

**COMPARACIÓN DEL EFECTO DE LOS PORCENTAJES DE INCLUSIÓN DE
PROTEINA EN EL DILUYENTE DE TRYLADIL®
SOBRE LA MOTILIDAD INDIVIDUAL Y VITALIDAD ESPERMÁTICA EN EL
SEMEN BOVINO CRIOPRESERVADO**

Propuesta de trabajo de grado sometido a
evaluación como requisito parcial para la
obtención del título de zootecnista.

DIRECTOR

Karen Montoya Andrade

Zootecnista UdeC

Esp. Nutrición y alimentación Animal UdeC

UNIVERSIDAD DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
PROGRAMA DE ZOOTECNIA
FUSAGASUGÁ

2017

**COMPARACION DEL EFECTO DE LOS PORCENTAJES DE INCLUSION DE
PROTEINA EN EL DILUYENTE DE TRYLADIL®
SOBRE LA MOTILIDAD INDIVIDUAL Y VITALIDAD ESPERMATICA EN EL
SEMEN BOVINO CRIOPRESERVADO**

**JOSE LUIS BERNAL OSORIO
LUIS ALIRIO BETANCOUR DIAZ**

**UNIVERSIDAD DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
PROGRAMA DE ZOOTECNIA
FUSAGASUGÁ**

2017

NOTA DE ACEPTACION

PRESIDENTE DEL JURADO

JURADO

JURADO

CIUDAD Y FECHA (DÍA, MES Y AÑO) (FECHA DE ENTREGA)

Queremos agradecer primero a dios por permitirnos culminar con este gran sueño, a nuestros padres por todo su esfuerzo y dedicación y a nuestros profesores por guiarnos por esta grandiosa carrera.

JOSE LUIS BERNAL OSORIO
LUIS ALIRIO BETANCOURT DIAZ

CONTENIDO

RESUMEN.....	7
INTRODUCCIÓN -----	8-9
2. OBJETIVOS -----	10
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA -----	11
4. JUSTIFICACIÓN-----	12
5. MARCO TEORICO	
5.1 Generalidades sobre el semen bovino-----	13-
14	
5.2 Colecta del semen bovino-----	
14	
5.2.1 Vagina artificial -----	14-
15	
5.2.2 Electroeyaculador-----	16
5.2.3 Masaje manual-----	
16	
5.2.4 Colecta del epidídimo-----	17
5.3 Evaluación del semen bovino-----	17-
18	
5.4 Evaluación macroscópica-----	18-19
5.5 Evaluación microscópica-----	18-
20	
5.6 Parámetros para la evaluación del semen Bovino-----	20-
21	
5.6.1 Determinación de la concentración de las células .espermáticas en el eyaculado --	22-23

5.7	Procesamiento del semen bovino-----	24
5.8	Agentes protectores del semen -----	24-25
5.9	Diluyentes-----	25-28
6.	MATERIALES Y MÉTODOS-----	29-31
6.1	Localización	
6.2	Materiales	
6.3	Métodos	
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN-----	32-38
8.	CONCLUSIONES-----	39
9.	BIBLIOGRAFÍA-----	40-44

RESUMEN

En el presente trabajo se realizó la evaluación del semen bovino crio preservado con los equipos de andrología existentes en el laboratorio de reproducción animal de la Universidad de Cundinamarca, ubicada en el Municipio de Fusagasugá, con el objetivo comparar el efecto sobre la criopreservación de semen bovino con tryladil® modificando el porcentaje de inclusión de la proteína (yema de huevo). Para este trabajo se utilizaron dos toros donantes uno de la raza Simmental y uno de la raza Brangus perteneciente a la hacienda el Portal ubicada en la vereda San Roque, en el municipio de Arbeláez Cundinamarca.

Como diluyente se utilizó el producto comercial tryladil® con variaciones en el porcentaje (%) de inclusión de proteína yema de huevo al 16% (T1) 18% (T2) 22% (T3) 24%.(T4), teniendo como tratamiento testigo una inclusión del 20% de proteína, la cual es la inclusión de proteína utilizada comercialmente.

Para esta investigación se realizaron cuatro colectas a cada donante en dos tomas en días diferentes dejando un periodo de descanso de 4 días para la recuperación de los donantes, las muestras tomadas se dividieron en 5 partes iguales y a cada parte se diluyó con uno de los tratamientos respectivamente; este procedimiento se realizó para cada donante, realizando la respectiva evaluación seminal, empaque en pajillas de 0,5 ml y se procedió a realizar la crio preservación en nitrógeno líquido a -196°C, posteriormente se descongelaron las pajillas y se les realizó el análisis microscópico evaluando la motilidad individual (progresividad y velocidad) y porcentaje de vitalidad de los espermatozoides. Los resultados fueron analizados por prueba de normalidad de datos, análisis descriptivo de datos, análisis de varianza y prueba de tukey.

Con los resultados de este trabajo se puede afirmar que la inclusión de proteína al 18 y 20 % respectivamente, son los más recomendados para la crio preservación del semen bovino, ya que en estos dos tratamientos se obtuvo un porcentaje más alto en la motilidad individual y vitalidad espermática.

INTRODUCCIÓN

La criopreservación del semen ha sido durante muchos años la técnica utilizada para conservación del material genético para ser utilizado en programas de inseminación Artificial (IA), inseminación Artificial a Tiempo Fijo (I.A.T.F), Transferencia de Embriones (T.E.) en la Reproducción Asistida. Esta conservación consiste en la obtención, dilución y posterior congelación del semen la cual permite ampliar el tiempo de viabilidad del espermatozoide, al reducir su tasa metabólica y por lo tanto prolongar la supervivencia de los espermatozoides. (SERRANO J., 2016).

Si bien, la criopreservación garantiza la supervivencia de los espermatozoides, una elevada y variable proporción del proceso de congelación-descongelación afecta la integridad de la membrana plasmática (MP) y acrosomal (MA) tanto en lo referente a la morfología como a la funcionalidad, lo cual suele ocasionar daños irreversibles y causar muerte celular e infertilidad.(SERRANO J. 2016). Se ha demostrado cómo los espermatozoides de diferentes toros evaluados, resisten de manera distinta los efectos lesivos de la crio preservación, de manera indiscriminada sobre la integridad estructural y funcional MP y MA, lo que afecta la capacidad fecundante de las muestras seminales destinadas a la Inseminación Artificial (I.A.) (RUBIO-GUILLEN 2009).

Cuando se habla de crio preservar el semen se debe tener en cuenta qué tipo de medio se va a utilizar para realizar la dilución, así como los crio protectores a utilizar, ya que este es muy importante para obtener un semen de excelente calidad y en condiciones ideales para lograr

porcentajes altos de fecundación en los programas realizados con las biotecnologías reproductivas. (Brinsko y Varner, 1992).

La congelación de semen permite la conservación de las características genéticas de un animal por tiempo indeterminado y lograr con esto transferir por generaciones sin alteraciones cuando sea requerido (Brinsko y Varner, 1992). Pero la crio preservación conlleva a alteraciones en la membrana plasmática de los espermatozoides debido a cambios en la temperatura o shock térmico, deshidratación, toxicidad de las sales, formación de hielo intracelular, fluctuaciones del volumen celular o alteraciones en el equilibrio metabólico (Brinsko y Varner, 1992), es por esta razón que se debe implementar el uso de técnicas necesarias para evitar al máximo estos procesos que afectan la calidad del material genético crio preservado. Para esto es necesario, realizar un manejo apropiado durante todo el proceso de la congelación de semen, como el uso de diluyentes con componentes efectivos que provean al espermatozoide los suplementos necesarios para mantener un adecuado metabolismo espermático y la suficiente protección, como también un correcto manejo de la técnica de congelación y descongelación del material genético. (Brinsko y Varner, 1992).

El objetivo del presente estudio fue realizar una comparación sobre el efecto que ocasiona la inclusión de proteína en diferentes porcentajes en el diluyente Triladyl® sobre la motilidad individual y vitalidad espermática del semen bovino crio preservado.

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Comparar el efecto de los porcentajes de inclusión de proteína en el diluyente Triladyl® sobre la crio preservación de semen bovino.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Evaluar la motilidad individual y vitalidad espermática del semen bovino de dos donantes de la raza Simmental y Brangus con cada tratamiento.
- Calcular la motilidad individual semen bovino entre razas a través del tiempo, a las 2 horas, 4 horas, 6 horas y 8 horas pos congelación.
- Determinar el porcentaje de motilidad individual y vitalidad espermática de los donantes entre razas Simmental y Brangus en el proceso de pos congelación.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A pesar de que la inseminación artificial es para los productores la forma de mejorar genéticamente su hato, aún existen vacíos en la técnica de recolección y procesamiento del semen por la falta de estudios que permitan lograr una mayor eficiencia en la capacidad de fecundación del espermatozoide que debe ser alta; la fertilidad potencial de una muestra de semen probablemente va a depender de que contengan un número suficiente de espermatozoides viables, que exista normalidad morfológica y que sea funcionalmente competente, capaz de alcanzar el oviducto y de establecer un reservorio oviductal, y posteriormente llevar a cabo la fecundación del ovocito y contribuir al desarrollo embrionario, por tal razón es de vital importancia el método que se utilizará para la crío preservación del semen bovino. (Nuñez, 2006).

Por otra parte, la utilización de las biotecnologías reproductivas en bovinos en la provincia del Sumapaz en los últimos años, ha tomado mucho auge para el progreso genético de los hatos ganaderos existentes en esta zona y no se han realizado por ejemplo, estudios puntuales que permitan conocer exactamente la calidad del semen que será utilizado, por lo tanto este material genético debe ser de una excelente calidad y este resultado se logra solamente mediante la utilización de una adecuada técnica de crío preservación. (Amann, 1985).

Para crio preservar este material genético se utilizan concentrados estériles, los cuales se complementan con yema de huevo para obtener un diluyente con algunas características ideales para la preservación de los espermatozoides. La proteína (yema de huevo) se utiliza en diferentes porcentajes en la preparación de estos crio preservadores, con esta investigación queremos observar como se ve afectada la motilidad individual y la vitalidad espermática pos congelación disminuyendo y aumentando la cantidad del porcentaje de inclusión de la proteína (yema de huevo) al realizar la preparación del diluyente, con relación al tratamiento testigo el cual tiene un porcentaje de inclusión de proteína del 20 %.

4. JUSTIFICACIÓN

El objetivo de la utilización de los diluyentes en la crio preservación del semen es aumentar el volumen seminal, proporcionarle al semen un medio eficiente para la supervivencia y mantener el poder de fecundación de los espermatozoides; durante décadas se ha venido investigando y comprobando varias sustancias que tengan la capacidad de generar un medio apto para la crio preservación del semen; Para que un medio sea considerado apto como un diluyente para el semen bovino este debe tener la capacidad de nutrir, amortiguar y proteger las células espermáticas.

La utilización de la yema de huevo en el diluyente tiene como fin de proteger la membrana contra el enfriamiento, evitando así el rompimiento de esta por la posible formación de cristales y ayuda al mantenimiento de la viabilidad de los espermatozoides.

Las anteriores consideraciones determinan la necesidad de llevar a cabo la presente investigación, que pretende conocer qué resultados se obtienen con la adición de un porcentaje más o menos alto de proteína (yema de huevo) en comparación con el porcentaje que se está utilizando actualmente en la realización de los diluyentes, evaluando la afectación del porcentaje de motilidad individual y porcentaje de espermatozoides vivos.

5. MARCO TEÓRICO

5.1 GENERALIDADES DEL SEMEN BOVINO

El semen eyaculado es una combinación de las secreciones de los testículos, las vías de conducción y de las secreciones de las glándulas accesorias., que contiene espermatozoides y diversas proporciones de fluidos y secreciones de las glándulas que delimitan las vías reproductoras masculinas y de las glándulas que evacuan en ellas.

El semen de un toro normal es generalmente blanco cremoso, aunque algunos toros lo producen de una coloración amarilla, varía desde un producto espeso y cremosos a un fluido claro, dependiendo de su concentración de espermatozoides.

El semen normal de un toro producido en cantidades que aumentan con la edad y el tamaño del animal (hasta un promedio de 6 - 7 ml por eyaculado), puede contener hasta 2 -3 mil millones de espermatozoide por mililitro. Contiene también plasma seminal líquido aportado por los órganos sexuales accesorios, algunas células epiteliales y otros componentes. Sus propiedades físicas incluidas el contenido en materia seca, viscosidad, densidad, pH, presión osmótica, dependen en diversos grados de la concentración relativa de espermatozoides.

El sodio, potasio y calcio son los elementos minerales hallados en mayor abundancia en el semen. (Lopez j.)

El descubrimiento de la viabilidad espermática post descongelación debido a un hallazgo accidental en 1949 de congelación de semen, en un diluyente que contenía glicerol, dio vía libre para que a partir de este momento se realizaran diversos experimentos para lograr preservar el semen al ser congelado; por motivos económicos, dichas investigaciones fueron enfocadas más que todo hacia la especie bovina; razón por la cual, todos los procesos de congelación de semen en otras especies han sido extrapolados de los utilizados en el semen de toros; sin embargo, debido a las diferencias entre las especies, estos métodos han sido de menor éxito (Amann, 1982).

Las principales variables que afectan la congelación eficaz del semen en las diferentes especies están dadas por, la concentración espermática, el número total de espermatozoides vivos, motiles y morfológicamente normales, su habilidad para adaptarse a los cambios de condiciones osmóticas y su capacitación de una manera apropiada y en un tiempo adecuado, entre otras. Dichas características cambian significativamente entre las diferentes especies por lo que es necesario llevar a cabo diferentes procesos según la especie a la que se le congela semen (Petrunkina, 2007).

5.2 COLECTA DEL SEMEN BOVINO

La colecta seminal es una técnica habitual en los centros de reproducción bovina que se emplea para evaluar la capacidad reproductiva de los sementales, el control rutinario de la calidad del semen, el diagnóstico de la infertilidad y por su puesto la inseminación artificial ya sea con semen fresco, refrigerado o congelado.

Existen varios procesos para la obtención del semen bovino como son: la vagina artificial, electroeyaculador, masaje manual, y extracción seminal del conducto epididimario, en los centros especializados se utiliza con más frecuencia la vagina artificial excepto en toros con problemas para realizar la monta.

5.2.1 Vagina artificial

La vagina artificial está formada por un cilindro rígido, en ambos extremos del cilindro se fija la funda de caucho que delimita una cámara interior. Está en su interior se llena de agua a través de una válvula, con una temperatura de 45°C la cual varía dependiendo a la

temperatura que el animal este acostumbrado a ser trabajado, por la misma válvula se llena de aire con el fin de incrementar la presión y facilitar la eyaculación del animal. En uno de los extremos del cilindro se coloca un embudo de caucho o silicona unido a un tubo colector, protegiéndolo de la luz y del frío por una funda protectora. El pene en erección se introduce en el interior de la vagina artificial y, gracias a las condiciones de temperatura y presión, se desencadena la eyaculación del macho. Es un método muy eficaz que, realizado apropiadamente, puede utilizarse a lo largo de la vida reproductiva del animal. Si la temperatura o la presión interior de la vagina no son las adecuadas o la colecta la realiza personal no entrenado, se pueden originar lesiones en el pene que pueden llegar a suprimir la libido del toro o generar rechazo de la monta. Para esta labor se debe entrenar el animal para que realice la monta en un maniquí o bien una vaca en celo. (Corteel, 1977; Pickett y Back, 1973; Furman y col., 1975; Salisbury y col., 1978).

Existe una gran variedad de modelos de vaginas artificiales en el mercado, y los sementales pueden mostrar predilección por uno u otro modelo en función de sus características. La vagina Missouri o Nasco es posiblemente la más común y está constituida por un forro de látex doble termo sellado que forma una cámara donde se introduce el agua con una válvula que permite la introducción de agua y aire y una funda externa de cuero. Es económica, liviana y de fácil manejo, además permite una estimulación externa del glande del semental (efecto cérvix) o de la base del pene. El Modelo japonés o Nishikawa está formado por una caja externa de aluminio y un forro de látex y en el extremo distal tiene una anilla de goma espuma para estimular el glande durante la penetración. Es rígida y cuenta con un bulbo de goma para la recogida del semen.



Fotografía 1: vagina artificial bovina.

Fuente Betancourt L. 2017.

5.2.2 El electroeyaculador

Es un sistema utilizado en toros que no han sido adiestrados para realizar la monta, o bien en toros con lesiones en los miembros ya sean posteriores o anteriores que le impidan realizar la monta para la toma del semen. Este método se utiliza una bala con unos electrodos que hacen contacto con las glándulas accesorias para hacer la estimulación y poder extraer el semen, esta bala es introducida vía rectal del animal y conectada a una batería la cual emitirá una descarga eléctrica para estimular la eyaculación. El semen será colectado en un cono colector el cual en su extremo ira conectado un embudo desechable o de silicona unido a un tubo colector cubierto de la luz y del frio. Esta labor debe realizarse por una persona capacitada y entrenada ya que si se realiza mal podemos lesionar el animal.

5.2.3 Masaje manual

Es el menos utilizado por ser dispendioso para la persona que lo realiza, ya que debe realizarse por vía rectal introduciendo la mano y realizando masajes específicamente hacia la región ampular del conducto deferente y la próstata hasta para lograr la estimulación del animal y la eyaculación, el semen es recogido en un cono en donde en uno de sus extremos lleva unido a él un embudo de silicona o desechable conectado a un tubo recolector cubriéndolo de la luz y el frio.



Fotografía 1: palpación rectal

Fuente Bernal J. 2017

5.2.4 Extracción seminal de la cola del epidídimo

Cuando el animal muere repentinamente, su material genético se pierde. Una forma de conservar este material es por el método de colecta de espermatozoides del epidídimo (Martins y col 2007). Este procedimiento post mortem es considerado una importante herramienta en la utilización de espermatozoides de animales en peligro de extinción (Lambrechts y col 1999). Los espermatozoides colectados del epidídimo pueden ser criopreservados o utilizados de inmediato en la fecundación in vitro (Martins y col 2007) o por inseminación artificial (James y col 2002).

El método consiste en pasar un catéter nº 20 por el ducto deferente, el cual es conectado a una jeringa de 10 mL, conteniendo medio diluyente. la muestra de depositada en un portaobjeto para ser evaluado y se realiza su respectivo procedimiento, ya sea para congelación o para ser utilizado en fresco.

5.3 EVALUACION DE LA CALIDAD DEL SEMEN BOVINO

El objetivo final de evaluación del material seminal es encontrar uno o pocos parámetros para predecir la capacidad fertilizante del esperma colectado. Muchos métodos han sido evaluados a lo largo de las últimas décadas, pero sólo unos pocos métodos han sido adoptados para la práctica. La mayoría de estos estudios han utilizado el microscopio óptico para las

evaluaciones de los parámetros clásicos de espermatozoides, incluyendo la concentración de espermatozoides, la motilidad, morfología y viabilidad y mediante sistema CASA (Januškauskas & Žilinskas, 2002).

5.4 Evaluación macroscópica

- **Volumen**

El volumen del eyaculado y la concentración de espermatozoides deben realizarse de forma exacta, porque de estas dos medidas va a depender la cantidad de dosis seminales que saldrán de un eyaculado (Van Camp, 1997;). Este volumen es directamente tomado del tubo colector.

- **Color**

El color del semen del toro es blanco cremoso, en condiciones normales, que a su vez tiene relación con la cantidad y la concentración de espermatozoides contenidos en el eyaculado. Es importante tener en cuenta que la coloración varía de acuerdo al estado del animal, puede variar de un color amarillento por la presencia de riboflavina que se puede confundir con la presencia de orina; o de color rojizo a causa de una lesión (Barszcz et al., 2012). El color del semen de toro es variable, va desde claro transparente hasta el amarillo claro y depende por lo general del método de colecta ya que por la mala aplicación de la técnica puede existir la presencia de sangre, pus y tonalidades fuera de lo normal (Sesma et al., 2008).

- **Olor**

El olor es característico de cada especie animal y en general no es muy intenso. El olor del semen de toro es similar al de la leche de la vaca. El semen puede tomar un olor dependiendo del estado y condición del animal, como cuando se mezcla con orina o ya sea tal vez por procesos purulentos y por la falta de limpieza (Barszcz et al., 2012). Por lo general se lo determina olfateando el tubo colector donde se encuentra la muestra seminal, olores extraños diferente al característico indica alguna contaminación sea con orina o alguna secreción derivada de una patología genito-urinaria (Crespo & Moreno, 2014).

- **pH**

En condiciones normales el semen de toro colectado recientemente posee un pH que oscila entre 6.5 a 6.9 con una media pH 6.7. El pH del semen de toro puede variar dependiendo de las condiciones del tiempo de colecta hasta su determinación en laboratorio (Moussa et al.,

2002). El pH del semen está por lo general se relaciona con el método de colecta, así como de los atenciones y cuidados en el momento de ejecutar la técnica de colección del material seminal (Sesma et al., 2010).

5.5 Evaluación microscópica

- **Motilidad masal**

La motilidad masal del semen de toro se evalúa respecto a la concentración, el movimiento progresivo y velocidad de los espermatozoides. Es por eso que cuando uno de estos tres principios se encuentra rebajado, las ondas que son expresadas en remolinos son duramente deprimidas o nulas (Yildiz et al., 2000).

La observación de la misma se evalúa colocando una gota de semen puro colocada en un cubre objetos atemperado a 37°C, para luego ser visualizada mediante microscopio electrónico a 40X, la misma que se valora observando la presencia de ondas cerca del borde de la gota de material seminal (Yildiz et al., 2000). La escala se clasifica de 1 a 5, en donde 1 corresponde al semen que no presenta ondas y 5 cuando las ondas se mueven formado remolinos (Yildiz et al., 2000).

- **Motilidad individual**

La valoración del movimiento individual de los espermatozoides con el fin de determinar las células con movimiento flagelar del total de espermatozoides del eyaculado obtenido, observados en diferentes campos de placa puesta en el microscopio (Curbelo & Rodríguez, 2013). La observación debe ser realizada con un microscopio óptico con un aumento de 40X, ahí se observan los espermatozoides que se mueven en forma rectilínea a los cuales se los considera normales, caso contrario los que se mueven en círculo se consideran anormales. El porcentaje se obtiene de los espermatozoides con movimiento rectilíneo progresivo sobre el total de los espermatozoides observados en la placa (Curbelo & Rodríguez, 2013).

- **Concentración**

La concentración espermática se evalúa generalmente por hemocitómetro pero en laboratorios especializados donde el trabajo es mayor o abundante optan por utilizar el espectrofotómetro permitiendo estimar de forma indirecta la concentración espermática

basándose en la absorción o dispersión de la luz provocada por los espermatozoides en suspensión. La determinación de la concentración espermática mediante un espectrofotómetro es un método rápido y facilita resultados con un margen de error asumible (Catena y Cabodevilla, 1999).

En la producción comercial de semen bovino congelado, el número mínimo de espermatozoides por pajillas necesario para obtener la máxima fertilidad *in vivo* se ha establecido en 15 millones, con al menos el 50% de motilidad progresiva postdescongelación (Van Lieshout, 1995).

No obstante, las dosis seminales producidas por muchos centros de IA exceden este número mínimo establecido, intentando garantizar la presencia de al menos 10 millones de espermatozoides vivos. Este número mínimo, para algunos sementales excepcionales, probablemente pueda ser reducido hasta 5 ó 6 millones de espermatozoides vivos por dosis sin un descenso significativo en la fertilidad (Januskaukas y col., 1996), pero estos individuos tendrían que ser identificados previamente. A partir de ese mínimo establecido, por mucho que se incremente la concentración espermática de las dosis seminales no se va a reflejar en un aumento de la fertilidad (Amann y Hammerstedt, 2002).

- **Morfología**

se coloca una gota de aproximadamente 30 microlitros de semen diluido sobre un portaobjetos limpio y desengrasado y se realiza el frotis en forma firme y pareja. Se deja secar el frotis y se lo tiñe con una solución de Giemsa. Se dejan incubar con el colorante por 4 horas, se los retira se enjuagan y se los deja secar. La evaluación de la morfología y la acrosomía se realiza bajo aceite de inmersión a 1000 aumentos. Los espermatozoides se visualizan de color violáceo y en el caso de tener presente su acrosoma se puede apreciar de un violáceo más intenso, de estar ausente el mismo se observa la cabeza del espermatozoide de un color homogéneo o con el tercio superior más claro. El valor mínimo tanto para rodeo general como para congelación es de 70% de acrosomas normales. También se puede evaluar por medio de contraste de fase con glutaraldehído al 0,2%. Si se desea ver sólo morfología se puede utilizar también Rosa de Bengala observándose a los espermatozoides de un color rosa intenso. (Gomez Ma;). Por medio de esta técnica observamos las anormalidades espermáticas clasificándolas en anormalidades primarias y secundarias; Primarias por definición, son aquellas que se originan dentro del testículo durante la espermatogénesis y malformaciones

Secundarias son aquellas que se originan dentro del epidídimo; cabe destacar que por definición se denota el origen y no la severidad del defecto. (Gomez Ma;).

5.6 PARÁMETROS

Volumen	3 a 6 cc
Olor	Sin olor
pH	6,4 a 6,9
Apariencia	<p>Cremosa Muy buena mayor a 750 x 106</p> <p>Lechosa Buena 400 a 750 x 106</p> <p>Blanquecina lechosa Regular 250 a 400 x 106</p> <p>Traslúcida Mala menor a 200 x 106</p>

Fuente: (Barth et al., 2006)

Motilidad masal (4x o 10x)

Semen muy bueno	ondas oscuras marcadas con rápido movimiento.
Semen bueno	ondas menos oscuras que el anterior, marcadas con movimiento moderado.
Semen regular	ondas claras con movimiento muy ligero.
Semen malo	no hay ondas, se observan los espermatozoides inmóviles

Fuente: (Barth et al., 2006)

Motilidad individual: diluido (400x)

Muy bueno	> 80 %
Bueno	60 – 79%

Regular	40 – 59%
Malo	< al 40%

Fuente: (Barth et al., 2006)

Morfología	Anormalidades primarias	Total
Muy bueno	< 10%	< 25%
Bueno	10 - 19%	26-39%
Regular	20 - 29%	40-59%
Malo	> 29%	>59%

Fuente: (Barth et al., 2006)

5.6.1 DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE LAS CELULAS ESPERMATICAS EN EL EYACULADO

Existen 2 métodos de evaluación de la concentración espermática

- Determinación por medio del método espectrofotométrico.

El espectrofotómetro mide la densidad espermática por dificultad que ofrece la suspensión de espermatozoides en una solución que los inmoviliza (por ej. formol citrato) al pasaje de los haces de luz. El aparato está acompañado de una tabla, confeccionada a partir de la curva de turbidez y de la espermática, medida en una cámara cuenta glóbulos. El valor indicado en la tabla en la tabla es expresado $\times 10^6/\text{mm}^3$. (Palma G. 2001).

- Determinación de la concentración en la cámara cuenta glóbulos (hemocitómetro).

Se define concentración espermática a la cantidad de espermatozoides que se encuentran en una unidad de volumen. Existen diferentes tipos de cámaras para el recuento de espermatozoides. Todas fueron desarrolladas para el recuento hemocitométrico: Neubauer, Thoma, Thoma neu, Bürker, Dürner-Türk/Türk, Fuchs-Rosenthal. Las más conocidas para la determinación del número de espermatozoides son la de Neubauer y Thoma (Thoma neu), sobre las cuales se hará la descripción del recuento. (Palma G. 2001).

El principio de la determinación de la concentración espermática está establecido por el recuento de los espermatozoides de una muestra de semen diluido bajo condiciones estandarizadas. El mismo tiene en cuenta la superficie y la altura de la cámara como así también el grado de dilución al que se sometió la muestra de semen. Con ayuda de la ecuación (a) será posible establecer la concentración de espermatozoides/ml. (Palma G. 2001).

Método

De una dosis de semen se toma una muestra que se diluye en agua destilada en una relación 1:20 (por ejemplo, 50µl de semen + 950µl de agua destilada). Después de la homogeneización durante 5 segundos en un agitador mecánico o en forma manual, se coloca una muestra de la dilución en cada hemicámara. El recuento se lleva a cabo en un microscopio a 400X. (Palma G. 2001).

El recuento y cálculo de la concentración de espermatozoides difiere según el tipo de cámara empleado. Existen en el mercado varios tipos de hemocitómetros, razón por la cual se darán las indicaciones con un tipo de cámara variando el cálculo según las instrucciones de uso de cada cámara (i. e. altura de la cámara y superficie total)

$$Esp = \frac{E}{SAD} * 1000$$

Esp= Numero de espermatozoides

E= Números de espermatozoides contados

S= Superficie empleada en mm³ (1/2,5 mm²)

A= Altura de la cámara (1/10 mm)

D= Grado de dilución (1/200)

Fuente: (Palma G. 2001).

5.7 PROCESAMIENTO DEL SEMEN BOVINO

La vida fértil del plasma seminal se limita a varias horas en el laboratorio. Si bien se puede extender la vida fértil del semen del toro indefinidamente a través de la criopreservación, los espermatozoides congelados-descongelados son aún más frágiles y menor duración que los espermatozoides recién eyaculados. Y mientras que cada paso en la elaboración y manipulación de semen congelado es esencial para proporcionar espermatozoides viables después de la descongelación; La concentración de espermatozoides y la motilidad inicial se determina en última instancia, el número de espermatozoides en cada una de las pajillas. El eyaculado se diluye a continuación con un medio apropiado, el diluyente, para comenzar el proceso de enfriamiento del semen de toros, ya que proporcionan sustratos para los espermatozoides para generar la energía necesaria para la supervivencia y la motilidad, capacidad de amortiguación para controlar la acidez, además de proporcionar protección durante el proceso de enfriamiento y congelación. (Parks, 2015).

CRIOPRESERVACIÓN

La criopreservación del semen bovino comprende cinco fases: la dilución, el empajillado y enfriamiento, la congelación, el almacenamiento y la descongelación, lo que hace que haya una articulación entre la función de la membrana con el metabolismo pudiendo que el espermatozoide detenga su función en cada etapa (Ávila-Portillo et al., 2006).

5.8 AGENTE CRIOPROTECTOR.

La utilización de crioprotectores es muy importante en el proceso de preservar, ya que protege a los espermatozoides durante la congelación y la descongelación.

- **yema de huevo.**

La yema de huevo es un componente básico que está presente en la mayoría de los diluyentes utilizados para la congelación del semen bovino, las características protectoras son conocidas desde los trabajos realizados por Phillips y Lardy en 1940, el cual describieron todos los beneficios al incluir la yema de huevo en los diluyentes utilizados para la conservación de los espermatozoides. Desde entonces esta adición ha sido utilizada en algunos diluyentes obteniendo buenos resultados. La yema de huevo está compuesta por un 68% de lipoproteínas de baja densidad (LDL), 16% de lipoproteína de alta densidad (HDL), 10% de levetelinas y 4% fosfivitina (Dauphas, 2006).

- **Glicerol**

El glicerol es el crioprotector más utilizado en los protocolos de congelación del semen de perro, y prácticamente en todas las especies domésticas (Maxwell y Watson, 1996; Curry, 2000; Salamon y Maxwell, 2000; Vidament y col., 2000; Gil y col., 2003; Bittencourt y col., 2004). Su descubrimiento como agente crioprotector se debe a Polge y col. (1949) y ha marcado un avance notable en la preservación del semen, por medio de la congelación. Su bajo peso molecular le permite ingresar a la célula mediante los canales aquaporin 7 (Ishibashi y col., 1997) y reemplazar osmóticamente el agua intracelular durante el proceso de congelamiento, esto combinado con una velocidad de congelamiento lenta reduce la formación de cristales de hielo intracelulares (Salamon y Maxell, 2000). Según Amann y Pickett (1987) así como Almlid y Johnson (1988), el glicerol también tiene un rol crioprotector en el medio extracelular, su función a este nivel consiste en aumentar el volumen del medio extra-celular y la proporción de agua en estado de no-congelación,

haciendo disminuir las concentraciones de los electrolitos y por tanto, minimizando los “efectos de solución” (Mazur, 1984); además, y mediante la estimulación osmótica de la deshidratación celular, consigue disminuir el volumen del agua intra-celular disponible para congelarse y formar cristales (Medeiros y col., 2002).

5.9 DILUYENTES PARA LA CRIOPRESERVACIÓN DEL SEMEN BOVINO

En el mercado existen variabilidad de diluyentes para la criopreservación del semen bovino entre ellos:

Triladyl®

Es un concentrado estéril para la preparación de un diluyente con yema de huevo para la congelación de semen bovino en un solo paso. Triladyl® se presta también para la congelación de semen de otros rumiantes por ejemplo ovino, caprino, ciervo etc. Su contenido en antibióticos corresponde al estándar de la UE: EC norma 88/407.

Composición

- TRIS
- Ácido cítrico
- Azúcar
- Tampones
- Glicerina
- Antibióticos
- Agua de extrema pureza

100 del diluyente preparado contienen (unidades activas)

- Tilosina 5,7 mg
- Gentamicina 28,6 mg
- Espectinomicina 34,3 mg
- Lincomicina 17,2 mg 2.

Forma de presentación

Cada frasco de Triladyl® contiene 250 g de concentrado para la preparación de 1250 g de diluyente listo para su utilización.

Aplicación

Preparación del diluyente listo para su uso

Para la preparación del diluyente se requiere de:

- Triladyl® concentrado agua pura estéril.
- yema de huevo fresca.
- probeta graduada estéril o matraz de Erlenmeyer
- papel filtro estéril filtro-embudos estériles

El diluyente listo se compone de una parte de concentrado de Triladyl®, tres partes de agua pura estéril y de una parte de yema de huevo, lo que equivale al 20% de su volumen final. (Minitüb Manual 13500/0250)

Steridyl - Medio completo para la congelación de semen bovino

Beneficios

- Fórmula de buffer madurada basada en TRIS
- Listo para su uso
- Resultados óptimos y constantes dentro de un rango amplio de variación de tasas de dilución.
- Fácil de preparar, ahorra tiempo.
- Estándar GMP de producción Minitube

Desde la introducción de Triladyl® al mercado en el año 1974, el diluyente se ha establecido como estándar de laboratorio para la producción moderna de semen. Steridyl combina el probado Triladyl con yema de huevo gamma-irradiada, presentándose como un producto completo, terminado y fácil de aplicar. Sólo debe adicionarse agua al concentrado para preparar el diluyente listo para su uso. Steridyl también se presta para eyaculados de otras especies, como p.Ej., semen de carnero, macho cabrío y también de muchas especies exóticas.

Composición

Steridyl contiene TRIS, ácido cítrico, azúcar, tampones, Glicerina, agua purificada, yema de huevo estéril irradiada y antibióticos (Tilosina, Gentamicina, Espectinomicina , Lincomicina).

AndroMed®

Medio de cultivo sin componentes de origen animal, Para congelación de semen bovino, ovino y caprino, También apto para preservación de semen fresco.

Beneficios

- Sin ingredientes de origen animal.
- Sin riesgo de contaminación microbiológica.
- Protocolos de producción eficiente
- Altas tasas de fertilidad
- Amplio rango de aplicación
- Estándar GMP de producción Minitube

Composición

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

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 LOCALIZACIÓN

El presente trabajo se llevó a cabo en la hacienda el Portal en la vereda San Roque del municipio de Arbeláez Cundinamarca ubicado en la Provincia del Sumapaz, localizado 82 km de Bogotá. limita con Fusagasugá, Pasca, San Bernardo, conocido por su alto crecimiento económico en los últimos años, este municipio tiene una temperatura 21 °C, viento 0 a 10 km/h, 81% de humedad.

6.2 MATERIALES

EN CAMPO

- Un electroeyaculador. (Electrojac)
- Conos de silicona.
- Tubo colector.
- Solución salina.
- Tijeras.
- Toallas de papel.
- Mangas.
- Guantes.

EN LABORATORIO

- Microscopio.
- Lamina calentadora.
- Baño de maría.
- Portaobjetos.
- Cubreobjetos.
- Aceite de inmersión.
- Iosina-nigrosina.
- Pajillas.
- Maquina marcadora de pajillas.
- Maquina empacadora de pajillas.
- Nitrógeno.
- Termo congelador.
- Termo descongelador.
- Hemocitometro.
- Espectofotometro.

ANIMALES

Los animales que fueron utilizados para este trabajo fueron, 1 toro de la raza Simmental de 40 meses de edad con un peso de 600 kg el cual se encuentra con una condición corporal de 3.8 en una escala de 1 a 5 y cuyo manejo es en pastoreo el segundo ejemplar es un toro Brangus con una edad de 30 meses con 630 kg de peso vivo, encontrándolos en una condición corporal de 4 en una escala de 1 a 5, manejados en potreros y con disponibilidad de agua y sal a voluntad, estos animales han sido desparasitados y vitaminizados con anterioridad, es de anotar que los animales se encuentran sirviendo las vacas existentes en el predio; Se les realizó una evaluación física y palpación rectal encontrándolos aptos reproductivamente y para la realización de la colecta.

6.3 METODOS

OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN DE LOS EYACULADOS

La obtención del semen bovino se realizó por el método de electro eyaculación, utilizando un electroeyaculador electrojac 5 utilizándolo modo automático, haciendo dos eyaculados, con un intervalo de 20 min entre las dos tomas. Tras la obtención del semen se realizó una primera valoración de la calidad de los eyaculados atendiendo a los siguientes parámetros: -

volumen: determinado por lectura directa en un tubo graduado de 10 ml -motilidad en masa determinada mediante examen microscópico; los eyaculados se puntuaron en una escala de 1 (ausencia de movimiento) a 5 (ondas con movimiento muy rápido y vigoroso), - Motilidad masal mediante microscopio evaluando progresividad y velocidad en una escala del 1(inmóvil) al 5 (muy rápido) -Concentración espermática, determinada mediante el uso de cámara de Neubauer. -Morfología espermática con tinción eosina nigrosina, estos análisis y procedimientos se llevaron a cabo en el laboratorio de reproducción de la Universidad de Cundinamarca.

DILUCION SEMINAL

Una vez determinado el volumen del eyaculado se procedió a realizar la dilución 1:1 el eyaculado obtenido se dividió en 5 partes iguales (por los 5 tratamientos) y se le adicionó la misma cantidad de diluyente de cada uno de los tratamientos, se procedió a refrigerar y se trasladó al laboratorio de reproducción de la Universidad de Cundinamarca, para su respectiva evaluación.

PROCESAMIENTO DEL SEMEN

Ya realizada la evaluación de la concentración de cada una de las muestras se procedió a realizar la adición de los diluyentes por tratamientos siempre a una temperatura de (5°C), por un intervalo de 15 minutos, se deja en la nevera por 18 horas y se procede a marcar las pajillas con los siguientes datos: Raza, tratamiento y toma de muestra, una vez marcadas las pajillas se procede al empacado de las mismas en pajillas de 0.5 ml, y se sellaron con polivinilo, luego se procedió a la congelación.

Tratamientos utilizados

- Tratamiento 0 (20% proteína)
- Tratamiento 1 (16% proteína)
- Tratamiento 2 (18% proteína)
- Tratamiento 3 (22% proteína)

- Tratamiento 4 (24% proteína)

EVALUACIÓN DEL SEMEN

Para la evaluación del semen poscongelación se realiza una descongelación de 2 pajilla por cada tratamiento a una temperatura de 37°C por 1 minuto, luego se coloca una muestra en el portaobjeto y se procede a la evaluación en el microscopio, el mismo procedimiento para todas las pajillas con cada tratamiento.

Para la evaluación a través del tiempo se evalúan dos pajillas por cada tratamiento a las 2, a las 4, a las 6 y a las 8 horas poscongelación de las pajillas.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para realizar la comparación de promedios entre los tratamientos para las variables concentración espermática y vitalidad lo primero que se presenta es la descripción estadística de los datos dichos valores que se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Estadística descriptiva de las variables “Concentración Espermática” y “Vitalidad”

Medidas resumen

Variable	n	Media	D.E.	Var(n-1)	CV	Min	Máx	Asimetría	Kurtosis
CONCESPER	20	895,25	222,94	49703,88	24,90	520,00	1460,00	0,50	0,35
VITALIDAD	20	71,70	15,51	240,54	21,63	40,00	95,00	-0,32	-0,88

De estos valores se hace énfasis en el coeficiente de variación que indica el grado de dispersión de los datos o variabilidad de los mismos respecto al promedio, valores menores del 15% son indicadores de poca dispersión de los datos, en este caso se obtuvieron coeficientes del 24,9% para concentración espermática y de 21,63% para vitalidad, esto quiere decir que los datos son muy heterogéneos o “diferentes” al promedio.

El siguiente análisis fue una prueba de normalidad de los datos, en este caso se aplicó la prueba de Shapiro – Wilks, disponible en el programa INFOSTAT. Los resultados se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Prueba de normalidad de los datos.

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
CONCESPER	20	895,25	222,94	0,96	0,7450
VITALIDAD	20	71,70	15,51	0,93	0,3246

Los valores de probabilidad mayores a 0,05 indican que los datos distribuyen de manera normal.

Como los datos distribuyen de manera normal lo siguiente es realizar un Análisis de Varianza en el que se incluyen dentro del modelo los tratamientos, la raza y la muestra, estas dos últimas se incluyen no para concluir sobre ellas sino para reducir el tamaño del error experimental y con esto mejorar el valor del coeficiente de determinación. Las tablas obtenidas se muestran a continuación.

Tabla 3. Análisis de varianza para la variable “Concentración Espermática”.

CONCESPER

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
CONCESPER	20	0,57	0,38	19,68

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)						
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo.	540927,50	6	90154,58	2,90	0,0505	
TRATAMIENTO	127755,00	4	31938,75	1,03	0,4288	
RAZA	410411,25	1	410411,25	13,22	0,0030	
MUESTRA	2761,25	1	2761,25	0,09	0,7702	
Error	403446,25	13	31034,33			
Total	944373,75	19				

El valor de **p 0,4288 (p>0,05)**, indica que no existen diferencias significativas para esta variable en los tratamientos, es importante anotar en este caso el valor de R² que es de 0,57 cuando se espera que en un modelo adecuado sea superior a 0,8. Esto quiere decir que es posible que exista otra variable que pueda influir en la concentración espermática que no fue tomada en cuenta en este ensayo.

Tabla 4. Análisis de Varianza para la variable “Vitalidad”.

VITALIDAD

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
VITALIDAD	20	0,91	0,86	7,97

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	4145,50	6	690,92	21,15	<0,0001
TRATAMIENTO	4091,70	4	1022,93	31,31	<0,0001
RAZA	20,00	1	20,00	0,61	0,4480
MUESTRA	33,80	1	33,80	1,03	0,3276
Error	424,70	13	32,67		
Total	4570,20	19			

VITALIDAD ESPERMATICA %					
	T0 20%	T1 16 %	T2 18%	T3 22%	T4 24 %
toma 1 SM	90	60	87	60	40
toma 2 SM	95	65	90	70	50
toma 1Br	87	65	85	70	60
toma 2 Br	85	70	80	75	50
promedio	89,25	65	85,5	68,75	50

Para la variable vitalidad el valor de $p < 0,0001$ indica que existen diferencias significativas entre los tratamientos, además el valor del coeficiente de determinación R^2 de 0,91, que es un valor satisfactorio para la explicación del modelo.

Como existen diferencias significativas entre los tratamientos se realiza una prueba de Tukey para determinar cuáles tratamientos difieren de cuáles. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 5. Prueba de Tukey para la variable “Vitalidad”

VITALIDAD

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
VITALIDAD	20	0,91	0,86	7,97

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	4145,50	6	690,92	21,15	<0,0001
RAZA	20,00	1	20,00	0,61	0,4480
MUESTRA	33,80	1	33,80	1,03	0,3276
TRATAMIENTO	4091,70	4	1022,93	31,31	<0,0001
Error	424,70	13	32,67		
Total	4570,20	19			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=12,72574

Error: 32,6692 gl: 13

TRATAMIENTO	Medias	n	E.E.
T4	50,00	4	2,86 A
T1	65,00	4	2,86 B
T3	68,75	4	2,86 B
T2	85,50	4	2,86 C
To	89,25	4	2,86 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

La prueba de tukey muestra que el tratamiento 4 tiene la menor vitalidad de todos (50%), el tratamiento 1 y 3 no tienen diferencias entre ellos y muestran vitalidades de 65 y 68,75% respectivamente; las mejores vitalidades las muestran los tratamientos control y tratamiento 2 con valores de 89,25 y 85,5 % respectivamente, no hay diferencias significativas entre ellas.

Para la variable “Progresividad” que se evaluó a las 2, 4, 6 y 8 horas se muestra primero que toda la estadística descriptiva en la tabla 6.

Tabla 6. Estadística Descriptiva para “progresividad”

Medidas resumen

Variable	n	Media	D.E.	CV	Mín	Máx	Asimetría	Kurtosis
PROGRES 2	20	28,00	17,50	62,51	5,00	60,00	0,42	-1,33
PROGRES 4	20	19,85	15,64	78,80	2,00	50,00	0,59	-1,27
PROGRES 6	20	12,90	11,61	89,98	0,00	35,00	0,71	-1,12
PROGRES 8	20	8,05	9,17	113,96	0,00	30,00	1,22	-0,04

Se observa que los coeficientes de variación son demasiado altos (gran heterogeneidad en los datos) y que los valores de Asimetría y Kurtosis son indicativos de una posible no normalidad en los datos; para confirmar esto se hace la prueba de normalidad de Shapiro – Wilks, que se muestra a continuación.

Tabla 7. Prueba de normalidad de Shapiro – Wilks para la variable “Progresividad”

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
PROGRES 2	20	28,00	17,50	0,85	0,0093
PROGRES 4	20	19,85	15,64	0,81	0,0010
PROGRES 6	20	12,90	11,61	0,81	0,0010
PROGRES 8	20	8,05	9,17	0,77	<0,0001

Todos los valores de p son menores a 0,05 lo cual indica que no distribuyen de manera normal, cuando esto sucede se hace una prueba no paramétrica, en este caso se aplicó la prueba de Kruskal Wallis cuyos resultados se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 8. Prueba no Paramétrica de Kruskal Wallis para la variable Progresividad

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	TRATAM	N	Medias	D.E.	Medianas	Promedio rangos	H	p
PROGRES 2	T1	4	21,25	2,50	20,00	10,13	16,3	0,0021
PROGRES 2	T2	4	45,00	5,77	45,00	15,75		
PROGRES 2	T3	4	13,75	4,79	12,50	5,75		
PROGRES 2	T4	4	10,00	4,08	10,00	3,63		
PROGRES 2	To	4	50,00	8,16	50,00	17,25		
Variable	TRATAM	N	Medias	D.E.	Medianas	Promedio rangos	H	p
PROGRES 4	T1	4	11,25	2,50	10,00	9,38	15,4	0,0028
PROGRES 4	T2	4	35,00	5,77	35,00	15,75		
PROGRES 4	T3	4	7,50	2,89	7,50	6,00		
PROGRES 4	T4	4	5,50	3,32	5,00	4,13		
PROGRES 4	To	4	40,00	8,16	40,00	17,25		
Variable	TRATAM	N	Medias	D.E.	Medianas	Promedio rangos	H	p
PROGRES 6	T1	4	6,25	2,50	5,00	9,38	16,2	0,0025
PROGRES 6	T2	4	25,00	5,77	25,00	16,25		
PROGRES 6	T3	4	5,00	2,16	4,50	7,25		
PROGRES 6	T4	4	2,00	1,63	2,00	2,88		
PROGRES 6	To	4	26,25	8,54	27,50	16,75		
Variable	TRATAM	N	Medias	D.E.	Medianas	Promedio rangos	H	p
PROGRES 8	T1	4	1,75	0,50	2,00	6,38	14,7	0,0042
PROGRES 8	T2	4	13,75	4,79	12,50	15,38		
PROGRES 8	T3	4	2,25	0,96	2,50	8,38		
PROGRES 8	T4	4	1,25	0,96	1,50	4,75		
PROGRES 8	To	4	21,25	8,54	22,50	17,63		

PROGRESIVIDAD % (2horas)					
	T0 20%	T1 16 %	T2 18%	T3 22%	T4 24 %
toma 1 SM	50	20	50	15	5
toma 2 SM	60	25	40	10	10
toma 1Br	50	20	40	10	15
toma 2 br	40	20	50	20	10
promedio	50	21,25	45	13,75	10

PROGRESIVIDAD % (4 horas)					
	T0 20%	T1 16 %	T2 18%	T3 22%	T4 24 %
toma 1 SM	40	10	40	10	2
toma 2 SM	50	15	30	5	5
toma 1Br	40	10	30	5	10
toma 2 br	30	10	40	10	5
Promedio	40	11,25	35	7,5	5,5

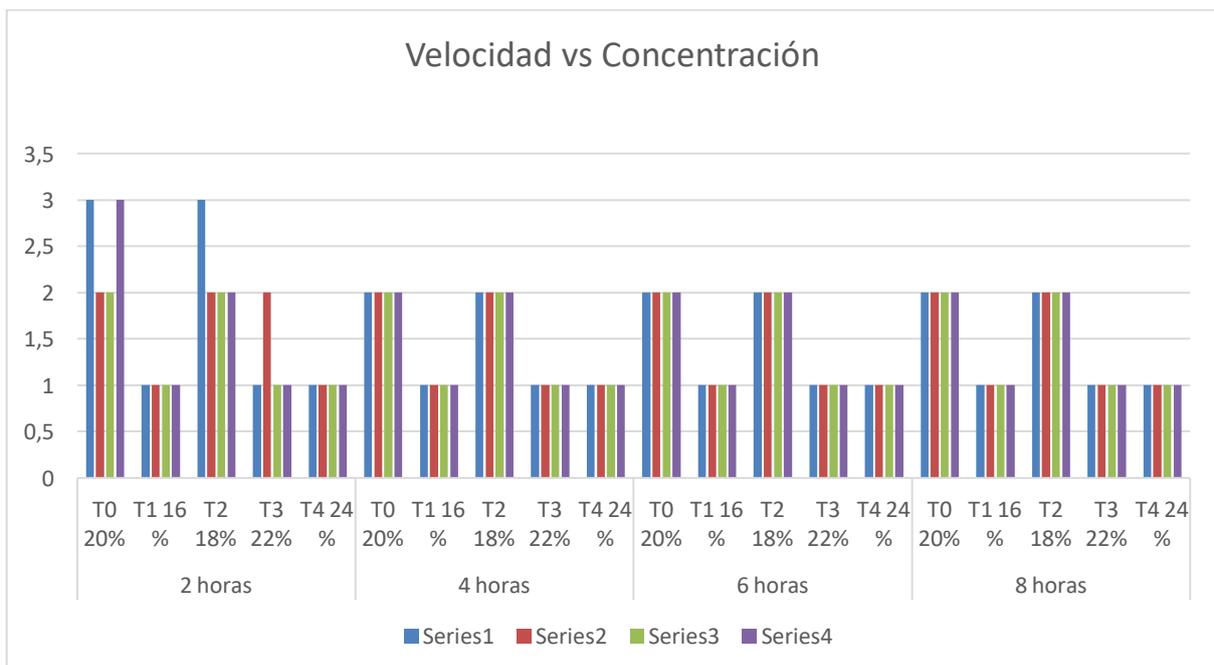
PROGRESIVIDAD % (6 horas)					
	T0 20%	T1 16 %	T2 18%	T3 22%	T4 24 %
toma 1 SM	30	5	30	8	0
toma 2 SM	35	10	20	4	2
toma 1Br	25	5	30	3	4
toma 2 br	15	5	20	5	2
Promedio	26,25	6,25	25	5	2

PROGRESIVIDAD % (8 horas)					
	T0 20%	T1 16 %	T2 18%	T3 22%	T4 24 %
toma 1 SM	25	1	20	3	0
toma 2 SM	30	2	10	2	2
toma 1Br	20	2	15	1	2
toma 2 br	10	2	10	3	1
Promedio	21,25	1,75	13,75	2,25	1,25

Los valores de probabilidad en esta prueba se muestran en el recuadro azul y como se observa todos los valores son menores a 0,05 por lo cual se puede decir que existen diferencias significativas entre los tratamientos para la variable progresividad, para saber cuáles tratamientos son mejores se utilizan las medianas (recuadro rojo) como se observa las medianas más altas se ven en los tratamientos control y dos.

En el caso de la velocidad por ser una variable categórica su análisis estadístico es muy complejo, por lo cual en este caso se prefiere mostrar una tendencia a través de un gráfico que se muestra a continuación:

Grafico 1. Velocidad espermática vs Concentración



El gráfico muestra que la velocidad 1 y 2 son las más frecuentes y solo hay 3 casos en los que se muestran velocidades de 3.

Finalmente se analizaron las variables Progresividad y Vitalidad espermática postcongelación (0 horas), la prueba de normalidad para esas variables se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 9. Prueba de Normalidad para las variables progresividad y vitalidad espermática (0 Horas).

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
PROGRESI	20	38,75	16,85	0,91	0,1743
VITALIDAD E	20	39,50	16,21	0,94	0,4820

Los valores de $p > 0,05$ indica que los datos distribuyen de manera normal, por lo cual se hará un análisis de varianza para ambas variables el cual se muestra a continuación:

Tabla 10. Análisis de Varianza y Prueba de Tukey para la variable “Progresividad 0 horas”

PROGRESI

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
PROGRESI	20	0,88	0,82	18,51

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	4725,00	6	787,50	15,31	<0,0001
RAZA	11,25	1	11,25	0,22	0,6478
MUESTRA	1,25	1	1,25	0,02	0,8785
TRATAM	4712,50	4	1178,13	22,90	<0,0001
Error	668,75	13	51,44		
Total	5393,75	19			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=15,96885

Error: 51,4423 gl: 13

TRATAM Medias n E.E.

T	Medias	n	E.E.	Grupos
T4	18,75	4	3,59	A
T3	26,25	4	3,59	A B
T1	36,25	4	3,59	B
T2	55,00	4	3,59	C
To	57,50	4	3,59	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

PROGRESIVIDAD %					
	T0 20%	T1 16 %	T2 18%	T3 22%	T4 24 %
toma 1 SM	60	40	60	30	10
toma 2 SM	65	30	50	20	15
toma 1 Br	55	35	50	20	30
toma 2 Br	50	40	60	35	20
promedio	57,5	36,25	55	26,25	18,75

Para la variable progresividad se observa que existen diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$), dichas diferencias se evalúan con la prueba de Tukey que muestra que las mayores motilidades se observan en el tratamiento control y dos.

Tabla 11. Análisis de Varianza y Prueba de Tukey para la variable “Vitalidad 0 horas”

VITALIDAD E

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
VITALIDAD E	20	0,83	0,75	20,32

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	4157,50	6	692,92	10,76	0,0002
RAZA	80,00	1	80,00	1,24	0,2853
MUESTRA	45,00	1	45,00	0,70	0,4184
TRATAM	4032,50	4	1008,13	15,65	0,0001
Error	837,50	13	64,42		
Total	4995,00	19			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=17,87040

Error: 64,4231 gl: 13

TRATAM Medias n E.E.

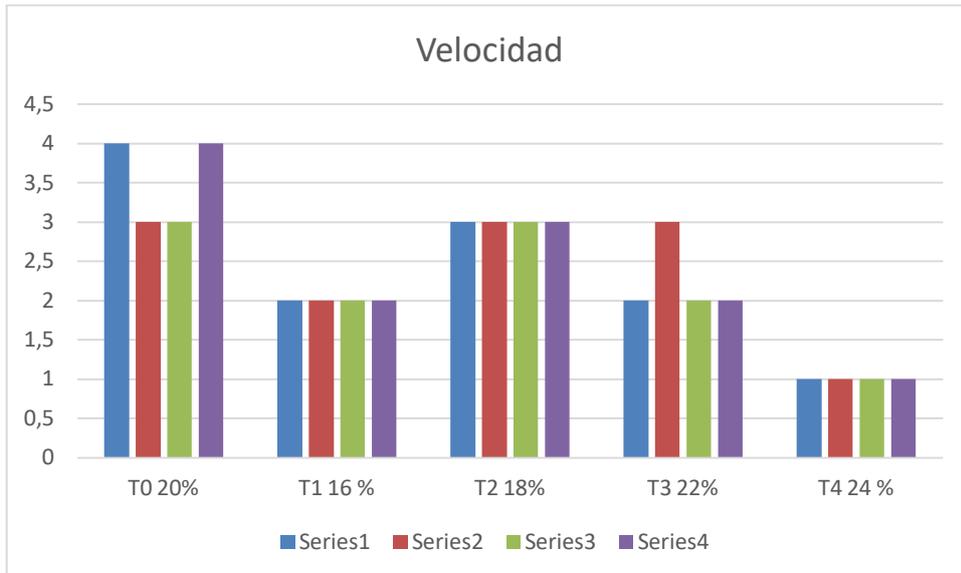
T	Medias	n	E.E.	Grupos
T4	20,00	4	4,01	A
T3	33,75	4	4,01	A B
T1	35,00	4	4,01	A B
T2	46,25	4	4,01	B C
To	62,50	4	4,01	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

VELOCIDAD 1-5					
	T0 20%	T1 16 %	T2 18%	T3 22%	T4 24 %
toma 1 SM	4	2	3	2	1
toma 2 SM	3	2	3	3	1
toma 1 Br	3	2	3	2	1
toma 2 Br	4	2	3	2	1

En este caso se observa también que existen diferencias significativas entre tratamientos presentándose una mayor vitalidad en los tratamientos control y 2.

Grafico 2. Velocidad espermática 0 hora



8. CONCLUSIONES

- Los tratamientos con una concentración de proteína del 20% y del 18% respectivamente son los más recomendados para los procesos de crio preservación, por cuanto los valores de probabilidad fueron menores a 0,05, lo que permite deducir que existen diferencias significativas entre los tratamientos para la variable progresividad, observando las medianas más altas en los tratamientos control y 2.
- Los tratamientos con una concentración de proteína del 20% y del 18% respectivamente fueron los que mejor progresividad espermática presentaron contribuyendo esto con la calidad del material seminal, por cuanto la variable progresividad demostró que existen diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$) y al realizar la evaluación con la prueba de Tukey se observó que las mayores motilidades se presentaron en el tratamiento control y 2.
- La realización de este y de otros estudios sobre biotecnología reproductiva permitirán conocer en una mayor proporción, los factores que mejoren la calidad del semen y contribuirán enormemente a un mayor desarrollo de los factores productivos en la provincia del Sumapáz.
- La utilización del laboratorio de biotecnología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias del programa de Zootecnia de la Universidad de Cundinamarca, es una

herramienta fundamental para el desarrollo de la investigación de la biotecnología reproductiva en la región del Sumapáz.

- Una mayor cualificación de la calidad de la investigación reproductiva en la zona, solo se logrará motivando e incentivando este tipo de investigaciones, que tengan la participación y el interés de los futuros profesionales del sector agropecuario.

9. BIBLIOGRAFIA

- Amann, R.P.; Pickett, B.W. 1987. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Science* 7: 145-176.
- Almlid, T. y Johnson, L.A. 1988. Effects of glycerol concentration, equilibration time and temperature of glycerol addition on post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in straws. *J Anim Sci.* 66: 2899- 2905.
- Aguirre, L., Bermeo, A., Maza, D., & Merino, L. (2011). *Estudio fenotípico y zoométrico del bovino criollo de la sierra media y alta de la región sur del Ecuador (RSE)*. Recuperado el 20 de febrero de 2017, de http://www.uco.es/conbiand/aica/templatemo_110_lin_photo/articulos/2011/Aguirre2011_1_392_396.pdf
- Amann RP, Pickett BW. (1987). Principle of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *J Equine Vet Sci* 7: 145-173
- Aké-López, R., Sánchez-Encalada, W., & Mérida, A. D. (1997). Efecto de la remoción parcial del plasma seminal sobre la congelabilidad del semen bovino. Recuperado el 20 de febrero de 2017 de http://www.imbiomed.com/1/1/articulos.php?method=showDetail&id_articulo=21468&id_seccion=136&id_ejemplar=2208&id_revista=22

- Arieta, R., Fernández, J., & Menchaca, J. (2014). Métodos de Extracción de Semen Bovino. *REDVET*, 15(5), 1-8.
- Ávila-Portillo, L. M., Madero, J. I., López, C., León, M. F., Acosta, L., Gómez, C., . . . Gómez, C. (2006). Fundamentos de criopreservación. *Revista colombiana de obstetricia y ginecología*, 57(4), 291-300.
- Bittencourt, R.; Ribeiro, A.; Santos, A.; Fürst, R.; Texeira, R. y Chalhoub, M. 2004. Freezing goat semen with glycerol and ethylene glycol as the cryoprotective agents. 15th Internacional Congress on Animal Reproduction. Porto Seguro, Brasil. 487 p.
- Barth, A., Bo, G., Bogliatti, G., Tribulo, H., Tribulo, R., 2006. Fisiología de la reproducción del toro y evaluación de la capacidad reproductiva, Córdoba, Argentina, 182 pp.
- Barszcz, K., Wiesetek, D., Wąsowicz, M., & Kupczyńska, M. (2012). Bull Semen Collection and Analysis for Artificial Insemination. *Journal of Agricultural Science*, 4(3).
- Barszcz, K., Wiesetek, D., Wąsowicz, M., & Kupczyńska, M. (2012). Bull Semen Collection and Analysis for Artificial Insemination. *Journal of Agricultural Science*, 4(3).
- Björndahl, L., Söderlund, I., Johansson, S., Mohammadieh, M., Pourian, M. R., & Kvist, U. (2004). Why the WHO Recommendations for Eosin-Nigrosin Staining Techniques for Human Sperm Vitality Assessment Must Change. *Journal of andrology*, 25(5), 671-678.
- Curry, M.R. 2000. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Reviews of Reproduction*. 5: 46-52.
- Crespo, E., & Moreno, A. Q. (2014). Calidad seminal de toros criollo limonero. *Revista Científica*, 24(6), 518-525.
- Cabrera, P., & Pantoja, C. (2012). VIABILIDAD ESPERMÁTICA E INTEGRIDAD DEL ACROSOMA EN SEMEN CONGELADO DE TOROS NACIONALES. Recuperado el 18 de marzo de 2017 de <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/veterinaria/article/view/899>

- Corteel, J.M., 1977. Production, storage and insemination of goat semen. Proc. Symposium Management of Reproduction in sheep and goats. Am. Soc. of Anim. Sci., 41-57.
- Garde J, M Aguado, S Pérez, D Garrido, M Pérez-Guzmán, V Montoro. 1994. Physiological characteristics of epididymal spermatozoa from post-mortem rams. *Theriogenology* 41, 203.
- Moussa, M., Martinet, V., Trimeche, A., Tainturier, D., & Anton, M. (2002). Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen–thawed bull semen. *Theriogenology*, 57(6), 1695-1706.
- Curbelo Curbelo, M., & Rodríguez Rodríguez, Z. (2013). *Relevamiento de laboratorios de procesamiento de semen bovino en Uruguay*. Recuperado el 15 de 03 de 2017, de <https://www.colibri.udelar.edu.uy/handle/123456789/2730>.
- Furman, J.W., Ball, L., Seidel, G.E., 1975. Electroejaculation of bulls using pulse waves of variable frequency and length. *J. Anim. Sci.* 40, 665.
- Gomez Ma. Protocolo para la evaluación en semen en rumiantes. Consultado de http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/cria_toros/49-ProtocoloEvalSemen.pdf.
- Ishibashi, K.; Kuwanhara, M.; Gu, Y.; Kageyama, Y.; Tohsaka, A.; Suzuki, F.; Marumo, F. y Sasaki, S. 1997. Cloning and functional expression of a new water channel abundantly expressed in the testis permeable to water, glycerol and urea. *Journal of Biological Chemistry*. 272: 20782-20786.
-
- Januškauskas, A., & Žilinskas, H. (2002). Bull semen evaluation post-thaw and relation of semen characteristics to bull's fertility.
- Martinez-Pastor F, V Garcia-Macias, M Alvarez, C Chamorro, P Herraiez, P Paz, L Anel. 2006. Comparison of methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. *Theriogenology* 65, 471-485.
- Medeiros, C.M.; Forell, F.; Oliveira, A.T. y Rodrigues, J.L. 2002. Current status of sperm cryopreservation: Why isn't it better?. *Theriogenology*. 57: 327 – 344
- Maxwell, W. y Watson, P. 1996. Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim. Repro. Sci.* 42: 55-65.

- Medeiros, C. M., Forell, F., Oliveira, A. T., & Rodrigues, J. L. (2002). Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*, 57(1), 327-344.
- Sesma, B. R., Hernández, H. R., Nazar, P. M., TíPacamú, G. A., & Velasco, H. L. (2008). Comportamiento reproductivo de sementales bovinos de la raza pardo suizo (*Bos taurus*) activos, en un sistema de monta abierta en la región Central del estado de Chiapas.
- Mozo, R., Alabart, J. L., Rivas, E., Echegoyen, E., Navarro, M. A., & Folch, J. (2012). Desarrollo de un dispositivo intravaginal para la recogida de semen en ganado ovino.
- James AN, H Green, S Hoffman, AM Landry, D Paccamonti, RA Godke. 2002. Preservation of equine sperm stores in the epididymis at 4°C for 24, 28, 72 and 96 hours. *Theriogenology* 58, 401-404
- Martins CF, R Rumpf, DC Pereira, MN Dode. 2007. Cryopreservation of epididymal bovine spermatozoa from dead animals and its uses in vitro embryo production. *Anim Reprod Sci* 101, 326-331.
- Muiño, R., Fernández, M., Areán, H., Viana, J. L., López, M., Fernández, A., & Peña, A. I. (2005). Nuevas tecnologías aplicadas al procesado y evaluación del semen bovino en centros de inseminación artificial. Recuperado el 20 de febrero de 2017 de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=1271105>.
- Nunez-Martínez, I., Moran, J.M., Pena, F.J., 2006b. Two-step cluster procedure after principal component analysis identifies sperm subpopulations in canine ejaculates and its relation to cryoresistance. *J. Androl.* 27, 596–603.
- Lambrechts H, F Van Niekerk, W Coetzer, S Cloete, HG Vander. 1999. The effect of cryopreservation on the survivability, viability and motility of epididymal African buffalo (*Synceruscaffer*) spermatozoa. *Theriogenology* 52, 1241-1249.
- Lopez j., Revista veterinaria recordando la reproducción <http://www.reproduccionveterinaria.com/fisiologia-y-anatomia-obstetrica/macho/fisiologia-reproductiva-del-macho/semen/>.
- Polge, C.; Smith, A.; Parks, A. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 164: 666.

- Pickett, B.W., Back, D.G., 1973. Procedures for preparation, collection, evaluation and insemination of stallion semen. Ft. Collins, Col., Colorado State University, General Series 934, 501-531.
- Palma G; (2001). Determinación de la concentración de células espermáticas en el eyaculado, recuperado el 28 de octubre de 2017 de http://www.reprobiotec.com/congel_concentr.html.
- Rubio, G., (2009). Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides de toros. *Revista Científica, FCV-LUZ / Vol. XIX, N° 4, 382 - 389, 2009.*
- Salisbury, G.W., VanDemark, N.L., Lodge, J.R., 1978. Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle. Principles and techniques of freezing spermatozoa. (2ed). Freeman and Company. San Francisco. pp. 494-554.
- Sesma, B. R., Hernández, H. R., Nazar, P. M., Llaven, M. Á., Miceli, F. A., Martínez, R. I Trujillo, G. U. (2010). Caracterización reproductiva de toros *Bos taurus* y *Bos indicus* y sus cruzas en un sistema de monta natural y sin reposo sexual en el trópico Mexicano. *Revista Científica UDO Agrícola, 10(1), 94-102.*
- Sánchez Riquelme, A., & Garrido Burgos, D. (2013). Evaluación de una prueba hipoosmótica simplificada en semen canino fresco y refrigerado. *Revista Científica, recuperado 20 de febrero de 2017 de <http://produccioncientific Luz.org/index.php/cientifica/article/view/15835>.*
- Salamon, S. y Maxwell. W. 2000. Storage of ram semen. *Anim. Repro. Sci. 62: 77-111.*
- Mazur, P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am. J. Physiol. 247: 125 - 142.*
- Salamon, S. y Maxwell, W.M. 1995a. Frozen storage of ram semen: I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Anim Reprod Sci. 37: 185-249.*
- Vidament, M.; Ecot, P.; Noue, P.; Bourgeois, G.; Magistrini, M.; Palmer, E. 2000. Centrifugation and addition of glycerol at 22 °C instead of 4 °C improve post-thaw sperm motility and fertility of stallion spermatozoa. *Theriogenology 54: 907-919.*
- Parks, J. (2015). Processing and handling bull semen for artificial insemination— Don't add insult to injury. *Department of Animal Science Cornell University.*

- Pinto, C. R., Loaiza, R. A., Arias, J. L., Gonzalez, J. L., Villadiego, F. C., & Garay, O. V. (2012). Efecto de los niveles de proteína y energía de la dieta sobre la calidad seminal y los perfiles metabólicos de toros Brahman. *Revista Científica*, 22(2).
- Petrunkina, 2007, Managment of wounds involving synovial structures, *Clinical Technics in practice*, Elsevier, 3: P. 204-214.
- Van Camp, S.D., 1997. Common causes of infertility in the bull. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 13 (2), 203-31.
- Yildiz, C., Kaya, A., Aksoy, M., & Tekeli, T. (2000). Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology*, 54(4), 579-585.