



# **ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

## **RECONGELACIÓN DE ESPERMATOZOIDES BOVINOS COMO ALTERNATIVA PARA MEJORAR LA CALIDAD ESPERMÁTICA DE SEMEN DESCONGELADO**

**CARLOS ANDRÉS MANCHENO HERRERA**

Trabajo de Titulación modalidad Proyectos de Investigación y Desarrollo, presentado ante el Instituto de Posgrado y Educación Continua de la ESPOCH, como requisito parcial para la obtención del grado de Magíster en Reproducción Animal Mención Reproducción Bovina.

Riobamba – Ecuador

Junio - 2021



## ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

### CERTIFICACIÓN:

EL TRIBUNAL DE TRABAJO DE TITULACIÓN CERTIFICA QUE:

El Trabajo de Titulación modalidad Proyectos de Investigación y Desarrollo, titulado RECONGELACIÓN DE ESPERMATOZOIDES BOVINOS COMO ALTERNATIVA PARA MEJORAR LA CALIDAD ESPERMÁTICA DE SEMEN DESCONGELADO, de responsabilidad del Sr. Carlos Andrés Mancheno Herrera, ha sido prolijamente revisado y se autoriza su presentación.

Tribunal:

Ing. Luis Eduardo Hidalgo Almeida Ph.D.  
**PRESIDENTE**

Ing. Antonio Nelson Duchi Duchi Ph.D.  
**DIRECTOR**

Ing. Pablo Rigoberto Andino Nájera Mag.  
**MIEMBRO**

Dr. Alex Arturo Villafuerte Gavilánez Mag.  
**MIEMBRO**

Luis Eduardo  
Hidalgo  
Almeida

Firmado digitalmente por Luis  
Eduardo Hidalgo Almeida  
DN: cn=Luis Eduardo Hidalgo  
Almeida, o=Luis Eduardo Hidalgo  
Almeida c=EC, Ecuador, e=C. Ecuador  
on=ESPOCH, ou=Instituto de Posgrado  
y Educación Continua  
en\_l\_hidalgo@espoche.edu.ec  
Motivo: Soy el autor de este  
documento  
Ubicación:  
Fecha: 2021.06.15 16:03:05:00

Dr. Antonio  
Nelson Duchi  
Duchi

Firmado digitalmente por  
Dr. Antonio Nelson Duchi  
Duchi  
Fecha: 2021.06.14 20:49:03  
-05'00'

PABLO  
RIGOBERTO  
ANDINO NAJERA

Firmado digitalmente por PABLO  
RIGOBERTO ANDINO NAJERA  
DN: cn=PABLO RIGOBERTO ANDINO  
NAJERA, c=EC, o=SECURITY DATA S.A. 1  
que ENTIDAD DE CERTIFICACION DE  
INFORMACION  
Motivo: Soy el autor de este documento  
Ubicación:  
Fecha: 2021.06.14 07:37:05:00

ALEX ARTURO  
VILLAFUERTE  
GAVILANEZ

Firmado digitalmente por ALEX ARTURO  
VILLAFUERTE GAVILANEZ  
DN: cn=ALEX ARTURO VILLAFUERTE  
GAVILANEZ, c=EC, o=SECURITY DATA S.A. 1  
que ENTIDAD DE CERTIFICACION DE  
INFORMACION  
Motivo: Soy el autor de este documento  
Ubicación:  
Fecha: 2021.06.14 08:49:05:00

Riobamba, junio 2021

## DERECHOS INTELECTUALES

Yo, Carlos Andrés Mancheno Herrera, declaro que soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en el **Trabajo de Titulación modalidad Proyectos de Investigación y Desarrollo**, y que el patrimonio intelectual generado por la misma pertenece exclusivamente a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

CARLOS  
ANDRES  
MANCHENO  
HERRERA

Firmado digitalmente  
por CARLOS ANDRES  
MANCHENO HERRERA  
Fecha: 2021.06.15  
19:55:40 -05'00'

---

Carlos Andrés Mancheno Herrera  
No. Cédula: 060379133-6

## DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Carlos Andrés Mancheno Herrera, declaro que el presente **Trabajo de Titulación modalidad Proyectos de Investigación y Desarrollo**, es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autor, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este proyecto de investigación de maestría.

CARLOS ANDRES  
MANCHENO  
HERRERA

Firmado digitalmente  
por CARLOS ANDRES  
MANCHENO HERRERA  
Fecha: 2021.06.15  
21:06:10 -05'00'

---

Carlos Andrés Mancheno Herrera  
No. Cédula: 060379133-6

## **DEDICATORIA**

Quiero dedicar este trabajo a mi familia que ha sido mi apoyo y pilar fundamental en toda mi formación personal y profesional, en especial a mi hijo Esteban, a mi madre María Elena, a mi hermana Paulina y a mi Padre Político Marco.

## **AGRADECIMIENTO**

Un agradecimiento especial a mis maestros y compañeros que hicieron posible la culminación de este programa de estudios, a mis amigos que me apoyaron en este proceso y a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por permitirme ser parte de este proyecto educativo.

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN .....	ix
SUMARY.....	x
CAPÍTULO 1.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Planteamiento del Problema.....	1
1.1.1. <i>Situación Problemática</i> .....	1
1.1.2. <i>Formulación del problema</i> .....	1
1.1.3. <i>Preguntas directrices o específicas de la investigación</i> .....	2
1.2. Justificación.....	2
1.3. Objetivos.....	3
1.3.1. <i>Objetivo General</i> .....	3
1.3.2. <i>Objetivos Específicos</i> .....	3
1.4. Hipótesis.....	3
1.4.1. <i>Hipótesis nula</i> .....	3
1.4.2. <i>Hipótesis alterna</i> .....	3
CAPÍTULO II.....	4
2. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1. Antecedentes.....	4
2.2. Manejo de sementales bovinos.....	5
2.3. Sistemas de recolección de semen bovino.....	6
2.3.1. <i>Vagina artificial</i> .....	6
2.3.2. <i>Electroeyaculación</i> .....	7
2.4. Valoración del eyaculado bovino.....	7
2.4.1. <i>Características macroscópicas</i> .....	8
2.4.2. <i>Características microscópicas</i> .....	9
2.5. Membrana espermática.....	12
2.5.1. <i>Componentes de la membrana</i> .....	12
2.5.2. <i>Daños en la membrana</i> .....	12
2.6. Evaluación de la calidad espermática.....	13
2.6.1. <i>Test de resistencia de la membrana – Test de Host (hipoosmótico)</i> .....	13
2.6.2. <i>Estudio de la cromatina</i> .....	14

2.6.3.	<i>Fluorescencia con naranja de acridina.</i>	14
2.7.	<b>Criopreservación de semen bovino.</b>	15
2.7.1.	<i>Diluyentes de semen bovino.</i>	16
2.7.2.	<i>Crioprotectores.</i>	16
2.7.3.	<i>Concentración de dosis seminales.</i>	17
2.7.4.	<i>Sistemas de envasado.</i>	17
2.7.5.	<i>Curvas de temperatura.</i>	18
2.7.6.	<i>Almacenamiento de dosis seminales.</i>	18
2.7.7.	<i>Descongelación de semen.</i>	19
2.8.	<b>Recongelación de espermatozoides.</b>	19
<b>CAPÍTULO III</b>		22
3.	<b>METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN.</b>	22
3.1.	<b>Características del área de estudio.</b>	22
3.1.1.	<i>Localización.</i>	22
3.2.	<b>Materiales.</b>	22
3.2.1.	<i>Materiales de oficina.</i>	22
3.2.2.	<i>Materiales de campo.</i>	22
3.2.3.	<i>Materiales de laboratorio.</i>	23
3.3.	<b>Metodología.</b>	24
3.3.1.	<i>Descongelación e incubación de semen.</i>	24
3.3.2.	<i>Análisis microscópico del semen.</i>	24
3.3.3.	<i>Proceso de recongelación.</i>	27
3.3.4.	<i>Comprobación de hipótesis.</i>	29
<b>CAPÍTULO IV</b>		30
4.	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.</b>	30
4.1.	<b>Análisis comparativo de las características microscópicas de semen bovino en los procesos post congelación y post recongelación.</b>	30
4.1.1.	<i>pH.</i>	32
4.1.2.	<i>Motilidad individual (%).</i>	32
4.1.3.	<i>Viabilidad espermática (%).</i>	32
4.1.4.	<i>Morfoanomalías (%).</i>	34
4.1.5.	<i>Daño del ADN (%).</i>	35
4.1.6.	<i>Daño en la membrana (%).</i>	36
<b>CONCLUSIONES.</b>		39



**RECOMENDACIONES**.....40

**BIBLIOGRAFÍA**

**ANEXOS**

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1 - 2:</b> Clasificación de la motilidad espermática de acuerdo a la Sociedad de Teriogenología de los Estados Unidos de Norteamérica.....	9
<b>Tabla 2 - 3:</b> Composición del medio Tyrode.....	24
<b>Tabla 3 - 3:</b> Valoración de la Motilidad Individual Progresiva según la Sociedad Americana de Theriogenología.....	25
<b>Tabla 4 - 4:</b> Resultados comparativos de las características microscópicas de semen bovino en los procesos pre congelación, post congelación y post recongelación.....	31

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1 - 4:</b> Diferencia en la viabilidad espermática de semen bovino pre congelado, post congelado y post recongelado.....	33
<b>Figura 2 - 4:</b> Diferencia en las morfoanomalías de semen bovino pre congelado, post congelado y post recongelado.....	35
<b>Figura 3 - 4:</b> Diferencias en el daño del ADN de semen de bovino Jersey pre congelado, post congelado y post recongelado.....	36
<b>Figura 4 - 4:</b> Diferencias en el daño de la membrana de semen de bovino Jersey pre congelado, post congelado y post recongelado.....	38

## **ÍNDICE DE ANEXOS**

**Anexo A.** Colecta de semen mediante vagina artificial.

**Anexo B.** Semen pre diluído.

**Anexo C.** Análisis microscópico de semen.

**Anexo D.** Evaluación de morfoanomalías y viabilidad espermática de semen fresco.

**Anexo E.** Determinación de la concentración espermática en equipo automatizado.

**Anexo F.** Congelación de semen en vapores de nitrógeno.

**Anexo G.** Preparación de medio Tyrode.

**Anexo H.** Incubación de semen.

**Anexo I.** Recongelación de semen en vapores de nitrógeno.

**Anexo J.** Fluorocromo Naranja de Acridina usado en análisis de fluorescencia.

**Anexo K.** Resultados de la prueba de fluorescencia para determinar daño en ADN de espermatozoides.

**Anexo L.** Espermatozoides sometidos al Test de Host.

**Anexo M.** Equipos utilizados para la investigación.

## RESUMEN

El objetivo fue evaluar el efecto de la recongelación de espermatozoides bovinos sobre la calidad espermática de semen descongelado. Para esto se realizó la descongelación del semen en agua a 56 °C durante 12 segundos para simular una agresión seminal máxima, el contenido de las pajillas se vertió en tubos de ensayo para mantenerlos atemperados a 37 °C e incubarlos con 5 ml del medio *Tyrode* durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo se realizó el análisis microscópico del semen, se realizaron dos centrifugaciones 300 rpm/5 minutos - 800 rpm/10 minutos y se determinó la concentración espermática con la ayuda de un contador digital de células para diluir el semen; la estabilización y acondicionamiento de los espermatozoides se la realizó a temperatura ambiente (14 – 20 °C) durante 45 minutos y bajo luz ultravioleta, posteriormente se procedió al envasado y sellado de las pajillas usando pajillas de 0.5 ml y alcohol polivinílico para sellarlas. Se realizaron las curvas de temperatura y finalmente la recongelación en vapores de nitrógeno. Para la comprobación de hipótesis se utilizaron las técnicas de análisis de ADEVA (Análisis de Varianza) y separación de medidas por el método del rango múltiple de Waller Duncan a un nivel de significancia  $p < 0,01$ . Se determinó así, que en los parámetros evaluados el semen recongelado mostró mejores resultados como en el daño de ADN en donde se determinó que el semen recongelado presentó un menor daño con un 1,07 % a diferencia del semen congelado el cual presentó un 8,74% de daño. Al analizar las diferentes variables de semen recongelado se determinó que el efecto de esta biotecnología es positivo en variables como el daño en el ADN y daño en la membrana espermática, teniendo valores inferiores a los reportados en semen congelado; lo que indica que al recongelar espermatozoides la calidad espermática mejora especialmente en las variables mencionadas. Se recomienda utilizar espermatozoides recongelados en biotecnologías reproductivas como la Fertilización In Vitro.

**Palabras clave:** <RECONGELACIÓN>, <ESPERMATOZOIDEOS>, <BOVINOS>, <CALIDAD SEMINAL>, <SEMEN>.

## SUMARY

The objective was to evaluate the effect of re-freezing bovine sperm on the sperm quality of thawed semen. For this, the semen was thawed in water at 56°C for 12 seconds to simulate a maximum seminal aggression, the content of the straws was poured into test tubes to keep them temperate at 37°C and incubated with 5 ml of Tyrode medium for 15 minutes. After this time, the microscopic analysis of the semen was carried out, two centrifugations were carried out 300 rpm / 5 minutes - 800 rpm / 10 minutes and the sperm concentration was determined with the help of a digital cell counter to dilute the semen. The stabilization and conditioning of the sperm was carried out at room temperature (14-20° C) for 45 minutes and under ultraviolet light, then the straws were packed and sealed using 0.5 ml straws and polyvinyl alcohol to seal them. The temperature curves and finally the refreezing in nitrogen vapors were carried out. For hypothesis testing, the analysis techniques of ADEVA (Analysis of Variance) and separation of measurements by the Waller Duncan multiple range method were used at a significance level of  $p < 0.01$ . It was thus determined that in the evaluated parameters the reconfrozen semen showed better results as in the DNA damage where it was determined that the reconfrozen semen presented less damage with 1.07% in contrast to the frozen semen which presented 8, 74% damage. When analyzing the different variables of re-frozen semen, it was determined that the effect of this biotechnology is positive in variables such as DNA damage and sperm membrane damage, having values lower than those reported in frozen semen; this indicates that when sperm is re-frozen, sperm quality improves especially in the mentioned variables. It is recommended to use re-frozen sperm in reproductive biotechnologies such as In Vitro Fertilization.

**Key words:** <REFREEZE>, <SPERMATOZOIDS>, <BOVINOS>, <SEMINAL QUALITY>, <SEMEN>.

# CAPÍTULO I

## 1. INTRODUCCIÓN.

### 1.1. Planteamiento del Problema.

#### 1.1.1. *Situación Problemática.*

En el Ecuador encontramos 4'056.796 de cabezas de ganado vacuno, en la región sierra se concentra el 48.4%, la región costa reporta el 42.4%, la Amazonía concentra el 9.1% y zonas no delimitadas el 0.02%. La región sierra reporta una producción lechera de 3'843.133 litros lo que representa el 76.5% de la producción Nacional (INEC, 2019).

Desde 1985, las biotecnologías de la reproducción animal especialmente en bovinos lecheros alcanzaron su auge en Europa. Estas técnicas, en especial la Inseminación Artificial, tuvieron un impacto significativo en rumiantes mayores a partir de la segunda guerra mundial. Posteriormente la súper ovulación, lavado, transferencia y congelación de embriones seguida de la aspiración folicular para las técnicas de Fecundación *In Vitro* e ICSI se han ido desarrollando para brindar alternativas biotecnológicas a los productores e investigadores a nivel mundial.

Nuevas Biotecnologías de la reproducción reemplazarán a las existentes y el desarrollo de este trabajo investigativo permitirá recabar información acerca del protocolo de recongelación de espermatozoides para en un futuro aplicarla en casos de sexaje de semen, fertilización in vitro, inyección intracitoplasmática de espermatozoides, etc.

#### 1.1.2. *Formulación del problema.*

¿Cuál es la incidencia de la recongelación de espermatozoides bovinos sobre la calidad espermática de semen descongelado?

### ***1.1.3. Preguntas directrices o específicas de la investigación***

¿Los espermatozoides sometidos al proceso de recongelación tendrán menor daño en la membrana plasmática?

¿Los espermatozoides sometidos al proceso de recongelación tendrán menor daño en la cromatina?

¿Se logrará crear un protocolo de referencia para futuras investigaciones acerca de la recongelación de espermatozoides bovinos?

¿Los espermatozoides sometidos al proceso de recongelación serán más viables para técnicas de biotecnología reproductiva como la Fertilización *In Vitro* o la Inyección Intracitoplasmática de espermatozoides?

### **1.2. Justificación.**

Existen avances investigativos que conllevan al desarrollo práctico en el campo de la biotecnología de la Reproducción Animal, elaborar protocolos de nuevas técnicas para su futura aplicación en el sector productivo e investigativo se convierte en la base fundamental del avance tecnológico.

Por esta razón el presente trabajo se enfoca en generar información acerca de la técnica de recongelación de espermatozoides bovinos con la finalidad de aplicarla en futuras investigaciones, así como en el desarrollo de nuevos protocolos biotecnológicos en el ámbito de la Reproducción Animal.

Mediante la experimentación se generará información teórica que servirá para iniciar un banco de datos con información actualizada sobre esta biotecnología; además, al conjugar dicha información con la práctica se podrán estandarizar técnicas y protocolos para hacerla más eficiente y así tanto investigadores como productores se puedan beneficiar de los resultados obtenidos al finalizar esta investigación.



### **1.3. Objetivos.**

#### ***1.3.1. Objetivo General.***

Evaluar el efecto de la recongelación de espermatozoides bovinos sobre la calidad espermática de semen descongelado.

#### ***1.3.2. Objetivos Específicos.***

- a) Determinar el porcentaje de espermatozoides viables en semen descongelado sometido al proceso de congelación y recongelación.
- b) Evaluar el daño de la membrana plasmática de los espermatozoides descongelados posterior a la congelación y recongelación.
- c) Identificar el daño del paquete de ADN en los espermatozoides descongelados posterior a la congelación y recongelación.

### **1.4. Hipótesis.**

#### ***1.4.1. Hipótesis nula.***

La recongelación de espermatozoides bovinos no mejorará la calidad espermática de semen descongelado.

#### ***1.4.2. Hipótesis alterna.***

La recongelación de espermatozoides bovinos si mejorará la calidad espermática de semen descongelado.

## CAPÍTULO II

### 2. MARCO TEÓRICO.

#### 2.1. Antecedentes.

La recongelación de espermatozoides es una biotecnología reproductiva que ha comenzado a utilizarse en la última década principalmente con el objetivo de preservar material genético valioso de animales que se encuentran en peligro de extinción. Trabajos realizados en osos pardos como el de Álvarez (2018, págs. 66-67), muestran cómo la recongelación de espermatozoides se convierte en una alternativa para seleccionar y obtener material genético de mejor calidad al ser comparado con el material obtenido de una congelación convencional.

Almela (2014), en su tesis doctoral se convierte en la primera investigadora en reportar datos acerca de la recongelación de espermatozoides bovinos con la finalidad de conservar gametos masculinos de la raza Murciano Levantina, en peligro de extinción, en sus resultados reporta datos interesantes y menciona que en cuanto a la calidad seminal se presentan mejores valores en semen descongelado de una congelación normal que en el recongelado haciendo hincapié a que existieron diferencias muy marcadas entre los animales sujetos al estudio. Sin embargo, al realizar un estudio de fertilidad con el semen recongelado inseminando a 7 novillas frisonas reporta un 57,1% de fertilidad lo que se traduce en que se puede usar esta técnica para la conservación *In vitro*.

Por otro lado, Carwel et al., (2010, págs. 140-141), en su trabajo realizado acerca de la recongelación de semen de cabras mencionan que la recongelación brinda la oportunidad de volver a congelar semen que se ha descongelado por error. Otra especie en la que se ha trabajado en esta biotecnología es la equina con la finalidad de aprovechar el material genético en técnicas de reproducción animal asistida como la ICSI en donde el semen ha sido sometido hasta 8 recongelaciones y se ha demostrado que el ADN comienza a desnaturalizarse a partir de la quinta recongelación (Chelsey, Pinto, Cramer, Love, & Paccamonti, 2017, págs. 19-24).

Otro experimento realizado en semen bovino demostró que el semen descongelado presentó mejores características al ser enfriado en hielo seco a  $-79^{\circ}\text{C}$  antes de ser recongelado en nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$  mejorando las tasas de motilidad en un 13 a 17% (Abdussamand, Gauly, & Holtz, 2015, págs. 278-284).

A estos trabajos se suman además investigaciones realizadas en semen humano con la finalidad de mediar las criolaciones de los espermatozoides sometidos a varios ciclos de congelación y recongelación, las muestras provinieron de hombres con cáncer testicular y hombres sanos en donde se demostró que los espermatozoides de hombres sanos resisten dos ciclos más que los espermatozoides de hombres con la patología mencionada (Verza, Feijo, & Esteves, 2009, págs. 581-590).

En el Ecuador y en Sudamérica no existe información científica publicada acerca de esta biotecnología.

## **2.2. Manejo de sementales bovinos.**

Angelino (2009) menciona que el manejo de los animales comienza muy temprano, con su ubicación en unas cómodas, amplias e higiénicas instalaciones que permitan a los animales el desarrollo armónico y la expresión de sus caracteres instintivos sexuales. La alimentación contendrá aportes proteicos y energéticos suficientes para la construcción orgánica y mantenimiento de la actividad vital. De igual modo, deberá estar equilibrado la composición vitamínico - mineral de la dieta, y con gran vigilancia de la composición en vitaminas liposolubles y minerales como el calcio, magnesio, fósforo y, principalmente zinc, entre otros. Las instalaciones deberán asegurar el control de la temperatura ambiente, huyendo de la exposición al frío y calor extremos, así como de la humedad excesiva, situaciones contraproducentes para la producción de espermatozoides.

Ballina (2010), indica por su parte que los reproductores representan al menos el 50 % de la genética del hato y se ubican en el segundo orden respecto a los requerimientos mínimos de manejo.

Como algunas recomendaciones importantes para esta categoría nos menciona:

- Practicarle un chequeo anual para brucelosis.
- Evitar usarlo en el hato por más de dos años.
- Mantenerlo no más de 20 a 25 vacas por toro.
- Usarlo primero con las vaquillas o vaconas.
- Practicarle pruebas andrológicas y de fertilidad una vez al año.
- Tener presente que no herede defectos físicos o genéticos.

Separarlo del resto del hato por un tiempo para evitar que se tenga consanguinidad con las vacas.

### **2.3. Sistemas de recolección de semen bovino.**

Según Guerrero (2014), la colecta de semen está constituida como la primera operación, y también es considerada la operación de mayor importancia en el programa de inseminación. Este proceso envuelve una serie de factores, prácticas, conocimientos y habilidades, que, puestos en un conjunto, van a resultar en el mejor aprovechamiento del toro y por ende un eyaculado con una excelente calidad.

Además, nos menciona que para el desarrollo de esta práctica serán empleados dos tipos de equipos muy conocidos y con excelentes resultados en la obtención del líquido seminal:

- La vagina artificial
- El electro eyaculador

#### ***2.3.1. Vagina artificial.***

Arieta Román (2014), cita que la vagina artificial consiste en tubo cilíndrico de plástico el cual debe ser resistente. Aproximadamente sus medidas son 7 centímetros de diámetro y de 34 a 40 centímetros de largo. El tubo se encuentra recubierto internamente por una camisa de goma que se dobla en los extremos del cilindro formando un compartimento que se llena con agua caliente a una temperatura que oscila entre 45 a 46 °C y aire, con la finalidad de proveer el estímulo adecuado de temperatura y presión al órgano sexual del macho, lográndose así la eyaculación, el producto recogido estará libre de contaminación y es netamente representativo de la eyaculación en condiciones normales. La recolecta en vagina artificial requiere la presencia de una vaca en celo o de un falso animal (maniquí) que sirve de estímulo. Esto le ofrece al macho las condiciones parecidas a las naturales.

Escamilla (2005), al respecto menciona que para la extracción se utiliza un señuelo que puede ser una vaca en celo o un maniquí. Antes de la colecta del semen se debe tener en cuenta dos aspectos muy importantes: en primer lugar, la higiene y en segundo lugar el estímulo del semental. En este sentido, se deberá apoyar con el método más efectivo para estimular al toro. Uno de ellos es la monta falsa, la cual consiste en permitir al semental montar sobre el señuelo y desviar el pene tomándolo con la palma de la mano sin ofrecerle la vagina; un aspecto muy importante es que nunca se deberá tocar con la mano la mucosa del pene ya que provocará contaminación. En el siguiente intento de monta se colocará la punta del pene en la entrada de la vagina artificial; inmediatamente el toro se

lanza hacia adelante en un empuje final o conocido como golpe de riñón que vendrá acompañado a la eyaculación. Se ha comprobado que la monta falsa en el bovino aumenta la calidad del semen en cuanto a volumen, concentración espermática y motilidad. El método de la vagina artificial tiene como principal desventaja de requerir el uso de animales dóciles y entrenados.

### **2.3.2. *Electroeyaculación.***

Según, Iñiguez et al., (2017), el método de electroeyaculación permite obtener semen de toros sanos que no aceptan el uso de vagina artificial como método de colecta, debido a que para esto es necesario un entrenamiento previo de los sementales, y de aquellos en que es imposible la ejecución de la monta debido a lesiones principalmente. Por ejemplo, se pueden presentar casos de animales que padecen de poliartritis, fracturas, anquilosis, entre otras. Para este método se usa un electro eyaculador, que no es más que un electrodo conectado a una batería que genera estimulaciones eléctricas rítmicas con una carga no mayor a 20 voltios y entre 0 y 1000 miliamperios.

Al respecto, Brito (2017), indica que al momento del manejo y manipulación del electro eyaculador se debe colocar el electrodo (sonda) sobre la ampolla de Henle y las glándulas vesiculares. Es importante que el electrodo se ajuste perfectamente contra el ano y realizar movimientos hacia adelante y atrás, para de esta manera, aplicar el estímulo eléctrico sobre los centros nerviosos que producen la erección y la posterior eyaculación. Al comienzo la intensidad de los estímulos aplicados debe ser mínima y se deben ir aumentando gradualmente hasta que se produzca la eyaculación. Cada estímulo durará menos de un segundo y se aplicarán entre 5 y 10 estímulos por cada grado de intensidad. Previo a la utilización del electro eyaculador se debe preparar al animal realizando el corte del vello prepucial, limpieza de la zona peneana con soluciones no espermicidas, limpieza del recto y estimulación mediante masaje transrectal.

## **2.4. Valoración del eyaculado bovino**

Hidalgo (2005), indica que de una adecuada valoración de la fertilidad dependerá la utilización futura del material seminal y el grado de aprovechamiento de los eyaculados obtenidos a lo largo de toda la vida reproductiva de un semental; esto es, las dosis a producir por eyaculado, en función al número de células espermáticas viables y, en definitiva, su mayor o menor rentabilidad. Un requisito indispensable para el desarrollo de esta biotecnología es que el semen utilizado mantenga su

capacidad de fertilidad después de haber sido crio preservado utilizando correctamente las técnicas existentes.

#### **2.4.1. Características macroscópicas.**

Gómez & Migliorisi (2009), nos muestran indicadores de evaluación macroscópica del semen en donde nos recomiendan:

##### *2.4.1.1. Volumen.*

Se analiza directo en el tubo graduado, recalcando que un toro más de 2 años debe tener un eyaculado de no menos de 4ml. El volumen varía entre 2 a 12ml.

##### *2.4.1.2. Color.*

Se consideran normales los colores que van del blanco al amarillento, siendo patológicos, los colores rosado, amarronado y verdoso.

##### *2.4.1.3. pH.*

Se estima extrayendo una gota de semen del tubo y emplear sobre una tira indicadora de pH. Es considerado un pH normal, en un rango 6.2 y 6.8. Nota: no incluir la tira dentro del tubo para que el semen no sea alterado por el reactivo.

##### *2.4.1.4. Olor.*

El olor del semen es valorado al ser extraído, percibiéndolo directamente del tubo de recolección. Se estima un olor neutro (no desagradable) como un valor normal, y se descartan las muestras que presenten olores desagradables o a orina.

### 2.4.2. Características microscópicas.

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

#### 2.4.2.1. Motilidad masal.

Es un movimiento de masa, la actividad en onda de todos los espermatozoides, observado en los eyaculados densos. Para su evaluación se toma una gota del semen a examinar (gota de semen íntegro) con una pipeta, se coloca la gota sobre un portaobjeto a 37°C y se observa en campo claro (aumento 10X), sin colocar el cubreobjetos.

De acuerdo a Rosenberger (1994), el grado del movimiento en masa o motilidad masal (MM) se describe según la siguiente escala:

+++ : Actividad cinética excelente, remolinos potentes con ondas espermáticas perceptibles.

++ : Actividad cinética buena, remolinos apreciables, aunque poco potente.

+ : Actividad cinética regular, disminución de remolinos y con poca frecuencia que la anterior.

- : Actividad cinética incompleta, no se forman remolinos en él, sino ocasionalmente y sin ninguna intensidad.

**Tabla 1 - 2:** Clasificación de la motilidad espermática de acuerdo a la Sociedad de Teriogenología de los Estados Unidos de Norteamérica

<b>MOTILIDAD</b>	<b>EXCELENTE</b>	<b>BUENA</b>	<b>REGULAR</b>	<b>MALA</b>
MASAL	+++	++	+	-
INDIVIDUAL	≥ 70 %	50 – 70 %	30 – 50 %	≤ 30 %

Fuente: (Agüero, 2012): Clasificación de la motilidad espermática.

Realizado por: Mancheno Herrera, Carlos Andrés, 2021

#### 2.4.2.2. *Motilidad individual.*

Barth, Bó, Broglatti, Tribulo, & Tribulo (2014), señalan que la motilidad individual y la estimación de células con movimiento progresivo nos da información de la integridad de la membrana.

Gómez & Miglioris (2009), indican que para realizar esta evaluación se debe diluir el semen en Citrato de Na 2.92%. Se debe colocar una gota gruesa de semen, de aproximadamente 30 ó 40 microlitros en un tubo con unos 2ml. de la sustancia de Citrato que se debe encontrar a la misma temperatura del semen, en el Baño María.

Una vez disuelto el semen se extrae una gota de la dilución y se la coloca sobre un portaobjetos atemperado a 36-37°C y se coloca un cubreobjetos sobre ésta, a la misma temperatura. Se observa al microscopio, siempre sobre la platina térmica, a 40 aumentos.

Se debe analizar un campo y valorar subjetivamente los espermatozoides que se mueven de manera rectilínea progresiva, siendo los que atraviesan el campo de observación. Los espermatozoides que van circularmente o se dirigen en forma oscilatoria, son considerados con movimientos anormales. El valor que se muestra es el de los espermatozoides con direcciones rectilíneas progresivas del total de espermatozoides aceptados, siendo un valor pequeño, aceptable del 50 %.

#### 2.4.2.3. *Viabilidad espermática.*

Pérez & Pérez (1985), incluye al respecto que esta característica mide el porcentaje de espermatozoides vivos y se expresa como el porciento de células muertas. Para medir la viabilidad de una muestra de semen, se utilizan colorantes vitales, tales como el colorante eosina-nigrosina, con el cual los espermatozoides muertos serán teñidos de color rojo o en rosa, mientras que los vivos quedan sin teñir, esto debido a que el colorante, cuando existe daño a nivel de la membrana celular, como en la célula espermática muerta, es capaz de atravesarla y colorearla; aquellos espermatozoides que se observan en la lámina sin teñirse, son aquellos espermatozoides que poseen una membrana celular intacta y no permeable al paso del colorante.

#### 2.4.2.4. *Concentración espermática.*

Según, Bearden, McCallow & Smith (1982, págs. 157-160), la concentración de los espermatozoides se expresa como el número de espermatozoides/mL de semen. El conteo directo de



células, a través del hemocitómetro o cámara de Neubauer fue diseñado para contar eritrocitos. Esta cámara de Neubauer consiste de una laminilla especial que tiene 2 cámaras de conteo. Las cámaras de conteo poseen 0,1 mm de profundidad y un área graduada en el fondo de la cámara de 1 mm<sup>2</sup>. Este cuadro se divide en 25 cuadros más pequeños. Al conocerse la profundidad y el área se puede determinar el número de espermatozoides en un volumen dado. El diluyente utilizado debe inmovilizar a los espermatozoides para que se pueda llevar a cabo el conteo. Normalmente se utiliza NaCl- al 3% (solución hipertónica), lo cual hace que la célula deje de ser viable. La dilución de la muestra de semen, para determinar la concentración espermática en el caso del bovino es de 1:200. Una vez diluido el semen e inmovilizados los espermatozoides, se coloca el semen diluido en la cámara de Neubauer. Para calcular la concentración de espermatozoides se utiliza la siguiente ecuación: (Espermatozoides/mL)= Número de espermatozoides contados en 5 cuadrados (4 esquinas + el centro) x 5 x dilución (1:200) x 10 x 1000.

#### 2.4.2.5. *Morfología espermática.*

La morfología está estrechamente relacionada con la motilidad espermática en forma más directa, y se mide en porcentaje de espermatozoides con defectos de morfología. Se necesita, al menos, un buen porcentaje de espermatozoides móviles y de ellos se espera que entre 70 a 80% posea morfología normal. Esto quiere decir, que como máximo se acepta 20 a 30% de atípicas.

Palacios (2005, págs. 235-242), señala que la morfología espermática es un factor determinante en la capacidad de fertilización del semen, ya que existe una correlación entre defectos espermáticos e infertilidad. Los espermatozoides son translucidos y virtualmente invisibles al microscopio de luz directa, por lo que se requiere del uso de colorantes que provean de un fondo oscuro para visualizarlos. La coloración vital, con eosina, azul de anilina, o eosina-nigrosina, es la más comúnmente usada para la evaluación morfológica de semen. La morfología se evalúa de la siguiente manera: se coloca una gota de aproximadamente 20 µL de semen diluido sobre un portaobjetos limpio y desengrasado y se coloca una gota de colorante, se realiza el frotis en forma firme y pareja. Luego de esperar, por lo menos 10 min, para el secado del frotis, se coloca en el microscopio y se procede a contar los espermatozoides. Se cuentan 200 espermatozoides por muestra para determinar el porcentaje de espermatozoides normales, el porcentaje de espermatozoides anómalos y de éstos cuáles poseen atípicas de tipo primaria y secundaria.

## **2.5. Membrana espermática.**

Pérez (2020), señala que todo el espermatozoide está contenido en la membrana plasmática, la cual se ensancha en áreas especializadas y forma el componente más externo del espermatozoide. Permanece intacta, excepto en la región del acrosoma previo a la fertilización o como resultado de la muerte del espermatozoide. El espermatozoide tiene una membrana heterogénea y cinco dominios específicos: el acrosoma, segmento ecuatorial, basal, pieza media y cola.

Wunder (2009), añade al respecto que la composición lipídica y proteica de cada membrana es única y ocurre muy poco o nada de intercambio de lípidos o proteínas entre ellas. Este compartimiento ocurre durante la espermiogénesis y se mantiene durante las modificaciones en el epidídimo, permite que cada membrana fomente su función específica.

### **2.5.1. Componentes de la membrana.**

Wunder (2009), indica que estructuralmente se compone de tres capas o zonas: bicapa lipídica, interfase fosfolípidos-agua y glycocalix.

La bicapa lipídica es una capa que está subdividida en fosfolípidos polares, que se direccionan de tal forma que los grupos de cabezas polares hidrofílicas se encuentran externamente y las cadenas de ácidos grasos ubicadas internamente unas a otras.

La mayoría de los lípidos que están presentes son fosfolípidos y colesterol, en una razón de 0.64:0.36. La cantidad de colesterol, relativo al fosfolípido, indica la fluidez de la membrana. De manera general mientras más alta la concentración relativa de los fosfolípidos, más fluida es la membrana. El colesterol, por lo tanto, actúa junto con proteínas integrales, como un estabilizador garantizando una configuración laminar de los fosfolípidos y de la bicapa. Es sabido que la concentración de colesterol llega a variar entre las zonas de la membrana plasmática, siendo más alta en la región del acrosoma.

### **2.5.2. Daños en la membrana.**

Según, Innocenti (2009), “Shock térmico” es el término que describe la respuesta de estrés con que responde el espermatozoide a una disminución de temperatura. El daño espermático que resulta de un choque térmico va a depender no solo de la baja de temperatura sino también de la velocidad con

que esta ocurra. Se ha establecido que cada tipo celular posee una velocidad optima de congelación que asegura su supervivencia luego de la criopreservación, si la velocidad de congelación es acelerada o disminuye debido al estrés producido por el proceso de criopreservación aumenta.

Está constatado que al reducir la temperatura por debajo de los 20°C el espermatozoide comienza a presentar cambios biofísicos, principalmente en la membrana plasmática, pero no es sino cuando se somete a temperaturas entre los 0°C y los -20°C, o hasta los -60°C, que el espermatozoide sufre efectos de descompensación iónica y de líquidos suficientemente graves para causar un shock térmico. Esto se puede detectar al microscopio por la presencia de espermatozoides con la cola doblada, con pérdida de motilidad por la disminución de energía, o realizando movimientos en círculo, lo cual se debe al aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática y a la salida de iones y moléculas.

Según, Innocenti (2009), además añade que el proceso de congelación da lugar también a cambios de fase en la membrana celular y pueden alterar receptores de membrana y/u otras proteínas interfiriendo en su capacidad de reconocimiento, de transporte de agua e iones a través de los canales o poros de membrana, etc.

Según, Innocenti (2009), los ROS son especies químicas que tienen un electrón no pareado y se comportan como moléculas altamente reactivas; pueden causar daño por reaccionar con las diversas biomoléculas sustrayendo electrones para lograr su estabilidad. El aumento de los ROS puede dañar a los espermatozoides y una de las principales causas del deterioro espermático es el estrés oxidante, que ocasiona peroxidación de los lípidos de la membrana, cambio de su fluidez y alteración de la permeabilidad, lo que puede llevar a la muerte celular. La membrana de los espermatozoides contiene una alta concentración de ácidos grasos poliinsaturados, lo que le brinda una alta susceptibilidad a los problemas de daño oxidativo (oxidación o peroxidación), alterando la posibilidad de fecundación.

## **2.6. Evaluación de la calidad espermática.**

### ***2.6.1. Test de resistencia de la membrana – Test de Host (hipoosmótico).***

Hernández & Carrillo-Gonzales (2015, págs. 165-171), sobre el tema mencionan que este test se fundamenta en la suspensión de espermatozoides en un medio hipoosmótico que ocasiona un desequilibrio osmótico entre el medio extracelular y el intracelular, situación que la célula compensa fisiológicamente difundiendo agua al compartimento intracelular y como consecuencia, el

espermatozoide aumenta su volumen con consecuentes cambios morfológicos en los flagelos, como dilatación y enrollamiento de los mismos

Según, Veloz (2017), en el test de endósmosis (Hypoosmotic Swelling test, HOST), se basa en someter a los espermatozoides a un medio de presión osmótica que es más disminuida que la fisiológica, lo que ocasiona una entrada de agua en la célula en un intento de igualar la presión osmótica interna con la del medio externo. Para que esta respuesta se produzca, la membrana plasmática del espermatozoide debe de estar íntegra y con los mecanismos de intercambio de fluidos funcionando de manera correcta.

### **2.6.2. Estudio de la cromatina.**

Nava, Quintero, Hernández & Osorio (2016, págs. 20-25), mencionan que la integridad de la cromatina espermática (ICE) ha sido relevante ya que en un eyaculado se ha encontrado espermatozoides vivos, motiles y con morfología normal que transportan cromatina dañada, los cuales no pierden la capacidad fecundante, pero si comprometen el desarrollo embrionario subsiguiente. La ICE se ha asociado con el potencial reproductivo y algunos estudios han incluido una correlación negativa como el daño a la cromatina y otros parámetros de calidad, como es la , motilidad, viabilidad, y su fertilidad. Varios son los factores asociados con daño en la cromatina; entre éstos se ha reportado que la criopreservación aumenta el valor porcentual de espermatozoides con daño en la cromatina. En el periodo de la espermatogénesis, el ADN espermático se localiza inicialmente dispuesto en forma de nucleosomas, al estar junto ADN de las células somáticas a unas proteínas que se llaman histonas, las cuales serán reemplazadas casi en su totalidad por las portaminas que se encargan de dar al núcleo espermático su compactación característica.

### **2.6.3. Fluorescencia con naranja de acridina.**

Páez & Corredor (2014, págs. 49-55), señalan que este test se utiliza para evaluar la susceptibilidad del ADN a la desnaturalización. El naranja de acridina es un fluorocromo meta cromático y puede utilizarse en tinción nativa o desnaturalizada. El test se basa en someter a la célula a un agente desnaturalizante y posteriormente realizar una tinción con naranja de acridina. El espectro de emisión

del fluorocromo (verde o naranja) depende del estado de la hebra de ADN. Si el colorante se alterna con la doble hélice intacta del ADN, emite una fluorescencia de color verde. Sin embargo, cuando el ADN está desnaturalizado, la unión del fluorocromo con la hebra simple crea una fluorescencia de color naranja.

## **2.7. Criopreservación de semen bovino.**

Según, Cárdenas (2013), la criopreservación de semen de animales domésticos ofrece muchas ventajas en los sistemas de producción, particularmente en los programas de mejoramiento genético. El proceso de criopreservación produce un daño celular que disminuye el porcentaje de espermatozoides viables.

Al respecto, Holt (2000), indica que desde el descubrimiento del glicerol como agente crioprotector (CP) efectivo y del establecimiento de las técnicas básicas de criopreservación, el semen de varias especies se congela y utiliza con éxito en la IA.

Hafez & Hafez (2000), añade que si se agregan CPs como el glicerol o el dimetil-sulfóxido (DMSO) al medio de congelación, es posible retardar la deshidratación celular y el consecuente daño por el efecto de la disolución.

Por tanto, la deshidratación osmótica, más que la formación de hielo intracelular, es la principal causa de las alteraciones ultraestructurales de la membrana, y una de sus consecuencias es la pérdida de la selectividad de la membrana (Parks & Graham, 1992, págs. 209-222).

Medina, Sánchez & Cruz (2007), señalan que las células congeladas están sujetas a tensiones que resultan de las interacciones agua-soluto y que aumentan con la cristalización del agua. Existe una velocidad de enfriamiento óptima para cada tipo de célula, dependiendo de su tamaño, relación superficie-volumen, permeabilidad al agua y el coeficiente de temperatura de esa permeabilidad.

El proceso de criopreservación incluye 5 etapas: dilución, refrigeración, adición del CP, congelación y descongelación.

### **2.7.1. Diluyentes de semen bovino.**

Entendemos por diluyente a la solución acuosa que permite aumentar el volumen del eyaculado hasta conseguir las dosis necesarias, preservar las características funcionales de las células espermáticas y mantener el nivel de fertilidad adecuado (Gadea, 2003, págs. 17-27).

Derrivaux (1982), menciona que entre los diluyentes utilizados desde el principio de la tecnología de IA bovina se encuentran:

- Diluyente de yema de huevo fosfatada
- Diluyente de yema de huevo citrada
- Diluyentes a base de leche
- Diluyentes gelatinados
- Diluyentes a base de leche de coco y yema de huevo

Según, Carballo, Canseco, García & Montiel (2005) y un diluyente debe reunir las siguientes propiedades:

- Proporcionar nutrientes como fuente energética, para el metabolismo de los espermatozoides.
- Proteger contra el efecto nocivo del enfriamiento acelerado.
- Imposibilitar cambios perjudiciales en el pH, al formarse ácido láctico.
- Perdurar la presión osmótica apropiada y el equilibrio electrolítico.
- Inhibir la proliferación bacteriana.
- Aumentar el volumen de semen de modo que éste puede usarse en múltiples inseminaciones.
- Proteger las células espermáticas contra los daños producidos durante la congelación y descongelación.
- Preservar la vida de los espermatozoides con un mínimo efecto sobre la fertilidad.
- Debe ser de preparación fácil, estable y económica.

### **2.7.2. Crioprotectores.**

(Mazur, 1984) indica que las lesiones por la congelación del agua intracelular e intersticial pueden atenuarse mediante la adición de compuestos crioprotectores en la elaboración de diluyentes (Lake & Setewart, 1978, págs. 187-194). Por tanto, la función de estos CPs es la de proteger a las células de las lesiones producidas por la congelación. Siendo la acción de estos compuestos la de extraer el agua

intracelular evitando la formación de cristales en el interior de la célula. La ausencia de CP producirá alteraciones en el núcleo que contiene el paquete cromosomal, daños en el acrosoma y de la estructura lipídica y canales iónicos de la membrana espermática.

La presencia de CPs es absolutamente necesaria en los ciclos de congelación-descongelación. Son reemplazados osmóticamente el agua intracelular antes del enfriamiento y se mezclan con tasas lentas controladas de pérdida de calor. La eficiencia se ve en la reducción paulatina del volumen celular, minimizando así la formación de cristales dentro de las células. El efecto CP ayuda a deshidratar la célula antes de someterla a enfriamiento y como resultado, se obtiene la mínima formación de cristales de hielo.

### **2.7.3. *Concentración de dosis seminales.***

Poto & Peinado (1999, págs. 4-9), señalan que el número de espermatozoides para la constitución de una dosis seminal fértil es mucho mayor, a veces más del doble, para el semen congelado que para el refrigerado. La situación se agrava cuando el semental del que se extrae el semen pertenece a una raza que no ha sido seleccionada por su aptitud reproductiva, con lo cual, el número de esp/dosis fértil ha de ser aumentado. A veces, no solo el problema se encuentra en aumentar el N° de células espermáticas vivas, sino que también es necesario considerar la situación particular de la población de esa raza, caso de un pequeño n° de sementales donde no se puede elegir entre diferentes animales, ya que hay que conformarse con lo que queda.

### **2.7.4. *Sistemas de envasado.***

Los envases que son utilizados tienen infiere con el éxito de supervivencia de los espermatozoides. Según, Polge, Salamon & Wilmut (1970, págs. 424-429), en los estudios pioneros en esta área, los espermatozoides de cerdo se congelaban en ampollas o en tubos de vidrio usando bajas tasas de congelamiento junto con concentraciones de glicerol relativamente altas.

Estudios realizados por Clulow, Mansfield, Morris, Evans & Maxwell (2008, págs. 298-308), indican que en la congelación en pajuelas de 0'25 y 0'50 ml, no se observan diferencias significativas en los parámetros evaluados después de la criopreservación del semen.

### **2.7.5. *Curvas de temperatura.***

El proceso de congelación expone a las células espermáticas a una pérdida de agua y a un incremento de la concentración de solutos intra y extracelulares.

El semen de toro es recolectado comúnmente l sobre tubo seco y estéril sin diluyente. Un estudio reciente realizado por Wendee (2007), narra las bondades de realizar la colecta sobre un dispositivo llamado BreedMaX® que contiene diluyente en su interior a 37°C antes de realizar la colecta. No obstante, el semen de toro puede permanecer sin diluyente en un baño de agua termostatzado durante un periodo de 30 min.

Gran parte de los cuidados y tiempos usados en el laboratorio de los centros de reproducción son destinados a evitar el choque térmico. Por regla general, después de recogido, el semen debe enfriarse a 4-5°C de forma gradual (1'5-2 h), y luego equilibrado (tiempo de espera a 4-5°C hasta congelación) durante 3-24 h. Poco se ha experimentado con la primera fase de la curva (37°C hasta 4-5°C). 160 min en una velocidad de 0'1°C/min en congelador programable. Es posible que este tipo de descenso de la temperatura sea más regular, homogéneo y lento que el enfriado en masa realizado en recipientes donde la técnica no está estandarizada (Wendee, 2007).

### **2.7.6. *Almacenamiento de dosis seminales.***

Quintero & Gonzales (2005), indica que la calidad de un semen muy fértil puede deteriorarse rápidamente si se maneja o se almacena descuidadamente. El semen debe de ser procesado bajo normas estrictamente controladas y sujetas constantemente a pruebas de control de calidad. El semen bovino congelado puede guardarse durante un tiempo indefinido si se mantiene de forma constante a temperaturas muy bajas como las del nitrógeno líquido (-196 °C). La temperatura crítica es -44'4°C (-112°F), por lo tanto, las muestras sometidas a temperaturas que excedan de este valor, incluso durante un período corto de tiempo, suelen dañarse, a pesar de un rápido retorno a las temperaturas de almacenamiento.



### **2.7.7. Descongelación de semen.**

Según, Sellés, Gadea, Matás & Ruiz (2003, págs. 66-72), la descongelación es el proceso por el cual una sustancia que se ha solidificado por la pérdida de calor cambia al estado de líquido con la ganancia de energía procedente del medio que le rodea. La ganancia de temperatura se realiza sumergiendo la pajuela dentro de un termo atemperado a 37°C, 30 segundos.

Catena & Cabodevila (2002), al respecto señala que la viabilidad post-descongelación se determina mediante el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva y el vigor espermático. Durante la congelación-descongelación los daños que se producen en la membrana pueden no ser completamente expresados inmediatamente después de la descongelación. Por ello, el semen debe ser incubado a 37°C, 2 h en una evaluación conocida como prueba de termorresistencia o de incubación. El semen descongelado de buena calidad normalmente tiene 40-50% de espermatozoides con motilidad progresiva. Después de 2 h de incubación, estos valores disminuyen un 10-15%.

### **2.8. Recongelación de espermatozoides.**

Owiny, Barry & Godke (2010, págs. 56-64), menciona que la posibilidad de realizar la recongelación de semen descongelado podría tener importantes beneficios para el futuro de la tecnología reproductiva animal. Algunos de los beneficios que podría aportar sería el de mejorar las probabilidades de fertilización cuando el semen esté criopreservado en grandes cantidades, en suministros limitados, se trata de un semen muy valioso o ha sido descongelado por equivocación.

Maxwell et al., (2007, págs. 489-494), además nos dice que los programas de conservación genética para especies en peligro de extinción y ganado en general están basados fundamentalmente en la criopreservación del material genético masculino. Para cumplir con las cambiantes regulaciones higiénicas cuando el semen se descongela, es necesario purificar los espermatozoides y tratarlos con antibióticos específicos antes de realizar la recongelación para su envío al mercado y permitir el intercambio de material genético entre países.

Según, Vázquez et al., (2009, págs. 80-88), la realización del sexado de los espermatozoides entre ciclos de congelación-descongelación, es una de las principales finalidades de la recongelación. Sin embargo, esta técnica posee un coste muy elevado en cuanto a instalaciones y mantenimiento, por lo

que existen muy pocos laboratorios en los que se pueda realizar. Por lo tanto, para la realización del sexado es necesario enviar las muestras biológicas desde el punto de recogida en el campo a un laboratorio que ofrezca este servicio. Puesto que la refrigeración de las muestras para su envío al laboratorio especializado puede ser perjudicial incluso controlando las limitaciones como el tiempo y temperatura, la recongelación espermática sería la solución al principal problema de este tipo de transporte: la caducidad de las muestras espermáticas (Álvarez Rodríguez, 2012).

Maxwell, et al., (2007, págs. 489-494) señalan que la congelación-descongelación en dos o más ciclos ya ha sido realizada en varias especies de animales domésticos con el fin de mejorar los recursos genéticos disponibles, reduciendo así los costes que supone el así como también en el caso del sexado de espermatozoides por citometría de flujo.

Un estudio realizado por McCue et al., (2004), sobre las características del semen recongelado equino con diferentes diluyentes concluye que el semen equino puede ser recongelado con el objetivo de obtener un mayor número de pajuelas del mismo animal para ser utilizadas en programas de ICSI, además de concluir que en esta especie es posible la recongelación del semen como opción para preservar y optimizar el uso de material genético valioso para el futuro de la reproducción asistida.

La eficacia de la recongelación espermática en cuanto a fertilidad final obtenida se demuestra en diversos trabajos: Hollinshead et al., (2004, págs. 557-568); Morton, Rowe & Maxwell (2006); (2006, págs. 1333-1345); Arav, Zeron, Shturman & Gacitua (2002, págs. 583-586). Por su parte, Choi, Love, Varner, & Hinrichs (2006, págs. 808-819) emplearon semen recongelado para la realización de ICSI en caballos y obtuvieron unos resultados de desarrollo embrionario temprano sin diferencias con respecto al semen control que tan solo había sido sometido a una congelación.

Por otra parte, las pérdidas de calidad seminal que se producen durante la recongelación podrían ser menores con la utilización de gradientes de selección espermática, que usado entre dos ciclos de congelación consecutivos podrían mejorar la calidad de las muestras, lo que ayudaría a seleccionar la población con mayor motilidad según Nicolás et al., (2012, págs. 1119-1128), y mejorar el proceso de sexado espermático con el aumento en la proporción de espermatozoides vivos tras la separación de espermatozoides X e Y (Álvarez Rodríguez, 2012)

Existen referencias sobre la eficacia obtenida tras la IA de vacas con semen redescongelado, Arav et al., (2002, págs. 583-586) indican que el semen que ha sufrido doble congelación puede obtener una fertilidad muy próxima a la de vacas inseminadas con semen congelado convencional. Aunque según el tipo de tratamiento realizado, los resultados de gestación tras la IA de vacas con semen recongelado pueden diferir. Así, una sola gestación fue obtenida después de la IA de semen sexado por citometría

de flujo cuando fueron inseminadas doce vacas; esto significa que mejorando las técnicas de manejo del semen después de una vez descongelado y las de posterior recongelación, se podría aumentar la fertilidad post-IA (Underwood, Bathgate, Ebsworth, Maxwell, & Evans, 2010, págs. 7-12).

Además, Underwood et al., (2010, págs. 7-12) indican que el semen recongelado parece estar influido por el donante, con diferencias significativas de fertilidad entre toros; teniendo esto relación con la fertilidad obtenida para los toros cuando solo se utiliza semen una sola vez congelado. Siendo mayor la fertilidad del semen recongelado de toros que tienen una fertilidad mayor que con semen sólo congelado.

## CAPÍTULO III

### 3. METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN.

#### 3.1. Características del área de estudio.

##### 3.1.1. *Localización.*

El trabajo de campo de la presente investigación se realizó en la Parroquia Nuevo Mundo perteneciente al Cantón Riobamba, provincia de Chimborazo.

El trabajo de laboratorio se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo ubicado en la Panamericana sur Km 1 ½.

#### 3.2. Materiales.

##### 3.2.1. *Materiales de oficina.*

- Registros de campo.
- Esferográfico.
- Cuaderno de apuntes.

##### 3.2.2. *Materiales de campo.*

- Overol.
- Botas de caucho.
- Sogas.
- Vagina artificial con todos sus accesorios.
- Termo de agua.
- Papel aluminio.
- Guantes de nitrilo.

- Guantes de inseminación artificial.
- Cinta métrica.
- Tijeras.
- Mascarilla.

### **3.2.3. *Materiales de laboratorio.***

- Microscopio óptico.
- Placas porta objetos.
- Placas cubre objetos.
- Platina calefactora para microscopio.
- Contador digital de células (Opción de fluorescencia)
- pH metro digital.
- Micropipeta.
- Tubos de eppendorf.
- Baño maría.
- Termo descongelador de semen automático.
- Centrífuga.
- Tubos para centrífuga.
- Diluyentes de semen.
- Agua bidestilada.
- Tinción eosina – nigrosina.
- Guantes de nitrilo.
- Pinzas.
- Balones volumétricos.
- Vasos de precipitación.
- Agitador magnético.
- Luces UV.

### 3.3. Metodología.

#### 3.3.1. Descongelación e incubación de semen.

La descongelación se realizó en agua a 56 °C durante 12 segundos, proceso que simula una agresión seminal máxima. El contenido de cada una de las pajillas se vertió y mantuvo en tubos de ensayo atemperados en baño termostático a 37 °C y se incubaron durante 15 minutos, conteniendo cada uno de ellos 5 ml de medio *Tyrode* (Tabla 2 - 3).

**Tabla 2 - 3:** Composición del medio Tyrode.

Compuesto	Concentración (g/l)
NaCl	8.00
KCl	0.20
CaCl <sub>2</sub>	0.20
MgCl <sub>2</sub>	0.10
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.05
NaHCO <sub>3</sub>	1.00
Glucosa	1.00

Fuente: (Rigby et al., 2001, págs. 171-180)

Realizado por: Mancheno Herrera, Carlos Andrés, 2021

#### 3.3.2. Análisis microscópico del semen.

El análisis microscópico se realizó en semen post congelación y post recongelación.

##### 3.3.2.1. Motilidad individual (%).

Se tomó con una micropipeta (esterilizada), 1 microgota (5 µL) de semen diluido en una solución isotónica de NaCl- al 0,9% misma que fue colocada sobre un portaobjetos atemperado a 37°C y cubriéndolo con un cubreobjetos; la observación se la realizó en un microscopio óptico con un aumento de 40X, para la estimación se evaluó si más de la mitad de los espermatozoides que hay en

el campo poseen movimiento o no, se observarán los espermatozoides que se mueven en forma rectilínea a los cuales se los considera normales, caso contrario los que se mueven en círculo se consideraron anormales. El porcentaje se obtiene de los espermatozoides con movimiento rectilíneo progresivo (normales) sobre el total de los espermatozoides observados en la placa, valores a ser comparados con la siguiente escala de 0 a 100% como se observa en la Tabla 3 – 3.

**Tabla 3 - 3:** Valoración de la Motilidad Individual Progresiva según la Sociedad Americana de Theriogenología.

<b>Clasificación</b>	<b>Motilidad progresiva individual</b>	<b>Valor %</b>
Pobre	Muy lento y errático	<50
Aceptable	Lineal lento y generalizado	60-70
Bueno	Lineal moderadamente rápido	70-80
Muy bueno	Lineal rápido	80-100

Realizado por: Mancheno Herrera, Carlos Andrés, 2021.

### 3.3.2.2. Viabilidad espermática (%).

Para determinar la viabilidad espermática se usó la técnica con tinción de Eosina – Nigrosina misma que consiste en agregar 10 µL del colorante sobre 10 µL de la muestra de semen puro en un portaobjetos atemperado a 37°C, después de homogenizarla se la dejó reposar un minuto y se realizó un frotis para finalmente se dejarla secar. La muestra se observó en un microscopio óptico a un aumento de 100X, contando un mínimo de 100 espermatozoides en diferentes campos del portaobjetos.

Los espermatozoides con cabeza roja o rosa oscuro son considerados muertos (membrana dañada), mientras espermatozoides con cabeza blanca o rosa claro son considerados vivos (membrana intacta).

El resultado será expresado como porcentaje y por determinación subjetiva se calculará mediante la siguiente relación:

$$\text{Viabilidad espermática (\%)} = \frac{\text{Número de espermatozoides muertos}}{\text{Número de espermatozoides vivos}} * 100$$

### 3.3.2.3. *Morfoanomalías espermáticas (%)*.

Se utilizó la misma placa del análisis de viabilidad espermática en donde se observó la estructura espermática con un aumento de 100X, para ello se contaron las células sin anomalías mismas que serán clasificadas como normales, cuando la cabeza y flagelo son regulares, y como anormales las que presentan alguna de las siguientes categorías de morfoanomalías: cabezas muy grandes, cabezas muy pequeñas, doble cabeza, flagelos doblados, flagelos enrollados, flagelos múltiples o sin flagelo, también es común encontrar espermatozoides con presencia de gota citoplasmática proximal o distal. Se contaron un total de 100 espermatozoides por campo y se utilizó la siguiente fórmula para transformarlo a porcentaje:

$$\text{Morfoanomalías (\%)} = \frac{\text{Número de espermatozoides anormales}}{\text{Número de espermatozoides normales}} * 100$$

### 3.3.2.4. *Daño del paquete de ADN del espermatozoide (Cromatina) (%)*.

Se evaluó mediante la integridad de la cromatina, para esto se preparó una muestra que contenía 2 µL del fluorocromo Naranja de Acridina y 18 µL de semen descongelado, a continuación se procedió a homogenizar la muestra para tomar con una micropipeta la cantidad de 10 µL y colocarlos en la placa del contador digital de células Luna *Fl* el cual se encontraba calibrado y en modo de fluorescencia con naranja de acridina. Las cabezas de los espermatozoides con ADN en estado nativo (intacto) emiten fluorescencia verde, mientras que aquellos, cuyo ADN se encuentra desnaturalizado se observan de color rojizo.

Los resultados de este análisis fueron emitidos en porcentaje por el equipo mencionado.

### 3.3.2.5. *Integridad de la membrana celular (%)*.

Para la valoración de esta variable se utilizó el test Hipoosmótico (HOST) en el cual se preparó una solución de fructosa al 2.7% (solución A) y una solución de Citrato de sodio 1.47% (solución B). El medio hipoosmótico se preparó en el momento de utilizar mezclando 0.5 ml de solución A con 0.5 ml de solución B, al que se agregó 0.1 ml de semen descongelado. Esta mezcla se incubó durante 20 minutos a 37 °C. Finalmente se colocó 10 µL de la mezcla incubada entre porta y cubreobjetos, y se



observó en un microscopio con contraste de fases en donde se contaron como mínimo 100 espermatozoides y se determinó el número de espermatozoides con membrana funcional (colas y/o segmento intercalar hinchados y enrollados), y el número de espermatozoides con membrana deteriorada (cola y/o segmento intercalar recto, delgado y sin enrollamiento).

Los resultados se expresaron en porcentaje de reacción total de espermatozoides con membrana funcional utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Int. Membrana} = \frac{A}{A + B} * 100$$

En dónde:

Int. Memb.= Integridad de membrana (por ciento).

A = Número de espermatozoides con endósmosis positiva.

B = Número de espermatozoides con endósmosis negativa.

A + B = N° total de espermatozoides contabilizados (100 espermatozoides).

Se consideró una muestra normal de semen si más del 60 % experimentaron hinchazón de la cola y menos del 50 % se consideró anormal.

### **3.3.3. *Proceso de recongelación.***

#### **3.3.3.1. *Centrifugación***

Posteriormente al análisis microscópico se realizó la primera centrifugación (300 rpm, durante 5 minutos) eliminándose el *pellet* y conservando el sobrenadante. A continuación, se realizó una segunda centrifugación (800 rpm, durante 10 minutos), rescatando el *pellet* y eliminando el sobrante en este caso.

#### **3.3.3.2. *Dilución del semen***

Los *pellets* obtenidos se unieron; se determinó su volumen mediante un tubo graduado, y concentración espermática con la ayuda de un contador digital de células marca *Luna Fl* para así

calcular el volumen de diluyente necesario, se utilizó el diluyente comercial AndroMed® y se preparó según las recomendaciones del fabricante.

#### 3.3.3.3. *Estabilización y acondicionamiento de los espermatozoides*

La estabilización y acondicionamiento de los espermatozoides consiste en darle a la célula el tiempo y condiciones necesarias para que ésta saque toda el agua intracelular y la reemplace por el diluyente, con la finalidad de que al momento de la congelación y descongelación no se formen cristales de hielo los cuales perforarían la membrana celular dañando así al espermatozoide. Para esto se mantuvo la muestra de semen diluido a temperatura ambiente (14 – 20 °C) y bajo luz Ultra Violeta durante un tiempo de 45 minutos.

#### 3.3.3.4. *Envasado y sellado de pajillas.*

Una vez diluido completamente el semen se procedió a envasarlo en pajillas de 0.5 ml, el envasado se realizó con la ayuda de una jeringa de insulina para posteriormente con la ayuda de otra jeringa sacar un poco de semen de la pajilla con la finalidad de dejar una burbuja de aire que evitará que esta explote al momento de la descongelación y se sellaron con alcohol polivinilo. Esta actividad se la realizó a temperatura ambiente que oscilará entre los 14 y 20 °C y bajo una luz Ultra Violeta para evitar cualquier tipo de contaminación.

#### 3.3.3.5. *Curvas de temperatura.*

Las curvas de temperatura tuvieron como finalidad el descenso controlado y paulatino de la temperatura para que la célula espermática no sufra cambios bruscos de la misma, dichas curvas iniciaron reduciendo la temperatura de 20 °C a 5 °C en 30 minutos (velocidad: -0.5 °C/min) mediante la adición de hielo en un cooler con agua. Una vez alcanzada esta temperatura se introdujeron las pajillas en una cámara de refrigeración por un lapso de 4 horas a una temperatura de 4 °C para el periodo de equilibramiento.

#### *3.3.3.6. Recongelación.*

La recongelación se realizó mediante vapores de nitrógeno colocando las pajillas en un rack con capacidad de 50 pajillas dentro de un cooler en el cual se colocaron 2 cm de nitrógeno líquido. El descenso de temperatura se realizó en relación a los siguientes valores y tiempos: primer descenso de 4 °C a -6 °C durante 10 minutos (velocidad -1 °C/min), esto se logró colocando el rack a 6 cm del nitrógeno líquido. Segundo descenso de -6 °C a -196 °C en 4 minutos (velocidad -47.50 °C/min), esto se logró colocando el rack a 2 cm del nitrógeno líquido. Realizado este descenso se sumergieron las pajillas en el nitrógeno líquido del cooler para terminar con su recongelación.

#### *3.3.3.7. Análisis microscópico Post Recongelación.*

Una vez finalizado todo el proceso de recongelación las dosis seminales fueron descongeladas a una temperatura de 37 °C durante 12 segundos para proceder con el análisis microscópico descrito en el apartado **3.3.2.**

#### *3.3.4. Comprobación de hipótesis.*

Para la comprobación de hipótesis se utilizaron las técnicas de análisis de ADEVA (Análisis de Varianza) y separación de medidas por el método del rango múltiple de Waller Duncan a un nivel de significancia  $p < 0,01$ .

## CAPÍTULO IV

### **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**

#### **4.1. Análisis comparativo de las características microscópicas de semen bovino en los procesos post congelación y post recongelación.**

Al realizar el análisis estadístico mediante el Software Infostat versión 2020 y separación de medias por el método de Waller Duncan de las características microscópicas de semen se registraron diferencias altamente significativas ( $P \geq 0,01$ ), para todas las variables en estudio como se observa en la Tabla 4 - 4.

**Tabla 4 - 4:** Resultados comparativos de las características microscópicas de semen bovino en los procesos pre congelación, post congelación y post recongelación.

<b>Variables</b>	<b>E1</b>	<b>E2</b>	<b>E3</b>	<b>EE</b>	<b>Prob.</b>
<b>Ph</b>	6,83 b	6,78 c	6,85 a	1,1171e-16	0,01
<b>Motilidad individual, %</b>	80,0000 a	53,5000 b	46,1660 c	0,486374494	0,01
<b>Viabilidad espermática, %</b>	97,033 b	89,499 a	81,016 c	0,157632249	0,01
<b>Morfología normal, %</b>	95,085 b	95,031 b	97,00 a	0,134042973	0,01
<b>Morfoanomalías, %</b>	4,915 b	4,969 b	1,899 a	0,133436488	0,01
<b>Normalidad en ADN, %</b>	0 c	91,26 b	98,43 a	0,522102019	0,01
<b>Daño en el ADN, %</b>	0 c	8,74 b	1,072 a	0,513588537	0,01
<b>Integridad de la membrana, %</b>	0 c	90,868 b	98,15 a	0,238478278	0,01
<b>Daño en la membrana, %</b>	0 c	9,132 b	1,602 a	0,238472919	0,01

**E1:** Ensayo 1 – análisis microscópico de semen pre congelación.

**E2:** Ensayo 2 – análisis microscópico de semen post congelación.

**E3:** Ensayo 3 – análisis microscópico de semen post recongelación.

**EE:** Error experimental.

**Prob:** Probabilidad.

Letras diferentes muestran diferencias significativas para cada variable.

Realizado por: Mancheno Herrera, Carlos Andrés, 2021.

#### **4.1.1. pH.**

El pH del eyaculado en los diferentes ensayos mostró diferencias estadísticas significativas ( $P \geq 0,01$ ), con valores de 6,78; y 6,85 puntos de pH en el semen congelado y recongelado respectivamente (Tabla 4 - 4), valores que se encuentran dentro de los parámetros permitidos según (Huamantuco, 2005), quien menciona que el pH del epidídimo y conducto deferente fluctúa entre 6,72 a 6,90.

#### **4.1.2. Motilidad individual (%).**

La Motilidad Individual presentó diferencias estadísticas significativas ( $P \geq 0,01$ ), con valores de 53,50 % y 41,16 % para el semen congelado y recongelado respectivamente (Tabla 4 - 4.). En relación a estos valores, Peres, A. et al., (2014), indican que la reducción de la motilidad espermática puede estar asociada a la lesión mitocondrial, pues es necesaria energía tanto para la motilidad como para la fertilización

Por su parte, Ramón (2013), en su investigación reporta un valor de 35,98% en la variable de motilidad individual progresiva con un valor máximo del 55%; mientras que, Ribeiro- Peres et al., (2014, págs. 20-25), en relación a esta variable reporta un resultado de 29,5 % +/- 14,9 % en su estudio, realizando una congelación convencional. Estos resultados difieren de la presente investigación presumiblemente debido a la subjetividad del evaluador al momento del análisis y a los métodos de congelación y descongelación del material seminal.

La diferencia encontrada en los diferentes ensayos puede estar relacionada además al estrés que sufre la membrana y el espermatozoide en general por el cambio de temperatura, las lesiones producidas por el congelamiento de las membranas solo se invierten parcialmente con el descongelamiento. La motilidad post congelación se reduce a valores entre 40 a 50%.

#### **4.1.3. Viabilidad espermática (%).**

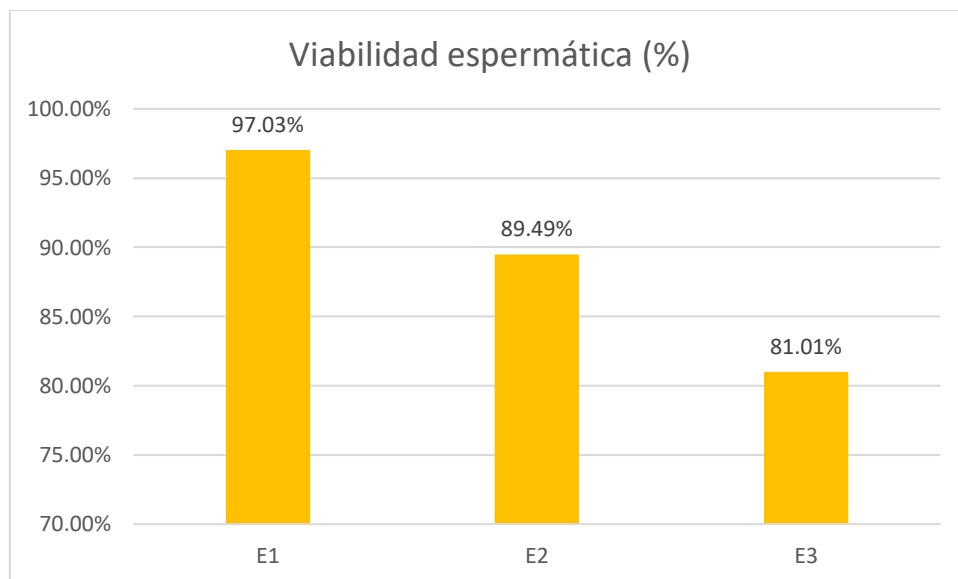
Con relación a la viabilidad espermática en los ensayos se presentaron diferencias significativas ( $P < 0,01$ ), de esta manera el mayor porcentaje de viabilidad fue identificado en el semen congelado con 89,49 % y el menor valor se registró en el semen recongelado con 81,01 % (Tabla 4 - 4) (Gráfico 1 - 4).

Al respecto, Cabrera & Pantoja (2012) encontraron una viabilidad del 86 % en semen descongelado, resultados que difieren a los reportados por Ribeiro Peres et.al., (2014, págs. 20-25) quienes

mencionan un 53,9 % de viabilidad espermática en semen descongelado. Dichos resultados varían debido al criterio del evaluador, así como al método utilizado, se podría estandarizar el método al realizar un análisis mediante un sistema automatizado como es el caso del sistema CASA pero tanto en la presente investigación como en las mencionadas anteriormente el análisis se lo realizó de la forma convencional.

Almela (2014) en su Trabajo Doctoral menciona un 60,21% de viabilidad espermática en el descongelamiento de semen recongelado, lo que puede ser ocasionado por parámetros como la raza, edad del reproductor y principalmente el método de descongelación usado para su investigación; mientras que Mejía (2017), menciona un 59,1 % +/- 2,40 de vitalidad espermática en semen descongelado y Carpio (2015), reporta un 82,50 % de viabilidad espermática al realizar el análisis de semen descongelado, resultado muy similar al presente estudio.

Las diferencias encontradas entre los ensayos se pueden deber a lo indicado por Neira et al., (2007, págs. 93-105) quienes señalan que la centrifugación ejercida durante los procesos puede generar diversas alteraciones que pueden disminuir la movilidad de los espermatozoides e incluso su calidad en general, debido a las fuerzas mecánicas asociadas.



**Figura 1 - 4:** Diferencia en la viabilidad espermática de semen bovino pre congelado, post congelado y post recongelado.

Realizado por: Mancheno Herrera, Carlos Andrés, 2021.

#### 4.1.4. Morfoanomalías (%).

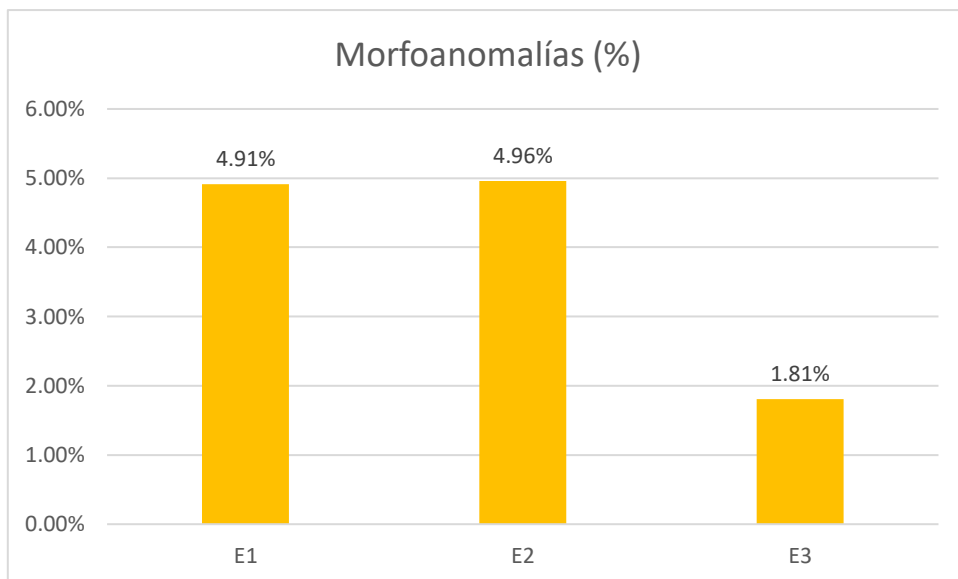
Las morfoanomalías observadas presentaron diferencias estadísticas significativas ( $P \geq 0,01$ ) entre los ensayos, en donde el mayor valor se reportó en el semen congelado con 4,96 % de morfoanomalías mientras que el menor valor lo registró en el semen recongelado con 1,89 % de morfoanomalías (Tabla 4 - 4) (Gráfico 2 – 4). Los valores en la recongelación probablemente están atribuidos a lo señalado por Palma (2009), quien detalla que un menor daño en la célula espermática es consecuencia de haber tenido un menor sufrimiento durante el proceso de recongelación, aumentando consecuentemente la presencia de espermatozoides normales. Además, se puede mencionar que al momento de realizar la recongelación se realizó una selección de los mejores espermatozoides para usarlos en este proceso.

En función los valores registrados Vera (2003), menciona que es de gran importancia garantizar el mayor porcentaje de morfología normal dentro de los espermatozoides ya que esto optimizará una buena fusión con el núcleo del ovocito para finalmente completar la dotación genética del nuevo ser.

González & Muñoz (2002), registran anomalías primarias en la raza Jersey de 15,2 % +/- 1,8; 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 y sobre todo a la preparación de la muestra.

Mejía (2017), en su estudio realizado al evaluar el semen de ganado criollo utilizando vagina artificial y la técnica de microscopía óptica reporta un promedio de anomalías totales de 15,0 +/- 0,96 lo que difiere del presente estudio probablemente por la subjetividad en el análisis, raza de los animales y condiciones de congelación y descongelación; mientras que Ramón (2013), en el análisis de semen post congelación reporta un 13,15 % de espermatozoides con morfoanomalías. Muchas veces dicho resultado varía por la forma en la preparación de la placa lo que puede confundir al evaluador en anomalías que se presenten principalmente a nivel de la parte distal de la célula espermática.





**Figura 2 - 4:** Diferencia en las morfoanomalías de semen bovino pre congelado, post congelado y post recongelado.

Realizado por: Mancheno Herrera, Carlos Andrés, 2021.

#### 4.1.5. Daño del ADN (%).

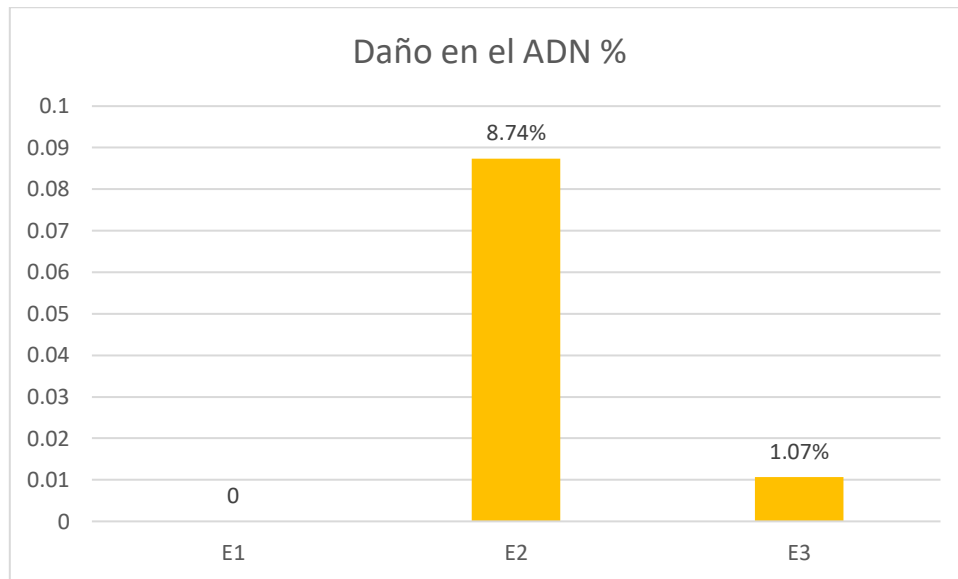
Al analizar el daño en el ADN mediante el proceso de fluorescencia con Naranja de Acridina los ensayos presentaron diferencias significativas ( $P < 0,01$ ), de esta manera el mayor daño del ADN se observó en el semen congelado con un valor 8,74 %, y el menor daño lo reportó el semen recongelado con un valor de 1,07 % (Tabla 4 - 4) (Gráfico 3 - 4). Los valores reportados en la presente investigación son menores a los registrados por Almela (2014), en donde en el semen recongelado reporto el valor de 32,7 % en daño del ADN de semen recongelado.

Al respecto, Nava-Trujillo et al., (2016), reportan un 0,9 % +/- 1.29 de espermatozoides con cromatina dañada al evaluar semen post congelación, resultados muy similares a los presentados en el presente estudio. Por otra parte, Ribeiro Peres et al., (2014), encontraron un 93,1 +/- 6,1 % de ADN íntegro en semen descongelado, lo que representa a un 6,9 % de daño en la cromatina. Dichos resultados concuerdan con la presente investigación debido a las técnicas usadas y a que el análisis se realizó utilizando un equipo automatizado en todos los casos.

Peña & Linde (2000) al respecto, mencionan que el acrosoma tiene varias regiones que son expuestas durante el proceso de refrigeración, congelación y descongelamiento; esto

determinará en gran medida la capacidad fecundante que tiene el espermatozoide debido al daño que puede sufrir específicamente la cromatina.

Los resultados del presente estudio son los primeros en sugerir un efecto favorable al usar la recongelación de espermatozoides reducir el daño del ADN espermático contenido en la cromatina.



**Figura 3 - 4:** Diferencias en el daño del ADN de semen de bovino Jersey pre congelado, post congelado y post recongelado.

Realizado por: Mancheno Herrera, Carlos Andrés, 2021.

#### 4.1.6. Daño en la membrana (%).

En relación a la variable daño de la membrana se observaron diferencias altamente significativas ( $P < 0,01$ ), entre los ensayos; el valor más alto se observó en el semen congelado con 9,13 % y el menor valor lo reportó el semen recongelado con 1,60 % de daño en la membrana (Tabla 4 - 4) (Gráfico 4 - 4).

Bedoya, Vásquez & Rivera (2003), en su estudio reportan un 53,4 % de espermatozoides que reaccionaron de forma positiva al test de HOST, lo que representa un 46,6 % de espermatozoides con daño en la membrana; mientras que Ribeiro Peres et al., (2014), mencionan un 63,1 % de espermatozoides con la membrana íntegra, es decir 36,9 % de espermatozoides con daño en la membrana. Estos resultados difieren del presente estudio y se puede asumir esta variación al método

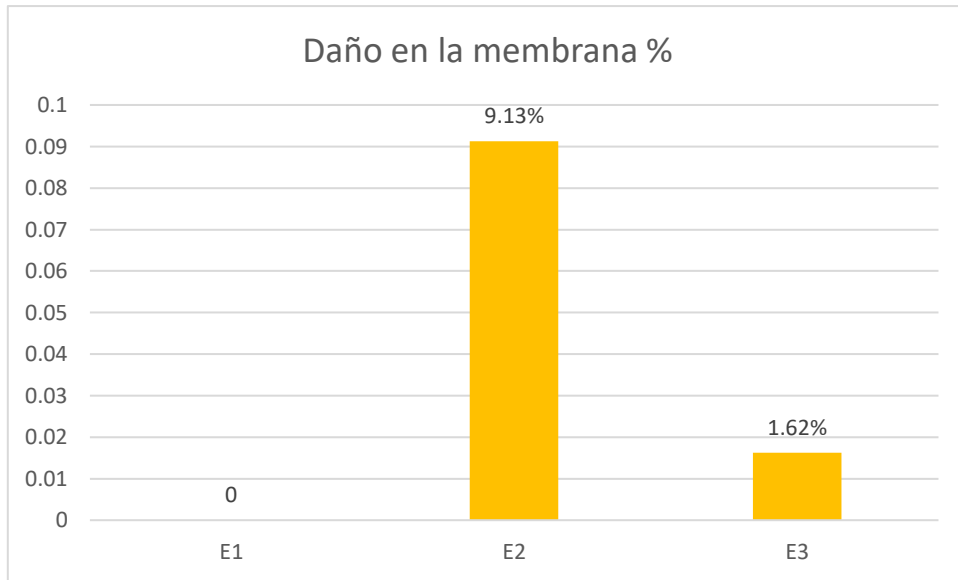
de análisis, así como a la subjetividad del evaluador al hacerla de una manera tradicional y no automatizada.

Mejía (2017), en relación a esta variable reporta un 15,6 % de espermatozoides que reaccionaron con daño a la membrana espermática al ser analizados mediante el test de Host. Dichos resultados varían de los obtenidos al presente estudio, se puede asumir esta variación al método de incubación utilizado, así como a la preparación del medio de incubación usado en el test.

La membrana plasmática del espermatozoide es el principal sitio de lesión que ocurren durante la congelación y descongelación de semen (Hammersstedt, Graham, & Nolan, 1990, págs. 73-88). La membrana intacta y un funcionamiento activo es esencial para que el espermatozoide pueda mantener el metabolismo, someterse a la capacitación y reacción acrosómica y además, para unir y penetrar en el ovocito a través de la zona pelúcida (Jeyendran, Van de Ven, Perez Pelaez, Crabo, & Zaneveld, 1984, págs. 219-228).

Al comparar los resultados obtenidos en este trabajo, con los de otros autores como (Muhammad, Rakha, & Akhter, 2010, págs. 197-203), los cual usaron L-cisteína y obtuvieron un 56.06 % de membranas intactas, los resultados en esta investigación son superiores en cuanto a membranas intactas, lo que posiblemente se deba a la diferencia en la composición de los diluyentes y a los diferentes protocolos de criopreservación en cuanto se refiere al tiempo en la etapa de enfriamiento, mismo que afecta directamente las características de funcionalidad celular del espermatozoide al permanecer mayor tiempo en contacto con los solutos del diluyente.

Ante estos resultados, se puede inferir que la recongelación de espermatozoides permite mantener la integridad de la membrana, por su parte González & Muñoz (2002), indican que la membrana plasmática del espermatozoide juega un papel crítico en el proceso de capacitación, reacción acrosómica y penetración de ovocitos, al regular las interacciones del medio interno con el externo.



**Figura 4 - 4:** Diferencias en el daño de la membrana de semen de bovino Jersey pre congelado, post congelado y post recongelado.

Realizado por: Mancheno Herrera, Carlos Andrés, 2021.

## CONCLUSIONES

- Al analizar las diferentes variables de semen recongelado se determinó que el efecto de esta biotecnología es positivo en variables como el daño en el ADN y daño en la membrana espermática, teniendo valores inferiores a los reportados en semen congelado; lo que indica que al recongelar espermatozoides la calidad espermática mejora especialmente en las variables mencionadas.
- El porcentaje de espermatozoides viables de semen congelado fue de 89.48 % mientras que esta variable para semen recongelado reportó un valor de 81.01 % aduciendo esta variación al estrés de temperatura que sufren los espermatozoides por el proceso de descongelación y recongelación. Sin embargo, los valores se encuentran dentro de los rangos recomendados para ser usados en biotecnologías como la inseminación artificial, transferencia de embriones y fertilización *in vitro*.
- Los resultados al evaluar el daño de la membrana plasmática de los espermatozoides reportaron valores de 9.13% en semen descongelado mientras que el semen recongelado reportó un valor de 1.62% lo que claramente refleja un incremento en la integridad de la membrana plasmática al recongelar los espermatozoides.
- El daño en el paquete de ADN de los espermatozoides se vió reducido al recongelarlos obteniendo un 1.07 % de daño en semen recongelado versus 8.74 % de daño en semen congelado. Estos datos hacen una primera inferencia en que la recongelación de espermatozoides seleccionará a las mejores células para tener una mejor eficiencia al momento de utilizarlas en biotecnologías reproductivas, haciendo una referencia especial a su uso en fertilización *in vitro* FIV.

## RECOMENDACIONES

- Replicar el presente estudio empleando otro método de selección de espermatozoides viables Gradiente de Percoll, para de esta manera comparar los resultados obtenidos.
- Al momento de re congelar los espermatozoides tomar en cuenta la concentración espermática contenida en cada pajilla para de esta manera no reducir la calidad fecundante del semen al momento de utilizarlo.
- Respetar los tiempos y temperaturas especificadas en los diferentes procedimientos para congelar y re congelar espermatozoides debido a que si se producen fallas en estos parámetros no se tendrán buenos resultados finales.
- Replicar el estudio en otras especies para determinar la resistencia de los espermatozoides a esta biotecnología

## BIBLIOGRAFÍA

- Abdussamad, A., Gaulty, M. & Holtz, W.** (2015). Temporary Storage of Bovine Semen Cryopreserved in Liquid Nitrogen on Dry Ice and Refreezing of Frozenthawed Semen. *Cryoletters*, 36(4), 278 – 284. Recuperado de: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26576003/>
- Agüero, G.** (2012). Evaluación de las características seminales de sementales bovinos mediante el Analizador Seminal Computarizado (CASA) (Tesis de postgrado, Universidad Central de Venezuela). Recuperado de: [http://saber.ucv.ve/bitstream/123456789/3292/1/T026800002626-0-Tesis\\_Final\\_Gloria\\_Aguero-000.pdf](http://saber.ucv.ve/bitstream/123456789/3292/1/T026800002626-0-Tesis_Final_Gloria_Aguero-000.pdf).
- Almela, L.** (2014). Aportaciones a la Crioconservación de Gametos Masculinos en la Raza Bovina Murciano Levantina: Recongelación de Espermatozoides (Tesis doctoral – Universidad de Murcia). Recuperado de: <https://conocimientoabierto.carm.es/jspui/bitstream/20.500.11914/1005/1/Tesis%20Laura%20Almela%20Veracruz%5B1%5D.pdf>
- Álvarez-Rodríguez, M.** (2012). Mejora y evolución de los protocolos de congelación de eyaculados de oso pardo (Tesis doctoral, Universidad de León). Recuperado de: <http://hdl.handle.net/10612/2463>
- Álvarez, M.** (2018). Optimización de los protocolos de congelación de eyaculados de oso pardo (*Ursus arctus*). *Ambiociencias. Revista de divulgación científica*, 10(1), 66-67. Recuperado de: <http://revistas.unileon.es/index.php/ambioc/article/view/5518>.
- Angelino, J.** (2009). Manual de evaluación de semen en bovinos. Universidad Veracruzana Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Veracruz, México.

- Aray, A., Zeron, Y., Shturman, H. & Gacitua, H.** (2002). Successful pregnancies in cows following double freezing of a large volume of semen. *Reproduction Nutrition Developed*. 42(6), 583 – 586. doi: 10.1051/rnd:2002044
- Arieta Román, R.** (2014). Métodos de Extracción de Semen Bovino. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/636/63633881001.pdf>
- Ballina, A.** (2010). Manejo Sanitario Eficiente del Ganado bovino. Recuperado de [https://www.academia.edu/17666282/Manejo\\_sanitaria\\_eficiente\\_del\\_ganado\\_bovino\\_principales\\_enfermedades](https://www.academia.edu/17666282/Manejo_sanitaria_eficiente_del_ganado_bovino_principales_enfermedades)
- Barth, A., Bó, G., Brogliatti, G., Tríbulo, H. & Tríbulo, R.** (2007). Fisiología de la reproducción del toro y evaluación de la capacidad reproductiva. Primera Edición. Córdoba. Instituto de Reproducción Animal de Córdoba (IRAC).
- Bearden, J., McCallow, G. & Smith, P.** (1982). Sperm dilutions for appropriate routine of semen evaluation. *Theriogenology*. 33(1), 157 – 160. Recuperado de: <https://www.journals.elsevier.com/theriogenology>
- Bedoya, N., Vásquez, N. & Rivera, N.** (2003). Evaluación de la integridad funcional de la membrana plasmática de espermatozoides bovinos mediante el test hipoosmótico (HOST). *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 56(2), 1983 - 1997. Recuperado de: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/refame/article/view/24606>
- Brito, D.** (2017). Evaluación cuali-cuantitativa de semen colectado con electroeyaculador (EE) de toros tratados con y sin tranquilizante (Tesis de pregrado, Universidad de Cuenca). Recuperado de: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/27044/1/TESIS%20FINAL%20BRITO-%20REINOSO%20.pdf.pdf>.



- Cabrera, P. Pantoja, C.** (2012). Viabilidad espermática e integridad del acrosoma en semen congelado de toros nacionales. *Revista de investigaciones veterinarias de Perú*. 23(2), 5 – 10. Recuperado de: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1609-91172012000200009](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172012000200009)
- Carballo, D., Canseco, R., García, R., & Montiel, F.** (2005). Avances en la investigación agrícola, pecuaria, forestal y acuícola en el trópico Mexicano. Recuperado de: <https://www.uv.mx/veracruz/cienciaanimal/files/2013/11/Comparacion-de-dos-diluyentes-comerciales-para-preservar-semen-bovino.pdf>
- Cárdenas, J.** (2013). Evaluación de dos agentes crioprotectores no permeables y un diluyente comercial (Triladyl) en la congelación de semen bovino (Tesis de postgrado, Universidad de Cuenca). Recuperado de: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/4535/1/Tesis.pdf>
- Carpio, S.** (2015). Evaluación de dos diluyentes para la críoconservación de semen bovino: yema de huevo vs leche descremada Tesis de grado, Universidad Politécnica Salesiana – Sede Cuenca). Recuperado de: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/7955/1/UPS-CT004815.pdf>
- Carwel, D., Scott, B., Gentry, G., Bondioli, K. & Godke, R.** (2010). Refreezing post-thawed goat semen. *Reproduction, fertility and development*, 23(1), 140 – 141. doi: <https://doi.org/10.1071/RDv23n1Ab70>
- Catena, M. & Cabodevila, J.** (2002). Evaluación de semen bovino congelado. Recuperado de: <http://www.ganaderia.com.mx/articulos/ia/ia002.php.2002>.
- Chelsey, A., Pinto, C., Cramer, E., Love, C. & Paccamonti, D.** (2017). Effects of Repeated Partial Thaw and Refreeze on Post-Thaw Parameters of Stallion Semen Cryopreserved in Cryovials. *Journal of Equine Veterinary Science*, 49(1), 19 – 24. doi: 10.1016/j.jevs.2016.10.006

- Choi, Y., Love, C., Varner, D. & Hinrichs, K.** (2006). Equine blastocyst development after intracytoplasmic injection of sperm subjected to two freeze-thaw cycles. *Theriogenology*. 65(4), 808 – 819. doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.04.035>
- Clulow, J., Mansfield, L., Morris, L., Evans, W., & Maxwell, W.** (2008). A comparison Between Freezing Methods for the Cryoreservation of Stallion Spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 108(3-4), 298 – 308. doi: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.08.014>
- Derrivaux, J.** (1982). Reproducción de los animales domésticos. 2da edición. Zaragoza: Acriba.
- Escamilla, A.** (2005). Métodos de extracción del semen bovino. Recuperado de: <http://www.repositorio.usac.edu.gt/5404/1/Tesis%20Med.%20Vet.%20Ana%20Ruby%20Escamilla.pdf>
- Gadea, J.** (2003). Semen extenders used in the artificial insemination of swine. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 1(2), 17 – 27. doi: 10.5424/sjar/2003012-17
- Gómez, M. & Migliorisi, A.** (2009). Protocolo para la evaluación de semen en rumiantes. Recuperado de: [http://www.produccion-animal.com.ar/informacion\\_tecnica/cria\\_toros/49-ProtocoloEvalSemen.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/cria_toros/49-ProtocoloEvalSemen.pdf)
- González, G. & Muñoz, A.** (2002). Determinación de la calidad biológica del semen congelado de la unidad de ganado lechero y doble propósito en Zamorano, Honduras (Tesis de pregrado, Universidad Zamorano - Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria). Recuperado de: <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/2203/1/CPA-2002-T057.pdf>
- Guerrero, G.** (2014). Sistemas de recolección de semen bovino. Recuperado de: <https://repository.ucc.edu.co/bitstream/20.500.12494/63/1/35-%28499-14%29manual%20de%20procedimientos%20para%20la%20colecta%20y%20criopreservacion%20de%20semen%20bovino%20para%20la%20empresa%20santa%20clara%20genetica%20estado%20parana%20-brasil..pdf>

**Hafez, E. & Hafez, B.** (2000). Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. Sexta Edición. México: Interamericana.

**Hammerstedt, RH., Graham, JK., & Nolan, JP.** (1990). Cryopreservation of Mammalian Sperm: What We Ask Them to Survive. *Journal of Andrology*. 11(1), 73 – 88. doi: <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1990.tb01583.x>

**Hernandez, D & Carrillo-Gonzales, D.** (2015). Aplicación del test hipoosmotico en la evaluacion de calidad seminal en ovinos criollos de pelo. *Aica* 6(1), 165 – 171. Recuperado de: <https://docplayer.es/8284962-Aplicacion-del-test-hipoosmotico-host-en-la-evaluacion-de-calidad-seminal-en-ovinos-criollos-de-pelo-colombiano.html>

**Hidalgo, C.** (2005). Análisis del semen bovino. Recuperado de: <http://www.serida.org/publicacionesdetalle.php?id=1495>

**Hollinshead, F., Evans, G., Evans, K. & Maxwell, W.** (2004). Birth of lambs of a pre-determined sex after in vitro production of embryos using frozen-thawed sex-sorted and refrozen-thawed ram spermatozoa. *Reproduction*. 127(5), 557 – 568. doi: <https://doi.org/10.1530/rep.1.00049>

**Holt, W.** (2000). Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*. 62(1-3), 3 – 22. doi: 10.1016/s0378-4320(00)00152-4

**Innocenti, P.** (2009). Daños Producidos en el Espermatozoide durante la congelación. Recuperado de: <http://www.bioteq.cl/index.php/es/temas-de-interes>

**Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC).** (2019). Encuesta de superficie y producción agropecuaria continua. Recuperado de: [https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas\\_agropecuarias/espac/espac-2018/Boletin%20tecnico.pdf](https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac-2018/Boletin%20tecnico.pdf)

- Íñiguez, C., Reinoso, N., Galarza, D., Argudo, D. & Albeiro, R.** (2017). Efecto de un tranquilizante sobre las características seminales de toros colectados con electroeyaculador. *Revista Científica Maskana*, 8(1), 121 – 123. Recuperado de: <https://publicaciones.ucuenca.edu.ec/ojs/index.php/maskana/article/view/1504>
- Jeyendran, R., Van der Ven, H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B. & Zaneveld, L.** (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil.* 70(1), 219 - 28. doi: 10.1530/jrf.0.0700219. PMID: 6694140.
- Lake, P., & Setewart, J.** (1978). Preservation of fowl semen in liquid nitrogen. An improved method. *British Poultry Science.* 19(2), 187 – 194. doi: 10.1080/00071667808416462
- Maxwell, W., Parrilla, I., Caballero, E., Garcia, J., Roca, E., Martinez, A., Vazquez, M. & Rath, D.** (2007). Retained Functional Integrity of bull spermatozoa after double freezing and thawing using a sperm density gradient centrifugation. *Reproduction Domestic Animals.* 42(5), 489 – 494. doi: 10.1111/j.1439-0531.2006.00811.x.
- Mazur, P.** (1984). Freezing of Living Cells: Mechanisms and Implications. *The American journal of physiology.* 3(1), 25 – 42. doi: 10.1152/ajpcell.1984.247.3.C125
- McCue, P., Kelly, J., Moore, A., Bruemmer, J. & Walker, SK.** (2004). Refrozen semen: sperm characteristics in horses in vitro embryo production in ruminants. Sixth International Symposium on Equine Embryo Transfer. Río de Janeiro – Brasil.
- Medina-Robles, V., Sánchez-Carvajal, E. & Cruz-Casallas, P.** (2007). Crioconservación de semen bovino usando un congelador programable (CL-8800) y determinación de su calidad postdescongelación por medio de análisis espermático asistido por computador (CASA). *Orinoquia.* 11(1), 75 – 86. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/896/89611108.pdf>

- Mejía, J.** (2017). Evaluación pre y post congelación del semen obtenido con vagina artificial y electroeyaculador en el ganado criollo (Tesis de postgrado, Universidad de Cuenca). Recuperado de: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/26940>
- Morton, K., Rowe, A. & Maxwell, W.** (2006). In vitro and in vivo survival of bisected sheep embryos derived from frozen-thawed unsorted and frozen-thawed sex-sorted and refrozen-thawed ram spermatozoa. *Theriogenology*. 65(7), 1333 – 1345. doi: 10.1016/j.theriogenology.2005.08.009
- Muhammad, A., Rakha, B. & Akhter, S.** (2010). Effect of L-cysteine in extender on post-thaw quality of Sahiwal bull semen. *Animal Science Papers and Report*. 29(3), 197 – 203. Recuperado de: [https://www.researchgate.net/publication/285638615\\_Effect\\_of\\_L-cysteine\\_in\\_extender\\_on\\_post-thaw\\_quality\\_of\\_Sahiwal\\_bull\\_semen](https://www.researchgate.net/publication/285638615_Effect_of_L-cysteine_in_extender_on_post-thaw_quality_of_Sahiwal_bull_semen)
- Nava-Trujillo, H., Quintero-Moreno, A., Hernández-Fernández, A., & Osorio-Melendez, O.** (2016). Espermatozoides con cromatina dañada e inmadura en semen. *Revista Científica*. 26(1), 20 – 25. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/959/95944832005.pdf>
- Neira, J., Ramirez, G., Leon, S. & Moreno, D.** (2007). Efecto de la asociación de la L-GlutaminaEtilenglicol en criopreservación de semen equino. *Revista Médica Veterinaria*. 1(14), 93 - 105. Recuperado de: <https://ciencia.lasalle.edu.co/mv/vol1/iss14/7/>
- Nicolas, M., Alvarez, M., Borragán, S., Martínez-Pastor, F., Chamorro, C., Alvarez-Rodriguez, M. Paz, P. & Anel, L.** (2012). Evaluation of qualitative and quantitative effectiveness of three media of centrifugation (MaxiFreeze, Cushion Fluid Equine and PureSperm 100) in preparation of fresh or frozen-thawed brown bear spermatozoa. *Theriogenology*. 77(6), 1119 – 1128. doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.10.016
- Owiny, O.; Barry, D. & Godke, R.** (2010). Effects of repaired freeze-thawing of bovine epididymal sperm in vitro embryo development. *Animal Biomed Science*. 8(1), 56 – 64. Recuperado de: <http://hdl.handle.net/10570/671>

- Páez, E., & Corredor, E.** (2014). Evaluación de la aptitud reproductiva del toro. *Ciencia y Agricultura*. 11(2), 49 – 55. Recuperado de: <https://go.gale.com/ps/anonymous?id=GALE%7CA515248477&sid=googleScholar&v=2.1&it=r&linkaccess=abs&issn=01228420&p=IFME&sw=w>
- Palacios, C.** (2005). Técnicas para la evaluación de la capacidad fecundante de espermatozoides. *Memorias Posgrado de Reproducción Bovina*. Colombia, 235-242.
- Palma, G.** (2009). Inseminación Artificial. Recuperado de: [http://www.reprobiotec.com/i\\_artificial.swf](http://www.reprobiotec.com/i_artificial.swf)
- Parks, JE. & Graham, JK.** (1992). Effects of Cryopreservation Procedures on Sperm Membranes. *Theriogenology*. 38(2), 209 – 222. doi: [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(92\)90231-F](https://doi.org/10.1016/0093-691X(92)90231-F)
- Peña, A. & Linde, C.** (2000). Effects of Equex, one- or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology*. 54(6), 859 – 875. doi: [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00397-6](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00397-6)
- Pérez & Pérez, F.** (1985). *Inseminación Artificial y Trasplante de Embriones*. Primera Edición. Barcelona. Editorial Científico Médica.
- Pérez, L.** (2020). Evaluación de dos curvas de congelación programables en la criopreservación de semen ovino en el Centro Experimental Uyumbicho (Tesis de pregrado, Universidad Central del Ecuador). Recuperado de: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/20635/1/T-UC-0014-MVE-094.pdf>
- Polge, C., Salamon, S., & Wilmut, I.** (1970). Fertilizing capacity of frozen boar semen following surgical insemination. *Veterinary Record*. 87(1). 424 – 429. doi: <http://dx.doi.org/10.1136/vr.87.15.424>

- Poto, A., & Peinado, B.** (1999). Diferentes aplicaciones de las técnicas de conservación "ex situ" en las razas autóctonas. *Horticultura y Ganadería Tropical*. 8(1), 4 – 9. Recuperado de: <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/284850/TLAV.pdf.txt;jsessionid=18B820B2C6A89AF01BA831E663AFB2D2?sequence=2>
- Quintero, A. & Gonzales, D.** (2005). *Manual de Ganadería Doble Propósito*. Maracaibo: Astro-Data.
- Ramónez, J.** (2013). Evaluación de dos agentes crioprotectores no permeables y un diluyente comercial (Triladyl) en la congelación de semen bovino (Tesis de pregrado, Universidad de Cuenca). Recuperado de: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/4535>
- Ribeiro-Peres, A., Munita-Barbosa, L., Yumi-Kanazawa, M., Mello-Martins, M. & Ferreira de Souza, F.** (2014). Criopreservación de espermatozoides bovinos extraídos de la cola del epidídimo utilizando los métodos convencional y automatizado. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 46(1), 20 – 25. doi: <http://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2014000100005>
- Rosenberger, G.** (1994). *Exploración Clínica de los Bovinos*. Primera Edición. Buenos Aires. Hemisferio sur.
- Sellés, E., Gadea, J., Matás, C. & Ruiz, S.** (2003). Analysis of in vitro fertilizing capacity to evaluate the freezing procedures of boar semen and to predict the subsequent fertility. *Reproduction Domestic Animals*. 38(1), 66 – 72. doi: <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2003.00406.x>
- Underwood, S., Bathgate, R., Ebsworth, M., Maxwell, W. & Evans, G.** (2010). Pregnancy loss in heifers after artificial insemination with frozen-thawed dairy bull sperm. *Animal Reproduction Science*. 118(1), 7 – 12. doi: 10.1016/j.anireprosci.2009.06.004

**Vázquez, J., Parrilla, I., Roca, J., Gil, M. & Cuello, C.** (2009). Sexsorting sperm by flow cytometry in pigs: issues and perspectives. *Theriogenology*. 71(1), 80 – 88. doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.09.044>

**Veloz, D.** (2017). Evaluación de la calidad espermática de reproductores bovinos mediante el uso de sistemas de evaluación seminal convencional y sistema CASA (análisis seminal) asistido por computadora y su respuesta con la fertilidad por inseminación artificial (Tesis de postgrado, Universidad de Cuenca). Recuperado de: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/28466>

**Vera, O.** (2003). Desarrollo Sostenible de la Ganadería Doble Propósito: Fisiología de los espermatozoides bovinos. Maracaibo: Fundación GIRARZ. Ediciones Astro Data S.A.

**Verza, S., Feijo, C. & Esteves, C.** (2009). Resistance of human spermatozoa to cryoinjury in repeated cycles of thaw-refreezing. *Journal of the Brazilian Society of Urology*, 36(5), 581 – 590. doi: 10.1590/S1677-55382009000500010

**Wendee, L.** (2007). Effect of semen parameters of bovine spermatozoa after using a contemporary collecting receptacle (Tesis doctoral, Texas University). Recuperado de: <http://hdl.handle.net/2346/17079>

**Wunder, M.** (2009). Membrana plasmática del espermatozoide. Recuperado de: <http://www.bioteq.cl/index.php/es/temas-de-interes>



## ANEXOS

**Anexo A.** Colecta de semen mediante vagina artificial.



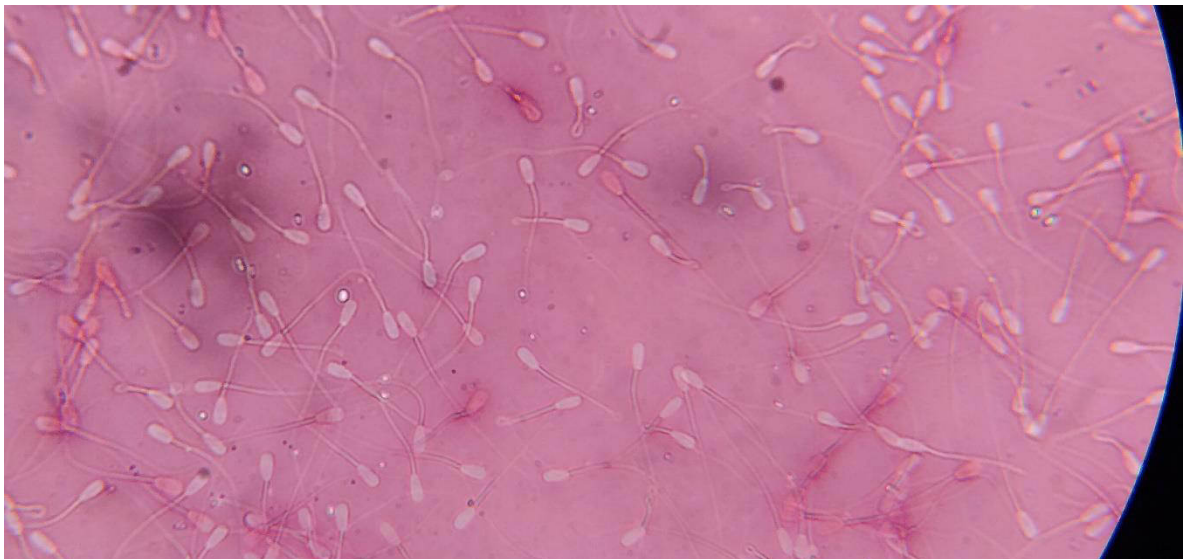
**Anexo B.** Semen pre diluído.



**Anexo C.** Análisis microscópico de semen.



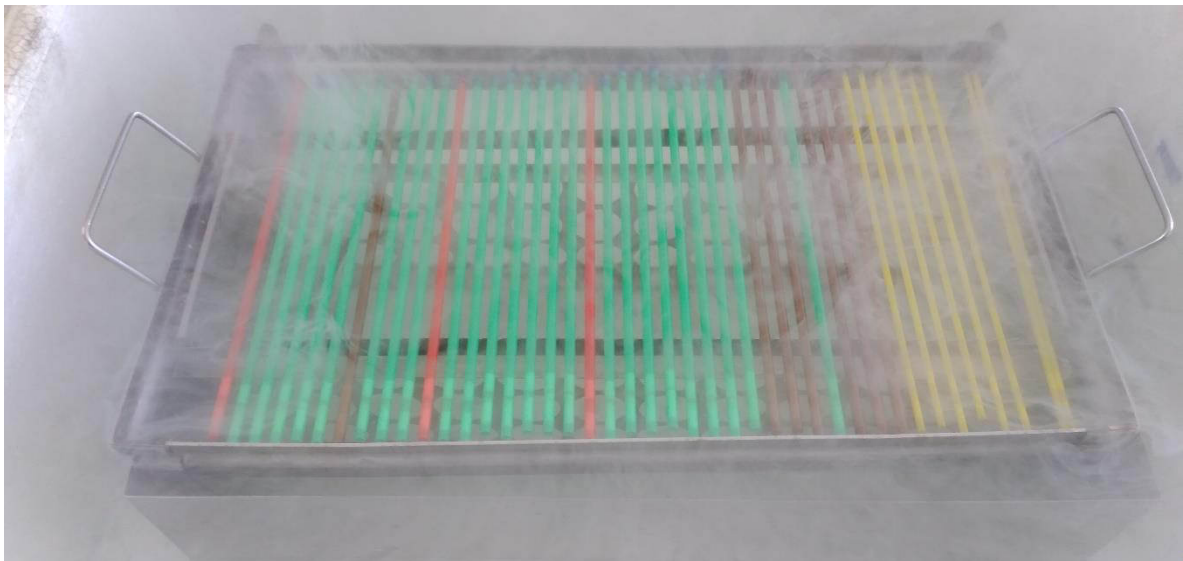
**Anexo D.** Evaluación de morfoanomalías y viabilidad espermática de semen fresco.



**Anexo E.** Determinación de la concentración espermática en equipo automatizado.



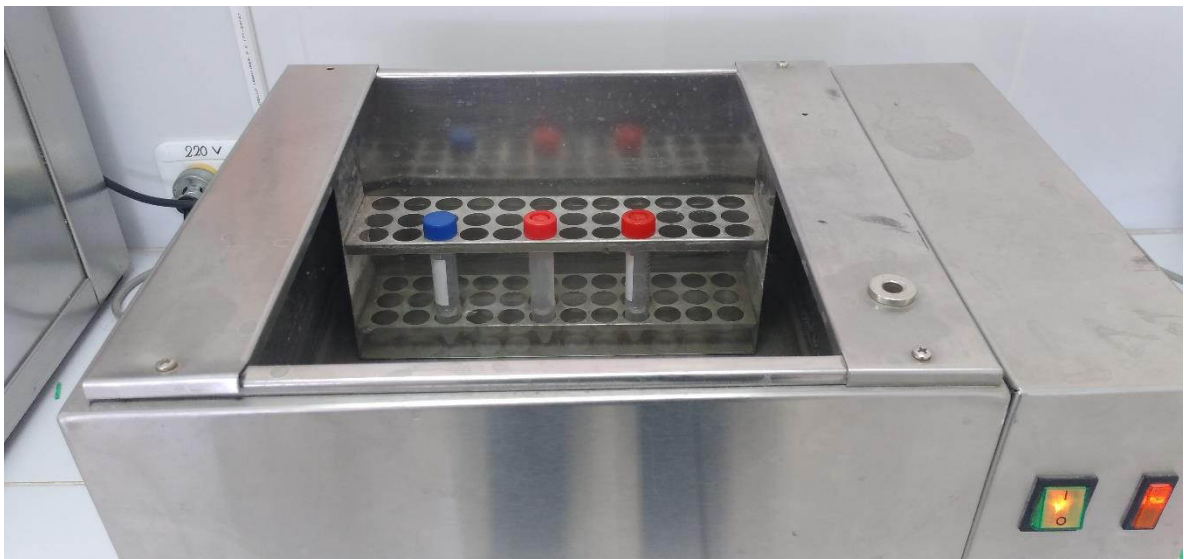
**Anexo F.** Congelación de semen en vapores de nitrógeno.



**Anexo G.** Preparación de medio Tyrode.



**Anexo H.** Incubación de semen.

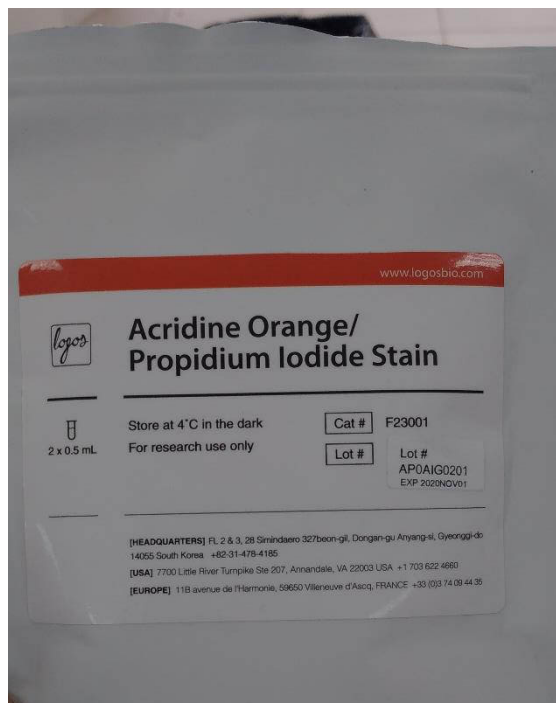




**Anexo I.** Recongelación de semen en vapores de nitrógeno.



**Anexo J.** Fluorocromo Naranja de Acridina usado en análisis de fluorescencia.



**Anexo K.** Resultados de la prueba de fluorescencia para determinar daño en ADN de espermatozoide.

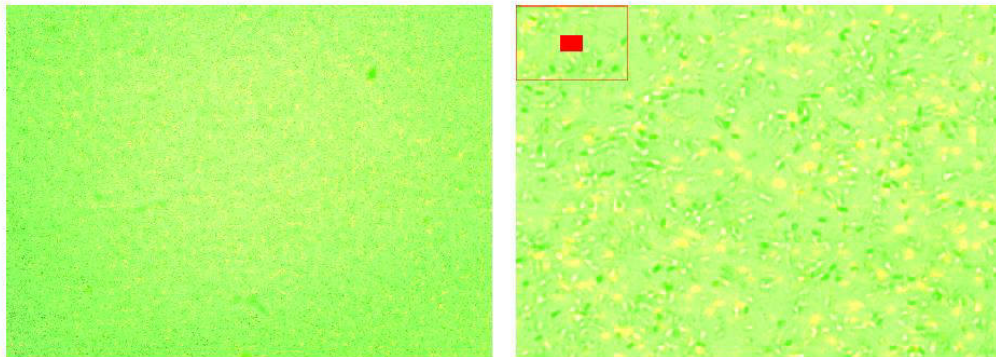
**Cell count results**

Total cell concentration:  $3.08 \times 10^6$  cells/mL  
Live cell concentration:  $3.03 \times 10^6$  cells/mL  
Dead cell concentration:  $4.70 \times 10^4$  cells/mL  
Viability: 98.5 %  
Average cell size: 5.8  $\mu\text{m}$   
Total cell number: 1439  
Live cell number: 1417  
Dead cell number: 22

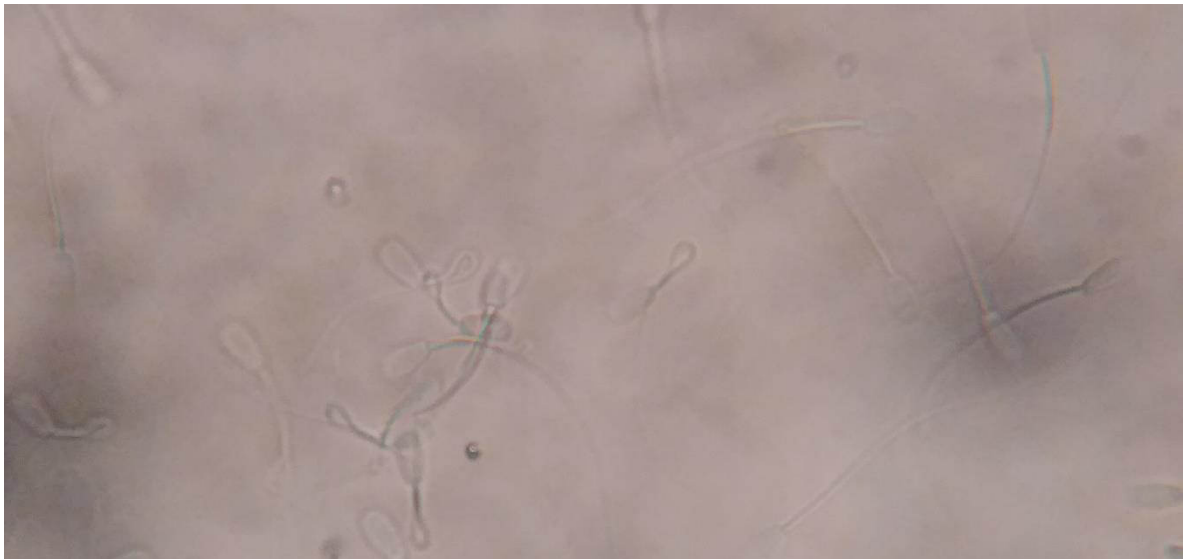
**Protocol**

Protocol name: New Protocol1  
Dilution factor: 1.00  
Min. cell size: 3  $\mu\text{m}$   
Max. cell size: 90  $\mu\text{m}$   
Size gating: 3 ~ 90  $\mu\text{m}$   
Green fluorescence threshold: 5  
Red fluorescence threshold: 5  
Green exposure: 18  
Red exposure: 10  
Green calibrated value: 0x35BD  
Red calibrated value: 0x4000

**Cell Image** (Average intensity: 102)



**Anexo L.** Espermatozoides sometidos al Test de Host.



**Anexo M. Equipos utilizados para la investigación.**











