



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

**Efecto de cafeína y glutatión adicionados al medio de
crioconservación sobre los parámetros de calidad seminal y en la
tasa de concepción en bovinos lecheros**

RICARDO MIGUEL SÁNCHEZ 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

FEBRERO-2024

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD Y CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Yo, Ricardo Miguel Sánchez 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.

Riobamba, febrero 2024.



Firmado electrónicamente por:
**RICARDO MIGUEL
SANCHEZ HERRERA**

Ricardo Miguel Sánchez Herrera
C.I. 180406355-8

©2024, Ricardo Miguel Sánchez Herrera

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



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

EL TRIBUNAL DEL TRABAJO DE TITULACIÓN CERTIFICA QUE:

El Trabajo de Titulación modalidad Proyectos de Investigación y Desarrollo, titulado: **Efecto de cafeína y glutatión adicionados al medio de crioconservación sobre los parámetros de calidad seminal y en la tasa de concepción en bovinos lecheros**, de responsabilidad del señor Ricardo Miguel Sánchez Herrera, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del trabajo de titulación, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal autoriza su presentación.

Ing. Fabian Augusto Almeida López, Mgtr.

PRESIDENTE



Firmado electrónicamente por:
**FABIAN AUGUSTO
ALMEIDA LOPEZ**

Ing. Pablo Rigoberto Andino Nájera, Mgtr.

DIRECTOR



Firmado electrónicamente por:
**PABLO RIGOBERTO
ANDINO NAJERA**

Ing. Hermenegildo Díaz Berrones, Mgtr.

MIEMBRO



Firmado electrónicamente por:
**HERMENEGILDO DIAZ
BERRONES**

Ing. Manuel Enrique Almeida Guzmán, Mgtr.

MIEMBRO



Firmado electrónicamente por:
**MANUEL ENRIQUE
ALMEIDA GUZMAN**

Riobamba, febrero 2024

DEDICATORIA

A mi querido Dios, por estar siempre presente en todos los momentos de mi vida con sus infinitas bendiciones, protegiéndome y guiándome por el camino del bien.

A mi amado Papá Miguel Sánchez, por guiarme y protegerme, por ser mi ejemplo y gran orgullo, a ti te debo lo que soy.

A Ti insuperable, preciosa y amorosa Mamá Rosario Herrera, por darme tu cariño, apoyo, consejos y por sobre todo valor para seguir adelante.

A mi bella e inigualable hermana Tatiana, por ser una persona tan maravillosa en mi vida, quien siempre ha estado ahí para apoyarme en todo.

A mis queridos hermanos Christopher y Abel, que son parte importante de mi vida, que este logro lo vean como una motivación para ustedes, para que de igual manera sigan superándose profesionalmente.

A mi hermosa Ángela Sofía, razón de mi felicidad.

A mi apreciado cuñado Nicolás Janeta por su apoyo en la obtención de este logro.

A mi amor y razón de mis desvelos Alisson Kasandra por ser una excelente persona y apoyarme en cada momento de mi vida.

Ricardo Miguel Sánchez Herrera

AGRADECIMIENTO

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, al Instituto de Posgrado y Educación Continua por los conocimientos y destrezas impartidas y por haberme permitido realizar mi maestría.

A la empresa PRODUBIOGENSA, de manera especial al Doctor Francisco Caiza de la Cueva Gerente General, por brindarme su confianza, sus enseñanzas, por sus aportes valiosos e importantes para el desarrollo de la presente investigación.

Al Ing. Pablo Rigoberto Andino Nájera, por sus apreciables aportaciones, enseñanzas y acompañamiento en el desarrollo de esta investigación.

A la Ing. Tatiana Elizabeth Sánchez Herrera, por su apoyo incondicional, su motivación e iniciativa que permitió dar inicio como también poder culminar mi investigación.

A ustedes, mi agradecimiento, ya que fueron pilares primordiales para el desarrollo de esta investigación, darle gracias por educar con excelencia y creer en la educación la misma que representa el desarrollo de la sociedad.

Ricardo Miguel Sánchez H.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	xv
SUMMARY	xvi

CAPÍTULO I

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Situación problemática	3
1.2	Formulación del problema	3
1.3	Justificación de la investigación	4
1.4	Objetivos de la investigación	4
1.4.1	<i>Objetivo general</i>	4
1.4.2	<i>Objetivos específicos</i>	4
1.5	Hipótesis	5
1.5.1	<i>Hipótesis alternativa o del investigador (HI)</i>	5

CAPÍTULO II

2.	MARCO TEÓRICO	6
2.1	Procesos metabólicos de los espermatozoides.	6
2.2	Efectos dañinos de la criopreservación sobre el espermatozoide.....	6
2.3	Estrés oxidativo	8
2.3.1	<i>Estrés oxidativo en la reproducción</i>	9
2.3.2	<i>Estrés oxidativo en procesos de criopreservación</i>	10
2.3.3	<i>Estrés Oxidativo en los Espermatozoides</i>	10
2.4	Radicales libres	12
2.4.1	<i>Efecto de los radicales libres sobre el ADN</i>	13
2.4.2	<i>Efecto de los radicales libres sobre la motilidad espermática</i>	13
2.5	Fuentes de especies reactivas del oxígeno en el semen (ROS).....	14
2.6	Medida del estrés oxidativo y capacidad antioxidante	15
2.7	Antioxidantes.....	15
2.7.1	<i>Glutatión</i>	17
2.7.2	<i>Cafeína</i>	18
2.8	Prueba de Estrés Hipo-osmótico (HOST).	18

2.9	Test de Resistencia Osmótica (ORT)	19
2.10	Matriz de consistencia	20
2.11	Operacionalización de variables	22

CAPÍTULO III

3	METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN	24
3.1	Identificación de las variables	24
3.1.1	<i>Variables Independientes</i>	24
3.1.2	<i>Variables dependientes</i>	24
3.1.2.1	<i>Evaluación en semen fresco</i>	24
3.1.2.2	<i>Evaluación en semen pre congelado</i>	24
3.1.2.3	<i>Evaluación post descongelación</i>	24
3.1.2.4	<i>Evaluación de campo</i>	25
3.2	Operacionalización de las variables	25
3.2.1	<i>Evaluación de semen fresco</i>	25
3.2.1.1	<i>Volumen (ml)</i>	25
3.2.1.2	<i>Color y aspecto</i>	25
3.2.1.3	<i>pH (pts)</i>	26
3.2.1.4	<i>Concentración (espz/ml)</i>	26
3.2.2	<i>Evaluación de semen pre congelación</i>	27
3.2.2.1	<i>Motilidad masal espermática (pts)</i>	27
3.2.2.2	<i>Motilidad individual (%)</i>	27
3.2.2.3	<i>Morfología espermática (%)</i>	27
3.2.3	<i>Evaluación post congelación</i>	28
3.2.3.1	<i>Motilidad progresiva (%)</i>	28
3.2.3.2	<i>Vitalidad espermática (%)</i>	28
3.2.3.3	<i>Anormalidades (%)</i>	29
3.2.3.4	<i>Integridad de la membrana (%)</i>	30
3.2.3.5	<i>Integridad del acrosoma (%)</i>	31
3.3	Metodología	33
3.3.1	<i>Ubicación</i>	33
3.3.2	<i>Armado de vagina artificial</i>	33
3.3.3	<i>Preparación y estimulación del seminal</i>	33
3.3.4	<i>Extracción y transporte de eyaculados</i>	34
3.3.5	<i>Preparación del diluyente y adición de cafeína y glutatión</i>	35
3.3.6	<i>Cálculo de número de dosis de semen</i>	35

3.3.7	<i>Envasado y sellado del semen</i>	36
3.3.8	<i>Proceso de crio conservación</i>	36
3.3.8.1	<i>Fase de refrigeración</i>	36
3.3.8.2	<i>Fase de congelación</i>	37
3.3.9	<i>Proceso de descongelamiento</i>	37
3.4	Tipo y diseño de investigación	37
3.4.1	<i>Esquema del Experimento</i>	38
3.4.2	<i>Esquema del análisis de la varianza (ADEVA)</i>	38
3.4.3	<i>Análisis estadístico y pruebas de significancia</i>	38
3.5	Métodos de investigación	38
3.6	Enfoque de la investigación	39
3.6.1	<i>El enfoque cuantitativo</i>	39
3.6.2	<i>El enfoque cualitativo</i>	39
3.7	Alcance de la investigación	39
3.8	Población de estudio	39
3.9	Unidad de análisis	40
3.10	Técnica de recolección de datos	40
3.11	Instrumentos de recolección de datos	40
3.11.1	<i>Instrumentos primarios</i>	40
3.11.2	<i>Instrumentos secundarios</i>	40
3.12	Instrumentos para procesar datos recolectados	41

CAPÍTULO IV

4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
4.1	Evaluación en semen fresco	43
4.1.1	<i>Volumen (ml)</i>	43
4.1.2	<i>Color</i>	44
4.1.3	<i>pH</i>	44
4.1.4	<i>Concentración (esp/ml)</i>	45
4.2	Evaluación del efecto de la raza sobre la calidad seminal pre congelado	46
4.2.1	<i>Motilidad masal (pts)</i>	46
4.2.2	<i>Motilidad individual (%)</i>	47
4.2.3	<i>Vitalidad, (%)</i>	48
4.2.4	<i>Anormalidades (%)</i>	49
4.2.5	<i>Integridad de la membrana (%)</i>	50
4.2.6	<i>Integridad del acrosoma (%)</i>	51

4.3	Evaluación del efecto de los antioxidantes sobre la calidad seminal en pre congelación	52
4.3.1	<i>Motilidad masal (pts)</i>	52
4.3.2	<i>Motilidad individual (%).....</i>	53
4.3.3	<i>Vitalidad, (%).....</i>	54
4.3.4	<i>Anormalidades (%).....</i>	55
4.3.5	<i>Integridad de la membrana (%).....</i>	56
4.3.6	<i>Integridad del acrosoma (%).....</i>	57
4.4	Evaluación del efecto de los antioxidantes sobre la calidad seminal post descongelado.....	58
4.4.1	<i>Motilidad individual, %.....</i>	58
4.4.2	<i>Vitalidad, %.....</i>	60
4.4.3	<i>Anormalidades, %.....</i>	61
4.4.4	<i>Integridad de la membrana plasmática, %.....</i>	62
4.4.5	<i>Integridad del acrosoma del acrosoma, %.....</i>	63
4.5	Evaluación del efecto de la raza sobre la calidad seminal post descongelado.....	64
4.5.1	<i>Motilidad individual, %.....</i>	64
4.5.2	<i>Vitalidad, %.....</i>	65
4.5.3	<i>Anormalidades, %.....</i>	66
4.5.4	<i>Integridad de la membrana, %.....</i>	67
4.5.5	<i>Integridad del acrosoma, %.....</i>	68
4.6	Evaluación en campo	70
4.6.1	<i>Tasa de concepción</i>	70
CONCLUSIONES.....		71
RECOMENDACIONES.....		72
GLOSARIO		
BIBLIOGRAFÍA		
ANEXOS		

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-2: Matriz de constancia	20
Tabla 2-2: Operacionalización de variables	22
Tabla 1-3: Color y densidad del eyaculado fresco en bovinos.....	25
Tabla 2-3: Valoración de la motilidad individual progresiva	28
Tabla 3-3: Esquema del experimento	38
Tabla 4-3: Esquema de ADEVA	38
Tabla 5-3: Cronograma de actividades	42
Tabla 1-4: Efecto de la raza en semen pre congelado.....	46
Tabla 2-4: Efecto de los tratamientos sobre la calidad seminal en semen pre congelado	53
Tabla 3-4: Efecto de los tratamientos sobre calidad seminal post descongelado	58
Tabla 4-4: Efecto de la raza sobre la calidad seminal post descongelado	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-2: Daño oxidativo en la membrana celular	11
Figura 2-2: Problemas relacionados con un exceso de plasma residual	12
Figura 3-2: Esquema de la molécula de glutatión	18
Figura 1-3: Motilidad masal.....	27
Figura 2-3: Anormalidades de los espermatozoides.....	30
Figura 3-3: Determinación de la integridad del acrosoma.....	32
Figura 4-3: Ubicación geográfica del cantón Mejía	33
Figura 5-3: Cálculo del número de pajillas	36

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-4:	Volumen de eyaculado de las cuatro razas en estudio.....	43
Gráfico 2-4:	Valor de pH en semen fresco de las cuatro razas en estudio	44
Gráfico 3-4:	Concentración espermática de las cuatro razas en estudio	45
Gráfico 4-4:	Efecto de la raza sobre la motilidad masal durante la pre congelación	47
Gráfico 5-4:	Efecto de la raza sobre la motilidad individual durante la pre congelación.....	48
Gráfico 6-4:	Efecto de la raza sobre la vitalidad espermática durante la pre congelación	49
Gráfico 7-4:	Efecto de la raza sobre las anormalidades durante la pre congelación	50
Gráfico 8-4:	Efecto de la raza sobre la integridad de la membrana en la pre congelación	51
Gráfico 9-4:	Efecto de la raza sobre la integridad del acrosoma en pre congelación.....	52
Gráfico 10-4:	Efecto de los tratamientos sobre la motilidad masal pre congelación	53
Gráfico 11-4:	Efecto de los tratamientos sobre la motilidad individual pre congelación.....	54
Gráfico 12-4:	Efecto de los tratamientos sobre la vitalidad durante la pre congelación	55
Gráfico 13-4:	Efecto de los tratamientos sobre las anormalidades en pre congelación	56
Gráfico 14-4:	Efecto de los tratamientos sobre la integridad de la membrana.....	57
Gráfico 15-4:	Efecto de los tratamientos sobre la integridad del acrosoma.....	58
Gráfico 16-4:	Motilidad espermática del semen post descongelación previa adición de antioxidantes en medios de congelación	59
Gráfico 17-4:	Vitalidad espermática del semen post descongelación previa adicción de antioxidante en medios de congelación.....	60
Gráfico 18-4:	Anomalías espermáticas del semen post descongelación previa adición de antioxidantes en medios de congelación	61
Gráfico 19-4:	Integridad de la membrana del semen post descongelación previa adición antioxidante en medios de congelación.....	62
Gráfico 20-4:	Integridad del acrosoma del semen post descongelación previa adición de antioxidante en medios de congelación.....	63
Gráfico 21-4:	Motilidad individual del semen post descongelación en relación a la raza	64
Gráfico 22-4:	Vitalidad del semen post descongelación en relación a la raza	65
Gráfico 23-4:	Anormalidades del semen post descongelación en relación a la raza	66
Gráfico 24-4:	Motilidad individual del semen post descongelación en relación a la raza	68
Gráfico 25-4:	Integridad del acrosoma del semen post descongelación en relación a la raza	68

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A: COLECTA DE SEMEN

ANEXO B: PREPARACIÓN DEL DILUYENTE

ANEXO C: ADICIÓN DE ANTIOXIDANTES

ANEXO D: CÁLCULO DE CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA

ANEXO E: IDENTIFICACIÓN DE TRATAMIENTO E INICIO FASE DE
PRECONGELACIÓN

ANEXO F: TINCIONES FOSINA-NEGROSINA

ANEXO G: PARÁMETROS DE CALIDAD SEMINAL

ANEXO H: FASE DE CONGELACIÓN

ANEXO I: TASA DE CONCEPCIÓN

RESUMEN

Las células espermáticas al ser sometidas al proceso de crioconservación sufren una serie de daños y alteraciones funcionales en sus estructuras, asociados al estrés oxidativo.

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto antioxidante de la cafeína y el glutatión adicionados al medio de congelación sobre los parámetros de calidad seminal bovina. La investigación se realizó en el centro de investigación CIBRAE perteneciente a la empresa Produbiogensa Ltda., se utilizó cuatro sementales de las razas Holstein, Jersey, Brown Swiss y Simmental, la colecta fue mediante vagina artificial. Se realizó una pre-dilución en una proporción de 1:1, se dividió en tres alícuotas para la adición de sus respectivos tratamientos (T0:0 mg, T1:1,94 mg cafeína, T2:1,53 mg glutatión) se sometió a un descenso de temperatura controlada durante cuatro horas hasta llegar a los 6 °C (fase pre congelación), se envasó en pajillas de 0.5 ml, se sometió a vapores de nitrógeno líquido durante 20 minutos, luego se sumergieron en nitrógeno líquido para llegar a -196 °C (fase congelación). Las evaluaciones macroscópicas en cuanto al color fueron de blanco cremoso a lechoso y un pH promedio 6,8. Se utilizó un Diseño Completamente al Azar bifactorial, determinándose diferencias significativas, donde la raza Holstein demostró mayor aptitud en los procesos de crioconservación con valores de motilidad individual de 64,27%, vitalidad 65,03 %; integridad de la membrana 58,9 % e integridad del acrosoma con 66,76 %, la adición de 1,54 mg de glutatión en la fase de pos congelación demostró una superioridad en los valores de calidad espermática con respecto a motilidad individual con 62,5%, vitalidad 62,79%; integridad de la membrana 61,14% e integridad del acrosoma con 67,24%, demostrando así su capacidad antioxidante y su efecto eficiente durante el proceso de crio conservación.

Palabras claves: <CAFEÍNA>, <GLUTATIÓN>, <ANTIOXIDANTES>, <ESTRÉS OXIDATIVO>, <CALIDAD SEMINAL>.



Firmado electrónicamente por:
**LUIS ALBERTO
CAMINOS
VARGAS**



06-12-2022

0195-DBRA-UPT-IPEC-2022

SUMMARY

The objective of this research was to evaluate the antioxidant effect of caffeine and glutathione added to the freezing medium on bovine semen quality parameters. The research was carried out at the CIBRAE research center, which belongs to the company Produbiogensa Ltda. The collection was carried out by an artificial vagina using four stallions of the Holstein, Jersey, Brown Swiss, and Simmental breeds. A pre-dilution was made in a 1:1 ratio, divided into three aliquots for the addition of their respective treatments (T0:0 mg, T1:1.94 mg caffeine, T2:1.53 mg glutathione), subjected to a controlled temperature decrease for four hours until reaching 6 °C (pre-freezing phase), packed in 0.5 ml straws, subjected to liquid nitrogen vapors for 20 minutes, then immersed in liquid nitrogen to reach -196 °C (freezing phase). Macroscopic evaluations for color were creamy white to milky white and had an average pH of 6.8. A bifactorial Completely Randomized Design was used, determining significant differences, where the Holstein breed showed greater aptitude in the cryopreservation processes with individual motility values of 64.27% and vitality of 65.03%. The addition of 1.54 mg of glutathione in the post-freezing phase showed superiority in sperm quality values concerning individual motility at 62.5%, vitality at 62.79%, membrane integrity at 61.14%, and acrosome integrity at 67.24%, thus demonstrating its antioxidant capacity and its efficient effect during the cryopreservation process.

Key words: <CAFFEINE>, <GLUTATHION>, <ANTIOXIDANTS>, <OXIDATIVE STRESS>, <SEMINAL QUALITY>.

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

Durante el proceso de crio conservación el éxito de la aplicación de esta biotecnología no se fundamenta en mantener semen congelado durante algunos años, la verdadera importancia radica en que las células espermáticas logren sobrevivir manteniendo su vitalidad durante mencionado tiempo que ha permanecido crioconservado, durante las fases de congelación y descongelación el semen bovino sufre el daño o muerte de aproximadamente el 30 % de los espermatozoides, como también una disminución en su motilidad en un 50%, afectando directamente su capacidad de fecundación (Chaveiro et al., 2006).

El proceso de crioconservación de semen bovino en nuestro país constituye una actividad altamente compleja, debido a los diversos procesos que están involucrados durante las fases de refrigeración, congelación y descongelación generan daños relacionados al estrés oxidativo que se produce en el espermatozoide (Chatterjee et al., 2001; Gutiérrez-Pérez et al., 2009).

Los procesos de oxidación que se dan en la célula espermática es uno de los factores que más afecta y limita la crioconservación de semen bovino, este proceso se da por el metabolismo que poseen los espermatozoides al igual que la manipulación a la que es sometido el semen cuando se realiza la inseminación artificial donde está expuesto a cambios térmicos y bioquímicos.

Los procesos metabólicos que conllevan a que se den una serie de reacciones de oxidación son imprescindibles para la vida, las mismas que se producen de manera natural en todas las células como consecuencia de la respiración, las cuales generan sustancias que cuando superan los niveles normales resultan citotóxicas. En el caso de las células espermáticas estas sustancias son llamadas especies reactivas de oxígeno (ROS, del acrónimo en inglés Reactive Oxygen Species) (Chaveiro et al., 2006).

Por su alto contenido en ácidos grasos poli-insaturados que están conformando la membrana plasmática, la misma es en especial más susceptible al daño causado por los ROS. La acción de los ROS en el semen también puede causar daños irreparables a nivel del material genético del espermatozoide, provocando alteraciones en el desarrollo embrionario. En conclusión, un elevado nivel de sustancias oxidantes presentes en las dosis seminales, reduce su calidad, afectando seriamente los resultados reproductivos (Chatterjee et al., 2001; Gutiérrez-Pérez et al., 2009).

Diversas investigaciones han logrado demostrar que al suplementar los diluyentes seminales con sustancias antioxidantes, las mismas reducen el impacto que provoca el estrés oxidativo durante el proceso de crioconservación, mejorando de esta forma la calidad seminal, dicha acción de estos antioxidantes neutraliza la producción de radicales libres, protegiendo de esta manera a los espermatozoides de los procesos oxidativos, de esta manera se neutralizan de igual manera otros factores como la presencia de agentes infecciosos, la osmolaridad, alteraciones del pH, y la temperatura. Por tal motivo es imperante realizar esta investigación encaminada a encontrar los elementos más apropiados para mantener una criopreservación espermática eficaz sin que se presenten inconvenientes en la calidad futura y posterior utilización.

1.1 Situación problemática

El desarrollo en la producción lechera que se está dando en la actualidad en Ecuador está representando como uno de los principales eslabones en el crecimiento económico del mismo, donde las aplicaciones de biotecnologías han contribuido de mejor manera al mejoramiento del ganado bovino, dentro de estas nuevas biotecnologías la crioconservación de semen juega un rol importante, ya que nos permite preservar semen durante algunos años donde los mismos puedan sobrevivir y mantener tanto su vialidad como capacidad fecundante durante dicho tiempo.

Las células espermáticas al ser sometidas al proceso de crioconservación se ven expuestas a diversos cambios en su funcionalidad donde las principales estructuras afectadas son la membrana plasmática y la membrana acrosomal, que causa que el espermatozoide sufra daños asociados al estrés oxidativo, las investigaciones realizadas hasta el momento han evidenciado la necesidad de la búsqueda y estudio de nuevas sustancias que mediante su combinación puedan ofrecer mayor protección a la célula espermática sometidas a la crioconservación, las cuales contribuyan a preservar la calidad del semen bovino, manteniendo un porcentaje aceptable de espermatozoides viables.

Por esta razón, se presenta la necesidad de aplicar nuevos aditivos a los medios de crioconservación seminal como alternativa frente al estrés oxidativo que se produce durante dicho proceso, los cuales constituyan a mejorar la calidad seminal y presentar una mayor eficiencia durante la inseminación artificial.

1.2 Formulación del problema

La Compañía Produbiogensa Ltda., ubicada en el cantón Mejía, ciudad de Machachí, investiga de forma permanente diferentes tipos de “menstruos” (del latín medios), término utilizado para referirse a la solución acuosa donde se diluye el semen, que garanticen de una manera más óptima un medio adecuado para la supervivencia de los espermatozoides y poseer un mayor poder fecundante, debido al hecho que el proceso de crioconservación provoca el daño o a su vez la muerte de un porcentaje importante de espermatozoides en el semen, afectando de manera negativa la calidad del mismo. Debido a esto se requiere evaluar de forma integral los posibles efectos generados al adicionar cafeína y glutatión a un diluyente comercial (Triladyl ®) sobre los parámetros de calidad seminal de las principales razas lecheras de nuestro país durante la pre y pos congelación. De todo lo anterior surge el siguiente problema de investigación:

¿La adición de cafeína y glutatión al diluyente comercial Triladyl® influye en los parámetros de calidad de semen bovino durante la crioconservación?

1.3 Justificación de la investigación

Háfez (2000) plantea que el manejo del ganado debe enfocarse en la búsqueda de un manejo que permita un comportamiento reproductivo altamente eficiente, lo cual es de vital importancia para la sobrevivencia de la industria ganadera en la economía actual. En la ganadería bovina, el macho reproductor juega un papel importante, ya sea en programas de monta directa o inseminación artificial y aunque se utilice un método u otro, su éxito o fracaso en la reproducción se encuentra en dependencia de su salud sexual, capacidad para la monta y calidad espermática.

La crioconservación de semen, como técnica biotecnología encaminada a la reproducción artificial de especies promueve la conservación del germoplasma masculino por tiempo indeterminado; junto con la inseminación artificial proporcionan un ahorro en la economía para el productor, al reducir los costos que implicaría el mantener un macho reproductor, así como los riesgos de contagio de enfermedades de transmisión sexual (Castelo et al., 2008).

Durante el proceso de crioconservación, los espermatozoides pueden ser afectados por diferentes causas que pueden dañar la integridad de los mismos, y por tanto la disminución de la fertilidad (González, 2003). En dicho proceso se integran un grupo de factores como la dilución, la congelación, la descongelación y la fisiología propia del semen de cada especie, elementos a tener en cuenta en la búsqueda de la obtención de resultados satisfactorios (Castelo et al., 2008).

1.4 Objetivos de la investigación

1.4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto que presenta la adición de cafeína y glutatión al medio de crioconservación sobre los parámetros de calidad seminal y la tasa de concepción en bovinos lecheros.

1.4.2 Objetivos específicos

- Evaluar la utilización de cafeína y glutatión adicionados al diluyente de crioconsevación, (Triladyl ®), en semen de toros de las razas Holstein Friesian, Jersey, Brown Swiss y Simental.

- Determinar parámetros de calidad seminal como morfología, vitalidad, funcionalidad de membrana e integridad acrosomal, cuando al diluyente comercial (Triladyl ®) se le es añadido cafeína y glutatión.
- Evaluar el efecto antioxidante de la cafeína y del glutatión sobre la motilidad espermática masal e individual pre y pos congelación.

1.5 Hipótesis

1.5.1 Hipótesis alternativa o del investigador (HI)

La adición de cafeína y glutatión al diluyente (TRILADYL®) influye sobre los parámetros de calidad seminal y tasa de concepción en bovinos lecheros durante la crioconservación.

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Procesos metabólicos de los espermatozoides.

Hoskins y Casillas (1973) manifiestan que la energía que el espermatozoide requiere para la motilidad proviene de las reservas intracelulares de ATP, la misma que se encuentra regulada por la concentración endógena del monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) para su utilización, elemento que de igual manera interviene directamente en la motilidad de los espermatozoides.

Los espermatozoides degradan los azúcares, como la glucosa, fructosa, como también el ácido láctico (actividad fructolítica), procesos que se dan en condiciones anaerobias, debido a que la fructosa que es la principal azúcar presente en el semen que permite que los gametos logren sobrevivir en dicha condición, cuestión muy importante que se debe considerar durante el proceso de crioconservación del semen e inseminación artificial (Garner y Hafez, 2000).

Las células espermáticas utilizan una gran cantidad de sustratos, las cuales en presencia de oxígeno representan una cadena respiratoria que permite el empleo de lactato y el piruvato, productos resultantes de la fructólisis de los azúcares, y dar dióxido de carbono y agua como productos resultantes (Mann, 1975).

Durante los procesos metabólicos, la generación de energía, la vía oxidativa, que se encuentra localizada en las mitocondrias, es mucho más eficiente que la fructólisis. Cabe mencionar que una gran parte del ATP es empleado como fuente principal de energía en la actividad de motilidad del espermatozoide, como también es utilizada en los diferentes procesos de transporte activo a nivel de las membranas espermáticas, dichos procesos de transporte activo tienen como principal función la de mantener la concentración adecuada de los componentes iónicos que son vitales para las células espermáticas.

Según White (1980) al existir carencia de sustratos exógenos, las células espermáticas hacen uso de sus reservas intracelulares de plasmalógeno utilizándolas para la producción de energía, este proceso es útil solamente a corto plazo.

2.2 Efectos dañinos de la crioconservación sobre el espermatozoide

La baja capacidad fecundativa que presentan los espermatozoides se enfoca básicamente en dos elementos determinantes, la pobre viabilidad postcongelamiento y el daño subletal

producido en una proporción de espermatozoides sobrevivientes, lo mismo que se dan a factores como: cambios drásticos de temperatura, efecto del estrés osmótico, formación de hielo intracelular y toxicidad a nivel celular, los cambios de temperatura pueden generar estrés en la membrana espermática (Watson, 2000).

Los daños ocasionados por la crioconservación en las membranas espermáticas durante este proceso se invierten de manera parcial después del descongelamiento. Las proteínas integrales que se encuentran en la membrana son agrupadas por la separación de la fase lipídica, esto puede llegar a alterar su función, principalmente la función de las proteínas de canales iónicos. Debido a esto, la permeabilidad que presenta la membrana plasmática se incrementa después del proceso de congelamiento. También se ve afectada la regulación del calcio alterando así la función celular. En cuadros muy drásticos, es incompatible con la viabilidad celular (Bailey y Buhr, 1994).

Factores como el efecto del estrés osmótico, la formación de hielo intracelular durante un deficiente proceso o protocolo de crioconservación provocan una considerable disminución en la viabilidad espermática, otro factor como la toxicidad por la presencia en demasía de sustancias como el glicerol que constituye el principal elemento utilizado en conservación de semen también producen la muerte de las células espermáticas (Watson, 2000). Un porcentaje de espermatozoides que sobreviven presentan lesiones funcionales relacionadas con la integridad de la membrana, integridad de los receptores de membrana, integridad de la estructura nuclear y daños oxidativos.

Según Watson (2000) los espermatozoides crioconservados presentan como principal característica una disminución de las células móviles, presentando una disminución a valores entre 40 a 50% (Molinia et al., 1994a; 1994b; Hellemann y Jara, 1997; Salomón y Maxwell, 2000; El-Alamy y Foote, 2001).

Los espermatozoides en semen fresco sin embargo presentan membranas plasmáticas débiles alrededor del 8% al 24%, las cuales durante los procesos de congelación y descongelación tienden a sufrir una fragmentación de su estructura, provocando una disminución en la vitalidad de los espermatozoides y por ende de su calidad (Muhammad et al. 2002).

2.3 Estrés oxidativo

Comprender de mejor manera el concepto de estrés oxidativo no sería posible si no fuésemos capaces de imaginar la presencia de un escenario aerobio, en el cual las células y el medio que las rodea mantienen un balance entre la producción de radicales libres y de aquellos procesos responsables en compensar una excesiva producción de mencionados radicales libres, bloqueándolos o a su vez reparando cualquier efecto negativo que pudiese alterar o comprometer el rendimiento de los procesos biológicos de las células (Miquel, 1991; Harman, 2003).

Dentro de dicha perspectiva, el estrés oxidativo resultaría en el desequilibrio creado en ese balance fisiológico, a causa de un incremento desmedido o excesivo de los radicales libres, o a su vez una incapacidad de los procesos compensadores, o también presentarse ambos escenarios a la vez (Sies y Cadenas, 1985).

La producción excesiva de especies reactivas de oxígeno que se dan a nivel celular abaten las defensas antioxidantes, provocando alteraciones como deformidades al impedir de forma natural la espermatogénesis, daños en la funcionalidad espermática y como consecuencia de lo anteriormente menciona se da problemas de infertilidad (Agarwal et al., 2014).

Los blancos principales donde actúa el estrés oxidativo son las macromoléculas de la célula (lípidos, ácidos nucleicos, proteínas y carbohidratos), que provoca un considerable daño en la funcionalidad de los espermatozoides a causa de la peroxidación lipídica incitada por los ROS (Sariözkan et al., 2009).

Los parámetros que principalmente se ven afectados son la motilidad, integridad de la membrana y fertilidad (Sariözkan et al., 2009). El incremento considerable en el estrés oxidativo se ve reflejado en el ADN espermático, en la transcripción de ARN y en los telómeros, dando como resultados infertilidad, mortalidad embrionaria y por ende pérdida de la gestación (Agarwal y Bui, 2017).

Algunas investigaciones realizadas por algunos autores interpretan que estos sistemas obedecen a un ámbito de tipo evolutivo, donde los organismos celulares, en su proceso evolutivo encaminado hacia un sistema de respiración aerobio energéticamente más eficiente, tuvieron la necesidad de generar un complejo sistema antioxidante para contrarrestar y hacer frente a la formación de subproductos altamente reactivos; originando una multiplicidad de moléculas e iones destinadas a establecer un “equilibrio redox” que favorezca un desarrollo sostenible de la vida en nuevos entornos biológicos (Freeman y Grapo 1982).

En su gran mayoría, el estrés oxidativo es asociado a efectos negativos principalmente sobre todo tipo de moléculas tales como lípidos, proteínas, carbohidratos y ADN, como también a diversos procesos biológicos como la mutagénesis, procesos carcinogénicos, daños a nivel de membrana celular, peroxidación lipídica, oxidación proteica, fraccionamiento de las cadenas de ADN. El origen de todos estos fenómenos reside principalmente en la formación de los denominados radicales libres, los mismos que se derivan de la respiración celular en presencia de oxígeno o nitrógeno (Sies y Cadenas, 1985; Agarwal et al., 2006).

2.3.1 Estrés oxidativo en la reproducción

Se ha indicado al estrés oxidativo como un desequilibrio que ocurre a nivel celular debido al aumento desmedido de radicales libres y a su vez la disminución de la capacidad antioxidante que posee la célula la cual puede inactivar los efectos dañinos causados por las especies reactivas del oxígeno siempre y cuando la formación de los mismos no sea de manera desmedida (Córdova et al., 2017).

Estudios sobre fisiología de la reproducción en mamíferos conduce cada vez más a evidencias sobre la presencia de fenómenos de estrés oxidativo, ya sea de manera directa e indirectamente, y su gran relación con problemas de fertilidad (de Lamirande, 1997).

El estrés oxidativo provoca daños a nivel de la membrana espermática, de igual forma disminuye la motilidad del espermatozoide al provocar alteraciones de las principales estructuras vitales principalmente el material genético (ADN) dando como consecuencia la incapacidad de llevar a cabo la fecundación provocando una pobre baja fertilidad.

En el proceso de formación de los espermatozoides también conocida como espermatogénesis, las células espermáticas atraviesan por transformaciones importantes que las convierte en unas células cada vez más especializadas, donde existe la pérdida de la mayor parte de su contenido citoplasmático hasta que adquieren su forma definitiva de espermatozoide. Posteriormente, las células espermáticas sufren procesos madurativos importantes constituyéndose en células sexuales sumamente especializadas en su estructura y funcionalidad, pero a la vez perdiendo contenido antioxidante citoplasmático. Todo este proceso se da lugar en ausencia de los mecanismos antioxidantes provenientes del plasma seminal (Balercia et al., 2003).

Por la gran importancia que tiene el proceso de espermatogénesis en la calidad seminal posterior, es muy necesario que cuente con mecanismos antioxidantes efectivos, y se podría decir

alternativos de los que cuenta el propio espermatozoide (células de testículo y epidídimo) (Agarwal et al., 2006; Dun et al., 2012).

2.3.2 Estrés oxidativo en procesos de crioconservación

La historia nos ha mostrado sobre la capacidad del espermatozoide para sobrevivir a temperaturas cercanas a la congelación en las investigaciones realizadas por Spallanzani en 1776, quien supo congelar semen en nieve y posteriormente reactivarlo transcurrido tras treinta minutos más tarde en un medio temperado. Pese a dicha capacidad que posee de permanecer almacenados a temperaturas cercanas a los -196°C , los espermatozoides van a estar expuestos a una serie de daños estructurales y fisiológicos generados en este proceso de criopreservación (Polge & Jakobsen, 1959; Watson, 2000).

La congelación y posterior descongelación de dosis seminales representa una serie de daños que afectan directamente a la supervivencia celular espermática, a la vez que en dicho proceso eliminamos potencial antioxidante natural que posee la muestra, se crea un ambiente nocivo para el espermatozoide, como resultado de eliminar gran parte del plasma seminal y adicionar en su lugar el medio crioprotector (Gadea et al., 2005).

Tanto la estructura y composición que posee la membrana plasmática juega un papel muy importante en el proceso de crioconservación y de cómo esta vaya a comportarse en la congelación y descongelación determinara básicamente la supervivencia, su funcionalidad y el potencial fértil que presenten las muestras seminales crioconservadas (Polge & Jakobsen, 1959; Pursel y Johson, 1975; Waterhouse et al., 2006).

Los radicales libres que se forman durante los procesos de crioconservación han sido estudiados muy detenidamente por diferentes investigadores (Ball et al., 2001; Chatterjee et al., 2001; Gadea et al., 2004), vislumbrando como resultado que los espermatozoides presentes en el semen incrementan la producción de radicales libres en respuesta al descenso de temperatura que ocurre durante su crioconservación, sobre todo en temperaturas cercanas a los 4°C (Wang et al., 1997).

2.3.3 Estrés Oxidativo en los Espermatozoides

En la espermatogénesis durante el proceso de maduración, los espermatozoides liberan ROS ocasionando cambios de fluidez en la membrana indispensable en la unión con el óvulo, se sabe que los espermatozoides genera un alto índice de división celular el cual conlleva a una mayor tasa en el consumo de oxígeno mitocondrial por parte del epitelio germinal, sumado a ello la

poca vascularización de los testículos hace que la concentración de oxígeno sea baja y que la competencia para este elemento vital dentro de los testículos se intensifique (Córdova et al. 2017).

Estudios anteriores han demostrado que los espermatozoides son altamente sensibles a daños ocasionados por las ROS debido a que sus membranas son ricas en ácidos grasos poliinsaturados necesarios para mantener la fluidez al momento de la fusión de la membrana durante la fecundación, el daño oxidativo se lleva a cabo en el plasma seminal; mientras que las espermogonias son consideradas como tolerantes a las ROS.

Cabe mencionar que la peroxidación lipídica a causa de ROS en bajas concentraciones modifica la membrana celular facilitando la adherencia del espermatozoide con el oocito (Córdova et al. 2017).

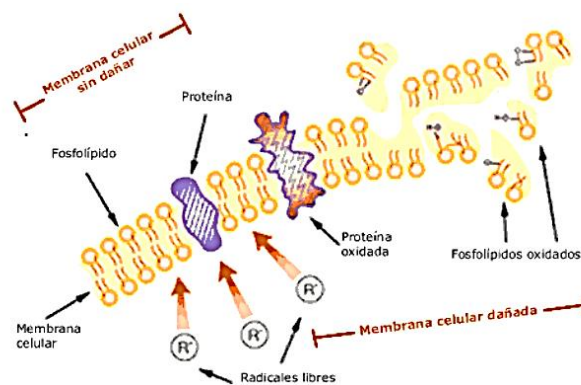


Figura 1-2: Daño oxidativo en la membrana celular

Fuente: Córdova et al., 2017.

Sin duda el alto nivel de ROS en los espermatozoides provoca que la espermiogénesis proceso donde las espermátides redondas se transforman en espermatozoides sea defectuoso presentándose problemas de tipo morfológico principalmente en la región de la pieza intermedia del espermatozoide, durante el proceso normal las células de sertoli eliminan el citoplasma del espermatozoide antes de que este sea liberado del epitelio germinal.

Sin embargo, el citoplasma residual resultante del proceso de espermiogénesis se presenta como una gota esférica de citoplasma que migra lentamente hacia la cola del espermatozoide antes de su liberación en el espacio extracelular. La gota citoplasmática está claramente correlacionada con bajos niveles de fertilidad porque afectan la hiperactivación, la capacitación y la reacción acrosómica (Córdova et al. 2017).

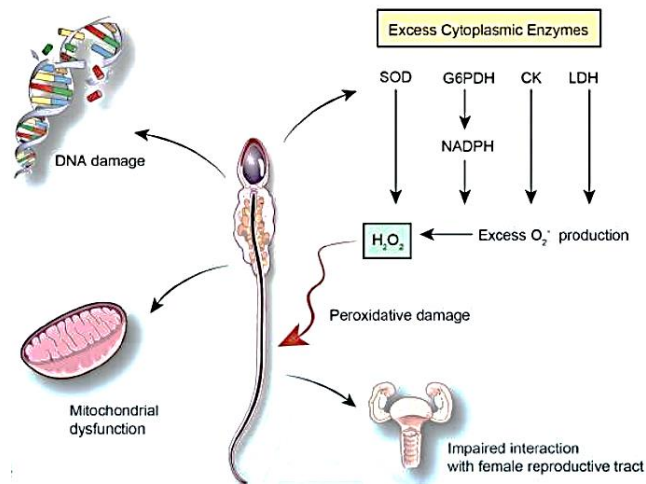


Figura 2-2: Problemas relacionados con un exceso de plasma residual

Fuente: Córdova et al., 2017.

2.4 Radicales libres

Se puede definir como radical libre a aquella molécula o átomo que posee la capacidad de existir en un estado temporal de desequilibrio electrónico es decir que tiene en su estructura uno o más electrones no apareados (Núñez Selles A, 2001). Dentro de los radicales libres más importantes están las especies reactivas de nitrógeno (NOS) y especies reactivas de oxígeno (ROS), siendo estos últimos los más comunes e importantes (Agarwal A, Gupta S, Sharma RK, 2005 y Chihuailaf M, Chihuailaf RH, Contreras PA, Wittwer FG, 2002).

La producción normal de radicales libres ocurre durante el metabolismo del oxígeno, cuando existe un incremento de ATP, hay también un exceso en la producción de dichos radical. Además, lesiones de tipo crónico a nivel de los testículos además del estrés oxidativo normal provocan liberación de radicales libres generando un importante daño a nivel de los espermatozoides debido a la peroxidación lipídica, generando alteraciones en los espermatozoides que afectan la motilidad, actividad endogénica de antioxidantes enzimáticos, integridad de la membrana y fertilidad (Lavranos et al., 2009).

Una gran parte de sustancias que se encuentran presentes en la mayoría de los organismos vivos contienen en su estructura electrones apareados, es decir son moléculas químicamente estables, los radicales libres son átomos o moléculas que tienen en su estructura electrones no apareados los mismos que pueden presentar carga o no, dándole al radical la capacidad de reaccionar químicamente con otras moléculas. La manera de actuar de un radical libre es tomar un electrón de una molécula estable para completar o aparear su electrón libre convirtiéndose en un radical

oxidante o también puede unirse a la molécula químicamente estable dando como resultado un radical químicamente agresivo.

Los radicales libres que poseen mayor trascendencia e influencia en las patologías animales son aquellos derivados de la molécula de oxígeno tal es el caso del peróxido de hidrógeno (H_2O_2), ácido hipocloroso, hidroperóxido, oxígeno simple, donde está presente al menos una molécula de oxígeno dentro de su estructura, razón por el cual los radicales libres se los denominan o toman el nombre de ROS o especies reactivas al oxígeno (Camargo, Ramírez, y Oliveira 1999).

2.4.1 Efecto de los radicales libres sobre el ADN

Los sementales bovinos que por lo general presentan problemas de baja fertilidad son aquellos que poseen problemas en el proceso de protaminación, esto hace que el ADN espermático no se encuentre empaquetado y a su vez protegido por las protaminas, siendo este vulnerable al daño provocado por los radicales libres. La molécula de ADN es atacada en sus bases de purina (Adenina y Guanina) y pirimidina (Tiamina y Citosina) como también su esqueleto carbonado de la dexosirribosa, provocando daños en la lectura y reordenamiento cromosómico (Ramos y Wetzels 2001).

Otro de los daños que ocasionan los radicales libres es la activación de la apoptosis celular debido a la degradación enzimática que sufre el ADN por acción de las enzimas capaces las cuales rompen los enlaces peptídicos presentes en las proteínas (Ford, 2001).

Existen evidencias que demuestran que la presencia de radicales libres provoca inestabilidad en los puentes disulfuro de las nucleoproteínas presentes en las moléculas, provocando un entorpecimiento de las funciones metabólica que están involucradas en los procesos celulares posteriores, principalmente durante el desarrollo embrionario (Yeste et al., 2012). Otros autores manifiestan que para que exista un daño significativo a nivel del ADN espermático, sería necesario que exista otros procesos defectuosos además de los fenómenos provocados por el estrés oxidativo, principalmente durante la maduración espermática, o también de apoptosis celular Weng et al., (2002).

2.4.2 Efecto de los radicales libres sobre la motilidad espermática

Las células espermáticas son más sensibles al daño ocasionado por los radicales libres ya que estos tienen altas concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados en su membrana espermática. (Tortolero, Arata, Osuna, Gómez, & Regadera, 2005).

La acción que ejercen los radicales libres de oxígeno sobre la motilidad espermática está dada por un sin número de eventos en donde existe una disminución en la adición de un grupo fosfato a las moléculas de proteínas (fosforilación de las proteínas) las cuales recubren el axonema dando como resultado la inmovilización del espermatozoide asociándose con la reducción en la fluidez de membrana.

El peróxido de hidrogeno (H_2O_2) considerada como una de las principales fuentes para la disminución de la motilidad puede expandirse a través de la membrana impidiendo la actividad normal de ciertas enzimas tal es el caso de la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PD) la cual regula la velocidad en el flujo de la glucosa por medio de la vía hexosa monofosfato controlando la disponibilidad de fosfato dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADPH) a nivel intracelular, esta inhibición de la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PD) disminuye la cantidad de NADPH cuya principal función es servir como canal de electrones para que los espermatozoides produzcan radicales libres incrementando la degradación oxidativa de los lípidos ya que altera los ácidos grasos insaturados presentes en la membrana de los espermatozoides proceso conocido como peroxidación de los fosfolípidos de la membrana (Aitken et al., 1998).

La generación de radicales libres especialmente el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) producido por el sistema oxidasa del espermatozoide atacan las altas concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados en la membrana plasmática espermática, iniciando una cascada de peroxidación lipídica (García et al., 2011).

2.5 Fuentes de especies reactivas del oxígeno en el semen (ROS)

Algunas investigaciones realizadas han podido demostrar que la mayor fuente de especies reactivas del oxígeno son las mismas células espermáticas, debido a los procesos metabólicos que se producen en las mitocondrias producto de la respiración, donde los electrones se fugan produciendo anión superóxido (O_2^-) el cual posteriormente se transforma en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) causando permeabilidad en la membrana del espermatozoide, afectando lípidos y otros componentes de la célula; aunque el peróxido de hidrógeno que se ha producido en este proceso puede disminuir al ser subsecuentemente transformado en agua por acción de enzimas como la catalasa y la glutatión peroxidasa (Aitken et al., 1998).

Los neutrófilos o leucositos que son células inmunitarias cuya función es la de destruir los agentes patógenos con la producción de ROS son considerados como una fuente importante en la producción de los mismos. Los leucocitos poseen en sus membranas la enzima NADPH oxidasa que producen Oxígeno (O_2) y que en presencia de algún metal de manera específica el hierro se

convierte en ion hidroxilo (HO^-) con características químicamente tóxicas, fenómeno que se da en procesos inflamatorios.

La generación de radicales libres por efecto de leucocitos pueden llegar a cuadros crónicos y dañar la célula, la producción de ROS es 1,000 veces más en leucocitos en comparación que en los espermatozoides durante el proceso de capacitación, razón por la cual se considera que los leucocitos constituyen como la principal fuente productora de ROS en el líquido seminal (Córdova et al. 2017).

2.6 Medida del estrés oxidativo y capacidad antioxidante

Un porcentaje considerable de infertilidad en sementales está relacionado con el estrés oxidativo para lo cual existe un sin número de pruebas ya sean directas o indirectas donde se detecta la presencia de especies reactivas del oxígeno y la capacidad antioxidante de cada una de las muestras espermáticas, para ello se debe tener en cuenta aspectos correspondientes a la logística, el coste-eficiencia, y el hecho de no existir un método analítico estandarizado pudiendo encontrar más de treinta análisis diferentes (Agarwal, Durairajanayagam, y Plessis 2014).

Las pruebas directas más utilizadas son aquellas de detección de luminol y lucigenina mediante quimioluminiscencia ya que permiten la medición de radicales libres tanto en el medio como en el espermatozoide, a partir de la luz detectada mediante el luminómetro como resultado de la combinación con los radicales libres presentes, donde el luminol detecta especialmente el radical superóxido y peróxido de hidrógeno, mientras que la lucigenina puede detectar radicales O_2^- y el HO^- el principal inconveniente de esta prueba son las altas concentraciones y volúmenes de muestra (Mahfouz, Sharma, Ph, Lackner, & Aziz, 2009).

Las pruebas indirectas para determinar el estrés oxidativo se basan en la valoración de las alteraciones que sufren los espermatozoides y sus efectos negativos sobre la funcionalidad fisiológica y potencial fértil por acción de los radicales libres especialmente en sus membranas y ADN mediante pruebas de microscopía, citometría de flujo, etc; (Gadea citado por Guambao 2015).

2.7 Antioxidantes.

Según la definición propuesta por Halliwell y Gutteridge, un antioxidante es cualquier especie molecular que, en presencia de concentraciones superiores de un sustrato oxidable, reduce o inhibe la oxidación del mismo (Halliwell y Gutteridge, 1989).

Los antioxidantes son sustancias capaces de retardar, prevenir y detener la oxidación de los sustratos o moléculas diana. (Valdez Torres JM. Barry H, M., John Gutteridge C,2009). Los antioxidantes tienen una variedad amplia que pueden ser desde moléculas complejas, como el superóxido dismutasa, la catalasa, peroxirredoxinas y moléculas sencillas como ácido úrico y glutatión (Gutteridge y Halliwell, 2000).

El sinnúmero de procesos biológicos que se dan en presencia de oxígeno, células y tejidos se han visto en la obligación de desarrollar, en el transcurso evolutivo, una serie de moléculas y sistemas, con la finalidad de conformar una defensa efectiva frente al estrés oxidativo. Estos sistemas se pueden clasificar como preventivos, proactivos o reparadores, con una función básica en todos los casos para los antioxidantes (Ma y Eaton, 1992).

De estos mecanismos antioxidantes, las células poseen cierta facultad de prevención frente a la formación de especies reactivas, los cuales se basan en los mismos mecanismos de acción que tienen algunas de las enzimas que generan radicales libres, entre la que podemos citar el citocromo oxidasa que precisa de iones hierro o cobre; de igual manera tenemos la enzima ribonucleótido reductasa, (Reichard y Ehrenberg, 1983).

De todo lo mencionado anteriormente podemos concluir que la producción de radicales libres es un proceso que se lleva a cabo de manera natural, continuo y sistemático pudiendo causar daño si el equilibrio entre estos radicales y los antioxidantes se llega a romper, dentro de los principales mecanismos de defensa contra estos radicales se encuentra los antioxidantes, definidos como aquellos compuestos capaces de modificar y suprimir la formación de las especies reactivas del oxígeno generando un balance e impidiendo el daño oxidativo de la célula (Carvajal, 2016).

El sistema antioxidante primario se encuentra constituido por enzimas que catalizan la ruptura de los radicales libres a nivel intracelular en tanto que el sistema secundario está formado por diversas sustancias de carácter no enzimático (Gil, 2014).

Los antioxidantes se clasifican como enzimáticos y no enzimáticos (Martín HD, 2013). Los no enzimáticos funcionan dando un electrón a un radical libre con el fin de estabilizarlo y estos a su vez se ubican en el citosol, matriz mitocondrial y nuclear además en los fluidos extracelulares (Comporti, 1989).

2.7.1 *Glutación*

Es un tripéptido de tipo no proteico, el cual está conformado a partir de tres aminoácidos tales como la cisteína, el ácido glutámico y la glicina. Su característica principal es presentar un enlace peptídico inusual que se encuentra entre el grupo amino de la cisteína y el grupo carboxilo de la cadena lateral del glutamato, que hace que posea un grupo sulfhidrilo (tiol) libre, responsable principal de la actividad biológica que posee (Irvine, 1996).

El glutación está presente en las células de los mamíferos en concentraciones alrededor de 12 Mm, el glutación al actuar como antioxidante posee importantes funciones forma parte primordial de la detoxificación de xenobióticos, de igual manera actúa como un cofactor para las reacciones de isomerización como también en el almacenamiento y transporte de la cisteína (Ballatori N, Krance SM, Notenboom S, Shi S, Tieu K, Hammond CL, 2009).

El glutación está inmerso en varios procesos biológicos de síntesis de proteínas, transporte de aminoácidos y principalmente en el funcionamiento del sistema inmune; pero el rol principal que le ha dado el calificativo del rey de los antioxidantes es el de participar en los mecanismos de defensa celular antioxidante, bloqueando la acción de los agentes oxidantes, electrófilos y radicales libres presentes en el estrés oxidativo que sufren las células (Freeman y Grapo, 1982; Meister y Anderson, 1983).

El glutación también está inmerso en la proliferación celular, posee una relevante importancia en la apoptosis celular, ya que la cantidad de glutación ha demostrado estar directamente relacionado con la activación de caspasas y la progresión de los mecanismos de apoptosis siendo estas mayores cuando los niveles de glutación son bajas (Franco R, Cidlowski JA, 2009).

La capacidad antioxidante que posee el glutación representa un factor muy importante como medio defensivo en sistemas especialmente vulnerables al estrés oxidativo como por ejemplo el sistema nervioso como también el reproductivo, dentro del cual se destaca estructuras como el epitelio espermático, epidídimo y eyaculado en si (Irvine, 1996).

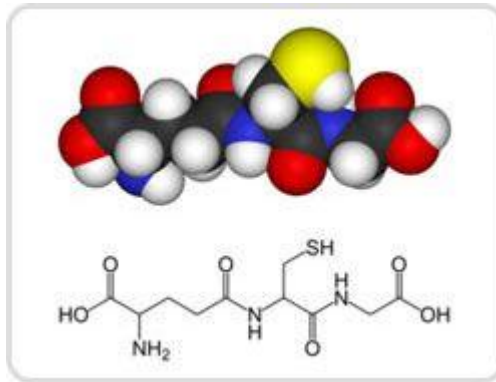


Figura 3-2: Esquema de la molécula de glutatión

Fuente: Irvine, 1996.

2.7.2 *Cafeína*

La cafeína constituye como un compuesto alcaloide, que forma parte de la familia de las metilxantinas, que son derivadas de los inhibidores de fosfodiesterasas (Stephens et al., 2013). A este grupo también pertenecen la teofilina que se encuentra presente en el té, de igual manera la teobromina que está en el chocolate, entre otras, las cuales poseen efectos de carácter estimulante sobre el sistema nervioso autónomo.

La cafeína posee un efecto directo sobre el metabolismo de las células, incluidas las células espermáticas; se cree que tal efecto está dado por la concentración de iones de calcio (Barakat et al., 2015). Dicho compuesto aumenta la glucólisis en la célula espermática influyendo directamente de una manera positiva la motilidad del mismo, esto gracias al incremento en la concentración intracelular de adenosín monofosfato cíclico (AMPc). El aumento de los niveles intracelulares de ATP, promueve una alta motilidad (Stephens et al., 2013).

2.8 Prueba de Estrés Hipo-osmótico (HOST).

Esta prueba se fundamenta en la suspensión de los espermatozoides en un medio hiposmótico que provoca un desequilibrio osmótico entre el medio extracelular y el medio intracelular, proceso que la célula espermática compensa fisiológicamente mediante la difusión de agua al compartimento intracelular, como consecuencia de este fenómeno, el espermatozoide tiende a aumentar su volumen presentando cambios morfológicos principalmente en los flagelos, como dilatación y enrollamiento de los mismos (Hernández & Carrillo-Gonzales, 2015).

Para que este efecto de respuesta se produzca, la membrana plasmática del espermatozoide debe de estar íntegra y con sus mecanismos de intercambio de fluidos funcionales y de manera

correctamente. El ingreso de agua provoca en los espermatozoides un hinchamiento y enrollamiento del flagelo. Las células espermáticas que presenten la membrana tanto física como funcionalmente dañada no experimentarán ningún cambio en la forma del flagelo. Las colas de los espermatozoides cuya membrana plasmática posea una buena capacidad osmorreguladora se hincharán por efecto de la entrada de líquido y adoptarán patrones fácilmente reconocibles al microscopio (Bassas Arnau, 2009).

Contri 2010, indico que en los últimos años la aplicación de nuevas tecnologías más avanzadas como el sistema CASA ha tomado considerable relevancia, convirtiéndose en una herramienta muy importante de evaluación, debido a que existe una gran variabilidad en la estimación subjetiva de los parámetros de calidad del semen.

2.9 Test de Resistencia Osmótica (ORT)

Es otro test muy utilizado en la valoración de la calidad seminal basado en el porcentaje de espermatozoides que presentan una alteración estructural evidente a nivel del acrosoma tras su incubación en un medio hiposmótico (Correa y Zavos, 1994; Gil et al.,2000; Rubio et al.,2006). Se denomina ORT por sus siglas en inglés (Osmotic Resistance Test), o test de resistencia osmótica la cual presenta una correlación positiva con la capacidad fecundante que presenta el espermatozoide (Schillinget al.,1986; Rubio, 2006).

Esta valoración del estado de los acrosomas permite determinar la resistencia osmótica de las membranas de los eyaculados, y de esta manera poder predecir el comportamiento de los espermatozoides referente a su capacidad fecundativa (Schillinget al.,1986; Rubio et al.,2006b), como también su capacidad para soportar la criopreservación (Rubio et al.,2007). Esto nos permite valorar el potencial reproductivo de los sementales en función a la integridad del acrosoma, al someter los espermatozoides a un medio hiposmótico e isosmótico, donde aquellos que se encuentren funcionales no mostrarán alteraciones en el acrosoma (Rubio et al., 2007).

2.10 Matriz de consistencia

Tabla 1-2: Matriz de constancia

Formulación del problema	Objetivo general	Hipótesis general	VARIABLES	Indicadores	Técnicas	Instrumento
<p>Los daños sufridos por los espermatozoides durante el proceso de crioconservación influye sobre los parametros de calidad seminal</p> <p>¿La adición de cafeína y glutatión al diluyente comercial Triladyl® influye en los parámetros de calidad de semen bovino durante la crioconservación?</p>	<p>Evaluar el efecto que presenta la adición de cafeína y glutatión al medio de crioconservación sobre los parámetros de calidad seminal y la tasa de concepción en bovinos lecheros.</p> <p>Objetivos Específicos.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Evaluar la utilización de cafeína y glutatión adicionados al diluyente de crioconsevación, (Triladyl ®), en semen de toros de las razas Holstein Friesian, Jersey, 	<p>La adición de cafeína y glutatión al diluyente (TRILADYL®) influye sobre los parámetros de calidad seminal y tasa de concepción en bovinos lecheros durante la crioconservación.</p>	VARIABLES INDEPENDIENTES			
			Niveles de adición de cafeína y glutatión en el medio de crioconservación	0 mg testigo 1,94 mg cafeína/ml 1,53 mg glutatión/ml	Método descrito por Purdy y Graham	Balanza Caja Petri Espátula
			VARIABLES DEPENDIENTES			
			Volumen	(ml)	La extracción de semen se lo realizará aplicando el método de Vagina artificial, misma que tendrá en uno de los extremos un tubo recolector para determinar el volumen del eyaculado	Vagina artificial Tubos Falcón graduados
Color	Blanco cremoso Blanco lechoso Lechoso	Observación directa	Tubo Falcón			

<p>Brown Swiss y Simental.</p> <ul style="list-style-type: none"> Determinar parámetros de calidad seminal como morfología, vitalidad, funcionalidad de membrana e integridad acrosomal, cuando al diluyente comercial (Triladyl®) se le es añadido cafeína y glutatión. Evaluar el efecto antioxidante de la cafeína y del glutatión sobre la motilidad espermática masal e individual pre y pos congelación. 		Traslucido		
	pH	6,4-6,9	Observación directa	Papel indicador de pH
	Concentración	(spz/ml)	Conteo espermático	Cámara de Neubauer Microscopio
	Motilidad individual progresiva	(%)	Técnica de la gota gruesa	Microscopio Placas porta y cubreobjetos
	Motilidad masal	(1-5 pts.)	Técnica de la gota gruesa	Microscopio Placas porta y cubreobjetos
	Anormalidades	(%)	Conteo celular	Microscopio Porta y cubre objetos solución isotónica de NaCl- al 0,9%
	Vitalidad	(%)	Tinción de Eosina – Nigrosina	Microscopio Porta y cubre objetos Eosina Nigrosina
	Integridad de la membrana	(%)	Test HOST	Medio hipoosmótico Tubo Falcón Microscopio Porta y cubre objetos
	Integridad del acrosoma	(%)	Test ORT	Medio hiposmótico Medio isosmótico Tubo Falcón Microscopio Porta y cubre objetos

Realizado por: Sánchez, Ricardo, 2022.

2.11 Operacionalización de variables

Tabla 2-2: Operacionalización de variables

Variable	Tipo	Definición	Indicador	Técnicas	Instrumento
EVALUACIÓN MACROSCÓPICA					
Volumen	Cuantitativa discreta	Cantidad de semen que se obtiene de un eyaculado.	ml	Colecta manual	Tubo Falcón graduado
Color	Cualitativa nominal	Tonalidad y aspecto del semen relacionada con la concentración espermática que posee	Blanco cremoso Blanco lechoso Lechoso Translucido	Observación directa	Tubo Falcón graduado
pH	Cuantitativa continua	Medida del grado de acidez o alcalinidad, en consecuencia es un indicador de la actividad metabólica de los espermatozoides	6,4 – 6,9	Tomar una muestra de semen en un tubo Eppendorf e introducir el papel indicador y comparar con la escala.	Tubo Eppendorf Papel indicador de pH
EVALUACIÓN MICROSCÓPICA					
Concentración	Cuantitativa discreta	Numero de espermatozoides por unidad de volumen de eyaculado (ml)	Espermatozoides/ml	Conteo en la Cámara de Neubauer, obtenido en millones de espermatozoides por ml	Cámara de Neubauer Microscopio
Motilidad progresiva individual	Cuantitativa continua	Capacidad motil que poseen los espermatozoides.	%	Visualización directa subjetiva	Microscopio Porta y cubreobjetos
Motilidad masal	Cuantitativa discreta	Movimiento de los espermatozoides de manera grupal en semen fresco.	Escala de 1-5	Colocar una muestra de semen en un porta objeto temperado a 37 °C y observar al microscopio con un aumento de 10X	Microscopio Portaobjetos
Vitalidad espermática	Cuantitativa continua	Relación entre la cantidad de espermatozoides vivos y	%	$\frac{\text{Número de espz muertos}}{\text{Número de espz vivos}} \times 100$	Microscopio con un aumento de 400x

		muertos en una muestra de semen			
Anormalidades	Cuantitativa continua	Alteración en la estructura espermática del flagelo o la cola.	%	$\frac{\text{Número de espz anormales}}{\text{Número de espz normales}} \times 100$	Microscopio Porta y cubreobjetos
Integridad de la membrana	Cuantitativa continua	Evalúa el estado funcional de la membrana plasmática del espermatozoide	%	Test HOST (solución hipoosmótica de fructosa y citrato de sodio) $\frac{A}{A+B} \times 100$	Microscopio con un aumento de 400x
Integridad del acrosoma	Cuantitativa continua	Evalúa el estado estructural funcional del acrosoma espermático	%	Test ORT (medio hiposmótico de citrato de sodio, 2,7g/100 ml, a 150 mOsm/l y un medio isosmóticas de suero fisiológico a 300 mOsm/l)	Microscopio con el lente de inmersión Aceite de inmersión

Realizado por: Sánchez, Ricardo, 2022.

CAPÍTULO III

3 METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN

3.1 Identificación de las variables

3.1.1 Variables Independientes

Niveles de adición de cafeína y glutatión al medio de crioconservación (T0 = 0 mg cafeína, 0mg glutatión; T1= 1,94 mg cafeína/ml y T2= 1,53 mg glutatión/ml).

3.1.2 Variables dependientes

3.1.2.1 Evaluación en semen fresco

- Volumen (ml)
- Color
- Ph (puntos)
- Concentración (espz/ml)

3.1.2.2 Evaluación en semen pre congelado

- Motilidad masal (%)
- Motilidad Individual (%)
- Vitalidad (%)
- Morfología (%)
- Integridad de la membrana (%)
- Integridad acrosomal (%)

3.1.2.3 Evaluación post descongelación

- Motilidad Individual (%)
- Vitalidad (%)
- Morfología (%)
- Integridad de la membrana (%)
- Integridad acrosomal (%)

3.1.2.4 Evaluación de campo

- Tasa de concepción

3.2 Operacionalización de las variables

3.2.1 Evaluación de semen fresco

3.2.1.1 Volumen (ml)

El volumen completo de un toro semental varía entre 3 y 6 cc, esto puede variar dependiendo de las condiciones individuales y ambientales (Hafez, 2000).

Se evaluó mediante la utilización de un tubo Falcón graduado en el cual se observó directamente el volumen del eyaculado expresado en mililitros (ml) (Agüero, 2012).

3.2.1.2 Color y aspecto

Dicha característica se evalúa mediante la visualización, siendo lo normal desde blanquecino marfil hasta un tono amarillento, las coloraciones atípicas como puede ser una coloración rojiza, es un indicativo de presencia de sangre; si el color es pardo, indica la presencia de sangre hemolizada, en ambos casos considerados como hemospermia. Factores que hay que tomar en cuenta cuando se realice la evaluación de este parámetro (Agüero, 2012).

El color se determinó por medio de visualización directa del eyaculado con la ayuda de un tubo Falcon graduado el cual estuvo relacionado a su calidad (blanco cremoso a blanco lechoso), en cuanto al aspecto se avaluó por el grado de opacidad que presentaba el eyaculado que iba de muy denso cremoso a denso acuoso (Valenzuela, 2009).

Tabla 1-3: Color y densidad del eyaculado fresco en bovinos

Aspecto	Concentración aparente	Color
Muy denso	Más de 1300.000/mm ³	Blanco Cremoso
Denso	800,000 y 1300,000/mm ³	Blanco Lechoso
Semi-denso	500,000 y 800,000/mm ³	Lechoso
Ralo	200,000 y 500,000/mm ³	Traslúcido
Oligozoospermico	Inferior a 200,000/mm ³	Trasparente

Fuente: Valenzuela (2009).

3.2.1.3 pH (pts)

Se evaluó inmediatamente después de la colecta seminal. El rango del mismo se encuentra entre 6,4 – 6,9. Se debe considerar que el metabolismo espermático se acidifica por la presencia de sustancias contaminantes tales como la orina y procesos inflamatorios que pueden dar valores que difieren al normal (Gonzales et al., 2013).

Se utilizó un papel indicador de ph (Macherey Nagel ®), donde se sumergió el mismo en una alícuota de semen fresco para su posterior lectura en base a la escala de matices.

3.2.1.4 Concentración (espz/ml)

Nos permite evaluar la capacidad de producción de espermatozoides del semental y a la vez calcular el número de pajillas que se puede producir por eyaculado. Existe una estrecha relación entre la concentración y el porcentaje de fertilidad que presenta el toro a la vez hay variaciones en la misma dependiendo tanto del individuo, estación del año, frecuencia de colecta y técnica que se utilice (Olegario, C. Tamargo, C. y Diez, C. 2012).

Para su determinación se utilizó una pipeta de Thomas con la cual se procedió a tomar una muestra de 0,5 µl de semen puro para posteriormente aforar a una relación 1/20 con solución salina formolada y se procedió a homogenizar. Posteriormente se procedió a cargar la Cámara de Neubauer por capilaridad, en ambos retículos, teniendo en cuenta de cargar otros 14 µl para el segundo retículo volviendo a homogeneizar entre una carga y otra, se esperó entre 4 y 5 minutos hasta que la muestra se sedimente.

Se Llevó la cámara de Neubauer al microscopio de luz con un objetivo de 40X, se ubicó cinco cuadrados para realizar el conteo, se contó todos aquellos espermatozoides que se encuentren completamente dentro del cuadrado. Terminado de hacer el conteo, se realizó los cálculos respectivos con la siguiente formula:

$$Esp = \frac{\text{número de células}}{\text{número de cuadros}} \times 200000$$

3.2.2 Evaluación de semen pre congelación

3.2.2.1 Motilidad masal espermática (pts)

Se evaluó el movimiento en masa que se entiende como el movimiento en onda que presentan todos los espermatozoides, se tomó una gota del semen puro (10 μ l) mediante una pipeta la cual se colocó sobre un portaobjeto temperado a 37°C y se observó en campo claro con un aumento 10X, no se debe colocar el cubre objeto, se valoró subjetivamente mediante una escala de 1 a 5, donde 1 representa la ausencia de movimiento y 5 es el máximo movimiento observado que es cuando se visualizó ondas muy marcadas oscuras y con movimiento rápido como se indica en el gráfico (Agüero, 2012).



Figura 1-3: Motilidad masal

Fuente: Rutter & Russo, 2006.

3.2.2.2 Motilidad individual (%)

Posteriormente realizado la dilución del semen, mediante el uso de una micro pipeta se procedió a tomar una muestra de 10 μ l del mismo para ser colocado sobre una lámina portaobjetos previamente temperada a 37°C, donde se evaluó de manera subjetiva considerando el movimiento progresivo rectilíneo, movimiento circular en el mismo lugar y los espermatozoides que no presentaban movimiento.

3.2.2.3 Morfología espermática (%)

Con la ayuda de una micro pipeta se colocó 10 μ l de semen sobre una porta objetos y se realizó frotices de espermatozoides teñidos con eosina-nigrosina, se dejó en reposo 5 minutos y se observó en el microscopio usando un objetivo de 400x, se observaron 100 células espermáticas en dos campos.

3.2.3 Evaluación post congelación

3.2.3.1 Motilidad progresiva (%)

Se evaluó en base a la proporción de espermatozoides progresivamente móviles, y se expresó en porcentaje, para lo cual se colocó una alícuota de semen sobre una lámina portaobjetos precalentada a 37°C y se cubrió con una laminilla cubre objetos igual posteriormente precalentada y se observó al microscopio con un objetivo de 40x, ahí se determinó los espermatozoides con movimiento rectilíneo progresivo sobre el total de los espermatozoides observados en la placa, y se comparó con la siguiente escala de 0 a 100% como se observa en el cuadro 2 (Angelino, 2009).

Tabla 2-3: Valoración de la motilidad individual progresiva

Calidad	Movimiento	Porcentaje
Muy Bueno	Progresivo	80-100
Bueno	Progresivo	60-79
Suficiente	Progresivo	40-59
Pobre	Progresivo	Menor de 40

Fuente: Angelino (2009).

3.2.3.2 Vitalidad espermática (%)

El test de vitalidad espermática no ayuda a calcular el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos que presente la muestra de semen. Se debe considerar que, aunque la movilidad nos indica vitalidad, no todos los espermatozoides inmóviles necesariamente están muertos (Rodrigo, 2016).

Para este proceso se colocó 10 µl de semen en un portaobjetos mismo que estaba a una temperatura de 37°C sobre una termoplatina, luego se añadió a la muestra de semen 30 µl de solución eosina-nigrosina, se homogenizó con la ayuda de una micro pipeta. Se dejó que la tinción se fije por un tiempo de 30 segundos temperatura ambiente, se realizó un frotis y se dejó secar por aproximadamente 3 minutos.

Se realizó la lectura en un microscopio con el lente de inmersión ayudados del aceite de inmersión para una mejor precisión, se contó 100 espermatozoides en dos campos para después obtener un estimado en porcentaje de vitalidad. Los espermatozoides cuyas cabezas fueron teñidas se determinaron muertas dado que su membrana no se encuentra intacta, en tanto que los espermatozoides que no fueron teñidos o presentan una coloración rosada clara fueron

considerados como vivos debido a que su membrana se encontraba ilesa. La determinación se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Vitalidad espermatocítica}(\%) = \frac{N^{\circ} \text{ espermatozoides muertos}}{N^{\circ} \text{ espermatozoides vivos}} \times 100$$

3.2.3.3 Anormalidades (%)

Es muy importante evaluar este parámetro, ya que se requiere un número mínimo de células espermáticas normales para que la fecundación se lleve a cabo de mejor manera, estos valores mínimos se encuentran en un rango de 80 al 75 % de espermatozoides normales (De Alba Romero, 2014).

Utilizando la misma muestra con la que se realizó la vitalidad espermática también se procedió a evaluar aquellos espermatozoides que presentaron cambios en su estructura morfológica, enfocándose principalmente en la cabeza, zona intermedia y el flagelo, en función a esto se diferenciaron las anomalías primarias secundarias y terciarias, se debe mencionar que el porcentaje de anomalías no debe exceder el 20% para que este sea considerado de buena calidad (De Alba Romero, 2014).

- Anomalías Primarias

Se originan en el testículo, que se producen durante la espermatogénesis, de origen genético, son anomalías de la cabeza, zona intermedia o inserción de la cola (Gonzales et al., 2013).

- Anomalías Secundarias

Se desarrollan a nivel del epidídimo durante el proceso de maduración espermática, se presentan gotas citoplasmáticas, afectando principalmente a la cola del espermatozoide (Gonzales et al., 2013).

- Anomalías Terciarias

Se originan por la incorrecta manipulación del semen tras su colecta (Gonzales et al., 2013).



Figura 2-3: Anormalidades de los espermatozoides

Fuente: Salgado, 2006.

La determinación del porcentaje de anormalidades se realizó mediante la siguiente relación:

$$(\%) \text{ Anormalidades} = \frac{\text{Espermatozoides anormales}}{\text{Espermatozoides normales}} \times 100$$

3.2.3.4 Integridad de la membrana (%)

La valoración y análisis de la integridad de la membrana constituye una valiosa información en la evaluación de la fertilidad del semental, ya que esta integridad no sólo juega un papel importante para el metabolismo espermático, sino que también para una adecuada capacitación y reacción acrosómica y por ende la fertilidad que posea el macho (Hidalgo et al., 2005).

La determinación de la integridad de la membrana espermática se utilizó la prueba de endósmosis (HOST) donde los espermatozoides fueron sometidos a una solución hipoosmótica de fructosa y citrato de sodio (100 mOsm/l), (Correa y Zavos 1994). Donde se tomó 10 µl de esta solución y se adiciono 20 µl de semen, se procedió a incubar durante 20 minutos en baño María a 37°C, fijada la muestra se la colocó en una lámina porta objetos realizando un frotis llevando la muestra al microscopio, donde se contó 100 células espermáticas en dos campos a 400X y se determinó su porcentaje donde aquellos que presentaban su membrana citoplasmática intacta mostraban una deformación a nivel de la cola por efecto de la hinchazón.

Su determinación se realizó mediante esta fórmula:

$$\text{Int. Membrana} = \frac{\text{Espz. Endósmosis positiva}}{\text{espz. Endósmosis positiva} + \text{espz, endosmosis negativa}} \times 100$$

3.2.3.5 Integridad del acrosoma (%)

El acrosoma es una estructura que posee un rol fundamental en la fecundación, el mismo está formado por tres regiones claramente diferenciadas entre sí, la zona acrosomal, la post acrosomal y el segmento ecuatorial ubicada en el medio de las anteriores descritas, las cuales tienden a fraccionarse durante los procesos de crioconservación, dichas alteraciones se reflejan en una baja fertilidad (Peña A, Linde-Forsberg C. 2000).

La actividad que presenta el acrosoma es un requisito absoluto para que se dé la fertilización ya que sólo aquellos espermatozoides que pueden realizar la reacción acrosomal de una manera correcta y sincronizada con la fase de penetración del oocito, poseerán la habilidad de pasar a través de la zona pelúcida y así poder fusionarse con el ovulo y darse la fecundación (Januskauskas et al., 2000).

Fraser (1994), manifiesta que sólo aquellos espermatozoides que presenten un acrosoma intacto podrán atravesar la zona pelúcida (Florman y Storey, 1982).

Los procesos de crioconservación donde los espermatozoides son sometidos a procesos de congelación y descongelación pueden afectar directamente estas estructuras provocando daños en las mismas, como alteración en el flujo de calcio y principalmente cambios en la actividad enzimática que conlleva a que se dé una capacitación espermática anticipada, afectando negativamente la fertilidad (Tartaglione y Ritta, 2004).

Para evaluar la funcionalidad acrosomal, se aplicó la prueba denominada ORT (Osmotic Resistance Test) que consiste en someter a las células espermáticas a dos medios, uno hiposmótico (150 mOsm/L) y otro en condiciones isosmóticas a 300 mOsm/l, para lo cual se tomó dos alícuotas de 20 µl de semen. Una de las alícuotas se adicionara en el medio hiposmótico de citrato de sodio (2,7g/100 ml) a 150 mOsm/l, mientras que la otra muestra se adicionara en 20 µl de suero fisiológico como medio isosmótico a 300 mOsm/l. se procedió a incubar ambas muestras a baño María a 37 °C durante 30 minutos, después se centrifugo a 3000 rpm durante 2,5 minutos, de la cual se obtuvo un sedimento (espermatozoides) y un sobrenadante el cual se desechó en un 80%, luego se extrajo 10 µl de solución y mezclar con 30 µl de eosina-nigrosina, y se realizó un frotis. Se evaluó con el microscopio óptico con el objetivo de inmersión a100X, se contó 200 espermatozoides y se observó el número de reacciones acrosómicas de ambos medios. Se sumó el total de reacciones acrosómicas del medio hiposmótico y del medio isosmótico y se dividió para dos y se expresó el resultado en porcentaje.





	Espermatozoide vivo con acrosoma intacto "VAI"	Espermatozoide vivo con acrosoma reaccionado "VAD"	Espermatozoide muerto con acrosoma intacto "MAI"	Espermatozoide muerto con reacción del acrosoma "MAD"
Acrosoma	Color azul-violeta	Translucido	Color azul-violeta	Translucido
Región post acrosomal	Translucido, ligeramente coloreado	Translucido, ligeramente coloreado	Azul oscuro - azul violeta	Azul oscuro - azul violeta
Imagen				
Tipo	I	II	III	IV

Figura 3-3: Determinación de la integridad del acrosoma

Fuente: Tartaglione y Ritta, 2004.

3.3 Metodología

3.3.1 Ubicación

El estudio investigativo se realizó en la empresa Produbiogensa Ltda. perteneciente al Cantón Mejía, Provincia Pichincha. El clima es fresco y agradable, la temperatura oscila entre los 13 y los 22 °C y se encuentra ubicada en la cordillera de Los Andes a 05° 12' 286'' de latitud sur y 78° 56' 6028'' de longitud oeste, a una altitud de 2805 msnm (Figura 8).

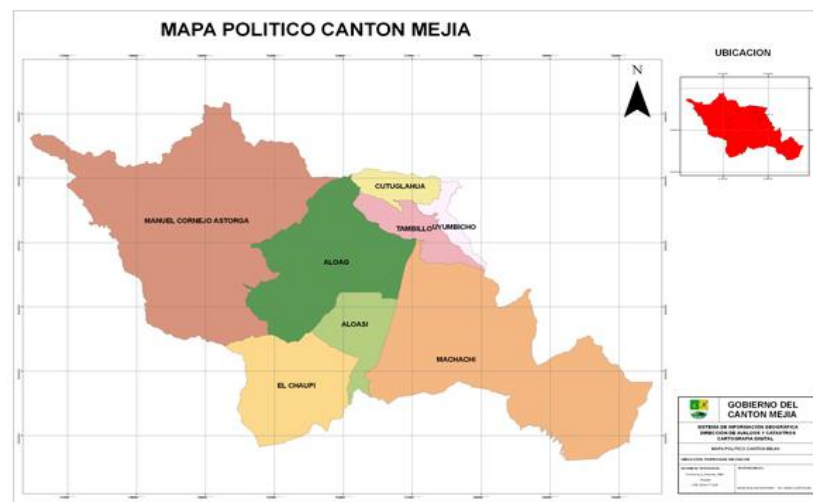


Figura 4-3: Ubicación geográfica del cantón Mejía

Fuente: Municipalidad de Mejía 2018.

3.3.2 Armado de vagina artificial

Se realizó la limpieza del tubo cilíndrico plástico con papel toalla, se procedió a colocar la camisa de goma rugosa, se colocó el cono colector introduciendo al tubo rígido en el lado contrario donde estaba ubicada la válvula de llenado, se llenó la vagina artificial retirando la tapa de la válvula, para posteriormente proceder a verter por el orificio de la válvula, el agua estaba a una temperatura de 40 grados, una vez llena en su capacidad, se colocó y se ajustó la tapa de la válvula. Se ajustó la presión de la vagina realizando insuflación de aire, la temperatura del interior de la vagina permanecía entre un rango de 40 a 45 grados, se cubrió con papel aluminio la boca de la vagina para evitar el ingreso de impurezas.

3.3.3 Preparación y estimulación del semental.

Se procedió a sujetar al semental, se lavó la parte ventral abdominal con la utilización de jabón neutro y abundante agua y se secó con papel toalla, se cortó el exceso de vello del orificio del

prepucio, se lavó de igual manera el orificio prepucial con jabón neutro y abundante agua y se secó con papel toalla. Posteriormente se procedió a lavar con 60ml de solución de cloruro de sodio la parte interna prepucio utilizando un catéter de lavado, se secó con papel toalla.

Para la estimulación del semental primero se aseguró la cabeza del animal señuelo en un brete de seguridad, una persona encargada sujeto al semental dándole libertad visual, se realizó una caminata corta del semental en forma circular detrás del animal señuelo, esto se repitió hasta lograr el estímulo del semental y posteriormente se realizó la monta.

3.3.4 Extracción y transporte de eyaculados

El operador diestro se colocó del lado derecho del toro, al momento del intento de monta se desvió el pene tomando el prepucio con la mano izquierda hacia el lado derecho impidiendo todo contacto con la monta, con la mano derecha, se sostuvo la vagina artificial y se colocó el extremo lubricado por delante del pene, y como respuesta al estímulo, el semental penetra la vagina en toda su extensión. Después de la eyacuación inmediatamente se procedió a retirar el tubo colector, se midió tanto el volumen, color y Ph. Se protegió el tubo colector de los rayos solares y mantuvo a una temperatura de 36 a 37 grados centígrados, se colocó el tubo colector a la caja de tergopol donde se regula su temperatura y así evitar el shock térmico, se etiquetó el tubo colector.

Una vez evaluada la concentración del eyaculado se realizó una pre dilución 1:1 (semen: solución de trabajo) a una concentración final de 120 millones de espermatozoides. Posteriormente el eyaculado fue dividido en tres alícuotas numeradas al azar según el tratamiento a realizar. T0 no tiene la adición de CLC por cada 120 millones de spz/ml, el T1 tuvo la adición de 1,5 mg de CLC por cada 120 millones de spz/ml, y al T2 se le adicionó 3,0 mg de CLC por cada 120 millones de spz/ml, cada alícuota fue incubada por 15 minutos en baño maría a 37°C (Mesa & Henao, 2012 p2910).

El total del diluyente fue agregado pasado los 15 min con el fin de estabilizar las muestras por un lapso de 10 min en temperatura ambiente, luego se inició el proceso de empajillado. (Viñán, 2017 p1).

3.3.5 Preparación del diluyente y adición de cafeína y glutatión

Triladyl® constituye como uno de los principales diluyentes de semen, es un concentrado estéril en cuya preparación se utiliza yema de huevo, utilizado para la congelación de semen bovino en un solo paso. Triladyl® puede usarse también para la congelación de semen de otras especies tales como ovino, caprino, ciervo, etc” (Minitube, 2012).

Este diluyente está compuesto de “TRIS (hidroximetil aminometano), ácido cítrico, azúcar, tampones, glicerina, antibióticos tales como tilosina 5,7 mg, gentamicina 28,6 mg, espectinomicina 34,3 mg,y lincomicina 17,2 mg) y agua de extrema pureza (Minitube, 2012).

Para la preparación del diluyente se mezcló 150 ml de Triladyl en 450 ml de agua bidestilada y se refrigeró a 5 °C, posteriormente se procedió a romper los huevos y separar totalmente la clara pasando repetidamente la yema de un cascaron a otro, se tuvo cuidado de no romper la membrana, para después hacer rodar la yema sobre papel para eliminar el exceso de clara, con la ayuda de una aguja hipodérmica se rompió la yema y todo su contenido se vertió sobre un matraz de 500 ml provisto de papel filtro de manera que el líquido de la yema pueda gotear. Se mezcló 150 ml de esta solución con la anterior solución madre con la ayuda de una probeta graduada. Se homogenizo el contenido con una varilla de vidrio evitando en lo posible la formación de espuma (Minitube, 2012).

De esta solución se tomó una muestra de 300 ml, la cual fue dividida en tres fracciones, la una fracción fue adicionada con 1,94 mg de cafeína por ml de solución madre, la segunda fracción se le añadió 1,53 mg de glutatión y la tercera fracción como testigo de la investigación.

3.3.6 Cálculo de número de dosis de semen

El cálculo se realizar de acuerdo a los lineamientos ya establecidos en la formula.

Número de espermatozoides/ml X Volumen del eyaculado	=	Concentración del eyaculado
Concentración del eyaculado X % de espermatozoides con motilidad	=	Espermatozoides viables
$\frac{\text{Espermatozoides viables}}{\text{Concentración de espermatozoides en la pajilla}}$	=	Número de pajillas
Número de pajillas X 0,5 ml o 0,25 (volumen de la pajilla)	=	Volumen final (yaculado+diluyente)

Figura 5-3: Cálculo del número de pajillas

Fuente: Rutter & Russo, 2006.

3.3.7 *Envasado y sellado del semen*

Para realizar este procedimiento se utilizó la maquina SFS, semi automática de envasado y sellado de pajuelas de 0,5 ml de la marca minutube, que incluye un cabezal de llenado y uno de aspiración para seis pajuelas, las cuales se colocaron sobre chasis para pajuelas, las pajuelas se llenaron de seis en seis, para posteriormente efectuar el sellado con esferas de cristal, en cada pajuela se produjo una burbuja de aire de 1 cm.

3.3.8 *Proceso de crio conservación*

El proceso crio preservación inicia con la distribución homogénea de las pajillas de semen en los racks de congelación y luego se cubren con papel aluminio para dar inicio a la fase de refrigeración.

3.3.8.1 *Fase de refrigeración*

Los soportes con las pajillas se introdujeron en la maquina estabilizadora de temperatura por un tiempo de cuatro horas y a una temperatura constante de 6 grados centígrados.

Concluido las cuatro horas se retiraron los racks de la maquina estabilizadora y finalizaba la fase de refrigeración y comenzaba la fase de congelación.

3.3.8.2 Fase de congelación

La fase de congelación en nitrógeno líquido se realizó en dos partes, en la primera parte se expuso los racks con las pajillas al vapor del nitrógeno por un tiempo de 20 minutos a una altura de 5 centímetros del nivel de nitrógeno, para este proceso se utilizó una caja térmica Platex.

La segunda parte se procedió a sumergir las pajillas de semen en el nitrógeno líquido, para después realizar su almacenamiento en los termos.

3.3.9 Proceso de descongelamiento

El descongelamiento se realizó colocando la pajilla de 0,5 ml a baño María a 37 grados centígrados por 30 segundos, la inmersión de la pajilla en el agua se realizó de forma completa e inmediata y no sobrepasó el tiempo establecido.

3.4 Tipo y diseño de investigación

Para la presente investigación se planteó el estudio de dos tratamientos, donde la adición de cafeína y glutatión al medio de crioconservación constituyeron el tratamiento 1 y tratamiento 2 respetivamente (T1=1,94 mg/ml y T2= 1,53 mg/ml), junto al tratamiento testigo (T0) el cual no incluye ningún tipo de aditivo a su composición, con cuatro repeticiones y un tamaño de la unidad experimental de 4 pajillas por raza y tratamiento, distribuyéndose bajo un Diseño Completamente al Azar de dos factores el mismo que se basa en el siguiente modelo lineal aditivo:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$$

Dónde:

Y_{ij} = Valor de la variable dependiente

μ = Media general

α_i =Efecto del nivel de inclusión de cafeína y glutatión

β_j =Efecto de la raza

ε_{ij} =Efecto del error Experimental

3.4.1 Esquema del Experimento

Tabla 3-3: Esquema del experimento

TRATAMIENTO	CÓDIGO	REPETICIONES	TUE	TUE*REP
0 mg	T0	4	10	40
1,94 mg cafeína	T1	4	10	40
3,0 mg glutatión	T2	4	10	40
TOTAL				120

T.U. E= Tamaño de la Unidad Experimental

3.4.2 Esquema del análisis de la varianza (ADEVA)

Tabla 4-3: Esquema de ADEVA

Fuente de variación	gl
Tratamiento	2
Raza	3
Error	36
Total	47

Realizado por: Sánchez, Ricardo, 2022.

3.4.3 Análisis estadístico y pruebas de significancia

Para la presente investigación se utilizó un Diseño completamente al Azar con dos factores con interacción, donde los datos fueron sometidos a los siguientes análisis estadísticos:

- Estadística descriptiva para variables cualitativas, Excel (2008).
- ADEVA (Análisis de Varianza), Infostat V 2018, Spss V 18 (2010)
- Separación de medidas por el método del rango múltiple de Waller Duncan a un nivel de significancia $p < 0,05$.

3.5 Métodos de investigación

La investigación es EXPERIMENTAL, ya que se aplicó el método HIPOTETICO-DEDUCTIVO para la realización de la misma, ya que a través de la hipótesis planteada se demostró que la adición de cafeína y glutatión al medio de crioconservación con respecto al tratamiento testigo, si influye sobre los parámetros de calidad que presenta el semen.

3.6 Enfoque de la investigación

El enfoque de la investigación es cualitativo a partir de consultas de literatura científica actualizada relacionadas con la adición de cafeína y glutatión a medios de congelación y es cuantitativa ya que se aplicó la estadística como herramienta que permitió la toma de decisiones con un fundamento matemático-científico.

3.6.1 *El enfoque cuantitativo*

El enfoque de la investigación se basó en un estudio cuantitativo ya que se efectuó mediciones de las variables, para posteriormente establecer su tipo y fuerza de correlación, además de inferir los resultados de la muestra a la población de estudio.

3.6.2 *El enfoque cualitativo*

Se enfocó en la interpretación y al crear puntos de vista a partir de la consulta de literatura científica actualizada existente relacionado al tema de investigación indexada en bases de datos de alto impacto científico.

3.7 Alcance de la investigación

La presente investigación está encaminada a centros de colecta, procesamiento y crioconservación de semen bovino, a laboratorios de reproducción animal, bancos de conservación de germoplasma y universidades.

3.8 Población de estudio

El estudio se realizó en el laboratorio del centro de colecta y procesamiento de semen bovino de la empresa Produbiogensa Ltda. donde se utilizó el eyaculado de 4 toros de diferentes razas (Holstein, Jersey, Brown Swiss y Simmental), considerando los siguientes criterios de inclusión:

- Coloración blanca y consistencia cremosa.
- Olor característico sui géneris (leche fresca).
- Sin presencia de partículas extrañas.

Los eyaculados que no fueron considerados en la investigación presentaron los siguientes criterios de exclusión:

- Consistencia translúcida
- Olores atípicos (orina)
- Presencia de cuerpos extraños (coágulos, sangre, pus)

3.9 Unidad de análisis

El número de unidades experimentales fue de 120 pajillas divididas en 3 tratamientos y 4 repeticiones considerando como repeticiones a la frecuencia de extracción de semen, con un tamaño de unidad experimental de 10 pajuelas.

3.10 Técnica de recolección de datos

Los datos fueron recolectados una vez realizada la evaluación post descongelación, mismos que fueron tomados cada semana, donde se evaluó 10 pajuelas por cada unidad experimental, considerando los parámetros de viabilidad, motilidad individual progresiva, vitalidad espermática, integridad de la membrana espermática, anormalidades e integridad del acrosoma, obteniendo el análisis de varianza, e interacciones.

3.11 Instrumentos de recolección de datos

Para la recolección de datos tanto de las características macroscópicas como microscopias se utilizó registros de colecta y congelación de semen donde consta el nombre del toro, número de registro, fecha y hora de colecta, volumen de eyaculado, color, olor, pH, concentración espermática, motilidad masal e individual, vitalidad, anormalidades e integridad acrosómica y de membrana.

3.11.1 Instrumentos primarios

Vagina artificial, tubos Falcón, tubos Eppendorf, tiras indicadoras de pH, cámara de Neubauer, microscopio, placas cubre y porta objetos, pajillas de 0,5 ml, caja térmica, termo de criopreservación.

3.11.2 Instrumentos secundarios

Mandil, mascarilla, zapatones desechables, cofia desechable, libreta de apuntes, esferográfico.

3.12 Instrumentos para procesar datos recolectados

Una vez recolectados los datos fueron procesados en el software estadístico Infostat y Excel.

Tabla 5-3: Cronograma de actividades

ACTIVIDADES	TIEMPO DE LA INVESTIGACIÓN											
	NOVIEMBRE			DICIEMBRE			ENERO					
	Semanas											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Preparación de sementales de la investigación	X											
Elaboración del diluyente	X											
Inclusión de cafeína y glutatión al medio de crio conservación	X											
Extracción y evaluación macro y microscópica del semen		X	X	X	X	X						
Procesamiento y embasamiento del semen		X	X	X	X	X						
Evaluación de pajillas pre y pos congelación		X	X	X	X	X						
Tabulación de datos								X	X	X		
Elaboración del documento final											X	X

Realizado por: Sánchez, Ricardo, 2022.

CAPÍTULO IV

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Evaluación en semen fresco

4.1.1 Volumen (ml)

La raza que mayor volumen obtuvo, fue la raza Holstein para todas las repeticiones con un promedio de 8,1 ml, valor ligeramente inferior con el dato obtenido por Rubio, Quintero y (González, 2009 p382) para esta raza de $8,35 \pm 0,60$ ml. Seguidamente la raza Jersey obtuvo como promedio 7,2 ml de eyaculado, valor inferior al reportado por (Lemma & Shemsu, 2015 p38) con un promedio de 7,73 ml para toros Jersey, pero superior a datos obtenidos por (Aguilar, 2016 p64) quien al evaluar el potencial reproductivo de sementales Jersey registro una media de 5,25 ml. El toro de la raza Brown Swiss obtuvo un promedio de 4,8 ml, siendo este el menor valor de todos, pero a su vez superior al reportado por (Gastelum et al. 1989) con volúmenes de eyaculado de 4.0 ml, el toro de la raza Simmental presento un promedio de 5,3 ml de volumen de eyaculado.

El volumen del eyaculado de los bovinos puede estar sujeto a variación debido que está influenciado a diversos factores como la edad, condición del animal, el medio ambiente, destreza del operario durante la colecta como también la frecuencia de colecta, la cual al ser mayor influirá en obtener menor volumen de semen durante un eyaculado (Lemma & Shemsu, 2015 p38).

El valor normal promedio para eyaculados de toros jóvenes (2años) es de 2ml aproximadamente, mientras que para sementales adultos debe ser superior a 4 ml hasta 12 ml (Rutter & Russo, 2006 p76).

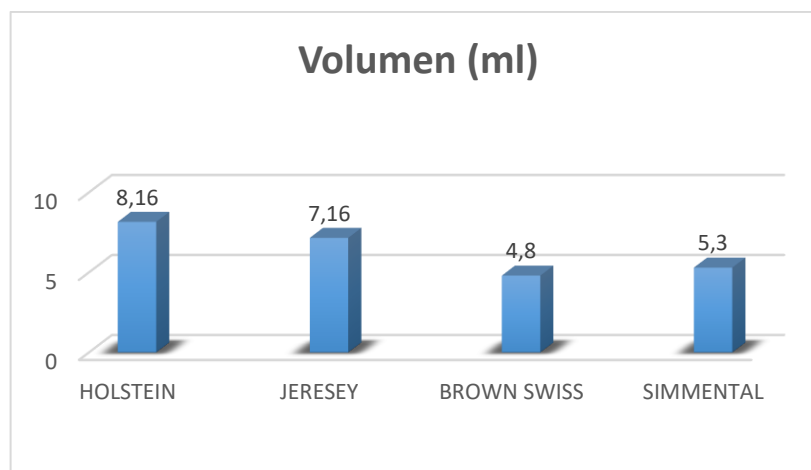


Gráfico 1-4: Volumen de eyaculado de las cuatro razas en estudio

Realizado por: Sánchez, Ricardo, 2022.

4.1.2 Color

El semen extraído del toro Holstein presentó un color blanco cremoso en todas las extracciones realizadas para esta investigación, indicativo de buena calidad y buena concentración espermática (Valenzuela, 2009), el semen de la raza Jersey a más de este color presentó un tono blanco lechoso en el 70 % de las extracciones realizadas, mientras que tanto la raza Brown Swiss y Simmental presentaron tonalidades lechosas en el 50 % de las extracciones realizadas.

El color que presenta el semen bovino puede variar de tonalidades que es un aspecto normal dentro de la especie, puede ir desde un tono blanco, blanco amarillento a marfil o inclusive hasta algo grisáceo (Rutter & Russo, 2006 p77). Se debe considerar que el color que presente el semen durante la realización de la colecta está directamente relacionado con la densidad y la concentración que presente el mismo (Aguilar, G 2016).

4.1.3 pH

Al determinar el pH del semen durante el proceso de colecta, los sementales de las razas Holstein, Brown Swiss y Jersey presentaron un valor promedio de 6,8 mientras que la raza Simmental presentó un valor ligeramente inferior de 6,7. Encontrándose todos dentro de los rangos normales, el cual varía de 6,4 a 6,9; (Gonzales et al., 2013).

Si el valor del pH es anormalmente superior, es decir mayores a 7, es un indicativo de la existencia de un cuadro infeccioso a nivel de vesículas seminales (Aguilar, G 2016 pp 19), en esta investigación no se reportaron dichos valores.



Gráfico 2-4: Valor de pH en semen fresco de las cuatro razas en estudio

Realizado por: Sánchez, Ricardo, 2022.

4.1.4 Concentración (esp/ml)

Similar a los parámetros evaluados anteriormente, el toro de la raza Holstein obtuvo la media con los mayores valores en cuanto a concentración espermática con un valor de 966×10^6 espz/ml, valores superiores a los reportados por (Moncayo, 2016), donde menciona que la raza Holstein presentó una concentración espermática con un promedio de $699,3 \times 10^6$ espz/ml, en la misma investigación reporta que la raza Brown Swiss mostró menor concentración entre las razas en estudio con un promedio de $391,7 \times 10^6$ espz/ml, dato que concuerda con el valor obtenido en esta investigación donde presento una concentración de $390,1 \times 10^6$ espz/ml, dichos valores son inferiores al estudio realizado por (Medina, Sánchez, Velasco, & Cruz, 2007), en el cual se obtuvieron una concentración espermática promedio de $434,5 \pm 41,6 \times 10^6$ espz/ml para esta raza.

En la investigación realizada por (Kumar U., y otros, 2015) en la cual se evaluó la calidad de semen en toros puros y mestizos de raza Jersey, obtuvo como resultado una concentración espermática media de $1171,01 \times 10^6 \pm 56,09$ y $1093,488 \times 10^6 \pm 48,25$ espz / ml, valores superiores a los reportados en esta investigación donde se obtuvo una media de $644,6 \times 10^6$ espz/ml, el promedio obtenido por la raza Simmental fue de $488,6 \times 10^6$ espermatozoides/ml, valor inferior al reportado por (Vélez, Rugeles & Vergara, 2014) donde se determinó un valor de $715,00 \pm 413,37$ ml. La variabilidad de este parámetro está muy influenciada por la contextura anatómica del semental principalmente en su circunferencia escrotal, eso nos indica que toros que presenten un buen desarrollo del parénquima testicular, producirán eyaculados que posean mayor concentración espermática (Valle et al, 2005).

Según (Porrás, 2009), manifiesta que un eyaculado para ser considerado como bueno debe contener una concentración entre 750 y 1000×10^6 espz/ml, por el contrario, cuando presenta una concentración en un rango de espermatozoides por mililitro de 250 y 400×10^6 espz/ml, se lo califica como regular.

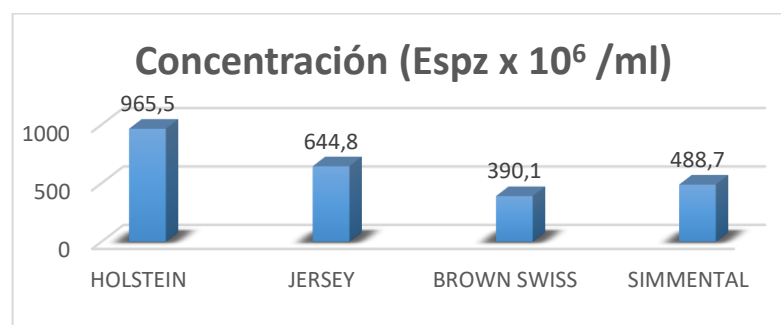


Gráfico 3-4: Concentración espermática de las cuatro razas en estudio

Realizado por: Sánchez, Ricardo, 2022.

4.2 Evaluación del efecto de la raza sobre la calidad seminal pre congelado

4.2.1 Motilidad masal (pts)

Tabla 1-4: Efecto de la raza en semen pre congelado

TRATAMIENTOS PARÁMETROS	HOLSTEIN	JERESEY	BROWN SWISS	SIMMENTAL	EE	Prob
Motilidad masal , pts	4,33 a	3,96 b	3,38 b	4,08 b	0,70	0,0001
Motilidad Individual %	83,75 a	82,50 a	77,95 b	82,08 a	4,38	0,0001
Vitalidad %	83,91 ab	83,37 bc	81,56 c	85,60 a	2,88	0,0001
Morfoanomalias %	4,26 a	4,56 a	6,43 a	5,33 a	1,68	0,2802
HOST %	87,30 a	87,40 a	83,67 a	86,05 a	3,01	0,1669
ORT %	84,42 a	78,83 bc	76,58 c	81,38 ab	5,84	0,0001

Letras iguales no difieren estadísticamente

EE: Error estándar

Prob: Probabilidad

Realizado por: Sánchez, Ricardo, 2022.

Para la evaluación de este parámetro en semen refrigerado, se valoró mediante una escala de 1 a 5, como se puede observar en el Grafico 1, si existió diferencia estadística ($P < 0,01$) de la motilidad masal en cuanto a su influenciada con la raza, entre el toro Holstein que presento un valor de $4,33 \pm 0,7$ con las demás razas en estudio, las cuales no mostraron diferencias estadísticas entre las mismas, dicho valor concuerda con el estudio realizado por (Vallecillo, 2011), quien reporta datos de motilidad masal en semen antes de la congelación para esta raza entre 3 y 4,2. En otra investigación realizado por (Rubio, Quintero & Gonzales, 2009), donde evaluó la motilidad masal para la raza Brown Swiss y Pizán, obtuvo un valor de $3,25 \pm 0,13$, dato levemente inferior al de esta investigación para la raza Brown Swiss que presento un valor de $3,38 \pm 0,7$, siendo esta la más inferior de todas.

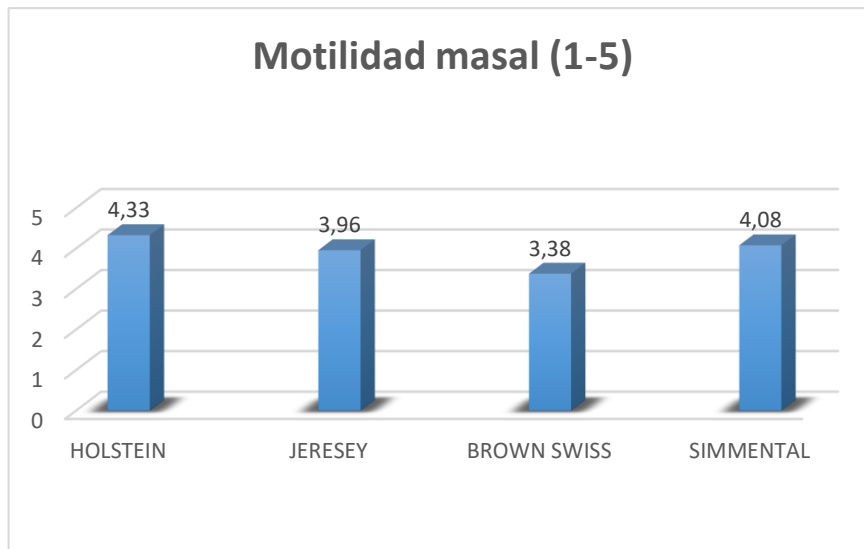


Gráfico 4-4: Efecto de la raza sobre la motilidad masal durante la pre congelación

Realizado por: Sánchez, Ricardo, 2022.

4.2.2 *Motilidad individual (%)*

Los resultados para la motilidad individual de semen antes de la congelación en función al efecto de la raza sobre dicho parámetro, demostraron que no existió diferencias estadísticas marcadas ($P < 0,01$), entre las razas Holstein, Jersey y Simmental presentando valores de 83,75; 82,50 y $82,08 \pm 4,38$ respectivamente, más no con la raza Brown Swiss la cual si reporto diferencias estadísticas con respecto a las demás con un valor de $77,95 \pm 4,38$; valor que concuerda con los reportados por (Madrid-Bury et al. 2005) en cinco toros de doble propósito donde se obtuvo valores de 76.7- 85.5%.

Los valores obtenidos para la raza Holstein concuerdan con la investigación de (Cabrera, Pantoja, 2012) quienes determinaron una motilidad individual en semen refrigerado en toros de esta raza de $85,1 \pm 2,0$ pero difieren con los de la raza Brown Swiss reportando valores superiores de $82,7 \pm 3,3$. Caso similar donde se obtuvo valores superiores se reportaron en la investigación realizado por (Medina, Sánchez & Cruz, 2007) quienes al evaluar la motilidad individual en semen de toros de la raza Holstein y Pizán , previa congelación obtuvieron un valor de $87,5 \pm 1,4$ %. En cuanto a la raza Jersey (Lemma & Shemsu, 2015) al evaluar la motilidad individual en reproductores de mencionada raza obtuvieron un valor de 79,41%, valor levemente inferior al obtenido en esta investigación (Vélez, Rugeles & Vergara, 2014). reportan en su investigación valores de $55,31 \pm 25,39$ % de motilidad individual en toros Simmental, valor inferior los obtenidos en esta investigación donde se reporto $82,08 \pm 4,38$ %, esta diferencia marcada se puede deber a varios factores que difirieron entre ambas investigaciones como método de colecta, medio ambiente y manejo de los animales.

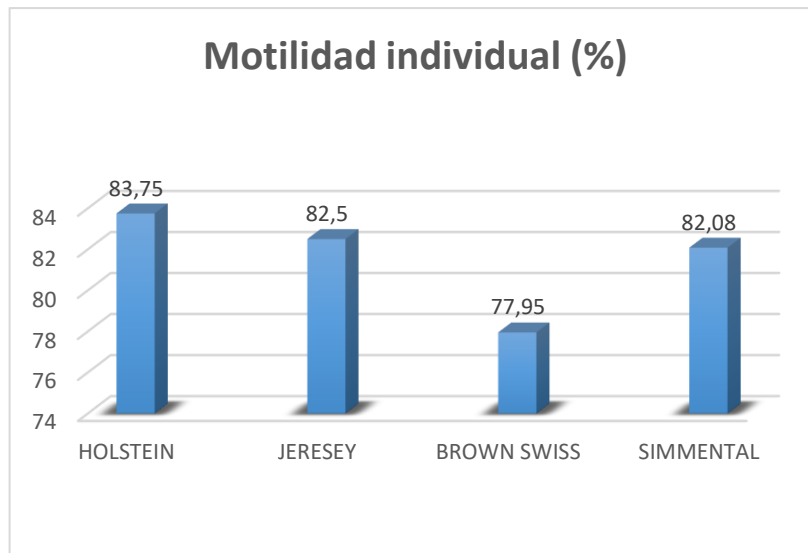


Gráfico 5-4: Efecto de la raza sobre la motilidad individual durante la pre congelación

Realizado por: Sánchez, Ricardo, 2022.

4.2.3 Vitalidad, (%)

El parámetro de vitalidad y su influencia bajo el efecto de la raza en esta investigación si presento diferencias estadísticas ($P < 0,01$), donde la raza Simmental reporto el mayor valor con $85,60 \pm 2,88$ %, seguida de las razas Holstein y Jersey con $83,91$ y $83,37 \pm 2,88$ % respectivamente, y la raza Brown Swiss la cual presento el inferior valor de todas las demás razas con $81,56 \pm 2,88$ %. Dichos valores son superiores a los reportados por (Vélez, Rugeles & Vergara, 2014), donde obtuvo un valor de $65,00 \pm 24,29$ de vitalidad en toros de raza Simmental, de igual manera a datos presentados por (Valle et al, 2005), reportaron niveles de porcentaje de vitalidad entre 71 y 73,6% en toros Holstein y Pardo Suizo.

Se debe considerar que toros que presenten un buen desarrollo en el parénquima testicular, producirán eyaculados de excelente calidad, que posean mayor concentración espermática, lo cual está relacionado con mayores porcentajes de vitalidad (Valle et al, 2005).

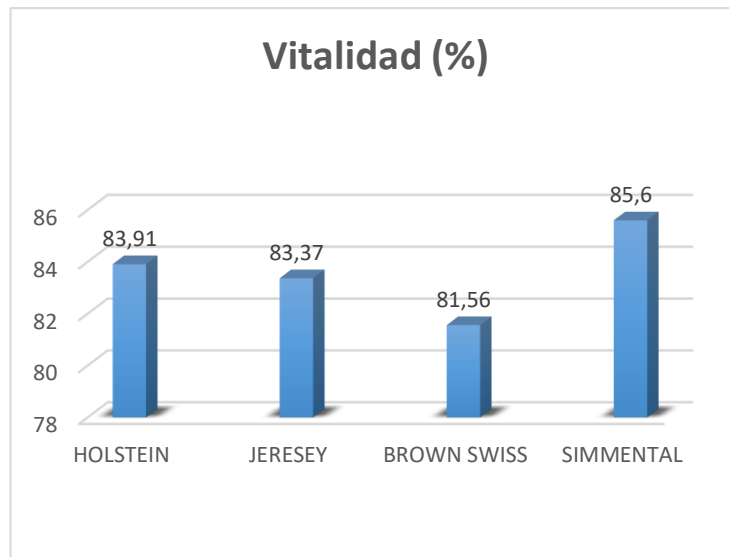


Gráfico 6-4: Efecto de la raza sobre la vitalidad espermática durante la pre congelación

Realizado por: Sánchez, Ricardo, 2022.

4.2.4 Anormalidades (%)

El porcentaje de Anormalidades presentes en el semen, no reporto diferencias estadísticas significativas ($P < 0,01$) entre las razas en estudio, las diferencias numéricas mostraron que la raza con mayor porcentaje de anormalidades fue la raza Brown Swiss con $6,43 \pm 1,68$ %, mientras que la raza Holstein y Jersey fueron las que menos anomalías presentaron con $4,26$ y $5,56 \pm 1,68$ % respectivamente. Valores superiores a los reportados por (Moncayo S. 2016) quien al evaluar las alteraciones morfológicas de los espermatozoides previo a la congelación identifico que la raza Holstein presento el menor número de anomalías con un porcentaje de 3% , mientras que la raza Brown Swiss reporto un porcentaje de 4% , siendo esta la raza que mayor porcentaje de alteraciones morfológicas presento. A su vez los valores de esta investigación fueron menores a los reportados por (Medina, Sánchez, Velasco, & Cruz, 2007), quienes obtuvieron $12,5 \pm 1,2\%$ de espermatozoides anormales, los valores mínimos de espermatozoides con morfología normal para ser considerado un semen de buena calidad debe poseer del $70 - 75$ % de morfología normal (De Alba Romero, 2014), dicho porcentaje concuerda con (Rutter & Russo, 2006 p84), quienes mencionan, que un semen debe contener mínimo un 70 % de espermatozoides con morfología normal.

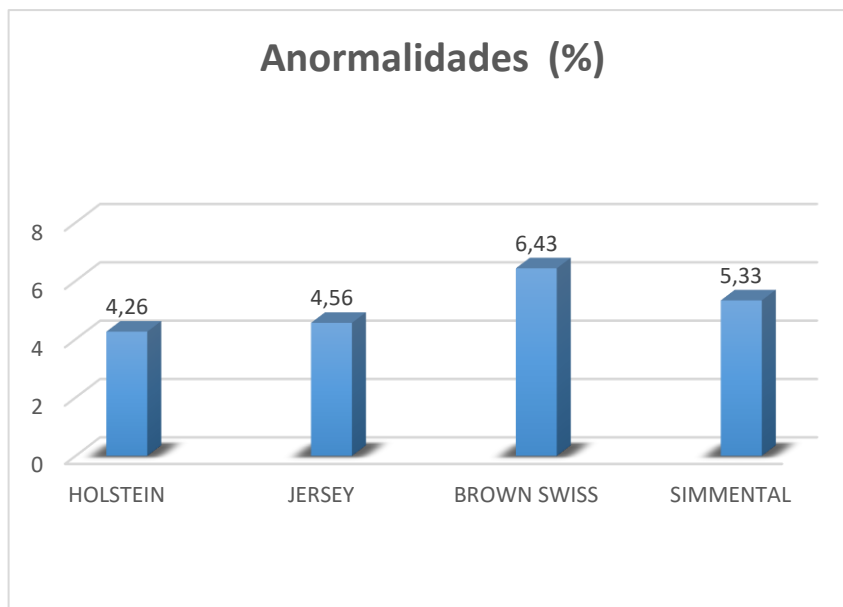


Gráfico 7-4: Efecto de la raza sobre las anomalías durante la pre congelación

Realizado por: Sánchez, Ricardo, 2022.

4.2.5 Integridad de la membrana (%)

Al realizar el método HOST para la determinar la integridad de la membrana y su influencia bajo el efecto de la raza, no se presentó diferencias estadísticas ($P < 0,01$), en esta investigación, únicamente se reportó diferencias numéricas, donde la raza Jersey y la raza Holstein presentaron los mayores valores con $87,40$ y $87,30 \pm 3,01$ % respectivamente, y la raza Brown Swiss obtuvo el menor valor con $83,67 \pm 3,01$ % entre todas las razas. Valores ligeramente inferiores a los reportados por (Ludeña, E. 2019), quien, al evaluar la integridad de la membrana mediante el método HOST, obtuvo un valor de $89,3$ % para la raza Holstein, pero inferior con respecto de la raza Brown Swiss donde reportó un valor del 80 %.

Resultados similares donde no se encontró diferencias estadísticas entre toros de raza Holstein y raza Brown Swiss pero si inferiores a los de esta investigación, fueron los reportados por (Cabrera & Pantoja, 2012) quienes obtuvieron valores de integridad de membrana citoplasmática en semen refrigerado previa congelación de $59,1 \pm 3,3$ % para la raza Holstein y $58,1 \pm 2,5$ % para la raza Brown Swiss .

Sin embargo, los datos de esta investigación se aproximan a los alcanzados por (Rubio & Quintero, 2008) en su investigación sobre el uso de pruebas de resistencia osmótica para valorar la funcionalidad de la membrana espermática donde el toro B presentó un HOST de 86 % y el toro C presentó un valor de $80,9$ %.

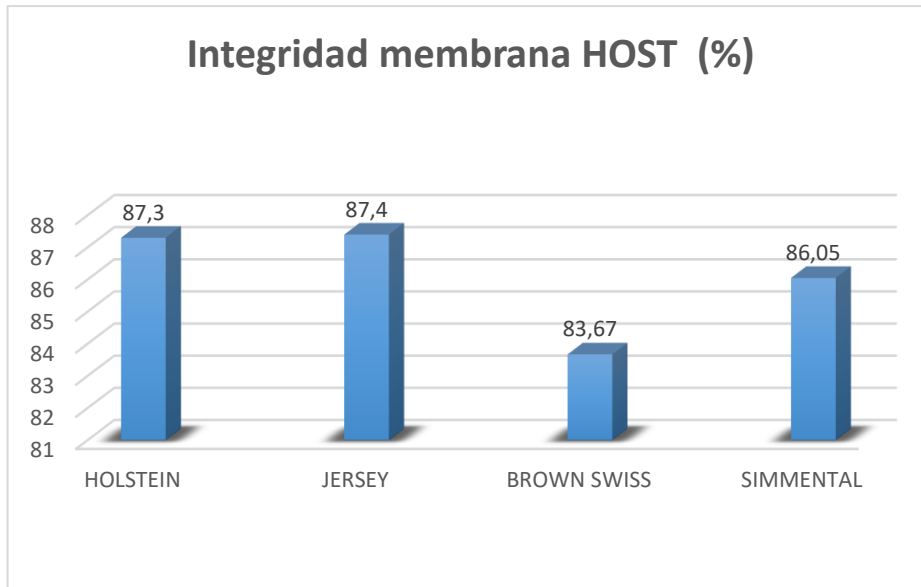


Gráfico 8-4: Efecto de la raza sobre la integridad de la membrana en la pre congelación

Realizado por: Sánchez, Ricardo, 2022.

4.2.6 *Integridad del acrosoma (%)*

Mediante el método ORT se demostró que la integridad del acrosoma con respecto al efecto de la raza, si presento diferencias estadísticas en el semen pre congelado ($P < 0,01$), donde la raza Holstein presento el mayor valor en dicho parámetro con $84,42 \pm 5,84$ % con respecto a las demás razas excepto la Simmental la cual reporto un valor de $81,38 \pm 5,84$ %. La raza Jersey difirió estadísticamente de la raza Holstein, Brown Swiss, más no de la raza Simmental con un valor de $78,83$ %, mientras que la raza Brown Swiss obtuvo diferencias estadísticas con todas las demás razas de esta investigación. Dichos valores son ligeramente inferiores a los reportados por (Rubio & Quintero, 2008), quienes reporta valores de $86,4$ % y $91,9$ %. Otra investigación reporta valores que superan a los anteriormente descritos indicando un valor de $88,8 \pm 0,81$ % realizado por (Rubio, Quintero, & González, 2009). Valores inferiores fueron reportados por (Cabrera & Pantoja, 2012) donde la integridad del acrosoma en semen refrigerado fue uniforme entre un rango de $59,3 \pm 3,3$ y $69,2 \pm 3,1$ % en toros de raza Holstein y Brown Swiss, ligeramente inferiores a los valores de (Madrid-Bury et al. 2005) comprendidos entre $70,2$ y $73,5$ %.

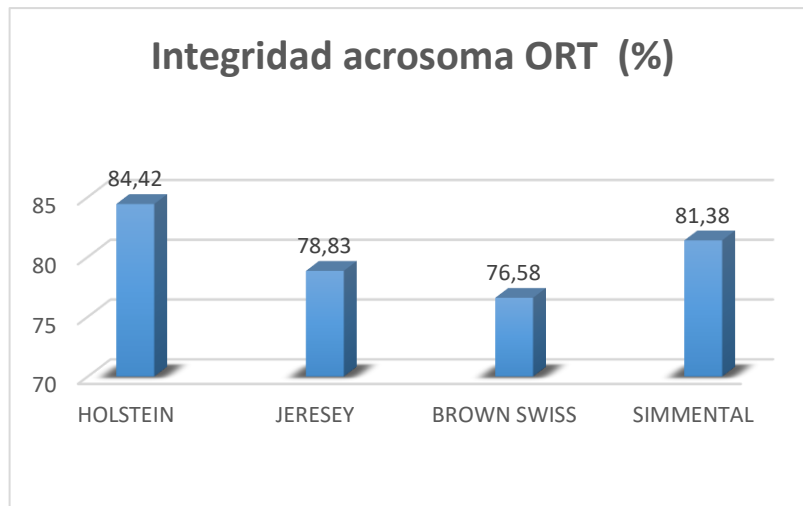


Gráfico 9-4: Efecto de la raza sobre la integridad del acrosoma en pre congelación

Realizado por: Sánchez, Ricardo, 2022.

4.3 Evaluación del efecto de los antioxidantes sobre la calidad seminal en pre congelación

4.3.1 Motilidad masal (pts)

En cuanto al efecto de los tratamientos sobre la motilidad masal se pudo observar (Gráfico 2), que la adición de cafeína en el semen antes de la congelación si presentó diferencias estadísticas ($P < 0,01$) sobre el grupo testigo y la adición de glutatión con un valor de $4,31 \pm 0,65$; frente a $7,72 \pm 0,65$ y $3,78 \pm 0,65$ respectivamente. Esto se puede deber a que las metilxantinas y su derivada, como es la cafeína, provocan un incremento de la motilidad y el vigor de los espermatozoides frescos, por esta razón inclusive es utilizada para tratar problemas de oligozoospermia y astenozoospermia (Aparicio y col., 1997) (Schill, 1982) (Schoenfeld C. y col., 1975) (Shen y col., 1991).

Esta mayor motilidad masal espermática podría deberse al aumento del contenido de AMP cíclico, debido a la inhibición provocada por las metilxantinas sobre la fosfodiesterasa (Garbers y col., 1971b) (Stefanovich, 1973).

En el efecto de la interacción raza-tratamiento, se determinó que la raza Holstein más el tratamiento con cafeína obtuvo diferencias estadísticas, con un valor de $5,00 \pm 0,28$ con respecto a las tres razas restantes en estudio y los otros dos tratamientos aplicados.

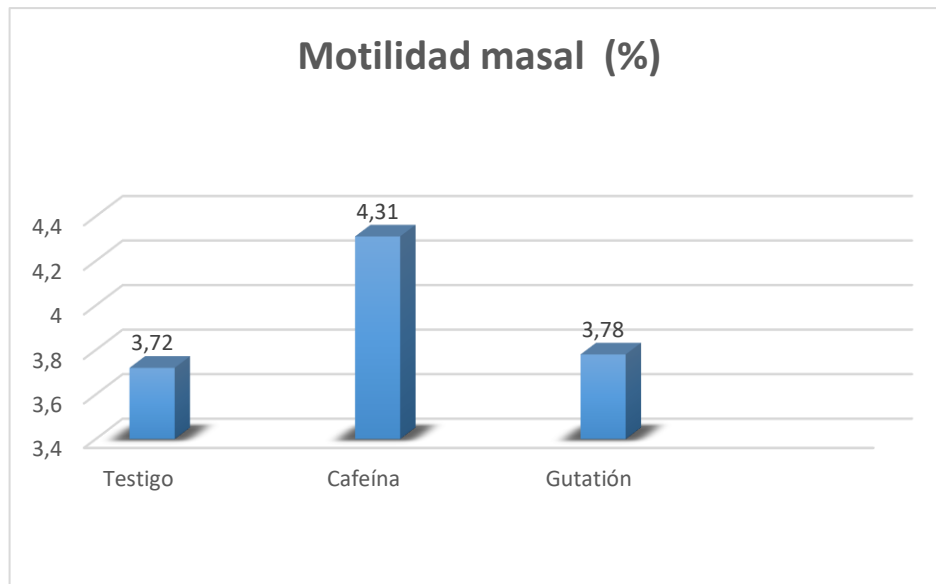


Gráfico 10-4: Efecto de los tratamientos sobre la motilidad masal pre congelación

Realizado por: Sánchez, Ricardo, 2022.

Tabla 2-4: Efecto de los tratamientos sobre la calidad seminal en semen pre congelado

TRATAMIENTOS	Testigo	Cafeína	Glutación	EE	Prob
PARÁMETROS					
Motilidad masal , pts	3,72 b	4,31 a	3,78 b	0,65	0,0001
Motilidad Individual %	80,63 a	82,16 a	81,25 a	2,25	0,0001
Vitalidad %	82,19 b	85,24 a	83,41 b	3,07	0,0001
Anormalidades %	5,16 a	5,54 a	4,74 a	0,80	0,0793
HOST %	85,50 a	87,00 a	85,80 a	1,58	0,6126
ORT %	81,91 a	79,97 ab	79,03 b	2,94	0,0314

Letras iguales no difieren estadísticamente

EE: Error estándar

Prob: Probabilidad

Realizado por: Sánchez, Ricardo, 2022.

4.3.2 Motilidad individual (%)

El efecto de los tratamientos con respecto a la motilidad individual del semen durante la pre congelación no reportó diferencias estadísticas entre los mismos ($P < 0,01$), solo se reportó diferencias numéricas donde la cafeína presento un valor ligeramente superior de $82,16 \pm 2,25$ % frente al glutación con 81,25 % y el testigo con 80,63 %. Particular similar a experiencias donde se utilizó concentraciones altas de cafeína las cuales no arrojaron diferencias significativas en cuanto a motilidad cuando se utilizó entre 10 y 20 mM cuando fueron agregados al semen fresco antes de ser sometido a crioconservación, al contrario, se determinaron problemas de toxicidad con concentraciones mayores (El-Gaafary y col., 1990). El efecto del glutación trasciende más durante

el proceso de congelación, donde se encarga de proveer los mecanismos suficientes para contrarrestar y eliminar las de especies reactivas del oxígeno formadas en dicho proceso.

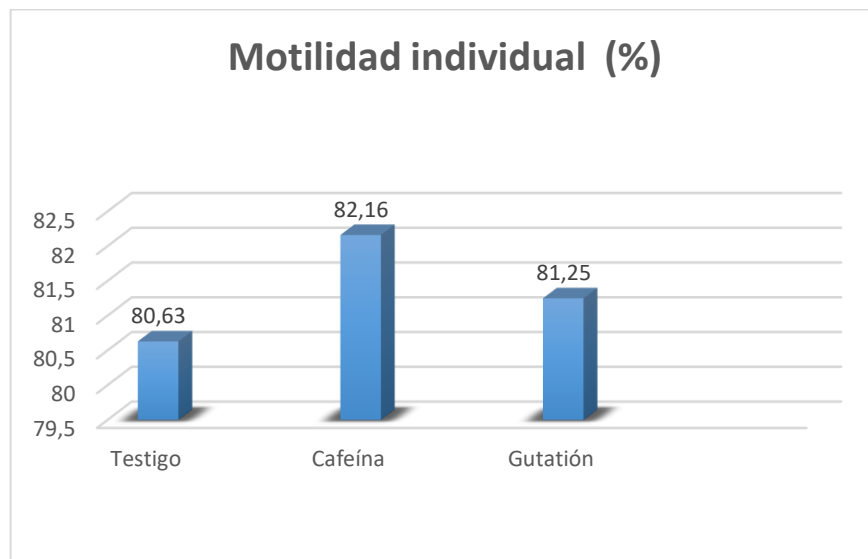


Gráfico 11-4: Efecto de los tratamientos sobre la motilidad individual pre congelación

Realizado por: Sánchez, Ricardo, 2022.

4.3.3 Vitalidad, (%)

Con respecto a la influencia de los tratamientos sobre el parámetro de vitalidad espermática, se encontró diferencias estadísticas ($P < 0,01$), donde la cafeína difirió de los demás tratamientos presentado un valor de $85,24 \pm 3,07$ % frente al glutación y al testigo. Esto se puede deber a lo mencionado por (De la Vega, Wilde & Cruz, 1997), quienes al adicionar cafeína (10 mM) a medios de cultivo, incrementaron la viabilidad de los espermatozoides manifestándose en una hipercinesis, efecto que permitiría utilizar dicho compuesto en trabajos de fertilización in vitro. La interacción entre la raza y los tratamientos aplicados demostraron que la vitalidad espermática con diferencias estadística ($P < 0,01$), fue mejor en la raza Simmental con la adición de cafeína con un valor de $87,98 \pm 1,14$ %, y los valores más inferiores se reportaron con el tratamiento testigo en las razas Holstein, Jersey y Brown Swiss con un valor promedio de $81,34 \pm 1,14$ %. Toros que presenten un mayor desarrollo testicular más la adición de metilxantinas como la cafeína, adicionados a medios o diluyentes utilizados habitualmente en inseminación artificial, presentarían y a su vez prolongaría la vitalidad de los espermatozoides, manteniendo la calidad del semen por períodos más largos y así mejorando las perspectivas de éxito en la inseminación artificial (De la Vega, Wilde & Cruz, 1997).

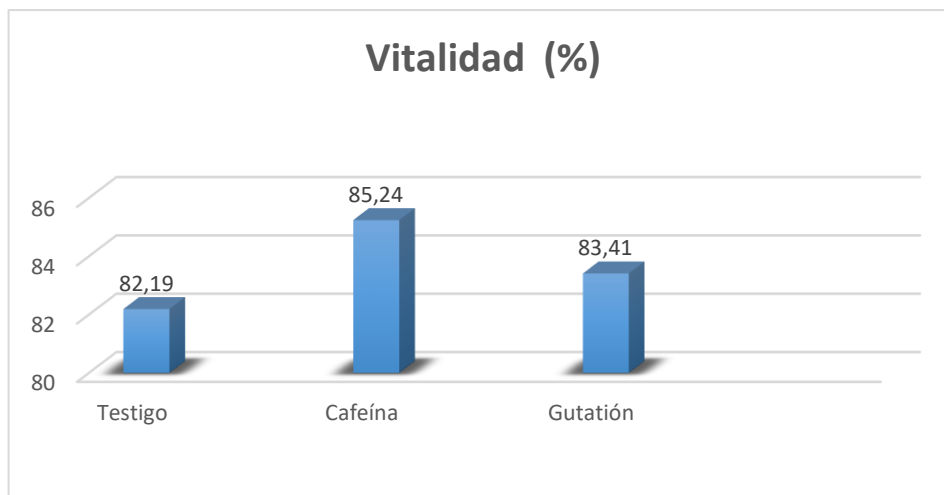


Gráfico 12-4: Efecto de los tratamientos sobre la vitalidad durante la pre congelación

Realizado por: Sánchez, Ricardo, 2022.

4.3.4 Anormalidades (%)

De igual manera que en el caso anterior, no se encontró diferencias estadísticas entre el efecto de los tratamientos y la presencia de anomalías espermáticas durante la pre congelación, los valores numéricos reportan que la cafeína presentó un mayor porcentaje de anomalías en el semen con $5,54 \pm 0,80$ % en comparación con el testigo $5,16$ y el glutación que presentó menor porcentaje de anomalías con $4,74 \pm 0,80$ %. Situación similar se reportó en la investigación realizada por (Ludeña, E. 2019), quien no encontró diferencias estadísticas significativas en cuanto a morfología espermática al utilizar dos antioxidantes como la vitamina E y la vitamina C a una concentración de 2mM y 2,5 mM respectivamente en bovinos criollos. Estas anomalías morfológicas que no tuvieron diferencias estadísticas entre tratamientos, estaban en un rango entre 8,17% y 9,58% los cuales son menores a los presentados por (Mejía, 2017) el cual obtuvo un 15% de anomalías totales en bovinos criollos del Azuay, pero superiores en ambos casos a las reportadas en esta investigación. La interacción entre la raza y los tratamientos no reportaron diferencias estadísticas las anomalías encontradas en este estudio consistieron en su mayoría en cabezas desprendidas y colas enrolladas. Resultados similares a los obtenidos por (Gororo et al., 2019). Las anomalías morfológicas de acuerdo a (Salviano & Torres De Souza, 2015) pueden dividirse en primarias (causadas durante el proceso de espermatogénesis), secundarias (problemas a nivel de epidídimo) y terciarias (causadas por la crío conservación inadecuada). En este proceso de pre congelación se observaron en su mayoría anomalías primarias y secundarias. Según (Ambali et al., 2018) este tipo de anomalías de los espermatozoides pueden deberse a un trastorno de los túbulos seminíferos o en la manipulación de la muestra seminal, una excesiva agitación, enfriamiento rápido, mezcla de agua, razón por la cual no influiría tanto la raza como el tratamiento aplicado.

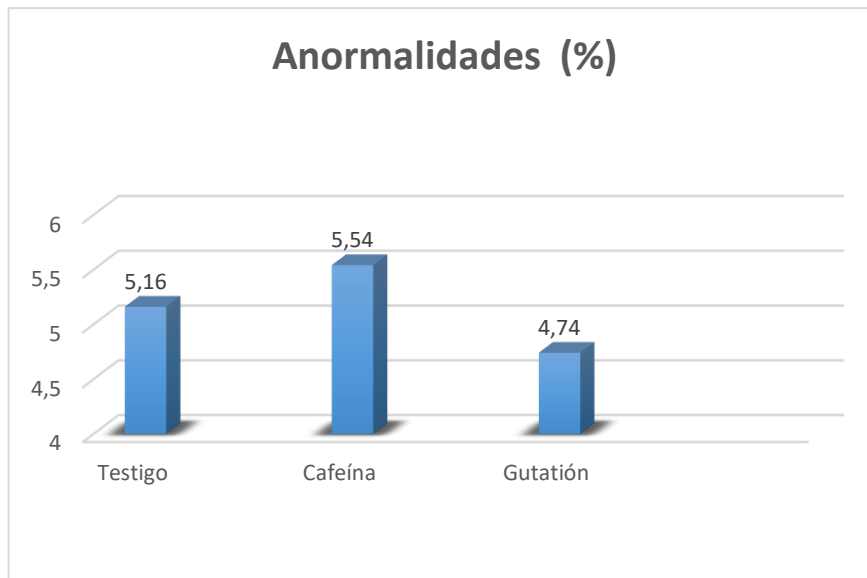


Gráfico 13-4: Efecto de los tratamientos sobre las anomalías en pre congelación

Realizado por: Sánchez, Ricardo, 2022.

4.3.5 Integridad de la membrana (%)

Similar situación se reportó con el efecto de los tratamientos sobre la integridad de la membrana en pre congelación donde no se encontró diferencias estadísticas, solamente numéricas, donde los valores de integridad de membrana citoplasmática fueron homogéneos, sin diferencia estadística entre tratamientos. Mayor valor fue de la cafeína con $87,0 \pm 1,58$ %. Esto en consecuencia de igual manera en la interacción entre la raza y el tratamiento dio que no exista diferencia estadística. Este fenómeno si se podría definir así, se podría deber a que la acción principal que poseen los antioxidantes tales como la cafeína, glutación entre otros, lo demuestran de manera más marcada en los procesos tanto de congelación como descongelación ya que existen varias investigaciones de la adición de diferentes antioxidantes al diluyente seminal sin reportar efectos sobre este parámetro, como las de (Malo et al., 2012), quien indica que la adición de *Foeniculum vulgare* no tuvo ningún efecto sobre la integridad de la membrana espermática en comparación con el tratamiento control. De igual manera (Luño et al. 2014), no observo diferencias significativas en la integridad de la membrana celular al adicionar *Melissa officinalis* y *Ilex paraguensis* al diluyente. (Sarıözkan et al. 2009) en su investigación donde adicionaron cisteína que es un compuesto activo del glutación, como fuente antioxidante al diluyente de semen bovino, no encontraron diferencia estadística con respecto a la integridad de la membrana de las células espermáticas.

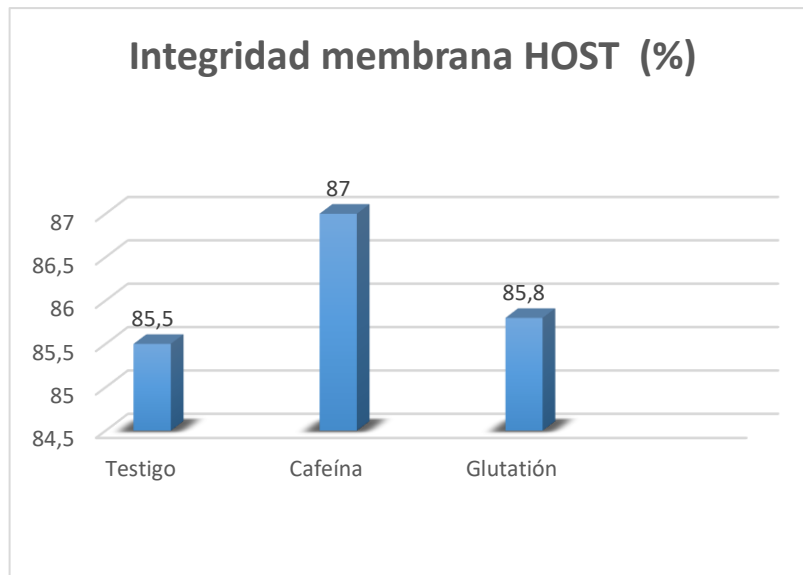


Gráfico 14-4: Efecto de los tratamientos sobre la integridad de la membrana

Realizado por: Sánchez, Ricardo, 2022.

4.3.6 Integridad del acrosoma (%)

En cuanto al efecto de los tratamientos sobre la integridad del acrosoma, se reportaron diferencias estadísticas ($P < 0,01$), entre el tratamiento testigo y el tratamiento de glutación, donde el primero obtuvo un valor de $81,91 \pm 2,94$ % frente al valor de $79,03 \pm 2,94$ % obtenido por el segundo. El tratamiento con la adición de cafeína no mostro diferencias estadísticas con los otros dos en estudio en cuanto a integridad del acrosoma en semen antes de la congelación.

Valores inferiores con respecto a la investigación realizada por (Barragán, 2017), donde determino el porcentaje de espermatozoides con reacción acrosómica, después de ser sometidos a un tratamiento con cistina (aminoácido del glutación) y cafeína como fuentes de antioxidantes, obteniendo como resultado un valor de $96,78$ y $96,78 \pm 0,54$ % respectivamente.

La interacción de las razas y los tratamientos aplicados, demostraron con diferencias estadísticas que la Raza Holstein con el tratamiento testigo y cafeína lograron mejores resultados en la integridad del acrosoma con respecto a las otras tres razas y el tratamiento restante, con un valor de $86,13$ y $84,63 \pm 2,21$ % respectivamente. A su vez la raza Brown Swiss con el tratamiento de glutación reportaron los menores valores en este parámetro de estudio con un porcentaje de $73,75 \pm 2,21$ %.

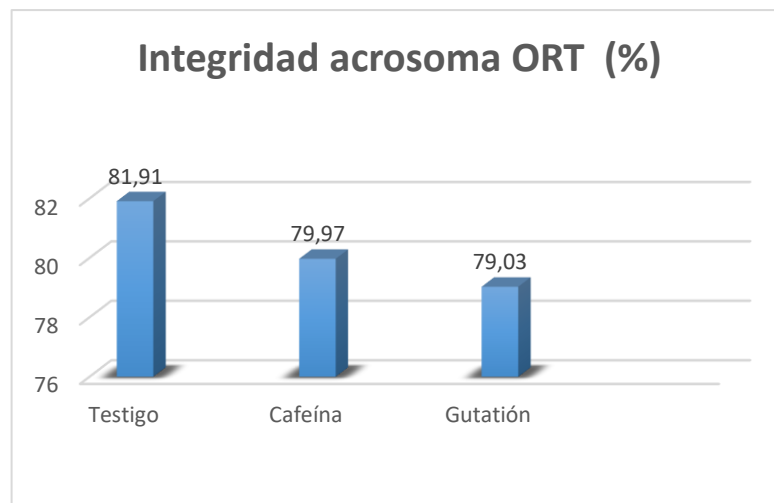


Gráfico 15-4: Efecto de los tratamientos sobre la integridad del acrosoma

Realizado por: Sánchez, Ricardo, 2022.

4.4 Evaluación del efecto de los antioxidantes sobre la calidad seminal post descongelado

4.4.1 Motilidad individual, %

El efecto de los tratamientos sobre el porcentaje de motilidad individual post descongelación muestra diferencias altamente significativas ($P < 0,01$), donde el tratamiento a base de glutatión (T2) presenta una media de 62,50%, seguido por el tratamiento control (T0) con un promedio de 55,39%, en tanto que las pajuelas a base de cafeína (T1) mostraron el menor porcentaje de motilidad con un promedio de 51,00 % ± 5.80 como se registra en la tabla 12-4.

Tabla 3-4: Efecto de los tratamientos sobre calidad seminal post descongelado

TRATAMIENTOS	Testigo	Cafeína	Glutatión	EE	Prob
PARÁMETROS					
Motilidad Individual, %	55,39 b	51,00 c	62,50 a	5,80	0,0001
Vitalidad %	51,95 b	50,34 c	62,79 a	6,77	0,0001
Anormalidades %	13,86 a	13,13 a	13,23 a	0,40	0,3354
Integridad de la membrana %	50,82 b	51,45 b	61,14 a	5,78	0,0001
Integridad del acrosoma %	57,14 b	55,67 b	67,24 a	6,30	0,0001

Letras iguales no difieren estadísticamente

EE: Error estándar

Prob: Probabilidad

Realizado por: Sánchez, Ricardo, 2022.

El resultado del glutatión es inferior a los encontrados por Quisbert, G (2014), quien obtuvo una motilidad de 72,4% con la utilización de selenio en medios de congelación mismo que actúa como

cofactor del glutatión peroxidasa el cual le confiere protección a la célula de los radicales libres durante el proceso de crioconservación.

Sariözkan, Numan, Barbaros, Ulutas, & Bilgen, (2009), al emplear precursores del glutatión como la taurina y la cisteína en medios de congelación encontró una motilidad de 43,3 y 57,8% respectivamente, valores inferiores a los encontrados en el presente estudio; en tanto que (Gadea, Guambo, Cánovas, & Grullón, 2007) registro un promedio de 61,8 y 59,3 % al utilizar 1mM y 5mM de Glutation (GSH) en medios post descongelación

Por otro lado el porcentaje de motilidad post descongelación hallado, al adicionar cafeína previa congelación es inferior a los encontrados por Barakat, Danfour, Galewan, & Dkhil, (2015) y Barragán, I (2017), quienes obtuvieron medias de 55,20 y 54,74 %; sin embargo, Srivastava & Kumar, (2014), encontró una motilidad del $38,9\pm 4,7\%$ media que es inferior a las encontradas en la presente investigación.

En el gráfico 1-4 se observa como el porcentaje de motilidad varía de acuerdo al antioxidante gracias a que el glutatión al estar presente en los espermatozoides y en el plasma seminal junto con la SOD, taurina, GSH-PX y catalasa elimina el alcohol y radicales peroxilo protegiendo la motilidad de la célula esperática Sariözkan et al., (2009). Es importante mencionar que la cafeína induce la hiperactivación espermática al incentivar la activación de los canales de calcio que se encuentran en la membrana plasmática mejorando así motilidades de semen frasco mas no en semen post congelado (Ho & Suarez, 2001).

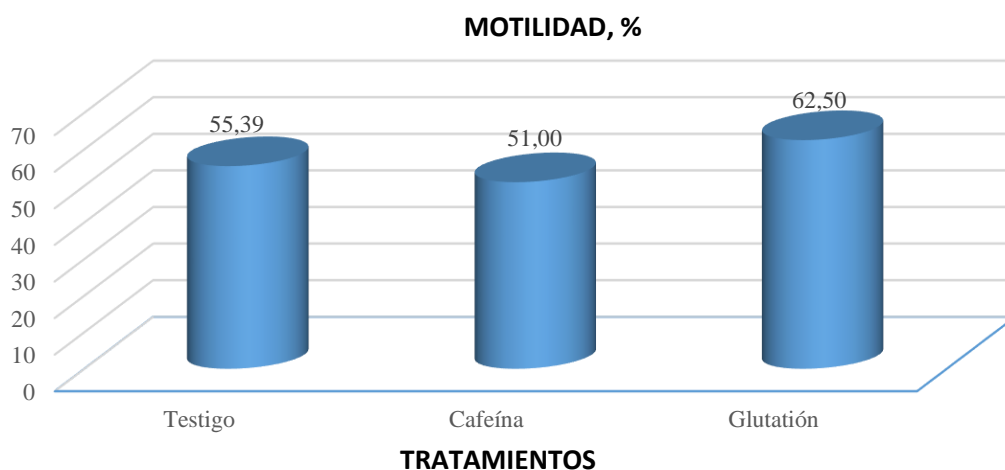


Gráfico 16-4: Motilidad espermática del semen post descongelación previa adición de antioxidantes en medios de congelación

Realizado por: Sánchez, Ricardo, 2022.

4.4.2 Vitalidad, %

Los promedios registrados para la vitalidad muestran que la adición de antioxidante para la congelación de semen en bovinos de leche muestra una tendencia estadística ($p > 0.01$), esto sugiere que el glutatión presenta mejor porcentaje de vitalidad con el 62,79 % con respecto al tratamiento control y al uso de la cafeína (T1) con una media de 51,95 % y 50,34% respectivamente con una dispersión para cada media de $\pm 5,80$ % (tabla 12-4).

Resultados que son superiores a los descritos por Ludeña, E (2019) al utilizar antioxidantes de tipo no enzimático como vitamina C y vitamina E donde registra un porcentaje de vitalidad del 47,75 y 51,83 % en su respectivo orden.

Los datos reportados por Galarza, A (2018) en cuanto a vitalidad espermática son similares a los del presente estudio, puesto que alcanza el más alto porcentaje con Triladyl con 51,73% y con AndroMed 48,96%. Valdez, J(2018) alcanzó un porcentaje de vitalidad de 52,56; 54,47; 53,86 y 62,36% al utilizar cisteína, cafeína, ácido ascórbico y rhus trilobata resultados que coinciden con los hallados en la presente investigación.

En el gráfico 2-4 se puede observar la diferencia entre los tratamientos debido probablemente a que la producción de especies reactivas al oxígeno (ROS) es inferior con la adición de glutatión en medios congelación haciendo que la concentración de solutos de la parte no congelada modifique la presión osmótica protegiendo la vitalidad y el funcionamiento normal del espermatozoide.

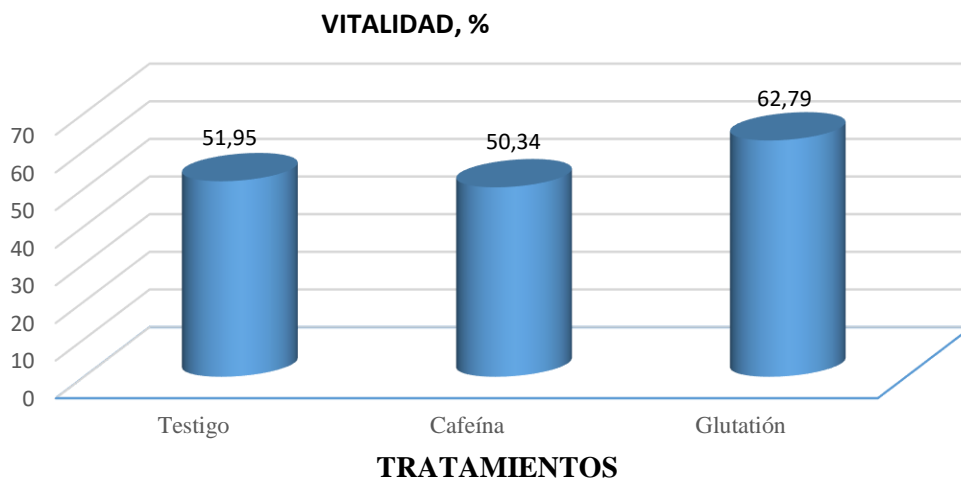


Gráfico 17-4: Vitalidad espermática del semen post descongelación previa adición de antioxidante en medios de congelación

Realizado por: Sánchez, Ricardo, 2022.

4.4.3 Anormalidades, %

El porcentaje de morfoanomalias no mostró diferencias estadísticas ($P>0,05$), a pesar de ello se registraron diferencias numéricas donde el tratamiento testigo marco un porcentaje de 13,86 % seguido por el glutatión (T2) con el 13,23% para finalmente quedarse con el 13,13% perteneciente a la cafeína (T1); datos que son inferiores a los reportados por Galarza, A (2018) quien al usó Trilady1 con el 10,19% y con AndroMed el 10,48%.

Ludueña, E (2019) al evaluar la morfología con la adición de antioxidantes no enzimático como la vitamina C y E al diluyente Trilady1 registro una media de 9,5 y 9,67% respectivamente en bovinos con biotipo criollo datos que son inferiores a los encontrados en el presente estudio; a su vez, estos promedios son superiores a los detallados por Grober, Q (2014) quien al utilizar selenio previa congelación como activador de la enzima glutatión peroxida obtuvo anormalidades del 20,9%.

En el grafico 3-4 se puede observar que al utilizar antioxidantes en medios de congelación disminuyen la producción de radicales libres de oxígeno los cuales alteran los lípidos en la membrana incrementando la peroxidación lipídica y produciendo espermatozoides morfológica alterados.

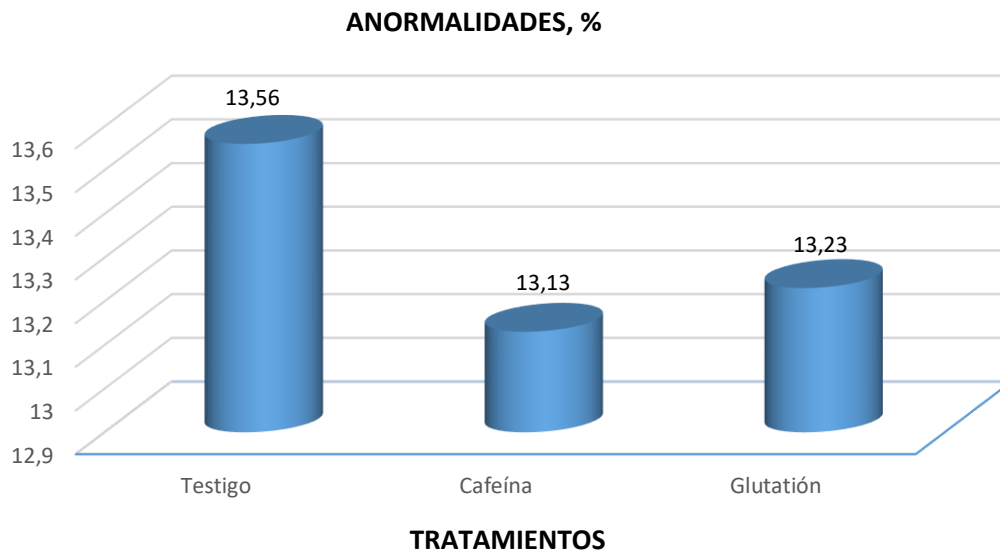


Gráfico 18-4: Anomalías espermáticas del semen post descongelación previa adición de antioxidantes en medios de congelación

Realizado por: Sánchez, Ricardo, 2022.

4.4.4 Integridad de la membrana plasmática, %

La integridad de la membrana después de la post congelación presento diferencias estadísticas ($P < 0,01$) variando entre 61,14 y 51,45% valores correspondientes al T2 y al T1 en su respectivo orden, para el caso del tratamiento testigo comparte significancia con el tratamiento control con un promedio de 50,82% y con una dispersión de 5,78% para cada media como se indica en tabla 12-4 y como se observa en el grafico 4-4

Estos resultados son superiores a los obtenidos por Valdez, J (2018), quien obtuvo medias de 46,86 y 42,56% por efecto de la cisteína y cafeína en medios de congelación, siendo también superiores a los encontrados por Sariözkan et al., (2009) al usar taurina y cisteína con un 46,6 y 48,4% respectivamente.

Durante la etapa de crioalmacenamiento la membrana sufre un daño considerable, la cafeína puede compensar este daño estimulando la actividad de una bomba de calcio de la membrana plasmática dirigida hacia el exterior a través de la mediación de cAMP, a pesar de ello, la cafeína fue pobre ya que actúan como un estimulante haciendo que la célula espermática se hiperactive, en tanto que, el glutatión mantiene el equilibrio redox a través de la modificación de los tioles proteicos en el espermatozoide (Gadea et al., 2007), mantienen la distribución normal de los puentes de disulfuro protegiéndola de los radicales libres que se forman durante el proceso de crioconservación (García, G 2015).

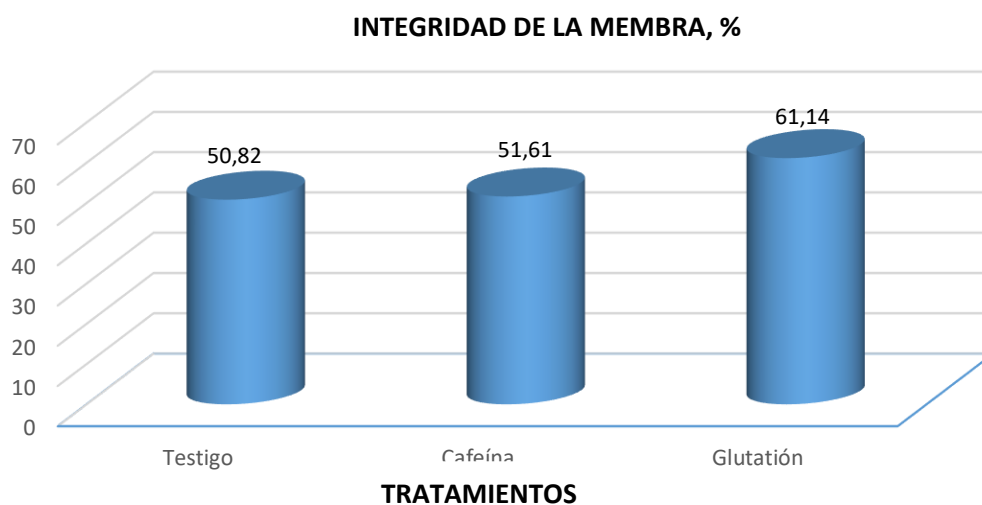


Gráfico 19-4: Integridad de la membrana del semen post descongelación previa adici3n antioxidante en medios de congelaci3n

Realizado por: S3nchez, Ricardo, 2022.

4.4.5 Integridad del acrosoma del acrosoma, %

El análisis de varianza para esta variable encontró diferencias significativas ($P < 0,01$), donde el mejor porcentaje de integridad del acrosoma fue para el tratamiento (T2) a base de glutatión con una media de 67,24 % seguido por el T0 y T1 los cuales comparten significancia con un promedio de 57,14 % y 55,67 % con una dispersión para cada media de 6,30 como se muestra en la tabla 10-4

Resultados que son inferiores a los encontrados por Srivastava & Kumar, (2014) donde evaluó el efecto post descongelación de distintos antioxidantes en medios de congelación registrando el 80,3; 74,1 y 72,8% pertenecientes al ácido ascórbico, cafeína y cloroquina respectivamente; mientras que para (Valdez, J (2018) estos resultados son superiores a los reportados en su investigación sobre la adición de fuentes antioxidantes al diluyente de semen bovino y sus efectos post descongelamiento con el 50,08 y 41,23 % al utilizar cisteína y cafeína respectivamente.

Gardón & Matas, (2001) reporta un 47,80 y 37,40 % de integridad del acrosoma al ser sometidos a un tratamiento con heparina más cafeína y a un tratamiento con percoll en su estudio sobre efecto del protocolo de preparación de los espermatozoides bovinos sobre el patrón de reacción acrosómica, resultados inferiores a los encontrados en la presente investigación.

Gadea et al., (2007), estableció porcentajes del 55,8 y 56,0% correspondientes a la adición de 1mM y 5mM de glutatión reductasa (GSH) en medios post descongelación resultados son inferiores a los hallados en el presente estudio con respecto a la utilización del glutatión.

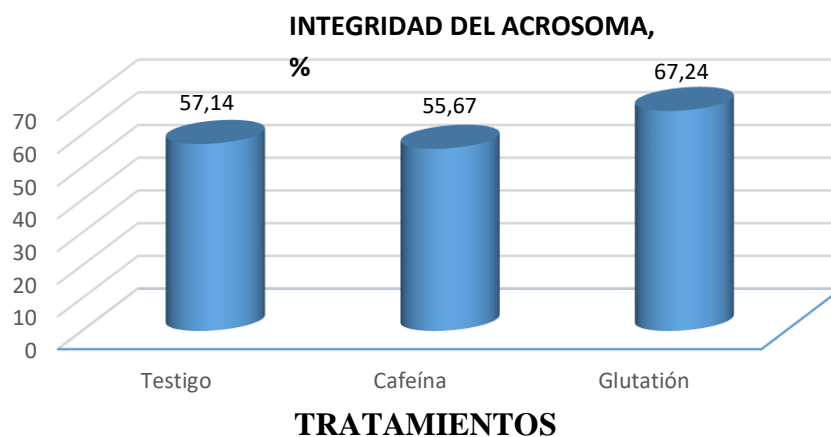


Gráfico 20-4: Integridad del acrosoma del semen post descongelación previa adición de antioxidante en medios de congelación

Realizado por: Sánchez, Ricardo, 2022.

La diferenciación en el porcentaje de acrosoma intacto posterior a la descongelación como se observaba en el gráfico 5-4 podría deberse a diferencias en la respuesta de las membranas celulares a la congelación que pueden estar relacionadas con los defectos en la espermatogénesis, a su vez está ligada a la posición normal de los puentes de disulfuro y equilibrio redox intracelular.

4.5 Evaluación del efecto de la raza sobre la calidad seminal post descongelado

4.5.1 Motilidad individual, %

En la tabla 13-4 se puede observar el efecto de la raza sobre el porcentaje de motilidad individual, mismo que presenta diferencias significativas ($P > 0,01$) donde, para el semental Holstein registra un 64,27%, seguido por el toro Jersey y Simmental con el 57,69 y 56,25% respectivamente siendo el reproductor raza Brown Swiss quién presento el menor porcentaje de motilidad individual al momento de la descongelación con el 46,98% con una dispersión para cada media de 6,17%

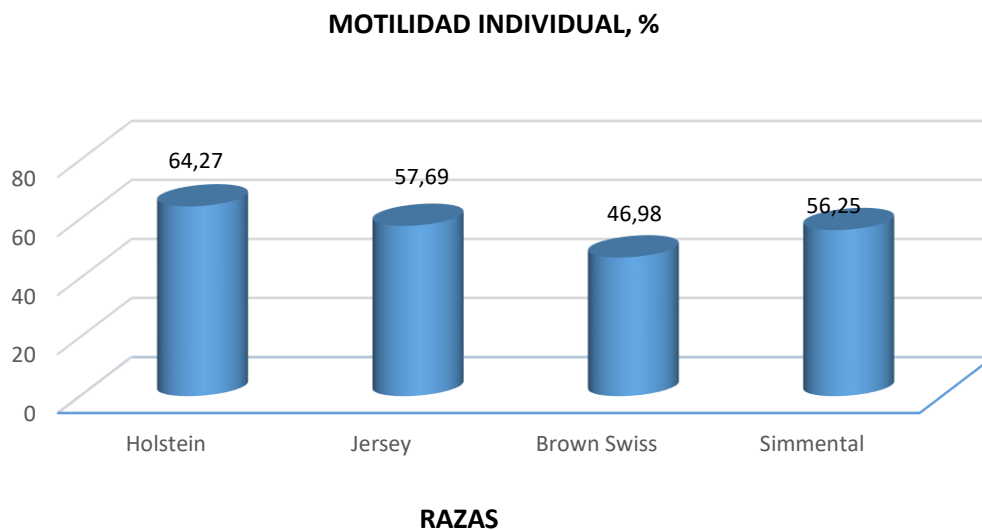


Gráfico 21-4: Motilidad individual del semen post descongelación en relación a la raza

Realizado por: Sánchez, Ricardo, 2022.

Datos que son inferiores a los descritos por Veloz, M (2017) quien halló una motilidad post descongelación de 73,18; 67,72 y 59,09% para el grupo racial de Jersey, Holstein y Brown Swiss al ser evaluados de manera convencional; a su vez, las medias registradas en la presente investigación son semejantes a los proporcionados por la misma Veloz, M (2017) al evaluar parámetros seminales entre las tres razas de reproductores con el método CASA obteniendo valores de 60,43; 63,24 y 55,65% para Jersey, Holstein y Brown Swiss respectivamente.

Aquino, M (2017) obtuvo una motilidad individual de 61,7 y 61,2% en reproductores Simmental y Brown Swiss respectivamente, en tanto que (López & Rivera, 2015), encontró una motilidad de 61,7% en toros Jersey y en toros holstein se obtuvo el 75,8% Muiño, R (2000) valores superiores a los descritos en el presente estudio. En el gráfico 21-4 se puede ver la variación de la motilidad post descongelación según el grupo racial por lo tanto suponemos que esta diferencia está ligada al componente genético, especialmente al gen leptina relacionado a la calidad seminal, así como al daño mecánico durante el proceso de congelación y descongelación.

4.5.2 Vitalidad, %

El análisis de varianza para esta variable (Tabla 13-4) determinó que el menor porcentaje de vitalidad fue para el toro raza Brown Swiss con 46,25% seguido por el 54,82 y 54,02% perteneciente a los reproductores Jersey y Simmental en su respectivo orden siendo el toro Holstein quien obtuvo el $64,27 \pm 6,67\%$.

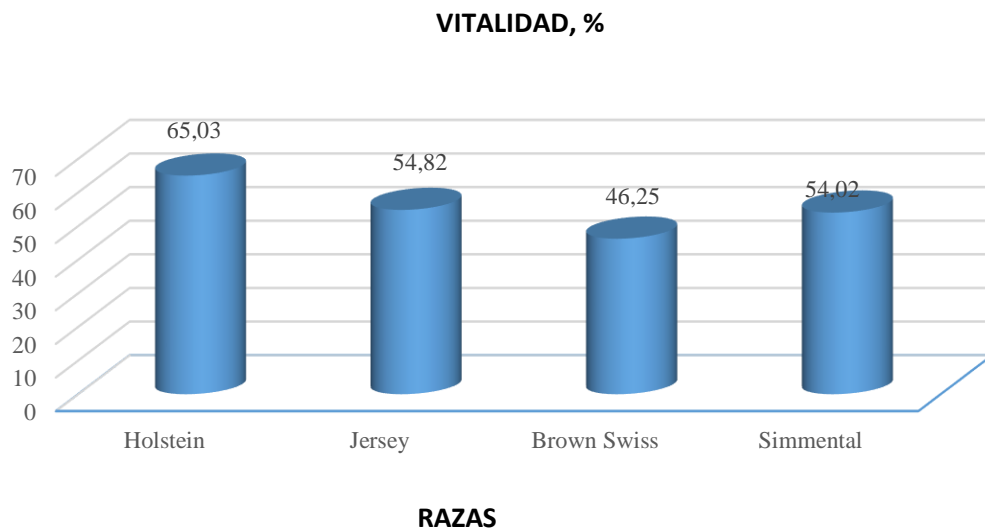


Gráfico 22-4: Vitalidad del semen post descongelación en relación a la raza

Realizado por: Sánchez, Ricardo, 2022.

Vergara, S (2016) al utilizar Trilady en toros raza Holstein reportó un porcentaje de vitalidad del 46,40% mismo que es inferior al hallado en el presente resultado en relación a dicha raza Patarón, S (2021); registro una vitalidad de 54,13% en semen descongelado de toro Jersey dato que coincide con el encontrado en el presente documento. Ludueña, E. (2019), evaluó el semen post descongelado de dos biotipos de ganado criollo en la provincia de Loja donde registró 49,83 y 44,46% correspondientes al biotipo encerado y negro lojano valores inferiores a los descritos en la presente investigación.

En el gráfico 7-4 podemos ver como el semen de la raza Holstein evidencia una ligera resistencia al proceso de congelación, por ende, un mejor porcentaje de vitalidad gracias a la cantidad de enzima que tiene esta raza en su sistema la cual la hace más resistente a ataque de radicales libres protegiendo a la membrana plasmática y por ende obteniendo un mejor porcentaje de vitalidad.

4.5.3 Anormalidades, %

Para el porcentaje de morfoanomalías no se registró diferencias estadísticas entre los grupos raciales ($P>0,05$) a pesar de esto, existieron diferencias de tipo numérico en el cual, el linaje de Jersey tuvo el menor número de morfoanomalías con 12,75% seguido por la Holstein con 13,40%; el Simmental presentó una media de 13,52%, siendo, el porcentaje más alto el registrado por el Brown Swiss con un valor de 13,96% $\pm 0,43\%$ para cada raza.

Resultado que al ser comparado con Quisbert, G (2014) es superior ya que dicho autor describió un porcentaje de anomalías en semen congelado del 22,9% en toros holstein, en tanto que González, B (2002) encontró anomalías del 13,6 y 13,5 % en Jersey y Holstein coincidiendo con los valores registrados en el presente documento. Otro valor fue hallado por López, N (2015) quien registro un porcentaje de anomalía de 6,2% en toros Jersey. El 11% de morfoanomalías fue reportado por Palacios, L (2015) en toros Brown Swiss valor inferior al del presente trabajo.

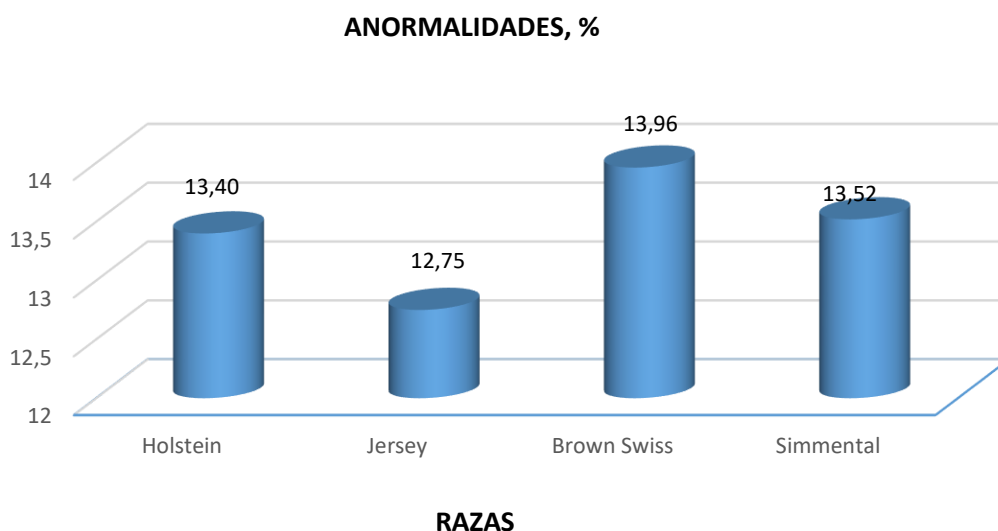


Gráfico 23-4: Anormalidades del semen post descongelación en relación a la raza

Realizado por: Sánchez, Ricardo, 2022.

En el gráfico 3-4 se muestra como el porcentaje de morfoanomalías no difieren entre los tratamientos debido posiblemente al estado fisiológico de las gónadas dado que es durante el proceso de la espermatogénesis donde se produce la mayoría de anomalías especialmente si este proceso es defectuoso o a su vez estos resultados se den por una inadecuada manipulación del semen o una baja calidad espermática al momento de criopreservarlo (Valverde A 2018).

4.5.4 Integridad de la membrana, %

Pajuelas provenientes del toro Brown Swiss presentan el promedio más bajo (Tabla 13-4) en cuanto a integridad de la membrana con 57,75% la cual difiere estadísticamente ($P < 0,01$) del resto de razas, siendo el Holstein quien registra el mejor porcentaje con un promedio de 68,90% seguido por el Jersey y Simmental con 65,61 y $65,62 \pm 4,10\%$ respectivamente.

En el caso de la raza Holstein (Vergara, Alarcón, Sosa, Cortés, & Gallegos, 2017) al utilizar Trilady como diluyente obtuvo el 38,28% en la integridad de la membrana post congelación, mismo que es inferior al reportado en la presente investigación.

La prueba de endosmosis celular HOST mostro el 60% de la integridad en la membrana en la raza Jersey dato registrado por López, N (2015) en su estudio sobre el efecto de la criopreservación en la integridad de la membrana plasmática en espermatozoides de toro, valor que es inferior al obtenido en el presente estudio.

Palacios, L (2015) obtuvo el 28,14% al emplear Andromed y Trilady en medios de congelación de semen de toros Brown Swiss siendo ampliamente inferiores a los encontrados en la presente investigación.

En el gráfico 9-4 se muestra la variación en el porcentaje de integridad de la membrana mismo que se debe posiblemente a la actividad antioxidante enzimática en semen de toros Holstein y Angus con el 5810,7 U/ml de GPx cuyo antioxidante impide la formación de nuevos radicales libres que aumenten la permeabilidad de la membrana causando distintas anomalías (Flores, C y Medina, C 2013). Son pocos los trabajos donde se dan a conocer la actividad enzimática de GPx como mecanismo antioxidativo, al ser catalizador de las especies libres de nitrógeno a pesar de ello, Nichi, M (2006) señala que toros Simmental poseen más cantidad de glutatión peroxidasa 741,5 U/ml de GPx frente a toros Nelore 510 U/ml de GPx en su estudio realizado acerca de la variación estacional en la calidad del semen en Bos indicus y Toros Bos taurus criados en condiciones tropicales.

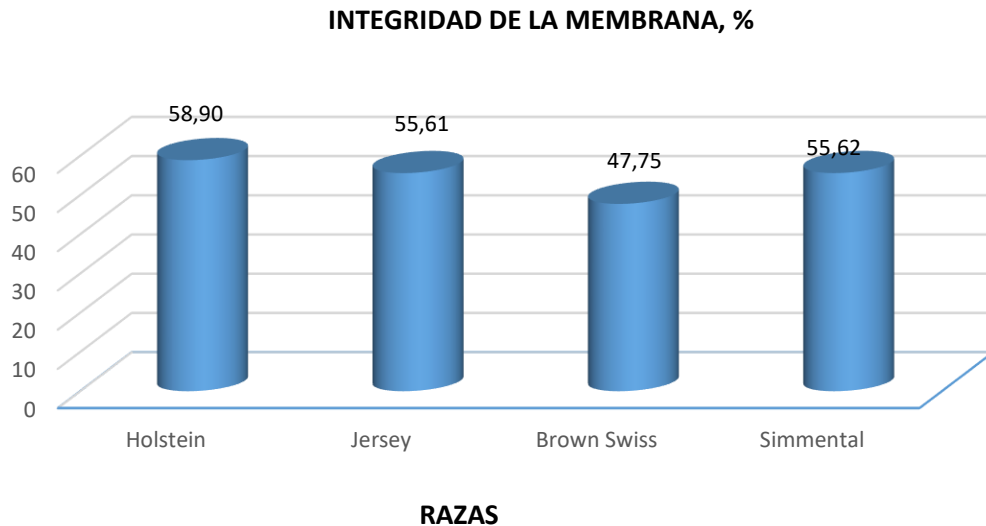


Gráfico 24-4: Motilidad individual del semen post descongelación en relación a la raza

Realizado por: Sánchez, Ricardo, 2022.

4.5.5 Integridad del acrosoma, %

La evaluación de pajillas post descongelación mostraron diferencias significativas ($P < 0,01$) para esta variable donde el mejor valor se halla registrado con el toro Holstein con el 66,76%; seguido por los toros Simmental, Jersey y Brown Swiss con porcentajes de la integridad del acrosoma de 59,36; 58,83 y 55,12% respectivamente con una dispersión de 4,22 % para cada media como se observa en la (Tabla 13-4).

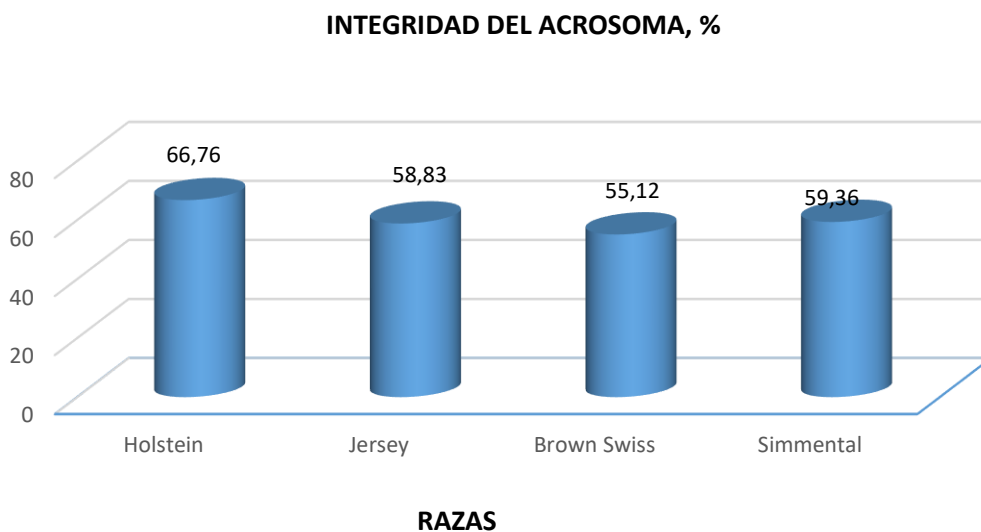


Gráfico 25-4: Integridad del acrosoma del semen post descongelación en relación a la raza

Realizado por: Sánchez, Ricardo, 2022.

Grober, Q (2014), registro en toros raza Holstein un porcentaje de integridad del acrosoma del 73,7% en semen congelado superior al del presente documento Próspero, C (2012) reportó un 49,1% de integridad del acrosoma para el fenotipo Brown Swiss, porcentaje que es inferior a los descrito en esta investigación.

Durante el proceso de congelación la integridad del acrosoma se encuentra comprometido dado el cambio en la fluidez de la membrana plasmática o por la misma despolarización de la membrana del acrosoma provocando un cambio en los canales de calcio importante en la reacción acrosomal (García, G 2015); todo este proceso puede verse influenciado por la presencia de radicales libres de oxígeno mismo que son controlados por la glutatión peroxida transformando el peróxido de hidrogeno en oxígeno no molecular, agua y glutatión oxidado (Flores, C y Medina, C 2013) reduciendo el daño en la membrana y evitando la despolarización de la membrana acrosomal; procedimiento que dependerá de la cantidad de glutatión peroxida que cada gupo racial presente en el plasma seminal.

Tabla 4-4: Efecto de la raza sobre la calidad seminal post descongelado

RAZA	HOLSTEIN	JERSEY	BROWN SWISS	SIMMENTAL	EE	Prob
PARÁMETROS						
Motilidad Individual,						0,000
%	64,27 a	57,69 b	46,98 c	56,25 b	6,17	1
						0,000
Vitalidad %	65,03 a	54,82 b	46,25 c	54,02 b	6,67	1
						0,275
Morfoanomalias %	13,40 a	12,75 a	13,96 a	13,52 a	0,43	8
						0,000
I. de la membrana %	68,90 a	65,61 b	57,75 c	65,62 b	4,10	1
						0,000
I. del acrosoma %	66,76 a	58,83 b	55,12 c	59,36 b	4,22	1

Letras iguales no difieren estadísticamente

EE: Error estándar

Prob: Probabilidad

Realizado por: Sánchez, Ricardo, 2022.

4.6 Evaluación en campo

4.6.1 Tasa de concepción

Posterior a la inseminación artificial que se realizó a seis vacas de raza Holstein, transcurrido el tiempo adecuado (35 días), mediante ecografía se logró determinar lo siguiente:

Las vacas que fueron inseminadas con pajuelas pertenecientes al tratamiento T2 (Glutación) tuvieron una efectividad del 100%, es decir ambos animales resultaron preñados. En cuanto los animales que fueron inseminados con los tratamientos T0 (testigo) y T1 (cafeína), ambos tuvieron una efectividad del 50%.

Dichos resultados obtenidos nos indican una leve superioridad del tratamiento donde las pajuelas fueron adicionadas con glutación con respecto a la cafeína y al tratamiento testigo, sin embargo, estos resultados no son del todo concluyentes en base a que la muestra de animales inseminados es algo pequeña, a su vez se encuentran inmersas otras variables a tomar en cuenta que influyen directamente en la preñez de una vaca y por ende en la tasa de concepción.

La tasa de concepción está influenciada por varios factores inherentes al animal como son la edad, número de partos, peso, condición corporal, estrés como también factores ambientales que permiten mayor o menor adaptación al medio ambiente, de igual manera si el animal está bajo un sistema reproductivo mediante el uso de inseminación artificial, donde influirá la destreza del inseminador que realice dicha actividad, la calidad de la pajueta también juega un rol primordial en sistemas reproductivos con inseminación artificial, la cual dependerá en gran parte a la forma como esta sea reconstituida es decir sea descongelada (Laing, Brinley & Wagner, 1991).

CONCLUSIONES

El semental de raza Holstein demostró poseer mayor eficiencia en comparación con las razas jersey, Brown Swiss y Simental, durante el proceso de colecta presentando un mayor volumen de eyaculado de 8,16 ml, como también una mayor concentración espermática de 965,5 millones de espermatozoides /ml, de igual manera presento mayor aptitud sobre las demás razas durante el proceso de crioconservación principalmente en la fase de post congelación en las variables de motilidad individual con 64,27%, vitalidad con 65,03%, integridad de la membrana con un valor de 68,9% e integridad de acrosoma con 66,76%.

La adición de 1,53 mg de glutatión al diluyente comercial Triladyl tuvo un efecto positivo durante la fase de post congelación, principalmente en los parámetros de motilidad individual con un valor de 62,5%, vitalidad con 62,79%, integridad de la membrana plasmática donde se obtuvo un valor de 61,14% e integridad del acrosoma donde se reportó un valor de 67,24%, no hubo efecto alguno sobre las anormalidades espermáticas, demostrando así su capacidad antioxidante, y su efecto contra lo formación de radicales libres durante el proceso de crio conservación, manteniendo así la calidad espermática.

La adición de 1,94 mg de cafeína al medio de crioconservación resulto ser efectiva durante la fase de pre congelación, principalmente en las variables de motilidad masal con un valor de 4,31% y vitalidad con un valor de 85,24%, pero demostró ser ineficiente en semen en las fases posteriores a la congelación, donde dichas variables tienden a reprimirse considerablemente, posiblemente debido a la hiper activación que las células espermáticas presentan por efecto de la cafeína al inicio del proceso de crioconservación.

RECOMENDACIONES

Emplear la adición de 1,54 mg de glutatión como fuente antioxidante durante los procesos de crioconservación de semen bovino.

Investigar la utilización de 1,94 mg cafeína como hiper activador espermático en protocolos que utilizan semen fresco.

Investigar otras fuentes antioxidantes que presenten mayor eficiencia en las razas de toros con menos aptitud a los procesos de crioconservación.

GLOSARIO

Glutati3n: Sustancia que se encuentra en los tejidos vegetales y animales, y que desempeña muchas funciones en la c3lula, como la activaci3n de ciertas enzimas y la destrucci3n de compuestos t3xicos y sustancias qu3micas que contienen ox3geno.

Cafe3na: Se denomina cafe3na a un alcaloide presente en el caf3, el chocolate, el t3 y el mate, que forma parte del conjunto de las xantinas. Se trata de una sustancia diur3tica, cardiot3nica y que estimula el sistema nervioso central.

Antioxidante: Antioxidante es aquello que minimiza o impide la oxidaci3n: el proceso que provoca un agente oxidante cuando, al reaccionar con otra sustancia, genera 3xido (un compuesto derivado de la combinaci3n de ox3geno con un metaloide o un metal).

Pajuelas: Las pajuelas son el soporte en el que los bi3logos vitrifican los embriones conseguidos en un ciclo de FIV. En ellas, los embriones pueden congelarse individuales o en grupos.

Semen: Conjunto de espermatozoides y sustancias fluidas que se producen en el aparato genital masculino de los animales y de la especie humana.

Espermatozoide: C3lula reproductora masculina de los animales, destinada a la fecundaci3n del 3vulo; mide de diez a sesenta micras de longitud y est3 compuesta de una cabeza que contiene el material cromos3mico y de una cola o flagelo que act3a como propulsor.

Inseminaci3n: T3cnica de reproducci3n asistida en la que se introduce el esperma en la vagina de la hembra por medios mec3nicos.

BIBLIOGRAFÍA

- Agarwal A, Bui AD. Oxidation-reduction potential as a new marker for oxidative stress: Correlation to male infertility. 2017;385–99.
- Aquino Marco Antonio. (2017). LA MOLINA. Universidad Agraria La Molina.
- Bailey, J. Y Buhr, M. 1994. Cryopreservation alters the Ca⁺⁺ flux of bovine spermatozoa. *Can. J. Anim. Sci.* 74, 45-51.
- Balercia G, Armeni T, Mantero F, Principato G, Regoli F. (2003) Total oxyradical scavenging capacity toward different reactive oxygen species in seminal plasma and sperm cells. *Clin Chem Lab Med.* Jan 41(1):13–9.
- Ball BA, Medina V, Gravance CG, Baumbe J. (2001). Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5 degrees C. *Theriogenology.* 56(4), 577–89.
- Ball, BA. Y VO, A. 2001. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potential. *J Androl.* . 22, 10611069.
- Ballatori N, Krance SM, Notenboom S, Shi S, Tieu K, Hammond CL (2009) Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol Chem* 390:191-214.
- Barakat, I. A. H., Danfour, M. A., Galewan, F. A. M., & Dkhil, M. A. (2015). Effect of Various Concentrations of Caffeine , Pentoxifylline , and Kallikrein on Hyperactivation of Frozen Bovine Semen. 2015.
- Barragán I, Evaluación del efecto crioprotector de diferentes fuentes de antioxidantes en el semen bovino. Facultad de Ciencias Pecuarias, 51-54 pp. 2017.
- Bassas Arnau, L. (2009). Exploración de la Función Testicular. Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición.
- Cabrera V, Próspero, & Pantoja A, César. (2012). Viabilidad espermática e integridad del acrosoma en semen congelado de toros nacionales. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 23(2), 192-200. Recuperado en 21 de marzo de 2022, de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172012000200009&lng=es&tlng=es.
- Camargo, O., Ramírez, J., & Oliveira, M. (1999). Radicales libres y desarrollo embrionario. *Rev Col Cienc Pec*, 12(2), 108–118.
- Cárdenas, N., & Pedraza, J. (2006). Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes : aspectos básicos.

- Carvajal, M. (2016). Determinación de la actividad de las enzimas antioxidantes del plasma seminal en tres razas ovinas bajo condiciones de trópico alto Colombiano. Universidad Nacional de Colombia.
- Castelo. T. (2008). Considerações sobre a criopreservação do sêmen. *Acta veterinaria*, Pág 67-75.
- Chatterjee S, de Lamirande, E, Gagnon C. (2001). Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: protection by oxidized glutathione. *Molecular Reproduction and Development*. 60(4), 498–506.
- Chatterjee, S.; DE LAMIRANDE, E. Y GAGNON C. 2001; Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: protection by oxidized glutathione. *MolReprodDev* 60: 498-06.
- Chaveiro A, Machado L, Frijters A, Engel B, Woelders H. 2006. Improvement of parameters of freezing medium and freezing protocol for bull sperm using two osmotic supports. *Theriogenology* 65. 1875-1890.
- Chihuailaf M, Chihuailaf RH, Contreras PA, Wittwer FG. Patogénesis del estrés oxidativo: Consecuencias y evaluación en salud animal Pathogenesis of oxidative stress: Consequences and evaluation in animal health. *Vet México*. 2002;33(3):265–83.
- Comporti, M. (1989). Three models of free radical-induced cell injury. *Chemico-Biological Interactions*. 72(1-2), 1–56.
- Contri. A. (2010). Effect of semen preparation on casa motility results in cryopreserved bull spermatozoa. *Theriogenology*.
- Córdova, A., Espinosa, R., Guerra, J., Iglesias-reyes, A. E., & Villa-mancera, A. E. (2017). Importancia del estrés oxidativo en los espermatozoides, (I), 208–214.
- Correa JR, Zavos PM. 1994. The hipoosmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. *The-riogenology* 42: 351-360
- De Alba Romero, M. (2014). Valoración de la calidad de semen bovino., Jornada ABEMBE Problemas reproductivo de las vacas nodrizas (págs. 40-44). Madrid: Universidad Complutense.
- De la Vega C. Adolfo, Wilde R. Osvaldo y Cruz L. M. Efectos de la pentoxifilina y la cafeína sobre la motilidad de espermatozoides bovinos criopreservados, *Avances en Ciencias Veterinarias Vol 12 (2) Julio - Diciembre 1997*
- De Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H, Gagnon C. (1997). Reactive oxygen species and sperm physiology. *Reviews of Reproduction*. 2(1), 48–54.
- Dun MD, Aitken RJ, Nixon B. (2012). The role of molecular chaperones in spermatogenesis and the post-testicular maturation of mammalian spermatozoa. *Human Reproduction Update*. 18(4), 420–35.

- EL- Gaafary M.N., Daader A.H and Ziedan A. 1990. Effects of caffeine on bull semen quality and sperm penetration into cervical mucus. *Animal Reproduction Science* 23: 13- 19.
- El-Alamy, M. y Foote, rh. 2001. Freezability of spermatozoa from Finn and Dorset rams in multiple semen extenders. *Anim. Repro. Sci.* 65, 245-254.
- Fisone G, Borgkvist A, Usiello A. Caffeine as a psychomotor stimulant: Mechanism of action. *Cell Mol Life Sci.* 2004;61(7–8):857–72.
- Florman HM, Storey BT. 1982. Mouse gamete interactions: the zona pellucida is the site of the acrosome reaction leading to fertilization in vitro. *Develop Biol* 91: 121-130.
- Ford, W. C. L. (2001). Reactive oxygen species and sperm. *Human Fertility*, 4, 77–78.
- Franco R, Cidlowski JA (2009) Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant. *Cell Death Differ* 16:1303-1314.
- Fraser LR 1994. Sperm functional changes from ejaculation to fertilization. *Ares-Serono Symposia* 8: 46-66.
- Freeman BA & Grapo JD. (1982). Biology of disease Free radicals and tissue injury. *Lab Invest.* 47:412-426.
- Gadea, J., Guambo, D., Cánovas, S., & Grullón, L. (2007). Supplementation of the dilution medium after thawing with reduced glutathione improves function and the in vitro fertilizing ability of frozen-thawed bull spermatozoa. 40–49. Obtenido de: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2007.00756.x>
- Gadea J, Sellés E, Marco MA, Coy P, Matás C, Romar R, Ruiz S. (2004). Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Theriogenology.* 62(3-4), 690–701.
- Galarza, A. (2018). Eficacia de dos diluyentes: andromed y triladyl en la crioconservacion de semen de toro de la raza jersey en cuenca ecuador (universidad de cuenca). Obtenido de: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/526>
- Garbers D.I., First N.L., Sullivan J.J. and Lardy H.A. 1971a. Stimulation and maintenance of eyaculated bovine spermatozoan respiration and motility by caffeine. *Biol. Reproduction* 5: 336-339.
- García, B. M., Fernández, L. G., Ferrusola, C. O., Tapia, J. A., Morcuende, D., & Peña, F. J. (2011). Fatty acids and plasmalogens of the phospholipids of the sperm membranes and their relation with the post-thaw quality of stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 75(5), 811–818.
- García, G. (2015). Efectos de los antioxidantes en la preservaciòn espermática tras procesos de congelación. Universidad de Jaén.

- Gardón, J., & Matas, C. (2001). Efecto del protocolo de preparación de los espermatozoides bovinos sobre el patrón de reacción acrosómica. 26, 19–26. Retrieved from <https://revistas.um.es/analesvet/article/view/16541>
- Garner, D.L. Y Háfes E.S.E 2000. Spermatozoa and Seminal Plasma. En: Háfes, E.S.E. and Háfes. B (eds)., *Reproduction in farm animals*, 7th edition. Lippincott Williams & Wilkins Company, Philadelphia, pp 96-109. 27.
- Gastelum E, Zapien A, Briceño J. 1989. Algunas características en la colección y preservación de semen bovino. Patronato del Centro de Investigaciones Pecuarias del Estado de Sonora AC. Obtenido de:
<http://www.patrocipes.org.mx/publicaciones/reproduccion/R89006.php>
- Gil, R. (2014). Estrés oxidativo y respuesta inflamatoria sistémica tras isquemia-reperfusión en el postoperatorio de cirugía cardiovascular pediátrica. Universidad de Málaga.
- Gonzales, J; Martínez, Y; & Sánchez, D. (2013). Análisis seminal de Bovinos y Equinos. Análisis Básico.
Obtenido de: <http://invitrosperm.blogspot.mx/2013/01/analisis-seminal-equino-ybovino.html>
- Guambao, D. (2015). Efecto antioxidante del glutatión aplicado en el medio de descongelación seminal de tres especies con interés pecuario. Universidad de Murcia.
- Gutiérrez-Pérez O, Juárez-Mosqueda, M, Uribe Carvajal S, Trujillo Ortega M. Boar spermatozoa cryopreservation in low glycerol/trehalose enriched freezing media improves cellular integrity. *Cryobiology* 58 (2009) 287–292
- Gutteridge JM & Halliwell B. (2000). Free radicals and antioxidants in the year 2000 A historical look to the future. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 899, 136–47.
- Hafez, E., & Hafez, B. (2000). *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales*. Kiawah Island, South Carolina USA: McGraw-Hill Interamericana.
- Hafez. B. (2000). *Espermatogénesis, Reproducción e inseminacion en animales*. USA: McGraw Hill.
- Halliwell B & Gutteridge JMC. (1989). Lipid peroxidation: a radical chain reaction In: *Free radicals in biology and medicine* Halliwell, B and Gutteridge, JMC (eds), Oxford Clarendon Press, pgs 188-276.
- Harman D. (2003). The free radical theory of aging. *Antioxidants & Redox Signaling*. 5(5), 557–61.

- Helleman C, Y Jara C. 1997. Efecto de un surfactante sobre la integridad de espermatozoides ovinos crioconservados. Archivos de medicina veterinaria. 29, 153-160.
- Hernández, D., & Carrillo-Gonzales, D. (2015). Aplicación del test hipoosmótico (host) en la evaluación de calidad seminal en ovinos criollos de pelo colombiano. Actas Iberoamericanas de Conservación Animal.
- Hidalgo, C; Tamargo, C; y Monforte, C. (2005). Analisis de semen Bovino. Obtenido de: [www.serida.org: http://www.serida.org/publicacionesdetalle.php?id=01495](http://www.serida.org/publicacionesdetalle.php?id=01495)
- Ho, H., & Suarez, S. S. (2001). An Inositol 1, 4, 5-Trisphosphate Receptor-Gated Intracellular Ca²⁺ Store Is Involved in Regulating Sperm Hyperactivated Motility. 1. 1615(July), 1606–1615.
- Irvine DS. (1996). Glutathione as a treatment for male infertility. Reviews of Reproduction. 1, 6–12.
- Kumar, U., Gawande, A., Sahatpure, S., Patil, M., K, L. C., Bonde, S. W., . Poharkar, A. a. (2015). Assessment of semen quality in pure and crossbred Jersey bulls. Veterinary World.
- Laing, J.A.; Brin Ley, W.J. & Wagner, W.C. Fertilidad e Infertilidad en la práctica veterinaria. Barcelona : Interamericana. McGraw-Hill p. 68-72. 1991.
- Lavranos, G, Balla M, Tzortzopoulou A, Syriou V, Angelopoulou R. Investigating ROS sources in male infertility: A common end for numerous pathways. Reprod Toxicol. 2009;34(3):298–307.
- Lemma, A., & Shemsu, T. Effect of Age and Breed on Semen Quality and Breeding Soundness Evaluation of Pre-Service Young Bulls. Reproduction and Infertility, 6(2),2015, 35–40. Obtenido de: <https://doi.org/10.5829/idosi.jri.2015.6.2.94131>
- López, N., & Rivera, D. (2015). Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática en espermatozoides de toro (Zamorano). Obtenido de: <https://www.google.com/search>
- Ludeña, E. Evaluación de dos antioxidantes en la calidad seminal post congelación de dos biotipos de ganado bovino criollo de la provincia de Loja; Universidad Nacional de Loja. 29-31 PP. 2019
- Luño, V., L. Gil, M. Olaciregui, R. A. Jerez, I. Blas y F. Hozbor. 2014. Antioxidant effect of lemon balm (*Melissa officinalis*) and mate tea (*Ilex paraguensis*) on quality, lipid peroxidation and DNA oxidation of cryopreserved boar epididymal spermatozoa. Andrologia, 47(9), 1004-1011.
- Ma M & Eaton JW. (1992). Multicellular oxidant defense in unicellular organisms. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 89(17), 7924–8.

- Madrid-Bury N. 2005. Es posible predecir la fertilidad en los toros. Manual de ganadería doble propósito. Maracaibo, Venezuela: Astro Data. p 631-635.
- Madrid-Bury, N. Relación entre los métodos de valoración seminal in vitro y la fertilidad in vivo del semen descongelado de toros frisonos. Universidad Complutense de Madrid, España. División de Estudios de Postgrado. Facultad de Veterinaria. Tesis Doctoral. 1-164 pp. 2004.
- Mahfouz, R., Sharma, R., Ph, D., Lackner, J., & Aziz, N. (2009). Evaluation of chemiluminescence and flow cytometry as tools in assessing production of hydrogen peroxide and superoxide anion in human spermatozoa. *Fertility and Sterility*, 92(2), 819–827.
- Malo, C., L. Gil, R. Cano, N. González y V. Luño. 2012. Fennel (*Foeniculum vulgare*) provides antioxidant protection for boar semen cryopreservation. *Andrologia*, 44(s1), 710-715.
- Mann, T. (1975). Biochemistry of semen. En: *Handbook of Physiology, Section 7, Endocrinology, Vol. V, Male Reproductive System*. R.O. Greep y E.B. Astwood(eds.). Washington, DC, American Physiological Society.
- Medina, V., Sanchez, E., Velasco, Y., & Cruz, P. (2007). Crioconservación de semen bovino usando un congelador programable (c1-8800) y determinación de su calidad postdescongelación por medio de un sistema de análisis espermático asistido por computador (CASA). Universidad de Los Llanos.
- Mejía, J. (2017). Evaluación pre y post congelación del semen obtenido con vagina artificial y electro eyaculador en el ganado criollo. Universidad de Cuenca. Recuperado de:
<http://dspace.ucuenca.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/26940/1/Tesis.pdf>
- Minitube., (2012). Manual Triladyl®. Obtenido de Perulactea.com:
<http://www.perulactea.com/wp-content/uploads/2012/09/DILUYENTE-DE-SEMEN-BOVINO-TRILADYL.pdf>
- Miquel J. (1991). An integrated theory of aging as the result of mitochondrial-DNA mutation in differentiated cells. *Archives of Gerontology and Geriatrics*. 12(2-3), 99–117.
- Molinia, FC. et al. 1994b. Effect of monosaccharides and disaccharides in Tris-based diluent on motility, acrosome integrity and fertility of pellet frozen ram spermatozoa. *Anim. Repro. Sci.* 36, 113- 122.
- Molinia, FC.; Evans, G. Y Maxwell, WM. 1994a. Incorporation of penetrating cryoprotectants in diluents for pellet-freezing ram spermatozoa. *Theriogenology*. 42, 849-858.

- Moncayo P.S. Evaluación de la calidad seminal de reproductores bovinos antes y después del proceso de criopreservación. Universidad Politécnica Salesiana. 38-39 pp. 2016
- Muhammad, AR.; et al. 2002. Sperm Apoptosis in Fresh and Cryopreserved Bull Semen Detected by Flow Cytometry and Its Relationship with Fertility, *Biology of Reproduction*. 66: 354-360.
- Muiño, R. (2000). UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA FACULDADE DE VETERINARIA Departamento de Patología Animal.
- Núñez Selles A. Terapia antioxidante, estrés oxidativo y productos antioxidante: retos y oportunidades. *Rev Cuba Salud Pública*. 2011;37(Ldl):644–60.
- Olegario, C; Tamargo, C; y Diez, C. (2012). Análisis de semen bovino. Obtenido de <http://invitrosperm.blogspot.mx/2013/01/analisis-seminal-equino-y-bovino.html>
- Peña A, Linde-Forsberg C. 2000. Effects of spermatozoa concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa. *Theriogenology* 54: 703-718.
- Polge C & Jakobsen KF. (1959). Techniques for freezing boar semen. *Vet Rec*. 71, 928.
- Porras, A., Páramo, R., Rangel, L., Alarcón, M., Hidalgo, C., Cerón, J., . . . Flores, H. (2009). Manual de practicas de reproduccion animal. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Quisbert, G. (2014). Suplementación de selenio sobre la calidad espermática de sementales bovinos en la estación experimental de Choquenaira.
- Ramos L & Wetzels AM. (2001). Low rates of DNA fragmentation in selected motile human spermatozoa assessed by the TUNEL assay. *Human Reproduction*. 16(8), 1703–7.
- Reichard P & Ehrenberg A. (1983). Ribonucleotide reductase--a radical enzyme. *Science. Reproduction*. 1, 6–12.
- Rodrigo, A. (2016). Prueba de vitalidad: espermatozoides inmóviles vivos o muertos. Obtenido de: www.reproduccionasistida.org: <http://www.reproduccionasistida.org/analisis-de-la-vitalidad-de-los-espermatozoides>
- Rubio, J., Quintero, A., & González, D. (2009). Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides de toros. *Revista Científica FCV-LUZ*, 382-389.
- Rubio-Guillén J, González D, González Y, Madrid N, Quintero A. 2007. ¿Puede el ORT complementar las pruebas clásicas de valoración Seminal y predecir la fertilidad en to-ros? *Arch Latinoam Prod Anim* 15 (Supl. 1): 329
- Rubio-Guillén J, González D, Quintero A. 2006b. ORT: Un test muy útil para evaluar localidad seminal de toros. *ConTacto Veterinario FCV-LUZ*. 6 (12): 19-20.

- Rubio-Guillén J. 2006. Efecto del proceso de criopreservación sobre la calidad seminal y fertilidad de toros Holstein, Brahman y sus mestizos. Universidad del Zulia. Facultad de Cs. Veterinarias. (Tesis de Maestría). Maracaibo, Venezuela. 103
- Rutter, B., & Russo, A. (2006). Bases para la evaluación de la aptitud reproductiva (Segunda; E. Capdevielle, Ed.). Obtenido de: <https://docplayer.es/55664957-Bases-para-la-evaluacion-de-la-aptitud-reproductiva-del-toro-bruno-rutter-angel-russo-buenos-aires-2006-prologo-a-la-segunda-edicion.html>
- Salomon, S. Y Maxwell, W. 2000. Storage of ram semen. *Anim. Repro. Sci.* 62, 77-111.
- Salviano, M. B. , & Torres De Souza, J. A. (2015). Avaliação andrológica e tecnologia do sêmen caprino. www.cbra.org.br
- Sarıözkan, S., Numan, M., Barbaros, P., Ulutas, P. A., & Bilgen, A. (2009). Cryobiology The influence of cysteine and taurine on microscopic – oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation q. 58, 134–138. Obtenido de: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2008.11.006>
- Schill W.B. 1982. Therapie der idiopathischen astheno and oligozoospermie mit pentoxifylline. *Fortschr. Med.* 100: 696-700.
- Schilling E, Vengust M, Bajt G, Tomcic M. 1986. The osmotic resistance (ORT) of boarspermatozoa and the relation to pregnancy rate and litter size. *Proc 9th IPVS Congress, Barcelona*, pp 77 (Abstr.).
- Schoenfeld C., Amelard R.D. and Dubin L. 1975. Stimulation of ejaculated human spermatozoa by caffeine. *Fertil Steril* 26: 158-161.
- Shen M.R., Chiang P.H., Yang R.C., Hong C.Y. and Chen S.S. 1991. Pentoxifylline stimulates human sperm motility both in vitro and after oral therapy. *Br. Jour. Clin. Pharmacol.* 31: 711-714.
- Sies H & Cadenas E. (1985). Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 311:617–31.
- Srivastava, S., & Kumar, S. (2014). Incorporation of Ascorbic Acid , Caffeine and Chloroquine Diphosphate in Dilutor Improves Structural and Functional Status of Frozen Semen. (February), 1–12.
- Stefanovich V. 1973. Effect of 3,7 - dimethyl - 1 - (5 - oxohexyl) - xanthine and 1 - hexyl - 3,7 - dimethyl - xanthine on cyclic AMP phosphodiesterase of the human umbilical cord vessels. *Res. Commun. Chem. Phatol. Pharmacol.* 5: 655-662.
- Stephens, T. D., R. M. Brooks, J. L. Carrington, L. Cheng, A. C. Carrington, C. A. Porr y R. K. Splan. 2013. Effects of pentoxifylline, caffeine, and taurine on post-thaw motility and longevity of equine frozen semen. *J. Equine Vet. Sci.* 33: 615-621.

- Tartaglione CM, Ritta MN. 2004. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* 62: 1245-1252.
- Tortolero, I., Arata, G., Osuna, J., Gómez, R., & Regadera, J. (2005). Estrés oxidativo y función espermática . Revisión. *Rev Venezolana de Endocrinología Y Metabolismo*, 3(3), 12–19. Retrieved from http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1690-31102005000300003bn
- Tremellen K. (2008). Oxidative stress and male infertility-a clinical perspective. *Human Reproduction*. 14:243-258.
- Valdez, J. M. (2018). Adición de fuentes antioxidantes al diluyente de semen bovino y sus efectos posdescongelamiento. Universidad Autónoma de Chihuahua.
- Valenzuela, C. (2009). Manual de Evaluación de Semen en Bovinos. <http://cdigital.uv.mx/bitstream/12345678/147/1/JOSe%20NICOLaS%20ANGELINO%20LIVERA.pdf>.
- Valle, A.F.; Puerta, M. Influencia de factores climáticos sobre las características seminales de toros Holstein y Pardo suizo nacidos en el trópico. *Rev. Fac. Agron.* 22: 52-61. 2005.
- Vallecillo, Á, (2011). En caracterización reproductiva de toros de la raza marismeña como base a su conservación. Córdoba, España; Universidad de Córdoba.
- Valverde, A. (2018). Sistemas de análisis computadorizado de semen en la reproducción animal 1 Computer-assisted semen analysis systems in animal reproduction. 29(2), 469–484. <https://doi.org/10.15517/ma.v29i2.29852>
- Vélez Castañeda, Leonardo, Rugeles Pinto, Clara, Vergara Garay, Oscar Efecto de la raza sobre las características reproductivas de toros manejados en sistemas extensivos. *Revista Científica [en línea]*. 2014, XXIV(4), 341-346
- Veloz, D. (2017). Facultad de Ciencias Agropecuarias MAESTRIA EN REPRODUCCIÓN ANIMAL TITULO : "Evaluación de la calidad espermática de reproductores bovinos mediante el uso de sistemas de evaluación seminal convencional y sistema CASA (análisis seminal asistido por computa (Universidad de Cuenca). Retrieved from <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/28466>
- Vergara, S., Alarcón, G., Sosa, G., Cortés, C., & Gallegos, J. (2017). EVALUATION OF A DILUTOR ELABORATED WITH *Opuntia* sp . 10, 82–86.
- Wang AW, Zhang H, Ikemoto I, Anderson DJ, Loughlin KR. (1997). Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. *Urology*. 49(6), 921–5.

- Watson, P. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved Semen. *Anim.Repro Sci.* 60-61, 481-492.
- Weng SL, Taylor SL, Morshedi M, Schuffner A, Duran EH, Beebe S, Oehninger S. (2002). Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm. *Molecular Human Reproduction.* 8(11), 984–91.
- White, I. 1980. Secretion of the male reproductive tract and seminal plasma. En: *Reproduction in Farm Animals.* 4th ed. E.S.E. Hafez (ed.). Philadelphia, Lea &Febiger.
- Yeste M, Castillo-Martín M, Bonet S, Briz MD. (2012). Direct binding of boar ejaculate and epididymal spermatozoa to porcine epididymal epithelial cells is also needed to maintain sperm survival in in vitro co-culture. *Animal Reproduction Science.* 131(3-4), 181–193.

ANEXOS

ANEXO A: COLECTA DE SEMEN

ARMADO DE VAGINA ARTIFICIAL



COLECTA DE SEMEN BOVINO



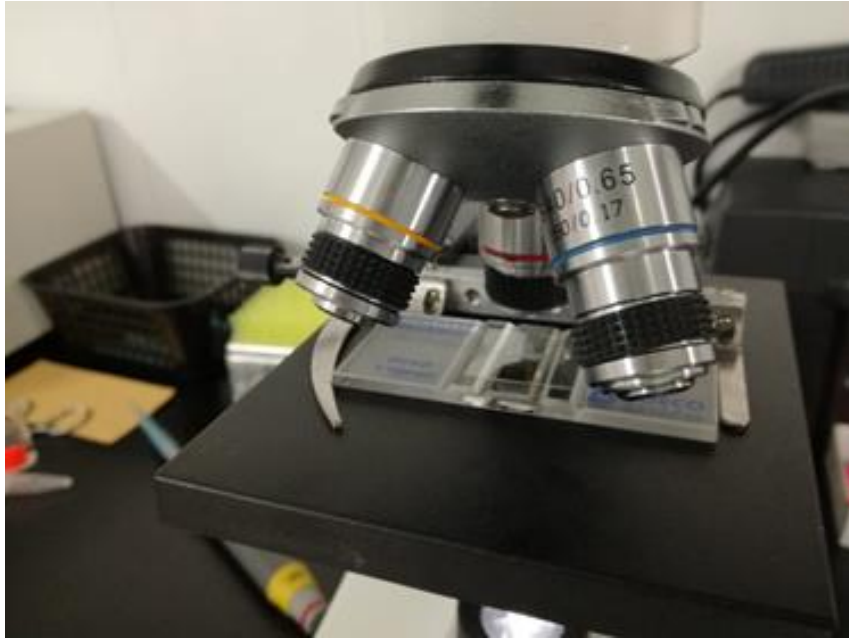
ANEXO B: PREPARACIÓN DEL DILUYENTE



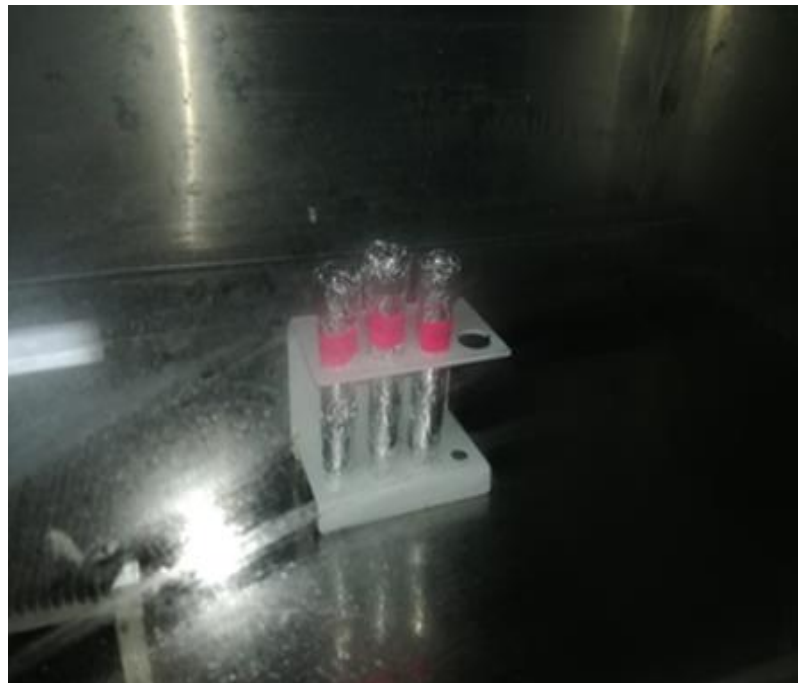
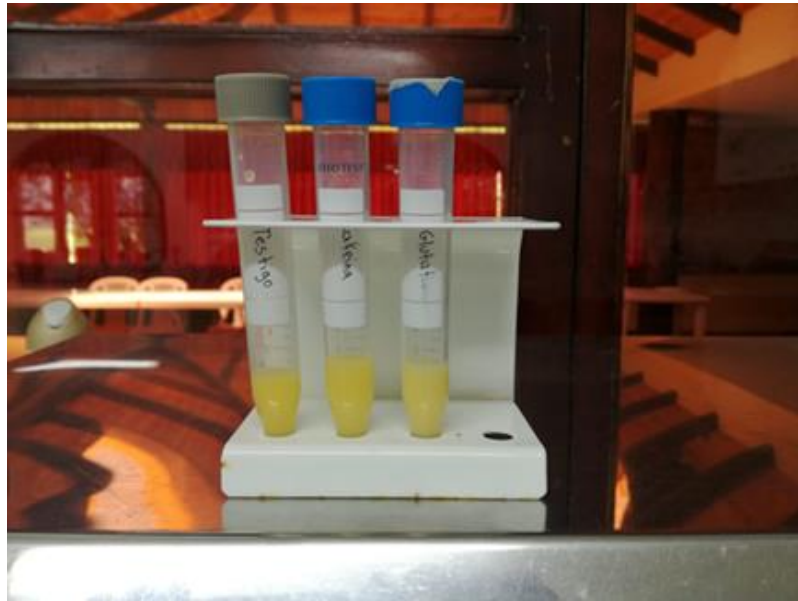
ANEXO C: ADICIÓN DE ANTIOXIDANTES



ANEXO D: CÁLCULO DE CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA



ANEXO E: IDENTIFICACIÓN DE TRATAMIENTO E INICIO FASE DE PRECONGELACIÓN

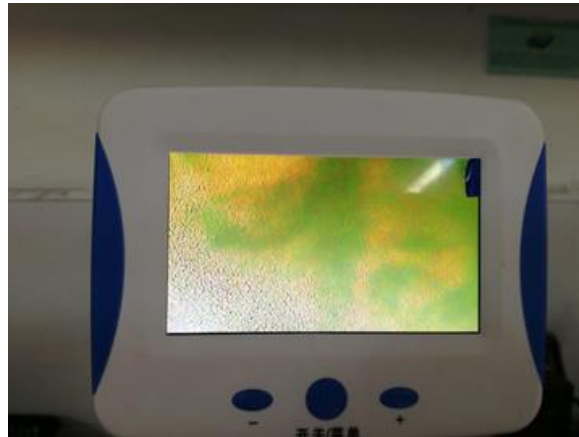


ANEXO F: TINCIONES FOSINA-NEGROSINA



ANEXO G: PARÁMETROS DE CALIDAD SEMINAL

MOTILIDAD MASAL



ANORMALIDADES ESPERMÁTICAS



MOTILIDAD INDIVIDUAL



VITALIDAD



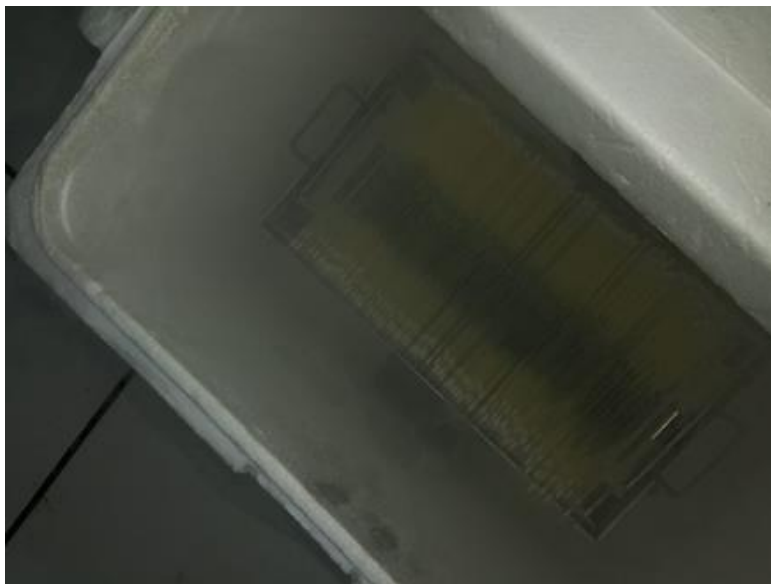
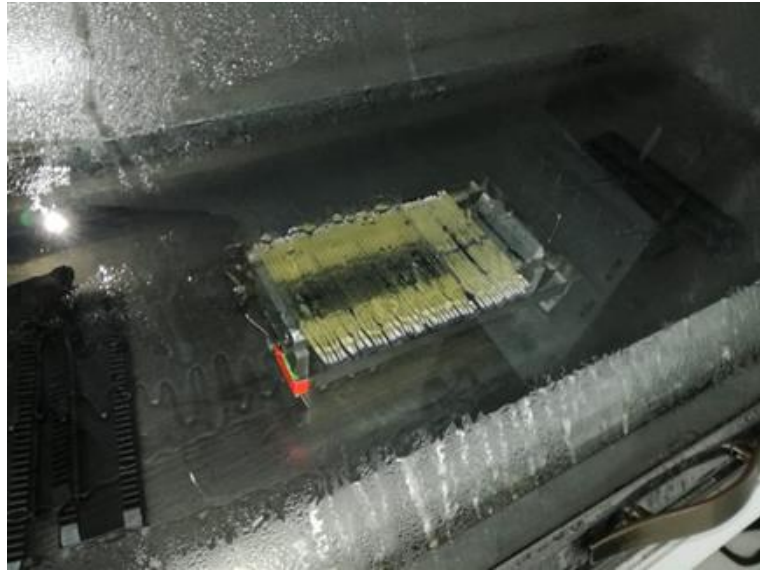
INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA



INTEGRIDAD DEL ACROSOMA



ANEXO H: FASE DE CONGELACIÓN



ANEXO I: TASA DE CONCEPCIÓN



ABSTRACT (RICARDO MIGUEL SÁNCHEZ HERRERA)

1



CARLOS AGUIRRE ALARCÓN

Para: ridegsan@gmail.com

CC: Centro de Idiomas



Mié 21/12/2022 12:45



7. ABSTRACT Ricardo Sánch...
39 KB

Con un saludo cordial, ^{39 KB} permito hacer entrega de la traducción del resumen del trabajo de titulación para el Programa de Maestría de REPRODUCCIÓN ANIMAL, MENCIÓN REPRODUCCIÓN BOVINA, PRIMERA COHORTE, perteneciente al maestrante RICARDO MIGUEL SÁNCHEZ HERRERA, con número de cédula 1804063558

Atentamente,

Carlos Aguirre Alarcón. MsC

Responder

Responder a todos

Reenviar