado por el olor típico del animal mismo y de la cavidad prepucial. El olor a orina es indeseable, así como el olor pútrido ya que confirman enfermedades del testículo y de las glándulas sexuales accesorias. (González *et al.*, 2011, p. 3).

9.1.4. Aspecto

Se realiza con el fin de determinar las células con movimiento flagelar del total de espermatozoides del eyaculado obtenido, observados en diferentes campos de placa puesta en el microscopio, (Rodríguez, 2012, p. 37), como se puede observar en la Tabla 2-1.

Tabla 2-1. Aspecto de los espermatozoides vistos en el microscopio.

ASPECTO	CALIFICACIÓN	RANGOS DE CONCENTRACIÓN
Cremosa	Muy buena	Mayor a 750×10^6
Lechosa	Buena	400 a 750×10^6
Blanquecina lechosa	Regular	250 a 400×10^6
Traslúcida	Mala	Menor a 200×10^6

Fuente: Jiménez, C. 2013.

9.1.5. pH .

La evaluación inmediatamente después de la recogida seminal se lo realiza con pHmetro, que ayudará en la toma de valor. El pH bovino oscila entre 6,4 - 7,8 el cual está inversamente relacionado con la concentración espermática, el metabolismo espermático acidifica el medio, y presencia de sustancias contaminantes como la orina y procesos inflamatorios le dan valores más altos. (Gómez & Cuétara, 2011, p. 4).

9.2. Características Microscópicas

9.2.1. Motilidad masal

La determinación de las motilidad masal se hace utilizando una gota de semen fresco de 5 a 10 mm de diámetro, colocada sobre un porta objeto tibio y sin cubre objeto. (Tribulo *et al.*, 2014, p 47).

La observación se realiza bajo un campo luminosos con un aumento de 40 - 125x. El movimiento en masa depende de tres factores: concentración, porcentaje de células con movimientos progresivos y velocidad de los espermatozoides, por lo tanto cuando las muestras están diluidas no habrá motilidad en onda y se evaluarán la motilidad individual directamente. (Tribulo *et al.*, 2014, p. 48).

Los espermatozoides de mamíferos adquieren la capacidad de movimiento durante el transporte por el epidídimo. (Yanagimachi *et al.*, 1981, p. 518).

La motilidad flagelar es estimulada tras la eyaculación y se modula durante el tránsito del espermatozoide a través del aparato reproductor de la hembra, este tránsito implica cambios secuenciales importantes en los patrones de movimiento espermático, mostrando diferencias en cuanto a la longitud de la onda flagelar (movimiento asimétrico) o cambios en el desplazamiento lateral de la cabeza. (Yanagimachi *et al.*, 1981, p. 518).

La escala se clasifica de 1 a 4, en donde 1 corresponde al semen que no presenta ondas y 4 cuando las ondas se mueven formando remolinos, (Muiño, 2008, p. 57), se presenta en la Tabla 3-1.

Tabla 3-1. Clasificación de la motilidad masal en eyaculados bovinos.

VALOR DESCRIPTIVO	ASPECTO DE MOTILIDAD
Muy buena	Movimientos en ondas vigorosas y en remolinos rápidos.
Buena	Remolinos y ondas más lentas.
Regular	Sin remolinos, pero con oscilaciones generalizadas.
Mala	Escasa o ninguna motilidad.

Fuente: Bury. 1998.

9.2.2. *Motilidad individual*

La observación de la motilidad individual y la estimación del porcentaje de células con movimiento progresivo nos da información de integridad de la membrana del espermatozoide, así como también de la calidad morfológica de los espermatozoides. (Tríbulo *et al.*, 2014, p. 68).

Para la observación de la motilidad individual son necesarios porta y cubreobjetos nuevos, limpios y tibios, una gota de semen de 3 - 4 mm, es suficientemente grande para que el fluido se extienda apenas hasta el borde del cubreobjetos formando una fina capa en donde los espermatozoides se encuentran todos en un mismo plano focal, la motilidad debe ser examinada con un aumento de 200 - 500x, preferentemente bajo contraste de fase. (Tríbulo *et al.*, 2014, p. 68).

La motilidad individual es el resultado de la evaluación del movimiento progresivo de los espermatozoides y de los cambios en su motilidad. Este seguimiento se hace en una superficie de 1 mm² y una altura de 0.1 mm los resultados se expresan en porcentaje o en una escala de 1 a 5. (Bavera & Penafort 2011, p 1), como se aprecia en la Tabla 4-1.

Tabla 4-1. Escala basada en el porcentaje de células móviles.

VALOR DESCRIPTIVO	CÉLULAS MÓVILES %
Muy buena	80-100% de células móviles.
Buena	60-79% de células móviles.
Regular	40-59% de células móviles.
Mala	Menos 40% de células móviles.

Fuente: Tomado de: “Pruebas de Calidad de Semen” por HOZBOR 2011.

La motilidad permite predecir la fertilidad o habilidad para congelar, ya que la motilidad post-descongelación es frecuentemente usada para ajustar la concentración de espermatozoides por pajilla, cuando el semen se designa para Inseminación Artificial la motilidad progresiva también puede ser evaluada siguiendo la velocidad de movimiento o grado de movimiento y se hace bajo la siguiente escala. (Vera, 2011, p. 13.). Observar tabla 5-1.

Tabla 5-1. Escala basada en la velocidad de movimiento de las células móviles.

VALOR DESCRIPTIVO	VELOCIDAD DEL MOVIMIENTO
0	Sin movimiento.
1	Leve movimiento de cola sin desplazamiento progresivo.
2	Lento movimiento de cola con algo de movimiento progresivo.
3	Movimiento progresivo a velocidad lenta.
4	Movimiento progresivo rápido.
5	Movimiento progresivo rápido donde es difícil de seguir la célula determinada.

Fuente: Tomado de: “Pruebas de Calidad de Semen” por HOZBOR. 2011.

9.2.3. Concentración

Concentración, al igual que el volumen, presenta una gran variabilidad y está fuertemente influida por un mayor número de variables, entre ellas, tamaño testicular, método de recogida (completa o fraccionada), edad de los sementales o la raza (Dowsett & Knott, 1996, p. 398).

9.2.3.1. Método Manual (hemocitómetro o cámara de Neubauer).

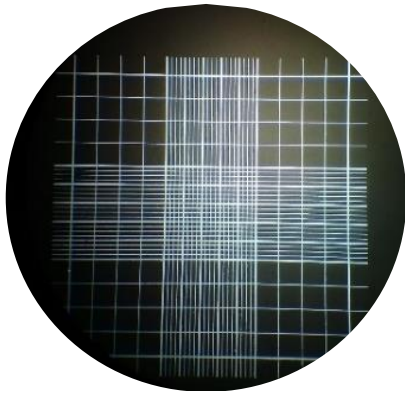
Se trata de una gruesa placa de cristal con forma de portaobjetos, de unos 30 x 70 mm y unos 4 mm de grosor, (fotografía 2-1). En una cámara simple, la porción central, que es donde se realiza el conteo, está dividida en 3 partes. (Dowsett & Knott, 1996, p. 398).



Fotografía 2-1. Cámara de Neubauer.

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

En la parte central se encuentra grabada una retícula cuadrangular. En el caso de cámaras dobles, que son las más comunes, existen 2 zonas de conteo, una superior y otra inferior al eje longitudinal de la cámara. Como se aprecia en la fotografía 3-1.



Fotografía 3-1. Cámara de Neubauer mirada en el microscopio con lente de 40x.

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

9.2.4. Determinación de células vivas y muertas.

Los espermatozoides son traslucidos y virtualmente invisibles al microscopio de luz directa, es por ello que se requiere el uso de colorantes o la provisión de fondos oscuros para ser visualizados, la técnica de tinción en un solo paso, donde se mezcla el colorante con el espermatozoide sobre un porta objeto, es la más recomendada puesto que de esta forma se puede observar a los espermatozoides. (Tribulo *et al.*, 2014, p. 74).

La eosina penetra la membrana de las células dañadas tiñendo las lesiones y los espermatozoides no viables de rosa (células muertas), mientras que las células viables repelen la eosina y aparecen traslucidas (células vivas), para la concentración muy buena, buena, y regular el tamaño de la gota de semen deberá ser de 3 a 5 mm., esto resultará en una cantidad de 15 a 25

espermatozoides por campo el cual es ideal para la cuenta de células vivas y muertas. (Tríbulo *et al.*, 2014, p. 74).

La evaluación de la morfología espermática se debe hacer con un objetivo de 1000 - 1250 aumentos y con aceite de inmersión, cuando hay pocas anomalías espermáticas, es suficiente contar 100 espermatozoides, cuando encontramos gran cantidad de anomalías es recomendable contar 300 o más células (Tríbulo *et al.*, 2014, p. 74).

9.2.5. Daños de la membrana.

La integridad de la membrana espermática ha sido uno de los parámetros más estudiados, por su papel clave en la función espermática. De hecho, el estado de la membrana espermática marca la integridad morfológica y funcional de la célula. (Garner *et al.*, 2000, p. 35).

La evaluación morfológica se realiza usando la óptica de contraste diferencial de interferencia, la óptica de contraste de fase o las tinciones supravitales como el verde rápido/eosina, la eosina/azul de anilina, el azul tripan/giemsa o el amarillo de naftol/eritrocina. (Garner *et al.*, 2000, p. 35).

Tinción eosina-nigrosina: la proporción de espermatozoides vivos pueden ser determinados por el uso de técnicas de tinción basados en el cual la membrana de células dañadas o muertas pueden tomar algunos colores. (Garner *et al.*, 2000, p. 35).

9.2.5.1. Morfología espermática

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 (Garner *et al.*, 2000, p. 35).

La cabeza del espermatozoide contiene cromatina muy compacta. La cromatina condensada consiste en un complejo formado por ADN y una clase especial de proteínas básicas llamadas protaminas espermáticas. El contenido de ADN nuclear es haploide, dicho núcleo posee la mitad de cromosomas que el núcleo de las células somáticas de la misma especie (Garner *et al.*, 2000, p. 35). La cola espermática está formada por el cuello y los segmentos medio, principal y caudal. La región de la cola comprendida entre el cuello y el anillo citoplasmático es el segmento medio.

El centro de este segmento medio, junto con toda la longitud de la cola, constituye el axonema. Este se compone de nueve pares de microtúbulos dispuestos radialmente alrededor de los filamentos centrales (Ilustración 5-1). El axonema y las fibras densas que lo rodean están cubiertos periféricamente por numerosas mitocondrias dispuestas en un patrón helicoidal (vaina mitocondrial) (Garner *et al.*, 2000, p. 35).

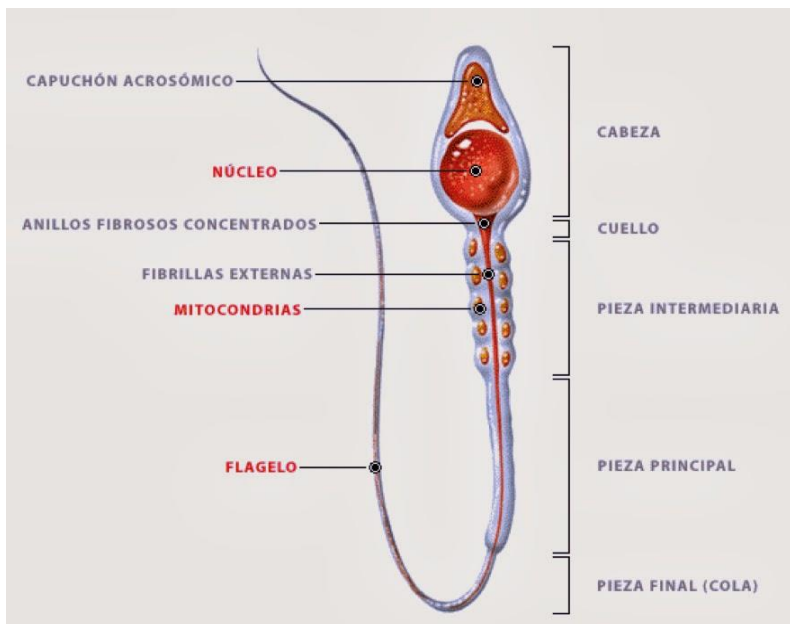
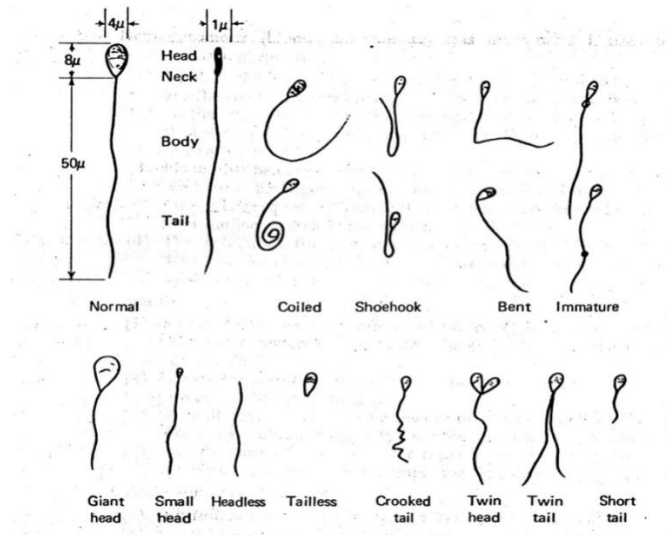


Ilustración 5-1. Estructura del espermatozoide bovino.

Fuente: Gimeno, M. 2014.

9.2.5.2. Anormalidades del espermatozoide

Las anomalías espermáticas se pueden observar en los animales tanto jóvenes como adultos los cuales se presentan en la cabeza, cuello, pieza intermedia y parte principal de la cola como se aprecia en la fotografía 4-1.



Fotografía 4-1. Morfología espermática.

Fuente: Laboratorio de biotecnología de la reproducción. FCP, ESPOCH. 2018.

Muchas de las alteraciones de este tipo son menos frecuentes de lo que se piensa, pudiendo presentarse algunas por errores de la técnica de coloración o manipulación de la muestra de semen, que pueden prestar a la confusión, en animales bovinos, las cabezas pueden presentar formas más alargadas y delgadas, considerándose esto como no patológico. (Garner *et al.*, 2000, p. 35).

El número máximo de anomalías de cabeza aceptable se encuentra entre un 15 y un 20%. Con respecto a las anomalías de acrosoma y cola se puede aceptar hasta un 25%. Sea cual sea el sistema de clasificación, en ninguno de los casos se debe esperar un mínimo de 70% de espermatozoides normales, en el eyaculado para poder aceptar un toro como apto reproductivo en cuanto a su semen, tanto para rodeo general, como para congelar (Gómez, 2011, p. 4).

10-1. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE SEMEN

10.1. Vagina artificial

La vagina artificial es 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 del bovino. (Morillo *et al.*, 2012, p. 28).

10.1.1. Procedimiento para la extracción del semen mediante la vagina artificial

Para la monta se utiliza una vaca, un macho o un maniquí. Antes de colectar el semen se debe tener en cuenta dos aspectos importantes: la higiene de los genitales del animal y el estímulo del semental (Rangel, 2007, p. 35).

En este sentido, se realiza una monta falsa, que consiste en permitir al semental montar sobre la vaca y desviar el pene tomando con la palma de la mano la piel del prepucio sin ofrecerle la vagina. Después de algunos segundos de intento de búsqueda de la vagina, el animal desciende; nunca se debe tocar con la mano la mucosa del pene. (Rangel, 2007, p. 35).

En el siguiente intento de monta se coloca la punta del pene desviado en la entrada de la vagina; inmediatamente el toro se lanza hacia delante en un empuje final que acompaña a la eyaculación. La monta falsa en el bovino aumenta la calidad del semen en cuanto a volumen, concentración espermática y motilidad (Rangel, 2007, p. 35).

10.1.2. Área de trabajo y recolección del semen

El área de recolección de semen debe contar con un puesto de monta, con un piso sólido y anti deslizante, 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 (Morillo *et al.*, 2012, p. 28).

10.2. Electroeyaculador

El electroeyaculador no es otra cosa que un electrodo conectado a una batería que genera estímulos rítmicos provocados por corrientes eléctricas no mayores a 20 voltios. (Tribulo *et al.*, 2014, p. 45).

10.2.1. Efectividad del equipo de electroeyaculación.

Las terminales de electrodos rectales pueden estar pintados con esmalte, reduciendo la transferencia de los estímulos eléctricos al toro, en los eyaculadores a batería, cuando presenta poca carga producen una estimulación insuficiente y dificulta a la obtención del eyaculado, las terminales rectales de 6,5 a 7,5 cm. de diámetro son eficientes para la mayoría de los toros, para toros muy grandes son necesarias las terminales de 9 cm de diámetro. (Tribulo *et al.*, 2014, p. 45).

10.2.2. Precauciones a tener el momento de la colecta.

La introducción de aire al momento de la examinación, y la insuficiente estimulación manual previa a la electroeyaculación, puede generar dificultades en la obtención del eyaculado o producir una muestra pobre. El volumen y la densidad están directamente afectados por la calidad de fluido preseminal colectado, el fluido preseminal y muestras de gran cantidad de semen se debe evitar por que reducen la capacidad de esperma. (Tribulo *et al.*, 2014, p. 45).

10.2.3. Respuesta individual de los toros al estímulo

Toros asustados o de mal carácter, que no recibieron una adecuada estimulación por masaje rectal, son comúnmente difíciles de colectar y producen muestras de poca densidad. En algunas circunstancias se puede intentar tranquilizar al animal, los toros que hay eyaculado las últimas 24 horas (toros que están en servicio) son generalmente difíciles de electroeyacular y producen semen de baja densidad. (Tribulo *et al.*, 2014, p. 45).

10.3. Colecta de semen por medio de masajes.

Este método se lo aplica a toros que han tenido un descanso sexual, son tranquilos y manejados con calma, al igual que para toros que tienen algún tipo de dolor severo o algún otro problema en las patas traseras lo que dificulta la monta. (Tribulo *et al.*, 2014, p. 45).

La colección de semen por masaje transrectal tiene algunas desventajas las cuales incluyen irritación de la mucosa rectal por la excesiva frotación manual, la falta de protrusión del pene que resulta colecciones de muestra contaminadas desde el prepucio, la necesidad de una segunda persona para la colección de la muestra y la dificultad de estimular toros excitados o de mal carácter. (Tribulo *et al.*, 2014, p. 45).

Para realizar la técnica el operador debe introducir su mano en el recto y luego de la examinación de las glándulas accesorias y los anillos inguinales, se aplica un masaje

longitudinal de atrás hacia delante sobre las ámpulas, la próstata y la uretra., cuando el musculo de la uretra comienza las contracciones el operador debe tratar de masajear en sincronía con ellas y continuar el masaje hasta que la muestra de semen pueda ser colectada. (Tribulo *et al.*, 2014, p. 45).

Si el brazo del operador se agota el otro brazo puede ser introducido en el recto y continuar con el procediendo. Si no se puede colectar semen después de 2 o 3 minutos, es poco probable que el procedimiento sea exitoso. (Tribulo *et al.*, 2014, p. 45).

CAPITULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2-2. LOCALIZACIÓN Y DURACIÓN

La recolección y evaluación de muestras de semen de ganado bovino Charolais para el estudio de la calidad seminal, se realizó Laboratorio de Biotecnología Reproductiva Bovina del GAD Provincial de Morona Santiago, la misma que se encuentra ubicada en la comunidad Santa Rosa en el Km. 12, vía Macas - Puyo a 20 minutos de la ciudad de Macas y en el Laboratorio de Reproducción Animal e Inseminación Artificial de la Facultad de Ciencias Pecuarias de la ESPOCH, se realizó una réplica de toma de datos de pajuelas descongeladas de semen de ganado bovino Charolais.

Las condiciones meteorológicas de la zona se describen en la tabla 6-2.

Tabla 6-2. Condiciones meteorológicas del laboratorio de biotecnología reproductiva bovina del GAD Provincial de Morona Santiago.

PARÁMETROS	VALORES
Temperatura, °C	21,10
Precipitación, mm/año	2912,00
Velocidad del viento, (m/s)	8,00
Humedad atmosférica, %	84,00
Altura, m.s.n.m	1142,00

Fuente: .GAD Provincial Morona Santiago. (2017).

El tiempo de duración del proyecto fue de 60 días, en los cuales se realizaron la extracción de semen con vagina artificial, valoración seminal en fresco, diluido con trehalosa, congelación de pajuelas y valoración de semen post-descongelado.

2-2. UNIDADES EXPERIMENTALES

Para el desarrollo de la presente investigación se utilizó 1 reproductor de la raza Charolais (Full French) de 21 meses de edad, del cual se obtuvieron ocho eyaculados de semen, con un intervalo de descanso de 4 días.

3-2. MATERIALES, EQUIPOS E INSTALACIONES

Los materiales, equipos e instalaciones que se utilizaron en la presente investigación, se enumeran a continuación:

3.1. Materiales

- Overol
- Botas
- Libreta de apuntes
- Esferos
- Mandil
- Pajillas de 0,5 ml.
- Pipetas
- Vasos de precipitación
- Micropipeta
- Puntillas
- Probeta

- Porta y cubreobjeto
- Cámara de Neubauer
- Tubos falcón
- Tubos eppendorf
- Embudo
- Guantes de manejo
- Termómetro
- Micro esferas

3.2. Equipos

- Crio-congeladora
- Microscopio
- Tanques de nitrógeno
- Baño maría
- Vagina artificial
- Termoplatina
- Computador
- Estufa

3.3. Reactivos

- Trehalosa
- Tris Base

- Ácido cítrico
- Fructosa
- Glicerol
- Yema de huevo
- Agua destilada
- Penicilina
- Gentamicina
- Estreptomina
- Eosina - Nigrosina

3.4. Instalaciones

- Mangas para colecta de semen
- Área de procesamiento de semen
- Laboratorio de Biotecnología Reproductiva Bovina
- Laboratorio de Reproducción Animal ESPOCH

4-1. TRATAMIENTO Y DISEÑO EXPERIMENTAL

El experimento se manejó bajo un diseño completamente al azar (DCA), analizando únicamente el efecto de la trehalosa en concentraciones de 25 mEq/l sol, 50 mEq/l sol y un control (Comercial), con un total de ocho eyaculados, mismos que se utilizaron como repeticiones.

TO: Diluyente comercial con Trehalosa 0 mEq/l sol

T25: Diluyente con Trehalosa 25 mEq/l sol

T50: Diluyente con Trehalosa 50 mEq/l sol

Se utilizó el siguiente modelo lineal aditivo.

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \epsilon_{ij}$$

Dónde:

Y_{ij} : Valor estimado de la variable.

μ : Media general.

α_i : Efecto del tratamiento.

ϵ_{ij} : Error Experimental.

4.1. Esquema del experimento

En la tabla 7-2, se describe el esquema de diferentes niveles de trehalosa.

Tabla 7-2. Esquema del experimento.

Niveles (mEq/l sol)	Código	Repeticiones	T.U.E	Rep/Trat
0 Trehalosa	T0	8	1	8
25 Trehalosa	T25	8	1	8
50 Trehalosa	T50	8	1	8
TOTAL				24

TUE: Tamaño Unidad Experimental.

5-1. TRATAMIENTOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Las mediciones experimentales fueron evaluadas en semen fresco, semen diluido y semen post-descongelado que se evaluaron en esta investigación fueron las siguientes:

5.1. Macroscópicas

- Volumen total por eyaculado (ml)
- Color
- Olor
- Aspecto
- pH

5.2. Microscópicas

- Motilidad masal. (puntos)
- Motilidad individual (%)
- Determinación de células vivas y muertas. (%)
- Concentración espermática. (ml)
- Daños de membrana. (%)
- Morfología espermática (%)
- Anormalidades del espermatozoide. (%)

Los resultados experimentales fueron sometidos a los siguientes análisis estadísticos:

Análisis de varianza (ADEVA)

Prueba de significancia según Waller Duncan, para la separación de medias se trabajó con el nivel de $P \leq 0.05$ y $P \leq 0,01$

Análisis de Correlación y Regresión

El esquema del ADEVA para los tratamientos se detalla en la tabla 8-2.

Tabla 8-2. Esquema del análisis de varianza (ADEVA).

Fuente de Variación	Grados de libertad
Total	23
Tratamientos	2
Error Experimental	21

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

6-2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

6.1. Campo

6.1.1 *Limpieza de toro*

Sujetar muy bien al animal para evitar lastimar el prepucio al momento de la limpieza, con ayuda de una tijera se procede a cortar las vellosidades que se encuentran alrededor del prepucio; teniendo mucho cuidado para evitar cortes, se lava con solución salina al 90%; en la parte interna del prepucio y con abundante agua por la parte externa (fotografía 5-2.), una vez lavado se seca con toallas industriales desechables.



Fotografía 5-2. Limpieza del prepucio del toro.

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

6.1.2 Armado de la vagina artificial

El armado de la vagina artificial (VA), se realizó con toda la asepsia necesaria, desinfectando las manos con alcohol, se colocó la manga de goma o camisa; dentro de un tubo rígido, como se puede observar en la fotografía 6-2, se procedió a colocar las ligas para sujetar los extremos y evitar la salida del agua; se ubicó el cono de goma en la parte cercana a la válvula de ingreso de agua y aire, el cual servirá como conductor del semen hacia el tubo de colecta que se lo ubicó en el extremo final del cono.



Fotografía 6-2. Armado de vagina artificial.

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

El llenado de la VA se realizó utilizando un embudo y agua a 45°C, evitando que se derrame e ingrese a la VA, lo que hará que los espermatozoides mueran por contacto al ser considerada el agua como un espermaticida; en este caso el agua caliente ayudará al toro a la eyaculación. Obsérvese fotografía 7-2.



Fotografía 7-2. Llenado de vagina artificial.

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

Una vez realizada la extracción de desarmó la vagina artificial y se procedió a lavar con amonio cuaternario y abundante agua, se dejó que caiga el exceso de agua, se desinfectó con alcohol tanto interna como externamente y se llevó para esterilizarlo; este proceso se lo realizó calentando el esterilizador a una temperatura de 60 °C, se colocó la manga de goma o camisa, conos y ligas y se deja hasta que el exceso de alcohol se haya evaporado.

6.1.3 Volumen total por eyaculado (ml)

Una vez realizada la colecta, se observó en un tubo graduado (ml), el volumen total de eyaculado, como se aprecia en la fotografía 8-2, se deben tomar las precauciones necesarias para evitar la muerte de los espermatozoides por contacto con el agua o exposición a radiación solar (fotosensibilidad), la evaluación espermática se realizó rápidamente después de la colecta en el laboratorio.



Fotografía 8-2. Volumen de eyaculado.

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

6.1.4 Color





Una vez obtenido el eyaculado se realizó la calificación o valoración por medio de observación visual, teniendo en cuenta que los colores van desde blanco marfil siendo muy bueno, pasando por blanco lechoso que es bueno, lechoso aguado un semen de calidad regular y traslucido acuoso que es un semen de mala calidad (Tabla 9-2; 10-2), (Sorensen, 1982, p. 6); señala que un semen de buena calidad tiene aspecto cremoso y espeso con apariencia perlada; los eyaculados regulares son de consistencia delgada y tiene un tono grisáceo y por su parte un semen pobre revela una apariencia muy delgada y tiene tono grisáceo y ayudado con la concentración espermática se da el valor de evaluación al semen.

Tabla 9-2. Clasificación del color y concentración de semen bovino.

COLORACIÓN	RANGOS DE CONCENTRACIÓN
Cremosa y granulosa	750 a 10000 x 10 ⁶ o más por mililitro.
Blanco lechosa	400 a 750 x 10 ⁶ por mililitro.
Lechosa	250 a 400 x 10 ⁶ por mililitro.
Traslúcida	Menor a 250 x 10 ⁶ por mililitro.

Fuente: Tribulo *et al.*, 2014.

Tabla 10-2. Escala colorimétrica de semen bovino.

ESCALA DE COLOR DE SEMEN BOVINO			
			
Cremosa y granulosa	Blanco lechosa	Lechosa	Traslúcida

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

6.1.5 Olor

La evaluación del olor del semen se lo realizó de manera olfativa, teniendo que se puede presentar olor dulzón como ha leche fresca cuando el semen es de muy buena calidad, un semen con olor a orina por lo general disminuirá la motilidad en los espermatozoides, el semen con olor pútrido nos indica un semen de mala calidad, y una posible infección en el aparato reproductor.

El olor para cada especie es característico y lo determina un lípido llamado espermina, se puede encontrar olores leche fresca, urinosa, excrementosos o putrefacto. (Grupo Editores, 2012, p. 6).

6.1.6 Aspecto

El aspecto está ligado a la concentración de espermatozoides y la coloración del semen. El aspecto depende del número de espermatozoides/ml, y de los componentes de secreción de las

glándulas accesorias. (Grupo Editores, 2012, p. 6); existen variaciones entre el cremoso, acuoso y lechoso, esto depende de la concentración de espermatozoides. Una alta concentración de espermatozoides determina el aspecto cremoso.

6.2. Laboratorio

6.2.1 *Pesaje de los reactivos.*

El pesaje de los reactivos se hizo en una balanza analítica de alta precisión, fotografía 9-2. Se pesó cada uno de los componentes que se utilizaron en esta investigación, con ayuda de papel aluminio y una espátula se procedió al pesaje de trehalosa (2,14 g) para el T 25, y (4,28 g) para el T 50, los demás reactivos se utilizó en la misma cantidad para los tratamientos: ácido cítrico (0,37 g), tris base (0,60 g), penicilina (0,08 ml), estreptomycin (0,13 ml), y fructosa (0,25 g).



Fotografía 9-2. Pesaje de reactivos.

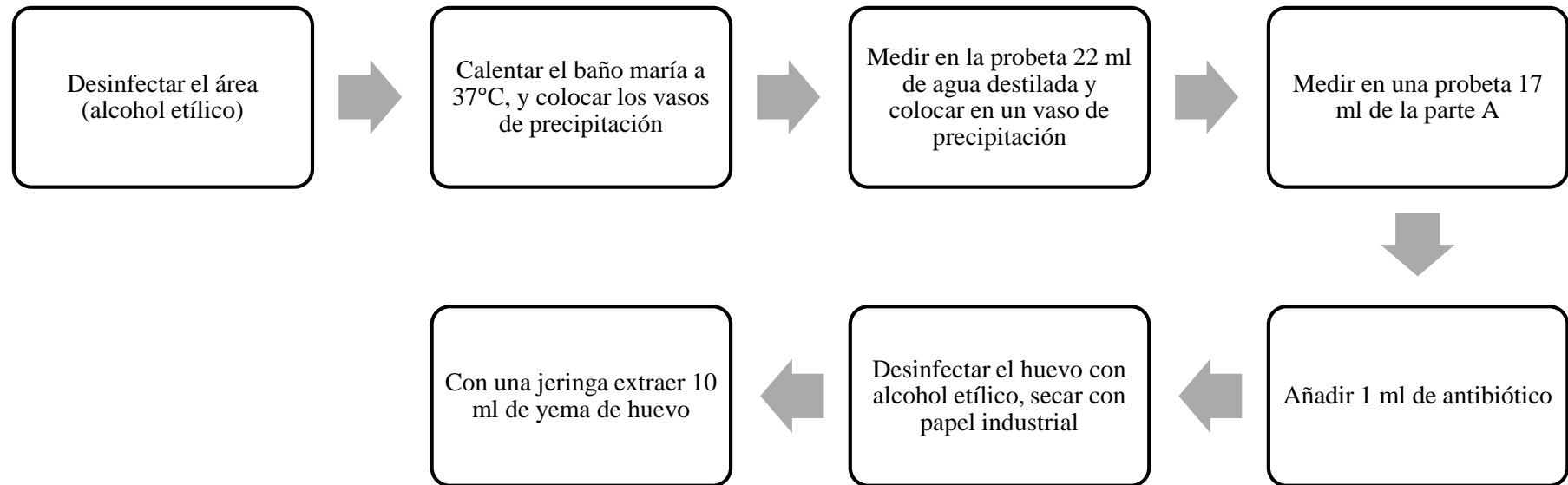
Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

6.2.2 *Elaboración de diluyentes.*

Para la elaboración de los diluyentes se tomó en consideración el cuidado que se debe tener para cada producto, para que no exista ninguna alteración durante el proceso de preparación de los diluyentes Trehalosa (0 mEq/l), Trehalosa (25 mEq/l), y Trehalosa (50 mEq/l) como se detalla a continuación.

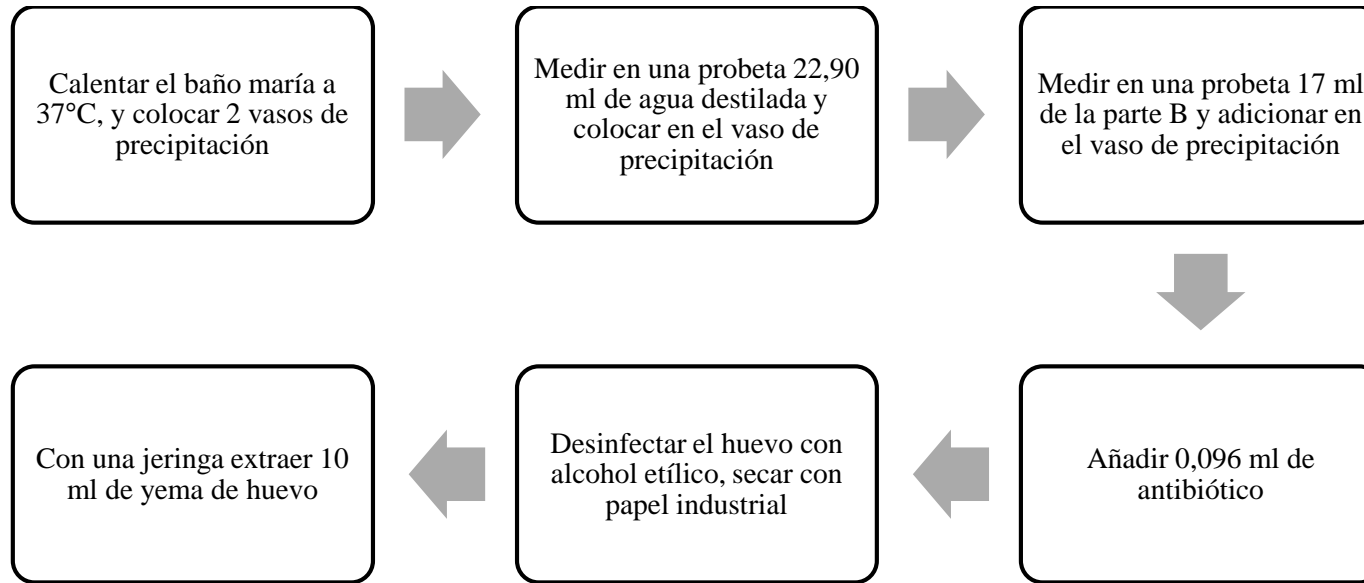
1) Preparación de diluyente (Comercial) con Trehalosa (0 mEq/l)

a. Preparación de diluyente parte A



Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

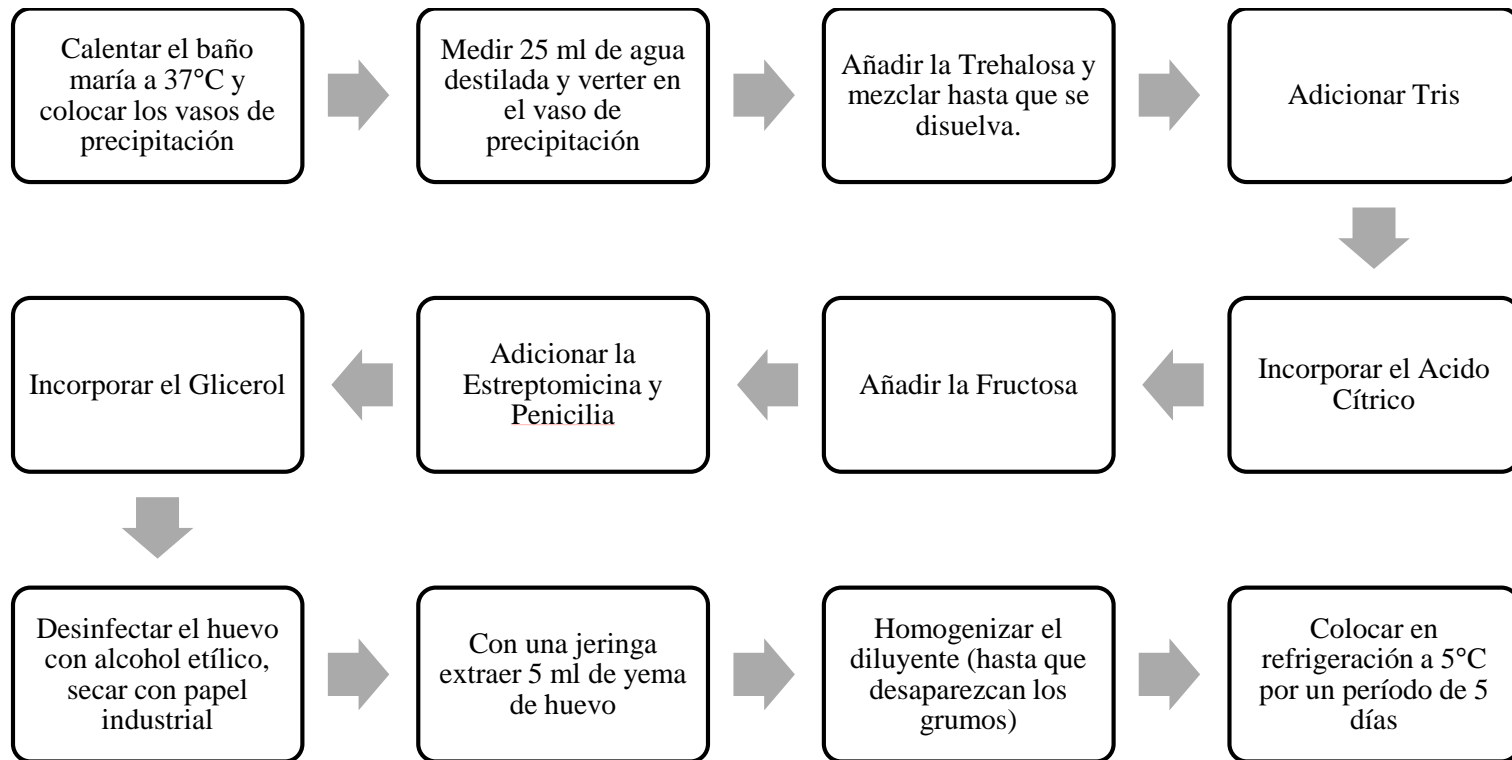
b. Preparación de diluyente parte B



Una vez preparado el diluyente se debe dejar en refrigeración a una temperatura de 5 °C, por un período máximo de 5 días.

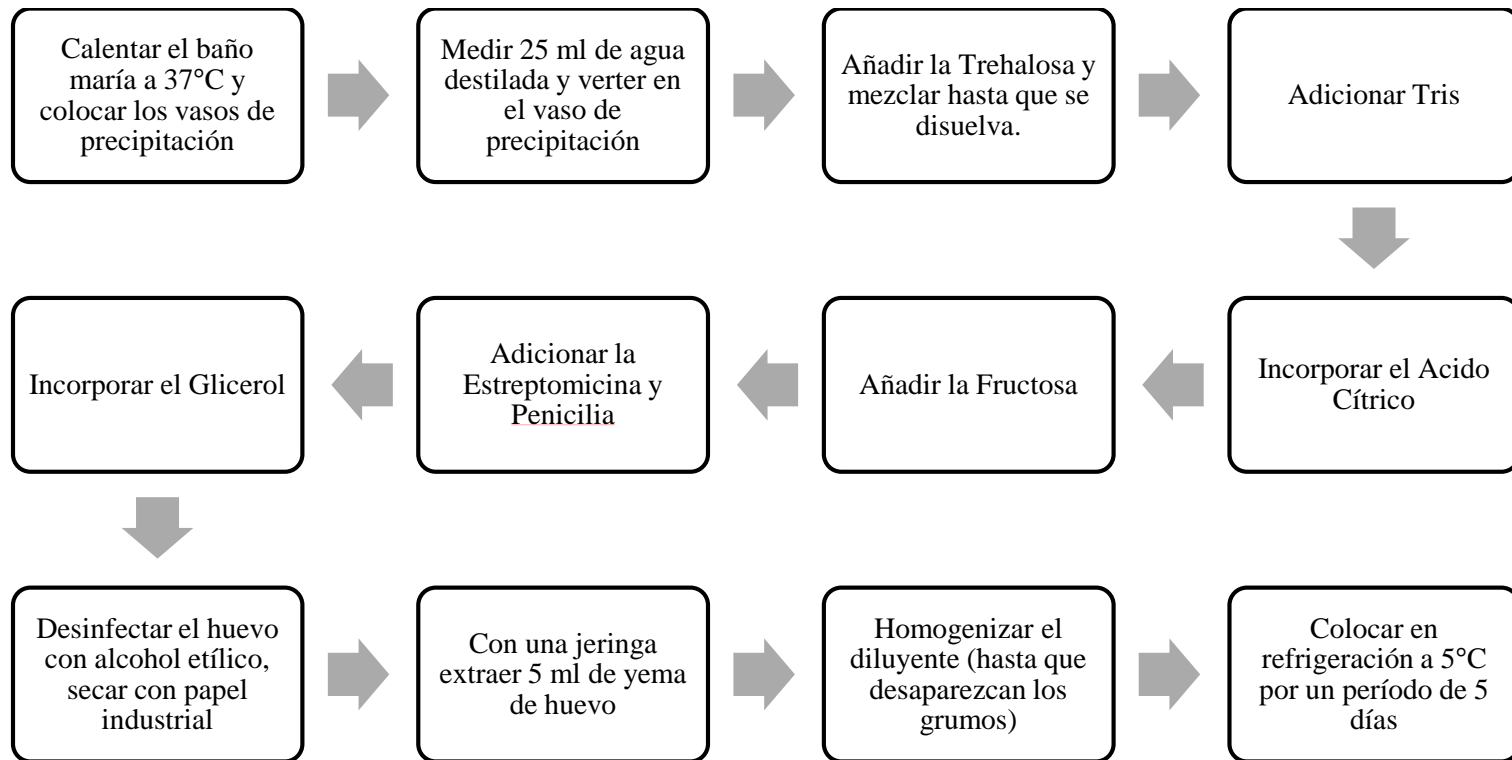
Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

2) Elaboración de diluyente con Trehalosa (25 mEq/l)



Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

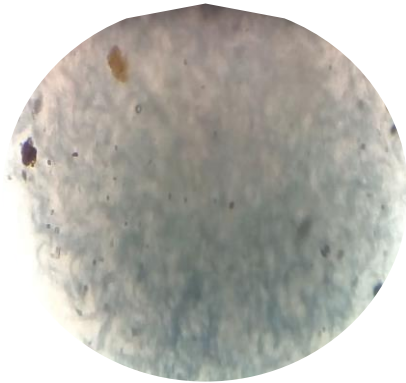
3) Elaboración de Trehalosa (50 mEq/l)



Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

6.2.3 *Motilidad masal*

La determinación de motilidad masal se realizó utilizando un portaobjeto tibio, pre calentado a 37°C; con una micropipeta de 10 (microlitros) μl se tomó una muestra de 5 μl de semen fresco y se colocó sobre el portaobjetos. La observación se lo realizó en el microscopio con el lente de 40 y 125x, ubicado en el borde de la gota (fotografía 10-2), en el cuadro 3 se observa la evaluación de motilidad masal de acuerdo a la apariencia o aspecto del semen. (Ruiz, *et al.*, 2009, p. 96), se determina añadiendo una gota de semen fresco sobrepuesto en un portaobjeto y se observa al microscopio en los lentes de 10 X, 20 X y 40 X a una temperatura de 37 °C, y se califica en función a la presencia de ondas o de movimiento de remolino.

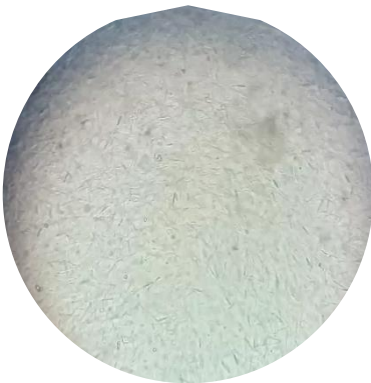


Fotografía 10-2. Motilidad masal.

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

6.2.4 *Motilidad individual (%)*.

La evaluación de motilidad individual se realizó utilizando un portaobjeto y cubre objeto, pre calentado a 37°C; con una micropipeta de 10 (microlitros) μl se extrajo una muestra de 3 μl de semen fresco y se puso sobre el portaobjetos; se colocó el cubreobjetos, se llevó la muestra al microscopio para observar con el lente de 200x (fotografía 11-2), en donde se cuentan las células móviles, seguidas de las no móviles por el lapso de un minuto.



Fotografía 11-2. Motilidad individual.

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

Se debe realizar el conteo de mínimo 4 campos, (moviendo la platina del microscopio con la muestra a campos diferentes); una vez recolectados los datos se procedió hacer el cálculo en porcentaje, que nos indica la viabilidad espermática del semen colectado, como se aprecia en el cuadro 4-2.

Para la evaluación se usa una escala de 0 a 100 %, considerando que motilidades >70% son muy buenas, entre 50 a 70% buenas, 30 a 50% regulares y < a 30% malas. (Hafez, 2000, p. 57).

6.2.5 *pH*

La valoración de pH se realizó con la ayuda de un pehachimetro HANNA HI99164, de alta precisión al cual se lo calibro a un pH de 7 (neutro), con una base buffer antes del inicio del trabajo de investigación.

Se colocó 0,5 ml de semen bovino fresco en un tubo eppendorf y se procedió a introducir la punta del pehachimetro en la muestra para su lectura, obteniendo así resultados que varían entre 6,5 y 7,5 los cuales se encuentran dentro de los parámetros óptimos de semen bovino. (Fotografía 12-2).



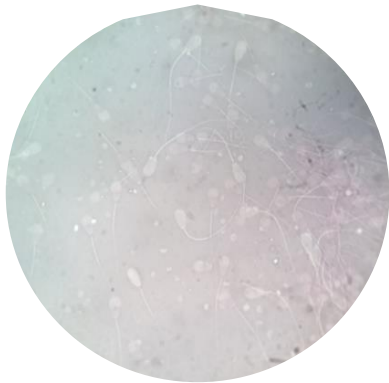
Fotografía 12-2. Pehachimetro utilizado para la presente investigación.

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

6.2.6 *Morfología espermática (%)*.

La morfología se efectuó colocando en un porta objetos una gota de 5 µl de semen fresco y la misma cantidad de eosina-nigrosina sobre la muestra, se realizó el extendido o barrido con la

ayuda de otro porta objetos, se dejó que la muestra se seque aproximadamente 5 minutos, se colocó una gota de aceite de inmersión en la placa seca y se observó en el microscopio con el objeto de 1000 x (fotografía 13-2).



Fotografía 13-2. Morfología espermática.

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

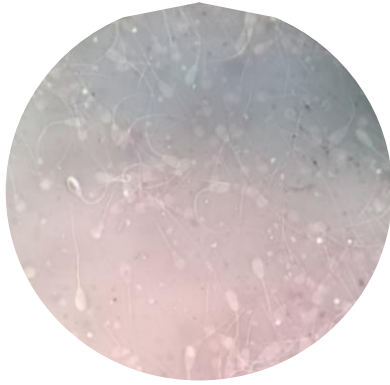
Se procedió a observar las anormalidades de los espermatozoides (cabeza, cuello, cola), se debe contar 100 espermatozoides por campo; en un mínimo de 4 campos (moviendo la platina del microscopio con la muestra a campos diferentes), se suma las anormalidades encontradas, y se lleva a porcentaje teniendo en cuenta que no deben excederse del 25 % de anormalidades presentes en la muestra.

Para la evaluación de morfología espermática se debe realizar un frotis con tinción de eosina-nigrosina y se observa al microscopio con el objetivo de 40x. Las muestras que van a ser criopreservadas deben tener una morfología normal mínima del 70%. (Arieta *et al.*, 2014, p. 3).

6.2.7 *Conteo de células vivas y muertas (%)*.

El conteo de las células vivas y muertas se lo realizó con la tinción de eosina-nigrosina la cual va a teñir de color rosado la membrana de las células muertas mientras que las células vivas permanecen blancas, se procede a contar como mínimo 4 campos (moviendo la platina del microscopio con la muestra a campos diferentes), con el lente de 1000 x, contando de manera individual las células vivas y muertas, se sumaron las células observadas por campos tanto vivas como muertas y se calculó el porcentaje de células vivas y muertas.

Cuando la tinción y el manejo del semen es el adecuado el porcentaje de células “vivas” está altamente relacionado con la motilidad individual (fotografía 14-2), el porcentaje de células vivas no debe ser inferior al 70 %; es ahí donde se ve reflejado el manejo que se da al semen desde la colecta hasta su evaluación.



Fotografía 14-2. Conteo de células vivas y muertas.

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

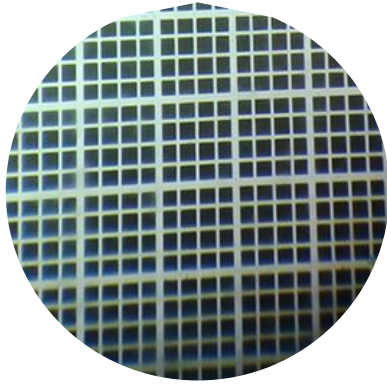
La muestra se prepara colocando una gota de semen diluido en un portaobjeto tibio, al que luego se le agrega una gota del colorante, se mezcla con rapidez para evitar que las células mueran y absorban colorante. Se toca la gota con otro portaobjeto y se hace un frotis delgado, luego de la preparación se seca con rapidez y se observa al microscopio, los espermatozoides se presentan como pequeños corpúsculos de color rosado o ligeramente coloreadas. (Sorensen. 1982, p. 5).

Una cabeza transparente del espermatozoide indica que estaba vivo al momento de la coloración mientras que las de color son los que estaban muertos al momento de la tinción. Es por eso que para esta técnica se la debe realizar lo más rápido posible, para evitar la mortalidad de los espermatozoides y así tener errores al momento de la evaluación, y posteriormente en la tabulación de datos que se observará una alteración.

6.2.8. Concentración espermática de semen fresco (ml).

La concentración espermática se la realizó colocando 1 ml equivalente (1000 μ l), de agua destilada en un tubo eppendorf, el cual va a funcionar como espermaticida, con una micropipeta se procedió a colocar 5 μ l de semen fresco en él tubo eppendorf (dilución 1:200); se homogenizó la muestra y se colocó sobre la cámara de Neubauer, se dejó reposar la muestra de 4 a 5 minutos.

Se observó al microscopio para observar con el objetivo de 100 x, se debe contar 5 cuadrantes centrales (fotografía 15-2), en las dos cámaras y se calcula un promedio que luego será multiplicado por 1000 para obtener la concentración por ml de la muestra diluida, a continuación se presenta la fórmula.



Fotografía15-2. Cámara central para conteo de semen fresco en cámara de Neubauer.

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

$$NE/ml. = NE * 10 * 1000 * 200$$

NE = Número de espermatozoides

10 = Altura de la cámara

1000 = Factor de transformación de mm³ en ml.

200 = Dilución

Fuente: Tribulo *et al.*, 2014.

Una vez conocida la concentración espermática por ml, se procedió a multiplicar por el volumen total de eyaculado, para conocer la concentración espermática total del eyaculado. (Grupo Editores, 2012, p. 3), la concentración de células espermáticas, en el eyaculado varía de acuerdo a la edad, raza, régimen nutricional, actividad sexual y medio ambiente, la concentración se expresa como el número de células espermáticas por centímetro cubico de semen, una vez realizado el conteo se aplica la siguiente fórmula:

$$\text{Espermatozoides/ml} = \frac{N * 200 * 400 * 10 * 1000}{80}$$

NE = Número de espermatozoides

400 = Cuadros pequeños en un mm².

1000 = Factor de transformación de mm³ en ml.

200 = Dilución

80 = Cuadros pequeños contados

6.2.9. *Conservación de semen fresco*

La conservación de semen fresco se lo realizó una vez hecha la colecta, el volumen total de semen obtenido se lo fraccionó en tres partes iguales para adicionar el mismo volumen de diluyente (Comercial, T 25, T 50) en relación 1:1; el cual ayuda a conservar, alimentar y evitar que pierdan energía al presentar un alto porcentaje de motilidad los espermatozoides recién colectados.

6.2.10. *Cálculo del número de pajuelas y volumen de diluyente.*

Para el cálculo del número de pajuelas por colecta, se toma en cuenta el volumen de eyaculado, la concentración espermática, y el porcentaje de motilidad individual, los mismos que ayudaran a la formulación, se debe tomar en cuenta la calidad de semen que se va a congelar, si es un semen muy bueno y bueno la concentración espermática por pajuela puede variar de 20 a 30 millones, teniendo en cuenta que en la descongelación existe aproximadamente el 10% de mortalidad de los espermatozoides.

$$\text{N}^{\circ} \text{ pajuelas} = \frac{\text{Vol. eyaculado} * \text{Calidad seminal (millones)} * \text{Mot. Individual (\%)}}{\text{Concentración espermatozoides / pajuela.}}$$

Fuente: Tribulo *et al.*, 2014.

El resultado obtenido en la fórmula, se divide para dos en caso que se utilice pajuelas de 0,5 ml o para cuatro en caso que sea pajuelas de 0,25 ml; una vez que se conoce el volumen de diluyente que se va adicionar, se restó el volumen de diluyente que se agregó para conservar el semen en relación 1:1; se procedió a colocar con una pipeta el volumen de diluyente (Comercial, T 25, T 50) en diferentes vasos de precipitación se añadió el semen y se homogenizó con leves movimientos. (Fotografía 16-2).



Fotografía 16-2. Agregando diluyente al vaso de precipitación, para el empajillado.

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

6.2.11. Empajillado y sellado.

El empajillado se lo realizó de manera empírica con la boca, el mismo que se debe realizar con mucho cuidado puesto que se están manejando células vivas y el manejo inadecuado puede dañar todo el proceso que se lo ha realizado anteriormente. Se colocó cuatro pajuelas en el vaso de precipitación con la muestra, y con la boca con una sola succión se realizó un correcto llenado; esto se lo realizaba hasta que la muestra se termine. (Fotografía 17-2).



Fotografía 17-2. Llenado de pajuelas.

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

Grupo Editores. (2012), después de recogido, evaluado, diluido el semen, teniendo las pajillas marcadas, almacenadas a 4 °C, se procede a sellar; existen tres métodos: manual, semiautomático y automático, siendo el método manual el más sencillo para poder empajillar, que hasta la actualidad se lo viene utilizando.

Para el caso del sellado se realizó la extracción de aproximado 1 cm de alto de la pajuela con una jeringuilla; para conservar la cámara de aire que es necesario para la congelación (fotografía 18.2), ya que al no existir la cámara de aire el sellado puede explotar por la expansión del contenido al momento de la congelación rápida.



Fotografía 18-2. Conservación de la cámara de aire.

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

Existen tres métodos de sellado de pajuelas, por calor, alcohol polivinílico, y con microesferas. El sellado de pajillas en esta investigación se realizó con microesferas (fotografía 19-2), al ser un método sencillo, seguro y confiable, se debe considerar la presencia de la cámara de aire, para evitar que las pajillas exploten y sean inservibles para la inseminación artificial.



Fotografía 19-2. Microesferas para sellado de pajuelas.

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

6.2.12. Congelación y conservación.

Para el proceso de congelación se utilizó el equipo CRYGEN HSE portátil el cual viene programado las curvas de congelación para diferentes especies animales. El equipo se lo utilizo para estabilizar la temperatura de las pajillas antes del proceso de congelación, una vez empajilladas y selladas se llevó a la rampa de refrigeración y estabilización, con una temperatura inicial de 17 °C (fotografía 20-2).



Fotografía 20-2. Proceso de refrigeración y estabilización de pajuelas.

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

La cual bajará de a poco hasta llegar a la temperatura de refrigeración 5 °C en un lapso de 5 minutos, se debe mantener dicha temperatura por un período de 3 horas y 30 minutos, este proceso lo conoce como estabilización.

Una vez que se ha terminado el proceso de estabilización de temperatura se colocó las pajuelas en un rack de congelación; este proceso se lo realizó muy rápido para que no haya cambio de temperatura, la congelación se lo realizo colocando nitrógeno líquido en un kuller y se dejó que repose.

El rack con las pajuelas se introdujo en el kuller para la congelación con vapores de nitrógeno (fotografía 21-2), en un tiempo de 20 minutos, una vez congeladas se retira las pajuelas del rack y se procede a guardar en el termo criogénico.



Fotografía 21-2. Proceso de congelación de pajuelas con vapor de nitrógeno.

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

6.2.13. Descongelado.

El proceso de descongelado se lo realizó 15 días después de la congelación, este proceso se realizó el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva Bovina del GAD provincial de Morona Santiago y el Laboratorio de Reproducción e Inseminación Artificial de la ESPOCH, siguiendo el mismo procedimiento para los dos establecimientos.



Fotografía 22-2. Descongelado de pajuelas.

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

Se calentó agua a 37 °C en baño maría, se extrajo del termo criogénico una pajuela por tratamiento (T0), (T25) y (T50) para hacer la evaluación; en baño maría se colocó las pajuelas por un lapso de 30 segundos (fotografía 22-2), se procedió a extraer, secar y cortar para verter el semen de la pajilla en un tubo eppendorf, y conservar en baño maría para realizar las evaluaciones posteriores.

6.2.14. *Motilidad Progresiva.*

Una vez que se tiene el semen descongelado, con una micropipeta se colocó una gota de 0,5 μ en un porta objetos, y se colocó el cubreobjetos los cuales están precalentado a 37 °C, se llevó la muestra al microscopio y se observó con el lente de 40 x (fotografía 23-2), la calificación se la realiza de acuerdo al vigor que presenten los espermatozoides, los valores son expresado en puntos, como se muestra en la tabla cuadro 11-2.



Fotografía 23-2. Motilidad progresiva de semen descongelado.

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

Tabla 11-2. Motilidad progresiva post-descongelado.

VALOR	CARACTERÍSTICAS
0	Sin movimiento
1	Leve movimiento de cola sin desplazamiento progresivo
2	Lento movimiento de cola con algo de movimiento progresivo
3	Movimiento progresivo velocidad lenta
4	Movimiento progresivo rápido
5	Movimiento progresivo rápido, es difícil seguir a una célula determinada

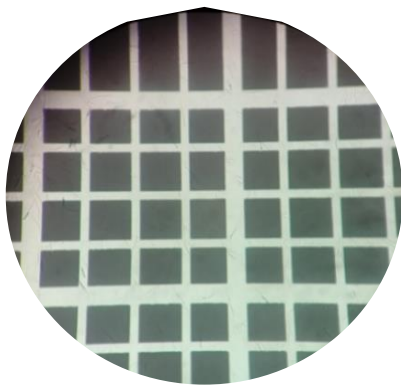
Fuente: Tribulo et al., 2014.

La valoración de la motilidad implica la estimación subjetiva de la viabilidad de los espermatozoides, y la calidad de la motilidad de evaluación se los realiza en semen fresco y diluido, la calificación se lo realiza en puntos desde 0 al 5, siendo 0 sin movimiento y 5 un movimiento rápido que dificulta seguir a una sola célula móvil. (Hafez, 2000, p. 45).

6.2.15. *Concentración espermática post-descongelación.*

La valoración de concentración espermática se hizo, colocando 1 ml de agua destilada en un tubo eppendorf, el cual va a funcionar como espermaticida, con una micropipeta se procede a colocar 5 µl de semen descongelado en él tubo eppendorf (dilución 1:200).

Se homogenizó la muestra y se colocó sobre la cámara de Neubauer colocado previamente el cubreobjetos, se dejó reposar la muestra en un lapso de 4 a 5 minutos; y se observó al microscopio con el objetivo de 100 x (fotografía 24-2), se contó 4 cuadrantes de los 4 lados de la cámara, se sumó y se realizó el cálculo del promedio.



Fotografía 24-2. Cuadrantes extremos de la cámara de Neubauer.

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

$$\text{NE/ml.} = \text{NE} * 10 * 1000 * 200$$

NE = Número de espermatozoides

10 = Altura de la cámara

1000 = Pasaje a ml

200 = Dilución

Fuente: Tribulo et al., 2014.

CAPITULO III

3. MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

1-3. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS

1.1. Volumen total por eyaculado (ml)

El volumen total de semen colectado en los ocho saltos, fue de $6,24 \pm 0,36$ ml (Cuadro.12.3); mientras que (Ramónez, 2013, p. 1), reporta un volumen de eyaculado de 5,33 ml en bovinos de la raza Limousin de 2 a 4 años; (Morón & Morón, 2015, p. 64), reportan $5,75 \pm 0,32$ ml para la raza Brahman, valores que son inferiores a los obtenidos en la presente investigación se puede debe a las condiciones fisiológicas y de nutrición a las que estaban sometidos los animales al momento de la colecta.

1.2. Color

El color del semen colectado en los ocho saltos, tres muestras presentaron un color blanco marfil o cremoso hasta amarillento que corresponde al 37,5 %; otras tres muestras presentaron un color opaco lechoso que corresponden al 37,5 %; y dos muestras presentaron un color lechoso aguado que corresponden al 25 %, para el color traslucido no se obtuvo resultados (Gráfico 1-3). (Ramónez, 2013, p. 1), reporta un color blanco cremoso en su estudio realizado con animales Limousin de 2 a 4 años, esto se pudo deber a una alimentación deficiente o la edad del reproductor.

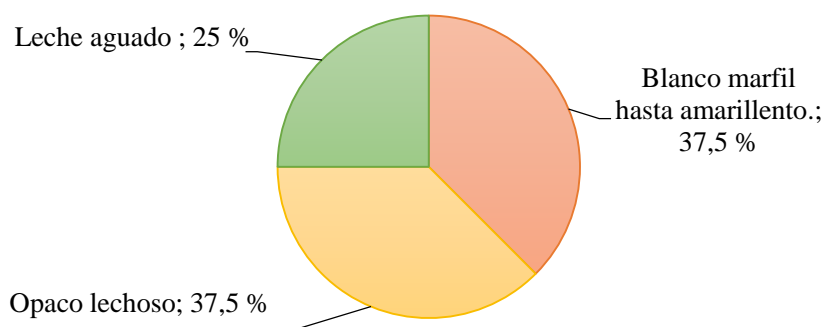


Gráfico 1-3. Color de semen fresco de Bovinos Charolais.

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

1.3. Olor

El olor del semen colectado en los ocho saltos, ocho muestras presentan un olor dulzón como a leche fresca que representa el 100%, siendo así que para el olor a orina y olor pútrido no se observó valores referenciales (Gráfico 2-3). (Agüero, 2012, p. 38), reporta un olor dulzón como leche fresca en animales F1 de la raza Holstein x Cebú de 3 a 7 años de edad.

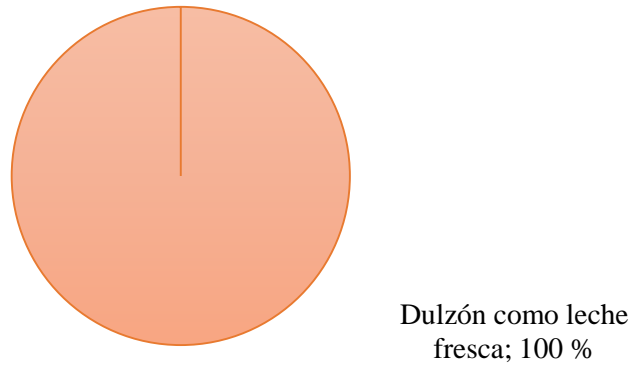


Gráfico 2-3. Olor de semen fresco de Bovinos Charolais.

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

1.4. Aspecto

El aspecto o consistencia del semen colectado en los ocho saltos, seis muestras presentan una calidad buena lo que representa el 75%, dos muestras son de calidad regular que corresponde el 25%, en cuanto al aspecto muy bueno y malo no se observaron resultados en la presente investigación (Gráfico 3-3). (Ramónez, 2013, p. 5), reporta un aspecto muy bueno en semen de bovinos Limousin de 2 a 4 años, los cuales son valores superiores a los obtenidos en esta investigación, los mismos que puede deber a la edad de los animales y estado fisiológico.

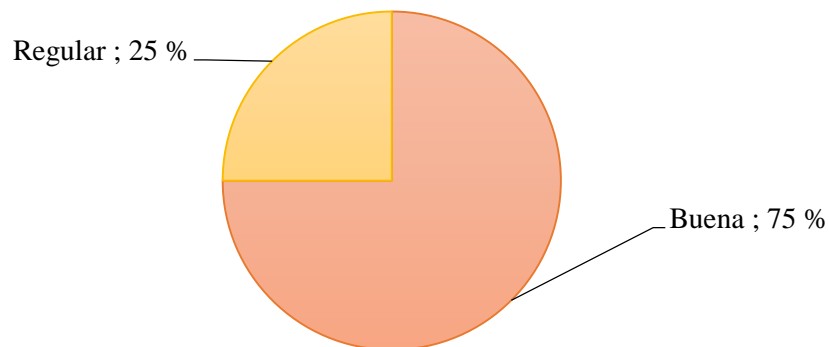


Gráfico 3-3. Aspecto o consistencia de semen fresco de Bovinos Charolais.

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

1.5. pH

El pH del semen colectado en los ocho saltos, al ser analizado con un pehachimetro, se tuvo una media de $6,88 \pm 0,08$ (Tabla 12-3). (Morón & Morón, 2015, p 64), reportan para esta variable una media de $6,73 \pm 0,46$ en la raza Brahmán, valores que son inferiores a los obtenidos en esta investigación, los mismos que se encuentran dentro de los parámetros óptimos de pH que es de 6,5 a 7,00.

Tabla 12-3. Características de semen fresco de bovinos Charolais.

Parámetro	Media	E.E*	Mínimo	Máximo	Rango
Volumen de eyaculado, ml.	6,24	0,36	5,00	8,00	3,00
Células vivas, %.	88,97	1,72	79,25	94,00	14,75
Células muertas, %.	11,03	1,72	6,00	20,75	14,75
Motilidad Masal, Puntos.	2,75	0,16	2,00	3,00	1,00
Motilidad Individual, %.	70,38	4,26	49,50	78,00	28,50
pH	6,88	0,08	6,50	7,23	0,73
Morfología de la cabeza, %.	7,16	0,29	5,75	7,75	2,00
Morfología parte media, %.	2,44	0,12	1,75	2,75	1,00
Morfología cola, %.	11,38	0,37	10,25	12,75	2,50
Espermatozoides normales, %.	79,03	0,55	76,75	80,75	4,00
Concentración 10 ⁶ /ml.	650,00	5,81	370,00	750,00	380,00

E.E*: Error estándar

Prob. > 0,05: No existen diferencias estadísticas.

Prob. < 0,05: Existen diferencias significativas.

Prob. < 0,01: Existen diferencias altamente significativas.

Medias con letras iguales no difieren estadísticamente de acuerdo a la prueba de Waller Duncan.

2-3. CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS

2.1. Motilidad Masal

La motilidad masal del semen colectado en los ocho saltos, se tuvo una media de $2,75 \pm 0,16$ puntos sobre 5 (Tabla 12-3), (Morón & Morón, 2015, p. 64), reportan para esta variable una media de $2,30 \pm 0,15$ en la raza Brahmán, valores que son inferiores a los obtenidos en la presente investigación; mientras que (Martínez, 2000, p. 702), reporta valores de $3,52 \pm 1,03$ en la raza Gir valores que son superiores a los obtenidos en la presente investigación, lo cual se pudo deber a la edad de los reproductores y su alimentación.

2.2. Motilidad Individual o progresiva

2.2.1. Semen Fresco

La motilidad individual en semen fresco en los ocho saltos, se logró una media de $70,38 \pm 4,26$ puntos sobre 100 (Tabla 12-3), mientras que (Núñez, 2015, p. 65) reporta valores de $89,4 \pm 5,98$ en la raza Brahmán, mientras que (Restrepo, 2007, p. 2), obtiene valores de $75,1 \pm 9,1$ en toros Pantaneros los cuales son superiores a los alcanzados en la presente investigación, esto posiblemente se deba a la calidad de semen que se obtuvo en la extracción.

2.2.2. Semen Diluido (Pre Congelamiento)

La motilidad individual o progresiva en semen bovino en los tres tratamientos, se presentó una media de $4,67 \pm 0,62$ para (T0), $3,67 \pm 0,62$ para (T25), y $0,67 \pm 0,62$ para (T50) con un error de 0,62, al ser valuados a las 0 horas (crio-preservedo), como se aprecia en el (gráfico 4-3).

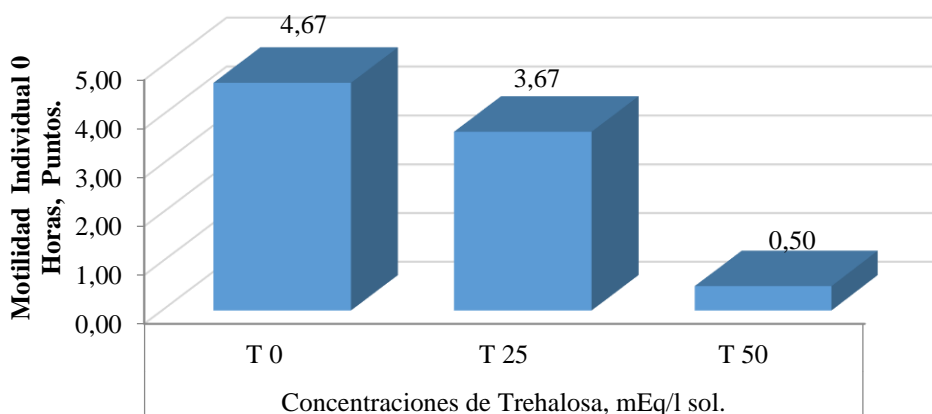


Gráfico 4-3. Motilidad progresiva de semen diluido de Bovinos Charolais evaluado a las 0 horas (pre-congelación) con diferentes concentraciones de Trehalosa.

Realizado por: Hernández Yesenia, 2019.

Mediante el análisis de regresión se determinó que la motilidad progresiva 0 horas pre-congelación (puntos) frente a la utilización de diferentes concentraciones de Trehalosa (mEq) están relacionadas significativamente ($P < 0,01$); obteniendo un modelo de regresión lineal, que alcanzó un coeficiente de determinación y una alta correlación de $R^2 = 85,46\%$ y $r = 0,92$ respectivamente, identificándose que a medida que se incrementa la concentración de Trehalosa la motilidad progresiva decrece $- 0,08$ (puntos); (gráfico 5-3). A lo cual se aplicó la siguiente ecuación:

$$\text{Motilidad Progresiva 0 Horas, (Puntos)} = 5,03 - 0,08 (CT)$$

Donde:

CT = Concentraciones de Trehalosa.

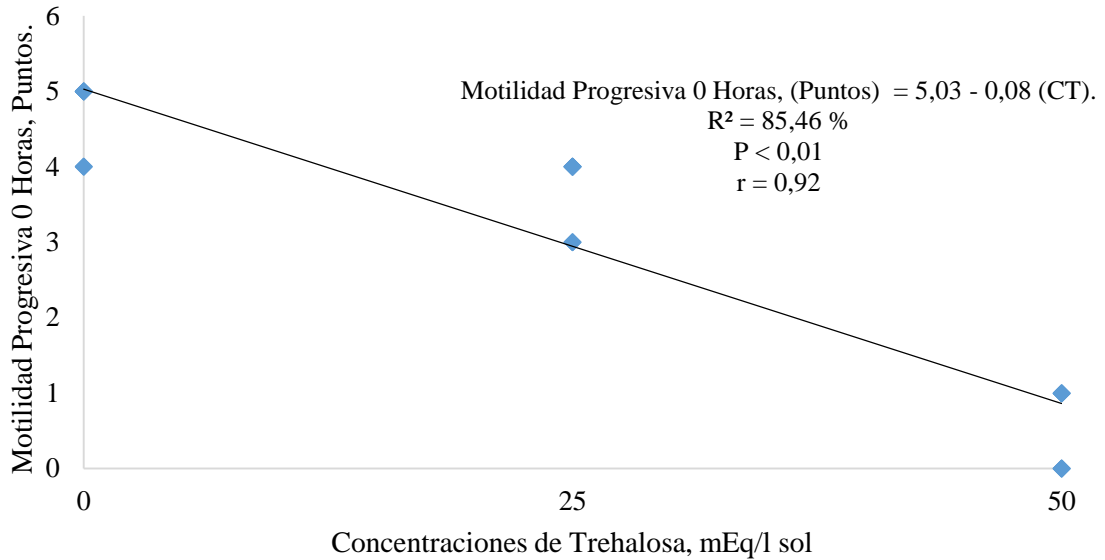


Gráfico 5-3. Tendencia de la Regresión de la motilidad progresiva 0 horas (pre-congelación), mediante la utilización de diferentes concentraciones de Trehalosa.

Realizado por: Hernández Yesenia, 2019.

Mientras que a las 2 horas pre-congelamiento se logró una media de $3,67 \pm 0,56$ para el (T0); $2,67 \pm 0,56$ para (T25) y $0,00 \pm 0,56$ para (T50); como se observa en el (gráfico 6-3), los cuales fueron evaluados sobre 5 puntos (Tabla 13-3), (Guillaume, 2008, p. 39) reporta valores de 4.5 ± 1.5 para motilidad a las 0 horas, y 3.2 ± 1.7 para motilidad a las 3 horas, en la Raza Simental, valores que son superiores a los obtenidos en la presente investigación, debido posiblemente al diluyente que se utilizó en el proceso de congelación de semen.

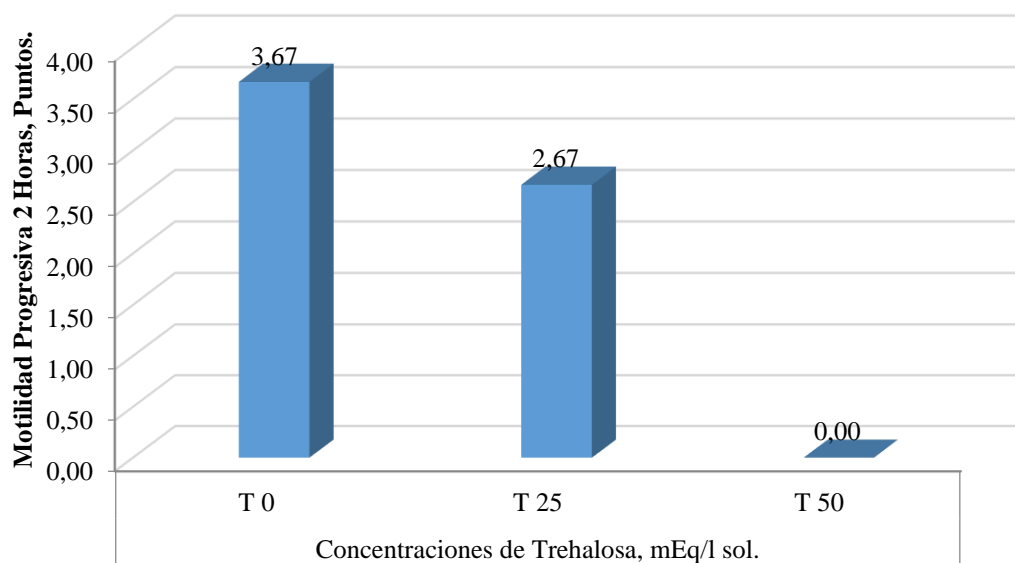


Gráfico 6-3. Motilidad progresiva de semen diluido de Bovinos Charolais evaluado a las 2 horas (pre-congelación) con diferentes concentraciones de Trehalosa.

Realizado por: Hernández Yesenia, 2019.

Al realizar el análisis de regresión se determinó que la motilidad progresiva 2 horas (puntos) pre-congelación de semen de bovinos Charolais frente a la utilización de diferentes concentraciones de Trehalosa (mEq) están relacionadas significativamente ($P < 0,01$); obteniendo un modelo de regresión lineal, que alcanzó un coeficiente de determinación y una alta correlación de $R^2 = 88,81\%$ y $r = 0,93$ respectivamente, identificándose que por incremento de la concentración de Trehalosa la motilidad progresiva 2 horas decrece $-0,07$ (puntos); (gráfico 7-3). A lo cual se aplicó la siguiente ecuación:

$$\text{Motilidad Progresiva 2 Horas, Puntos} = 3,94 - 0,07 (\text{CT}).$$

Donde:

CT = Concentraciones de Trehalosa (mEq).

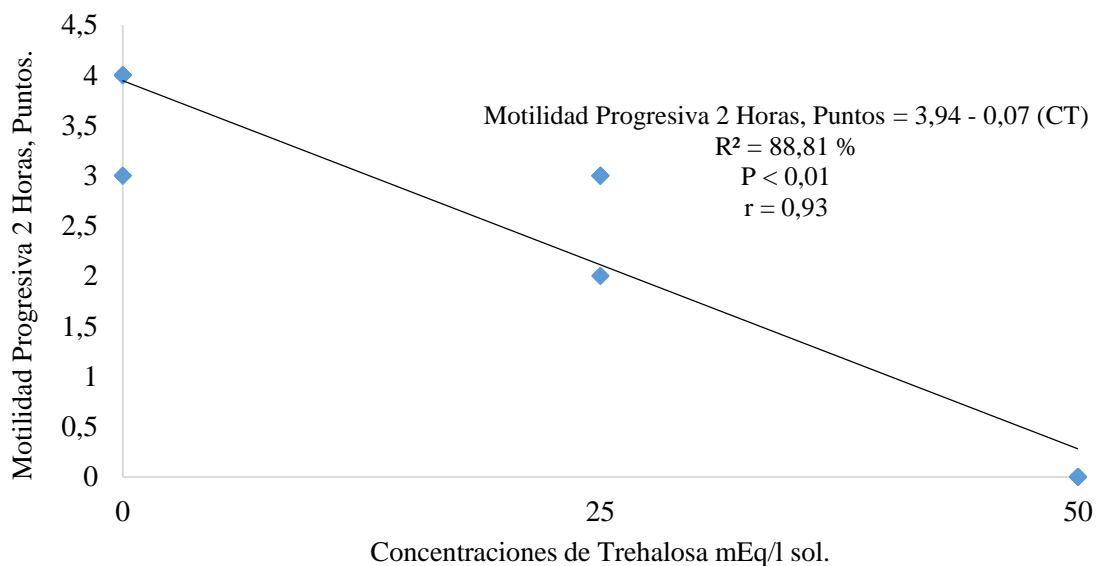


Gráfico 7-3. Tendencia de la Regresión de la motilidad progresiva 2 horas (pre-congelación), mediante la utilización de diferentes concentraciones de Trehalosa.

Realizado por: Hernández Yesenia, 2019.

2.2.3. Semen descongelado

Al evaluar la motilidad progresiva a las 0 horas, en semen post descongelado se alcanzó, una media de $3,88 \pm 0,23$ en el (T0), mientras que para (T25) fue de $2,50 \pm 0,23$, y para (T50) una media de $0,31 \pm 0,23$ como se aprecia en el (gráfico 8-3), esta variable fue evaluada en puntos.

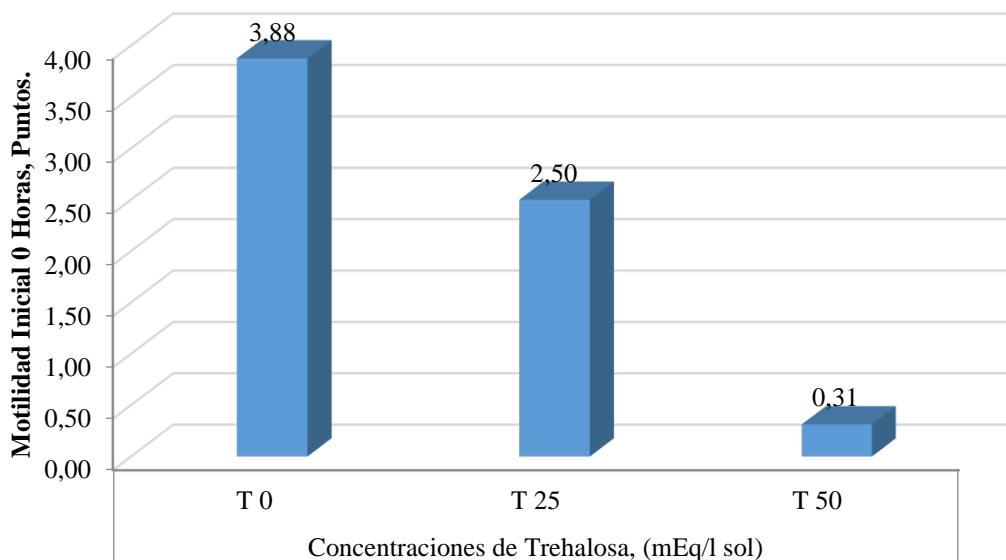


Gráfico 8-3. Motilidad individual de semen post-descongelado de Bovinos Charolais evaluado a las 0 horas (crio-preservado) con diferentes concentraciones de Trehalosa.

Realizado por: Hernández Yesenia, 2019.

En base al análisis de regresión se determinó que la motilidad progresiva 0 horas (puntos) de semen post-descongelado de Bovinos Charolais post-congelado frente a las diferentes concentraciones de Trehalosa (mEq) están relacionadas significativamente ($P < 0,01$); obteniendo un modelo de regresión lineal, que alcanzó un coeficiente de determinación y una alta correlación de $R^2 = 87,17\%$ y $r = 0,93$ respectivamente, identificándose que al incrementar las concentraciones de Trehalosa la motilidad progresiva 0 horas decrece $- 0,07$ (puntos); (gráfico 9-3). A lo cual se aplicó la siguiente ecuación:

$$\text{Motilidad Progresiva 0 Horas, Puntos} = 4,01 - 0,07 (\text{CT})$$

Donde:

CT = Concentraciones de Trehalosa (mEq).

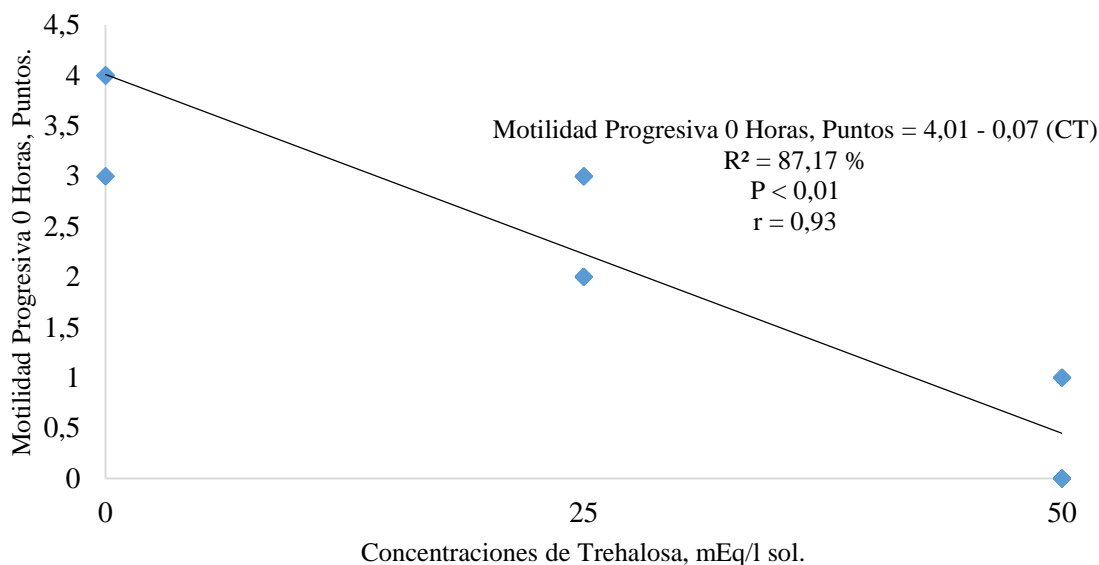


Gráfico 9.3. Tendencia de la Regresión de la motilidad progresiva 0 horas (post-congelación), mediante la utilización de diferentes concentraciones de Trehalosa.

Realizado por: Hernández Yesenia, 2019.

En el caso de motilidad Progresiva a las 2 Horas (crio-preservado), se evaluó en puntos, obteniendo $3,00 \pm 0,19$ para (T0), mientras que $1,81 \pm 0,19$ en el (T25) y para (T50) se obtuvo $0,00 \pm 0,19$ como se aprecia en el (gráfico 10-3), y los valores en el (Cuadro 14-3), (Ribeiro, 2014, p. 3), en su investigación reportó una media de $2,1 \pm 0,8$ raza Simental, valor que se encuentra dentro de los resultados obtenidos en la presente investigación, (Moncayo, 2016, p. 45), reporta una media de $3,00 \pm 0,98$ en la raza Angus valores que están dentro de los obtenidos en esta investigación.

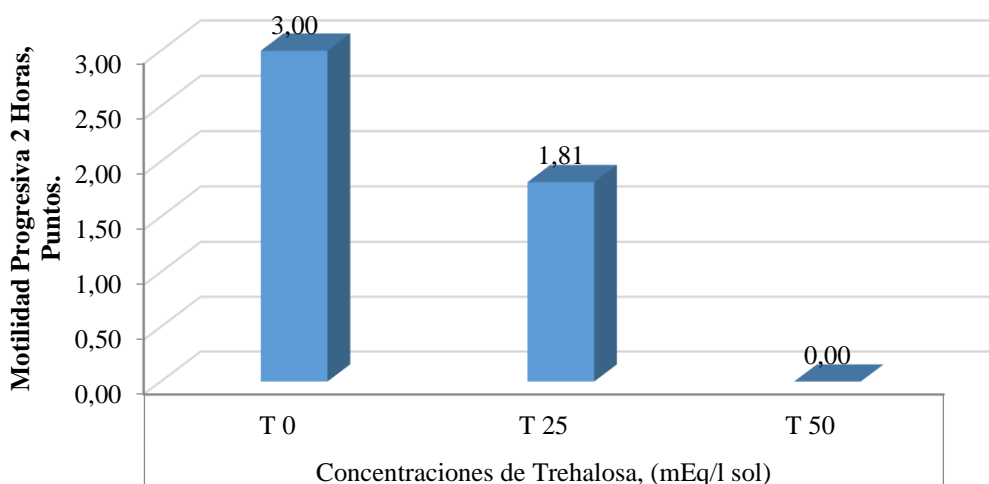


Gráfico 10.3. Motilidad individual de semen post-descongelado de Bovinos Charolais evaluado a las 2 horas (crio-preservado) con diferentes concentraciones de Trehalosa.

Realizado por: Hernández Yesenia, 2019.

En cuanto al análisis de regresión se determinó la motilidad progresiva 2 post-descongelado de Bovinos Charolais post-congelado frente a las diferentes concentraciones de Trehalosa (mEq) están relacionadas significativamente ($P < 0,01$); obteniendo un modelo de regresión lineal, que alcanzó un coeficiente de determinación y una alta correlación de $R^2 = 90,59 \%$ y $r = 0,95$ respectivamente, identificándose que al incrementar las concentraciones de Trehalosa la motilidad progresiva 2 horas decrece - 0,06 (puntos); (gráfico 11-3). A lo cual se aplicó la siguiente ecuación:

$$\text{Motilidad Progresiva 2 Horas, Puntos} = 3,10 - 0,06 (\text{CT})$$

Donde:

CT = Concentraciones de Trehalosa (mEq).

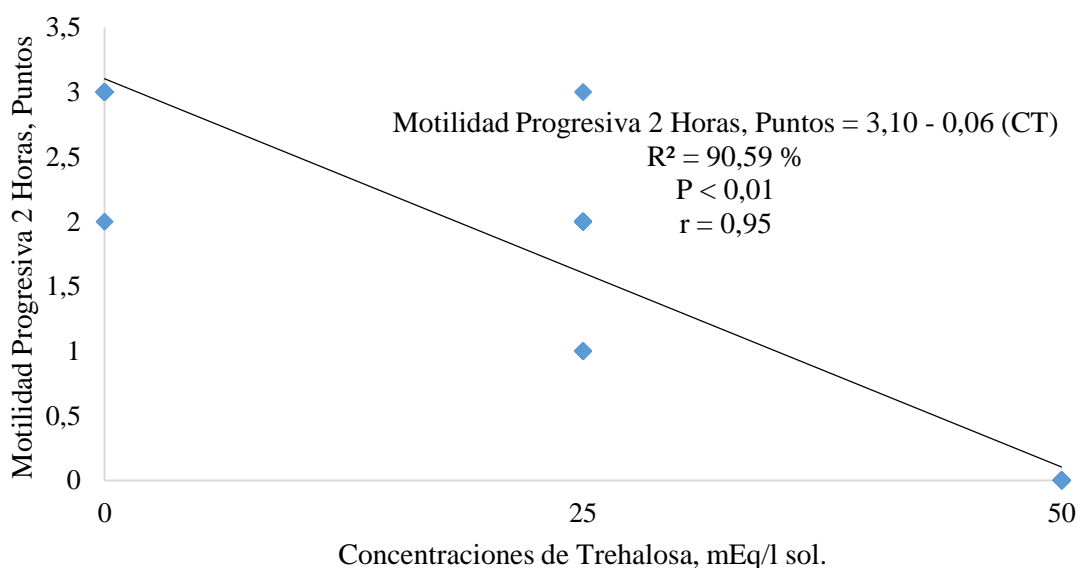


Gráfico 11-3. Tendencia de la Regresión de la motilidad progresiva 2 horas (post-congelación), mediante la utilización de diferentes concentraciones de Trehalosa.

Realizado por: Hernández Yesenia, 2019.

2.3. Determinación de células vivas y muertas

2.3.1. Semen Fresco

Al evaluar la cantidad de células vivas y muertas en semen fresco en los ocho saltos, se obtuvo una media de $88,97 \pm 1,72$ en células vivas mientras que $11,03 \pm 1,72$ para células muertas los

cuales fueron evaluados sobre 100 puntos (Tabla 12-3). (Ribeiro, 2014, p. 3), reporta valores de $69,4 \pm 10,7$ en células vivas y $30,6 \pm 10,7$ en células muertas, en la raza Simental valores que son inferiores a los obtenidos en la presente investigación, esto se puede deber a la forma de colecta y transporte de semen hacia el laboratorio antes del procesamiento.

2.3.2. Semen diluido (pre congelamiento)

La determinación de células vivas de semen pre-congelamiento, se alcanzó para el (T0) una media de $90,67 \pm 4,97$ mientras que para el (T25) fue de $78,92 \pm 4,97$ y para el (T50) se obtuvo $57,33 \pm 4,97$ de células vivas; como se aprecia en el (gráfico 12-3).

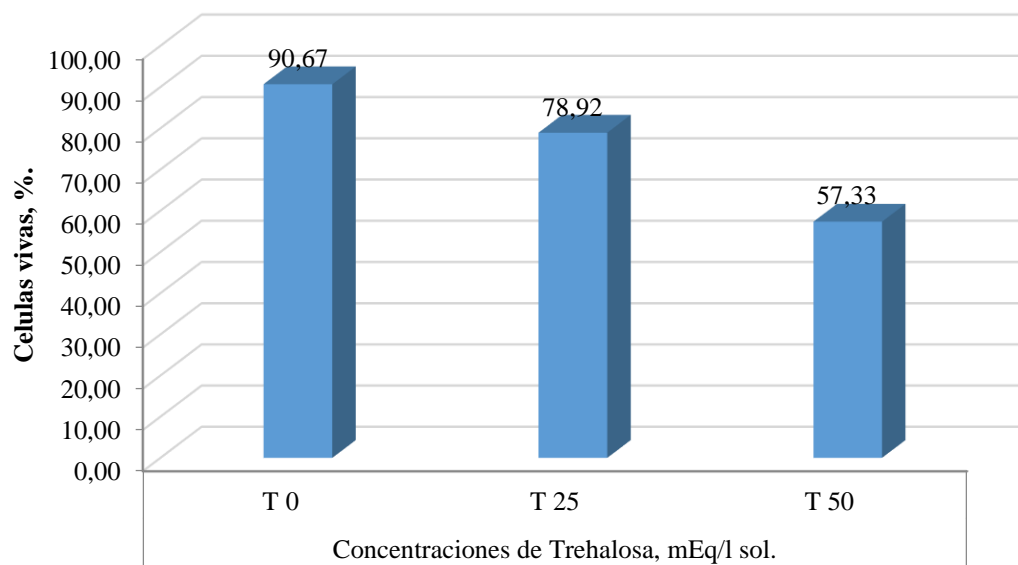


Gráfico 12-3. Células vivas de semen diluido de Bovinos Charolais (crio-preservado) con diferentes concentraciones de Trehalosa.

Realizado por: Hernández Yesenia, 2019.

Al someter la variable células vivas (%) pre-congelación frente a las diferentes concentraciones de Trehalosa (mEq) están relacionadas significativamente ($P < 0,01$); y presentó una tendencia lineal, que alcanzó un coeficiente de determinación y una alta correlación de $R^2 = 93,65 \%$ y $r = 0,96$ respectivamente, identificándose que al incrementar las concentraciones de Trehalosa la cantidad de células vivas disminuye $- 0,06$ (%); (gráfico 13-3). A lo cual se aplicó la siguiente ecuación:

$$\text{Células vivas, \%} = 92,30 - 0,66 (\text{CT}).$$

Donde:

CT = Concentraciones de Trehalosa (mEq).

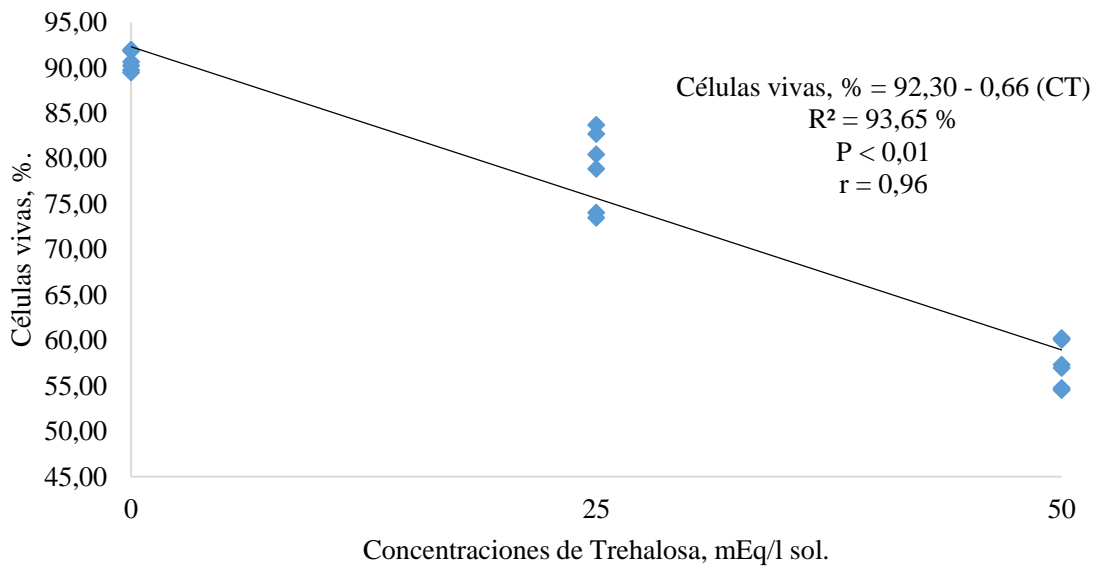


Gráfico 13-3. Tendencia de la Regresión de células vivas (pre-congelación), mediante la utilización de diferentes concentraciones de Trehalosa.

Realizado por: Hernández Yesenia, 2019.

Al evaluar las células muertas en el (T0) se obtiene una media de $9,33 \pm 4,97$; mientras que para (T25) una media de $21,08 \pm 4,97$ y para (T50) $42,67 \pm 4,97$, como se ilustra en el (Gráfico 14-3), los valores obtenidos se puede apreciar en el (Cuadro 13-3), (Guillaume, 2008, p. 39), reporta una media de 60 ± 20 para células vivas y una media de 40 ± 20 para células muertas, estos valores son inferiores en el caso de células vivas y valores superiores para células muertas a los obtenidos en la presente investigación, lo cual puede deber al manejo del semen antes del proceso de congelación.

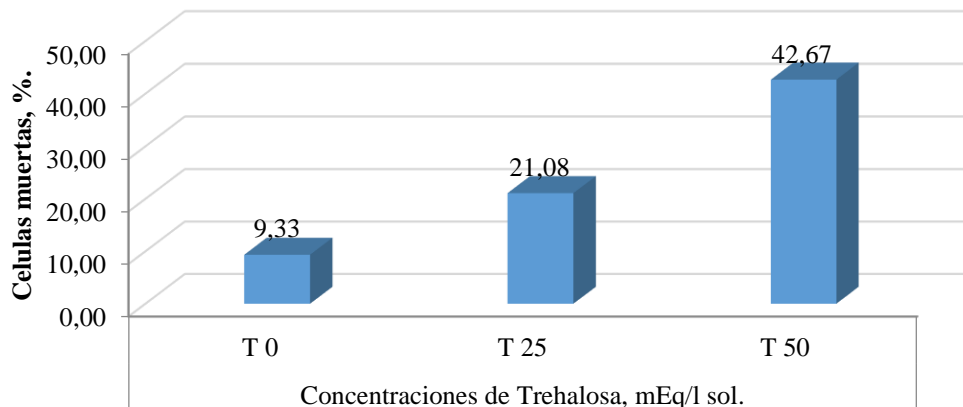


Gráfico 14-3. Células muertas de semen diluido de Bovinos (pre-congelado) con diferentes concentraciones de Trehalosa.

Realizado por: Hernández Yesenia, 2019.

Al someter la variable células muertas (%) pre-congelación frente a las diferentes concentraciones de Trehalosa (mEq) están relacionadas significativamente ($P < 0,01$); y presentó una tendencia lineal, que alcanzó un coeficiente de determinación y una alta correlación de $R^2 = 93,65\%$ y $r = 0,96$ respectivamente, identificándose que al incrementar las concentraciones de Trehalosa la cantidad de células muertas se incrementa $0,06\%$; (gráfico 15-3). A lo cual se aplicó la siguiente ecuación:

$$\text{Células muertas, \%} = 7,69 + 0,66 (\text{CT})$$

Donde:

CT = Concentraciones de Trehalosa (mEq).

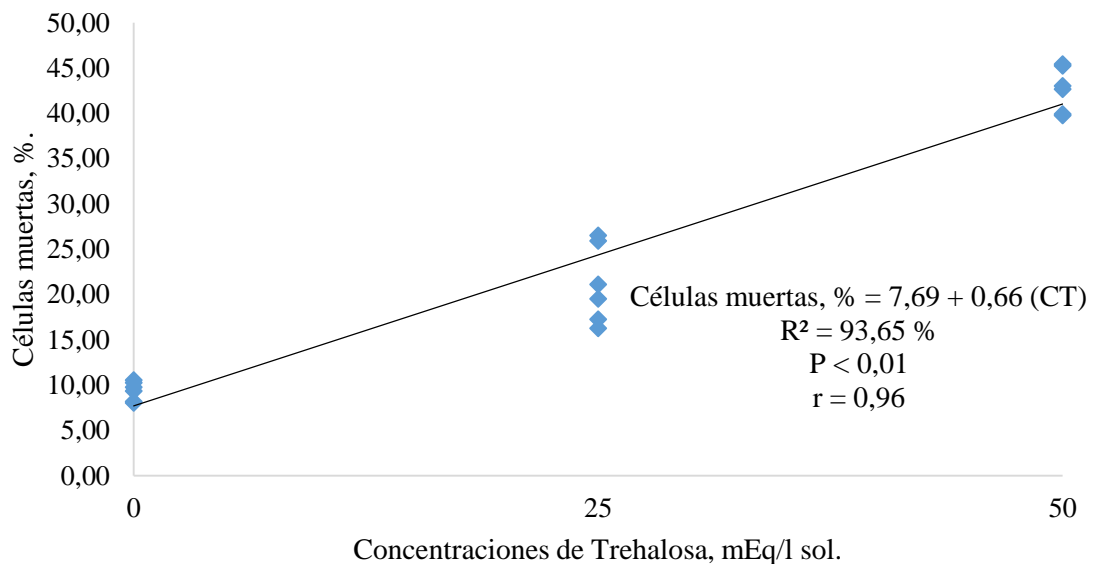


Gráfico 15-3. Tendencia de la Regresión de células muertas (pre-congelación), mediante la utilización de diferentes concentraciones de Trehalosa.

Realizado por: Hernández Yesenia, 2019.

2.3.3. *Semen descongelado*

Al determinar las células vivas de semen post descongelado se obtuvo que para células vivas, una media de $65,16 \pm 1,73$ para el (T0), mientras que para el (T25) la media fue de $56,27 \pm 1,73$, y para (T50) una media de $38,16 \pm 1,73$ como se aprecia en el (gráfico 16-3).

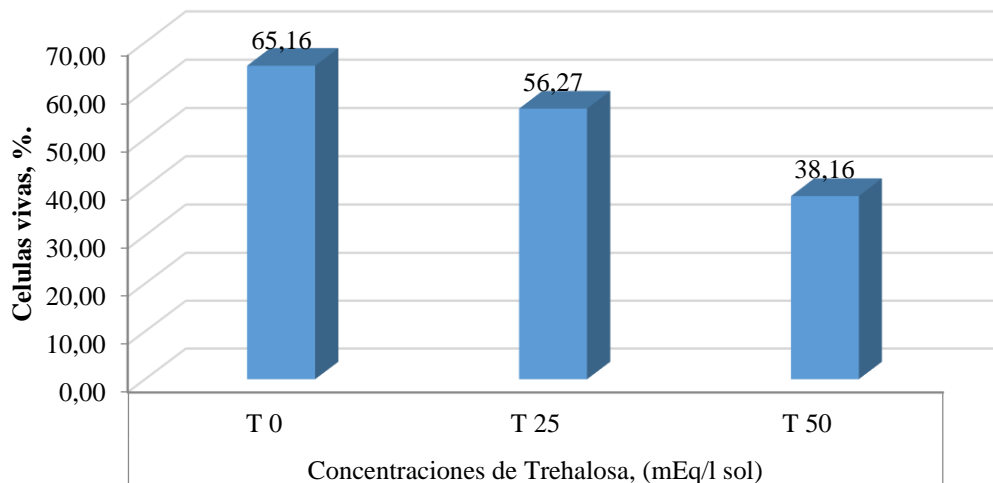


Gráfico 16-3. Células vivas de semen post-descongelado de Bovinos Charolais (crio-preservado) con diferentes concentraciones de Trehalosa.

Realizado por: Hernández Yesenia, 2019.

Al realizar el análisis de regresión de células vivas (post-congelación) frente a las diferentes concentraciones de Trehalosa (mEq) están relacionadas significativamente ($P < 0,01$); y presentó una tendencia lineal, que alcanzó un coeficiente de determinación y una alta correlación de $R^2 = 85,89\%$ y $r = 0,92$ respectivamente, identificándose que al incrementar las concentraciones de Trehalosa la cantidad de células vivas disminuye $-0,54\%$; (gráfico 17-3). A lo cual se aplicó la siguiente ecuación:

$$\text{Células vivas, \%} = 66,69 - 0,54 (CT)$$

Donde:

CT = Concentraciones de Trehalosa (mEq).

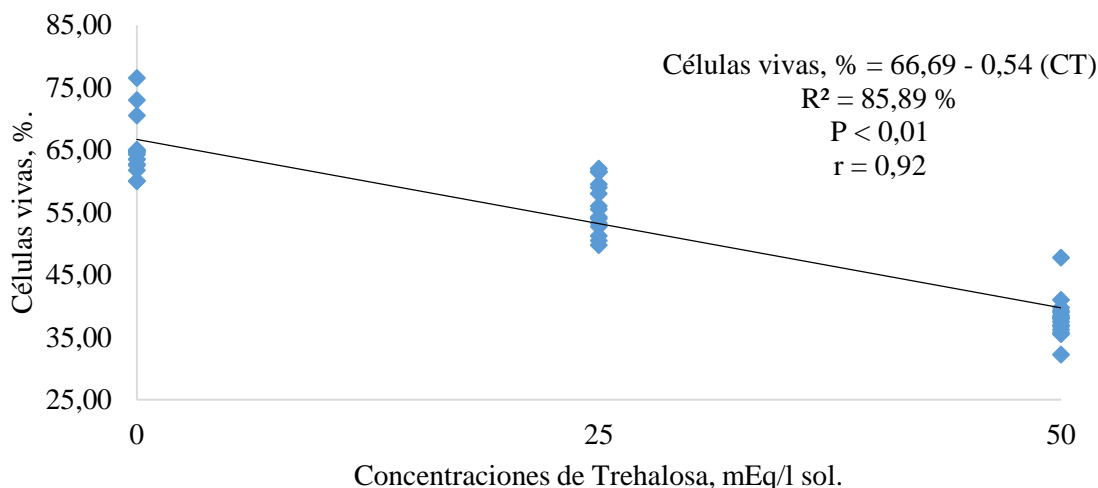


Gráfico 17-3. Tendencia de la Regresión de células vivas (post-congelación), mediante la utilización de diferentes concentraciones de Trehalosa.

Realizado por: Hernández Yesenia, 2019.

Para células muertas, se consiguió una media de $34,84 \pm 1,73$ para (T0), una media de $43,73 \pm 1,73$ en el T(25) y una media de $61,84 \pm 1,73$ como se observa en el (gráfico 18-3), los valores fueron calificados en porcentaje, como se presenta en el (Cuadro 14-3), mientras que (Ramónez, 2013, p. 5), reporta una media de $51,80 \pm 1,36$ para células vivas y para células muertas una media de $48,20 \pm 1,36$ valores que se encuentra dentro de los rangos reportados en la presente investigación, esto se puede deber al diluyente utilizado

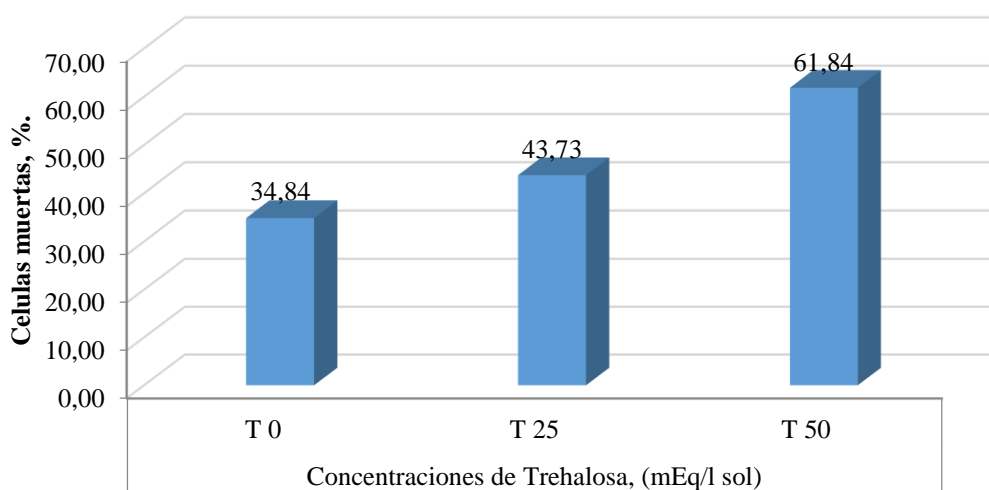


Gráfico 18-3. Células muertas de semen post-descongelado de Bovinos Charolais (crio-preservedo) con diferentes concentraciones de Trehalosa.

Realizado por: Hernández Yesenia, 2019.

Mediante el análisis de regresión de las células muertas (post-congelación) frente a las diferentes concentraciones de Trehalosa (mEq) están relacionadas significativamente ($P < 0,01$); y presentó una tendencia lineal, que alcanzó un coeficiente de determinación y una alta correlación de $R^2 = 85,89 \%$ y $r = 0,92$ respectivamente, identificándose que al incrementar las concentraciones de Trehalosa la cantidad de células muertas incrementa $0,54 \%$; (gráfico 19-3). A lo cual se aplicó la siguiente ecuación:

$$\text{Células muertas, \%} = 33,30 + 0,54 (\text{CT})$$

Donde:

CT = Concentraciones de Trehalosa (mEq).

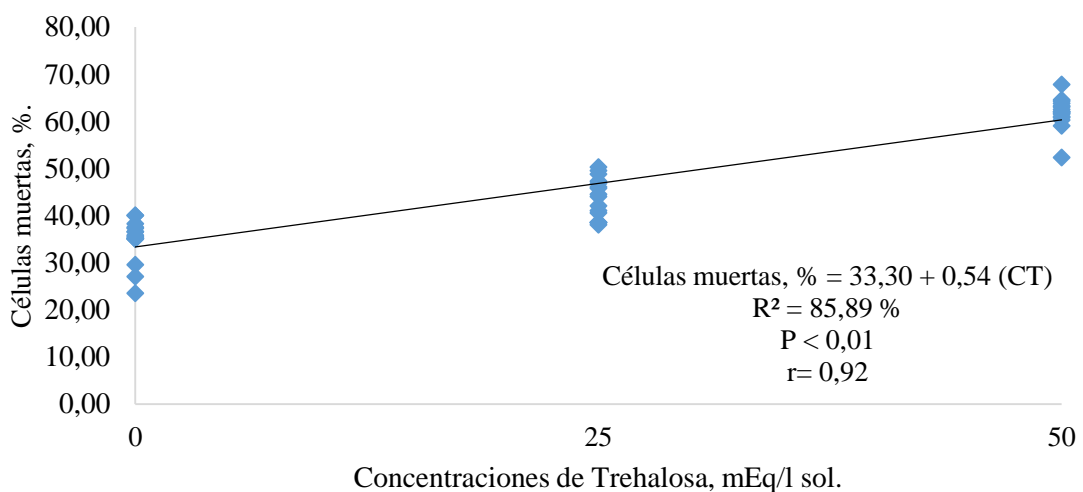


Gráfico 19-3. Tendencia de la Regresión de células muertas (post-congelación), mediante la utilización de diferentes concentraciones de Trehalosa.

Realizado por: Hernández Yesenia, 2019.

2.4. Concentración espermática (ml).

2.4.1. Semen fresco

La concentración espermática por ml en los ocho saltos realizados, se alcanzó una media de $650,00 \pm 380,00 \times 10^6$ espermatozoides/ml valores que se encuentran dentro de los rangos permitidos de espermatozoides, como se puede apreciar en el (Cuadro 12-3), mientras que (Guillaume, 2008, p. 39), reporta una media de $1800,00 \pm 460 \times 10^6$ ml en la Raza Simental, valores superiores a los obtenidos en la presente investigación, siendo así que (Martínez *et al.*, 2000, p. 702), presenta una media de $1379,00 \pm 544,00 \times 10^6$ ml para la raza Gir, valores que son muy

similares a los obtenidos en la presente investigación, los valores obtenidos se puede deber a la diferencia entre razas y las edades de los animales en la que fueron realizadas las colectas.

2.4.2. Semen diluido (pre congelamiento)

La concentración espermática de semen diluido pre-congelamiento se obtuvo para el (T0) una media de $32,33 \pm 2,78 \times 10^6 / 0,5 \text{ ml}$ mientras que para el (T25) fue de $31,33 \pm 2,42 \times 10^6 / 0,5 \text{ ml}$, y para (T50) fue de $32,16 \pm 1,05 \times 10^6 / 0,5 \text{ ml}$, como se presenta en el (gráfico 20-3), y los valores obtenidos se observan en el (Tabla 13-3), en el estudio realizado por (Moncayo, 2016, p. 46), se reporta valores de $20,40 \times 10^6 / 0,5 \text{ ml}$ en la raza Angus, valores que son inferiores a los obtenidos en la presente investigación.

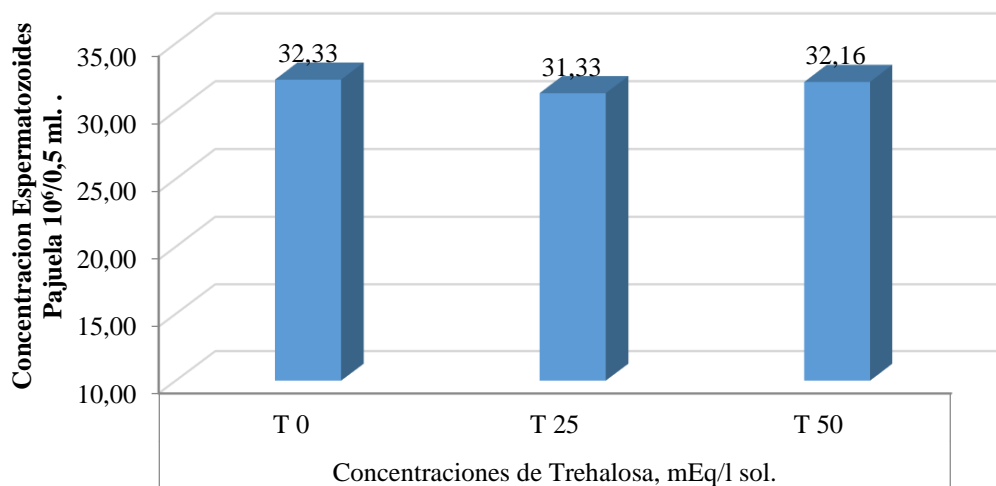


Gráfico 20-3. Concentración espermática de pajuelas de 0,5 ml, en semen diluido de Bovinos Charolais (crio-preservado) con diferentes concentraciones de Trehalosa.

Realizado por: Hernández Yesenia, 2019.

2.4.3. Semen descongelado

En la concentración espermática de semen descongelado en los tres tratamientos se logró para el (T0) una media de $33,34 \pm 2,23 \times 10^6 / 0,5 \text{ ml}$, mientras que para (T25) una media de $32,84 \pm 1,99 \times 10^6 / 0,5 \text{ ml}$ y para (T50) fue de $32,96 \pm 1,96 \times 10^6 / 0,5 \text{ ml}$, como se observa en el (gráfico 21-3), y los valores obtenidos en el (Tabla 14-3), en la investigación de (Moncayo, 2016, p. 45), reporta una media de $15,80 \times 10^6 / 0,5 \text{ ml}$ en la raza Angus, valores que son inferiores a los obtenidos en la presente investigación esto se puede deber a la calidad de semen que se utilizó antes de la congelación, tomando en cuenta que es suficiente cinco millones de espermatozoides por pajuela para que sea viable.

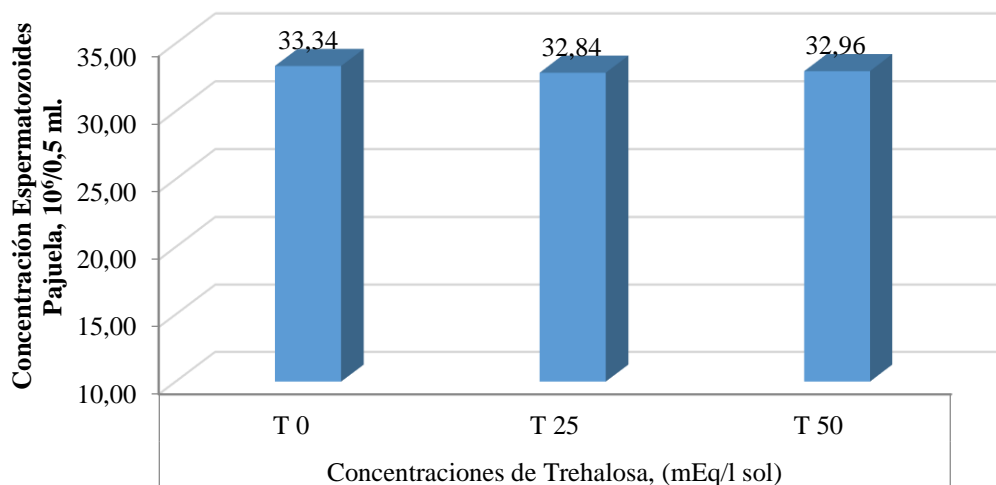


Gráfico 21-3. Concentración espermática de pajuelas de 0,5 ml, en semen post-descongelado de Bovinos Charolais (crio-preservado) con diferentes concentraciones de Trehalosa.

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

2.5. Daños de membrana

2.5.1. Semen Fresco

Al evaluar los daños de la membrana en semen fresco de los ocho saltos, se obtuvo una media de $11,03 \pm 1,72$ los cuales fueron evaluados sobre 100 puntos (Tabla 12-3), mientras que (Ribeiro, 2014, p. 6) reporta valores de $30,6 \pm 10,7$ en células muertas, en la raza Simental valores que son superiores a los obtenidos en la presente investigación, esto se puede deber al mal manejo del semen en el laboratorio permitiendo así mayor permeabilidad de la membrana una vez que las células mueren y permitiendo el paso de las tinturas para identificación.

2.5.2. Semen diluido (pre congelamiento)

La determinación de daños de la membrana en semen pre-congelamiento en los tres tratamientos, se logró una media de para el (T0) de $9,33 \pm 1,16$, mientras que para el (T25) con $21,08 \pm 1,16$ y seguido del (T50) de $42,67 \pm 1,16$, los valores obtenidos se puede apreciar en el (Tabla 13-3), (Guillaume, 2008, p. 39), reporta una media de 40 ± 20 para daños de la membrana, este valor se encuentra dentro de los obtenidos en la presente investigación esto se puede deber al tiempo empleado antes del proceso de congelación, incrementando la muerte de los espermatozoides y habilitando la permeabilidad de la membrana.

2.5.3. Semen descongelado

Al determinar los daños de la membrana en semen descongelado en los tres tratamientos, se obtuvo una media de $34,84 \pm 1,43$ para (T0), seguido del T(25) con $43,73 \pm 1,43$; y $61,84 \pm 1,43$ para el (T50); los valores fueron representados en porcentaje, como se presenta en el (Tabla 14-3), mientras que (Ramónez, 2013, p. 3), reporta una media de $51,80 \pm 1,36$ para daños de la membrana valores que se encuentra dentro de los rangos reportados en la presente investigación, siendo así que la permeabilidad de la membrana hace que los iones se intercambien y facilite su identificación.

2.6. Morfología espermática

2.6.1. Semen fresco

La morfología espermática en semen fresco, en la evaluación de los ocho saltos; se realizó por separación siendo así que la morfología de la cabeza presentan una media de $7,16 \pm 0,29$; en la parte media una media de $2,44 \pm 0,12$ y en la cola una media de $11,38 \pm 0,37$, como se puede apreciar en el (Tabla 12-3); mientras que (Martínez *et al.*, 2000, p. 702) presenta una media para la cabeza del espermatozoide de $2,26 \pm 0,48$; para la parte media $2,80 \pm 0,46$ y para la cola $5,09 \pm 2,51$ en la raza Gir, valores que son inferiores a los que se obtuvo en la presente investigación lo que se puede deber a condiciones ambientales.

2.6.2. Semen diluido (pre congelamiento)

La morfología de semen diluido pre-congelamiento en los tres tratamientos; se obtuvo una media de $2,58 \pm 0,28$ para el (T0), para (T25) $3,25 \pm 0,28$ y para (T50) $4,00 \pm 0,28$ correspondiente a la morfología de la cabeza como se aprecia en el (gráfico 22-3).

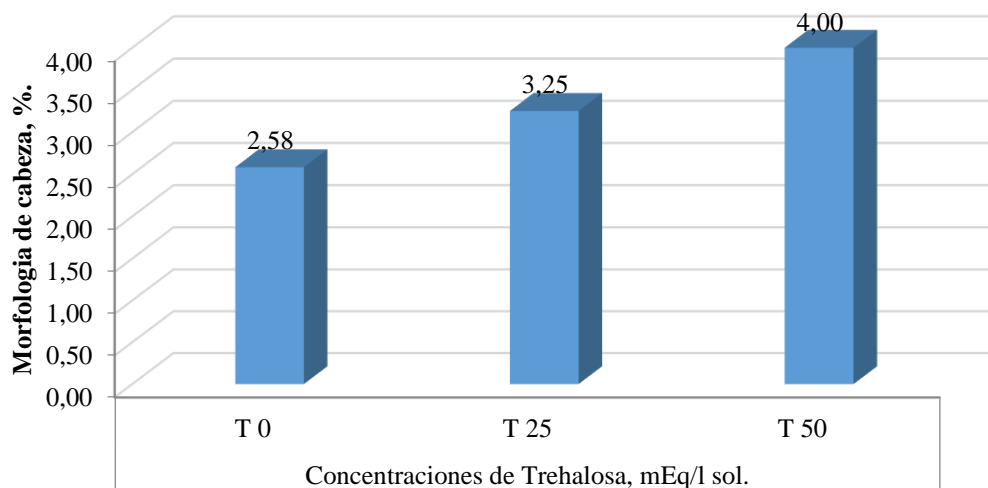


Gráfico 22-3. Morfología de la cabeza de semen diluido de Bovinos Charolais (pre congelado) con diferentes concentraciones de Trehalosa.

Realizado por: Hernández Yesenia, 2019.

Al realizar el análisis de regresión de morfología de la cabeza, (%) (pre-congelación) frente a las diferentes concentraciones de Trehalosa (mEq) están relacionadas significativamente ($P < 0,01$); y presentó una tendencia lineal, que alcanzó un coeficiente de determinación y una alta correlación de $R^2 = 54,23 \%$ y $r = 0,73$ respectivamente, identificándose que al incrementar las concentraciones de Trehalosa se incrementa la cantidad de la morfología de la cabeza en $0,02 \%$; (gráfico 23-3). A lo cual se aplicó la siguiente ecuación:

$$\text{Morfología de la cabeza, \%} = 2,56 + 0,02 (\text{CT})$$

Donde:

CT = Concentraciones de Trehalosa (mEq).

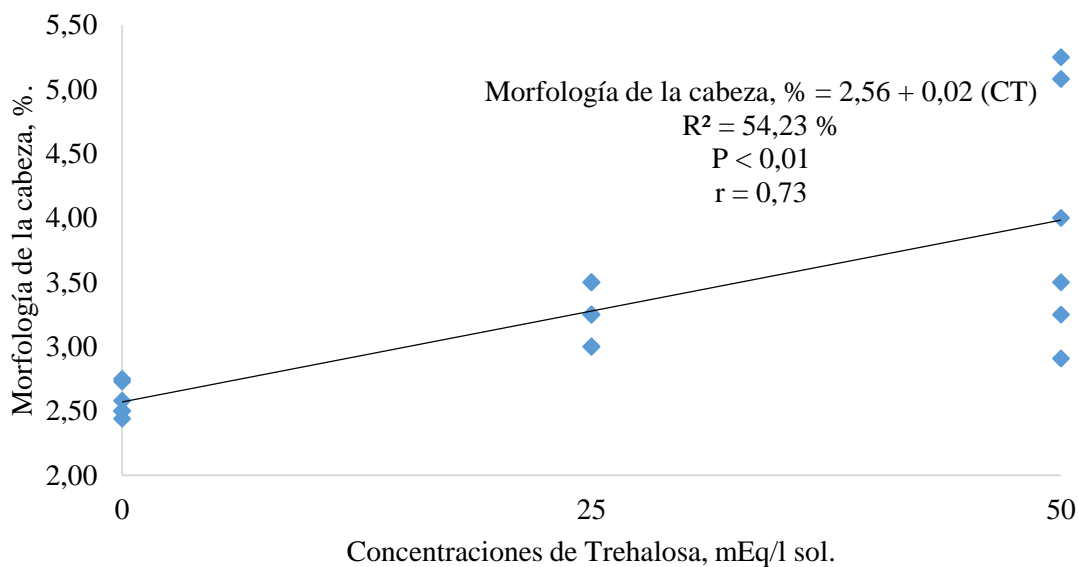


Gráfico 23-3. Tendencia de la Regresión de morfología de la cabeza (pre-congelación), mediante la utilización de diferentes concentraciones de Trehalosa.

Realizado por: Hernández Yesenia, 2019.

Para morfología de la cola se observa que (T0) logró una media de $5,58 \pm 0,96$, para (T25) alcanzó una media de $8,83 \pm 0,96$, y para (T50) consiguió una media de $12,08 \pm 0,96$ como se ilustra en el gráfico 24.3.

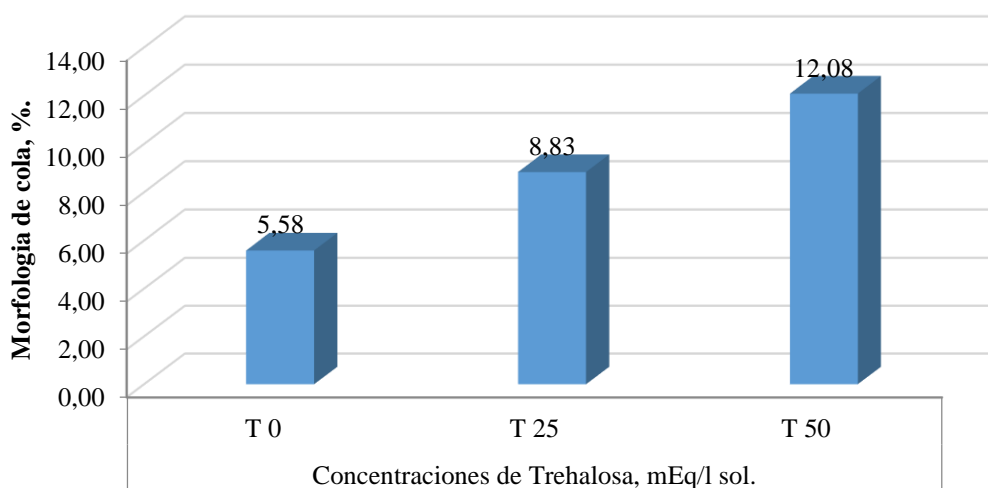


Gráfico 24-3. Morfología de cola de semen diluido de Bovinos Charolais (pre-congelado) con diferentes concentraciones de Trehalosa.

Realizado por: Hernández Yesenia, 2019.

En el análisis de regresión en la morfología de cola (%) pre-congelación, frente a las diferentes concentraciones de Trehalosa (mEq) están relacionadas significativamente ($P < 0,01$); y presentó una tendencia lineal, que alcanzó un coeficiente de determinación y una alta correlación de $R^2 =$

94,77 % y $r = 0,97$ respectivamente, identificándose que al incrementar las concentraciones de Trehalosa se incrementa la cantidad de células con morfología de la cola en 0,13 (%); (gráfico 25-3). A lo cual se aplicó la siguiente ecuación:

$$\text{Morfología de la cola, \%} = 5,58 + 0,13 (\text{CT})$$

Donde:

CT = Concentraciones de Trehalosa (mEq).

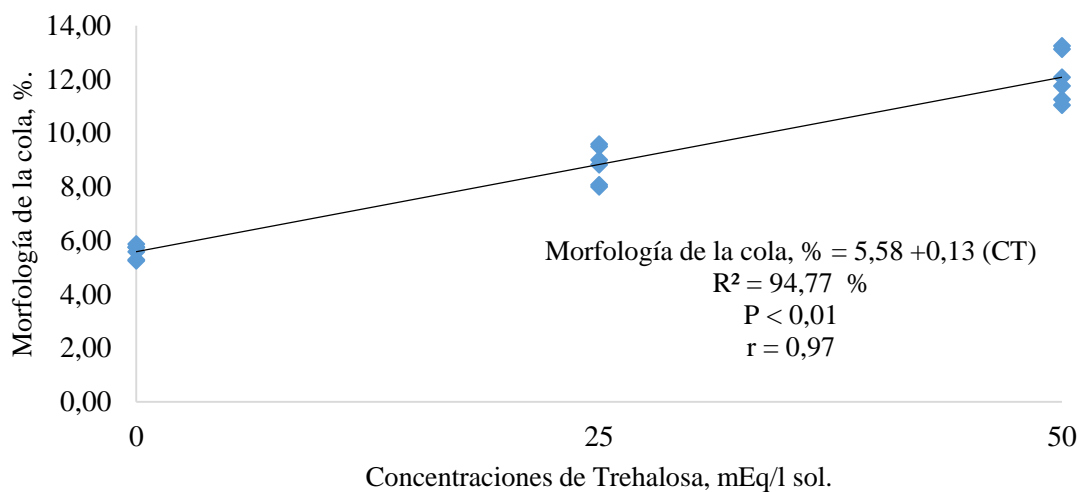


Gráfico 25-3. Tendencia de la Regresión de morfología de la cola (pre-congelación), mediante la utilización de diferentes concentraciones de Trehalosa.

Realizado por: Hernández Yesenia, 2019.

Mientras que en espermatozoides normales el (T0) alcanzó una media de $91,83 \pm 1,16$, (T25) $87,92 \pm 1,16$ y para (T50) $83,92 \pm 1,16$ en el (gráfico 26.3) se puede observar la relación entre tratamientos, los valores expresado se aprecia en el (Cuadro 13-3); en la investigación de (Oliveira, 2009, p. 39), presenta una media de $7,59 \pm 5,40$ para morfología de la cabeza, una media $9,18 \pm 9,44$ para la cola y una media de $83,23 \pm 2,45$ en bovinos de la raza Nelore de 20 meses de edad, valores que son inferiores a los obtenidos en la presente investigación, esto posiblemente se deba al diluyente utilizado para la valoración.

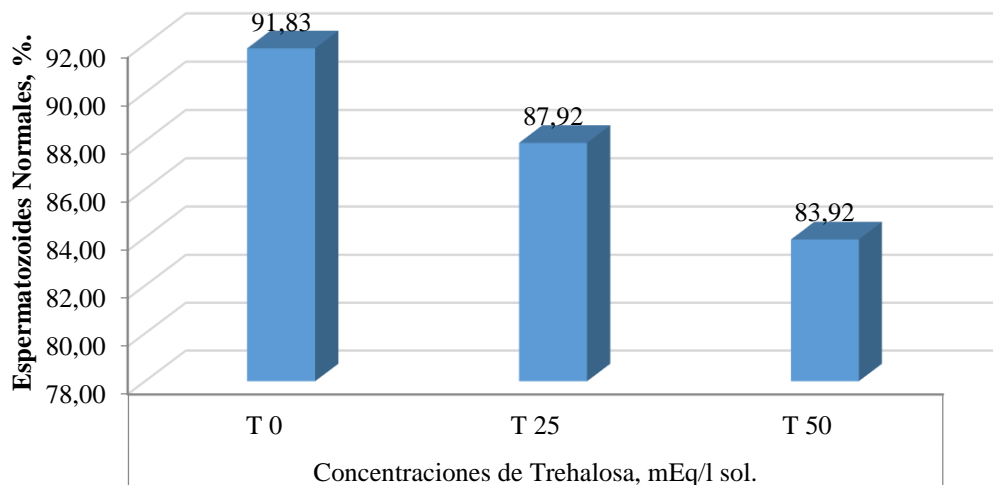


Gráfico 26-3. Espermatozoides Normales en semen diluido de Bovinos Charolais (pre congelado) con diferentes concentraciones de Trehalosa.

Realizado por: Hernández Yesenia, 2019.

En base al análisis de regresión de espermatozoides normales (%) pre-congelación, frente a las diferentes concentraciones de Trehalosa (mEq) están relacionadas significativamente ($P < 0,01$); y presentó una tendencia lineal, que alcanzó un coeficiente de determinación y una alta correlación de $R^2 = 97,00\%$ y $r = 0,98$ respectivamente, identificándose que al incrementar las concentraciones de Trehalosa la cantidad de espermatozoides normales desciende en $-0,15$ (%); (gráfico 27-3). A lo cual se aplicó la siguiente ecuación:

$$\text{Espermatozoides normales, \%} = 91,84 - 0,15 (\text{CT})$$

Donde:

CT = Concentraciones de Trehalosa (mEq).

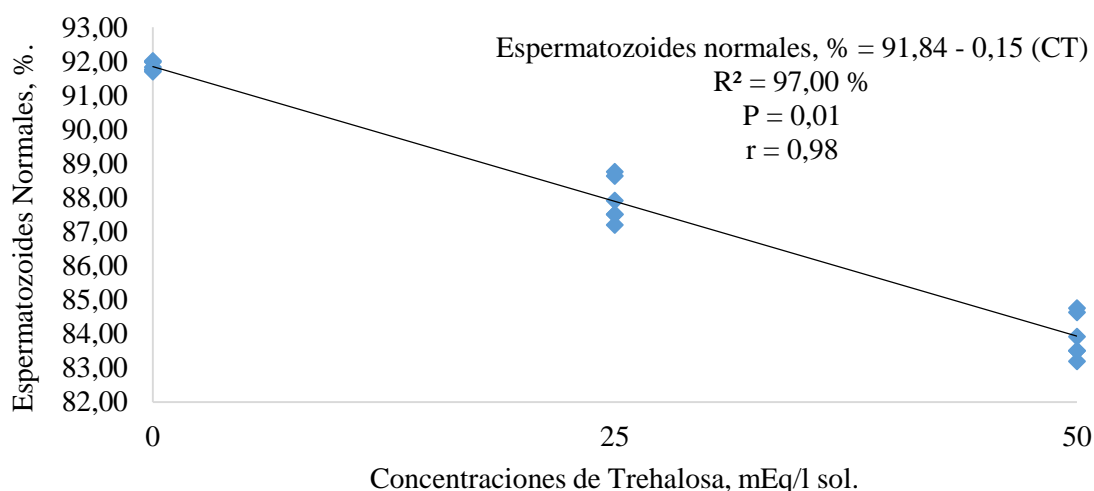


Gráfico 27-3. Tendencia de la Regresión de espermatozoides normales (pre-congelación), mediante la utilización de diferentes concentraciones de Trehalosa.

Realizado por: Hernández Yesenia, 2019.

2.6.3. Semen descongelado

En la morfología de semen descongelado en los tres tratamientos; se logró una media de $3,34 \pm 0,34$ para el (T0), para (T25) obtuvo una media de $5,66 \pm 0,34$ y para (T50) una media de $8,19 \pm 0,34$ correspondiente a la morfología de la cabeza como se aprecia en el (gráfico 28-3).

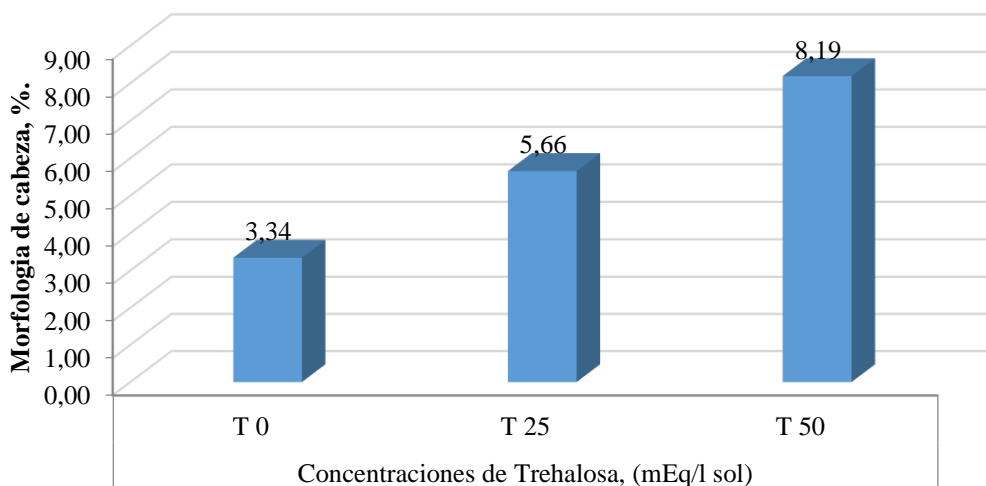


Gráfico 28-3. Morfología de la cabeza en semen post-descongelado de Bovinos Charolais (crio-preservado) con diferentes concentraciones de Trehalosa.

Realizado por: Hernández Yesenia, 2019.

En el análisis de regresión morfología de la cabeza (%) post-congelación, frente a las diferentes concentraciones de Trehalosa (mEq) están relacionadas significativamente ($P < 0,01$); y presentó

una tendencia lineal, que alcanzó un coeficiente de determinación y una alta correlación de $R^2 = 71,78\%$ y $r = 0,84$ respectivamente, identificándose que al incrementar las concentraciones de Trehalosa la morfología de la cabeza se incrementa en $0,09\%$; (gráfico 29-3). A lo cual se aplicó la siguiente ecuación:

$$\text{Morfología de la cabeza, \%} = 3,30 + 0,09 (\text{CT})$$

Donde:

CT = Concentraciones de Trehalosa (mEq).

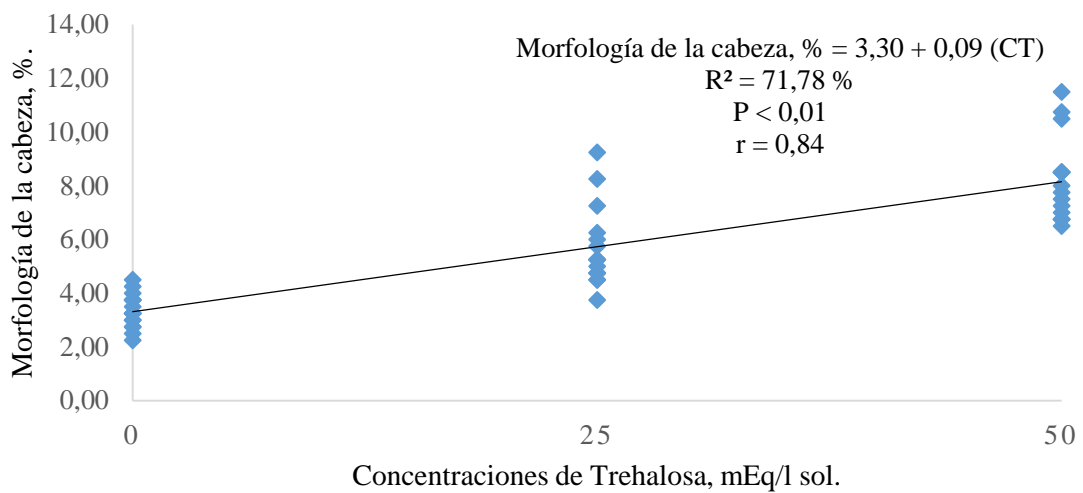


Gráfico 29-3. Tendencia de la Regresión de Morfología de la cabeza en semen post-descongelado de Bovinos Charolais (crio-preservado) con diferentes concentraciones de Trehalosa.

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

Para morfología de la cola se observa que (T0) alcanzó una media de $6,08 \pm 0,44$, para (T25) $9,30 \pm 0,44$, y para (T50) $12,70 \pm 0,44$, como se refleja en (gráfico 30.3).

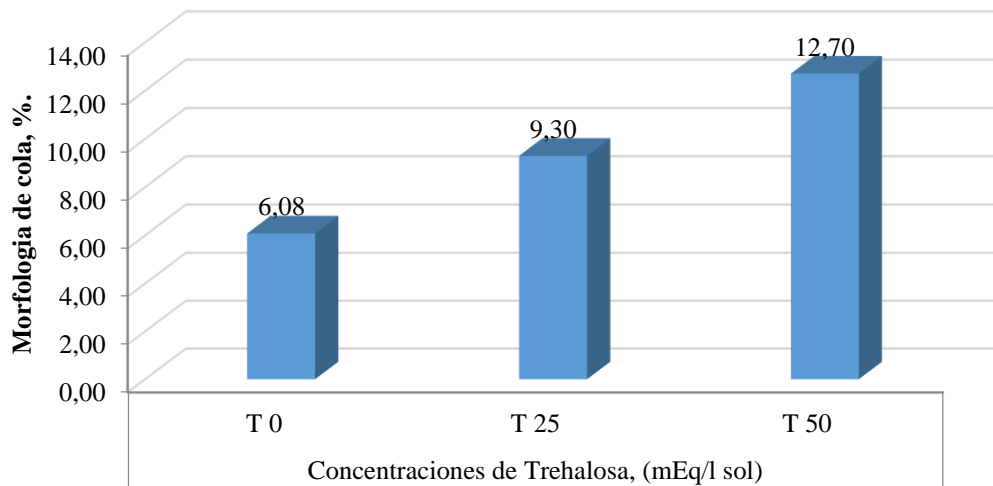


Gráfico 30-3. Morfología de la cola en semen post-descongelado de Bovinos Charolais (crio-preservado) con diferentes concentraciones de Trehalosa.

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

Al analizar la variable morfología de cola (%) post-congelación, frente a las diferentes concentraciones de Trehalosa (mEq) están relacionadas significativamente ($P < 0,01$); y presentó una tendencia lineal, que alcanzó un coeficiente de determinación y una alta correlación de $R^2 = 79,78\%$ y $r = 0,89$ respectivamente, identificándose que al incrementar las concentraciones de Trehalosa la morfología de cola se incrementa en $0,13\%$; (gráfico 31-3). A lo cual se aplicó la siguiente ecuación:

$$\text{Morfología de cola, \%} = 6,04 + 0,13 (\text{CT})$$

Donde:

CT = Concentraciones de Trehalosa (mEq).

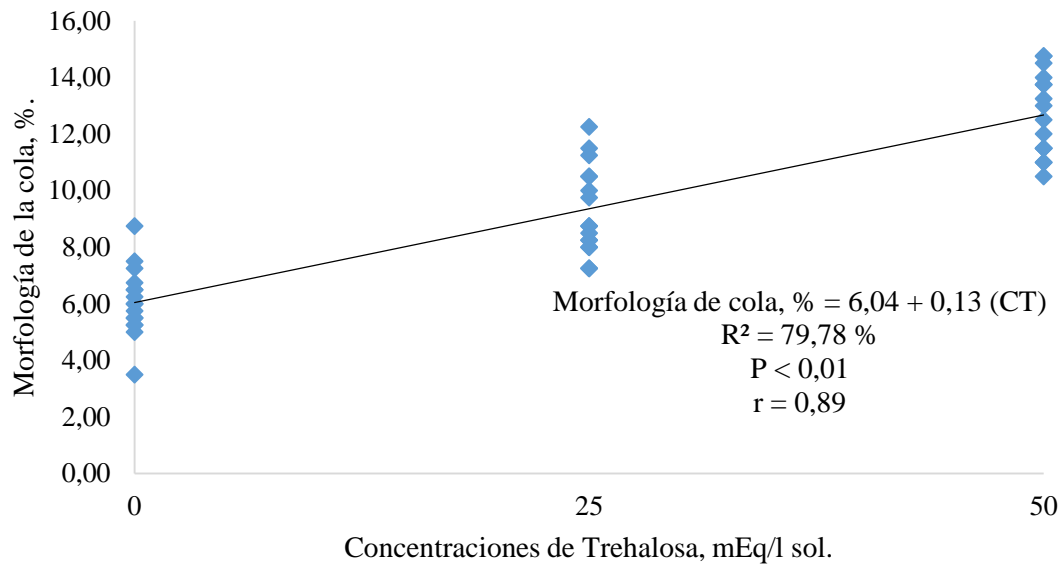


Gráfico 31-3. Tendencia de la Regresión de Morfología de la cola en semen post-descongelado de Bovinos Charolais (crio-preservado) con diferentes concentraciones de Trehalosa.

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

Mientras que en espermatozoides normales el (T0) se alcanzó una media de $90,58 \pm 0,76$, (T25) $85,00 \pm 0,76$ y para (T50) $79,11 \pm 0,76$ en el (gráfico 32-3) se puede observar la variabilidad de los espermatozoides por tratamiento, como se aprecia en el (Tabla 14-3); (Morón & Morón, 2015, p. 64), en su investigación reportan $8,30 \pm 0,99$ para morfología de la cabeza, y una media de $15,0 \pm 4,38$ para morfología en la cola, y $76,70 \pm 4,12$ para espermatozoides normales en la raza Brahman, valores muy similares a los obtenidos en la presente investigación, esto posiblemente se deba al intervalo de colecta de semen.

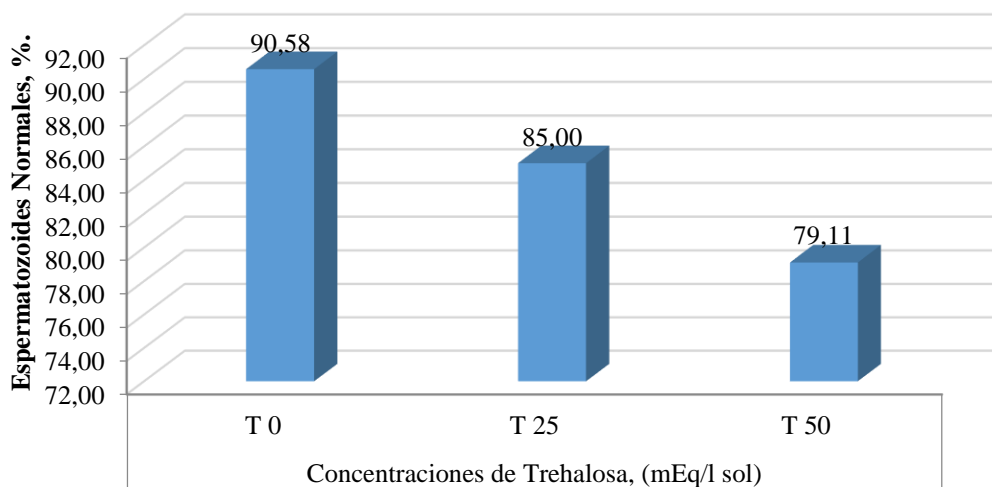


Gráfico 32-3. Espermatozoides Normales en semen post-descongelado de Bovinos Charolais (crio-preservado) con diferentes concentraciones de Trehalosa.

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

En cuanto al análisis de regresión se determinó los espermatozoides normales (%) post-congelación, frente a las diferentes concentraciones de Trehalosa (mEq) están relacionadas significativamente ($P < 0,01$); y presentó una tendencia lineal, que alcanzó un coeficiente de determinación y una alta correlación de $R^2 = 79,99 \%$ y $r = 0,89$ respectivamente, identificándose que al incrementar las concentraciones de Trehalosa la cantidad de espermatozoides normales tiende a disminuir en $- 0,22 \%$; (gráfico 31-3). A lo cual se aplicó la siguiente ecuación:

$$\text{Espermatozoides normales, \%} = 90,63 - 0,22 (\text{CT})$$

Donde:

CT = Concentraciones de Trehalosa (mEq).

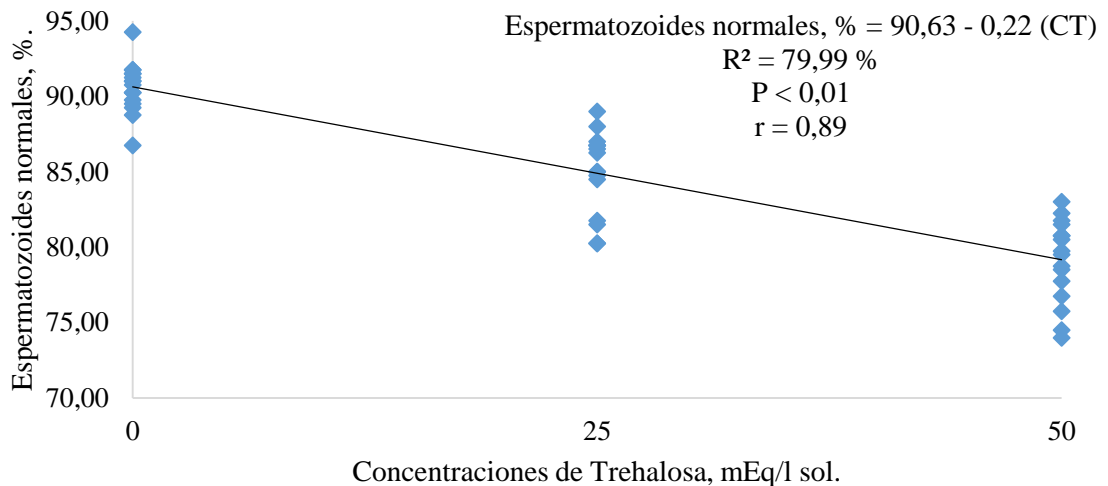


Gráfico 33-3. Tendencia de la Regresión de Espermatozoides Normales en semen post-descongelado de Bovinos Charolais (crio-preservado) con diferentes concentraciones de Trehalosa.

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

2.7. Anormalidades del espermatozoide.

2.7.1. Semen fresco

Las anormalidades del espermatozoide en semen colectado en los ocho saltos, se alcanzó un promedio de 14,31 % para anormalidades de la cabeza; dentro de los cuales se pudo observar

microcefalia 2,81%, desprendidas 3,13 %, angostas 2,06 %, redonda 2,38 %, alargada 1,94 % y macrocefalia 2,00 (Gráfico 34-3).

Anormalidades de la cabeza, %.

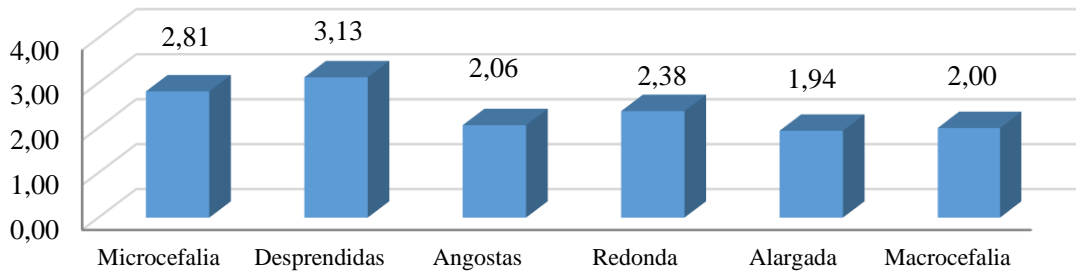


Gráfico 34-3. Anormalidades de cabeza en semen fresco de Bovinos Charolais.

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

En las anomalías de la parte media se encontró gotas citoplasmáticas proximales 2,69 % y gotas citoplasmáticas distales 2,19 %; con un promedio de anomalías de 4,88 %, como se aprecia en el gráfico 35-3.

Anormalidades de parte media, %.

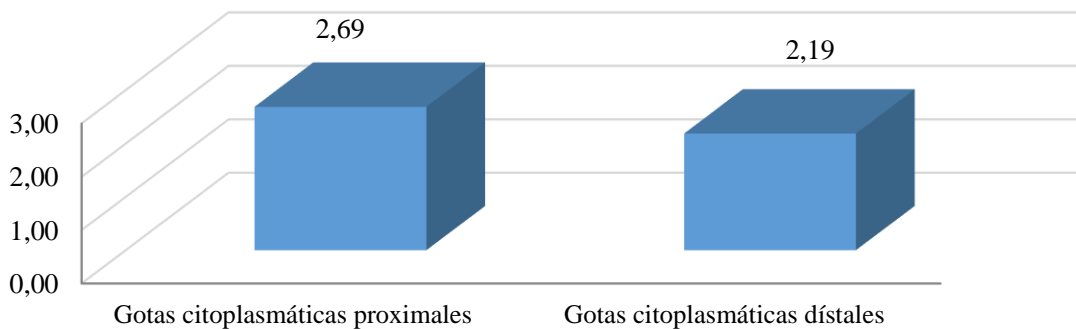


Gráfico 35-3. Anormalidades de la parte media en semen fresco de Bovinos Charolais.

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

En lo relacionado a anomalías de la cola se logró un promedio de 19,06 %, dentro de los cuales se encontraron colas cortas 3,81 %; enrollada 3,81 %; largas 3,31 %; rotas 3,44 %; y látigo 4,69 % como se lo puede observar en el gráfico 36-3.

(Hack, 2016, p.62), reporta una media de 11,6 % para defectos totales de espermatozoides, 6,9 % para defectos mayores y 4,6 % para defectos menores en *bos indicus*, valores que son inferiores a los obtenidos en la presente investigación, lo que puede deberse a la edad de los reproductores.

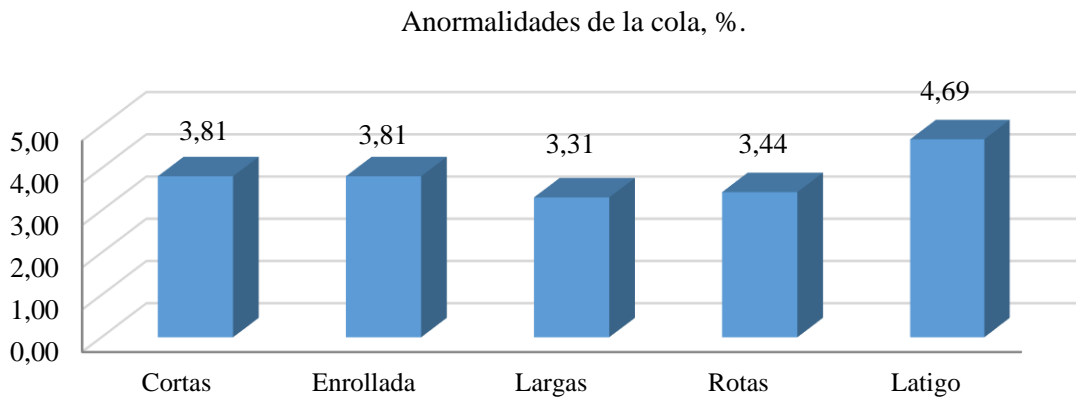


Gráfico 36-3. Anormalidades de cola en semen fresco de Bovinos Charolais.

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

2.7.2. Semen diluido (pre congelamiento)

Las anormalidades del semen diluido pre-congelamiento en los tres tratamientos; se alcanzó un promedio de 1,94 % para el (T0), para (T25) 2,44 % y para (T50) 3,00 %, correspondiente a la anormalidades de la cabeza como se aprecia en el (gráfico 37-3).

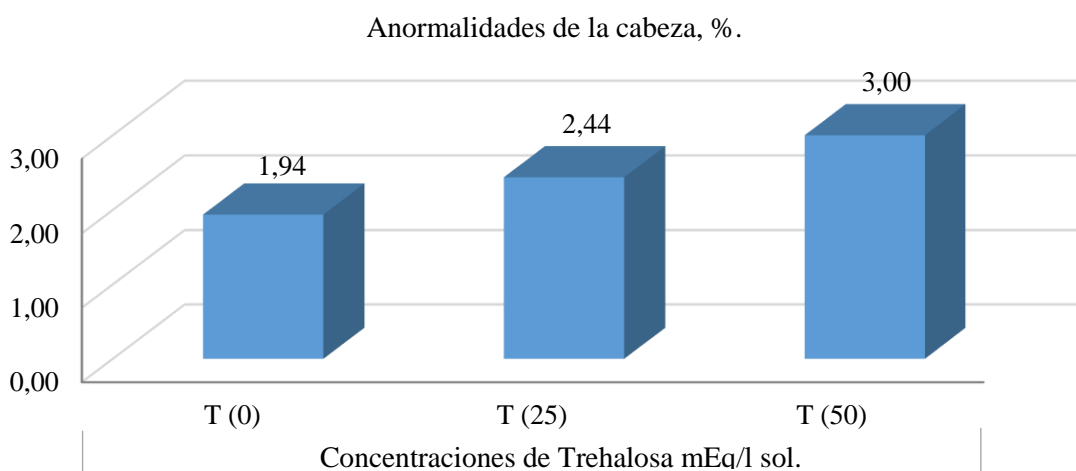


Gráfico 37-3. Anormalidades de la cabeza de semen diluido de Bovinos Charolais (pre congelado) con diferentes concentraciones de Trehalosa.

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

Para las anomalías de la parte media no se observa ninguna variación, en ningún tratamiento utilizado.

Mientras que en anomalías de la cola se puede observar una media de 4,19 % para (T0), para (T25) se logró una media 6,63 % y para (T50) una media de 9,06 % como se aprecia en el (gráfico 38-3). (Medina, 2007, p. 4), en su investigación reportan 38,2 % para defectos mayores de espermatozoides, mientras que 5,6 % para morfología de espermatozoides menores, en bovinos Montana de Brasil, valores que son superiores a los obtenidos en la presente investigación, esto posiblemente se deba a la manipulación del semen antes del proceso de congelación.

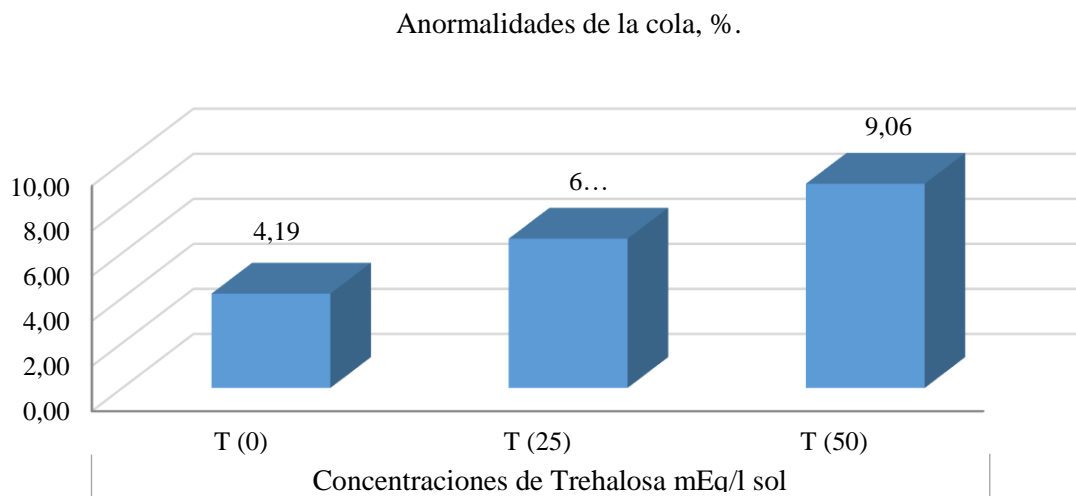


Gráfico 38.3. Anormalidades de la cola de semen diluido de Bovinos Charolais (pre congelado) con diferentes concentraciones de Trehalosa.

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

2.7.3. *Semen descongelado*

Las anomalías del semen descongelado en los tres tratamientos; se alcanzó un promedio de 6,69 % para el (T0), para (T25) 11,31% y para (T50) 16,38 %, correspondiente a la morfología de la cabeza como se aprecia en el (gráfico 39-3).

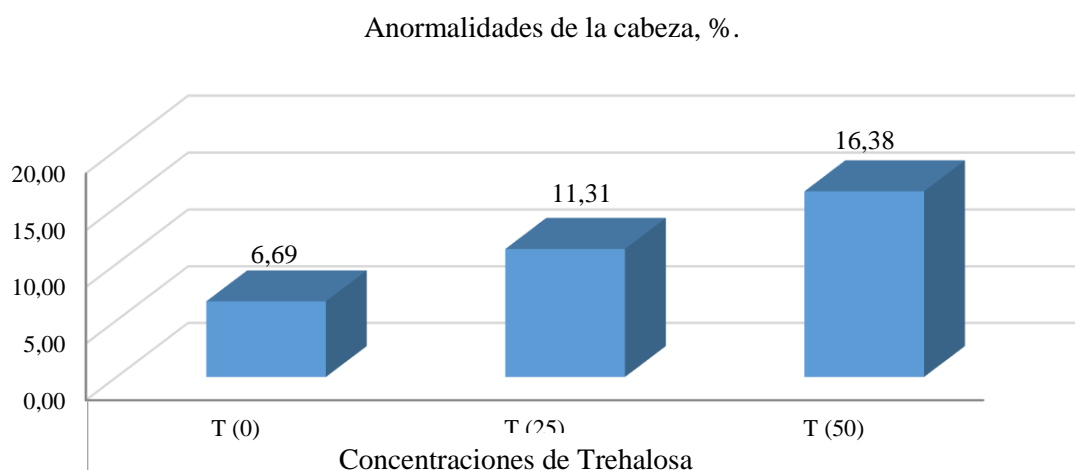


Gráfico 39-3. Anormalidades de la cabeza de semen post-descongelado de Bovinos Charolais (crio-preservedo) con diferentes concentraciones de Trehalosa.

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

Para las anormalidades de la parte media no se observa ningún daño, en ningún tratamiento utilizado.

Mientras que en las anormalidades de la cola se puede observar una media de 12,53 % para (T0), para (T25) obteniendo una media 6,81% y para (T50) se alcanzó una media de 9,06 % como se aprecia en el (gráfico 40-3). (Días, 2002, p. 1158), en su investigación reportan 18,5 % para defectos mayores de espermatozoides, mientras que 5,8 % para anormalidades de espermatozoides menores, en bovinos Nelore de 48 meses de edad, valores que son superiores a los obtenidos en la presente investigación, esto posiblemente se deba a la manera en la que fue descongelado el semen.

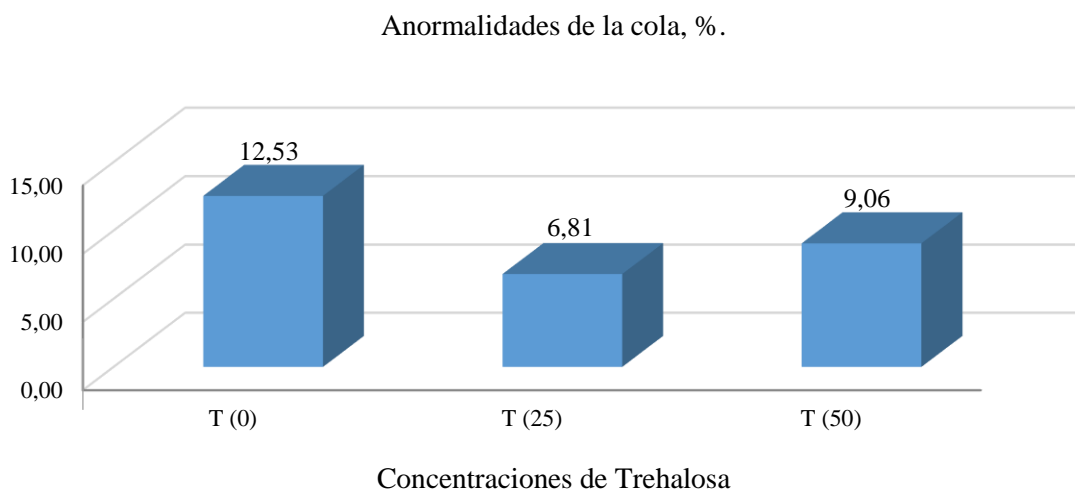


Gráfico 40-3. Anormalidades de la cola de semen post-descongelado de Bovinos Charolais (crio-preservedo) con diferentes concentraciones de Trehalosa.

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

Tabla 13-3. Características físicas y morfológicas de semen diluido de bovinos Charolais con diferentes concentraciones de trehalosa.

PARÁMETROS	CONCENTRACIONES DE TREHALOSA			E.E	Prob.
	T 0	T 25	T 50		
Motilidad Inicial 0 Horas, Puntos.	4,67 a	3,67 a	0,67 b	0,62	0,00
Motilidad Inicial 2 Horas, Puntos.	3,67 a	2,67 b	0,00 c	0,56	0,00
Células vivas, %.	90,67 a	78,92 b	57,33 c	4,97	0,00
Células muertas, %.	9,33 c	21,08 b	42,67 a	4,97	0,00
Morfología de cabeza, %.	2,58 c	3,25 ab	4,00 a	0,28	0,10
Morfología de cola, %.	5,58 c	8,83 b	12,08 a	0,96	0,00
Espermatozoides Normales, %.	91,83 a	87,92 b	83,92 c	1,16	0,00
Concentración Espermatozoides Pajuela 10 ⁶ /0,5 ml.	3233,00 a	3133,00 a	3216,00 a	2,42	0,21

E.E: Error estándar.

Prob. > 0,05: No existen diferencias estadísticas.

Prob. < 0,05: Existen diferencias significativas.

Prob. < 0,01: Existen diferencias altamente significativas.

Medias con letras iguales no difieren estadísticamente de acuerdo a la prueba de Waller Duncan.

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

Tabla 14-3. Características físicas y morfológicas de semen post-descongelado de bovinos Charolais con diferentes concentraciones de trehalosa.

PARÁMETROS	CONCENTRACIONES DE TREHALOSA			E.E	Prob.
	T 0	T 25	T 50		
Motilidad Inicial 0 Horas, Puntos.	3,88 a	2,50 b	0,31 c	0,23	0,00
Motilidad Inicial 2 Horas, Puntos.	3,00 a	1,81 b	0,00 c	0,19	0,00
Células vivas, %.	65,16 a	56,27 b	38,16 c	1,73	0,00
Células muertas, %.	34,84 c	43,73 b	61,84 a	1,73	0,00
Morfología de cabeza, %.	3,34 c	5,66 b	8,19 a	0,34	0,00
Morfología de cola, %.	6,08 c	9,30 b	12,70 a	0,44	0,00
Espermatozoides Normales, %.	90,58 c	85,00 b	79,11 a	0,76	0,00
Concentración Espermatozoides Pajuela, 10 ⁶ /0,5 ml.	3334,00 a	3284,00 a	3296,00 a	2,94	0,78

E.E: Error estándar.

Prob. > 0,05: No existen diferencias estadísticas.

Prob. < 0,05: Existen diferencias significativas.

Prob. < 0,01: Existen diferencias altamente significativas.

Medias con letras iguales no difieren estadísticamente de acuerdo a la prueba de Waller Duncan.

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

EVALUACIÓN ECONÓMICA.

Desde el punto de vista económico se observa que la producción de pajuelas de bovinos Charolais, sometidas a diferentes concentraciones de Trehalosa determinó que el uso de este azúcar es beneficioso en el costo de producción de 466 pajillas que corresponden a \$ 3,85 en la elaboración de 158 pajillas para el tratamiento (T0), \$ 1,05 en la elaboración de 155 pajillas para el (T25), mientras que \$ 1,66 para la elaboración 153 pajillas el tratamiento (T50), los costos son expresados por pajillas totales elaboradas por tratamiento.

De acuerdo al costo de producción de pajuelas de bovinos Charolais se puede observar que el menor costo de producción se obtuvo en el (T25) con un costo de producción de 0,35 centavos, seguido de (T50) con un costo de \$ 0,55 centavos y finalmente (T0) con un costo de \$ 1,31, por pajilla, como se puede apreciar en el (Tabla 15-3).

Tabla 15-3. Análisis de producción de semen post-descongelado de bovinos Charolais con diferentes concentraciones de trehalosa.

	Presentación	Costo Unitario	Unidad	Cantidad utilizada			Tratamientos		
				(T0)	(T25)	(T50)	Costo \$	Costo \$	Costo \$
				Cant. Uti.	Cant. Uti.	Cant. Uti.	(T0)	(T25)	(T50)
Trehalosa	700,00	200,00	gr	0,00	2,14	4,28	0,00	0,61	1,22
Ácido cítrico	25,00	1,60	gr	0,69*	0,37	0,37	0,00	0,02	0,02
Tris base	25000,00	132,16	gr	1,21*	0,60	0,60	0,00	0,00	0,00
Penicilina	20,00	5,00	ml	0,00	0,08	0,08	0,00	0,02	0,02
Estreptomicina	20,00	5,00	ml	0,55*	0,13	0,13	0,14	0,03	0,03
Gentamicina	10,00	5,00	mg	13,75*	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00
Tilosina	10,00	5,00	mg	2,75*	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Lincomicina	10,00	5,00	mg	8,25*	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Fructosa	25,00	3,75	gr	0,50*	0,25	0,25	0,00	0,04	0,04
Yema de huevo	30,00	3,50	ml	10,00*	10,00	10,00	0,23	0,12	0,12
Glicerol	1000,00	4,80	ml	7,00*	6,00	6,00	0,00	0,03	0,03
Agua destilada	1000,00	3,50	ml	50,00	50,00	50,00	0,08	0,18	0,18
Two Step	500,00	100,00	ml	17,00*	0,00	0,00	3,40	0,00	0,00
Costo/tratamiento							3,96	1,20	1,82
Costo/pajilla							1,34	0,40	0,60

* Incluyen en la fórmula de Two Step.

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

Tabla 16-3. Número de pajuelas obtenidas de bovinos Charolais por tratamiento con diferentes concentraciones de trehalosa.

	N° pajuelas/ tratamiento		
	(T0)	(T25)	(T50)
Salto 1	21	18	18
Salto 2	10	11	11
Salto 3	15	16	15
Salto 4	38	37	37
Salto 5	39	38	38
Salto 6	10	10	9
Salto 7	15	15	15
Salto 8	10	10	10
Total	158	155	153

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

CONCLUSIONES

- La viabilidad espermática en semen fresco y descongelado se obtuvo el mejor resultado con (T0) seguido del (T25) y finalmente (T50) los cuales se pueden utilizar en la inseminación artificial.
- La criopreservación de semen de bovinos Charolais al usar Trehalosa, se obtuvo con el T (25 mEq/l sol) un alto porcentaje de espermatozoides normales frente a T (50 mEq/l sol) que mostro un bajo porcentaje de espermatozoides normales.
- En los espermatozoides post-descongelado se obtuvo el mejor resultado en el (T0) con menor cantidad de daños en los espermatozoides, seguido del (T25) y finalmente (T50) en donde se pueden apreciar mayor cantidad células dañadas.
- En relación al costo de producción para la crioconservación de semen bovino, se obtuvo que el (T25), alcanzando un índice de producción por pajilla de 0,40 ctvs., seguido por (T50) con un costo por pajilla de 0,60 ctvs., mientras que el (T0) es el que mayor costo de producción tienen con 1,34 ctvs.

RECOMENDACIONES

- Se debe tomar en cuenta para una adecuada extracción de semen que los animales se encuentren en una edad apropiada, alimentados técnica y eficientemente, el aseo de los genitales debe ser minucioso, para que la colecta de semen, para que puedan expresar todo su potencial genético y obtener pajuelas de muy buena calidad.
- Realizar investigaciones de congelación de semen bovino utilizando los niveles (5, 10, 15 mEq/l sol) de Trehalosa, dosis que son inferiores a las de la presente investigación, puesto que al incrementar el nivel de trehalosa se obtuvo mayor mortalidad de espermatozoides.
- Orientar la investigación al post-descongelado para obtener un semen de mejor calidad en bovinos, y evitar un fracaso en la preñez de las vacas, y a su vez evitar la pérdida de material genético muy importante en la mejora genética.
- Analizar las relaciones entre el método de recolección (vagina artificial y electroeyaculador) para conocer con que técnica de recolección existe mayor viabilidad de semen antes y después de congelar.

BIBLIOGRAFÍA

- Agüero, G. (2012). Evaluación de las Características Seminales de Sementales Bovinos mediante el Analizador Seminal Computarizado CASA. (Tesis de Postgrado en Reproducción animal). Universidad Central De Venezuela. Caracas. Venezuela. pp 35-51
- Aisen, E. et al., (2002). Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Revista de Teriogenología*. Volumen 57. Número 7. pp. 1801 - 1808.
- Arieta, R. et al., (2014). Métodos de extracción de semen bovino. *Revista Electrónica Veterinaria*. Volumen 15. Número 5. pp 1–8.
- Ávila, L. et al., (2006). Fundamentos de criopreservación. *Revista Colombiana de Reproducción*. Volumen 57. Número 4. pp 291-300.
- Bailey, J. et al., (2000). Semen cryopreservation in domestic animals: A damaging and capacitating phenomenon minireview. *Journal of Andrology*. Volumen 21. Número 21. pp 1-6.
- Bavera, G., & Penafort C., (2008) Curso de producción bovina de carne.
[30 mayo 2018].
<http://www.produccion-animal.com.ar/>
- Belascoain, M. et al., (2010). Técnicas para la criopreservación de embriones bovinos. Córdoba. Argentina. pp 8-12.
- Blanco, J. et al., (2000). Species variation in osmotic, cryoprotectant, and cooling rate tolerance in poultry, eagle, and peregrine falcon spermatozoa. *Biology of Reproduction*. Volume 63. pp 1164–1171.
doi.org/10.1095/biolreprod63.4.1164
- Boiso, I. (2001). Principios básicos de criobiología. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*. Volumen 18. Número 127. pp 1-3.

- Brogliatti, M. (2003). Inseminación artificial a tiempo fijo. Argentina. Argentina Chica.
[2 agosto del 2018]
<http://www.produccionbovina.com.ar/>
- Bwanga, C. (1991). Cryopreservation of boar semen. IA literature review, department of Obstetrics and Gynecology. Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala, Sweden. Acta Vet Scand. Volumen 32. Número 4. pp. 430-433.
- Cabrera, et al., (2012). Viabilidad espermática e integridad del acrosoma en semen congelado de toros nacionales. Revista de investigación veterinaria Perú. Volumen 23. Número 2. pp 1-6.
- Castillo, M. (2015). Análisis de la Productividad y Competitividad de la Ganadería de Carne en el Litoral Ecuatoriano. Quito. Ecuador.
[9 de agosto 2018]
<http://webcache.googleusercontent.com/>
- Chaverio, A. et al., (2006). Improvement of parameters of freezing medium and freezing protocol for Theriogenology. Theriogenology. Volumen 65. Número 9. pp 1875-1890.
doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.10.017
- Cloud J., et al., (1990). Cryopreservation of sperm as a means to store salmonid germ plasm and to transfer genes from wild to hatchery populations. International Journal of Fisheries and Aquatic Studies. Volumen 1. Número 3. pp 22-25.
- Colas, G. (1984). Semen technology in the ram. In: The male in farm animal reproduction. Journal of Biological Sciences. Volumen 10. Número 1. pp 686-700.
- Dias, F. (2002). Relação da Circunferência Escrotal e Parâmetros da Qualidade do Sêmen em Touros da Raça Nelore, PO. Revista Brasileira de Zootecnia. Volumen 31. Número 3. pp. 1157-1165.
- Dowsett, K. & Knott, L. (1996), The influence of age and breed on stallion semen. Theriogenology. Volumen 46. Número 2. pp 397-412.

Escuela Superior Politécnica de Litoral ESPOL. (2016). La demanda de carne de res en Ecuador: ¿podrían los consumidores estimular mejoras en la calidad de la carne?. Ecuador. Quito. ESPOL.

[15 de junio 2018]

<https://www.espae.espol.edu.ec>

Felice, A. et al., (2012). Inseminación Artificial a tiempo fijo: Comparación del porcentaje de preñez obtenido utilizando semen refrigerado vs congelado/descongelado. Tesina de Graduación. Facultad de Ciencias Veterinarias (UNCPBA). Argentina. Pp. 45-89.

Fernández, C. (2013). La penicilina y sus beneficios.

[23 de septiembre 2018]

<http://www.eltiempo.com/archivo/documento/CMS-13019822>

Gadea, J. (2003). Los diluyentes de inseminación artificial.

[18 septiembre 2018]

Recuperado de: www.agrodigital.com/UPLOAD

Garcia, D. (Productor). (2012). La Trehalosa como Conservante Natural y sus Beneficios. Bogota. Colombia.

[18 September 2018]

<http://conservaciondevacunas.blogspot.com/>

Garner, D. & Háfes E. (2000). Spermatozoa and Seminal Plasma. Reproduction in farm animals. Volumen 18. Número 3. pp 35-65.

Gómez & Cuétara, C. (2011). El examen de compra en los sementales. Equine Medicine. Volumen 13. Número 2. pp 1-6.

González, K. (2017). Raza bovina Charolais. Bogota. Colombia.

[23 octubre 2018]

<https://zoovetespasion.com/ganaderia/razas-bovina/>

- Grupo Editores. (2012). Inseminación y transferencia de embriones en animales de granja. Colombia. D´vinni S.A.
- Guillaume, F. (2008). Comparaison de la qualite de la semence de taureaux collectes al'electro-ejaculateur ou au vagin artificiel. (Tesis de grado). Université Paul-Sabatier de TOULOUSE. Brasil. Pp 37-59.
- Hack, N. (2016). Influência sazonal sobre o perfil seminal e congelabilidade do sêmen de touros pantaneiros. Ciencia animal brasil. Volumen 17. Número 1. pps 60-69.
- Hafez, B. (2000). Espermatogénesis, Reproducción e inseminación en animales. USA: Mc Graw Hill.
- Hajarian, H. et al., (2011). Cryotop and development of vitrified immature bovine oocytes. Medicine Veterinary zootechnical. Volumen 63. Número 1. pp 1-6
- Hernández, J. (2004). Manual de inseminación artificial en bovinos. pp. 20
- Hochi, S. et al., (1997). Effect of cooling and warming rates during Cryopreservation on survival of in vitro-produced bovine embryos. Theriogenology. Volumen 46. (Número 837.) Pág. 47.
- Hoskins, D & Casillas, E. 1973. Function of cyclic nucleotides in mammalian spermatozoa. American Physiological Society. Volumen 5. Número 3. pp 453-460
- Jaime, D. 2004. Inseminación artificial en vacunos.
[29 de julio 2018]
<http://www.inia.org.uy/prado/2004/inseminacionartificial.htm>
- Jaramillo, A. (2014). Caracterización zoométrica de la raza Charoláis en el Cantón Morona (Tesis de grado. Ingeniero Zootecnista,) Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Macas. pp. 20-50.
- Jiménez, C. (2010). Técnicas de congelación y sexado del semen bovino y su importancia en reproducción.
[23 de julio 2018]

<http://www.docentes.unal.edu.co/cjimeneze/docs/8209.pdf>

- Knobil E. (2003). Spermatogenesis. Encyclopedia of reproduction. Volumen 4. Número 2. pp 17-23.
- Landsverk, K. (2000). Their impact on fertility. In: Johnston LA and Guthrie. Maryland, USA. pp 137-139.
- MAG. (2017). Ecuador es autosuficiente para cubrir demanda nacional de carne bovina. El Productor, pp1-3.
- Martínez, L. (2000). Correlações entre Características da Qualidade do Sêmen e a Circunferência Escrotal de Reprodutores da Raça Gir. Revista brasileira de zootecnia. Volumen 29. Número 3. pp 700-706.
- Mascorro, J. et al., (2005). Biotecnología de la trehalosa en las plantas. Revista Chapingo. Volumen 11. Número 002. pp 193-202.
- Medeiros, C. et al., (2002). Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? Theriogenology. Volumen 57. Número 3. pp 327-344.
- Medina, V. (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). Revista ORINOQUIA. Volumen 11. Número 1. pp 1-9.
- Méndez, A. (2010). Química. Bogota. Colombia.
- [25 de junio de 2018]
- <https://quimica.laguia2000.com/>
- Molinia F. et al., (1994). Effect of monosaccharides and disaccharides in Tris-based diluent on motility, acrosome integrity and fertility of pellet frozen ram spermatozoa. Animal Reproduction Science. Volumen 36. Número 2. pp 113- 122.

- Moncayo, S. (2016). Evaluación de la calidad seminal de reproductores bovinos antes y después del proceso de criopreservación. Tesis de grado. Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito. Quito. pp 25-57
- Morillo, M. et al., (2012). Evaluación del potencial reproductivo del macho bovino. Maracay, VE, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Volumen 23. Número 2. pp 28.
- Moron, D & Moron, L. (2015). Evaluación de la calidad seminal en toros reproductores en invierno y verano en el departamento del Cesar. Tesis de grado. Universidad Nacional De Córdoba. Barranquilla. Colombia. pp 15-65.
- Muiño, R., (2008). Evaluación de la Motilidad y Viabilidad del Semen Bovino Mediante el Uso de Sistemas CASA y Citometria de Flujo Identificación de Subpoblaciones Espermaticas. Tesis de maestría. Universidad de Santiago de Compostela. España. pp 20-60.
- Newth, M (1999). Change in pH boar semen extenders. Revista produccion animal. Volumen 2. Número 1. pp 1-9.
- Núñez, A. (2015). Comparación de la calidad biológica del semen bovino poscongelado utilizando como crioprotector leche al 2% de grasa, Andromed® y Continental® one step. (Tesina de pregrado). Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. Honduras. pp 25-45.
- Ochoa, J. (2011). Criopreservación de embriones bovinos. (Tesis de maestría en Reproduccion Animal). Universidad De Cuenca. Cuenca. Ecuador. pp 2-45.
- Oliveira, S. (2010). Aspectos bioeconômicos da avaliação andrológica em touros de corte. (Tesis de grado en Reproducción Animal). Universidad Federal Do Rio Do Sul. Janeiro. Brasil. pp 2-60.
- Olivera, J., et al., (2005). Preservación seminal para la IA cervical en majadas del Proyecto Merino Fino: semen refrigerado (24 y 48 h). Glencoe. Volumen I. Número 6. pp. 1-6.
- Pérez, J. & Merino, M. (2015). Definición de Agua Destilada. Bogota. Colombia.

[23 de septiembre 2018]

<https://definicion.de/agua-destilada/>

Pérez, J. (2017). Definición de Fructosa. Bogota. Colombia.

[29 julio 2018]

<https://definicion.de/fructosa/>.

QuimiNet. (2013). Los usos y aplicaciones principales del ácido cítrico. Quito. Ecuador.

[27 de junio 2017].

<https://www.quiminet.usos-y-aplicaciones-principales-del-acido-citrico-3440588.htm>

Rall, W. & Fahy, G. (1985). Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. Nature.

[23 septiembre 2018]

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Rall+WF%2C+Fahy+GM.+1985.+Ice-free+cryopreservation+of+mouse+embryos+at+-196%C2%B0C+by+vitrification>

Ramónez, J. (2013). Efecto de agentes crioprotectores no permeables y uno comercial sobre las características físicas de semen bovino posdescongelación. MASKANA, Producción Animal. Volumen 1. Número 1. pp. 1-7.

Ramos, E., et al., (2009). La Trehalosa. Parte I: su presencia en la caña de azúcar. Instituto Cubano de Investigaciones Azucareras (ICINAZ).

[23 septiembre 2018]

<https://www.redalyc.org/pdf/2231/223120662006.pdf>

Ramos, J. (2013). Morfología espermática de touros nelore, pantaneiro e curraleiro avaliada de amostras coletadas diretamente dos testículos e dos epidídimos. (Tesis de grado). Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia. Brazil. pp 5-35.

Rangel P. (2007). Evaluación de la salud de sementales bovinos. Reproducción bovina. (Tesis de posgrado). Argentina. Córdoba. pp 4-37.

- Restrepo, G (2007). Biotecnologías Reproductivas Aplicables a La Reproducción Bovina. Libro arte. Volumen 1. Número 1. Páginas. 1-8.
- Revista Asociación Charolais Morona Santiago, (2015). Charolais la mejor elección. Edición II. pp. 4, 7, 17.
- Ribeiro, A. (2014). Criopreservación de espermatozoides bovinos extraídos de la cola del epidídimo utilizando los métodos convencional y automatizado. *Medicine Veterinary*. Volumen 46. Número 1. pp 1-11.
- Rivera, M. (2013). Manual Biotecnología Reproductiva en Bovinos:
[23 de septiembre 2018]
<http://manualbiotecnologiareproductiva.blogspot.com/p/evaluacion-reproductiva-del-hato.html>
- Rodríguez, S. et al., (2012). Inseminación Artificial a tiempo fijo: Comparación del porcentaje de preñez obtenido utilizando semen refrigerado vs congelado/descongelado. Tesis de Graduación Facultad de Ciencias Veterinarias (UNCPBA). Argentina. Córdoba. pp 5-20.
- Rubio, et al., (2009). Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides de toros. *Revista Científica Maracaibo*. Volumen 19. Número 4. pp 1-8.
- Ruiz, B. et al., (2009). Caracterización reproductiva de toros *Bos taurus* y *Bos indicus* y sus cruces en un sistema de monta natural y sin reposo sexual en el trópico Mexicano. *Revista Científica UDO Agrícola*. Volumen 10. Número 1. pp 96.
- Salinas, N. (2014). Efecto de la trehalosa en la fragmentación del ADN en el espermatozoide bovino.
[23 September 2018]
www.revistaanimal.org
- Samper, J.C. 2009. Bovine breeding management and artificial insemination. Institute of Food and Agricultural Sciences. Volumen 2. Número 1. pp 1-8.

Serrano J. (2016). Congelación de semen bovino.

[23 septiembre 2018]

<http://jairo serrano.com/2016/06/congelacion-de-semen-bovino/>

Sorensen, J. (1982). Reproducción animal Principios y Prácticas. México DF. México: Litografía Ingramex, S.A. pp 5-8.

Stornelli, M. et al., (2005). Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. (Tesis maestría en Reproduccion animal). Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Argentina. pp 15-20.

Tiersch, T. et al., (2004). Cryopreservation of sperm from the endangered colorado pikeminnow. N Am J Aquacult Volumen 66. Número 8. pp 1-4.

Tribulo, H. et al., (2014). Evaluación de toros y calidad seminal. Cordoba, Argentina: J.L. de Cabrera 106.

Trounson, A. (1986). Preservation of human eggs and embryos.

[23 septiembre 2018]

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3522279>

Vajta G. & Kuwayama M. (2006). Improving Cryopreservation Systems. Theriogenology Volumen 65. Número 236. pp 24.

Vecol. (2018). Productos Veterinario para ganadería.

[23 septiembre 2018]

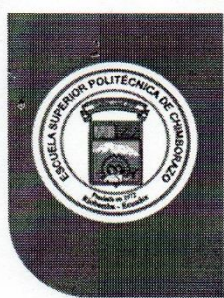
<http://www.vecol.com.co/productos/veterinaria/antibioticos>

Vera, C. 2011. Evaluación de la validez de la cría y análisis de semen para predecir la fertilidad del toro. (Tesis de grado en Reproducción Animal). Argentina. Córdoba. pp 15-25.

Vila, L. (1996). Efecto de diferentes tratamientos en el procesamiento y en la movilidad pos descongelación de espermatozoides criopreservados de bovino. (Tesis pregrado). Universidad Veracruzana. Veracruz, México. Pp 10-12.

- Vuthiphandchai, V. et al., (2009). Cryopreservation of red snapper (*Lutjanus argentima culatus*) sperm: effect of cryoprotectants and cooling rates on sperm motility, sperm viability, and fertilization capacity. *Theriogenology*. Volumen 72. Número 129. pp. 138
- Watson, P. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. 2000. *Animal Reproduction Science*. Volumen 60. Número 61. pp. 92 -94.
- White, I. (1980). Secretion of the male reproductive tract and seminal plasma. En: *Reproduction in Farm Animals*. 4th ed. E.S.E. Hafez (ed.). Philadelphia, Lea &Febiger.
- Woelders, H. et al., (1997). Effects of trehalose and sucrose, osmolality of the freezing medium and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing. *Cryobiology*. Volumen 35. Número 93. pp 105.
- Yanagimachi, R. et al., (1981), Sperm autoantigens and fertilization: II. Effects of anti-guinea pig sperm autoantibodies on spermovum interactions. *Biology of Reproduction*. Volumen 24. Número 12. pp. 518.
- Yang, H. et al., (2010). Evaluation of cryoprotectant and cooling rate for sperm cryopreservation in the euryhaline fish medaka *Oryzias latipes*. *Cryobiology*. Volumen 61. pp 211-219.
- Yildiz, C. et al., (2000). Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology*. Volumen 54. Número 579. pp 85.

ANEXOS



ESPOCH

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

LABORATORIO DE REPRODUCCIÓN ANIMAL

Riobamba, 11 de julio de 2018

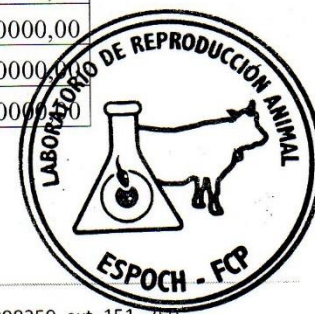
Ingeniero Andrés Mancheno Herrera

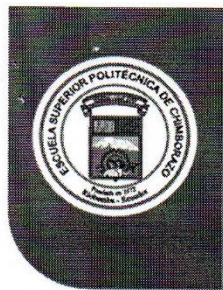
TÉCNICO DEL LABORATORIO DE REPRODUCCIÓN ANIMAL FCP - ESPOCH

CERTIFICA

Que la Srta. Yesenia Catherine Hernández Barriga con número de cédula 060402209-5 realizó los análisis de muestras seminales post descongelamiento correspondientes al trabajo de titulación "CRIO-PRESERVACIÓN Y VIABILIDAD ESPERMÁTICA DE SEMEN DE BOVINOS CHAROLAIS POST-DESCONGELACIÓN CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE TREHALOSA" las fechas 02, 03 y 04 de julio de 2018 obteniendo los siguientes resultados:

ANÁLISIS POST - DESCONGELADO								
Trat	Mot. 0h	Mot. 2h	Cel viv	Cel muert	Mor cab	Mor cola	Esp Normal	Conc / 05 ml
1	4	3	73,00	27,00	3,75	7,50	88,75	31500000,00
1	4	3	76,50	23,50	3,75	6,50	89,75	37000000,00
1	5	4	62,75	37,25	3,75	5,25	91,00	33500000,00
1	4	3	65,00	35,00	2,75	5,50	91,75	33500000,00
1	4	3	65,00	35,00	2,50	6,00	91,50	32000000,00
1	4	3	64,25	35,75	3,00	6,25	90,75	36000000,00
1	5	3	61,75	38,25	3,25	7,25	89,50	33000000,00
1	4	3	64,50	35,50	3,25	6,50	90,25	34000000,00
2	2	1	62,00	38,00	9,25	10,50	80,25	32500000,00
2	2	1	52,75	47,25	7,25	11,25	81,50	35500000,00
2	2	2	54,25	45,75	5,25	8,50	86,25	31500000,00
2	2	2	59,00	41,00	4,50	10,50	85,00	31500000,00
2	3	2	49,75	50,25	4,50	8,00	86,75	33000000,00
2	3	2	59,50	40,50	5,75	9,75	84,50	35500000,00
2	3	2	55,50	44,50	5,25	10,00	84,75	32000000,00
2	2	2	53,25	46,75	5,00	8,25	86,75	31500000,00
3	0	0	37,00	63,00	11,50	14,50	74,00	31000000,00
3	0	0	37,50	62,50	10,75	14,75	74,50	36000000,00
3	0	0	38,00	62,00	6,75	11,00	82,25	33000000,00
3	1	0	39,00	61,00	7,25	13,00	79,75	32500000,00
3	0	0	35,75	64,25	7,50	14,00	78,50	34000000,00
3	1	0	38,25	61,75	8,50	12,00	79,50	36000000,00
3	0	0	38,00	62,00	8,50	13,75	77,75	32500000,00
3	0	0	32,25	67,75	8,00	13,25	78,75	33500000,00





ESPOCH

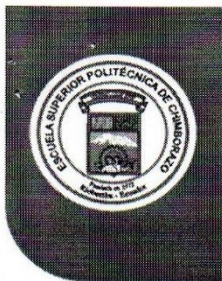
ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

LABORATORIO DE REPRODUCCIÓN ANIMAL

ANORMALIDADES ESPERMÁTICAS

SALTO 1	T0	T25	T50
Anormalidades de la cabeza			
Microcefalia	0	0	0
Desprendidas	9	25	36
Angostas	2	4	6
Redonda	2	3	1
Alargada	2	5	3
Macrocefalia	0	0	0
Anormalidades de la cola			
Dobles	0	0	0
Cortas	2	1	2
Enrollada	6	4	1
Largas	2	1	2
Rotas	9	25	36
Latigo	6	7	8
S	5	4	9
SALTO 2	T0	T25	T50
Anormalidades de la cabeza			
Microcefalia	0	0	0
Desprendidas	10	26	34
Angostas	3	0	4
Redonda	0	2	0
Alargada	2	1	5
Macrocefalia	0	0	0
Anormalidades de la cola			
Dobles	0	0	0
Cortas	1	1	4
Enrollada	5	4	3
Largas	2	1	2
Rotas	10	26	34
Latigo	5	8	9
S	3	5	7
SALTO 3	T0	T25	T50
Anormalidades de la cabeza			
Microcefalia	0	0	0
Desprendidas	7	18	24
Angostas	2	0	1
Redonda	1	1	1
Alargada	2	1	0
			1
Macrocefalia	3	1	



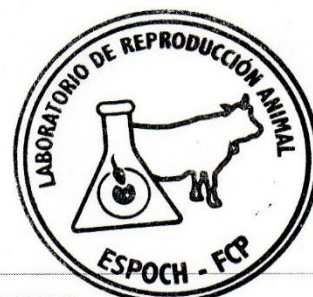


ESPOCH

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

LABORATORIO DE REPRODUCCIÓN ANIMAL

Anormalidades de la cola			
Dobles	0	0	0
Cortas	0	1	1
Enrollada	3	1	3
Largas	2	1	1
Rotas	7	18	24
Latigo	5	7	9
S	4	6	6
SALTO 4	T0	T25	T50
Anormalidades de la cabeza			
Microcefalia	1	0	0
Desprendidas	8	15	26
Angostas	1	1	0
Redonda	1	0	1
Alargada	0	2	2
Macrocefalia	0	0	0
Anormalidades de la cola			
Dobles	0	0	0
Cortas	2	2	0
Enrollada	2	6	7
Largas	1	2	0
Rotas	8	15	26
Latigo	6	8	11
S	3	9	8
SALTO 5	T0	T25	T50
Anormalidades de la cabeza			
Microcefalia	0	1	1
Desprendidas	9	16	28
Angostas	0	0	0
Redonda	0	1	0
Alargada	1	0	1
Macrocefalia	0	0	0
Anormalidades de la cola			
Dobles	0	3	0
Cortas	1	0	1
Enrollada	2	1	5
Largas	2	0	1
Desprendidas	9	16	28
Latigo	6	7	9
S	4	5	12



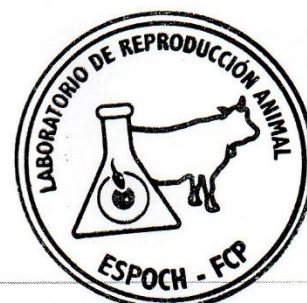


ESPOCH

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

LABORATORIO DE REPRODUCCIÓN ANIMAL

SALTO 6	T0	T25	T50
Anormalidades de la cabeza			
Microcefalia	2	0	0
Desprendidas	6	19	29
Angostas	1	0	0
Redonda	1	1	2
Alargada	0	0	0
Macrocefalia	2	3	3
Anormalidades de la cola			
Dobles	0	0	0
Cortas	1	2	1
Enrollada	5	3	1
Largas	1	2	2
Desprendidas	6	19	29
Latigo	5	7	9
S	7	6	6
SALTO 7	T0	T25	T50
Anormalidades de la cabeza			
Microcefalia	1	0	0
Desprendidas	9	18	30
Angostas	0	0	0
Redonda	0	1	2
Alargada	1	1	1
Macrocefalia	2	1	1
Anormalidades de la cola			
Dobles	0	0	0
Cortas	1	1	1
Enrollada	7	6	4
Largas	2	2	1
Rotas	9	18	30
Latigo	6	9	11
S	4	4	8
SALTO 8	T0	T25	T50
Anormalidades de la cabeza			
Microcefalia	2	0	1
Desprendidas	10	17	28
Angostas	0	0	1
Redonda	0	0	1
Alargada	1	3	0
Macrocefalia	0	0	1
Anormalidades de la cola			
Dobles	0	0	0
Cortas	0	2	1
Enrollada	4	3	4





ESPOCH

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

LABORATORIO DE REPRODUCCIÓN ANIMAL

Largas	1	0	1
Rotas	10	17	28
Latigo	6	7	8
S	5	4	11

Certifico que esta información es válida y real para que la interesada haga uso de ella como lo creyere conveniente.

Mancheno H.
Ing. Andrés Mancheno Herrera
TÉCNICO DE LABORATORIO FCP



Macas, 13 de julio de 2018

Dr. Iván Minchala Buestan M.V.Z

TÉCNICO RESPONSABLE

LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA REPRODUCTIVA BOVINA - GAD PROVINCIAL MORONA SANTIAGO

CERTIFICA

Que la Srta. **Yesenia Catherine Hernández Barriga** con número de cédula **060402209-5** realizó los análisis de muestras seminales en fresco, diluido y post descongelamiento correspondientes al trabajo de titulación "CRIO-PRESERVACIÓN Y VIABILIDAD ESPERMÁTICA DE SEMEN DE BOVINOS CHAROLAIS POST-DESCONGELACIÓN CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE TREHALOSA" con fecha de inicio el 07 de mayo del 2018 y culminando el 29 de junio del 2018, obteniendo los siguientes resultados:

SEMEN FRESCO

Salto	Vol. eyaculado	C vivas	C muertas	Mot. individual	Mot. Masal	ph	Morf. cabeza
1	8,00	92,25	7,75	78,00	3,00	6,73	7,50
2	6,40	79,25	20,75	52,50	2,00	7,18	7,75
3	5,00	94,00	6,00	76,00	3,00	6,50	6,00
4	6,50	89,25	10,75	75,00	3,00	6,87	7,75
5	7,00	91,75	8,25	78,00	3,00	6,82	5,75
6	6,50	84,25	15,75	49,50	2,00	7,23	7,25
7	5,00	91,25	8,75	76,00	3,00	6,80	7,50
8	5,50	89,75	10,25	78,00	3,00	6,89	7,75

Morf. media	Morf. cola	Esp. Normales	Concentración por eyaculado	Concentración por ml
2,50	11,25	78,75	5840000000,00	730000000,00
2,25	10,50	79,50	2560000000,00	400000000,00
2,75	10,50	80,75	3550000000,00	710000000,00
2,75	12,75	76,75	4875000000,00	750000000,00
2,25	12,25	79,75	5250000000,00	750000000,00
1,75	10,25	80,75	2405000000,00	370000000,00
2,50	10,75	79,25	3700000000,00	740000000,00
2,75	12,75	76,75	4125000000,00	750000000,00

COLOR	Numero
Blanco marfil hasta amarillento.	3
Opaco lechoso	3
Leche aguado	2
Traslucido o acuoso	0
TOTAL	8

OLOR	Numero
Dulzón como leche fresca	8
Olor a orina	0
Olor pútrido	0
TOTAL	8

Dirección: Calle 24 de Mayo y Bolívar

Telefax: (07) 2-700 116 / (07) 2-700 430 / (07) 2-702 492 - 493 - 494 - 495
www.moronasantiago.gov.ec

El futuro se siente....!

CONSISTENCIA	
Muy buena	0
Buena	6
Regular	2
Mala	0
TOTAL	8

MOTILIDAD MASAL	
Muy Buena	0
Buena	6
Regular	2
Malo	0
TOTAL	8

ANORMALIDADES DE LA CABEZA						
	Microcefalia	Desprendidas	Piriformes o angostas	Redonda	Alargada	Macrocefalia
1	6	8	4	4	3	5
2	7	6	5	6	4	3
3	5	7	2	3	3	4
4	6	5	6	5	4	5
5	5	6	2	4	3	3
6	5	5	3	6	5	5
7	4	8	5	4	5	4
8	7	5	6	6	4	3

ANORMALIDADES DE LA PARTE MEDIA			
SALTOS	Cuello hinchado	Gotas citoplasmáticas proximales	Gotas citoplasmáticas *distales
1	0	6	4
2	0	5	4
3	0	6	5
4	0	5	6
5	0	4	5
6	0	5	2
7	0	6	4
8	0	6	5

ANORMALIDADES DE LA COLA						
SALTOS	Dobles	Cortas	Enrollada	Largas	Rotas	Latigo
1	0	8	6	8	6	10
2	0	6	7	6	7	8
3	0	7	8	6	5	9
4	0	8	8	7	9	11
5	0	9	9	6	7	9
6	0	6	9	8	5	7
7	0	8	6	7	7	9
8	0	9	8	5	9	12



SEMEN DILUIDO (PRE CONGELAMIENTO)

Trat	Mot. 0h	Mot. 2h	Cel. vivas	Cel. muertas	Morf. cabeza	Morf. cola	Esp Normal	Conc/esp 10 ⁶ /05ml
1	5	4	92,00	8,00	2,50	5,75	91,75	33000000,00
1	5	4	90,25	9,75	2,50	5,75	91,75	32500000,00
1	4	3	89,75	10,25	2,75	5,25	92,00	31500000,00
2	4	3	82,75	17,25	3,50	9,00	87,50	31500000,00
2	4	3	80,50	19,50	3,25	8,00	88,75	32000000,00
2	3	2	73,50	26,50	3,00	9,50	87,50	30500000,00
3	1	0	57,00	43,00	3,25	13,25	83,50	32500000,00
3	1	0	60,25	39,75	5,25	11,25	83,50	32000000,00
3	0	0	54,75	45,25	3,50	11,75	84,75	32000000,00

ANORMALIDADES SEMEN DILUIDO (PRE CONGELAMIENTO)

SALTO 1	T0	T25	T50
Anormalidades de la cabeza			
Microcefalia	2	3	2
Desprendidas	3	4	7
Angostas	1	2	2
Redonda	1	1	1
Alargada	2	1	1
Macrocefalia	1	1	0
Anormalidades de la cola			
Dobles	0	0	0
Cortas	2	3	3
Enrollada	4	7	10
Largas	6	4	3
Rotas	5	7	8
Latigo	4	9	15
S	2	8	14

SALTO 2	T0	T25	T50
Anormalidades de la cabeza			
Microcefalia	0	0	0
Desprendidas	3	5	7
Angostas	4	3	5
Redonda	2	2	4
Alargada	1	3	5
Macrocefalia	0	0	0
Anormalidades de la cola			
Dobles	0	0	0
Cortas	2	4	3
Enrollada	4	6	9
Largas	3	4	4
Rotas	5	6	8
Latigo	4	7	12
S	5	5	9



ANORMALIDADES SEMEN DILUIDO (POST-DESCONGELADO)

SALTO 1	T0	T25	T50
Anormalidades de la cabeza			
Microcefalia	0	0	0
Desprendidas	8	15	25
Angostas	3	2	2
Redonda	2	1	2
Alargada	3	4	3
Macrocefalia	2	2	2
Anormalidades de la cola			
Dobles	0	0	0
Cortas	4	3	5
Enrollada	8	12	10
Largas	8	15	25
Rotas	4	6	2
Latigo	5	6	9
S	6	7	8

SALTO 2	T0	T25	T50
Anormalidades de la cabeza			
Microcefalia	0	0	0
Desprendidas	10	24	36
Angostas	5	0	2
Redonda	1	3	0
Alargada	0	6	4
Macrocefalia	0	0	0
Anormalidades de la cola			
Dobles	0	0	0
Cortas	1	2	1
Enrollada	5	10	2
Largas	2	1	1
Rotas	10	24	36
Latigo	5	4	8
S	4	5	7

SALTO 3	T0	T25	T50
Anormalidades de la cabeza			
Microcefalia	0	0	0
Desprendidas	7	15	19
Angostas	2	1	1
Redonda	2	0	2
Alargada	1	2	2
Macrocefalia	2	1	3
Anormalidades de la cola			
Dobles	0	0	0
Cortas	2	2	1
Enrollada	2	5	9
Largas	3	1	2
Rotas	7	15	19

Latigo	4	4	9
S	3	6	6

SALTO 4	T0	T25	T50
Anormalidades de la cabeza			
Microcefalia	0	0	1
Desprendidas	9	16	24
Angostas	1	2	0
Redonda	1	0	1
Alargada	0	1	1
Macrocefalia	0	0	0
Anormalidades de la cola			
Dobles	0	0	0
Cortas	1	1	2
Enrollada	3	7	10
Largas	1	2	1
Rotas	9	16	24
Latigo	5	6	8
S	4	3	5

SALTO 5	T0	T25	T50
Anormalidades de la cabeza			
Microcefalia	0	1	1
Desprendidas	5	15	24
Angostas	0	1	0
Redonda	2	0	0
Alargada	1	1	1
Macrocefalia	1	1	0
Anormalidades de la cola			
Dobles	0	0	0
Cortas	1	2	1
Enrollada	1	2	3
Largas	1	0	1
Rotas	5	15	24
Latigo	4	6	8
S	2	4	5

SALTO 6	T0	T25	T50
Anormalidades de la cabeza			
Microcefalia	2	0	0
Desprendidas	8	19	28
Angostas	1	0	0
Redonda	1	1	2
Alargada	0	0	0
Macrocefalia	1	1	1
Anormalidades de la cola			
Dobles	0	0	0
Cortas	1	1	2
Enrollada	3	2	2
Largas	1	2	1
Rotas	8	19	28



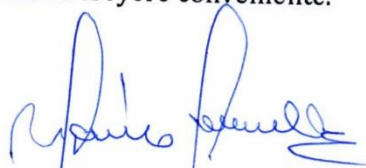


Latigo	4	6	9
S	3	2	4

SALTO 7	T0	T25	T50
Anormalidades de la cabeza			
Microcefalia	4	5	6
Desprendidas	8	14	21
Angostas	2	1	2
Redonda	3	4	3
Alargada	0	0	0
Macrocefalia	0	1	2
Anormalidades de la cola			
Dobles	0	0	0
Cortas	0	0	1
Enrollada	5	6	7
Largas	0	2	1
Rotas	8	14	21
Latigo	5	6	9
S	4	7	5

SALTO 8	T0	T25	T50
Anormalidades de la cabeza			
Microcefalia	1	0	1
Desprendidas	8	12	23
Angostas	0	0	1
Redonda	0	0	1
Alargada	1	2	1
Macrocefalia	2	1	1
Anormalidades de la cola			
Dobles	0	0	0
Cortas	0	1	1
Enrollada	3	3	3
Largas	0	0	3
Rotas	8	12	23
Latigo	5	5	10
S	8	8	6

Certifico que esta información es válida y real para que la interesada haga uso de ella como lo creyere conveniente.



Dr. Iván Minchala Buestan M.V.Z
TÉCNICO RESPONSABLE
LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA REPRODUCTIVA BOVINA DEL GAD
PROVINCIAL MORONA SANTIAGO

SEMEN DILUIDO

Anexo 1. Motilidad progresiva 0 horas (Puntos).

Estadística descriptiva

REPETICIONES/ TRATAMIENTOS	1	2	3	4	5	6	Media	Desviación Estándar
Comercial	5,00	5,00	4,00	5,00	4,00	5,00	4,66	0,51
T 25 mEq	4,00	4,00	3,00	4,00	3,00	4,00	3,66	0,51
T 50 mEq	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,50	0,54

CV = 17,90

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

Análisis de varianza (ADEVA).

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Tratamientos	56,77	2	28,38	102,20	0,000
Error	4,16	15	0,27		
Total	60,94	17			

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

Separación de medias Waller-Duncan ($P \leq 0.05$).

Trehalosa	Subconjunto para alfa = 0,05		
	a	b	c
Comercial			4,66
T 25 mEq		3,66	
T 50 mEq	0,50		

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA REGRESION

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	52,08	52,08	94,04	4,20E-08
Residuos	16	8,86	0,55		
Total	17	60,94			

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior</i>	<i>Superior</i>	<i>Inferior</i>	<i>Superior</i>
					95%	95%	95,0%	95,0%
Intercepción	5,02	0,27	18,12	4,32E-12	4,43	5,61	4,43	5,61
Variable X 1	-0,08	0,00	-9,69	4,20E-08	-0,10	-0,06	-0,10	-0,06

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

Anexo 2. Motilidad progresiva 2 horas (Puntos).

Estadística descriptiva

REPETICIONES/ TRATAMIENTOS	1	2	3	4	5	6	Media	Desviación Estándar
Comercial	4,00	4,00	3,00	4,00	3,00	4,00	3,66	0,52
T 25mEq	3,00	3,00	2,00	3,00	2,00	3,00	2,66	0,52
T 50 mEq	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

CV = 19,97

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

Análisis de varianza (ADEVA).

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Tratamientos	43,11	2	21,55	121,25	,00
Error	2,66	15	0,17		
Total	45,77	17			

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

Separación de medias Waller-Duncan ($P \leq 0.05$).

Trehalosa	Subconjunto para alfa = 0,05		
	a	b	c
Comercial			3,66
T 25 mEq		2,66	
T 50 mEq	0,00		

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA REGRESION

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	40,33	40,33	118,53	8,31E-09
Residuos	16	5,44	0,34		
Total	17	45,78			

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Intercepción	3,94	0,22	18,14	4,27E-12	3,48	4,41	3,48	4,41
Variable X 1	-0,07	0,01	-10,89	8,31E-09	-0,09	-0,06	-0,09	-0,06

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

Anexo 3. Células vivas (%).

Estadística descriptiva.

REPETICIONES/ TRATAMIENTOS	1	2	3	4	5	6	Media	Desviación Estándar
Comercial	92,00	90,25	89,75	90,67	89,49	91,85	90,66	1,05
T 25mEq	82,75	80,50	73,50	78,91	74,09	83,74	78,91	4,31
T 50 mEq	57,00	60,25	54,75	57,33	54,56	60,09	57,33	2,47

CV = 3,88

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

Análisis de varianza (ADEVA).

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Tratamientos	3430,99	2	1715,49	199,07	0,00
Error	129,26	15	8,61		
Total	3560,25	17			

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

Separación de medias Waller-Duncan ($P \leq 0.05$).

Subconjunto para alfa = 0,05			
Trehalosa	a	b	c
Comercial			90,66
T 25 mEq		78,91	
T 50 mEq	57,33		

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA REGRESION

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	3334,33	3334,33	236,14	5,31E-11
Residuos	16	225,92	14,12		
Total	17	3560,26			

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Intercepción	92,31	1,40	65,91	6,46E-21	89,34	95,28	89,34	95,28
Variable X 1	-0,67	0,04	-15,37	5,31E-11	-0,76	-0,57	-0,76	-0,57

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

Anexo 4. Células muertas (%).

Estadística descriptiva.

REPETICIONES/ TRATAMIENTOS	1	2	3	4	5	6	Media	Desviación Estándar
Comercial	8,00	9,75	10,25	9,33	8,15	10,51	9,33	1,05
T 25mEq	17,25	19,50	26,50	21,08	16,26	25,91	21,08	4,31
T 50 mEq	43,00	39,75	45,25	42,66	39,90	45,43	42,66	2,47

CV = 12,05

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

Análisis de varianza (ADEVA).

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Tratamientos	3429,96	2	1714,98	199,01	0,00
Error	129,26	15	8,61		
Total	3559,22	17			

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

Separación de medias Waller-Duncan ($P \leq 0.05$).

Trehalosa	Subconjunto para alfa = 0,05		
	a	b	c
Comercial	9,33		
T 25 mEq		21,08	
T 50 mEq			42,66

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA REGRESION

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	3333,33	3333,33	236,10	5,32E-11
Residuos	16	225,89	14,12		
Total	17	3559,22			

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Intercepción	7,69	1,40	5,49	4,90E-05	4,72	10,66	4,72	10,66
Variable X 1	0,67	0,04	15,37	5,32E-11	0,57	0,76	0,57	0,76

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

Anexo 5. Morfología de la cabeza (%).

Estadística descriptiva.

REPETICIONES/ TRATAMIENTOS	1	2	3	4	5	6	Media	Desviación Estándar
Comercial	2,50	2,50	2,75	2,58	2,44	2,73	2,58	0,12
T 25mEq	3,50	3,25	3,00	3,25	3,00	3,50	3,25	0,22
T 50 mEq	3,25	5,25	3,50	4,00	2,91	5,08	3,99	0,97

CV = 17,73

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

Análisis de varianza (ADEVA).

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Tratamientos	6,01	2	3,00	8,90	0,00
Error	5,06	15	0,33		
Total	11,07	17			

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

Separación de medias Waller-Duncan ($P \leq 0.05$).

Trehalosa	Subconjunto para alfa = 0,05	
	a	b
Comercial	2,58	
T 25 mEq	3,25	3,25
T 50 mEq		3,99

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA REGRESION

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	6,01	6,01	18,96	0,00
Residuos	16	5,07	0,32		
Total	17	11,08			

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Intercepción	2,57	0,21	12,25	1,53E-09	2,12	3,01	2,12	3,01
Variable X 1	0,03	0,01	4,35	0,00	0,01	0,04	0,01	0,04

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

Anexo 6. Morfología de la cola (%).

Estadística descriptiva.

REPETICIONES/ TRATAMIENTOS							Desviación	
	1	2	3	4	5	6	Media	Estándar
Comercial	5,75	5,75	5,25	5,58	5,29	5,87	5,58	0,25
T 25mEq	9,00	8,00	9,50	8,83	8,07	9,59	8,83	0,68
T 50 MEQ	13,25	11,25	11,75	12,08	11,04	13,12	12,08	0,93

CV = 7,73

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

Análisis de varianza (ADEVA).

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Tratamientos	126,74	2	63,37	136,06	0,00
Error	6,98	15	0,46		
Total	133,73	17			

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

Separación de medias Waller-Duncan ($P \leq 0.05$).

Trehalosa	Subconjunto para alfa = 0.05		
	a	b	c
Comercial	5,58		
T 25 mEq		8,83	
T 50 mEq			12,08

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA REGRESION

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	126,74	126,74	290,19	1,12E-11
Residuos	16	6,99	0,44		
Total	17	133,72			

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Intercepción	5,58	0,25	22,66	1,38E-13	5,06	6,10	5,06	6,10
Variable X 1	0,13	0,01	17,03	1,12E-11	0,11	0,15	0,11	0,15

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

Anexo 7. Espermatozoides normales (%).

Estadística descriptiva.

REPETICIONES/ TRATAMIENTOS							Desviación	
	1	2	3	4	5	6	Media	Estándar
Comercial	91,75	91,75	92,00	91,83	91,69	91,98	91,83	0,12
T 25mEq	87,50	88,75	87,50	87,91	87,19	88,63	87,91	0,64
T 50 MEQ	83,50	83,50	84,75	83,91	83,19	84,63	83,91	0,64

CV = 0,60

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

Análisis de varianza (ADEVA).

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Tratamientos	188,18	2	94,09	332,81	0,00
Error	4,24	15	0,28		
Total	192,42	17			

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

Separación de medias Waller-Duncan ($P \leq 0.05$).

Trehalosa	Subconjunto para alfa = 0,05		
	a	b	c
Comercial			91,83
T 25 mEq		87,91	
T 50 mEq	83,91		

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA REGRESION

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	188,18	188,18	708,91	1,12E-14
Residuos	16	4,25	0,27		
Total	17	192,43			

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Intercepción	91,85	0,19	478,34	1,12E-34	91,44	92,25	91,44	92,25
Variable X 1	-0,16	0,01	-26,63	1,12E-14	-0,17	-0,15	-0,17	-0,15

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

Anexo 8. Concentración espermática 10⁶ (0,5 ml).

Estadística descriptiva.

REPETICIONES/ TRATAMIENTOS	1	2	3	4	5	6	Media	Desviación Estándar
Comercial	33000000,00	32500000,00	31500000,00	32333333,33	31569570,72	33097095,95	323333,33	683130.05
T 25mEq	31500000,00	32000000,00	30500000,00	31333333,33	30569570,71	32097095,94	313333,33	683130.05
T 50 mEq	32500000,00	32000000,00	32000000,00	32166666,66	31877991,53	32455341,80	321666,66	258198.88

CV = 1,81

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

Análisis de varianza (ADEVA).concentración espermática 10⁶ (0,5 ml).

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Tratamientos	344444,44	2	172222,22	5,16	0,01
Error	499999,99	15	333333,33		
Total	844444,44	17			

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

Separación de medias Waller-Duncan ($P \leq 0.05$).

Trehalosa	Subconjunto para alfa = 0.05	
	a	b
Comercial		323333,33
T 25 mEq	313333,33	
T 50 mEq		321677,77

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

Morfología de la cabeza	Correlación de Pearson	0,73**	.a	-0,060**	-0,67**	-0,63**	0,72**	10,00	0,73**	-0,69**	0,04
	Sig. (bilateral)	0,00	.	0,01	0,00	0,01	0,00		0,00	0,00	0,89
	N	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
Morfología cola	Correlación de Pearson	0,97**	.a	-0,87**	-0,90**	-0,93**	0,97**	0,73**	10,00	-0,95**	-0,03
	Sig. (bilateral)	0,00	.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,00	0,90
	N	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
Espermatozoides Normales	Correlación de Pearson	-0,98**	.a	0,92**	0,94**	0,97**	-0,94**	-0,69**	-0,95**	10,00	0,15
	Sig. (bilateral)	0,00	.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,56
	N	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
Concentración espermática 000,5	Correlación de Pearson	0,73**	.a	-0,60**	-0,67**	-0,63**	0,72**	10,00	0,73**	-0,69**	0,04
	Sig. (bilateral)	0,00	.	0,01	0,00	0,01	0,00		0,00	0,00	0,89
	N	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18

a. No se puede calcular porque al menos una variable es constante.

** . La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

SEMEN DESCONGELADO

Anexo 10. Motilidad progresiva 0 horas (Puntos).

Estadística descriptiva.

REPETICIONES/ TRATAMIENTOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	Media	Desviación Estándar
Comercial	4,00	4,00	3,00	3,00	4,00	3,00	3,00	4,00	4,00	4,00	5,00	4,00	4,00	4,00	5,00	4,00	3,88	0,62
T 25mEq	3,00	3,00	3,00	2,00	3,00	2,00	2,00	3,00	2,00	2,00	2,00	2,00	3,00	3,00	3,00	2,00	2,50	0,52
T 50 MEQ	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,31	0,48

CV = 24,28

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

Análisis de varianza (ADEVA).

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Tratamientos	103,29	2,00	51,65	176,23	0,00
ERROR	13,19	45,00	0,29		
Total	116,48	47,00			

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

Separación de medias Waller-Duncan ($P \leq 0.05$).

Trehalosa	Subconjunto para alfa = 0,05		
	a	b	c
Comercial			3,88
T 25 mEq		2,50	
T 50 mEq	0,31		

ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA REGRESION

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	101,53	101,53	312,45	3,88E-22
Residuos	46	14,95	0,32		
Total	47	116,48			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico</i>		<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
			<i>t</i>	<i>Probabilidad</i>				
Intercepción	4,01	0,13	30,83	2,28E-32	3,75	4,27	3,75	4,27
Variable X 1	-0,07	0,00	-17,68	3,88E-22	-0,08	-0,06	-0,08	-0,06

Anexo 11. Motilidad progresiva 2 horas (Puntos).

Estadística descriptiva.

REPETICIONES/ TRATAMIENTOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	Media	Desviación Estándar
Comercial	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	2,00	3,00	3,00	3,00	3,00	4,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	0,37
T 25mEq	2,00	2,00	3,00	1,00	2,00	1,00	2,00	2,00	1,00	1,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	1,81	0,54
T 50 mEq	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

CV = 23,58

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

Análisis de varianza (ADEVA).

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Tratamientos	73,04	2	36,52	255,29	0,00
Error	6,44	45	0,14		
Total	79,48	47			

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

Separación de medias Waller-Duncan ($P \leq 0.05$).

Trehalosa	Subconjunto para alfa = 0,05		
	a	b	c
Comercial			3,00
T 25 mEq		1,81	
T 50 mEq	0,00		

ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA REGRESION

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	72,00	72,00	442,83	3,03E-25
Residuos	46	7,48	0,16		
Total	47	79,48			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Intercepción	3,10	0,09	33,73	4,30E-34	2,92	3,29	2,92	3,29
Variable X 1	-0,06	0,00	-21,04	3,03E-25	-0,07	-0,05	-0,07	-0,05

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

Anexo 12. Células vivas (%).

Estadística descriptiva.

REPETICIONES/ TRATAMIENTOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Comercial	70,50	62,50	60,00	60,00	63,50	65,00	63,50	64,75	73,00
T 25mEq	61,50	50,50	54,00	61,50	51,25	58,00	61,50	56,00	62,00
T 50 mEq	36,25	36,75	41,00	47,75	39,75	35,50	38,50	39,25	37,00

10	11	12	13	14	15	16	Media	Desviación Estándar
76,50	62,75	65,00	65,00	64,25	61,75	64,50	65,16	4,50
52,75	54,25	59,00	49,75	59,50	55,50	53,25	56,27	4,23
37,50	38,00	39,00	35,75	38,25	38,00	32,25	38,16	3,26

CV = 7,58

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

Análisis de varianza (ADEVA).

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Tratamientos	6058,63	2	3029,31	186,38	0,00
Error	731,40	45	16,25		
Total	6790,03	47			

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

Separación de medias Waller-Duncan ($P \leq 0.05$).

Trehalosa	Subconjunto para alfa = 0,05		
	a	b	c
Comercial			65,16
T 25 mEq		56,27	
T 50 mEq	38,16		

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA REGRESION

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	5832,00	5832,00	280,02	3,45E-21
Residuos	46	958,03	20,83		
Total	47	6790,03			

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Intercepción	66,69	1,04	64,04	1,28E-46	64,60	68,79	64,60	68,79
Variable X 1	-0,54	0,03	-16,73	3,45E-21	-0,60	-0,48	-0,60	-0,48

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

Anexo 13. Células muertas (%).

Estadística descriptiva.

REPETICIONES/ TRATAMIENTOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Comercial	29,50	37,50	40,00	40,00	36,50	35,00	36,50	35,25	27,00
T 25mEq	38,50	49,50	46,00	38,50	48,75	42,00	38,50	44,00	38,00
T 50 mEq	63,75	63,25	59,00	52,25	60,25	64,50	61,50	60,75	63,00

10	11	12	13	14	15	16	Media	Desviación Estándar
23,50	37,25	35,00	35,00	35,75	38,25	35,50	34,84	4,50
47,25	45,75	41,00	50,25	40,50	44,50	46,75	43,73	4,23
62,50	62,00	61,00	64,25	61,75	62,00	67,75	61,84	3,26

CV = 8,61

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

Análisis de varianza (ADEVA).

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Tratamientos	6058,63	2	3029,31	186,38	0,00
Error	731,40	45	16,25		
Total	6790,03	47			

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

Separación de medias Waller-Duncan ($P \leq 0.05$).

Trehalosa	Subconjunto para alfa = 0,05		
	a	b	c
Comercial	34,84		
T 25 mEq		43,73	
T 50 mEq			61,84

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA REGRESION

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	5832,00	5832,00	280,02	3,45E-21
Residuos	46	958,03	20,83		
Total	47	6790,03			

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Intercepción	33,31	1,04	31,98	4,54E-33	31,21	35,40	31,21	35,40
Variable X 1	0,54	0,03	16,73	3,45E-21	0,48	0,60	0,48	0,60

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

Anexo 14. Morfología de la cabeza (%).

Estadística descriptiva.

REPETICIONES/ TRATAMIENTOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Comercial	4,50	4,00	3,50	2,75	2,25	3,25	4,25	3,00	3,75
T 25mEq	6,00	8,25	4,75	4,75	4,75	5,25	6,25	3,75	9,25
T 50 mEq	8,50	10,50	6,75	6,75	6,50	7,75	8,50	7,00	11,50

10	11	12	13	14	15	16	Media	Desviación Estándar
3,75	3,75	2,75	2,50	3,00	3,25	3,25	3,34	0,63
7,25	5,25	4,50	4,50	5,75	5,25	5,00	5,66	1,47
10,75	6,75	7,25	7,50	8,50	8,50	8,00	8,19	1,53

CV = 22,33

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

Análisis de varianza (ADEVA).

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Tratamientos	187,82	2	93,91	57,38	0,00
Error	73,66	45	1,64		
Total	261,48	47			

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

Separación de medias Waller-Duncan ($P \leq 0.05$).

Trehalosa	Subconjunto para alfa = 0,05		
	a	b	c
Comercial	3,34		
T 25 mEq		5,66	
T 50 mEq			8,19

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA REGRESION

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	187,70	187,70	117,02	3,15E-14
Residuos	46	73,78	1,60		
Total	47	261,48			

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Intercepción	3,31	0,29	11,44	4,72E-15	2,73	3,89	2,73	3,89
Variable X 1	0,10	0,01	10,82	3,15E-14	0,08	0,11	0,08	0,11

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

Anexo 15. Morfología de la cola (%).

Estadística descriptiva.

REPETICIONES/ TRATAMIENTOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Comercial	8,75	6,75	5,25	5,75	3,50	5,00	5,50	6,00	7,50
T 25 mEq	12,25	11,50	8,25	8,75	7,25	8,00	8,75	7,25	10,50
T 50 mEq	14,75	13,75	11,50	12,50	10,50	11,50	11,00	11,50	14,50

10	11	12	13	14	15	16	Media	Desviación Estándar
6,50	5,25	5,50	6,00	6,25	7,25	6,50	6,08	1,19
11,25	8,50	10,50	8,00	9,75	10,00	8,25	9,30	1,55
14,75	11,00	13,00	14,00	12,00	13,75	13,25	12,70	1,45

CV = 15,02

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

Análisis de varianza (ADEVA).

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Tratamientos	351,22	2	175,61	88,90	0,00
Error	88,90	45	1,98		
Total	440,11	47			

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

Separación de medias Waller-Duncan ($P \leq 0.05$).

Trehalosa	Subconjunto para alfa = 0,05		
	a	b	c
Comercial	6,08		
T 25 mEq		9,30	
T 50 mEq			12,70

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA REGRESION

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	351,13	351,13	181,50	1,40E-17
Residuos	46	88,99	1,93		
Total	47	440,11			

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Intercepción	6,05	0,32	19,05	1,86E-23	5,41	6,69	5,41	6,69
Variable X 1	0,13	0,01	13,47	1,40E-17	0,11	0,15	0,11	0,15

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

Anexo 16. Espermatozoides normales (%).

Estadística descriptiva.

REPETICIONES/ TRATAMIENTOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Comercial	86,75	89,25	91,25	91,50	94,25	91,75	90,25	91,00	88,75
T 25 mEq	81,75	80,25	87,00	86,50	88,00	86,75	85,00	89,00	80,25
T 50 mEq	76,75	75,75	81,75	80,75	83,00	80,75	80,50	81,50	74,00

10	11	12	13	14	15	16	Media	Desviación Estándar
89,75	91,00	91,75	91,50	90,75	89,50	90,25	90,58	1,64
81,50	86,25	85,00	86,75	84,50	84,75	86,75	85,00	2,71
74,50	82,25	79,75	78,50	79,50	77,75	78,75	79,11	2,73

CV = 2,85

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

Análisis de varianza (ADEVA).

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Tratamientos	1052,52	2,00	526,26	90,06	0,00
Error	262,96	45,00	5,84		
Total	1315,48	47,00			

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

Separación de medias Waller-Duncan ($P \leq 0.05$).

Trehalosa	Subconjunto para alfa = 0,05		
	a	b	c
Comercial			90,58
T 25 mEq		85,00	
T 50 mEq	79,11		

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA REGRESION

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	1052,26	1052,26	183,89	1,10E-17
Residuos	46	263,22	5,72		
Total	47	1315,48			

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Intercepción	90,63	0,55	166,01	1,47E-65	89,53	91,73	89,53	91,73
Variable X 1	-0,23	0,02	-13,56	1,10E-17	-0,26	-0,20	-0,26	-0,20

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

Anexo 17. Concentración espermática 10^6 (0,5 ml).

Estadística descriptiva.

REPETICIONES/ TRATAMIENTOS	1	2	3	4	5	6	7	8
Comercial	33000000,00	37500000,00	32500000,00	31000000,00	30500000,00	36000000,00	30500000,00	32000000,00
T 25 mEq	31000000,00	35500000,00	32500000,00	31000000,00	32500000,00	37000000,00	30000000,00	33000000,00
T 50 mEq	30000000,00	36000000,00	31500000,00	32500000,00	32000000,00	35000000,00	30500000,00	31500000,00

9	10	11	12	13	14	15	16	Media	Desviación Estándar
31500000,00	37000000,00	33500000,00	33500000,00	32000000,00	36000000,00	33000000,00	34000000,00	33,34	2,23
32500000,00	35500000,00	31500000,00	31500000,00	33000000,00	35500000,00	32000000,00	31500000,00	32,84	2,00
31000000,00	36000000,00	33000000,00	32500000,00	34000000,00	36000000,00	32500000,00	33500000,00	32,97	1,96

CV = 6,26

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

Análisis de varianza (ADEVA).

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Tratamientos	2167000,00	2	1083000,00	0,25	0,78
Error	192500000,00	45	4277000,00		
Total	194600000,00	47			

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

Separación de medias Waller-Duncan ($P \leq 0.05$).

	Subconjunto para alfa = 0,05
Trehalosa	a
Comercial	32843750,00
T 25 mEq	32843750,00
T 50 mEq	33343750,00

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.

Morfología de la cabeza	Correlación de Pearson	0,84**	-0,25	-0,82**	-0,83**	-0,78**	0,78**	1	0,91**	-0,97**	0,06
	Sig. (bilateral)	0,00	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,66
	N	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48
Morfología cola	Correlación de Pearson	0,89**	-0,22	-0,84**	-0,86**	-0,80**	0,80**	0,91**	1	-0,98**	-0,00
	Sig. (bilateral)	0,00	0,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,00	0,99
	N	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48
Espermatozoides Normales	Correlación de Pearson	-0,89**	0,24	0,85**	0,87**	0,81**	-0,81**	-0,97**	-0,98**	1	-0,02
	Sig. (bilateral)	0,00	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,85
	N	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48
Concentración espermática 00,5	Correlación de Pearson	-0,07	-0,07	0,10	0,00	0,03	-0,03	0,06	-0,00	-0,02	1
	Sig. (bilateral)	0,60	0,59	0,46	0,97	0,80	0,80	0,66	0,99	0,85	
	N	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48

** La correlación es significativa al nivel 00,01 (bilateral).

Realizado por: Hernández Yesenia. 2019.