

Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias e Ingenierías Biológicas y Químicas
Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia



**“EVALUACIÓN COMPARATIVA DE LA CALIDAD SEMINAL Y
FUNCIONAL DE SEMEN CRIO PRESERVADO COMERCIAL DE
ORIGEN NACIONAL EN BOVINOS LECHEROS DE TRES
CENTROS DE COLECCIÓN SEMINAL, AREQUIPA, 2016”**

**“COMPARATIVE EVALUATION OF THE SEMINAL AND
FUNCTIONAL QUALITY OF COMMERCIALLY CRYO-PRESERVED
SEMEN OF BOVINES NATIONAL ORIGIN OF THREE SEMINAL
COLLECTION CENTERS, AREQUIPA, 2016”**

Tesis Presentada Por:

Quispe Pari, Génesis Nardelly

Tesis para optar el Título Profesional de:

Médico Veterinario y Zootecnista.

Asesor:

Dr. Reátegui Ordoñez, Juan Eduardo

**AREQUIPA-PERÚ
2018**



Universidad Católica de Santa María

(51 54) 382038 Fax: (51 54) 251213 ✉ ucsm@ucsm.edu.pe 🌐 http://www.ucsm.edu.pe Apartado: 1350

AREQUIPA - PERÚ

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERIAS BIOLÓGICAS Y QUÍMICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DICTAMEN PASE A SUSTENTACIÓN

El jurado dictaminador presidido por el MGTER. GUILLERMO VASQUEZ RODRIGUEZ e integrado por el vocal DR. FERNANDO FERNANDEZ FERNANDEZ y secretario el MGTER. JORGE ZEGARRA PAREDES;

DICTAMINA:

Que el Borrador de tesis titulado:

EVALUACION COMPARATIVA DE LA CALIDAD SEMINAL Y FUNCIONAL DE SEMEN CRIO PRESERVADO COMERCIAL DE ORIGEN NACIONAL EN BOVINOS LECHEROS DE TRES CENTROS DE COLECCIÓN SEMINAL, AREQUIPA 2016.”

presentado por (la) Sr.(s)(ita):

QUISPE PARI, GENESIS NARDELLY;

Puede ser sustentado públicamente después de tener en cuenta las observaciones del dictamen adjunto. Caso contrario, el (la) Bachiller asume la responsabilidad que pudiera derivarse.

Asesor(a): DR. JUAN EDUARDO REÁTEGUI ORDOÑEZ

Arequipa, 12 de enero del 2018


MGTER CARLO SANZ LUDENA
Director de la Escuela Profesional de
Medicina Veterinaria y Zootecnia

CSL/DEPMVZ
JL.



Universidad Católica de Santa María

(51 54) 382038 Fax:(51 54) 251213 ✉ ucsm@ucsm.edu.pe 🌐 http://www.ucsm.edu.pe Apartado: 1350

AREQUIPA - PERÚ

“IN SCIENTIA ET FIDE EST FORTITUDO NOSTRA”
(En la Ciencia y en la Fe está nuestra fuerza)

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DICTAMEN BORRADOR DE TESIS

Señor Magíster
CARLO SANZ LUDEÑA
Director de la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Presente.-

Mediante el presente, comunicamos a usted que se ha procedido a revisar el Borrador de Tesis titulado:

“EVALUACION COMPARATIVA DE LA CALIDAD SEMINAL Y FUNCIONAL DE SEMEN CRIO PRESERVADO COMERCIAL DE ORIGEN NACIONAL EN BOVINOS LECHEROS DE TRES CENTROS DE COLECCIÓN SEMINAL. AREQUIPA 2016.”

presentado por:

QUISPE PARI, GENESIS NARDELLY;

Asesorado (a) por el(la) DR. JUAN EDUARDO REÁTEGUI ORDOÑEZ

El jurado dictaminador presidido por el MGTER. GUILLERMO VASQUEZ RODRIGUEZ, e integrado por la vocal DR. FERNANDO FERNANDEZ FERNANDEZ y secretario el MGTER. JORGE ZEGARRA PAREDES;

DICTAMINA:

apto pro sustentación

OBSERVACIONES

Arequipa, *11* de *enero* del *2017*

Guillermo Vasquez
MGTER. GUILLERMO VASQUEZ RODRIGUEZ
Presidente

Fernando Fernandez
DR. FERNANDO FERNANDEZ FERNANDEZ
Vocal

Jorge Zegarra
MGTER. JORGE ZEGARRA PAREDES
Secretario



Universidad Católica de Santa María

(51 54) 382038 Fax: (51 54) 251213 ✉ ucsm@ucsm.edu.pe 🌐 http://www.ucsm.edu.pe Apartado: 1350

AREQUIPA - PERÚ

"IN SCIENTIA ET FIDE EST FORITUDO NOSTRA"

(En la Ciencia y en la Fe está nuestra fuerza)

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DICTAMEN DE PLAN DE TESIS

Señor Doctor:

OVIDIO VELASCO VELASQUEZ

Director de la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Presente.-

Mediante el presente, comunicamos a usted que se ha procedido a revisar el plan de Tesis Titulado:

"EVALUACION DE LA CALIDAD SEMINAL Y FUNCIONAL DEL SEMEN
CRIOPRESERVADO COMERCIAL DE ORIGEN NACIONAL EN BOVINOS LECHEROS.

AREQUIPA. AREQUIPA 2016."

presentado por el (la) Sr.(s)(ita):

QUISPE PARI, GENESIS NARDELLY

Asesor: DR. JUAN REATEGUI ORDOÑEZ

El jurado dictaminador presidido por el MGTER. GUILLERMO VÁSQUEZ RODRÍGUEZ e
integrado por el MGTER. FERNANDO FERNANDEZ FERNANDEZ y el MGTER. JORGE
ZEGARRA PAREDES

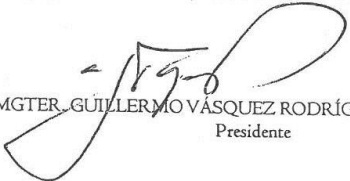
DICTAMINA:

Apto para su Ejecución

OBSERVACIONES

*"Evaluación Comparativa de la Calidad Seminal
y funcional del Semen Criopreservado Comercial
de Origen Nacional en Bovinos Lecheros de los Centros de
Selección Seminal Arequipa 2016"*

Arequipa, 15 de Diciembre de 2016


MGTER. GUILLERMO VÁSQUEZ RODRÍGUEZ
Presidente


MGTER. FERNANDO FERNANDEZ FERNANDEZ
Vocal


MGTER. JORGE ZEGARRA PAREDES
Secretario



Universidad Católica de Santa María

☎ (51 54) 382038 Fax: (51 54) 251213 ✉ ucsm@ucsm.edu.pe 🌐 <http://www.ucsm.edu.pe> Apartado: 1350

AREQUIPA - PERÚ

INSCRIPCIÓN PLAN DE TESIS 2016

Bachiller: QUISPE PARI, GENESIS NARDELLY

El jurado dictaminador presidido por el MGTER. GUILLERMO VÁSQUEZ RODRÍGUEZ e integrado por el DR. FERNANDO FERNANDEZ FERNANDEZ y el MGTER. JORGE ZEGARRA PAREDES; de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos, Título III del Título Profesional de Primera Especialidad, Capítulo III, de la Elaboración, Presentación y Aprobación de un Trabajo de Tesis, Art. 20; el Director de la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia;

DICTAMINA:

Autorizar la inscripción del Plan de Tesis titulado

“EVALUACION COMPARATIVA DE LA CALIDAD SEMINAL Y FUNCIONAL DEL SEMEN CRIO PRESERVADO COMERCIAL DE ORIGEN NACIONAL EN BOVINOS LÉCHEROS DE TRES CENTROS DE COLECCIÓN SEMINAL, AREQUIPA 2016”.

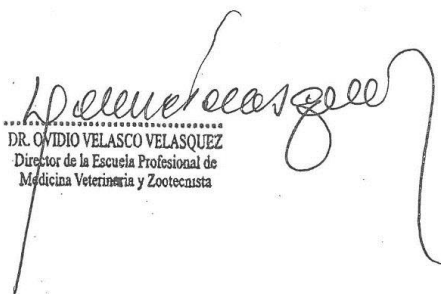
presentado por el (la) Sr.(ita) Alumno(a) de la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia;

QUISPE PARI, GENESIS NARDELLY

por un período de seis (06) meses a partir de la fecha; debiendo el (la) recurrente proceder al desarrollo del mismo, teniendo en cuenta las observaciones del jurado dictaminador del Plan de Tesis.

ASESOR: DR. JUAN REATEGUI ORDOÑEZ

Arequipa, 20 de diciembre del 2016



DR. OVIDIO VELASCO VELASQUEZ
Director de la Escuela Profesional de
Medicina Veterinaria y Zootecnista

OVV/DEPMVZ
Jl.



DEDICATORIA

A mi familia que es mi razón de ser
y mi motivación más grande para
seguir adelante. Para mis padres por
su apoyo, amor y comprensión.

Me han formado con dedicación y
cariño y gracias a ellos soy lo que soy
como persona: mis valores, mis principios,
mi carácter y mis ganas de vivir.

AGRADECIMIENTO

A mi asesor Dr. Juan Reátegui Ordoñez por su tiempo, su gran apoyo, sus enseñanzas y su motivación.

A mis jurados, Mg. Guillermo Vásquez Rodríguez, Dr. Fernando Fernández Fernández y Mg. Jorge Zegarra Paredes, por los conocimientos y el apoyo brindado.

A la Universidad Católica de Santa María, Vicerrectorado de Investigación, Laboratorio de Biotecnología Animal, proyecto “Determinación de la calidad del semen crio preservado comercial utilizado en hatos lecheros, implicancia en la fertilidad e impacto en variables productivas”. Resolución Nro. 24157-R-2017 por el financiamiento de la presente investigación mediante fondos propios concursable.

A mi familia, por su apoyo incondicional en cada etapa de mi vida, y especialmente en esta, por sus consejos amorosos y por su esfuerzo realizado para permitir que culminara mis estudios y pueda terminar mi tesis.

A quien creyó en mi, Jean Franco, me apoyó y no dejó que me rindiera en los momentos de debilidad en la elaboración de mi tesis.

INDICE

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTO

INDICE

RESUMEN

SUMMARY

CAPITULO I: INTRODUCCION

1.1. ENUNCIADO DEL PROBLEMA	10
1.2. DESCRIPCION DEL PROBLEMA	10
1.3. EFECTO EN EL DESARROLLO LOCAL Y REGIONAL.....	11
1.4. JUSTIFICACION DEL TRABAJO	11
1.4.1. Aspecto General	11
1.4.2. Aspecto Tecnológico	11
1.4.3. Aspecto Social.....	12
1.4.4. Aspecto Económico	12
1.4.5. Importancia del Trabajo	12
1.5. OBJETIVOS	13
1.5.1. Objetivo General	13
1.5.2. Objetivos Específicos	13
1.6. PLANTEAMIENTO DE LA HIPOTESIS.....	13

CAPITULO II: MARCO TEORICO CONCEPTUAL

2.1. ANALISIS BIBLIOGRAFICO	14
2.1.1. Introducción	14
2.1.2. Crio preservación	15
2.1.3. Espermatozoides y Plasma seminal	17
2.1.3.1. Semen	17
2.1.3.2. Células Espermáticas	18

2.1.4. Evaluación de la Calidad del Semen	22
2.1.4.1. Parámetros Microscópicos.....	23
a) Motilidad Progresiva	23
b) Concentración Espermática	26
c) Vitalidad Espermática	27
d) Integridad de Membrana Plasmática	29
e) Morfología Espermática	31
f) Integridad Acrosomica	41
2.2. ANTECEDENTES DE INVESTIGACION	45
 CAPITULO III: MATERIALES Y METODOS	
3.1. MATERIALES	50
3.1.1. Localización Del Trabajo	50
3.1.2. Materiales Biológicos.....	50
3.1.3. Materiales de Laboratorio	50
3.1.4. Materiales de campo	51
3.1.5. Equipos	51
3.1.6. Otros Materiales	51
3.2. METODOS	52
3.2.1. Muestreo	52
3.2.2. Métodos de Evaluación	52
3.2.3. Variables de Respuesta	58
3.2.4. Evaluación Estadística.....	58
 CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSION	
4.1. EVALUACION COMPARATIVA DE LOS PARAMETROS MICROSCOPICOS EN SEMEN CRIOPRESERVADO BOVINO COMERCIAL DE 3 CENTROS DE COLECCIÓN SEMINAL (AREQUIPA, PERU) 2016	60

Tabla N°1. Motilidad Progresiva Promedio (%) de semen bovino en 3 Centros de Colección Seminal1 considerando 2 horas de evaluación.....	60
Gráfico N°1. Motilidad Progresiva Promedio de semen bovino en 3 Centros de Colección Seminal considerando 2 horas de evaluación	60
Tabla N°2. Concentración Espermática Promedio (spz/ml) de semen bovino crio preservado en 3 Centros de Colección Seminal	62
Gráfico N°2. Concentración Espermática Promedio (spz/ml) de semen bovino crio preservado en 3 Centros de Colección Seminal.	62
Tabla N°3. Anormalidades de cabeza y cola Promedio (%) de semen bovino crio preservado en 3 Centros de Colección Seminal	64
Gráfico N°3. Anormalidades de cabeza y cola Promedio (%) de semen bovino crio preservado en 3 Centros de Colección Seminal	64
Tabla N°4. Morfología Espermática Total Promedio (%) de semen bovino crio preservado en 3 Centros de Colección Seminal	66
Gráfico N°4. Morfología Espermática Total Promedio (%) de semen bovino crio preservado en 3 Centros de Colección Seminal	66

4.2. DETERMINACION COMPARATIVA DE LOS PARAMETROS FUNCIONALES EN SEMEN CRIOPRESERVADO BOVINO COMERCIAL DE 3 CENTROS DE COLECCIÓN SEMINAL (AREQUIPA, PERU) 2016	68
Tabla N°5. Vitalidad Promedio (%) de semen bovino crio preservado en 3 Centros de Colección Seminal	68
Gráfico N°5. Vitalidad Promedio (%) de semen bovino crio preservado en 3 Centros de Colección Seminal	68
Tabla N°6. Integridad de Membrana Plasmática Promedio (%) de semen bovino crio preservado en 3 Centros de Colección Seminal	70
Gráfico N°6. Integridad de Membrana Plasmática Promedio (%) de semen bovino crio preservado en 3 Centros de Colección Seminal	70
Tabla N°7. Integridad de Acrosoma Promedio (%) de semen bovino crio preservado en 3 Centros de Colección Seminal	72
Gráfico N°7 Integridad de Acrosoma Promedio (%) de semen bovino crio preservado en 3 Centros de Colección Seminal	72
CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	75
5.1. CONCLUSIONES	75
5.2. RECOMENDACIONES	78
CAPITULO VI: BIBLIOGRAFIA	79
CAPITULO VII: ANEXOS	85

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Animal del Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Católica de Santa María. El objetivo es determinar la calidad seminal y funcional del semen crio preservado comercial de origen nacional en bovinos lecheros de 3 Centros de Colección Seminal de Arequipa del año 2016. Se evaluaron en total 30 pajillas de semen bovino, 10 por cada Centro de Colección Seminal. Se evaluó: concentración, motilidad, vitalidad, morfología, integridad de membrana plasmática e integridad de acrosoma después del proceso de descongelamiento. Los resultados obtenidos para el Centro 1, Centro 2 y Centro 3 después de la descongelación fueron en motilidad progresiva: 41%, 49% y 46%; en concentración: 22.25×10^6 , 27.25×10^6 , 19.88×10^6 espermatozoides por pajilla (0.5ml); en morfología total: 22.20%, 17.95% y 22.45%; en vitalidad: 55.60%, 55.90% y 52.90%; en integridad de membrana plasmática: 69.75%, 64.40% y 56.05% y en integridad de acrosoma: 3.75%, 4.60% y 5.25% respectivamente.

Se encontró que de los parámetros espermáticos evaluados microscópicos hubieron diferencias significativas ($P < 0.05$) solo en el parámetro de morfología total en el Centro de Colección 2 con un 17.95%, y en relación a los parámetros funcionales solo se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) en el parámetro de integridad de membrana plasmática en el Centro 2 con un 64.40%. Por lo tanto teniendo en cuenta los parámetros básicos de evaluación comparados con los promedios de todos los Centros de Colección Seminal evaluados en esta investigación, el Centro de Colección Seminal 2 cumple con los estándares y cuenta con mejores muestras de semen crio preservado comercial de origen nacional de bovinos lecheros siendo considerada de entre los tres Centros de Colección Seminal evaluados el de mejor calidad seminal y funcional.

Palabras clave: evaluación, semen, bovinos, calidad, motilidad, vitalidad, concentración, morfología, acrosoma, membrana plasmática.

SUMMARY

The present research work was carried out in the Animal Biotechnology Laboratory of the Vice-Rectorate for Research of the Catholic University of Santa Maria. The objective is to determine the seminal and functional quality of commercial condom semen from national origin in dairy cattle from 3 Seminal Collection Centers of Arequipa in 2016. A total of 30 straws of bovine semen were evaluated, 10 for each Seminal Collection Center. It was evaluated: concentration, motility, vitality, morphology, integrity of the plasma membrane and acrostic integrity after the thawing process.

The results obtained for Center 1, Center 2 and Center 3 after thawing were in progressive motility: 41%, 49% and 46%; in concentration: 22.25 x10⁶, 27.25 x10⁶, 19.88 x10⁶ spermatozoa per straw (0.5ml); in total morphology: 22.20%, 17.95% and 22.45%; in vitality: 55.60%, 55.90% and 52.90%; in plasma membrane integrity: 69.75%, 64.40% and 56.05% and in acrosomal integrity: 3.75%, 4.60% and 5.25% respectively.

The microscopic evaluated sperm parameters showed significant differences ($P < 0.05$) only in the parameter of total morphology in the Collection Center 2 with 17.95%, and in relation to the parameters evidence only differences ($P < 0.05$) in the integrity parameter of the plasma membrane in Center 2 with 64.40%. Therefore, taking into account the basic parameters of evaluation compared with the averages of all the Seminal Collection Centers evaluated in this research, the Seminal 2 Collection Center complies with the standards and has the best samples of semen preserved commercial national of dairy cattle being considered among the three centers of the seminal collection evaluated the best seminal and functional quality.

Keywords: evaluation, semen, bovines, quality, motility, vitality, concentration, morphology, acrosome, plasma membrane.

CAPITULO I. INTRODUCCION

1.1. ENUNCIADO DEL PROBLEMA

Evaluación comparativa de la calidad seminal y funcional del semen crio preservado comercial de origen nacional en bovinos lecheros de 3 Centros de Colección Seminal. Arequipa 2016.

1.2. DESCRIPCION DEL PROBLEMA

La inseminación artificial (IA) es uno de los factores importantes dentro del manejo reproductivo de los sistemas de producción animal y es una de las biotecnologías más difundida en la ganadería lechera por ende la utilización masiva de la IA en ganaderos lecheros es consecuencia del desarrollo de la técnica de crio preservación de gametos eficaz para conservar el semen bovino durante un tiempo prolongado.

La calidad seminal de la crio preservación del gameto masculino va a ser determinante del éxito de la inseminación artificial para lograr mayores tasas de preñez en hatos lecheros por ende es necesario monitorear y evaluar la calidad del semen crio preservado comercial de bovinos lecheros en Centros de Colección Seminal de nuestro país y nuestra región.

En la actualidad para la comercialización de semen importado se solicitan varias evaluaciones de tal manera que se garantiza su calidad sin embargo no existe un medio de control para la evaluación de calidad de las pajillas de semen de origen nacional con fines comerciales en nuestra región, ni tampoco registros actualizados de los Centros de Colección Seminal nacional existentes; es por esto que en la presente investigación se plantea la evaluación de semen crio preservado en el Perú para determinar su calidad.

1.3. EFECTO EN EL DESARROLLO LOCAL Y REGIONAL

La calidad del semen crio preservado de bovino, es de gran importancia en la actualidad por el uso masivo de este en la inseminación artificial. El semen crio preservado de buena calidad aumenta la tasa de preñez en hembras, asimismo mantiene la funcionalidad en los espermatozoides durante su periodo de conservación lo que es de gran importancia para los productores lecheros de la zona ya que de ello depende la fertilidad y la mejora de los índices reproductivos del rebaño lechero razón primordial del planteamiento de la presente investigación con la finalidad de evaluar el semen crio preservado comercial nacional.

1.4. JUSTIFICACION DEL TRABAJO

1.4.1. Aspecto General

La crio preservación de gametos procedentes de animales de alto valor genético, requiere de una exhaustiva y periódica evaluación, tal es el caso de la presente investigación que pretende evaluar la calidad seminal y funcional del semen crio preservado comercial nacional de razas lechera bovinas con la finalidad de evaluar su viabilidad en el uso de este en la inseminación artificial y garantizar altos índices reproductivos.

1.4.2. Aspecto Tecnológico

Con la presente investigación se aportará novedosos procedimientos y herramientas para la evaluación de semen bovino crio preservado comercial nacional que representara una tecnología innovadora para ser utilizada por los profesionales de campo especializados en biotecnologías reproductivas, además brindara un aporte tecnológico en el estudio de la calidad seminal de semen crio preservado en nuestro país.

1.4.3. Aspecto Social

Una alternativa para la utilización de animales de alto valor genético es la crío preservación de gametos masculinos, preservando el material genético de animales de importancia para el mejoramiento genético de los sistemas de producción de leche logrando mejorar la calidad genética y productiva de los productores lecheros; para ello el manejo adecuado del semen durante la colección, crío preservación y evaluación de fertilidad son un punto importante en los sistemas de producción animal para el logro de la mejora genética en los pequeños y medianos ganaderos de la región.

1.4.4. Aspecto Económico

En la actualidad tenemos un gran problema relacionado al campo reproductivo en la mayoría de los establecimientos ganaderos, la baja fertilidad y retorno al estro: uno de los factores que se suma a esta causa es el poco o nulo interés que se le toma al estudio del factor macho o espermático, al cual solo se le considera por costos de dosis seminal para así proceder a la inseminación, mas no se evalúa su calidad y funcionalidad espermática como indicador de fertilidad asumiendo que toda dosis comercial es de alta calidad.

La utilización de semen crío preservado comercial cuya calidad es probada y evaluada repercutirá en los porcentajes de preñez e indicadores reproductivos del rebaño lo que se traduce en una ganancia económica con un mejor manejo reproductivo del rebaño, costos y rentabilidad del sistema.

1.4.5. Importancia del trabajo

La importancia de la presente investigación radica en la evaluación de la calidad seminal y funcional del semen crío preservado comercial de bovinos para la utilización de la inseminación artificial en sistemas de producción lechera para asegurar altos índices de preñez.

1.5. OBJETIVOS

1.5.1. Objetivo General

Evaluar la calidad seminal y funcional del semen crio preservado comercial de origen nacional de bovinos lecheros para la inseminación artificial en la zona de influencia.

1.5.2. Objetivos Específicos

- 1) Evaluar los parámetros microscópicos en semen crio preservado bovino comercial de origen nacional:
 - 1.1) Motilidad
 - 1.2) Concentración Espermiática
 - 1.3) Morfología
- 2) Determinar la funcionalidad en semen crio preservado bovino comercial de origen nacional mediante:
 - 2.1) Vitalidad
 - 2.2) Membrana Plasmática
 - 2.3) Integridad Acrosómica

1.6. PLANTEAMIENTO DE LA HIPÓTESIS

Dado que: la calidad del semen crio preservado comercial está directamente relacionada con los parámetros microscópicos y funcionales es probable que:

Se pueda evaluar la calidad de semen crio preservado comercial de origen nacional según el Centro de Colección Seminal para garantizar los parámetros microscópicos y funcionales que aumenten los índices de fertilidad.

CAPITULO II.MARCO TEORICO

2.1. ANALISIS BIBLIOGRAFICO

2.1.1. Introducción

La inseminación artificial (IA) es la biotecnología reproductiva más antigua y más difundida en la especie bovina, es así que el conocimiento de la fertilidad o la capacidad fecundante de cada toro se convierten en uno de los principales objetivos en la producción de semen bovino. Resulta entonces, indispensable que el semen utilizado mantenga su capacidad de fertilización después del proceso de congelado-descongelado.

La capacidad de los espermatozoides de fecundar el ovocito y posteriormente de garantizar el desarrollo embrionario guarda relación con parámetros diversos como motilidad, metabolismo celular, integridad del acrosoma, integridad y funcionalidad de la membrana plasmática, integridad del ADN. (Muiño et al., 2005).

El mejoramiento genético de los animales de granja se ha beneficiado enormemente del uso de la inseminación artificial (IA). El desarrollo, perfeccionamiento y aplicación de la IA, lo que representa la primera generación de biotecnologías reproductivas, no sólo ha hecho posible la distribución de material genético en todo el mundo a bajo costo, sino que también ha contribuido en gran medida a frenar la propagación de enfermedades venéreas (Gil, 1999).

La utilización de semen bovino congelado representa la principal biotecnología reproductiva para el mejoramiento genético animal (Arruda et al., 2000; Freitas et al., 2009). Este impacto no habría sido posible sin la congelación acertada de semen de toro. Es posible ahora, a través de su uso, inseminar vacas con un toro superior en cualquier parte del mundo, aun luego de su muerte (Bailey et al., 2000). Además, se ha hecho posible el uso de semen de toro genéticamente superior en la inseminación de varias miles de vacas,

mucho más de lo que alguna vez se puede suponer con el uso de semen líquido.

El semen congelado en pajillas de 0,25ml o 0,5ml se ha convertido en la unidad universalmente aceptada de almacenamiento y transferencia de genética bovina a los productores de ganado (Baracaldo et al., 2007).

Durante las últimas décadas, la Inseminación Artificial ha demostrado ser la tecnología reproductiva que más ha contribuido a acelerar el progreso genético de las diferentes especies ganaderas, especialmente del ganado vacuno de aptitud láctea; sin embargo, el éxito de esta tecnología depende de que el semen utilizado tenga una calidad adecuada.

Uno de los objetivos prioritarios de la industria de la Inseminación Artificial ha sido la predicción de la capacidad fecundante del semen comercializado; con esta finalidad se han ido desarrollando a lo largo del tiempo diferentes métodos diagnósticos, desde la evaluación de la motilidad, concentración y morfología espermática de los eyaculados hasta la contrastación de dosis de semen congelado mediante sistemas de análisis computarizado, cartometría de flujo y tests de funcionalidad espermática basados en la fecundación in vitro.

2.1.2. Crio preservación

La preservación eficiente de las células espermáticas con su completa capacidad de fertilizar es el objetivo principal del proceso de crio preservación de semen.

El proceso de crio preservación representa una interrupción artificial del progreso del espermatozoide post eyaculación hacia la maduración y la fertilización (Januskauskas et al., 2002).

Son numerosos los efectos que la crio preservación puede inducir en los espermatozoides, que van desde lesiones letales hasta aquellas que solo alteran la función posterior. En los últimos años, el aumento considerable en la comprensión tanto de la fisiología celular del

espermatozoide y de las tensiones de la crío preservación ha contribuido a un renovado interés en la mejora del rendimiento de semen crío preservado. Hoy en día, las aplicaciones biotecnológicas de crío preservación disfrutan de un interés que no tiene precedentes.

El proceso de crío preservación reduce la viabilidad del espermatozoide 50 a 60 %, y causa varias alteraciones bioquímicas y estructurales que implican distintos compartimentos de la célula espermática (Chaveiro et al., 2006). Según González (2004), aproximadamente el 85 % de los espermatozoides bovinos presente en una muestra seminal sufre algún tipo de daño durante la congelación o en el procedimiento de descongelado.

La interrupción de la capacitación y/o la reacción del acrosoma comprometería severamente el potencial de fertilización de los espermatozoides, lo cual tal vez explique las tasas de fertilidad observadas en la práctica, de semen congelado, que estarían correlacionadas con la habilidad de los espermatozoides para moderar los niveles de calcio intracelulares (Bailey et al., 1994).

Durante la espermatogénesis, los espermatozoides pierden muchos de los organelos que poseen la mayoría de las células somáticas (como el retículo endoplásmico, los lisosomas, y la mayor parte del citoplasma) con el fin de reducir el "equipaje" que necesitan para llevar en el camino al óvulo. La función principal de un espermatozoide, fertilizar un ovocito, es un conjunto integrado de procesos, que requieren múltiples atributos celulares. Por lo tanto, aunque el espermatozoide contiene pocos organelos, sigue siendo una célula compleja, que tiene múltiples compartimentos celulares, composiciones de membrana, y las estructuras subcelulares, todas las cuales deben funcionar correctamente para que el espermatozoide pueda fertilizar un ovocito (Graham, 2001).

Es de especial interés para el profesional, que en la espermatogénesis, el ADN de la célula es condensado de tal manera que los genes no pueden ser expresados, por lo tanto el espermatozoide no puede sintetizar proteínas. Esto significa que la

célula no puede repararse de daño celular que se produce naturalmente o debido a intervenciones del hombre (manipulación de semen, refrigeración o crio conservación). (Graham, 2001).

Las células espermáticas deben presentar motilidad, actividad mitocondrial, la membrana celular y el acrosoma integridad total y el núcleo deberá estar condensado, permitiendo la interacción con el tracto genital femenino y la fertilización (Rodríguez, 2000; Graham, 2001).

Debido a la naturaleza multicompartimental de las células espermáticas y el daño que implica la crio preservación, las evaluaciones de laboratorio que con exactitud pueden determinar la viabilidad de muestras de semen son vitales. La calidad de semen bovino influye considerablemente en la tasa de no retorno y tasas de fertilización, en programas de inseminación artificial (Santos, 2003; Phillips et al., 2004b). Por ser una célula compleja, los espermatozoides se vuelven infértiles cuando uno de sus factores bioquímicos o morfológicos está afectado. La evaluación de solo uno de estos aspectos no garantiza la condición de normalidad del otro, por lo tanto la combinación de varios factores es un análisis multifactorial más apropiado para el diagnóstico de funcionalidad e integridad del espermatozoide (Melo y Henry, 1999).

Actualmente los métodos de evaluación utilizados en Centros de colecta y procesamiento de semen consisten básicamente en el análisis subjetivo de motilidad (antes y después del estrés térmico), concentración, morfología e integridad de las membranas plasmáticas y acrosomal (Crespilho et al., 2009).

2.1.3. Espermatozoides y Plasma Seminal

2.1.3.1. Semen

El semen es la suspensión celular líquida que contiene los gametos masculinos (los espermatozoides) y las secreciones de los órganos accesorios del aparato reproductor masculino.

La porción líquida de dicha suspensión, que se forma durante la eyaculación, se conoce como plasma seminal (Garner y Hafez; 2000).

En el plasma seminal se encuentran principalmente los siguientes grupos de sustancias:

- Iones y componentes inorgánicos
- Moléculas orgánicas pequeñas
- Hormonas (esteroides, prostaglandinas)
- Proteínas
- Enzimas

Las funciones de las sustancias contenidas en el plasma seminal son complejas y solo parcialmente conocidas. Se conocen las siguientes funciones:

- Medio de suspensión para los espermatozoides en los genitales de la hembra.
- Estimulación del transporte del esperma por los genitales de la hembra, por el efecto volumen y mediante componentes específicos (prostaglandinas, estrógenos).
- Abastecimiento de los espermatozoides con nutrientes y sustancias protectoras, como factores de anulación e inhibidores de proteinasas.
- Regulación de la función de los espermatozoides en los genitales de la hembra (Waberski; 2010).

2.1.3.2. Células Espermáticas

Los espermatozoides se forman en los túbulos seminíferos de los testículos. Estos túbulos contienen una serie compleja de células germinales en desarrollo que finalmente constituirán

los gametos masculinos. Los espermatozoides maduros son células alargadas consistentes en una cabeza aplanada portadora del núcleo y una cola que contiene el aparato necesario para la motilidad celular. El espermatozoide entero está cubierto por el plasmolema o membrana plasmática. El acrosoma, o casquete acrosómico, es una estructura de doble pared situada entre la membrana plasmática y la porción anterior de la cabeza del espermatozoide. Un cuello une la cabeza del espermatozoide con su cola (flagelo), la cual a su vez se subdivide en los segmentos medio, principal y caudal o terminal. (Garner y Hafez; 2000)

a) **Morfología del Espermatozoide**

- **Cabeza:** La característica principal de la cabeza del espermatozoide es el núcleo aplanado oval, que contiene cromatina muy compacta. La cromatina condensada consiste en un complejo formado por ácido desoxirribonucleico (DNA) y una clase especial de proteínas básicas llamadas protaminas espermáticas. Su número cromosómico y, por tanto, el contenido de DNA nuclear es haploide; esto es, posee la mitad de cromosomas que el núcleo de las células somáticas de la misma especie. La naturaleza haploide de las células espermáticas se debe a las divisiones celulares metódicas que ocurren durante su formación. (Garner y Hafez; 2000)
- **Acrosoma:** El extremo anterior del núcleo espermático está cubierto por el acrosoma, un delgado saco membranoso de doble capa ubicado sobre el núcleo y que se establece durante las últimas etapas de la formación del espermatozoide.

Esta estructura en forma de casquete, que contiene acrosina, hialuronidasa y otras enzimas hidrolíticas, participa en el proceso de la fecundación. El segmento ecuatorial del acrosoma es importante debido a que es esta parte del espermatozoide, junto con el segmento anterior de la región posacromosómica, la que se fusiona inicialmente con la membrana del oocito durante la fecundación. (Garner y Hafez; 2000)

- **Cola:** La cola espermática está formada por el cuello y los segmentos medio, principal y caudal. El cuello o segmento conector forma una placa basal que embona en una depresión en el extremo posterior del núcleo. La placa basal del cuello es continua en sentido posterior, y tiene nueve fibras gruesas que se proyectan hacia atrás a través de la mayor parte de la cola.

La región de la cola comprendida entre el cuello y el anillo citoplasmático es el segmento medio. El centro de este segmento medio, junto con toda la longitud de la cola, comprende el axonema. El axonema, como tal, se compone de nueve pares de microtúbulos dispuestos radialmente alrededor de dos filamentos centrales. En el segmento medio, esta disposición 9 + 2 de los microtúbulos está rodeada por nueve fibras gruesas o densas que al parecer están relacionadas con los nueve dobletes del axonema. El axonema y las fibras densas asociadas del segmento medio están cubiertos de manera periférica por numerosas mitocondrias. La vaina mitocondrial, dispuesta en un patrón helicoidal alrededor de las fibras longitudinales de

la cola, es la fuente de energía necesaria para la motilidad espermática.

El segmento principal. Que continua en sentido posterior desde el anillo citoplasmático y se extiende casi hasta la punta de la cola, está formado por el axonema en el centro y sus fibras gruesas asociadas. La vaina fibrosa de estabilidad a los elementos contráctiles de la cola.

El segmento caudal o terminal, posterior a la terminación de la vaina fibrosa, contiene solo el axonema central cubierto por la membrana plasmática. El axonema es el que da la motilidad al espermatozoide. Los pares externos de la motilidad al espermatozoide. Los pares externos de microtúbulos del patrón 9 + 2 generan las ondas de flexión de la cola por un movimiento deslizante entre pares adyacentes.

La gota protoplásmica o citoplasma, está compuesta de citoplasma residual. Suele desprenderse de los espermatozoides tras el eyaculado, aunque puede retenerse en la región del cuello (gota proximal) o cerca del anillo citoplasmático (gota distal). (Garner y Hafez; 2000)

Los espermatozoides testiculares son transportados desde el testículo a través de un conducto contorneado llamado epidídimo.

En su paso por éste, los espermatozoides experimentan un proceso de maduración, adquiriendo capacidad potencial de fecundar óvulos. Estos cambios se asocian a aspectos de la integridad funcional de los espermatozoides: a) desarrollo del potencial para la motilidad progresiva sostenida, b) modificación de los patrones metabólicos y el estado

estructural de organelos específicos de la cola, c) cambios en la cromatina nuclear, d) cambios en la naturaleza de la superficie de la membrana plasmática, e) movimiento y pérdida de la gota citoplasmática, f) modificación de la forma del acrosoma (en algunas especies).

Para que no exista un metabolismo innecesario por parte de los espermatozoides madurados, las células que recubren el epidídimo secretan “factores de inmovilidad” prolongando así la supervivencia de los espermatozoides.

Estos son almacenados mayormente en la porción caudal del epidídimo siendo éstos ya maduros los que pueden ser eyaculados. Si bien este ambiente les es favorable para su supervivencia, no serán preservados por tiempo indefinido. Los espermatozoides no eyaculados se eliminan de forma gradual por excreción en la orina (Graves, 1978; Garner y Hafez, 2000).

2.1.4. Evaluación De La Calidad Del Semen

La evaluación laboratorial de semen congelado bovino representa un componente fundamental de los programas de reproducción animal, garantizando la calidad de las muestras destinadas a trabajos de inseminación artificial, múltiples ovulaciones transferencia de embriones (MOTE) y producción de embriones in vitro (PIV) (Crespilho et al., 2009).

La evaluación de semen es un componente importante, complementaria a la exploración clínica, para estimar la capacidad potencial de un toro como reproductor.

La valoración de la calidad seminal, es una de las herramientas de análisis más empleadas en la clasificación de los machos para el servicio por monta directa o programas de inseminación artificial, gracias al cual se forma una opinión del potencial de fertilidad del toro de ese momento, ya que la calidad seminal puede cambiar bastante y rápidamente, dependiendo de si un toro está pasando o

recuperándose de un proceso que afecte la espermatogénesis (Barth, 2007).

La fertilidad potencial de una muestra de semen probablemente va a depender de que contenga un número suficiente de espermatozoides viables, morfológicamente normales y funcionalmente competentes, capaces de alcanzar el oviducto y de establecer un reservorio oviductal, de llevar a cabo la fecundación del ovocito, y de contribuir al desarrollo embrionario. La evaluación del semen mediante técnicas in vitro, si ha de tener algún valor predictivo de su capacidad fecundante in vivo, debería incluir el estudio de tantas características espermáticas como sea posible, especialmente cuando se trata de dosis de semen congelado o cuando se están evaluando nuevos métodos de crio preservación.

La evaluación post descongelación consiste en descongelar la pajilla de 0,5 ml o 0,25 ml en baño de agua a 37°C. A los 45 segundos se extrae la pajilla y se seca con toalla de papel, debido a que el agua puede ser nociva para los espermatozoides. El contenido de la pajilla se agita hacia el extremo con tapón de algodón, en tanto que el extremo opuesto de la pajilla se corta, para liberar el semen en un tubo de ensayo pequeño, limpio y desechable, cortando la abertura pequeña que se encuentra justamente por debajo del tapón de algodón. (Hafez, 2000).

2.1.4.1. *Parámetros Microscópicos*

a) Motilidad Progresiva

Para que un espermatozoide sea capaz de fecundar a un ovocito ha de reunir una serie de requisitos, entre ellos, tener motilidad progresiva. Dicho parámetro ha sido y sigue siendo el más utilizado para valorar la calidad de un eyaculado o de una dosis seminal. El movimiento activo de los espermatozoides es imprescindible para la

colonización del oviducto durante la fase de transporte sostenido en el tracto genital de la hembra, y para que tenga lugar la fecundación. Además, la motilidad es una manifestación de viabilidad espermática y de integridad celular. Un eyaculado con un porcentaje bajo de espermatozoides móviles, o ausencia de motilidad, automáticamente será descartado para su conservación (Den Daas, 1992; Holt y Van Look, 2004).

Las mitocondrias representan la central energética del espermatozoide, y suministran energía, en forma de ATP, a los brazos de dineína de cada doblete de microtúbulos. Los brazos de dineína, que realmente son moléculas ATP-asa, degradan el ATP liberando la energía que permite el movimiento del flagelo. Cada doblete presenta dos brazos de dineína dirigidos hacia el doblete adyacente, que al ser estimulados por el ATP actúan como “ganchos” y se desplazan a lo largo del doblete adyacente. El resultado es el deslizamiento de un doblete sobre otro. Los radios de unión entre cada doblete y el par central se resisten al deslizamiento, originando la curvatura del flagelo. La correcta secuencia de deslizamiento de los dobletes, provoca que se formen y se propaguen las ondas, y así la cola espermática experimenta su movimiento rotacional y elíptico característico.

El movimiento rotacional que experimenta el flagelo se transmite a la cabeza del espermatozoide a través del cuello. Este movimiento rotacional de la cabeza es lo que, en última instancia, otorga progresividad al movimiento espermático (Mortimer, 2000). La motilidad espermática está condicionada por la gestión del metabolismo energético de la célula (Rigau et al, 2001). La motilidad espermática normalmente se valora de forma subjetiva, mediante la observación visual de una

muestra de semen con un microscopio de contraste de fases y platina a 37°C. En el eyaculado de los rumiantes, dada su elevada concentración espermática, se puede valorar la motilidad masal, definida como el movimiento en remolinos del total de espermatozoides de la muestra. Normalmente la motilidad masal se valora de forma subjetiva en una escala de 0 a 5, con una puntuación de 5 cuando se observan oleadas o remolinos con movimiento rápido y vigoroso, y de 0 cuando no se observa movimiento en ondas. Tras la dilución del eyaculado fresco, o tras la descongelación de dosis de semen congelado, se estima el porcentaje de espermatozoides individuales que están en movimiento y el tipo de movimiento que realizan (progresivos o no progresivos). Las dosis descongeladas con una motilidad progresiva inferior al 40% normalmente se descartan para su uso en IA (NAAB, 1986).

La valoración visual de la motilidad espermática es el método más simple, rápido y barato. Sin embargo, es altamente subjetivo, puesto que los resultados obtenidos dependen en gran parte de la habilidad y experiencia del técnico que evalúa la muestra (Rodríguez, 2000; Phillips et al., 2004), y además, si se trabaja con muestras muy concentradas se tiende a sobrestimar el porcentaje de espermatozoides móviles. Por tanto, no es un método que, de forma fiable y repetible, permita predecir la capacidad fecundante de una muestra de semen (Saacke y White, 1972; Linford et al., 1976). La valoración de la motilidad como único parámetro de calidad seminal no es suficiente para predecir la capacidad fecundante del semen (Liu y Foote, 1998), es sólo uno de los requisitos que ha de cumplirse, de ahí que la correlación existente entre la motilidad de una

muestra de semen y su fertilidad real, aunque significativa, sea baja (Kjaested et al., 1993).

Las normas ISO 9002 establecen que la dosis inseminante debe tener un mínimo de 8 millones de espermatozoides con motilidad progresiva. Este número puede reducirse a 6 millones si el semen posee más de 30% de espermatozoides con motilidad progresiva y si la tasa de anormalidades es inferior al 25% o si, el porcentaje de no retomo 60/90 de 300 primo inseminaciones resulta equivalente al obtenido con 8 millones.

A los efectos de una correcta interpretación de los análisis de laboratorio, se debe tener presente que la evaluación del porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva es subjetiva y que los toros difieren en el porcentaje en el que expresan su máxima fertilidad. Al mismo tiempo, hay que recordar que por más que se establezcan valores mínimos de referencia, no es conveniente ceñir eventos biológicos a la más pura matemática.

b) Concentración Espermática

La concentración de espermatozoides, también llamada densidad, es el número de espermatozoides existente por unidad de volumen. Generalmente se expresa en millones por mm³ o en μ l; también se emplea la expresión en millones por ml.

La concentración espermática se puede medir usando cámara de Neubauer, turbimetría o espectrofotómetro. En el caso del hematocitómetro la cantidad de espermatozoides por cámara se cuenta manualmente, lo cual, pese a tomar mucho tiempo, es muy exacto (Elliot, 1978; Ax et al., 2000a).

Para evaluar la concentración, se deben matar previamente los espermatozoides y así poder contarlos. Esto se logra preparando previamente una solución salina formolada al 2%. Se colocan 10 micro litros de semen puro en 2ml. de solución salina formolada (1/200) y se homogeniza invirtiendo. Luego se toman aproximadamente 14 micro litros y se carga la Cámara de Neubauer (portaobjetos de microscopio que cuenta con cámaras numeradas de precisión) por capilaridad, (14ul por cada retículo, llenar los 2 retículos).

Una vez cargada, se debe dejar reposar unos minutos para permitir que todos los espermatozoides decanten y se ubiquen en un mismo plano para poder contarlos.

Luego se procede a ubicar el retículo de glóbulos rojos a 100 aumentos, y una vez localizado, se pasa a 400 aumentos para realizar el conteo. Se cuentan todos los espermatozoides que se encuentren en las 4 cuadrículas de las puntas y la central (5 en total). Solo se cuentan las cabezas de espermatozoides incluidas en los cuadrados, así como sobre las líneas limitantes a la izquierda y debajo de cada cuadrado. Se cuentan los retículos de ambos lados de la cámara y se saca el promedio. Al número de espermatozoides contados, se multiplican por 2.5 y por 10^6 y así se obtiene la cantidad de espermatozoides por milímetro cúbico de semen (Tribulo et al. 2002).

c) Vitalidad Espermática

Existe un conjunto de técnicas que permiten una coloración selectiva de espermatozoides vivos y muertos, como consecuencia de los cambios bioquímicos que se producen tras la muerte (acción cromo citológica). Los primeros ensayos al efecto fueron

llevados a cabo en el año 1942 por Lasley y colaboradores (Pérez y Pérez, 1985) quienes emplearon como colorante una mezcla de eosina y una solución de opal-blue en un medio tamponado a base de fosfatos y perfectamente isotónico, pudiendo demostrar que los espermatozoides muertos aparecían coloreados, mientras que los vivos no se teñían (Pérez y Pérez, 1985).

En esta técnica la eosina constituye el colorante vital, mientras que el opalblue es el colorante de fondo; en definitiva, los espermatozoides muertos aparecen teñidos en rosado por la eosina y los vivos no se colorean. Otros sustitutos eficaces de la eosina como colorante vital son el rojo de bengala, la eritrosina, el verde cresol o el azul de bromofenol con el que se ha tenido más claridad en la interpretación; mientras que, en todo caso, como colorantes de fondo se prefiere el azul de anilina o la nigrosina. Con el colorante eosina-nigrosina los espermatozoides muertos aparecen teñido en rojo o en rosa, mientras que los vivos quedan sin teñir (Pérez y Pérez, 1985).

El estudio de la Vitalidad espermática normalmente se basa en el análisis de la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides, mediante el uso de dos fluorocromos combinados: uno de ellos sólo es capaz de atravesar las membranas plasmáticas dañadas o degeneradas, y por tanto permite identificar a las células muertas o en proceso de degeneración, mientras que el otro es capaz de atravesar membranas celulares intactas y por tanto permite identificar la población de células viables (Garner y Hafez., 1997).

La combinación de colorantes para la tinción vital tales como azul de tripano-giemsa, eosina-nigrosina o eosina-azul de anilina (el más clásico) y algunos otros son

ampliamente utilizados para diferenciar vivos de muertos (Januskauskas y Zilinskas, 2002).

Usando eosina y azul de anilina provee un fondo oscuro (azul de anilina) tiñéndose las células de eosina. Esta última penetra la membrana de las células dañadas tiñendo las lesiones y los espermatozoides no viables de rosa (células muertas), en cambio las células viables repelen la eosina y aparecen blancas (células vivas).

Simplemente se aplica 10ul de semen en el portaobjetos y se mezcla por 20 segundos con 30ul de eosina, posteriormente se realiza el frotis y se lo observa a 400X. Se cuentan por lo menos 100 espermatozoides tomando la precaución de observar varios campos diferentes. Un valor mínimo aceptable es de 40% de espermatozoides vivos. (Srivastava, 2017)

d) Integridad de la Membrana Plasmática

La membrana plasmática del espermatozoide es el principal sitio de lesión que ocurren durante la congelación y descongelación de semen (Hammerstedt et al., 1990; Krogenaes et al., 1994).

La membrana intacta y un funcionamiento activo es esencial para que el espermatozoide pueda mantener el metabolismo, someterse a la capacitación y reacción acrosómica y además, para unir y penetrar en el ovocito a través de la zona pelúcida (Jeyendran et al., 1984; Burks y Sailing, 1992).

Una prueba sencilla y rápida es el test de Endosmosis o también llamado HOST (Hypoosmotic Swelling Test), se basa en el concepto fisiológico de la semipermeabilidad de las membranas plasmáticas intactas y bioquímicamente activas de los espermatozoides vivos,

las cuales absorben agua cuando son expuestas a una solución hipo osmótica (Vera, 2003; Rota et al., 2000). Esta puede ser una prueba muy fácil de realizar y evaluar a campo con un solo microscopio óptico disponible. Se proporciona información acerca de la funcionalidad espermática para el análisis de rutina de semen (Pérez, 1998).

En esta prueba, la membrana de los espermatozoides intactos teóricamente permite la entrada excesiva de agua en el citoplasma, lo que resulta en una variedad de cambios morfológicos del flagelo asociado con la hinchazón citoplasmática. Por el contrario, los espermatozoides que no puedan osmoregular bien, no experimentarán cambios en la forma del flagelo.

Para que esta respuesta se produzca, la membrana plasmática del espermatozoide debe estar íntegra y con los mecanismos de intercambio de fluidos funcionando correctamente. En los espermatozoides funcionalmente alterados no se produce la captación selectiva de agua de forma adecuada, alcanzándose así un equilibrio pasivo entre los medios intra y extracelular que no provoca cambios morfológicos apreciables (Madrid, 2004; Vera, 2003).

Metodología: El semen es incubado 2 horas a 37°C en una solución hipo osmótico de fructosa y citrato de sodio. Se realizan observaciones seriadas (horas 0, 1 y 2) entre porta y cubreobjetos, determinándose el % de espermatozoides vivos. Estos reaccionan al shock osmótico enrollando la cola. Debe haber como mínimo un 40% de espermatozoides reaccionantes.

De acuerdo a Correa y Zavos (1994) tras la evaluación de espermatozoides bovinos reactivos al HOST se produce su máxima hinchazón en el nivel de 100 mosm/L.

Generalmente aparece comprometida la integridad de membrana en aquellos casos donde se ha producido algún inconveniente en la conservación del semen como por ejemplo un bajo nivel de nitrógeno líquido en el termo por algún tiempo (Catena y Cabodevila, 1999).

e) **Morfología Espermática**

El estudio de la morfología espermática es muy importante a los fines de establecer porcentajes de espermatozoides normales y poder clasificar las anormalidades.

Nuestro interés sobre la morfología espermática radica en que ésta tiene gran impacto sobre la fertilidad del ganado. Lagerlof, en 1934, fue uno de los primeros en mostrar que el incremento de la prevalencia de anormalidades espermáticas está asociado con un decrecimiento en la fertilidad.

Para una interacción normal del espermatozoide con el microambiente del tracto genital femenino y con las envolturas del ovocito, además de tener motilidad progresiva, los espermatozoides han de ser morfológicamente normales. Cualquier anomalía que afecte a algún atributo del espermatozoide puede dificultar su migración en el tracto genital de la hembra, impidiendo la unión con el ovocito (Rodríguez, 2000). A medida que aumenta la proporción de espermatozoides anormales en el eyaculado, desciende la capacidad fecundante del mismo (Howard y Pace, 1998). Por tanto, se ha de tener muy presente que las muestras de semen con un porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales inferior al 70% (Barth y Oko, 1989) han de descartarse para la congelación.

Se han establecido distintas clasificaciones de las anomalías espermáticas atendiendo a distintos criterios: a) dependiendo de si se originan en el testículo (anomalías mayores) o a lo largo del tránsito epididimal o tras la eyaculación (anomalías menores) (Bloom, 1977; Barth y Oko, 1989); b) de si están asociadas a infertilidad o no (primarias o secundarias, respectivamente) (Milovanov, 1938; Bloom, 1977); o c) de la región espermática implicada (anomalías de la cabeza, de la pieza intermedia o de la pieza principal). Cualquier anomalía, primaria o secundaria, si afecta a un número elevado de espermatozoides, puede llegar a comprometer la fertilidad del semen. Por ejemplo, si una dosis seminal tiene una motilidad espermática entorno al 50%, y contiene un 30% de espermatozoides con gotas citoplasmáticas proximales, la alta incidencia de esta morfo anomalía repercutirá negativamente en la fertilidad de esa muestra pese a la buena motilidad del eyaculado. Este defecto es muy común en sementales jóvenes y normalmente su incidencia va disminuyendo a medida que el toro crece y maduran sus órganos sexuales (Amann et al., 2000). Otra anomalía relativamente frecuente son los espermatozoides con la cabeza de forma piriforme. Los espermatozoides con este defecto se observó que presentaban menor capacidad de unión y de penetración de la zona pelúcida, y si conseguían fecundar a algún ovocito, los cigotos resultantes tenían menor capacidad para iniciar su desarrollo y degeneraban a las pocas horas (Thundathil et al., 1999). El sistema de clasificación que ha sido aceptado ampliamente en bovinos es el de las atipias o defectos espermáticos primarios y secundarios; sin embargo, este sistema ha tenido diferentes significados e interpretaciones por los evaluadores. Por definición, un

defecto primario es el que se origina dentro del testículo durante la espermatogénesis; un defecto secundario es un defecto que se origina dentro del epidídimo (Barth, 2007). Generalmente se le da mayor importancia a los defectos primarios. Es necesario señalar que la definición para defecto primario y secundario denota el origen y no la severidad del defecto.

Siendo conocido que condiciones las adversas del medio que causan ambos tipos de defectos pueden afectar las funciones del epidídimo y la espermatogénesis simultáneamente, tanto los defectos primarios como los secundarios son igualmente importantes como indicadores de un disturbio de la función testicular; por eso en la actualidad se da igual importancia tanto a unos u otros defectos. Se ha demostrado la correlación entre defectos morfológicos del espermatozoide e infertilidad y se ha establecido 30% como un porcentaje aceptable o máximo permitido de atipias, es decir, se acepta un 70% de espermatozoides normales. Se ha establecido un límite de defectos de la cabeza de un 15 a 20%, mientras que defectos del acrosoma y defectos de la cola se toleran en un 25% (Barth, 2007).

Se pueden usar técnicas de frotis secos o húmedos de un solo paso como la tinción con Rosa Bengala donde todos los espermatozoides se ven rosas sobre un fondo limpio, mientras que con Tinta China el fondo es oscuro y los espermatozoides permanecen sin teñirse y aparecen blancos.

Para morfología un conteo de 100 células es satisfactorio cuando no existen problemas mayores. Cuando un gran número de defectos espermáticos está presente, hasta 500 células deben ser contadas para obtener un espermiograma preciso.

En la actualidad se utilizan las normas ISO 9002 de calidad para Centros de inseminación artificial a nivel mundial establecida por el Departamento de Medicina del Rodeo y la Teriogenología de la Universidad de Saskatchewan, Canadá, creadas por Barth (2007), las que establecen identificar la ubicación de la malformación y tener en cuenta los siguientes parámetros:

Se estima como valor mínimo aceptable 75% de acrosomas normales y también 75% de espermatozoides normales (sin malformaciones). Pero este máximo de 25% de malformaciones espermáticas permitido, debe contemplar un límite máximo de defectos del núcleo (cabeza) del espermatozoide que se encuentre en el rango de 15-20%, mientras que defectos del acrosoma y la cola se pueden tolerar hasta 25% (Saacke, 1970; Catena y Cabodevila, 1999; Tribulo et al., 2002).

Malformaciones espermáticas:

Primarias y secundarias:

Por definición se consideran anomalías “primarias”, aquellas que ocurren y/o tienen su origen durante la espermiogénesis dentro del testículo, mientras que las anomalías “secundarias”, se originan dentro del epidídimo o en el laboratorio.

Sin embargo los defectos tanto primarios o secundarios son igualmente importantes como indicadores de un mal funcionamiento testicular. Por ende, esta clasificación evalúa origen, no severidad.

Elhordoy y Haedo en 1983 consideran que la clasificación de las anomalías en primarias y secundarias además de obsoleta presenta algunas

dificultades, tales como la gota proximal que se clasifica como secundario porque se creía originada en un disturbio de la función del epidídimo, aunque Rao en 1971 reportó que es originado por defectos en la espermatogénesis en los testículos, por lo cual debería ser primario. Lo mismo pasa con el defecto de cabezas sueltas, las que pueden darse por una alteración de la base que conecta la cabeza del espermatozoide con la porción media del capitulum (siendo por lo tanto un defecto primario), o se puede dar por una función anormal del epidídimo (siendo un defecto secundario) (Elhordoy, 2010).

Blom en 1977 desarrolló un método nuevo de clasificación que consistía en separar los defectos en “mayores” a aquellos que se encuentran directamente asociados a infertilidad o malformaciones, y en “menores” a aquellos que no lo están (Salisbury, 1978). En 1994 Saacke ideó un sistema de clasificación más complejo, llamándole “defectos compensables” a aquellos espermatozoides anormales que no son transportados al oviducto, y a aquellos que son transportados pero no son capaces de penetrar la zona pelúcida, no evitando que otro fertilice, y entonces que pueden ser compensados por un incremento de la dosis espermática. Un ejemplo de ello son los espermatozoides con problemas de locomoción. Mientras que a aquellos otros espermatozoides perfectamente capacitados para llegar al ovocito y realizar el bloqueo de la polispermia, pero que no pueden continuar el proceso de fertilización se los llamo “defecto no compensable”, ya que por más que aumente la concentración, el % de espermatozoides con defecto es el mismo, no pudiendo compensar. Ejemplo de esto son los espermatozoides con vacuolas nucleares

(defecto de diadema). La presencia de este tipo de defectos suele ser la causa de baja fertilidad dado que, luego de la fertilización, se desarrollan embriones de mala calidad que mueren durante los primeros días de gestación.

A continuación se destacan algunas características de los principales defectos encontrados:

Cabezas piriformes y angostas:

Zona posacrosomal más angosta. Los espermatozoides con formas piriformes obvias (de pera) son anormales. En la mayoría de los casos se encuentran estas anomalías junto con otras e indican un defecto de espermatogénesis.

Microcefalia y macrocefalia:

Existe una gran variación de formas y tamaños. Aunque ésta es bastante común, generalmente se encuentran en proporción muy pequeña. La mayoría de estas células mueren o son fagocitadas por las células de Sertoli antes del llegar al estadio de espermátide. Esta es la razón por la cual no se encuentran en altos porcentajes en el extendido de semen.

Vacuolas nucleares:

Las vacuolas nucleares se encuentran primariamente como una línea en la región ecuatorial de la cabeza del espermatozoide (defecto “diadema”).

Aparentemente los espermatozoides con este defecto pueden ser transportados normalmente hacia el oviducto y pueden ser capaces de penetrar la zona pelúcida y la membrana vitelina, y producir el bloqueo de la polidesmina. Sin embargo este defecto es incompatible con el desarrollo embrionario.

Formas teratoides:

Variaciones de las formas teratoides que aparecen cuando existe una espermatogénesis anormal. Estas formas anormales producidas por disturbios en la espermatogénesis pueden ser confundidas con células inflamatorias. Estos espermatozoides defectuosos tienen generalmente una condensación de ADN anormal, un núcleo pequeño y deforme, y en la mayoría de los casos la pieza principal enrollada alrededor del núcleo. Las formas teratoides son generalmente encontradas con una incidencia de hasta 2% en semen normal. En muestras de toros con disturbios en la espermatogénesis su incidencia está entre el 5 y 10%.

Se pueden encontrar espermatozoides decapitados en pequeño número en semen normal. Este defecto puede ser producido por envejecimiento o por un defecto de implantación de la cola en la placa basal. Cuando se encuentra en mayor cantidad, están asociados con defectos en la termorregulación del testículo y en estos casos es producido, aparentemente, por un defecto en la espermiogénesis. En los casos de toros muy gordos el defecto se encuentra asociado con otros defectos espermáticos.

Las cabezas sueltas y muchos espermatozoides muertos se encuentran en toros con una acumulación del semen en la cola del epidídimo. Normalmente los espermatozoides envejecidos son eliminados de la cola del epidídimo a través de un movimiento peristáltico hacia la uretra. Toros con defecto en el mecanismo de transporte tienen una gran acumulación de espermatozoides muertos y viejos en la cola del epidídimo.

Aplasia segmentaria de la pieza intermedia y defectos de la vaina mitocondrial:

Estos pequeños defectos en las mitocondrias no afectan notablemente la motilidad espermática pero representan un lugar frágil que pueden terminar en fracturas de la pieza media. Raramente se encuentran en alta incidencia.

Colas abaxiales, accesorias y múltiples:

Algunas anomalías de cola pueden tener su origen en los testículos de los toros con o sin fertilidad disminuida, pero una mayor prevalencia de anomalías de cola, es generalmente el resultado de disfunción epididimal (Morrow, 1986).

Estas anomalías están usualmente asociadas entre sí, sin embargo las colas abaxiales son las más comunes, no produciendo reducción de la fertilidad.

El defecto de cola accesorio es poco común y aparentemente hereditario. Las colas accesorias están generalmente presentes junto con colas abaxiales y colas dobles.

No se sabe si espermatozoides con colas accesorias tienen reducida su capacidad de fertilizar el óvulo.

La cola es un cilio especializado que se desarrolla del centriolo proximal y distal. El caso de colas múltiples se produce cuando se forman más de un cilio a partir de una replicación de los centriolos.

Defecto "Dag":

Es la separación de la cubierta y de las fibras del axonema en la región de la pieza media. La pérdida de la cubierta que recubre estas fibras resulta en la fractura, explosión, corte y torsión de la pieza media, típicas del defecto Dag. Éste puede ser debido a disturbios de la

espermatogénesis. No obstante, es un defecto hereditario por un gen recesivo de la raza Jersey y posiblemente de la Hereford.

Espermatozoides de cola corta:

Este defecto no es común, es aparentemente heredable y asociado con un gen recesivo.

Pieza principal doblada:

Se ve normalmente que la pieza doblada hace un rulo inmediatamente distal al ángulo. En la mayoría de los casos se ve una gota citoplasmática distal en el centro del rulo. Este defecto aparentemente se origina en el epidídimo y no hay que confundirlo con el defecto producido por el shock hipotónico o por estrés por frío de los espermatozoides (no del toro).

Piezas intermedias arqueadas:

Tienen forma de arcoíris o de U. Es producido por la tinción pero puede haber algunos casos raros de toros. Cuando evaluamos la motilidad individual vemos una gran cantidad de espermatozoides con movimientos en círculo.

Gota citoplasmática proximal:

Casi todos los espermatozoides que se encuentran en la cabeza del epidídimo tienen una gota citoplasmática proximal. Luego, a medida que van descendiendo hacia la cola del epidídimo vemos que el 90% de los espermatozoides tienen esta gota citoplasmática en la parte distal. Este defecto se puede ver en animales jóvenes que no han completado la pubertad. En toros adultos es causa de disturbio epididimal o testicular. Se puede observar un aumento 7 a 10 días después del estrés en toros adultos afectándose los espermatozoides

que se encontraban transitando el epidídimo. Algunas anomalías primarias como cabezas piriformes están aparentemente predispuestas a retener la gota citoplasmática proximal. Se considera un defecto mayor, por afectar directamente la fertilidad.

Gota citoplasmática distal:

Entre el 65 y 95% de los espermatozoides almacenados en la cola del epidídimo tienen la gota citoplasmática en esta posición. Esta gota es liberada cuando los espermatozoides se mezclan con los fluidos seminales en la eyaculación, a causa de un factor hemolítico en las vesículas seminales. Aparentemente este defecto no afecta la fertilidad.

Células medusa:

Éstas son células epiteliales ciliadas provenientes del conducto eferente y se pueden encontrar en bajas cantidades en muestras de semen de toros con defectos graves de la función testicular. Generalmente la muestra de semen es muy diluida y puede ser necesario centrifugarla para concentrar los espermatozoides y poder verlos. Denotan daño testicular grave.

Glóbulos blancos:

Su presencia está asociada con procesos inflamatorios en la ámpula, glándulas accesorias o epidídimo. También puede deberse a infecciones de pene y de prepucio. Generalmente los casos que aparecen son en toros jóvenes. También se los puede identificar con contraste diferencial pero es preferible utilizar tinciones como Hematoxilina y eosina, Wright-Giemsa u otras específicas para estas células (Rao, 1971).

Barth en 2005 propone quitar importancia a los sistemas de clasificación, el aconseja enumerar los defectos e interpretar las anomalías a la luz del conocimiento actual y como afecta la fertilidad.

f) **Integridad Acrosómica**

El acrosoma es un lisosoma esencial para la función de la célula espermática, que cubre las dos terceras partes de la porción anterior de la cabeza espermática. La reacción acrosómica tiene lugar en el sitio de la fertilización y es activada por condiciones locales o por unión específica de enzimas contenidas en el lisosoma. O sea que las enzimas contenidas en el acrosoma permiten que el espermatozoide capacitado penetre el óvulo. Por lo tanto un alto porcentaje de células que tienen acrosoma intacto y por ende ser capaces de realizar la reacción acrosómica, es considerado como una característica seminal importante (Sullivan, 1978; Den Daas, 1992; Ax et al., 2000a).

El acrosoma juega un papel fundamental en la fecundación por contener las enzimas necesarias para la penetración del cúmulo oophorus y de la zona pelúcida. La reacción acrosomal previa a la fecundación produce puntos de fusión de la membrana apical celular con la membrana externa del acrosoma y forma vesículas para que el contenido enzimático pueda ser liberado ejerciendo su actividad sobre el ovocito. Las alteraciones del acrosoma o del proceso de capacitación inhiben la fecundación de la célula espermática, mientras que el proceso de congelación de semen produce daños en la membrana del espermatozoide y del acrosoma a pesar de la presencia de un agente crio protector en el diluyente de congelación.

La integridad del acrosoma se puede evaluar con diferentes métodos microscópicos y utilizando diferentes técnicas de tinción como Giemsa, Naphtol amarillo y eritrocina B. Sin embargo, el método más práctico y rutinario es la fijación en glutaraldehído y observación en un microscopio de contraste de fase. El aumento de espermatozoides con daño en el acrosoma pre-congelación es una evidencia de baja calidad seminal y puede incluso recomendarse el descarte de esa muestra para congelación. El aumento excesivo de acrosomas dañados postcongelación pudiera indicar algún problema en el proceso de congelación o estar relacionada con una composición lipídica de la membrana anormal que incide en una mayor susceptibilidad del espermatozoide al enfriamiento.

Se pueden usar técnicas de frotis secos o húmedos de un solo paso como la tinción con Rosa Bengala donde todos los espermatozoides se ven rosas sobre un fondo limpio, mientras que con Tinta China el fondo es oscuro y los espermatozoides permanecen sin teñirse y aparecen blancos.

Otra técnica, recomendada por Saacke (1970) donde también podemos observar los acrosomas, consiste en colocar 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 lo retira y se enjuaga y se lo 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, si éste se encuentra ausente, la cabeza del espermatozoide se observa de un color homogéneo o con el tercio superior más claro.

Un conteo de 100 células es satisfactorio cuando no existen problemas mayores. Cuando un gran número de defectos espermáticos está presente, hasta 500 células deben ser contadas para obtener un espermograma preciso.

Acrosomía (valores aceptables):

0hr valor mín. 60% acrosomas intactos

2hs valor mín. 40% acrosomas intactos

Un grupo de anomalías de especial importancia son las que afectan al acrosoma, y entre las más frecuentes se han descrito el acrosoma nudoso y la membrana acrosomal aplanada. Los espermatozoides con acrosoma nudoso se encontraron en el eyaculado de sementales frisonos cuya espermatogénesis estaba alterada y se cree que es un defecto de origen congénito y hereditario (Barth y Oko, 1989). Los eyaculados que contienen espermatozoides con el acrosoma nudoso suelen presentar también otras anomalías espermáticas, lo que compromete aún más la fertilidad del semental (Gran y Dott, 1976).

Si el porcentaje de espermatozoides con acrosoma nudoso es elevado, se podría decir que el semental es virtualmente estéril, puesto que los espermatozoides con esta alteración se comprobó que no eran capaces de atravesar la zona pelúcida (Thundathil et al., 2000; 2002). Además, se cree que es un defecto no compensable, es decir, los espermatozoides normales presentes en el mismo eyaculado también tenían menor capacidad fecundante.

Otra anomalía acrosómica es la membrana acrosomal aplanada, que se describió por primera vez en eyaculados de toros frisones. Se observó que los espermatozoides procedentes de eyaculados bovinos con alta incidencia de esta anomalía podían unirse normalmente a la zona pelúcida del ovocito, y su matriz acrosomal permanecía funcional (Thundathil et al., 2001; Meyer y Barth, 2001).

Parámetros de aceptabilidad para evaluación de semen post descongelado (Derivaux, 1976; Morrow, 1986; Bonadonna, 1989; Barth y Oko, 1989; Ax et al., 2000; Elhordoy y Farías, 2003).

PRUEBAS	VALORES DE REFERENCIA
Motilidad	0hs > 30% de spz móviles (Según ISO 9002 > o = 25%)
	2hs > 20% de spz móviles (Según ISO 9002 > o = 15%)
Acrosomía	0hr > 60% acrosomas intactos
	2hs > 40% acrosomas intactos
HOST	40% de spz reaccionantes
Morfología	
Defectos cabeza	< 5-15%
Defectos cola	< 20%
Anormalidades Totales	< 25%
Concentración	> 10 millones (muy variable)

2.2. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACION

Cabrera, P., et al (2012) en un trabajo de investigación sobre la “VIABILIDAD ESPERMÁTICA E INTEGRIDAD DEL ACROSOMA EN SEMEN CONGELADO DE TOROS NACIONALES” Reporto que: En semen fresco sin diluir se encontró un volumen de 4.33 ml, concentración espermática de $922.5 \times 10^6/\text{ml}$, y 78.5% de espermatozoides vivos. La motilidad individual progresiva en semen diluido fue de 82.7 a 86.0% con diferencia significativa entre toros ($p < 0.05$). La integridad de acrosoma en semen refrigerado varió entre 59.3 a 69.2% con diferencia estadística entre toros. El porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto disminuyó de 65.2% en semen refrigerado a 48.6% en semen congelado/descongelado, sin diferencias estadísticas entre toros. No se encontró una correlación significativa entre motilidad con integridad de membrana espermática o integridad de acrosoma.

Quispe, A. (2015) en un trabajo de investigación sobre la “EVALUACION DE LA SOBREVIVENCIA Y FERTILIDAD IN VIVO DE ESPERMATOZOIDEOS DEL EPIDIDIMO DE TOROS CRIOLLOS POST MORTEM” Reporto que: Los resultados obtenidos en los periodos de refrigeración a 5°C en 0, 12 y 24 h antes de la congelación y después de la descongelación fueron en motilidad total: 80.06 ± 11.68 , 74.43 ± 10.78 , $70.25 \pm 14.47\%$ ($p > 0.05$) y 49.26 ± 15.68 , 26.41 ± 6.82 , $24.92 \pm 4.89\%$ ($p \leq 0.05$); en motilidad progresiva: 44.76 ± 10.31 , 37.41 ± 12.20 , $30.97 \pm 9.75\%$ ($p > 0.05$) y 19.57 ± 5.18 , 12.55 ± 4.25 , $11.19 \pm 2.72\%$ ($p \leq 0.05$); en test hiposmótico: 69.72 ± 7.20 , 67.87 ± 4.46 , $60.31 \pm 7.91\%$ ($p > 0.05$) y 53.21 ± 5.53 , 31.99 ± 6.87 , $27.47 \pm 4.86\%$ ($p \leq 0.05$); en integridad de acrosoma: 62.18 ± 7.66 , 64.83 ± 3.69 , $59.51 \pm 7.13\%$ ($p > 0.05$) y de 48.33 ± 4.45 , 28.90 ± 7.25 , $23.87 \pm 6.95\%$ ($p \leq 0.05$), respectivamente.

Bustios, C. (2012) en un trabajo de investigación sobre el “EFECTO DEL DILUTOR, RAZA Y TIEMPO DE CONSERVACIÓN SOBRE LA

CALIDAD SEMINAL Y FUNCIONAL DEL SEMEN PORCINO CONSERVADO. AREQUIPA 2012” Reporto que: Se observó que el 100% de las muestras presentaron el color blanco característico de semen. La concentración promedio (espermatozoides por ml) fue 25.80a para Landrace y 23.20a para la raza Yorkshire. Se observó que la motilidad promedio (%) de semen según el dilutor y tiempo de conservación fue: para el dilutor A en la hora 0 de 77.30a, en la hora 24 de 73.90a, en la hora 48 de 70.70a, en la hora 72 de 67.50a, y para el dilutor B en la hora 0 de 77.30a, en la hora 24 de 72.80a, en la hora 48 de 68.90a, en la hora 72 de 65.00a. Integridad de membrana promedio (%) según el dilutor y tiempo de conservación fue: para el dilutor A en la hora 0 de 92.4a, en la hora 24 de 85.9a, en la hora 48 de 71.6a, en la hora 72 de 61.1a, y para el dilutor B en la hora 0 de 92.4a, en la hora 24 de 86.05a, en la hora 48 de 71.85a, en la hora 72 de 61.95a. Se observó que la motilidad promedio (%) en semen según raza y tiempo de conservación fue: Para la raza Landrace en la hora 0 de 89.60a, en la hora 24 de 85.50a, en la hora 48 de 82.70a, en la hora 72 de 79.90a, y para la raza Yorkshire en la hora 0 de 96.80b, en la hora 24 de 93.20 b, en la hora 48 de 90.60 b, en la hora 72 de 88.20b (Letras diferentes denotan diferencia estadística significativa $P<0.05$). La integridad de membrana promedio (%) en semen según raza y tiempo de conservación fue: Para la raza Landrace en la hora 0 de 73.00a, en la hora 24 de 69.10a, en la hora 48 de 65.90a, en la hora 72 de 63.10a, y para la raza Yorkshire en la hora 0 de 81.60b, en la hora 24 de 77.60b, en la hora 48 de 73.70b, en la hora 72 de 69.40b (Letras diferentes denotan diferencia estadística significativa $P<0.05$). Se concluye que el factor que más influye en la calidad seminal y funcional del semen porcino conservado es la raza.

Knobbe M., et al. 2008 en un trabajo de investigación sobre: “EVALUACION DE SEMEN CRIOPRESERVADO BOVINO DE UN SEMENTAL PARA USO COMERCIAL. NUEVA YORK 2008” Reporto que: La capacitación precoz de esperma o cryocapacitación puede contribuir a reducir la fertilidad del semen crio preservado, pero no es

cuantificable, es necesario un ensayo bioquímico para evaluar este cambio funcional.

La hipótesis de que si el espermatozoide de semental congelado bovino se somete a cryocapacitación, sería detectado por la fosforilación de tirosina de proteínas, un marcador bioquímico cuantificable de semen fresco de vacuno, capacitación espermática, y un aumento en la tasa de reacción acrosómica inducida por lisofosfatidilcolina (AR LC), un ensayo estándar de capacitación espermática. Para este estudio se usó semen crio preservado procesado comercialmente (Extensor de leche - glicerol) de eyaculados individuales de 19 toros Holstein los cuales se evaluaron dos veces por cada toro. Las muestras fueron evaluadas después de la descongelación (0 h) o después de un 4h de incubación en un medio TALP con: sin aditivos (NA); o 10 mg / ml de heparina (H); o 10 mg / ml de heparina y 1 mM dibutilil - cAMP más 100 mM IBMX (HCA, se sabe, que puede maximizar la capacitación del espermatozoide bovino). Los espermatozoides fueron evaluados para viabilidad usando CFDA / tinción de yoduro de propidio, espontáneamente (SAR) y AR LC (tintura Coomassie G- 250), y para la fosforilación de tirosina de proteínas, tal como se evaluó tanto por análisis de transferencia en ranura antifosfotirosina y análisis de inmunotransferencia unidimensional de SDS-PAGE estándar. La fosforilación de tirosina de proteínas de ranuras en banda (p48) fue cuantificada mediante el análisis (Gel - Pro 4.5, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EE.UU.). Los datos se presentan como medias S.D. y se evaluaron mediante ANOVA de tres vías, seguido de la prueba de Tukey para comparaciones múltiples, con una significación establecida en $p < 0,05$ (Sigma - Stat 3.0, SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.). A excepción de dos toros con baja viabilidad (A, B), no hubo diferencia significativa entre toros en la viabilidad del espermatozoide, pero la viabilidad se redujo en incrementos significativos para NA, H, y HCA (0 h: 60,7 8,9%; NA: 53,0 8,2%; H: 47.8 10.3; y HCA: 33.3 8.9%). Las tasas de Sar 0 h fueron más bajas que las muestras incubadas a 4 h (0 h: 15,7 6,6%; Na:40,6 21,3%; H: 42.7 a 19.8; HCA: 39.6 16.9%) y sólo dos toros (B, C) tuvieron tasas significativamente altas de sAR. Las tasas de AR LC

a 0 h fueron muy variables, lo cual no difirió significativamente entre los toros o entre experimentos para el mismo toro, y fueron consistentes con algunos en criopacitación (14.8 17,1%). LC a AR 4 h se redujo significativamente en comparación con 0 h, altamente variables, y no de manera consistentemente repetible (NA: 1,7 17,7%; H: 1.3 13.8; HCA: 1.4 10.2%). El análisis Slot blot fueron muestras consistentemente repetible para 0 h, pero no para las muestras incubadas, y detectaron significativamente mayor fosforilación de la tirosina de proteínas para un toro (A). La fosforilación de la tirosina de p48 con respecto al control positivo (HCA), difirieron significativamente entre los tratamientos (0 h: 17,8% 7,8; NA: 27,5 10,7%; H: 33,3 13,5%), era consistentemente repetible, y se detectaron dos toros (D, E) con reducida, y uno con un aumento de la fosforilación de tirosina (F) p48. La relativa falta de diferencias inter-toro detectado con estos ensayos no fue inesperado, ya que todos los toros eran toros probados. Fosforilación de la tirosina p48 proporcionado datos similares a AR LC a 0 h, pero no en la siguiente incubación, tal vez debido a la alta tasa de SAR. Por lo tanto, la fosforilación de tirosina es un buen candidato como marcador bioquímico para crio capacitación de espermatozoides bovinos, pero debe ser evaluada en toros con más variables a las respuestas a la congelación.

Nuñez, A., et al. (2015) en un trabajo de investigación sobre “COMPARACIÓN DE LA CALIDAD BIOLÓGICA DEL SEMEN BOVINO POSCONGELADO UTILIZANDO COMO CRIOPROTECTOR LECHE AL 2% DE GRASA, ANDROMED® Y CONTINENTAL® ONE STEP”. Reporto que: El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la leche al 2% de grasa, Andromed® y Continental® one step como crioprotectores sobre la calidad biológica del semen bovino, específicamente sobre la motilidad individual espermática, el porcentaje de muestras con calidad biológica aceptable e índice de recuperación. Se evaluó el semen de 6 toros, recolectado en la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. En el laboratorio se evaluó el volumen del eyaculado, color, olor, pH, motilidad en masa, motilidad espermática individual, concentración y morfología. Una vez evaluado el semen, se

separó el total del eyaculado en tres fracciones iguales para cada tratamiento. Para la congelación, se expusieron las pajuelas a nitrógeno líquido y luego se almacenaron en el termo. Seguidamente, se descongelaron para las pruebas poscongelado. Se usó el Modelo Lineal General realizando un ANDEVA y separación de medias utilizando la prueba de Duncan al 5%. El Continental® one step fue el que presentó los mejores resultados en la mayoría de las características evaluadas: mayor motilidad individual poscongelado (60%), mejor calidad biológica (18.00) y mayor índice de recuperación (66.8%). El Andromed® presentó el mayor porcentaje de anormalidades en fresco y poscongelado, 9 y 16% respectivamente. La leche no presentó diferencias con el Continental® one step en cuanto a porcentaje de anormalidades. Con base en los resultados del estudio, el diluyente Continental® one step obtuvo la mayor motilidad individual poscongelado y la menor diferencia de motilidad individual fresco vs poscongelado. El menor porcentaje de anormalidad poscongelado y la menor diferencia de anormalidades entre fresco vs poscongelado se obtuvo en los diluyentes a base de Leche al 2% y Continental® one step. La mejor calidad biológica y el mejor índice de recuperación se obtuvo en el diluyente Continental® one step.

CAPITULO III. MATERIALES Y METODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. Localización del Trabajo

3.1.1.1. *Espacial*

El presente trabajo se localizó en la localidad de Arequipa geográficamente ubicada entre las coordenadas 16°24'22"S 71°32'51"O a una altitud de 2335 m.s.n.m.

El departamento de Arequipa tiene una temperatura promedio de 23°C, con una humedad relativa mayor a 27% y menor a 70% y una precipitación promedio de 78mm (Google Earth, 2017)

3.1.1.2. *Temporal*

El desarrollo de la investigación de campo y evaluación seminal y funcional se desarrollaron en el Laboratorio de Biotecnología Animal del Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Católica de Santa María, durante los meses de Julio a Diciembre del 2017.

3.1.1.3. *Materiales Biológicos*

- 30 pajillas (10 por cada Centro de Colección Seminal) de semen crio preservado bovino comercial de origen nacional.

3.1.2. Materiales de Laboratorio

3.1.2.1. *Reactivos*

- Solución Salina Formolada
- Tinción Supra vital (Eosina - Nigrosina)
- Solución Hipo osmótica (HOS)
- Solución HOS Formol
- Tinción Rosa de Bengala

3.1.2.2. Materiales de Campo

- Mandil
- Computadora portátil
- Registros de procedencia de muestras.

3.1.2.3. Equipos

- Microscopio óptico
- Microscopio de contraste de fases
- Incubadora
- Termo platina
- Baño María

3.1.2.4. Otros Materiales

- Cámara de Neubauer
- Corta pajillas
- Pinzas para pajillas
- Crio viales
- Láminas portaobjetos
- Láminas cubreobjetos
- Guantes de nitrilo
- Termómetro
- Micro pipeta de 0.5 a 10 μ l
- Micro pipeta de 10 a 100 μ l
- Micro pipeta de 100 a 1000 μ l
- Puntas para micro pipetas
- Tubos de ensayo

3.2. METODOS

3.2.1. Muestreo

3.2.1.1. *Universo*

Se tomó como universo a las pajillas expendidas por los Centros de Colección Seminal seleccionados.

3.2.1.2. *Tamaño de Muestra*

El tamaño de la muestra es 30 muestras (pajillas) de semen crio preservado comercial de origen nacional bovino por cada Centro de Colección Seminal, 10 de cada uno.

3.2.1.3. *Procedimiento de Muestreo*

Se seleccionaron aleatoriamente 10 muestras de semen por cada Centro de Colección Seminal que cumplan con los factores de inclusión para la evaluación seminal y funcional.

3.2.2. Métodos de Evaluación

3.2.2.1. *Metodología de la Evaluación*

Se evaluaron los indicadores de calidad espermática microscópicos (concentración, motilidad progresiva y morfología,) y funcionales (vitalidad, integridad de membrana plasmática e integridad de acrosoma), en pajillas de semen bovino nacional según metodología descrita en el Procedimiento de Operación Estándar (POE) L-002 (Reátegui, 2015)

a) Parámetros Microscópicos

- **Motilidad Espermática**

Para evaluar el porcentaje de espermatozoides móviles se tomó una gota de semen que se colocó entre un portaobjetos y un cubreobjetos (atemperados a 37°C), generando así una fina película que permitió determinar el número de células móviles presentes en la muestra. El semen se observó utilizando un microscopio de contraste de fase con objetivo de 10x y 20x y platina térmica del microscopio atemperado a 37 ° C.

El porcentaje de motilidad progresiva fue determinado inmediatamente después de descongelado el semen y luego de 2 horas de incubación.

La valoración del movimiento se realizó sobre aquellos espermatozoides que mostraron un movimiento progresivo. (Busch y Waberski; 2010)

- **Concentración Espermática**

La determinación de la concentración seminal se realizó con una cámara de recuento (Cámara de Neubauer). Se realizó una dilución 1:50 (2.5 ml de solución salina formolada y 50µl de semen). Luego se colocó en la cámara de Neubauer. Concluida la sedimentación después de 2 -3 minutos, se contó en el microscopio los espermatozoides de 5 cuadrados secundarios.

El volumen de cada cuadrado secundario es de:

$$0.2 \text{ mm} \times 0.2 \text{ mm} \times 0.1 \text{ mm} = 0.004 \text{ mm}^3 = 0.0004 \mu\text{l}$$

Entonces el volumen total contado es de:

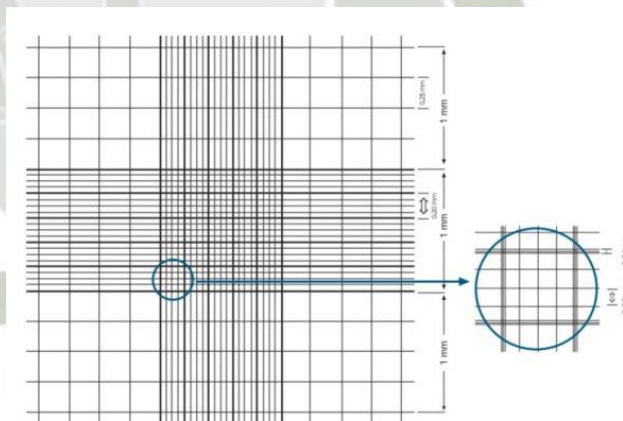
$$0.004 \mu\text{l} \times 5 \text{ cuadrados secundarios contados} = 0.02 \mu\text{l}$$

Si a este valor lo multiplicamos por el factor de dilución (1:50), el volumen es:

$$0.02 \mu\text{l} \times 0.02 = 0.0004 \mu\text{l}$$

La cantidad de espermatozoides contados se encuentra en un volumen de 0.0004 μl , hay que llevarlo a un volumen de 1ml (1000 μl). La cuenta final a realizar para calcular el número de espermatozoides/ml es la siguiente:

Sumatoria de espermatozoides totales en cinco cuadrados secundarios $\times 2.5 \times 10^6$



Para el recuento se consideraron las cabezas de los espermatozoides contenidos en los 16 cuadrados pequeños. En caso de que hubiera cabezas de espermatozoides sobre los bordes, se eligieron dos de los cuatro lados del cuadrado secundario. Se contaron las cabezas que estaban

sobre los lados elegidos. Si hubiera cabezas ubicadas sobre los otros dos bordes, se ignoraron al contar.

Solo se cuentan las cabezas de espermatozoides incluidas en los cuadrados, así como sobre las líneas limitantes a la izquierda y debajo de cada cuadrado. (Busch y Waberski; 2010)

- **Morfología**

Para llevar a cabo la valoración de la morfología espermática, se evaluaron 200 espermatozoides por muestra utilizando la Tinción de Rosa de Bengala. Primero se realizó un frotis sobre un portaobjetos atemperado a 37°C con una alícuota de 5µl de semen y 5µl de tinción Rosa de Bengala al 3% atemperada; luego se dejó secar a temperatura ambiente durante 20 minutos y finalmente se observó con objetivo de inmersión.

El resultado final se expresó en porcentaje e indica la proporción de malformaciones, aceptándose no más del 25%. De los espermatozoides con malformaciones un máximo de 8% de anomalías deberán ser de cabeza y un 20% de anomalías de cola (Barth y Oko; 1989).

- b) **Funcionalidad**

- **Vitalidad**

El recuento de espermatozoides vivos se evaluó utilizando la tinción Supra vital de Eosina – Nigrosina, y se ejecuta de la siguiente manera, sobre un portaobjetos a 37°C, se mezcla una gota de 5µl de

solución de Eosina - Nigrosina (mantenido a su vez en un baño María a 37°C), con otra gota de 5µl de semen sin diluir, y también mantenido en el baño María a 37°C. Una vez mezcladas ambas gotas, se realizó un frotis y se observara en un microscopio óptico con 400 aumentos.

Todos aquellos espermatozoides que presentaron algún tipo de coloración oscura, indicativo de una alteración de la membrana citoplasmática, se consideraron muertos, y vivos a todos los espermatozoides que mostraron un color totalmente blanco, indicativo que presentan una membrana funcional que no permite el paso del colorante. (Barth y Oko; 1989)

Se contaron un total de 200 espermatozoides indicando el número de espermatozoides blanco o sin colorante (vivos) respecto de los que se observan coloreados o rojos (muertos).

- **Membrana Plasmática**

Para evaluar la funcionalidad de la membrana plasmática se incubó 12.5 µl de semen en 125 µL de solución hipo osmótica (HOS), previamente calentada a 37°C, en baño María a la misma temperatura durante 10 minutos. Luego se detuvo la reacción agregando 25 µl de solución HOS Formol. Finalmente se colocó entre porta y cubreobjetos 5µl de la muestra y se observó en un microscopio de contraste de fase a 400 aumentos. Aquellos espermatozoides que presentaron colas hinchadas o enrolladas, se consideraron espermatozoides con integridad de membrana intacta (Jeyendran et al., 1984).

Se contó un total de 200 espermatozoides y el resultado final se expresó porcentualmente.

- **Integridad Acrosomica**

Para evaluar la integridad de acrosoma se colocó una alícuota de 5µl de semen y 5µl de Tinción de Rosa de Bengala sobre un portaobjetos y se realizó un frotis. Se observó en el microscopio óptico con aceite de inmersión. El defecto podía ser la falta total del capuchón acrosomico o su pérdida en distintas proporciones.

El resultado final se expresó en porcentaje e indica la proporción de acrosomas dañados, no más del 50 % de los espermatozoides deben presentar acrosomas dañados para que la dosis sea considerada de calidad. (Cross y Meizel, 1989)

Se hizo un conteo total de 200 espermatozoides. Y se expresó porcentualmente.

3.2.2.2. Recopilación de la Información

a) En el Campo

Se registraron los datos de los Centros de Colección Seminal y se colectaron las pajillas.

b) En el Laboratorio

Se realizaron las pruebas necesarias para la observación, microscópica y funcional del semen crio preservado bovino.

c) En la Biblioteca

Libros y revistas relacionados con el tema, artículos científicos especializados.

d) **En otros ambientes generadores de Información Científica**

- Páginas Web relacionadas al tema.
- Intercambio de información con profesionales especializados en el tema.

3.2.3. Variables de Respuesta

3.2.3.1. Variables Independientes

Pajillas de semen crio preservado comercial de origen nacional

3.2.3.2. Variables Dependientes

- Motilidad espermática
- Concentración espermática
- Morfología espermática
- Viabilidad
- Integridad membrana plasmática
- Integridad de acrosoma

3.2.4. Evaluación Estadística

3.2.4.1. Unidades Experimentales

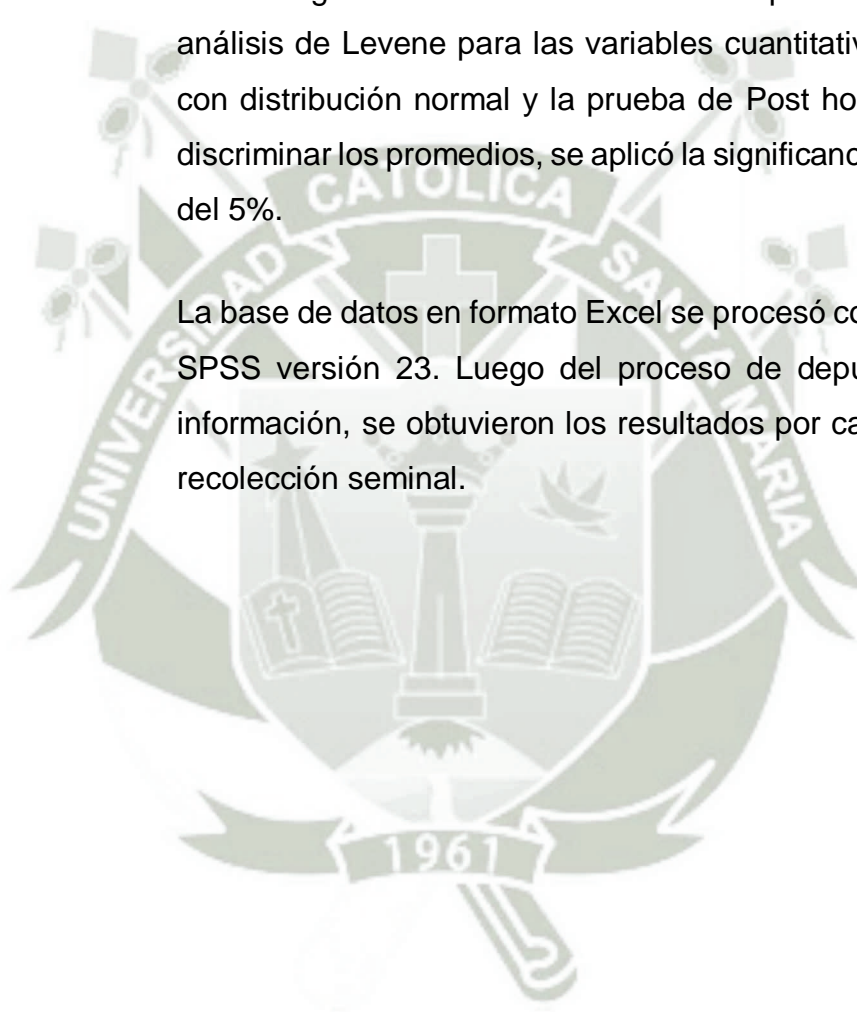
Cada muestra de semen fue considerada como una unidad experimental u observación.

3.2.4.2. *Diseño Experimental*

Para cada uno de los parámetros evaluados se usaron distintas técnicas que se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Animal.

Se realizó el resumen estadístico mediante las medidas de tendencia central y variabilidad para cada una de las variables de investigación. Para el contraste de la hipótesis se realizó el análisis de Levene para las variables cuantitativas cada una con distribución normal y la prueba de Post hoc Tukey para discriminar los promedios, se aplicó la significancia estadística del 5%.

La base de datos en formato Excel se procesó con el software SPSS versión 23. Luego del proceso de depuración de la información, se obtuvieron los resultados por cada centro de recolección seminal.



CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. EVALUACION COMPARATIVA DE LOS PARAMETROS MICROSCOPICOS EN SEMEN CRIOPRESERVADO BOVINO COMERCIAL DE 3 CENTROS DE COLECCIÓN SEMINAL (AREQUIPA, PERU) 2016

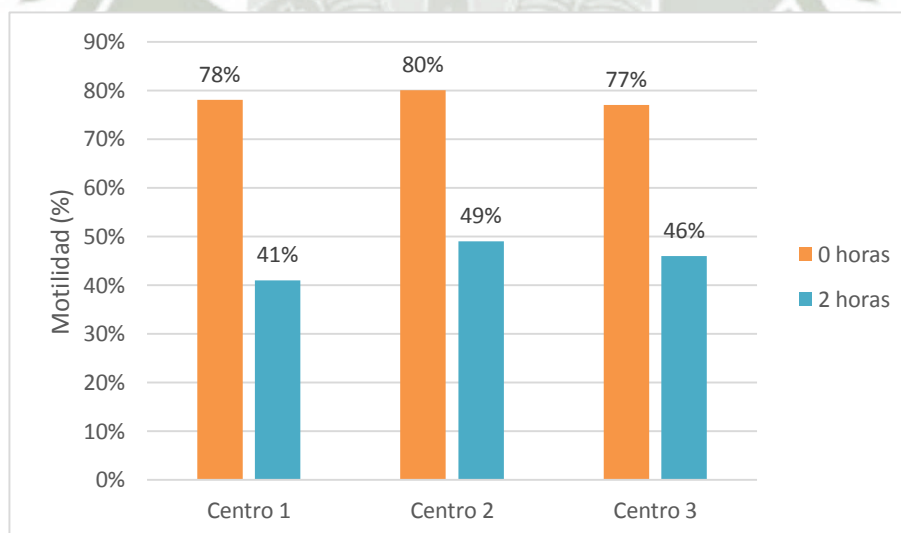
Cuadro N°1. Motilidad Progresiva Promedio (%) de semen bovino en 3 Centros de Colección Seminal¹ considerando 2 horas de evaluación.

Centro	Motilidad 0h (%)	Motilidad 2h (%)
Centro 1	78.00 ^a	41.00 ^a
Centro 2	80.00 ^a	49.00 ^a
Centro 3	77.00 ^a	46.00 ^a

^a Superíndices iguales dentro de columnas indican ausencia de diferencia significativa ($p>0.05$)

¹ 10 muestras por centro de colección seminal

Gráfico N°1. Motilidad Progresiva Promedio de semen bovino en 3 Centros de Colección Seminal considerando 2 horas de evaluación.



En el Cuadro N°1 y Gráfico N°1 se presentan los promedios de motilidad progresiva espermática hallados en semen bovino crio preservado de 3 Centros de colección seminal y en 2 horas de evaluación (0h y 2h respectivamente). Luego del respectivo proceso estadístico se encontró

que existe una tendencia descendente de la motilidad espermática en el tiempo, sin embargo no se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p > 0.05$) entre los valores de motilidad espermática en los 3 Centros de Colección Seminal.

Los valores mínimos aceptables según el **ISO 9002** para semen bovino descongelado a las 0 horas es de 25% y después de 2 horas es de 15% con lo cual todas las muestras de los 3 Centros evaluadas en esta investigación se encuentran por encima de dichos valores. Además **Cavestany (1994)**. Indica que una muestra de semen puede ser considerada “apta” si luego de 2 horas de incubación mantiene por lo menos un 50% de la motilidad inicial por tanto podríamos indicar que todas las muestras evaluadas son aptas después de 2 horas de incubación a 37°C y podrían ser consideradas de buena calidad, respecto a este parámetro, pues no hubo una variación tan abrupta desde el momento de descongelado de la pajilla hasta 2 horas después

Cabrera P. y Pantoja C. (2012) en sus resultados de motilidad espermática post descongelamiento de 4 toros nacionales obtuvieron valores entre 60 y 70% de motilidad, mientras que la mayoría de las pajillas evaluadas en esta investigación obtuvieron valores finales (2h) entre el 40% y 50%. La diferencia del porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva en ambos trabajos principalmente se debe a que en la primera investigación solo se evaluó la motilidad del semen crio preservado a las 0 horas y por ello el porcentaje fue mayor, también pudiera ser debida al protocolo de descongelamiento empleado y debido a que la evaluación de este parámetro es subjetiva, pues depende mucho del investigador que observa los espermatozoides.

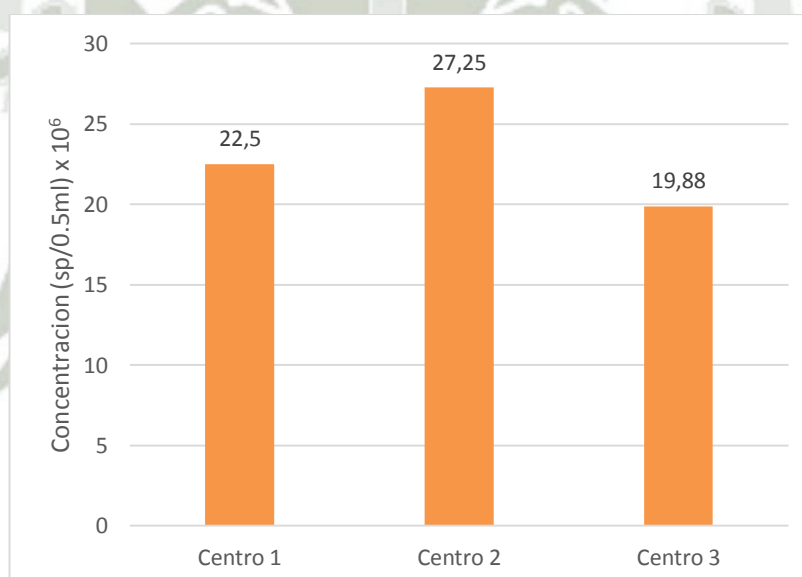
Cuadro N°2. Concentración Espermática Promedio (spz/0.5ml) de semen bovino crio preservado en 3 Centros de Colección Seminal¹.

Centro	Concentración (spz/0.5ml)	Concentración (spz/ml)
Centro 1	22.50 x 10 ^{6a}	44.5 x 10 ^{6a}
Centro 2	27.25 x 10 ^{6a}	54.5 x 10 ^{6a}
Centro 3	19.88 x 10 ^{6a}	39.8 x 10 ^{6a}

^a Superíndices iguales dentro de columnas indican ausencia de diferencia significativa ($p > 0.05$)

¹ 10 muestras por centro de colección seminal

Gráfico N°2. Concentración Espermática Promedio (spz/0.5ml) de semen bovino crio preservado en 3 Centros de Colección Seminal¹.



En el Cuadro N° 2 y el Gráfico N° 2 se presentan los promedios de concentración espermática en semen bovino crio preservado de 3 Centros de Colección Seminal, los valores hallados fueron de 44.5 x 10⁶ ml, 54.5 x 10⁶ ml y 39.8 x 10⁶ ml, respectivamente. Luego del respectivo proceso estadístico, se apreciaron diferencias numéricas; sin embargo no se encontraron diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$), entre los valores de concentración espermática.

Quispe, A. (2015) en su investigación sobre la evaluación de la sobrevivencia y fertilidad in vivo de espermatozoides del epidídimo de toros criollos post mortem encontró que la concentración promedio entre 758.3 y 240.4 x10⁶ espermatozoides/ml en periodos de refrigeración de 0 a 24 horas, estos resultados difieren de los obtenidos en esta investigación debido probablemente al efecto de método de colección de espermatozoides a partir de la cola del epidídimo de semen fresco, la metodología de evaluación en tres horas distintas y el efecto de refrigeración.

Respecto a nuestros resultados, estos se encuentran sobre el rango establecido y pueden ser considerados de buena calidad pues según **Christensen et al., (1999)** para la inseminación artificial, una dosis mínima de 10 x 10⁶ de espermatozoides con movimiento progresivo por pajilla al descongelado debe garantizar máxima fertilidad de los toros individuales, incluso algunos autores afirman que bajo buenas condiciones de recolección, procesamiento e inseminación, la tasa de fecundidad se mantiene con 5 x 10⁶ de espermatozoides con movimiento progresivo (Foote y Kaproth, 1997).

Es importante mencionar que las pajillas evaluadas de los 3 Centros de colección no contienen un ml de semen sino más bien 0.5 ml por lo que debemos considerar este valor para definir la concentración, dividiendo la cantidad obtenida entre 2.

Dado que **Barth y Oko, (1989)** mencionan que el valor mínimo aceptable para concentración espermática post descongelado es de 10 millones de espermatozoides los resultados de los tres Centros evaluados se encuentran por sobre ese límite pudiendo notar una ligera diferencia en el centro 2 respecto a los otros Centros de colección.

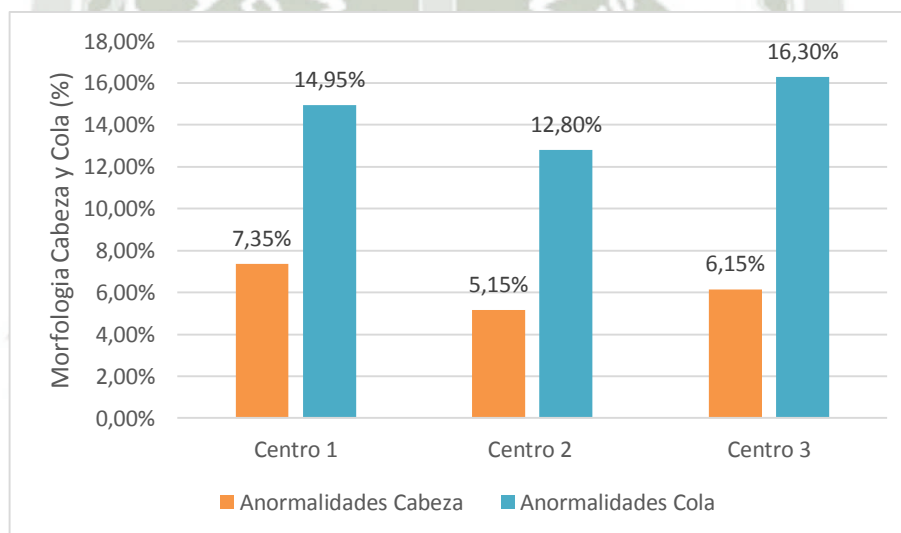
Cuadro N°3. Anormalidades de cabeza y cola Promedio (%) de semen bovino crio preservado en 3 Centros de Colección Seminal¹.

Centro	Anormalidades Cabeza (%)	Anormalidades Cola (%)
Centro 1	7.35 ^a	14.95 ^a
Centro 2	5.15 ^a	12.80 ^a
Centro 3	6.15 ^a	16.30 ^a

^a Superíndices iguales dentro de columnas indican ausencia de diferencia significativa ($p>0.05$)

¹ 10 muestras por centro de colección seminal

Gráfico N°3. Anormalidades de cabeza y cola Promedio (%) de semen bovino crio preservado en 3 Centros de Colección Seminal¹.



El Cuadro N°3y el Gráfico N°3, muestran los porcentajes promedio de las anormalidades encontradas en cabeza y cola respectivamente de las pajillas evaluadas de los 3 Centros de Colección Seminal, en el Centro 1 anormalidades de cabeza 7.35% y de cola 14.95%, en el Centro 2 anormalidades de cabeza 5.15% y de cola 12.80% y en el Centro 3 anormalidades de cabeza 6.15% y de cola 16.30%. Después de realizar el análisis estadístico se encontraron diferencias numéricas, sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticas significativas ($P>0.05$) entre los valores de anormalidades morfológicas.

Quispe, A. (2015) en su investigación sobre la evaluación de la sobrevivencia y fertilidad in vivo de espermatozoides del epidídimo de toros criollos post mortem diferenció las anormalidades en primarias y secundarias, en este último grupo observó un promedio de 13.19% de anormalidades de cola y cabeza libre 0.84% en promedio. Estos valores se encuentran por debajo de los encontrados en esta investigación debido a la metodología empleada en ambos estudios, sin embargo se encuentran dentro de los límites permitidos.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos y según los valores mínimos permitidos para malformaciones por **Barth y Oko, (1989)**, entre 5 y 15% para malformación de cabeza y en cola menos del 20%, observamos que los 3 Centros de Colección Seminal tuvieron promedios menores al límite permitido por lo que pueden ser considerados aptos o aceptables. Asimismo notamos que el Centro de Colección Seminal 2 tiene valores inferiores con relación a los otros dos Centros por lo que respecto a este parámetro puede ser considerado el mejor.

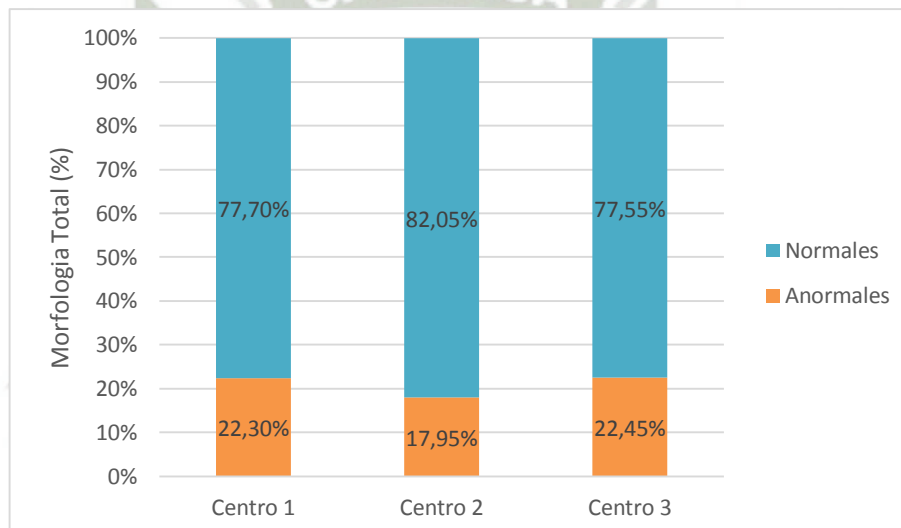
Respecto a las anormalidades que más repitieron durante la evaluación, tenemos en cabeza: cabezas piriformes y cabezas sueltas, en cuanto a las anormalidades de cola fueron cola enrollada y desprendimiento de cola.

Cuadro N°4. Morfología Espermática Total Promedio (%) de semen bovino crio preservado en 3 Centros de Colección Seminal¹.

Centro	Morfología (%)
Centro 1	22.20 ^b
Centro 2	17.95 ^a
Centro 3	22.45 ^b

^{a,b} Superíndices desiguales dentro de columnas indican diferencias significativas ($p < 0.05$)
¹ 10 muestras por centro de colección seminal

Gráfico N°4. Morfología Espermática Total Promedio (%) de semen bovino crio preservado en 3 Centros de Colección Seminal¹.



El Cuadro N°4 y el Gráfico N°4, muestran los porcentajes promedio de las anomalías totales de las pajillas evaluadas de los 3 Centros de Colección Seminal, en el Centro 1 fue de un 22.30%, en el Centro 2 un total de 17.95% y en el Centro 3 fue de 22.45%. Luego del análisis estadístico de dicha información, se determinaron diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) entre el Centro 1 y el Centro 2 de Colección Seminal y entre el Centro 2 y el Centro 3 de Colección Seminal.

Respecto a los resultados obtenidos en esta investigación son consistentes respecto a lo mencionado por **(Barth y Oko, 1989)** que indican que las anomalías totales permitidas son como máximo 25%

y nuestros resultados se encuentran por debajo de ese límite permitido, siendo el Centro 2 el que tiene menor porcentaje de espermatozoides anormales respecto a los otros Centros. Este parámetro es importante pues a medida que aumenta la proporción de espermatozoides anormales en el eyaculado, desciende la capacidad fecundante del mismo y puede tener un impacto perjudicial sobre la fertilización y el desarrollo embrionario (**Saacke, 2008**).

Núñez, A., et al. (2015) Reportó un 14.1 % de anomalías totales promedio pos congelado, este valor se encuentra por debajo de los valores encontrados en este estudio en cual el mínimo valor fue de 17.95%, la diferencia radica en el tiempo de conservación del semen pues en el primer estudio se utilizó semen congelado poco tiempo y además se usaron distintos tipos de dilutores para la evaluación.

Quispe, A. (2015) obtuvo resultados entre 28.28% y 35.08% de anomalías totales después de un tiempo de refrigeración de 5 horas, resultados similares a los obtenidos en la presente investigación aun teniendo en cuenta que las pajillas observadas en esta investigación fueron descongeladas y examinadas en distintos momentos. Sin embargo es importante recalcar que en nuestros resultados ninguno de los Centros evaluados paso el límite mínimo establecido, siendo el mejor posicionado el Centro 2.

4.2. DETERMINACION COMPARATIVA DE LOS PARAMETROS FUNCIONALES EN SEMEN CRIOPRESERVADO BOVINO COMERCIAL DE 3 CENTROS DE COLECCIÓN SEMINAL (AREQUIPA, PERU) 2016

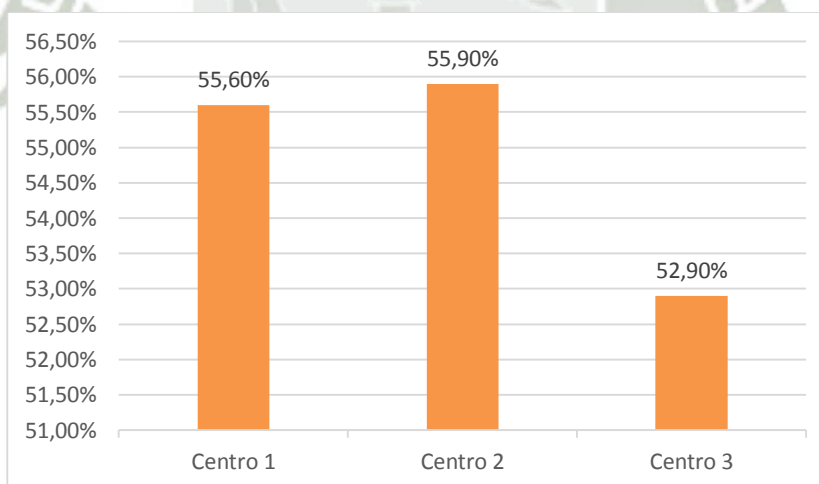
Cuadro N°5. Vitalidad Promedio (%) de semen bovino crio preservado en 3 Centros de Colección Seminal¹.

Centro	Vitalidad (%)
Centro 1	55.60 ^a
Centro 2	55.90 ^a
Centro 3	52.90 ^a

^a Superíndices iguales dentro de columnas indican ausencia de diferencia significativa ($p>0.05$)

¹ 10 muestras por centro de colección seminal

Gráfico N°5. Vitalidad Promedio (%) de semen bovino crio preservado en 3 Centros de Colección Seminal¹



En el Cuadro N°5 y el Gráfico N°5, se indica la Vitalidad promedio de las pajillas de semen evaluadas ($n=30$) en cada Centro de colección seminal (10 por cada Centro de colección seminal) obteniendo como resultados 55.60% para el Centro 1, 55.90% en el Centro 2 y 52.90% en el Centro 3. Luego del respectivo análisis estadístico, se observaron diferencias

numéricas; sin embargo, estas no presentaron diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$).

Cabrera P. y Pantoja C. (2012) al realizar la prueba de vitalidad encontraron en promedio un 78.5% de espermatozoides vivos, este resultado difiere con los hallados en esta investigación, entre 52% y 55%, puesto que se realizaron en semen puro haciendo una correlación entre vitalidad e integridad de acrosoma y en el caso del semen congelado obtuvieron en promedio 48.6%. En ambos casos los resultados hallados se encuentran dentro de los valores aceptables.

Los resultados obtenidos en esta investigación se encuentran sobre el valor mínimo permitido que es 40% post descongelación según **Srivastava N. (2017)** Dado que los espermatozoides inmóviles pueden estar vivos, solo una coloración supra vital (eosina nigrosina) puede establecer esa diferencia. La evaluación de este parámetro nos indica que la mayoría de los espermatozoides evaluados de las pajillas de los 3 Centros de Colección Seminal tienen la membrana plasmática intacta pues no dejaron pasar el colorante. Se puede decir que esta prueba es complementaria a la prueba HOST, ya que esta evalúa el daño físico de la membrana, mientras que la prueba HOST evalúa la actividad bioquímica de la membrana plasmática (**Brito et al., 2003**).

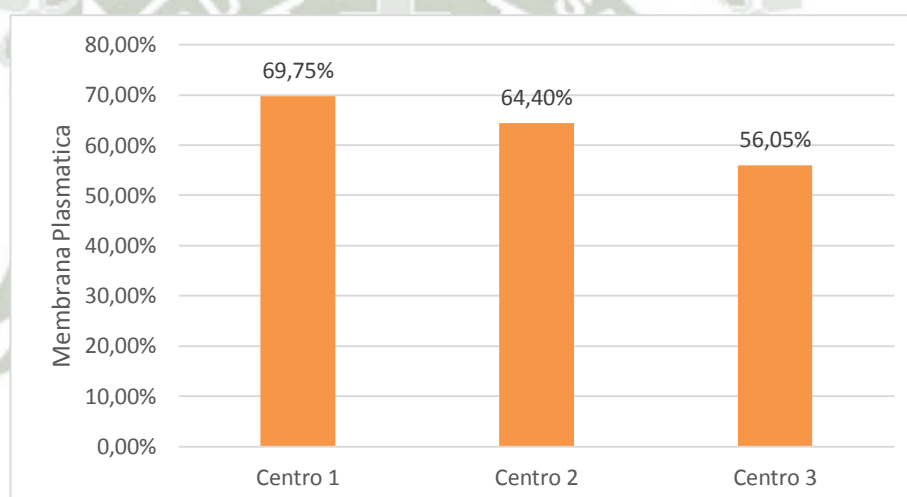
Cuadro N°6. Integridad de Membrana Plasmática Promedio (%) de semen bovino crio preservado en 3 Centros de Colección Seminal¹.

Centro	Membrana plasmática (%)
Centro 1	69.75 ^a
Centro 2	64.40 ^{ab}
Centro 3	56.05 ^b

^{a,b} Superíndices desiguales dentro de columnas indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

¹ 10 muestras por centro de colección seminal

Gráfico N°6. Integridad de Membrana Plasmática Promedio (%) de semen bovino crio preservado en 3 Centros de Colección Seminal¹.



El Cuadro N°6 y el Gráfico N°6, representan los promedios de la integridad de membrana de espermatozoides hallados en semen bovino post descongelado de 3 Centros de Colección Seminal. Luego de procesar dicha información se encontró que el Centro 1 tiene un 69.75% de espermatozoides con membrana plasmática intacta, el Centro 2 tiene un 64.40% y el Centro 3 un 56.05%, asimismo se halló diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) entre el Centro 1 y el Centro 3 de Colección Seminal.

Quispe, A. (2015) reporto en su investigación un promedio de 53.21% de espermatozoides reaccionados en el test hipo osmótico, este es un

resultado menor a los hallados en este estudio pues en dicha investigación se realizó la evaluación de los espermatozoides colectados de la cola del epidídimo y en diferentes tiempos, mientras que en este estudio se utilizaron espermatozoides obtenidos de pajillas. Sin embargo los valores obtenidos de los 3 Centros de Colección Seminal son superiores al mínimo requerido.

Cabrera P. y Pantoja C. (2012) obtuvieron como resultado entre 56.7-59.1% de espermatozoides con membrana plasmática intacta siendo consideradas todas las muestras de buena calidad por estar sobre el mínimo permitido. Los resultados obtenidos en esta investigación son similares aunque ligeramente más altos, esto se debería según **Graham y Parkes (1992)** a que la membrana plasmática es el sitio primario de lesión en los espermatozoides crio preservados y su principal daño se produce durante la congelación y descongelación, resultando en la pérdida sustancial de espermatozoides viables (**Bailey et al., 2003**). Por tanto el protocolo de descongelamiento utilizado en ambas investigaciones podría causar esa diferencia. Teniendo en cuenta esto podemos decir que los espermatozoides de los 3 Centros evaluados no presentan daños considerables en su membrana plasmática y podrían ser considerados buenos respecto a este parámetro.

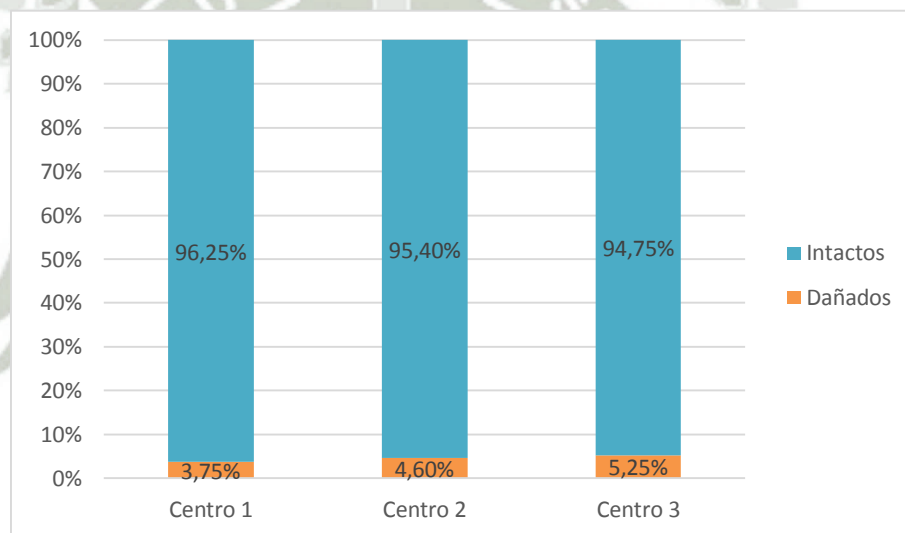
Cuadro N°7. Integridad de Acrosoma Promedio (%) de semen bovino crio preservado en 3 Centros de Colección Seminal¹.

Centro	Integridad de Acrosoma (%)
Centro 1	3.75 ^a
Centro 2	4.60 ^a
Centro 3	5.25 ^a

^a Superíndices iguales dentro de columnas indican ausencia de diferencia significativa ($p > 0.05$)

¹ 10 muestras por centro de colección seminal

Gráfico N°7 Integridad de Acrosoma Promedio (%) de semen bovino crio preservado en 3 Centros de Colección Seminal¹.



En el Cuadro N° 6 y el Gráfico N°6, se aprecia los promedios de integridad de acrosoma de semen bovino crio preservado, en términos porcentuales, de 3 Centros de Colección Seminal (10 pajillas por Centro). Siendo encontrados en el Centro 1 un 96.25% de espermatozoides con acrosoma intacto, en el Centro 2 95.40% y en el Centro3 94.75%. Luego del respectivo proceso estadístico, no se encontraron diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$), entre dichos valores.

Los resultados obtenidos en esta investigación son superiores, respecto a este parámetro, a los hallados por **Cabrera P. y Pantoja C. (2012)** quienes

hallaron en promedio un 48.6% de espermatozoides con acrosoma intacto después de la congelación/descongelación, mostrando el grado de influencia del efecto de la congelación sobre la calidad espermática. Podemos atribuir esta diferencia de resultados al tiempo de conservación de las pajillas y las condiciones del procesamiento de semen distintas en ambas investigaciones.

Quispe, A. (2015) en su investigación también obtuvo valores por debajo (entre 48 y 36%) de los hallados aquí, debido a que evaluó espermatozoides refrigerados en distintos tiempos (0, 12 y 24 horas), obtenidos de la cola del epidídimo. Debemos tener en cuenta que el protocolo utilizado para esta evaluación fue distinto lo que podría ser la causa de la diferencia de resultados así como la influencia de la zona geográfica y el clima de los lugares de evaluación.

Las principales anormalidades encontradas en el acrosoma en esta investigación fueron acrosoma nudoso o rugoso y acrosoma aplanado que son los más frecuentes según **(Barth y Oko, 1989)**. Este tipo de anormalidades son importantes debido a que Los eyaculados que contienen espermatozoides con el acrosoma nudoso suelen presentar también otras anomalías espermáticas, lo que compromete aún más la fertilidad del semental **(Gran y Dott, 1976)**. Además si el porcentaje de espermatozoides con acrosoma nudoso es elevado, se podría decir que el semental es virtualmente estéril, puesto que los espermatozoides con esta alteración se comprobó que no eran capaces de atravesar la zona pelúcida **(Thundathil et al., 2000; 2002)**. Además, se cree que es un defecto no compensable, es decir, los espermatozoides normales presentes en el mismo eyaculado también tenían menor capacidad fecundante.

Este parámetro es uno de los valores más importantes de la evaluación seminal pues según **Sullivan, 1978; Den Daas, 1992; Ax et al., 2000a**: La reacción acrosómica tiene lugar en el sitio de la fertilización y es activada por condiciones locales o por unión específica de enzimas contenidas en el lisosoma. O sea que las enzimas contenidas en el acrosoma permiten que el espermatozoide capacitado penetre el óvulo.

Por lo tanto un alto porcentaje de células que tienen acrosoma intacto y por ende son capaces de realizar la reacción acrosómica, es considerado como una característica seminal importante. Podemos indicar que las pajillas evaluadas de los 3 Centros de colección no sufrieron un daño considerable durante el proceso de descongelación lo que permitió que más del 90% de sus espermatozoides mantuvieran intacto el acrosoma. Y por tanto pueden ser considerados funcionalmente buenos no existiendo una diferencia marcada entre los 3 Centros de Colección Seminal.



CAPITULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

Evaluación de los parámetros microscópicos en semen crio preservado bovino comercial de origen nacional en bovinos lecheros de 3 Centros de Colección Seminal, Arequipa, 2016.

- En la evaluación de motilidad progresiva a las 0 horas, en el Centro 1 se encontró un 78%, en el Centro 2 se encontró un 80% y en el Centro 3 un 77% en promedio de espermatozoides con motilidad progresiva post descongelamiento.
- En la evaluación de motilidad progresiva a las 2 horas, en el Centro 1 se encontró un 41%, en el Centro 2 se encontró un 49% y en el Centro 3 un 46% en promedio de espermatozoides con motilidad progresiva post descongelamiento.

Se concluyó que los 3 Centros de Colección Seminal se encuentran dentro de los parámetros de aceptabilidad (0hs > 30% de spz móviles; 2hs > 20% de spz móviles) para la evaluación de semen post descongelado. Siendo el Centro 2 el que obtuvo mayor porcentaje (49%) de espermatozoides con motilidad progresiva después de 2 horas de descongelamiento.

- En la evaluación de concentración espermática se observó que en el Centro 1 se encontró un 22.50×10^6 , en el Centro 2 se encontró un 27.25×10^6 y en el Centro 3 un 19.88×10^6 de espermatozoides en 0.5ml de semen.

Se concluyó que los 3 Centros de Colección Seminal se encuentran dentro del parámetro de aceptabilidad, dado que este es un valor muy variable por pajilla, no se puede definir con exactitud la concentración ideal pero se considera como aceptable si superan los 10 millones. (Barth y Oko, 1989)

- En la evaluación de morfología de cabeza, en el Centro 1 se encontró un 7.35%, en el Centro 2 se encontró un 5.15% y en el Centro 3 un 6.15% de anomalías en la cabeza de los espermatozoides.
- En la evaluación de morfología de cola, en el Centro 1 se encontró un 14.95%, en el Centro 2 se encontró un 12.80% y en el Centro 3 un 16.30% de anomalías en la cola de los espermatozoides.
- En la evaluación de morfología total, en el Centro 1 se encontró un 22.20%, en el Centro 2 se encontró un 17.95% y en el Centro 3 un 22.45% de anomalías totales en los espermatozoides.

Se concluyó que los 3 Centros de Colección Seminal se encuentran dentro de los valores permitidos para anomalías espermáticas, siendo el Centro 2, el que obtuvo el menor porcentaje (17.95%) de espermatozoides anormales, pudiendo ser considerado mejor que los otros Centros en relación a este parámetro.

Evaluación de los parámetros funcionales en semen crio preservado bovino comercial de origen nacional en bovinos lecheros de 3 Centros de Colección Seminal, Arequipa, 2016.

- En la evaluación de vitalidad, en el Centro 1 se encontró un 55.60%, en el Centro 2 se encontró un 55.90% y en el Centro 3 un 52.90% de espermatozoides vivos post descongelamiento.

Se concluyó que, respecto al parámetro vitalidad, los 3 Centros de Colección Seminal superan el 40% como mínimo permitido de espermatozoides vivos después del descongelamiento, por lo que son considerados aceptables. Siendo los Centros 1 y 2 los que obtuvieron mayor porcentaje (55.60% y 55.90% respectivamente) de espermatozoides vivos.

- En la evaluación de integridad de membrana plasmática, en el Centro 1 se encontró un 69.75%, en el Centro 2 se encontró un 64.40% y en el Centro 3 un 56.05% de espermatozoides con membrana plasmática intacta.

Se concluyó que, sobre el parámetro integridad de membrana plasmática, los 3 Centros de Colección Seminal se encuentran en el rango de los valores normales (>40%), por lo que son considerados aceptables. Siendo el Centro 1 el que obtuvo el mayor porcentaje (69.75%) de espermatozoides con membrana plasmática intacta.

- En la evaluación de integridad de acrosoma, en el Centro 1 se encontró un 96.25%, en el Centro 2 se encontró un 95.40% y en el Centro 3 un 94.75% de acrosomas intactos post descongelamiento.

Se concluyó que, los 3 Centros de Colección Seminal se encuentran dentro de los valores permitidos (>40%) para integridad de acrosoma, siendo el Centro 1 el que obtuvo el porcentaje más alto de espermatozoides con acrosoma intacto.

- En conclusión considerando estos resultados, y basándonos en el cumplimiento de los parámetros básicos para la evaluación de calidad y funcionalidad espermática, las pajillas de los 3 Centros de Colección Seminal pueden ser considerados de buena calidad, sin embargo el Centro de Colección Seminal 2 cumple con dichos estándares y además cuenta con mejores resultados en comparación con los otros por lo que puede ser considerado el mejor Centro de Colección de semen crio preservado comercial de origen nacional de bovinos lecheros.

5.2. RECOMENDACIONES

- Se recomienda que, para evaluar la calidad seminal, tanto en el aspecto microscópico y funcional, tomar en cuenta por lo menos los 3 parámetros básicos, los cuales son: concentración de espermatozoides con motilidad progresiva por dosis inseminante, viabilidad (%motilidad progresiva y acrosomía) y morfología a la hora de comparar distintas pajillas
- Se recomienda usar pajillas de Centros de Colección confiables, que ofrezcan datos de los toros así como los resultados de las evaluaciones hechas de los espermatozoides de estos.
- Se recomienda usar pajillas para inseminación que por lo menos cumplan con los estándares mínimos descritos en la bibliografía.
- Como última recomendación, al organismo encargado de supervisar la calidad de semen nacional (SENASA) se recomienda tener un control sobre la calidad de semen nacional comercializado en Arequipa, dado que nuestra región hace uso permanente del método de inseminación artificial en bovinos para la producción lechera y de esa manera se podría llevar un manejo más eficaz de los Centros de Colección Seminal en nuestra región.

CAPITULO VI. BIBLIOGRAFIA

1. Amann, R.P., Seidel, G.E., Mortimer, R.G., 2000. Fertilizing potencial in vitro of semen from young beef bulls containing a high or low percentage of sperm with a proximal droplet. *Theriogenology*. 54 (9), 1499-515.
2. Arruda, R.P.; Celenghini C.C.E.; Andrade, A.F.C; García, A.R.; Nascimento, J.; Raphael, C.F.; Souza, L.W.O. (2000) Importância da qualidade do semen em programas de IATF e TETF. Simpósio internacional de reprodução animal aplicada. 1º Laboratorio de biotecnología do semen e andrología, centro de biotecnología em reprodução animal, Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo. pp166-179.
3. Ax R.L.; Dally M.R.; Didion B.A.; Lenz R.W.; Love C.C.; Varner D.D.; Hafez B.; Bellin M.E. (2000a) Evaluación del semen. En: Hafez, E.S.; Hafez. B. Reproducción e inseminación artificial en animales, 7ºed. México, McGraw-Hill Interamericana pp. 375-386.
4. Bailey, J. L.; Bilodeau, J. F.; Cormier, N. (2000) Semen criopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *Journal of Andrology* 21(1):1-7.
5. Bailey, J.L.; Robertson, L.; Buhr, M.M. (1994) Calcium regulation, computerize motility parameters and the fertility of bovine spermatozoa. *Canadian Journal of Animal Science* 74:53-58.
6. Baracaldo, M. I.; Barth, A. D.; Bertrand, W. (2007) Steps for freezing bovine semen: from semen collection to the liquid nitrogen tank. Disponible en: <http://www.ivis.org/reviews/rev/baracaldo/chapter.asp?la=1>
7. Barth, A. D. (2007) Evaluation of potential breeding soundness of the bull. En: Youngquist, S.; Walter, R. Threlfall. *Current therapy large animal theriogenology*. Saskatchewan, Saunders Elsevier-Interamericana. 1061p.
8. Barth, A.D.; Oko, R.J. (1989) *Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa*. Ames, IA, Iowa State University Press. 285p.
9. Bloom, E., 1977. Sperm morphology with reference to bull infertility. *First All-India Symp. Anim. Reprod.* pp: 61-81.
10. Bonadonna, T. (1989) *Reproducción animal e inseminación artificial*. 2ª ed. Buenos Aires. Hemisferio Sur, 2v.
11. Burks, D.J.; Sailing, P.M. (1992) Molecular mechanisms of fertilization and activation of development. *Animal Reproduction Science* 28:79-86.
12. Catena, M.; Cabodevila J. (1999) Evaluación de semen bovino congelado. *Taurus*. 1(3):18-31.

13. Chaveiro, A.; Machado L.; Frijters A.; Engel B.; Woelders, H. (2006) Improvement of parameters of freezing protocol for bull sperm using two osmotic supports. *Theriogenology*, 65:1875-1890.
14. Correa, J.R.; Zavos, P.M. (1994) The hipoosmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. *Theriogenology*. 42:351-360.
15. Crespilho, A.M.; Papa, F.O.; Martins, A.; Dell'Aqua Junior, J.A. (2009) Evaluation of frozen bovine semen: how do semen collection and processing centers evaluate the quality of commercialized samples? *Veterinária e Zootecnia*. 16(2):335-342.
16. Den Daas, J.H. (1992) Laboratory assessment of semen characteristics. *Animal Reproduction Science* 28:87-94.
17. Derivaux, J. (1976) Reproducción de los animales domésticos. 2º ed. Zaragoza, Acribia. 486p.
18. Elhordoy, D.; Fariás, D. (2003) Manual de Inseminación Artificial en Bovinos. Montevideo. Facultad de Veterinaria, Oficina Publicaciones. 95p.
19. Elhordoy, D.; Haedo, F. (1983) Experimental testicular degeneration in bulls. Proceeding 15 ° FAO/SIDA Postgraduated Course. Veterinary College. Uppsala. Suecia. 1:365-369.
20. Elhordoy, D.; Nan, E.; Hernández, L.; Hernández, S.; Acuña, R. (2010) Testosterone concentration, scrotal circumference and seminal parameters in yearling Hereford bulls in Uruguay. 26º World Buiatrics Congress, Santiago, Chile pp.14-18.
21. Elliott, F.I. (1978) Significance of semen quality. En: Salisbury, W.G.; Van Demark, N.L.; Lodge, J.R. *Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle*. San Francisco, Freeman. p428-441.
22. Freitas-Dell'Aqua, C.P.; Crespilho, A.M.; Papa, F.O.; Dell'Aqua J.A. (2009) Metodologia de avaliação laboratorial do semen congelado bovino. *Reproduction Animal*, Belo Horizonte 33:4213-222.
23. Garner, D.L.; Hafez, E.S. (2000) Espermatozoides y plasma seminal. En: Hafez, B.; Hafez, E.S. *Reproducción e inseminación artificial en animales*. 7ed. México. Interamericana-McGraw-Hill. 98-112p.
24. Gil, J. (1999) Evaluation of post-thaw sperm quality in the bull and ram with special emphasis on semen processing. Licenciante thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala 29p.
25. Gonzales, R.A.F. (2004) Effect of cryopreservation using different freezing techniques and cryoprotectants on sperm parameters and membranes integrity of bovine spermatozoa. Tese. Programa de Pos-Graduação em

- Medicina Veterinaria, Universidade Sao Paulo. Pirassununga, Sao Paulo. 94p.
26. Graham, J.K. (2001) Assessment of sperm quality. *Proceedings of the American Association of Equine Practitioners* 47:302-305.
 27. Gran, D.G., Dott, H.M., 1976. The ultrastructure of knobbed bull spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 47 (2), 407-408.
 28. Graves, C.N. (1978) El semen y sus componentes. En: Salisbury G.W., VanDemark N.L.; Lodge J.R. *Fisiología de la reproducción e inseminación artificial en bóvidos*, 2º ed. Zaragoza, Acribia. pp.258-298.
 29. Hafez, E.S. (2000) Preservación y criopreservación de gametos y embriones. En: Hafez, B.; Hafez, E.S. *Reproduccion e inseminación artificial en animales*, 7ª ed. Mexico. McGraw-Hill Interamericana. pp.441-452.
 30. Hammerstedt, R.H.; Graham, J.K.; Nolan, J.P. (1990) Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *Journal of Andrology* 11:73- 88.
 31. Holt, W.V.; Van Look, J.W. (2004) Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory test of semen quality. *Reproduction* 127:527-535.
 32. Howard, T.H., Pace, M.M., 1998. Seminal evaluation and artificial insemination: Fertility and Infertility in Veterinary Practice. Eds: Laing, J.A., Morgan, W.J., Wagner, W.C., Bailliere Tindall. London. U.K., 39-51.
 33. Janusakauskas, A.; Zilinskas, H. (2002) Bull semen evaluation post-thaw and relation of semen characteristics to bulls fertility. *Veterinarija ir Zootechnika* 39:1-8.
 34. Jeyendran, R.S.; Van der Ven, H.H.; Perez-Pelaez, M.; Crabo, B.G.; Zanevald L.J. (1984) Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility* 70:219-228.
 35. Kjaested, H.; Ropstad, E.; Andersen-Berg, K. (1993) Evaluation of spermatological parameters used to predict the fertility of frozen bull semen. *Acta Veterinaria Scandinavica* 34:299-303.
 36. Krogenaes, A.; Andersen-Berg, K.; Hafne, A.L.; Engeland, E. (1994) Membrane alteration in bull spermatozoa after freezing and thawing and after in vitro fertilization. *Acta Veterinaria Scandinavica* 35:17-26
 37. Linford E.; Glover , F.A.; Bishop, C.; Stewart, D.L. (1976) The relationship between semen evaluation methods and fertility in the bull. *Journal of Reproduction and Fertility* 47(2):283-291.

38. Liu, Z.; Foote, R.H. (1998) Bull sperm motility and membrane integrity in media varying in osmolality. *Journal Dairy Science* 81:1868-1873.
39. Madrid-Bury, N. (2004) Relación entre los métodos de valoración seminal in vitro y la fertilidad in vivo del semen descongelado de toros frisones. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España. División de Estudios de Postgrado. Facultad de Veterinaria. pp1-164.
40. Melo, M.; Henry, M. (1999) Teste hiposmótico na avaliação de sêmen eqüino. *Arquivo Brasileiro de Veterinária e Zootecnia* 51(1):71-78.
41. Meyer, R.A., Barth, A.D., 2001. Effect of acrosomal defects on fertility of bulls used in artificial insemination and natural breeding. *Can. Vet. J.* 42 (8), 630-4.
42. Milovanov, V.K., 1938. The artificial insemination of farm animals. *Seljhozgiz, Moscow*.
43. Morrow, D.A. (1986) *Current. Therapy in Theriogenology diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in small and large animals*. Philadelphia, Saunders. pp.132-136.
44. Mortimer, S.T. (2000) CASA: practical aspects. *Journal of Andrology* 21:515- 524.
45. 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.
46. NAAAb (National Association of Animal Breeders) Technical conference proceedings 1986. pp: 102.
47. Nuñez, A.L.; Rubio, A.L. (2015) Comparación de la calidad biológica del semen bovino poscongelado utilizando como crioprotector leche al 2% de grasa, Andromed® y Continental® one step. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras.
48. Pérez y Pérez, F. 1985. *Reproducción Animal: Inseminación Artificial y Transplante de Embriones*. Editorial Científico-Médica, Barcelona, España.
49. Pérez-Llano, B.; García-Casado, P.; Lorenzo, J.; Sánchez-Sánchez, R. (1998) Response to the boar sperm to the Host test and relationship between HOST and ORT results. *Proceeding 15th Internacional Pig Veterinary Society Congress*. Birmingham, England. p.69.
50. Phillips, N.J.; McGowan, M.R.; Johnston, S.D.; Mayer, D.G. (2004b) Relationship between thirty post-thaw spermatozoal characteristics and the field fertility of 11 high-use Australian dairy AI sires. *Animal Reproduction Science* 81:47-46.

51. Quispe, A.E. (2015) Evaluación de la sobrevivencia y fertilidad in vivo de espermatozoides de epidídimo de toros criollos post mortem. Universidad Nacional del Altiplano. Puno.
52. Rao, A.R. (1971) Changes in the morphology of sperm during their passage through the genital tract in bulls with normal and impaired spermatogenesis. Royal Veterinary College, Stockholm. 88p.
53. Reategui, J. (2015) Determinación de la calidad del semen criopreservado comercial utilizado en hatos lecheros, implicancia en la fertilidad e impacto en variables productivas. Vicerrectorado de Investigación. Universidad Católica de Santa María. Arequipa.
54. Rigau, T., Farré, M., Ballester, J., Mogas, T., Peña, A., Rodríguez-Gil, J.E., 2001. Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates. *Theriogenology*. 56, 801-815.
55. Rodríguez-Martínez, H. (2000) Evaluation of frozen semen: traditional and new approaches. En: *Topics in bull fertility*. Disponible en: http://www.ivis.org/advances/Repro_Chenoweth/Rodriguez_Martinez/chapter.a.sp?LA=1
56. Rota, A.; Penzo, N; Vicenti, L.; Mantovani, R. (2000) Hypoosmotic swelling (HOS) as a screening assay for testing in vitro fertility of bovine spermatozoa. *Theriogenology* 53:1415-1420.
57. Saacke R.G.; White, J.M. (1972) Semen quality tests and their relationship to fertility. *Proceeding. 4th Technical Conference National Association Animal Breeders (NAAB)*. Columbia. pp. 22-27.
58. Saacke, R.G. (1970) Morphology of the sperm and its relationship to fertility. *Proceedings 3rd Technical Conference National Association Animal Breeders (NAAB)*. Madison, Wisconsin. pp. 21-30.
59. Salisbury G.W., VanDemark N.L.; Lodge J.R. (1978) *Fisiología de la reproducción e inseminación artificial de los bóvidos*, 2º ed. Zaragoza Acribia, 831p.
60. Santos, G.C. (2003) Viabilidade de sêmen eqüino congelado em meios diluidores de diferentes composições. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais. *Dissertação (Mestrado Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais*. 58p.
61. Srivastava, N.; (Megha Pande). (2017). *Protocols in Semen Biology (Comparing Assays)*. Singapore. Springer Nature.
62. Sullivan J.J. (1978) Morfología y motilidad de los espermatozoides. En Salisbury G.W., Van Demark N.L., Lodge J.R. *Fisiología de la reproducción e inseminación artificial en bóvidos*, 2ºed. Zaragoza, Acribia. 831p

63. Thundathil, J., Palasz, A.T., Barth, A.D., Mapletoft, R.J., 1999. An investigation of the fertilizing characteristics of pyriform shaped bovine spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 57 (1-2), 35-50.
64. Tribulo, H.E.; Alonso, N.; Bó, G.A.; Brogliatti, G.M.; Caccia, M.; Carcedo, J.; Tribulo, R. (2002) Actualización sobre fisiología reproductiva y evaluación de la capacidad reproductiva del toro. Córdoba, Mariana Caccia, 225 p.
65. Vera, O. (2003) Evaluación seminal comparativa pre y post congelación en machos bovinos. En: González-Stagnaro, C. *Reproducción Bovina*. Maracaibo. Fundación Giraz. pp.251-262.
66. Waberski, D. (2010) Espermatozoides y plasma seminal. En: Busch, W. y Waberski, D. *Manual de inseminación artificial de los animales domésticos y de explotación zootécnica*. 91 -97p.





CAPITULO VII. ANEXOS



ANEXO 1
ANALISIS ESTADISTICO

Prueba de homogeneidad de varianzas

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Concentración	1,890	2	27	,171
Motilidad 0h	1,917	2	27	,166
Motilidad 2h	,036	2	27	,964
Viabilidad	1,188	2	27	,320
Membrana plasmática	,315	2	27	,732
Integridad acrosómica	,394	2	27	,678
Morfología	,752	2	27	,481

Fuente: Elaboración propia – Spss v23

Interpretación

Considerando que el estadístico de Levene nos permite contrastar la hipótesis de igualdad de varianzas poblacionales, considerando que si el nivel crítico (sig.) es menor o igual que 0.05, debemos rechazar la hipótesis de igualdad de varianzas y si es mayor, aceptamos la hipótesis de igualdad de varianzas.

Del Cuadro 19, prueba de homogeneidad de varianzas, se observa que los parámetros de calidad y funcionalidad del semen crio preservado en los diferentes Centros de Colección Seminal cumplen con la condición, es decir se tratan de muestras con igualdad de varianzas, por tener un nivel crítico de significancia mayor al nivel considerado 0.05.

Prueba ANOVA por parámetros de calidad y funcionalidad del semen crio preservado

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Concentración	Entre grupos	5,75E+15	2	2,87E+15	1,100	,347
	Dentro de grupos	7,05E+16	27	2,61E+15		
	Total	7,63E+16	29			
Motilidad 0h	Entre grupos	46,667	2	23,333	,245	,784
	Dentro de grupos	2570,000	27	95,185		
	Total	2616,667	29			
Motilidad 2h	Entre grupos	326,667	2	163,333	1,986	,157
	Dentro de grupos	2220,000	27	82,222		
	Total	2546,667	29			
Viabilidad	Entre grupos	54,600	2	27,300	,668	,521
	Dentro de grupos	1104,200	27	40,896		
	Total	1158,800	29			
Membrana plasmática	Entre grupos	953,450	2	476,725	3,940	,032
	Dentro de grupos	3267,250	27	121,009		
	Total	4220,700	29			
Integridad acrosómica	Entre grupos	11,317	2	5,658	1,206	,315
	Dentro de grupos	126,650	27	4,691		
	Total	137,967	29			
Morfología cabeza	Entre grupos	24,267	2	12,133	1,163	,328
	Dentro de grupos	281,575	27	10,429		
	Total	305,842	29			
Morfología cola	Entre grupos	62,317	2	31,158	1,457	,251
	Dentro de grupos	577,425	27	21,386		
	Total	639,742	29			
Morfología	Entre grupos	127,917	2	63,958	5,883	,008
	Dentro de grupos	293,550	27	10,872		
	Total	421,467	29			

Fuente: Elaboración propia – Spss v23

Interpretación

La tabla de ANOVA, nos ofrece el estadístico F con su nivel de significación, del cual se puede definir que si el nivel de significación (sig.) entre grupos es menor

o igual que 0,05, rechazamos la hipótesis de igualdad de medias, si es mayor – aceptamos la igualdad de medias, es decir, no existen diferencias significativas entre los grupos.

Del cuadro, Prueba ANOVA por parámetros de calidad y funcionalidad del semen crio preservado, se observa que de los parámetros de calidad y funcionalidad del semen crio preservado en los diferentes centros de colección seminal:

- La membrana plasmática, tiene un nivel de significancia 0.032 que es menor que el nivel de significancia 0.05 de la investigación, por lo tanto, existe diferencia significativa entre las muestras de los diferentes centros de colección seminal.
- La morfología, tiene un nivel de significancia 0.008 que es menor que el nivel de significancia 0.05 de la investigación, por lo tanto, existe diferencia significativa entre las muestras de los diferentes centros de colección seminal.
- Los demás parámetros presentan un nivel de significancia mayor al nivel de significancia 0.05 de la investigación, por lo tanto, no existen diferencia significativa entre las muestras de los diferentes centros de colección, es decir se trata de muestras homogéneas o con igualdad de medias.

Prueba Post hoc Tukey de comparaciones múltiples por parámetros de calidad y funcionalidad del semen crio preservado entre los Centros de Colección Seminal

Variable dependiente			Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
Concentración	1	2	-2,97E+07	2,29E+07	,408	-8,64E+07	2,70E+07
		3	-7,00E+05	2,29E+07	,999	-5,74E+07	5,60E+07
	2	1	2,97E+07	2,29E+07	,408	-2,70E+07	8,64E+07
		3	2,90E+07	2,29E+07	,425	-2,77E+07	8,57E+07
	3	1	7,00E+05	2,29E+07	,999	-5,60E+07	5,74E+07
		2	-2,90E+07	2,29E+07	,425	-8,57E+07	2,77E+07
Motilidad 0h	1	2	-2,0000	4,3631	,891	-12,818	8,818
		3	1,0000	4,3631	,971	-9,818	11,818
	2	1	2,0000	4,3631	,891	-8,818	12,818
		3	3,0000	4,3631	,773	-7,818	13,818
	3	1	-1,0000	4,3631	,971	-11,818	9,818
		2	-3,0000	4,3631	,773	-13,818	7,818
Motilidad 2h	1	2	-8,0000	4,0552	,138	-18,054	2,054
		3	-5,0000	4,0552	,445	-15,054	5,054
	2	1	8,0000	4,0552	,138	-2,054	18,054
		3	3,0000	4,0552	,742	-7,054	13,054
	3	1	5,0000	4,0552	,445	-5,054	15,054
		2	-3,0000	4,0552	,742	-13,054	7,054
Viabilidad	1	2	-,3000	2,8599	,994	-7,391	6,791
		3	2,7000	2,8599	,618	-4,391	9,791
	2	1	,3000	2,8599	,994	-6,791	7,391
		3	3,0000	2,8599	,553	-4,091	10,091
	3	1	-2,7000	2,8599	,618	-9,791	4,391
		2	-3,0000	2,8599	,553	-10,091	4,091
Membrana plasmática	1	2	5,3500	4,9195	,530	-6,848	17,548
		3	13,7000*	4,9195	,025	1,502	25,898
	2	1	-5,3500	4,9195	,530	-17,548	6,848
		3	8,3500	4,9195	,225	-3,848	20,548
	3	1	-13,7000*	4,9195	,025	-25,898	-1,502
		2	-8,3500	4,9195	,225	-20,548	3,848
Integridad acrosómica	1	2	-,8500	,9686	,659	-3,252	1,552
		3	-1,5000	,9686	,285	-3,902	,902
	2	1	,8500	,9686	,659	-1,552	3,252
		3	-,6500	,9686	,782	-3,052	1,752
	3	1	1,5000	,9686	,285	-,902	3,902
		2	,6500	,9686	,782	-1,752	3,052
Morfología cabeza	1	2	2,2000	1,4442	,296	-1,381	5,781
		3	1,2000	1,4442	,687	-2,381	4,781
	2	1	-2,2000	1,4442	,296	-5,781	1,381

		3	-1,0000	1,4442	,770	-4,581	2,581
	3	1	-1,2000	1,4442	,687	-4,781	2,381
		2	1,0000	1,4442	,770	-2,581	4,581
Morfología cola	1	2	2,1500	2,0681	,559	-2,978	7,278
		3	-1,3500	2,0681	,792	-6,478	3,778
	2	1	-2,1500	2,0681	,559	-7,278	2,978
		3	-3,5000	2,0681	,226	-8,628	1,628
	3	1	1,3500	2,0681	,792	-3,778	6,478
		2	3,5000	2,0681	,226	-1,628	8,628
Morfología	1	2	4,2500*	1,4746	,020	,594	7,906
		3	-,2500	1,4746	,984	-3,906	3,406
	2	1	-4,2500*	1,4746	,020	-7,906	-,594
		3	-4,5000*	1,4746	,014	-8,156	-,844
	3	1	,2500	1,4746	,984	-3,406	3,906
		2	4,5000*	1,4746	,014	,844	8,156

Fuente: Elaboración propia – Spss v23

Interpretación

Del Cuadro, Prueba Post hoc Tukey de comparaciones múltiples por parámetros de calidad y funcionalidad del semen crio preservado entre los Centros de Colección Seminal, se observa entre que grupos existen diferencias significativas respecto a los parámetros de calidad y funcionalidad del semen crio preservado.

Respecto a la membrana plasmática, se observa que:

- El Centro de Colección Seminal 1 y el Centro de Colección Seminal 3, tienen un nivel de significancia 0.025 que es menor al nivel de significancia 0.05 de la investigación, es decir que existen diferencia significativa entre ambos Centros de investigación seminal

Respecto a la morfología, se observa que:

- El Centro de Colección Seminal 1 y el Centro de Colección Seminal 2, tienen un nivel de significancia 0.020 que es menor al nivel de significancia 0.05 de la investigación, es decir que existen diferencia significativa entre ambos Centros de investigación seminal

- El Centro de Colección Seminal 2 y el Centro de Colección Seminal 3, tienen un nivel de significancia 0.014 que es menor al nivel de significancia 0.05 de la investigación, es decir que existen diferencia significativa entre ambos Centros de investigación seminal

Respecto a los demás parámetros de calidad y funcionalidad del semen crio preservado, como se mencionó en el Cuadro anterior, no presentan diferencias significativas.



Comparación de los parámetros básicos: Motilidad, Morfología, Integridad Acrosomica, Membrana Plasmática y Vitalidad de semen bovino crio preservado entre los 3 Centros de Colección Seminal¹.

Centro	Motilidad 0h (%)	Motilidad 2h (%)	Conc. (spz/0.5ml)	Morf. Total (anormales)	Int. Acros. (%)	Vitalidad (%)	Memb. Plasm. (%)
Centro 1	78,00 ^a	41,00 ^a	22.50 x 10 ^{6a}	22,20 ^b	96.25 ^a	55.60 ^a	69.75 ^a
Centro 2	80,00 ^a	49,00 ^a	27.25 x 10 ^{6a}	17,95 ^a	95.40 ^a	55.90 ^a	64.40 ^{ab}
Centro 3	77,00 ^a	46,00 ^a	19.88 x 10 ^{6a}	22,45 ^b	94.75 ^a	52.90 ^a	56.05 ^b

^{a,b} Superíndices desiguales dentro de columnas indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

¹ 10 muestras por centro de colección seminal

Del Cuadro Comparación de los parámetros básicos: Motilidad, Morfología, Integridad Acrosomica, Membrana Plasmática y Vitalidad de semen bovino crio preservado entre los 3 Centros de Colección Seminal, considerando los estándares de aceptabilidad para la evaluación de los parámetros de calidad y funcionalidad del semen crio preservado de semen post descongelado según Derivaux, (1976); Morrow, (1986); Bonadonna, (1989); Barth y Oko, (1989); Ax et al., (2000); Elhordoy y Farías, (2003)., observamos que comparando los resultados de los tres Centros de Colección Seminal entre si el Centro de Colección Seminal 2 cumple con dichos estándares y cuenta con mejores muestras de semen crio preservado comercial de origen nacional de bovinos lecheros

BASE DE DATOS

GRUPO	PAJILLAS		CONCENTRACION (millones de sp/ml)	MOTILIDAD (%)		VITALIDAD (%)	HOS (%)	INT. ACROSOMA (%)	MORFOLOGIA (%)		
	Núm.	ID		Total	0h				2h	Vivos	Colas Enrolladas
1	1	A	42500000	60.0	40.0	65.5	63.0	6.0	16.0	5.5	21.5
1	2	A	37500000	80.0	40.0	55.5	67.5	4.5	6.0	15.0	21.0
1	3	A	57500000	70.0	30.0	63.5	72.5	5.0	11.0	14.0	24.0
1	4	A	45000000	90.0	40.0	57.5	83.5	2.0	6.0	21.0	27.0
1	5	A	35000000	80.0	30.0	59.5	69.0	3.5	2.5	21.0	23.5
1	6	B	50000000	60.0	30.0	45.5	55.0	5.0	9.0	10.0	19.0
1	7	B	55000000	90.0	50.0	55.0	56.5	2.0	9.0	5.0	14.0
1	8	B	42500000	80.0	40.0	43.0	67.0	2.5	3.0	21.0	24.0
1	9	B	32500000	80.0	60.0	57.0	77.5	2.0	2.0	20.0	22.0
1	10	B	47500000	90.0	50.0	54.0	86.0	5.0	9.0	17.0	26.0
2	11	C	57500000	70.0	50.0	60.0	67.5	2.0	2.5	11.0	13.5
2	12	C	52500000	70.0	40.0	58.5	57.5	2.5	3.5	16.0	19.5
2	13	C	62500000	80.0	50.0	51.5	42.5	9.0	5.5	10.5	16.0
2	14	C	45000000	80.0	40.0	53.0	49.5	8.0	6.0	14.0	20.0
2	15	C	60000000	90.0	50.0	48.5	64.5	5.0	3.5	13.0	16.5
2	16	D	55000000	80.0	60.0	62.5	72.0	5.0	7.5	11.5	19.0
2	17	D	67500000	80.0	60.0	56.0	74.5	2.0	4.5	14.5	19.0
2	18	D	57500000	80.0	40.0	57.0	80.0	2.5	5.5	16.0	21.5
2	19	D	40000000	80.0	40.0	52.5	59.5	5.0	5.0	11.0	16.0
2	20	D	47500000	90.0	60.0	59.5	76.5	5.0	8.0	10.5	18.5
3	21	F	42500000	60.0	40.0	64.0	57.5	4.5	8.5	17.0	25.5
3	22	F	45000000	90.0	50.0	46.5	60.0	6.5	6.0	13.5	19.5
3	23	F	37500000	80.0	50.0	53.5	36.0	11.0	3.0	24.5	27.5
3	24	F	27500000	80.0	60.0	44.5	52.5	2.5	9.5	14.5	24.0
3	25	F	40000000	70.0	40.0	56.5	64.0	6.0	2.5	20.5	23.0
3	26	G	47500000	80.0	40.0	61.5	71.0	4.5	11.0	8.0	19.0
3	27	G	30000000	60.0	30.0	43.5	55.5	5.0	5.5	16.0	21.5
3	28	G	42500000	80.0	50.0	52.0	42.5	5.0	7.5	19.5	27.0
3	29	G	50000000	80.0	50.0	59.5	63.5	5.0	6.0	15.0	21.0
3	30	G	35000000	90.0	50.0	47.5	58.0	2.5	2.0	14.5	16.5

**ANEXO 2
POES**





VICERRECTORADO
DE INVESTIGACIÓN

PROCEDIMIENTO DE OPERACIÓN ESTANDAR (POE)

Descongelado de Pajilla de Semen Criopreservado

Nro.: L-001

Fecha de Elaboración: Marzo / 2017 Fecha Última Revisión: _____ / _____
(Mes) (Año) (Mes) (Año)

DESCRIPCIÓN DE LA TAREA

Lugar donde se realizará: Laboratorio de Biotecnología Animal F-405	
Número de personas que participaron: <input checked="" type="checkbox"/> 1 (Una) <input type="checkbox"/> 2 (Dos) <input type="checkbox"/> 3 (Tres) <input type="checkbox"/> 4 (Cuatro)	
Nivel de experiencia: Avanzado en la manipulación de manejo de semen criopreservado y tanques de nitrógeno líquido.	
Equipos y accesorios utilizados:	
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Baño maría húmedo ✓ Papel absorbente ✓ Tubos de vidrio 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Guantes de seguridad ✓ Lentes de seguridad ✓ Pinza para remover pajillas
Personal: Encargado de la evaluación de semen criopreservado.	
Otros equipos requeridos: Termo de nitrógeno líquido para almacenamiento de semen a -196°C.	

PRODUCTO TERMINADO O RESULTADO ESPERADO

Semen descongelado listo para continuar con la evaluación microscopica y funcional.

ALCANCE DE ESTE POE

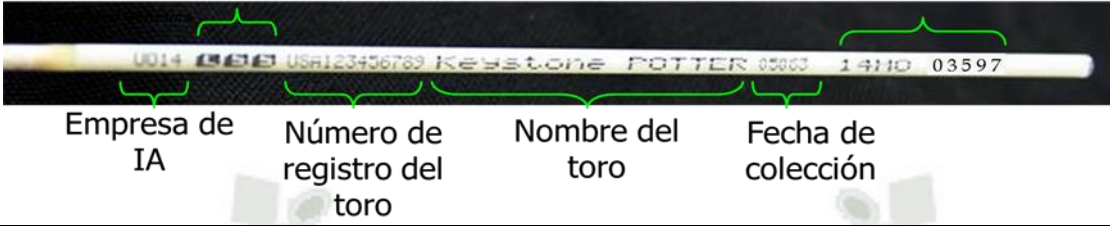
Validar la técnica correcta del descongelado de pajillas de semen criopreservado. La mayoría del semen se empaca en pajillas de 0.25 y 0.5 ml. Para una mejor facilidad, descongele las pajillas en agua tibia por lo menos 30 segundos pero no más de 15 minutos, use cualquier dispositivo especial para esto, ya sea un baño maría, termo o el descongelador electrónico (Cito), que mantiene el agua a una temperatura entre 35 – 37 °C, justo por debajo de la temperatura corporal y nunca sobre ésta. Las pajillas de semen criopreservado son almacenadas en termos de nitrógeno líquido, son empacadas ya sea en un sistema de porta pajillas (Caña de metal) o tubos plástico (goblets). En un sistema de porta pajillas, éste trae en su parte superior una etiqueta metálica con el código del toro, así que usted puede rápidamente localizar la pajilla que necesita. Todas las pajillas en el porta pajillas contienen semen de un solo toro. En el sistema de goblet, la información del toro está impresa en una barra insertada en el goblet.

HABILIDADES ESPECÍFICAS, ENTRENAMIENTO, CERTIFICACIONES Y PERMISO REQUERIDO

- ✓ Habilidad y destreza en descongelamiento de pajillas de semen congelado
- ✓ Habilidad para el manejo de tanques de nitrógeno líquido para el almacenamiento de semen

PROTOSCOLOS POE Nro. 001

Nro.	Pasos y procedimientos comprendidos en esta tarea o proceso	✓
1	Se identificará los tubos donde descongelar con el código de toro y numero de muestra antes de iniciar el procedimiento, se aconseja descongelar una sola pajilla al mismo tiempo	
2	Comience vertiendo agua fría al descongelador, permitiendo que la unidad caliente el agua a la temperatura adecuada de 37 °C. Siempre asegúrese de empezar con agua fría, si usted le pone agua caliente, éste puede estar más caliente que la temperatura apropiada para descongelar.	
3	Para realizar el chequeo de la temperatura, los descongeladores traen un termómetro digital para este fin, al sumergir el termómetro por 10 segundos o más unos números grandes en el termómetro indican la temperatura. Unidades más antiguas usan termómetros normales, los cuales deben ser calibrados a menudo. Si escoge usar un termo para descongelar pajillas, en la mayoría de los casos usted llenará el termo con agua tibia. Si el termómetro muestra que el agua está a una temperatura entre 35 y 37 C el agua está lista para la descongelación, si no, adicione agua fría o caliente hasta que se obtenga la temperatura correcta. Son necesarios frecuentes chequeos para asegurarse de la exactitud de la temperatura de descongelamiento	
4	Siempre localice la unidad de descongelamiento cerca al termo criogénico para reducir el tiempo en que la pajilla está expuesta a la temperatura del aire y cubra la unidad de descongelamiento tan pronto como haya colocado la pajilla. Todas las transferencias de pajillas deben ser hechas en 10 segundos o menos, las pajillas no deben ser expuestas más tiempo del necesario al aire y deben descongelarse a temperatura apropiada.	
5	Destape el termo y rápidamente localice la canastilla que tiene el portapajillas que usted necesita.	
6	Levante la varilla de la canastilla por encima del anillo indicador que está en la boca del termo solo lo necesario para retirar de forma segura solo la pajilla que se quiere. Esto debe ser siempre un poco más debajo de la boca del cuello del termo. Generalmente, usted debe ser capaz de localizar y retirar la pajilla apropiada manteniendo la canastilla por lo menos 3 cm. Debajo de la boca del cuello.	
7	Si el portapajillas que necesita no puede ser localizado en 10 segundos, baje la canastilla hacia el termo por 10 a 15 segundos y súbalo de nuevo para realizar la tarea. Si el nitrógeno líquido hierve o emite vapores cuando usted baja la canastilla, usted está manteniéndola en el cuello del termo por más de 10 segundos.	
8	Cuando levante la canastilla ponga la varilla de la misma entre su primer y segundo dedo con su palma de la mano hacia el termo. Sujete la varilla contra el cuello del termo, su dedo pulgar estará libre, luego con su mano libre alcance dentro del cuello el portapajillas deseado. Levante el portapajillas solo lo suficiente para hacer accesibles las pajillas de la parte superior, tome el portapajilla entre el dedo pulgar e índice de la mano que sostiene la canastilla	
9	Con la pinza porta pajillas, levante la pajilla verticalmente hacia arriba, sacándola del portapajilla, rápidamente colóquela en la unidad de descongelamiento y al mismo tiempo suelte el portapajilla y baje la canastilla hacia el termo y colóquela en su respectivo lugar.	
10	Retire la pajilla del descongelador después de 30 segundos. Aproximadamente, séquela con una toalla de papel limpia.	
11	Corte los extremos sellados de la pajilla con un cortapajillas, asegúrese de hacerlo de la manera correcta para volcar su contenido en tubos previamente atemperados e identificados.	

12	Incubar los tubos por lo menos 5 min. En el baño maría antes de iniciar la evaluación y contrastación de la pajilla de semen	
13	Verifique la identificación del toro para asegurarse que está trabajando con el reproductor elegido. Cada pajilla es marcada con el nombre y número de registro del toro, código de la raza, el número de la empresa empackadora de semen y el número de la colección. Realice esto sin exponer la pajilla a temperaturas extremas.	
<div style="text-align: center;"> <p>Logo de certificación Código de la NAAB</p>  <p>U014 USA USA123456789 Keystone POTTER 05003 14110 03597</p> <p>Empresa de IA Número de registro del toro Nombre del toro Fecha de colección</p> </div>		





VICERRECTORADO
DE INVESTIGACIÓN

PROCEDIMIENTO DE OPERACIÓN ESTANDAR (POE)

Análisis de Pajillas de Semen Criopreservado

Nro.: L-002

Fecha de Elaboración: Marzo / 2017 Fecha Última Revisión: _____ / _____
(Mes) (Año) (Mes) (Año)

DESCRIPCIÓN DE LA TAREA

Lugar donde se realizará: Laboratorio de Biotecnología Animal F-405	
Número de personas que participaron: <input checked="" type="checkbox"/> 1 (Una) <input type="checkbox"/> 2 (Dos) <input type="checkbox"/> 3 (Tres) <input type="checkbox"/> 4 (Cuatro)	
Nivel de experiencia: Avanzado en el protocolo para evaluar la calidad de muestra de semen criopreservado (pajilla) en Bovinos	
Equipos y accesorios utilizados:	
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Solución salina formolada ✓ Solución formol salino bufferada ✓ Eosina - Nigrosina ✓ Rosa de Bengala al 3% ✓ Solución HOS ✓ Solución HOS Formol 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Platina térmica ✓ Cámara de Nuebauer ✓ Porta y cubre objetos ✓ Microscopio de contraste de fase con platina térmica ✓ Microscopio trinocular ✓ Cámara digital
Personal: De laboratorio encargado de la evaluación de semen criopreservado.	
Otros equipos requeridos: Termo de nitrógeno líquido para almacenamiento de semen a -196°C, equipo de descongelar semen POE L-001.	

PRODUCTO TERMINADO O RESULTADO ESPERADO

Informe de Calidad seminal con el uso de las técnicas validadas de evaluación y análisis de semen criopreservado.

ALCANCE DE ESTE POE

Validación de las técnicas de rutina para la determinar la calidad seminal y funcional de semen criopreservado a partir de las técnicas de: volumen, concentración espermática, motilidad total y progresiva, numero de espermatozoides por dosis, numero de espermatozoides motiles progresivos por dosis, porcentaje de espermatozoides vivos, porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto, porcentaje de espermatozoides con membrana funcional, anomalidades morfológicas (tinción de Rosa de Bengala), porcentaje de espermatozoides con anomalidades de cabeza y anomalidades de cola.

HABILIDADES ESPECÍFICAS, ENTRENAMIENTO, CERTIFICACIONES Y PERMISO REQUERIDO

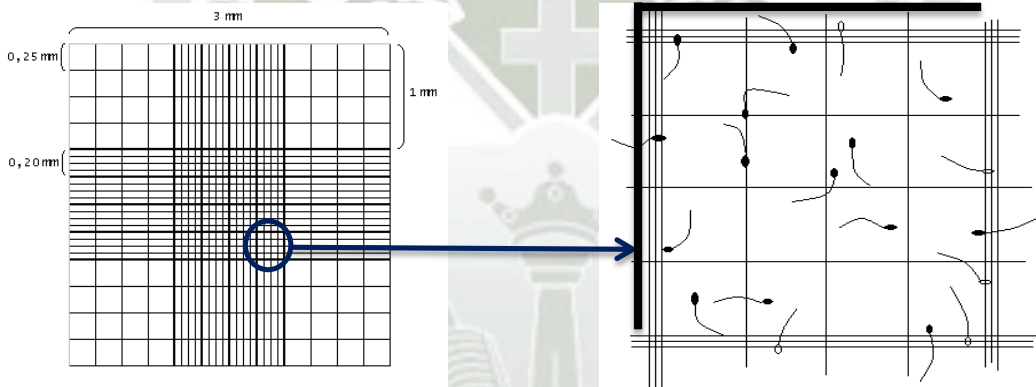
- ✓ Habilidad y destreza en descongelamiento de pajillas de semen congelado
- ✓ Habilidad para el manejo de tanques de nitrógeno líquido para el almacenamiento de semen
- ✓ Entrenamiento y habilidades en el análisis de laboratorio con técnicas de rutina para determinar calidad seminal y funcional.

PROTOCOLOS POE Nro. L-003

Nro.	Pasos y procedimientos comprendidos en esta tarea o proceso	✓
1	Una vez descongelado el semen y cumpliendo el protocolo del POE Nro. L-001	

CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA

La concentración de una pajuela de 0,25ml ó 0,5ml varía de 20 – 30 millones de espermatozoides totales por pajuela. De los cuales al descongelado deben existir un mínimo de 10 millones de células motiles por pajuela.

1	Realizar una dilución 1:50 (2,5 ml de solución salina formolada y 50 µl semen)	
2	Cargar la cámara de Neubauer. Dejar decantar 2-3 minutos	
3	<p>Contar los espermatozoides de 5 cuadrados secundarios: El volumen de cada cuadrado secundario es de: $0,2 \text{ mm} \times 0,2 \text{ mm} \times 1,1 \text{ mm} = 0.0004 \text{ mm}^3 = 0.004 \mu\text{l}$ Entonces el volumen total contado es: $0,004 \mu\text{l} \times 5 \text{ cuadraditos secundarios contados} = 0,02 \mu\text{l}$ Si el valor lo multiplicamos por el factor de dilución (1:50), el volumen es: $0,02 \mu\text{l} \times 0,02 = 0.0004 \mu\text{l}$ Método de conteo de la "L" invertida:</p>  <p>Para el recuento se consideran dos de los cuatro lados del cuadrado secundario (pintados con negro). Se cuentan los espermatozoides cuya cabeza esté sobre los lados elegidos. Si hay espermatozoides ubicados sobre los otros dos bordes, se ignoran al contar (en la imagen de la derecha los espermatozoides coloreados de negro se cuentan, los blancos no).</p>	
4	<p>La cantidad de espermatozoides contados se encuentra en un volumen de 0,0004 µl, hay que llevarlo a un volumen de 1 ml (1000 µl). La cuenta final a realizar para calcular el número de espermatozoides/ml es el siguiente: Sumatoria de espermatozoides totales en 5 cuadraditos secundarios * 2,5 * 10⁶</p>	

MOTILIDAD ESPERMÁTICA

El porcentaje de motilidad progresiva y el vigor serán determinados inmediatamente después de descongelado el semen y luego de 2 horas de incubación.

1	Colocar una gota (15µl) de semen entre porta y cubre (20 x 20 mm) atemperados en platina térmica a 37 °C	
2	Evaluar la movilidad total con objetivo de 10x y 20x, contraste de fase y platina térmica del microscopio atemperada a 37 °C.	
3	Evaluar la movilidad progresiva (vigor) con objetivo de 10x y 20x, contraste de fase y platina térmica del microscopio atemperada a 37°C.	

	La motilidad puedes ser cuantificada utilizando la siguiente escala:															
	Tabla N° 01 Calificación de motilidad espermática															
	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: center;">ESCALA</th> <th style="text-align: center;">DESCRIPCIÓN.-</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">0</td> <td>Sin movimiento.</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">1</td> <td>Ligera ondulación o vibración de cola, sin progresión.</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">2</td> <td>Progresión lenta, incluyendo detención y comienzo de movimiento</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">3</td> <td>Movimiento progresivo continuo y moderada velocidad</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">4</td> <td>Movimiento progresivo, rápido</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">5</td> <td>Movimiento progresivo muy rápido, en el cual las células son difíciles de seguir visualmente.</td> </tr> </tbody> </table>	ESCALA	DESCRIPCIÓN.-	0	Sin movimiento.	1	Ligera ondulación o vibración de cola, sin progresión.	2	Progresión lenta, incluyendo detención y comienzo de movimiento	3	Movimiento progresivo continuo y moderada velocidad	4	Movimiento progresivo, rápido	5	Movimiento progresivo muy rápido, en el cual las células son difíciles de seguir visualmente.	
ESCALA	DESCRIPCIÓN.-															
0	Sin movimiento.															
1	Ligera ondulación o vibración de cola, sin progresión.															
2	Progresión lenta, incluyendo detención y comienzo de movimiento															
3	Movimiento progresivo continuo y moderada velocidad															
4	Movimiento progresivo, rápido															
5	Movimiento progresivo muy rápido, en el cual las células son difíciles de seguir visualmente.															
4	El semen de buena calidad, que ha sido recientemente descongelado, normalmente tiene 40-50% de espermatozoides con motilidad progresiva y un vigor de 3-4. Después de 2 horas de incubación, estos valores generalmente disminuyen un 10 - 15% y 1 punto, respectivamente.															
5	Las normas mínimas para motilidad exigidas que se corresponden con las de las normas ISO 9002 son: 0 hs.= 25% de espermatozoides con motilidad progresiva. Vigor 3. 2 hs= 15% de espermatozoides con motilidad progresiva. Vigor 2															

TECNICAS DE COLORACIÓN VITAL	
Se contará un total de 100 espermatozoides indicando el número de espermatozoides blancos o sin colorante (vivos) respecto de los que se observan coloreados o rojos (muertos). El fondo del preparado se observará grisáceo o negrozco haciendo contrastar a los espermatozoides.	
Tinción con Eosina-Nigrosina (Tamuli <i>et al.</i>, 1988)	
1	Colocar 5µl de semen y 5 µl de solución de Eosina Nigrosina sobre un portaobjetos precalentado a 37°C y luego de 15 a 20 seg., realizar el frotis.
2	Secar y observar con microscopio de campo claro y objetivo de inmersión. Recuento mínimo: 200 espermatozoides por frotis.
Tinción con Eosina	
1	Colocar sobre un portaobjetos precalentado a 37°C una gota de semen y una gota de eosina.
2	Homogenizar y a los 15-20 segundos extender.
3	Secar y observar con objetivo de inmersión.
4	Recuento mínimo: 200 espermatozoides por frotis.

TEST DE ENDOSMOSIS (HOS)	
Los espermatozoides con cola enrollada totalmente, parcialmente, o simplemente acodada se consideraron vivos (reaccionados) y el resultado final se expresará porcentualmente. En cada muestra seminal debe observarse un mínimo de 40% de reaccionados para considerarla adecuada.	
1	Colocar en un tubo de ensayo 125 µl de solución HOS a 37°C y 12.5 µl de semen.
2	Incubar a 37°C durante 10 minutos.
3	Detener la reacción agregando 25 µl de Solución HOS Formol.
4	Colocar entre porta y cubreobjetos 5 µl de la muestra.
5	Observar con microscopio de contraste de fase a 400 aumentos.

INTEGRIDAD ACROSÓMICA

El defecto puede ser la falta total del capuchón acrosómico o su pérdida en distintas proporciones. El resultado final se expresará en porcentaje e indica la proporción de acrosomas dañados (AD), no más del 50% de los espermatozoides deberán presentar acrosomas dañados para que la dosis sea considerada de calidad.

Tinción Giemsa

1	Realizar un frotis con una gota de semen de 7 μ l en portaobjetos precalentado a 37°C.
2	Secar sobre platina térmica de 15 a 20 minutos
3	Fijar en formol bufferado durante 20 min.
4	Lavar 20 minutos en agua corriente
5	Colorear con Giemsa (una parte de colorante con 9 partes de agua corriente) durante 90 minutos.
6	Enjuagar cuidadosamente con agua corriente.
7	Secar al aire.
8	Observar con objetivo de inmersión.

Observación con contraste de fase (sin tinción)

1	Colocar una gota (8-9 μ l), entre porta y cubreobjetos, de la dilución preparada para el recuento de espermatozoides (2.5 ml de Solución Salina formolada y 50 μ l semen).
2	Observar con microscopio de contraste de fase.

Observación con contraste de fase y glutaraldehído

1	Se colocará una gota de semen sobre un portaobjetos y al lado una gota similar de glutaraldehído al 0,2% diluido con buffer fosfato salino
2	Se realizaran tres lecturas por cada pajuela descongelada utilizando un microscopio de contraste de fase (1000X) y contando en cada extendido 100 espermatozoides.

MORFOLOGÍA

El resultado final se expresará en porcentaje e indica la proporción de malformaciones aceptándose no más del 25%. De los espermatozoides con malformaciones un máximo de 8% de anomalías deberán ser de cabeza y un 17% de anomalías de cola.

Tinción con Rosa de Bengala

1	Realizar frotis sobre portaobjetos atemperado a 37 °C con una alícuota de 5 μ l de semen y 5 μ l de solución acuosa de Rosa de Bengala al 3% (m/v) atemperado
2	Dejar secar a temperatura ambiente durante 20 minutos.
3	Observar con objetivo de inmersión

Observación con contraste de fase (sin tinción)

1	Colocar una gota (8-9 μ l), entre porta y cubreobjetos, de la dilución preparada para el recuento de espermatozoides (2.5 ml de Solución Salina formolada y 50 μ l semen).
2	Observar con microscopio de contraste de fase.

ANEXO 3

UBICACIÓN CENTROS DE COLECCIÓN

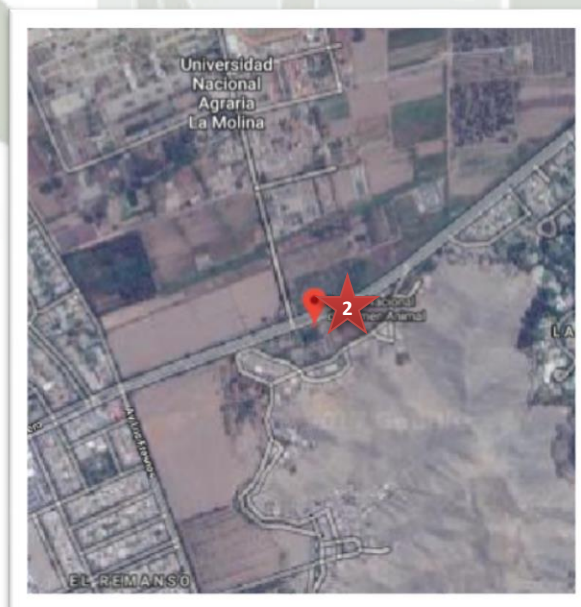


CROQUIS DE LOS CENTROS DE COLECCIÓN SEMINAL EVALUADOS

CENTRO DE COLECCIÓN 1



CENTRO DE COLECCIÓN 2





Materiales y Equipos



Descripción:

Micropipetas, puntas para micropipetas, pajillas.



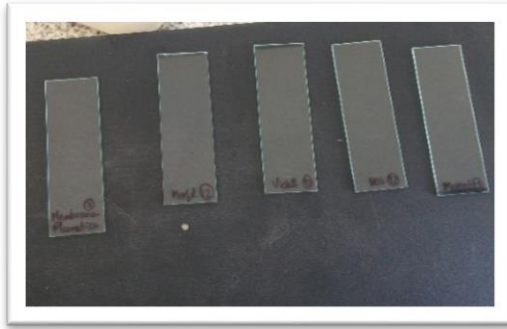
Descripción:

Incubadora



Descripción:

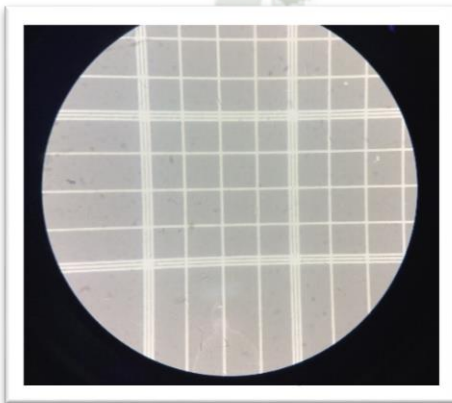
Baño María



Descripción:

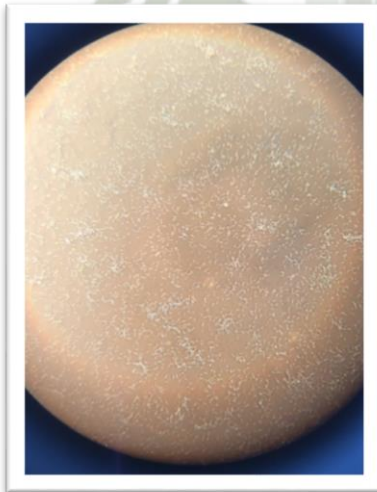
Laminas portaobjetos en platina térmica.

PARAMETROS EVALUADOS



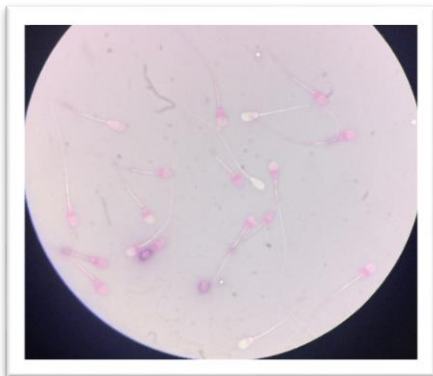
Descripción:

Concentración espermática evaluada en
Cámara de Neubauer.



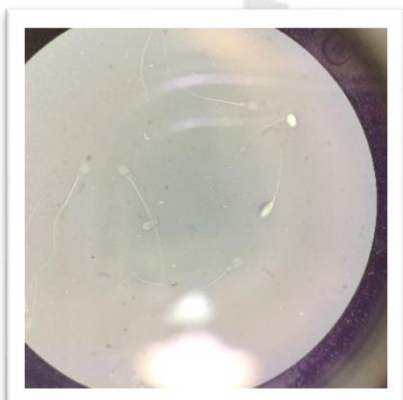
Descripción:

Evaluación de motilidad



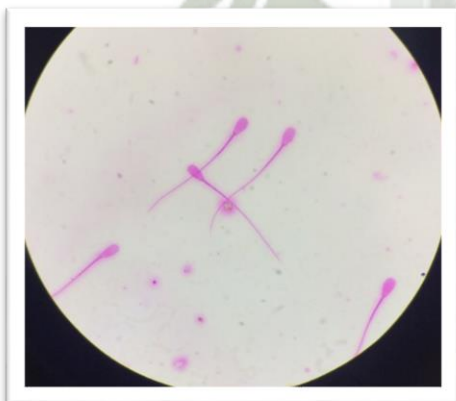
Descripción:

Espermatozoides teñidos con eosina-nigrosina para la evaluación de vitalidad.



Descripción:

Espermatozoides con cola enrollada después del test de HOS para evaluar la membrana plasmática



Descripción:

Espermatozoides teñidos con Rosa de Bengala para evaluación de morfología y acrosoma.



**ANEXO 5
CONSTANCIAS**



Universidad Católica de Santa María

(51 54) 302038 Fax:(51 54) 251213 ucsm@ucsm.edu.pe <http://www.ucsm.edu.pe> Apartado: 1350



CONSTANCIA

El que suscribe, Vicerrector de Investigación de la Universidad Católica de Santa María, hace constar que:

La Srta **GENESIS NARDELLY QUISPE PARI**

Ha participado como tesista de pregrado en el proyecto de investigación "**Determinación de la calidad del semen crio preservado comercial utilizado en hatos lecheros, implicancia en la fertilidad e impacto en variables productivas**" financiado por el Fondo para la Investigación UCSM, durante el año 2017 en laboratorio de investigación "Biotecnología Animal".

Se expide la presente a solicitud de la interesada para los fines que considere pertinentes.

Arequipa, 11 de enero de 2018.



Dr. Genaro H. Dávila Del Campo
VICE RECTOR DE INVESTIGACIÓN
Universidad Católica de Santa María