

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
FACULTAD DE AGRONOMÍA  
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**



**TESIS DE GRADO**

**EFFECTO DE LA REMOCIÓN PARCIAL DEL PLASMA SEMINAL ANTES Y  
POSTCONGELACIÓN SOBRE LA VIABILIDAD DEL SEMEN BOVINO (*Bos taurus*)  
EN LA ESTACIÓN EXPERIMENTAL DE CHOQUENAIRA**

**EDDY RODRIGO JACINTO CONDORI**

**LA PAZ – BOLIVIA**

**2020**

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
FACULTAD DE AGRONOMÍA  
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**

**EFFECTO DE LA REMOCION PARCIAL DEL PLASMA SEMINAL ANTES Y  
POSTCONGELACION SOBRE LA VIABILIDAD DEL SEMEN BOVINO (*Bos taurus*)  
EN LA ESTACION EXPERIMENTAL DE CHOQUENAIRA**

*Tesis de Grado presentado como requisito  
Parcial para optar el Título de  
Ingeniero Agrónomo*

**EDDY RODRIGO JACINTO CONDORI**

**ASESORES:**

M.V.Z. M.Sc. Rene Juan Condori Equice .....

Ing. M.Sc. Juan Jose Vicente Rojas .....

**TRIBUNAL EXAMINADOR**

M.V.Z. P. H. D. Celso Ayala Vargas .....

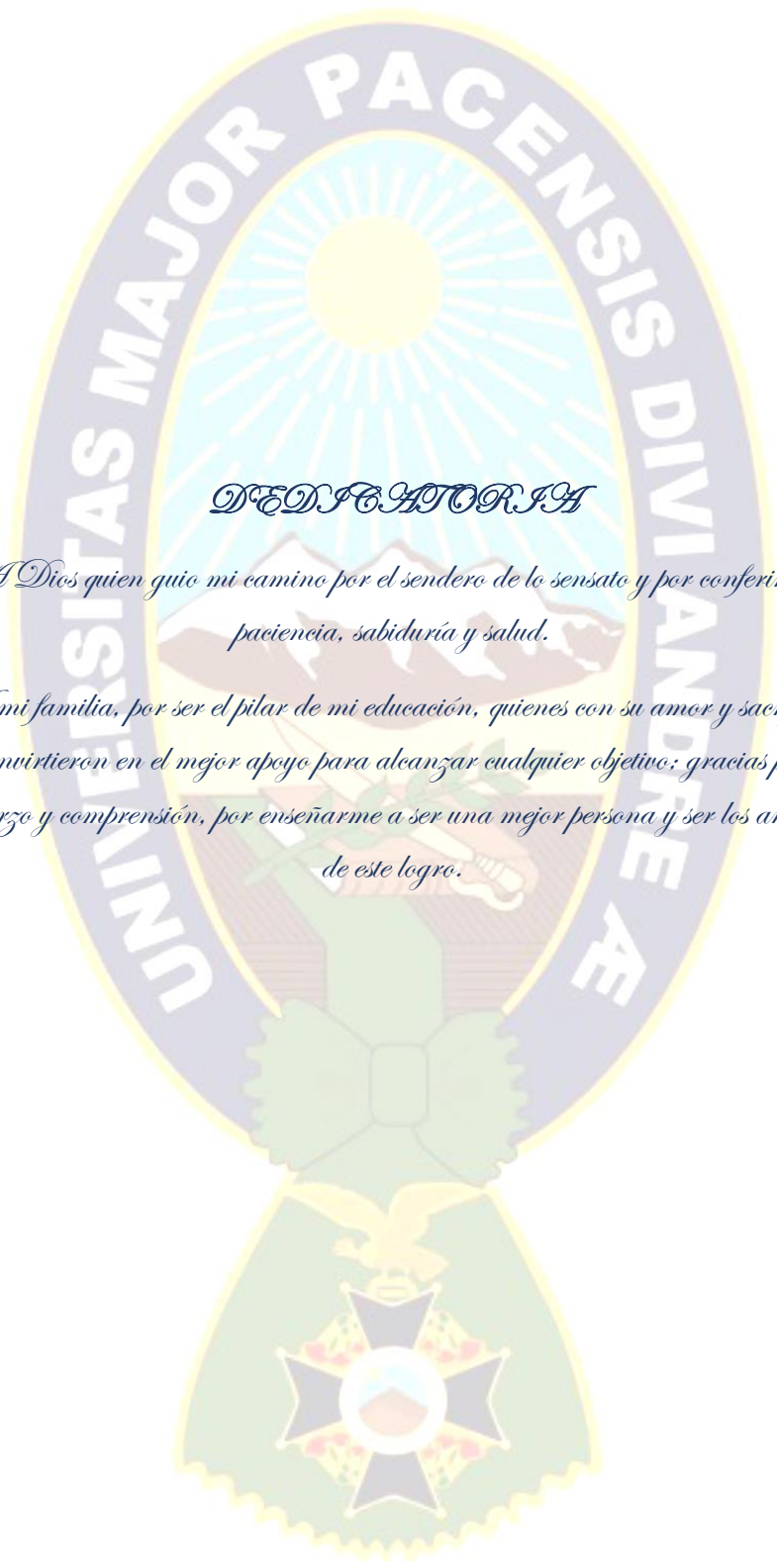
M.V.Z. Rodrigo Juan Aliaga Alvares .....

Ing. Zoot. M.Sc. Patricia Fernández Osinaga .....

**APROBADA**

**PRESIDENTE TRIBUNAL EXAMINADOR** .....

**LA PAZ – BOLIVIA  
2020**



*DEDICATORIA*

*A Dios quien guio mi camino por el sendero de lo sensato y por conferirme  
paciencia, sabiduría y salud.*

*A mi familia, por ser el pilar de mi educación, quienes con su amor y sacrificio  
se convirtieron en el mejor apoyo para alcanzar cualquier objetivo: gracias por su  
esfuerzo y comprensión, por enseñarme a ser una mejor persona y ser los artífices  
de este logro.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecer a Dios por prestarme la vida, ser fuente de inspiración y guía, por permitirme avanzar y culminar de manera exitosa de todos mis propósitos.

A mi casa de estudios superiores, Facultad de Agronomía de la Universidad Mayor de San Andrés, por acogerme en sus aulas durante mi formación académica

A mis estimados docentes por transmitirme sus conocimientos y brindarme una estrecha colaboración.

A la Estación Experimental de Choquenaira, por el préstamo del laboratorio de crío preservación y demás predios, en cuyos ambientes compartí gratos momentos con el personal docente, equipo administrativo y trabajadores quienes me brindaron su sincera amistad.

A mis asesores M.V.Z. Rene Juan Condori Equice e Ing. M.Sc. Juan José Vicente Rojas por brindarme su amistad, apoyo y asesoría constante, que fuero de indispensable utilidad en el desarrollo del presente trabajo.

Asimismo, agradecer al técnico superior en agropecuaria, Eulogio Kantuta Serrano, por su colaboración y paciencia en el proceso de instrucción al interior del laboratorio de crío preservación que me permitió culminar satisfactoriamente el trabajo de investigación.

Al Tribunal Examinador M.V.Z. Celso Ayala Vargas, M.V.Z. Rodrigo Juan Aliaga Alvares y la Ing. Zoot. M.Sc. Patricia Fernández Ojinaga, por la orientación y sugerencias que contribuyeron a la mejora del presente documento.

Un agradecimiento especial a toda mi familia, por su apoyo incondicional, comprensión, paciencia, compañía e infinito cariño brindado durante mi formación en la universidad.

Finalmente, un agradecimiento a mis compañeros y amigos por acompañarme durante el transcurso de todos estos años.

¡Muchas Gracias!

## ÍNDICE GENERAL

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	2
2.1. Objetivo General.....	2
2.2. Objetivos Específicos.....	2
<b>3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	2
3.1. Breve descripción de las razas en estudio .....	2
3.1.1. Raza Holstein .....	2
3.1.2. Raza Pardo Suizo.....	3
3.2. Importancia de la reproducción .....	3
3.3. Condición del Semental.....	4
3.4. Selección del Semental .....	4
3.5. Anatomía reproductiva del macho .....	5
3.5.1. Glándulas Vesiculares .....	5
3.5.2. Próstata .....	6
3.5.3. Glándulas bulbouretrales (De Cowper).....	6
3.5.4. El pene .....	7
3.5.5. Prepucio .....	8
3.5.6. Testículos.....	8
3.5.7. Epidídimo .....	9
3.5.8. Cordón espermático.....	10
3.5.9. Escroto .....	10
3.5.10. Conducto deferente.....	11
3.6. Espermatogénesis.....	11
3.7. El semen .....	12
3.8. El Plasma Seminal (PS) .....	12
3.9. Definición de espermatozoide .....	13
3.10. Estructura del espermatozoide.....	14
3.11. Métodos de colecta de semen.....	15
3.11.1. Método del electro – eyaculador .....	16
3.11.2. Método del masaje .....	17
3.11.3. Método de la vagina artificial (VA) .....	18

3.12.	Evaluación del Semen .....	19
3.12.1.	Evaluación Macroscópica.....	20
3.12.1.1.	Volumen .....	20
3.12.1.2.	Color .....	20
3.12.1.3.	Olor .....	21
3.12.1.4.	pH.....	21
3.12.2.	Evaluación Microscópica .....	21
3.12.2.1.	Motilidad Masal (MM).....	21
3.12.2.2.	Motilidad Individual (MI).....	22
3.12.2.3.	Morfología Espermática.....	24
3.12.2.4.	Concentración .....	25
3.13.	Vitalidad espermática.....	25
3.14.	Tinción vital.....	26
3.15.	Crio preservación.....	27
3.16.	Dilución y adaptación de semen .....	28
3.17.	Envasado del semen bovino.....	28
3.17.1.	Ampollas .....	29
3.17.2.	Pajuelas (Paillettes).....	29
3.17.3.	Pellets (Pastillas) .....	29
3.18.	Crio conservación del semen bovino.....	30
3.19.	Tiempo de equilibramiento.....	30
3.20.	Almacenamiento del semen.....	31
3.21.	Descongelación .....	32
3.22.	Análisis Post – Congelación .....	33
3.22.1.	Motilidad individual .....	33
3.22.2.	Concentración .....	33
<b>4.</b>	<b>MATERIALES Y METODOS .....</b>	<b>33</b>
4.1.	Localización.....	34
<b>4.2.</b>	<b>MATERIALES .....</b>	<b>34</b>
4.2.1.	Material biológico.....	35
4.2.2.	Material de laboratorio .....	35
4.2.3.	Reactivos .....	36
4.2.4.	Material de campo.....	36

4.2.5.	Material de Gabinete.....	36
<b>4.3.</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>36</b>
4.3.1.	Alimentación de los sementales.....	37
4.3.2.	Preparación de los sementales para la colecta del semen.....	37
4.3.3.	Proceso de colección del semen .....	37
4.3.4.	Manejo del semen eyaculado .....	38
4.3.5.	Preparación de los materiales previo a la evaluación seminal.....	38
4.3.6.	Análisis del semen colectado .....	39
4.3.6.1.	Características macroscópicas.....	40
4.3.6.2.	Características microscópicas .....	41
4.3.7.	Centrifugación y dilución del semen.....	43
4.3.8.	Periodo de adaptación a 5 °C.....	45
4.3.9.	Rotulado de pajuelas .....	45
4.3.10.	Envasado del semen.....	45
4.3.11.	Congelado del semen.....	46
4.3.12.	Almacenamiento del semen congelado .....	47
4.3.13.	Descongelación de las pajillas .....	47
4.3.14.	Análisis del semen post congelación.....	47
4.3.15.	Diseño Experimental .....	47
4.4.	Modelo estadístico.....	48
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>49</b>
5.1.	Primera Parte .....	50
5.1.1.	Características macro y microscópicas.....	50
5.1.1.1.	Características macroscópicas.....	50
5.1.1.1.1.	<i>Color del semen fresco</i> .....	50
5.1.1.1.2.	<i>Olor del semen fresco</i> .....	52
5.1.1.1.3.	<i>Volumen del semen fresco</i> .....	53
5.1.1.1.4.	<i>pH del semen fresco</i> .....	54
5.1.1.2.	Características microscópicas .....	55
5.1.1.2.1.	<i>Motilidad masal</i> .....	55
5.1.1.2.2.	<i>Motilidad individual</i> .....	56
5.1.1.2.3.	<i>Concentración de semen fresco</i> .....	58
5.1.1.2.4.	<i>Porcentaje de espermatozoide vivos del semen fresco por toro</i> .....	60

5.1.1.2.5.	<i>Porcentaje de espermatozoide muertos del semen fresco por toro</i>	61
5.1.1.2.6.	<i>Porcentaje de espermatozoides normales del semen fresco por toro</i>	61
5.1.1.2.7.	<i>Porcentaje de espermatozoides anormales del semen fresco por toro</i>	62
5.2.	Segunda Parte	63
5.2.1.	Características microscópicas	63
5.2.1.1.	Motilidad individual con los diferentes tratamientos de reducción parcial de plasma seminal pre congelación (Comparación entre tratamientos)	63
5.3.	Tercera Parte	66
5.3.1.	Características microscópicas	66
5.3.1.1.	Motilidad individual con los diferentes tratamientos de reducción parcial de plasma seminal post congelación (Comparación entre tratamientos)	66
5.4.	Cuarta Parte	68
5.4.1.	Características microscópicas pre y post congelación (Comparación de tratamiento entre toros)	68
5.4.1.1.	Motilidad individual con los diferentes tratamientos de reducción parcial de plasma seminal pre congelación (Comparación de tratamientos entre toros)	68
5.4.1.2.	Motilidad individual con los diferentes tratamientos de reducción parcial de plasma seminal post congelación por toro (Comparación de tratamientos entre toros)	72
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>79</b>
<b>7.</b>	<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>81</b>
<b>8.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>82</b>



## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Escala numérica y descriptiva para determinar la motilidad espermática masal del toro.....	22
Cuadro 2: Clasificación espermática para determinar la motilidad individual del toro ....	23
Cuadro 3: Características macroscópicas de color del semen fresco .....	50
Cuadro 4: Características macroscópicas de olor del semen fresco.....	52
Cuadro 5: Promedios de volumen de semen fresco por toro .....	54
Cuadro 6: Promedios de ph de semen fresco por toro.....	55
Cuadro 7: Promedios de motilidad masal en el semen fresco entre toros .....	56
Cuadro 8: Análisis de varianza de motilidad individual del semen fresco .....	57
Cuadro 9: Promedios de motilidad individual de semen fresco por toro.....	58
Cuadro 10: Promedios de concentración de semen fresco por toro.....	59
Cuadro 11: Promedio de los porcentajes de espermatozoides vivos del semen fresco por toro.....	60
Cuadro 12: Promedios de espermatozoides muertos del semen fresco por toro .....	61
Cuadro 13: Promedio de los porcentajes de espermatozoides normales del semen fresco por toro .....	62
Cuadro 14: Promedio de los porcentajes de espermatozoides anormales del semen fresco por toro.....	63
Cuadro 15: Análisis de varianza de motilidad individual con diferentes tratamientos de reducción de plasma seminal pre congelación (comparación entre tratamientos)...	64
Cuadro 16: Promedios de motilidad individual con diferentes tratamientos de reducción de plasma seminal pre congelación (comparación entre tratamientos) .....	65
Cuadro 17: Análisis de varianza de motilidad individual con diferentes tratamientos de reducción de plasma seminal post congelación (comparación entre tratamientos) .	66
Cuadro 18: Promedios de motilidad individual con diferentes tratamientos de reducción de plasma seminal post congelación (comparación entre tratamientos) .....	68
Cuadro 19: Análisis de varianza de motilidad individual con diferentes tratamientos de reducción parcial del plasma seminal pre congelación por toro (comparación de tratamientos entre toros).....	69

Cuadro 20: Promedios de motilidad individual con diferentes tratamientos de reducción parcial de plasma seminal pre congelación por toro (comparación de tratamientos entre toros) .....	71
Cuadro 21: Análisis de varianza de motilidad individual con diferentes tratamientos de reducción parcial de plasma seminal post congelación por toro (comparación de tratamientos entre toros).....	72
Cuadro 22: Promedios de motilidad individual con diferentes tratamientos de reducción parcial de plasma seminal post congelación por toro (comparación de tratamientos entre toros) .....	75

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Anatomía reproductiva del toro (Hernández, s.f.).....	5
Figura 2: Partes del testículo (Hernández, s.f.) .....	8
Figura 3: Estructura morfológica del espermatozoide (Ordoñez, et al., s.f.).....	14
Figura 4: Estación experimental de choquenaira .....	34
Figura 5: Toro holstein "river" .....	35
Figura 6: Toro holstein "osman" .....	35
Figura 7: Toro pardo suizo "líder" .....	35
Figura 8: Toro pardo suizo "nerón" .....	35
Figura 9: Proceso de colecta del semen .....	38
Figura 10: Tinción vital y frotis de la muestra de semen .....	43
Figura 11: Morfología de los espermatozoides.....	43
Figura 12: Atemperación de los tubos de ensayo .....	44
Figura 13: Centrifugación de las muestras de semen .....	44
Figura 14: Medición para la extracción del plasma seminal .....	45
Figura 15: Periodo de adaptación de las muestras .....	45
Figura 16: Congelado de las muestras de semen .....	46
Figura 17: Promedios de motilidad individual del semen fresco por toro .....	58
Figura 18: Promedios de tratamientos en motilidad individual pre congelación .....	65
Figura 19: Promedios de tratamientos en motilidad individual post congelación .....	68
Figura 20: Promedios de tratamientos en motilidad individual pre congelación por toro	71
Figura 21: Promedios de tratamientos en motilidad individual post congelación por toro .....	75

## RESUMEN

El presente estudio de investigación se llevó a cabo en la Estación Experimental de Choquenaira, perteneciente a la Facultad de Agronomía de la Universidad Mayor de San Andrés, donde se emplearon 2 toros sementales de la raza Holstein y 2 toros sementales de la raza Pardo Suizo con edades 1 año y 7 meses en caso del toro River (Holstein), 4 años y 9 meses en caso del toro Osman (Holstein), 2 años y 5 meses en caso del toro Nerón (Pardo Suizo) y de 2 años y 5 meses en caso del toro Líder (Pardo Suizo).

El objetivo de este estudio fue investigar si la remoción de una parte del plasma seminal en eyaculados diluidos incrementa la viabilidad de las muestras de los sementales bovinos *Bos Taurus*, pre y post congelación.

El estudio se inició con la preparación de los sementales con una dieta basada en heno y silo, seguidamente se tomaron las muestras seminales con la ayuda de una vagina artificial utilizando una vaca como maniquí, a las que se realizó el análisis macroscópico y microscópico.

Posterior a ello, las muestras se dividieron en dos fracciones, una fracción testigo y una fracción experimental a la que se centrifugo (3000 rpm/10 min) y retiro el 40%, 50% y 60% del plasma sobrenadante, seguidamente se homogenizaron las muestras, tanto el testigo como las experimentales que recibieron el mismo manejo de dilución y procesamiento iniciando inmediatamente con la evaluación pre – congelación, para finalmente congelar las mismas en nitrógeno líquido (-196°C) y culminar el trabajo con una evaluación post – congelación.

La remoción parcial del plasma seminal incremento el porcentaje de la viabilidad de las muestras bovinas pre y post congelación en comparación con las muestras testigo, sin embargo se debe de tomar en cuenta que la edad de los animales puede ser un factor importante a tomar en cuenta, ya que al realizar una comparación individual entre animales con los diferentes tratamientos, se puede evidenciar que en las muestras obtenidas de uno de ellos, el más longevo del grupo no tuvo efecto alguno los tratamiento aplicados en las muestras de semen, sobresaliendo entre todos ellos el testigo.

Bajo las condiciones de este estudio, la remoción de una parte del plasma seminal incremento la viabilidad de las muestras de semen bovino en un 10% aproximadamente, considerando que este método podría ser apto dentro de un centro de inseminación artificial, obteniendo así muestras de calidad que posean un porcentaje de preñez alto durante las futuras inseminaciones en bovinos.

## ABSTRACT

This research study was carried out at the Experimental Station of Choquenaira, belonging to the Faculty of Agronomy of the Universidad Mayor de San Andrés, where 2 stallion bulls of the Holstein breed and 2 stallion bulls of the Swiss Brown breed were used at age 1 year and 7 months in case of the River bull (Holstein), 4 years and 9 months in case of the bull Osman (Holstein) , 2 years and 5 months in case of the bull Nero (Swiss Brown) and 2 years and 5 months in case of the Bull Leader (Swiss Brown).

The objective of this study was to investigate whether the removal of a part of seminal plasma in diluted ejaculates increases the chance of freezing them successfully by highlighting the viability of *Bos Taurus bovine stallion samples*.

The study began with the preparation of the stallions with a hay and silo-based diet, then the seminal samples were taken with the help of an artificial vagina using a cow as a mannequin, to which macroscopic and microscopic analysis was performed.

Subsequently, the samples were divided into two fractions, a witness fraction and an experimental fraction to which centrifuge is centrifuge (3000 rpm/10 min) and 40% withdrawal, 50% and 60% of the over natant plasma, the samples were then homogenized, both the witness and the experimental ones that received the same dilution and processing management immediately initiating with the pre-freezing assessment, to finally freeze them in liquid nitrogen (-196°C)) complete the work with a post-freeze evaluation.

Partial removal of seminal plasma increases the percentage of viability of pre- and post-freezing bovine samples compared to witness samples, however it should be noted that the age of animals may be an important factor to consider, since when making an individual comparison between animals with different treatments , it can be shown that in the samples obtained from one of them, the longest of the group had no effect the treatment applied in the semen samples, highlighting among them the witness.

Under the conditions of this study, the removal of a part of the seminal plasma increases the viability of bovine semen samples by approximately 10%, considering that this method could be suitable within an artificial insemination center, thus obtaining quality samples that possess a high pregnancy percentage during future inseminations in cattle.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las implicaciones económicas de la producción de especies como la bovina y la porcina son las más estudiadas en el terreno de la fisiología reproductiva y biología del espermatozoide.

La ganadería bovina exige una producción con eficiencia que permite tener una relación beneficio-costo adecuado, lo que se logra optimizando los índices reproductivos de los hatos.

El aumento en la producción ganadera en países como Canadá y el Reino Unido se deben, principalmente, al mejoramiento genético en un 50% a través del uso de la Inseminación Artificial (IA), y el otro 50% al mejoramiento de factores como la salud, nutrición, sitios de pastoreo y administración.

La ganadería bovina es una de las principales áreas productivas pecuarias y las estrategias de su conservación, mejoramiento y producción a pequeña o gran escala conllevan un manejo adecuado del germoplasma que asegura las características de las razas de interés económico y cultural, una de ellas es el procesamiento de semen.

La mejora genética de las razas bovinas necesita el conocimiento previo de su variabilidad genética, para aplicar los métodos que aseguren un progreso genético máximo, siendo el potencial de crecimiento uno de los factores más importantes.

Por ello la IA es un proceso asistido de reproducción importante en el mejoramiento genético de los bovinos para mejorar la productividad y ser competitivos en el mercado. Su procedimiento consiste en depositar una dosis de semen en el tracto reproductivo de la hembra que permite propagar las buenas cualidades observadas en un macho reproductor. Un semental bovino puede preñar anualmente hasta 80 hembras, pero gracias a la IA teóricamente es posible obtener hasta 14,000 crías anuales

Hasta ahora, parámetros espermáticos tales como la concentración, motilidad y morfología eran los únicos que se tenían en cuenta a la hora de evaluar un eyaculado. No obstante, la capacidad fertilizadora conlleva otra serie de características tales como el estado de capacitación del espermatozoide con el fin de conseguir óptimos resultados de fertilización.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo General**

- Valuar el efecto de la remoción parcial del plasma seminal antes y post - congelación sobre la viabilidad del semen bovino en la Estación Experimental de Choquenaira.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Distinguir macroscópicamente el volumen, color, pH y olor del semen bovino antes de la remoción del plasma seminal.
- Distinguir microscópicamente la concentración, morfología y motilidad masal e individual del semen bovino antes de la remoción del plasma seminal.
- Determinar microscópicamente la motilidad individual después de la remoción parcial del plasma seminal pre y post congelación.

## **3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **3.1. Breve descripción de las razas en estudio**

#### **3.1.1. Raza Holstein**

Se originó en dos provincias septentrionales de Holanda: Frisia Occidental y país bajo del Norte o North Holland. Existe la Holstein frisón originaria de Holanda, ZuiderZee y la

Holstein friesian de origen americano. La holandesa es la más pesada de las razas “Lecheras”, presenta dos variantes en cuanto a color de pelaje, el pinto blanco con negro y el blanco con rojo, es una raza de cuerpo anguloso y amplio con una ubre de gran capacidad que es la más productiva de todas las razas lecheras (Marquez, 2013).

Las hembras adquieren un peso promedio de 600 y 700 kg y los machos entre 900 y 1000 kg. La producción promedio varía entre 13 y 27 kg de leche por día con un porcentaje de grasa que va desde los 3.3 a 3.6 % (Marquez, 2013).

### **3.1.2. Raza Pardo Suizo**

Originario de la parte media oriental del país Helvético, posee un pelaje color ceniza con tendencia al pardo castaño, moreno oscuro al moreno claro. Los adultos son fuertes y de buen peso, las vacas pueden pesar de 600 a 700 kg y de 950 a 1000 kg los toros, pero existe ejemplar de ambos sexos con más peso. Su producción de leche es de 16 kg por día en promedio con un 4% de grasa en su contenido, la duración de la lactancia varía entre 337 y 375 días, con un intervalo de partos de 430 días aproximadamente (Marquez, 2013).

## **3.2. Importancia de la reproducción**

Según Mamani (2007), la reproducción es el proceso fundamental de los animales que posibilitan la perpetuación de las especies dando origen a otros seres semejantes a ellos, además, es un eslabón importante para proporcionar alimento al hombre y herramientas básicas en el mejoramiento genético.

Al respecto para Cavestany y Mendez (1993), el manejo reproductivo es importante en la producción ganadera por requerir el conocimiento de la fisiología animal, sus capacidades genéticas y la adecuación al ambiente para utilizar su potencial de producción.



Es posible predecir el valor de cría de cada animal con mayor certeza y mejorarlo a través de decisiones genéticas que incluye la selección del par reproductivo, su apareamiento en época y duración elegidas, planificación de los cuidados en la gestación y el parto, el registro del comportamiento de cada animal y su clasificación de acuerdo a las necesidades fisiológicas y nutritivas (Cavestany y Mendez, 1993).

### **3.3. Condición del Semental**

Para incorporar un semental a los programas de colección de semen se debe tomar en cuenta la edad, raza y peso del reproductor. El peso sigue siendo un buen indicador del estado de salud del animal y cuando no es posible pesarlo en la finca, la estimación de su condición corporal pasa a ser un buen indicador. Para mantener saludable a los animales se les debe proporcionar un ambiente adecuado, en cuanto a temperatura, luz y espacio suficiente para desplazarse, además de una alimentación balanceada y los controles sanitarios debidamente establecidos (Vera y Muñoz, 2005).

Una vaca eficiente produce un becerro por año, el toro es capaz de producir un mayor número de crías en el mismo lapso y más si el semen se diluye, preserva y aplica artificialmente. Se estima que el toro aporta un 80% de la carga genética del hato, ahí la importancia de asegurar la capacidad de preñar a las hembras (Sánchez, 1999).

### **3.4. Selección del Semental**

Un semental adecuado debe reunir las mejores características corporales y genéticas respecto a otros de su misma especie. Dentro de su tipo debe tener buen desarrollo, prueba de su precocidad y buena crianza (Pelayo, 1958).

Según Pelayo (1958), cuando se pretende la producción de animales de trabajo es muy importante un pecho amplio y costillas que se separen bien en la inspiración, cabeza erguida, cuernos iguales y bien insertos, cuello y extremidades fuertes y musculados, gran esqueleto que dé sensación de resistencia, buenos aplomos que le permitan andar

regularmente, pezuña dura pero no demasiado grande y que se siente en el suelo de forma regular.

En el caso de animales para carnicería es preferible un toro precoz que muestre carne de primera calidad extremidades y cuello corto, cabeza pequeña, cuerpo largo, corpulento, esqueleto reducido y temperamento apacible (Pelayo, 1958).

Finalmente, para la producción de leche el animal debe tener viveza, cuernos cortos, piel fina al igual que las extremidades, amplio cuarto posterior, extremidades bien separadas y paralelas; cualidades de las mejores lecheras (Pelayo, 1958).

### 3.5. Anatomía reproductiva del macho

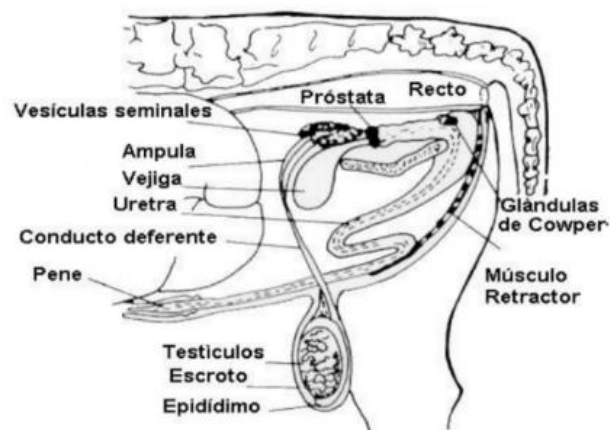


Figura 1: Anatomía reproductiva del toro (Hernández, s.f.)

#### 3.5.1. Glándulas Vesiculares

Según Gloobe (1989), las glándulas vesiculares (un par) tienen forma alargada y superficie lobulada, miden de 10 a 12 cm, palpables a la exploración rectal, las extremidades libres están situadas dorsalmente con respecto al cuello de la vejiga, lateralmente con respecto a los uréteres y a las ampollas del ducto deferente en la plica urogenital, desembocan con el conducto deferente en un ducto llamado conducto

eyaculador, este último penetra por la próstata y desemboca en el origen de la uretra pélvica en una abertura dorsal llamada cóliculo seminal.

La pared de la glándula contiene fibras musculares lisas que se contraen durante la eyaculación para expulsar la secreción glandular, si el toro ha sido castrado antes de la pubertad, las glándulas vesiculares lo mismo que otras glándulas genitales accesorias, no se desarrollan. Si la castración se hace después de la pubertad, las glándulas se atrofian (Gloobe, 1989).

### **3.5.2. Próstata**

De acuerdo a Gloobe (1989), la próstata es una glándula impar bilobulada. Su porción dorsal está situada en la pared dorsal de la uretra pélvica inmediata y caudalmente con respecto a las glándulas vesiculares. La otra parte es la porción diseminada que esta dispersa en la pared dorsal uretral cubierta por el musculo uretral, los ductos prostáticos desembocan en la uretra por numerosos conductos.

La secreción prostática es alcalina y da al semen un olor característico. Por vía rectal, una mano experta puede palpar la porción dorsal de la glándula, esta particularidad se aprovecha para la recolección del semen con el eyaculador eléctrico (Gloobe, 1989).

### **3.5.3. Glándulas bulbouretrales (De Cowper)**

Según Gloobe (1989), son un par de glándulas de forma esférica, cubiertas por la porción inicial del músculo bulboesponjoso y debido a que el músculo es grueso, las glándulas no son palpables en forma rectal. Las glándulas están situadas en la parte dorsal de la uretra pélvica, inmediatamente antes del arco isquiático, cada glándula bulbouretral tiene el tamaño aproximado de la parte final de la extremidad del dedo de una persona, cada una de ellas desemboca, por medio de un conducto excretor, debajo de un pliegue de la mucosa uretral que forma un divertículo de fondo ciego.

Las glándulas genitales accesorias aseguran la motilidad y la vida de los espermatozoos después de la eyaculación. El semen del toro contiene 2 a 8 ml de volumen por cada salto, un milímetro cúbico contiene cerca de un millón de espermatozoos. A efectos de la inseminación artificial, se considera también la apariencia y vitalidad de los espermatozoos en el juicio de evaluación, la irrigación de las glándulas accesorias está dada por ramas de la arteria prostática (Gloobe, 1989).

#### **3.5.4. El pene**

De acuerdo a Gloobe (1989), el pene es el órgano copulador del macho, compuesto por tejido eréctil, músculos y uretra, se divide en raíz, cuerpo y extremidad libre, tiene forma delgada, cilíndrica, alargada y dura, está rodeado por la túnica albugínea que es un tejido fuerte y grueso, los espacios que dejan los tabiques están rellenos de tejido cavernoso que se extiende a lo largo de toda la longitud del pene y forma el cuerpo cavernoso, presenta una flexión en forma de "S", llamada flexura sigmoidea, localizada en el punto donde el cordón espermático se cruza con el pene.

En estado de erección los 30 cm de esta flexura desaparecen debido a la proyección de la extremidad libre del pene fuera del prepucio, en la primera edad, la flexura sigmoidea no existe, ésta aparece a los tres meses de edad. Durante la excitación sexual (erección) el cuerpo cavernoso se llena de sangre, proveniente de ramas de la arteria profunda del pene, dichas ramas arteriales son capaces de modificar su volumen y en la excitación sexual, se dilatan de tal modo que permitan a la sangre pasar a los espacios cavernosos, contribuyendo a enderezar la flexura peneana, la extremidad del pene termina en un glande poco desarrollado, el cual es más suave por tener poco tejido eréctil (Gloobe, 1989).

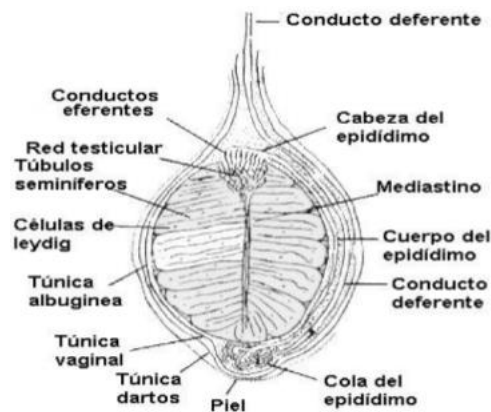
A la vez el drenaje se reduce mucho debido a la presión que sufren las venas a través de la túnica albugínea, después de la eyaculación las arterias regresan al estado normal con la consiguiente reducción del flujo sanguíneo, los músculos lisos del tejido cavernoso se

contraen y facilitan la salida de la sangre y de ese modo el pene regresa al estado normal (Gloobe, 1989).

### 3.5.5. Prepucio

El prepucio es un pliegue invaginado de piel que rodea la extremidad libre del pene a manera de manguita, la superficie externa está formada por una capa prepucial y otra peneana. El orificio del prepucio es de 3 cm de ancho y está en la línea mediana, caudalmente con respecto al ombligo, posee un musculo prepucial craneal o protractor y otro caudal o retractor y también músculos cutáneos. El frénulo del prepucio continua con el rafe del pene que pasa oblicuamente por el lado derecho del pene distal (Gloobe, 1989).

### 3.5.6. Testículos



**Figura 2: Partes del testículo (Hernández, s.f.)**

Según Porras y Páramo (2009), los testículos se encuentran en una bolsa de piel llamada escroto que protege y regula la temperatura, tienen una función endocrina (producción de andrógenos) y una exocrina (producción de espermatozoides).

Al respecto Angelino (2009), indica que los testículos están rodeados por dos capas serosas, la túnica albugínea y la túnica visceral, que es una extensión del peritoneo que pasa por el canal inguinal y dentro de esta pasan vasos y nervios.

De la túnica albugínea, emergen los túbulos seminíferos, que agrupándose conforman la red testis, estos representan el 80% del peso de los testículos y contienen espermatozoides que son las células germinales, las cuales se dividen y diferencian formando los espermatozoides (Angelino, 2009).

Las células de Sertoli con la estimulación de FSH, producen proteínas fijadoras de andrógenos. Los túbulos a su vez tienen a su alrededor a las células de Leydig estimuladas por la LH, las cuales son las encargadas de la producción de hormonas (Angelino, 2009).

Según Hafez y Hafez (2002), indica que un funcionamiento correcto de los testículos debe tener una temperatura de 1 a 4 °C menor que el resto del cuerpo. La piel del escroto posee glándulas sudoríparas y el musculo dartos le permite alejar o acercar los testículos del cuerpo según la temperatura ambiental.

### **3.5.7. Epidídimo**

Para Hafez y Hafez (2000), el epidídimo en el bovino es un tubo de 36 metros, envuelto en un saco de tejido conectivo, donde ocurre la maduración y almacenamiento de los espermatozoides.

Por otra parte, y de acuerdo con Ortíz (1999); Porras y Páramo (2009), el epidídimo se divide en: cabeza, cuerpo y cola. En la cabeza se encuentran los conductos deferentes que se unen al conducto epididimario, su función es absorber fluidos y solutos del lumen. Los espermatozoides en esta región son inmaduros e infértiles. El transporte de los espermatozoides por el epidídimo es de nueve a catorce días (Hafez y Hafez, 2000).

El cuerpo del epidídimo tiene una función de secreción y es la región donde termina la maduración de los espermatozoides (Ortíz, 1999).

La cola es el órgano principal donde se almacenan los espermatozoides los cuales conservan gran cantidad fecundante por algunas semanas. La cola continua en el conducto deferente, el cual se une al cordón espermático para conducir el semen a la uretra (Hafez y Hafez, 2000).

### **3.5.8. Cordón espermático**

El cordón espermático comienza en el anillo inguinal profundo formado el: conducto deferente, arteria y vena deferente, arteria y vena testicular, vasos linfáticos y plexo autónomo. La vena testicular forma el plexo pampiniforme alrededor de la arteria. El cordón espermático pasa en el canal inguinal junto con los nervios ilioinguinal y genitofemoral, túnica vaginal y musculo cremáster (Rutter y Russo, 2006).

### **3.5.9. Escroto**

Para Gloobe (1989), el escroto es un saco situado entre los muslos, colgado de la región inguinal, se define como una evaginación saquiforme de los distintos planos o capas de la pared abdominal, los cuales son piel y dartos, también forma el septo que divide la cavidad en dos, una para cada testículo, la posición coincide con el rafe visible externamente, deriva del musculo abdominal externo. Las demás capas son: fascia escrotal, que deriva del musculo oblicuo abdominal interno, túnica vaginal parietal, túnica vaginal visceral.

Las túnicas vaginales tienen su origen en el peritoneo, por la evaginación del testículo se forman dos capas, parietal y visceral. La parietal tapiza la cavidad del escroto y la visceral reviste el testículo y el epidídimo, entre ambas hojas existe una cavidad virtual (Gloobe, 1989).

El musculo cremáster contribuye a la regulación de la temperatura de modo que levanta el escroto durante el frio y lo baja cuando hace calor. La parte inferior del escroto tiene la forma de los testículos y está marcado por un surco extremo que corresponde al septo

interno. Dorsalmente el escroto forma un cuello constricto que se conecta a la pared abdominal entre los forámenes inguinales externos y un poco caudalmente con respecto a ellos (Gloobe, 1989).

### **3.5.10. Conducto deferente**

Son conductos que inician en la cola del epidídimo. Al inicio presenta circunvoluciones y corren hacia arriba paralelos al cuerpo del epidídimo; cerca de la cabeza de este son rectos y forman, con la capa muscular gruesa y los vasos sanguíneos, linfáticos y nerviosos, el cordón espermático que pasa a través del canal inguinal a la cavidad abdominal. Los dos vasos deferentes se van a juntar encima de la vejiga, engrosándose gradualmente para formar las ampollas seminales. Sirven de paso a los espermatozoides (Cabrera y Gutierrez, 2010).

La porción abdominal del conducto deferente puede ser palpada en craneal de las ampollas y se dirige hacia latero distal para pasar por el trayecto inguinal a través del anillo inguinal interno. La ausencia congénita raramente ocurre y es la única anomalía clínicamente detectable (Rutter y Russo, 2006).

### **3.6. Espermatogénesis**

Es el proceso biológico de la transformación gradual de las células germinales en espermatozoides durante un periodo de tiempo dentro de los límites de los túbulos seminíferos de los testículos, este proceso involucra la proliferación celular por divisiones mitóticas, duplicación de cromosomas, recombinación genética, reducción y división meiótica, hasta producir espermátides haploides y la diferenciación terminal de las espermátides en espermatozoides (Knobil y Neil, 2003).

La espermatogénesis toma aproximadamente de 64 a 74 días para la formación de espermatozoides y de 14 a 18 días para que el espermatozoide viaje a lo largo del epidídimo (lugar de acumulación y maduración final de los espermatozoides). Por tanto, los



síntomas de infertilidad del toro se presentarán dos y medio a tres meses luego de que el proceso de formación de espermatozoides ha sido afectado (Sanchez, 2003).

La espermatogénesis puede ser afectada por factores como el incremento de la temperatura escrotal que puede ocurrir por procesos de inflamación, fiebre, o temperatura ambiental muy elevada. Cuando se afecta la espermatogénesis todos los estadios de espermatogonias mueren, las espermatídes sufren anomalías estructurales y metabólicas, disminuye la proporción de espermatozoides vivos y progresivos móviles, y se incrementan las atipias por defectos de cabeza principalmente (Setchell, 1998).

### **3.7. El semen**

Según Deutscher (2010), indica que el semen está formado por los espermatozoides y el plasma seminal. El volumen del semen y el número de espermatozoides eyaculado, varía según los toros, sin embargo, la mayoría eyacula entre 3 y 5 cm<sup>3</sup> de semen que contiene alrededor de mil millones de espermatozoides por centímetro cúbico, o sea entre 3 y 5 mil millones de espermatozoides por eyaculado.

Una vez que los animales llegan a la madurez, la producción de espermatozoides continúa a lo largo de su vida reproductiva, en los períodos de descanso sexual, los espermatozoides viejos en el epidídimo mueren, degeneran y son absorbidos. Por esta razón la primera muestra obtenida después de un largo período de inactividad sexual contiene un alto porcentaje de espermatozoides muertos y anormales, por tanto, la evaluación del semen no se debe hacer con una única colecta (Deutscher, 2010).

### **3.8. El Plasma Seminal (PS)**

El plasma seminal (PS) es el medio líquido en el cual los espermatozoides se encuentran inmersos, producido por una mezcla de las secreciones procedentes del epidídimo y las glándulas sexuales accesorias con una composición muy heterogénea como: agua, lípidos, ácidos grasos, inmunoglobulinas, sustancias hormonales, iones inorgánicos,

azúcares, sales orgánicas, enzimas y proteínas, las cuales sirven como tampón, mantienen la osmolaridad adecuada y un pH cercano a 7, además de proporcionar fuentes de energía para su metabolismo (Hafez y Hafez, 2002).

El PS funciona como regulador de procesos que ocurren tanto a nivel espermático como a nivel del tracto genital de la hembra y fecundación. Estas funciones se refieren a la nutrición, protección, regulación de la motilidad y capacitación de los espermatozoides, así como el reconocimiento y unión entre gametos (Hafez y Hafez, 2002).

Las glándulas sexuales accesorias producen la mayor parte del volumen del eyaculado, los compuestos secretados son: zinc, ion calcio, azúcares (fructosa, inositol, ácido cítrico, ácido ascórbico), aminoácidos (ácido glutámico, carnitina, taurina, hipo taurina) y enzimas (proteasas, acrosina, nucleasas, fosfatasa acida y alcalina y superóxido dismutasa) (Hafez y Hafez, 2002).

Las sustancias producidas por las glándulas sexuales accesorias son específicos, por ello, varía la composición del PS según la especie y es altamente variable entre individuos de una misma especie, inclusive entre eyaculados de un mismo individuo, esto último debido a procesos patológicos, estación del año o estado fisiológico del animal. (Perez, et al., 2001; Strzezek, et al., 2005; Cardozo, et al., 2006 ).

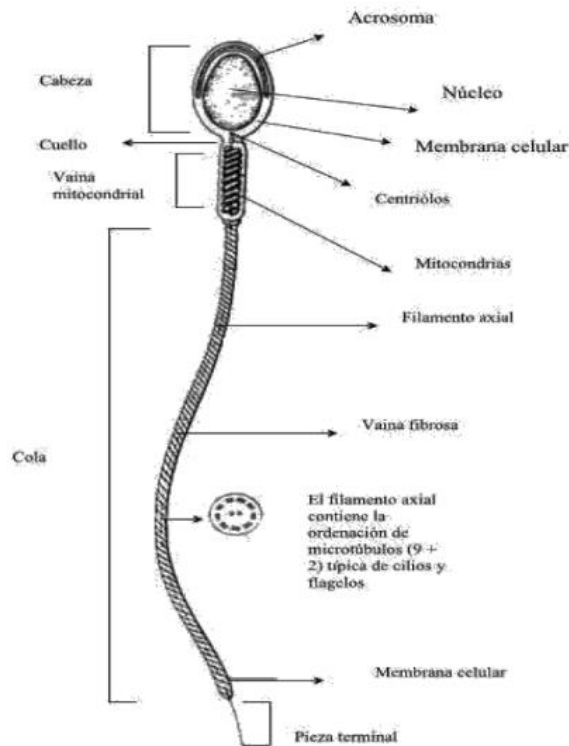
Por lo que se sugiere la presencia de factores beneficiosos para la fertilidad en el fluido de las glándulas sexuales accesorias de machos de alta fertilidad, o de factores inhibidores de la fertilidad en los machos con baja fertilidad (Moura, et al., 2006).

### **3.9. Definición de espermatozoide**

Los espermatozoides son gametos masculinos que se forman en los túbulos seminíferos de los testículos, son células alargadas consistentes con cabeza aplanada portadora de núcleo y una cola que es el aparato necesario para la motilidad celular (Valenzuela, 2009).

Al respecto Montero (2008), menciona que un espermatozoide es una célula haploide que constituye el gameto masculino que se forman en el interior de los testículos. Las paredes de estos túbulos se encuentran tapizadas de espermatogonias, las cuales se dividen primero mitóticamente y luego por meiosis para originar las células haploides, llamadas espermátidas, que por diferenciación (espermioogénesis) se convierten finalmente en espermatozoides.

### 3.10. Estructura del espermatozoide



**Figura 3: Estructura morfológica del espermatozoide (Ordoñez, et al., s.f.)**

Los espermatozoides maduros son células alargadas consistentes de una cabeza aplanada portadora del núcleo y una cola que contiene el aparato necesario para la movilidad celular, además de estar cubiertas en su totalidad por la membrana plasmática. El extremo anterior del núcleo espermático está cubierto por el acrosoma, un delgado

saco membranoso de doble capa estrechamente adherido al núcleo durante las últimas etapas de la formación del espermatozoide en el testículo (Muños, 2011).

Esta estructura en forma de casquete contiene varias enzimas hidrolíticas incluyendo proacrosina, hialuronidasa, esterases y ácido hidrolasa, que participan en el proceso de fecundación, un cuello une la cabeza del espermatozoide con la cola (flagelo) la cual se subdivide en los segmentos medio, principal y caudal (Muños, 2011).

El espermatozoide es una célula alargada especializada cuya única función es fertilizar al ovocito, está formada por tres componentes principales: cabeza, cuello y cola (Hafez y Hafez, 2002; McDonal, 1978).

En la cabeza del espermatozoide se encuentra el núcleo celular y el acrosoma. El núcleo es ovalado, aplanado, y la cromatina está compactada y conformada por ADN unido a histonas espermáticas (Salisbury, et al.,1961; 1978).

El cuello del espermatozoide es una estructura corta (0.4 – 1.5 micrones de largo) ubicada entre la cabeza y la pieza intermedia. Tiene un centriolo rodeado de 9 fibras periféricas orientadas longitudinalmente que se continúan con las fibras exteriores de la pieza intermedia (Salisbury, et al.,1961; 1978).

La cola del espermatozoide está dividida en 3 partes bien diferenciadas: la pieza media, la pieza principal y la pieza terminal. Con todos sus componentes mide 45-50 micrones de largo (Salisbury, et al.,1961; 1978).

### **3.11. Métodos de colecta de semen**

Los métodos para colectar semen pueden ser mediante el uso de electro eyaculadores, vaginas artificiales, o manualmente mediante el masaje de vesículas seminales y glándulas anexas a través del recto (Brogliatti y Bó, 2018).

### **3.11.1. Método del electro – eyaculador**

Para Brogliatti y Bó (2018), la colección con electro eyaculador permite extraer semen a toros sin previo acostumbramiento, esto es de suma importancia para la evaluación de los toros a campo, donde la colección de semen se puede realizar en la manga en el mismo momento del examen clínico.

Por su parte Rangel (2007), indica que en este método se hace uso de un electro eyaculador que es un electrodo conectado a una batería que genera estimulaciones rítmicas provocadas por descargas no mayores a 20 voltios.

Sin embargo, Angelino (2009), indica que los electros eyaculadores estimulan los nervios pélvicos simpáticos y para simpáticos con impulsos de bajo voltaje y amperaje que induce a la erección peneana y a la eyaculación, y que un sistema de electro eyaculación se compone de: la caja de transporte, la sonda rectal, la unidad de control, el cargador de batería, el cable de energía, el cable de conexión de la sonda, el mango, el cono y el envase de colección.

Al respecto Duarte (2008) y Cancio (2009), mencionan que la técnica de electro eyaculación consiste en dar pulsos eléctricos leves en la próstata y vesículas seminales para que el animal presente erección y eyaculación.

Por su parte Morillo, et al., (2012), indican que, manejando el electro eyaculador, la eyaculación es un proceso bifásico, donde primero ocurre la emisión y continúa con la erección y la eyaculación propiamente dicha. Al producir la estimulación adecuada, esta viaja vía nervio pudendo interno hacia los centros lumbo sacros de la columna vertebral, desde allí parte la respuesta vía nervios simpáticos lumbares (nervio erigente del plexus hipogástrico) que estimula la contracción de la musculatura lisa que recubre la próstata, glándulas vesiculares y conductos deferentes, asegurando la progresión de la masa espermática hacia la uretra pélvica (emisión).

La respuesta nerviosa viaja vía nervios parasimpático que provoca la contracción de la musculatura estriada del tracto uretral (músculo isquio cavernoso, bulbo esponjoso y uretral) que resulta en la erección del pene y la eyaculación propiamente dicha. Antes de la utilización del electro eyaculador se procede a la preparación del animal, que incluye recortar los pelos del orificio prepucial y limpiarlo además de lavar y secar cuidadosamente el área, paralelamente se procede a limpiar el recto y a estimular mediante masaje trans rectal las glándulas accesorias (glándulas vesiculares y ampollas de los conductos deferentes) para finalmente introducir el electrodo adecuado (Morillo, et al., 2012).

La estimulación debe ser considerada a través de la respuesta del toro y no prestando atención al voltaje del aparato, la primera estimulación debe ser pequeña hasta que el toro muestre una respuesta mínima. Las estimulaciones sucesivas se incrementan de a poco, deben durar uno o dos segundos luego deben discontinuarse por medio segundo antes de comenzar con la siguiente estimulación (Brogliatti y Bó, 2018).

El fluido pre seminal no debe ser colectado ya que lleva a falsos resultados. Cuando el fluido se pone más espeso y opaco comienza la colección en el cono o en el tubo de examinación colocando directamente en el pene. El fracaso en la colecta con este método puede residir en una técnica defectuosa, equipo inadecuado o escaso descanso sexual de los toros (Brogliatti y Bó, 2018).

### **3.11.2. Método del masaje**

La colección de semen por el método del masaje tiene algunas desventajas y no es práctico en todas las situaciones, estas pueden ser la irritación de la mucosa rectal por la excesiva frotación manual, falta de protrusión del pene que resulta en colecciones contaminadas, necesidad de una segunda persona para la colección de la muestra, dificultad de estimular toros excitados o de mal carácter, y el número limitado de toros a los que se realiza la colecta en un tiempo determinado, dado que el procedimiento es agotador para la persona que realiza el masaje (Brogliatti y Bó, 2018).

Para realizar la técnica se debe introducir la mano en el recto examinando las glándulas accesorias y los anillos inguinales donde se aplica un masaje longitudinal de atrás hacia adelante sobre las ámpulas, la próstata y la uretra. Cuando el músculo de la uretra comienza las contracciones el operador debe masajear en sincronía con ellas hasta que la muestra sea colectada, si el brazo del operador se agota el otro brazo puede ser introducido en el recto y continuar con el procedimiento, si no se colecta semen luego de 2 o 3 minutos, es poco probable que el procedimiento sea exitoso (Brogliatti y Bó, 2018).

### **3.11.3. Método de la vagina artificial (VA)**

La colección de semen con vagina artificial (VA) es usada por los centros de inseminación artificial, es de utilidad para evaluar toros que no producen semen o son muestras muy pobres por el método del electro eyaculador, las personas interesadas o centros de inseminación, prefieren comprar animales acostumbrados a ser colectados con vagina artificial (Brogliatti y Bó, 2018).

Los toros seleccionados para la colecta con vagina artificial deben ser mansos, de bozal y entrenados con mocheta, el animal de monta debe estar sujeto en un brete angosto de lados. Los toros que no están acostumbrados a servir en vagina artificial pueden necesitar una vaca en estro para que el procedimiento sea exitoso, como alternativa una hembra sedada (xilacina, 0.03 mg/kg) sujeta en el brete de monta puede facilitar la colección (Brogliatti y Bó, 2018).

La vagina artificial se prepara llenando la camisa interna con agua caliente a una temperatura entre 42-50 °C, se agregar aire para incrementar y simular la presión de la vagina artificial, finalmente, ésta es lubricada con gel estéril no espermicida (Brogliatti y Bó, 2018).

Cuando el toro realiza la monta, el operador debe estar atento para dirigir el pene a la apertura de la VA, el pene nunca debe ser manejado directamente sino desde el prepucio,

la vagina artificial no debe ser empujada sobre el pene ya que el toro hará movimientos de búsqueda que deben permitirse para que empuje dentro de la vagina artificial, hasta lograr que el toro realice un empuje extremadamente vigoroso llamado golpe de Riñón (Brogliatti y Bó, 2018).

### **3.12. Evaluación del Semen**

El conocimiento de la fertilidad o de la capacidad fecundante de cada toro es uno de los principales objetivos en la producción de semen bovino. De una cuidadosa valoración de la fertilidad dependerá la utilización futura del material seminal y el grado de aprovechamiento de los eyaculados obtenidos a lo largo de su vida reproductiva. Es decir, las dosis producidas por eyaculado están en función del nº de espermatozoides viables y, en definitiva, de su mayor o menor rentabilidad. (Almela Veracruz, 2014)

Muchos investigadores en el área de la reproducción animal están tratando de diseñar el “análisis seminal ideal”, que valore adecuadamente y prediga la fertilidad de una muestra seminal. El análisis de semen ideal sería aquel que de forma sencilla y eficaz permitiera predecir la capacidad fecundante de un eyaculado concreto. Las cualidades que deben tener los espermatozoides de un eyaculado fecundante son: motilidad progresiva, morfología normal, metabolismo energético activo, capacidad para desarrollar una motilidad hiperactivada, integridad estructural y funcionalidad de la membrana, integridad de las enzimas asociadas con la fecundación, capacidad de penetración y transferencia óptima del material genético. (Hidalgo - Ordoñez, Tamargo, y Diez, 2005)

Cabe destacar que hasta el momento no se ha conseguido un método de evaluación seminal *in vitro*, que al utilizarlo solo o en combinación con otros sea capaz de predecir de forma segura la capacidad fecundante de una muestra de semen. Por ello, para considerar a un toro como apto desde el punto de vista reproductivo, asumiendo que es un animal clínicamente sano, este debe cumplir con tres requisitos básicos: buena libido, buen estado clínico reproductivo y buena calidad espermática. La evaluación del semen



es un elemento importante para la certificación de la aptitud reproductiva en un toro. (Garcia, 2013)

### **3.12.1. Evaluación Macroscópica**

La primera evaluación a realizar es la macroscópica, consta de los siguientes pasos:

#### *3.12.1.1. Volumen*

Se mide directamente en el tubo colector cónico, que esta graduada de 1 a 15 ml, se observa la graduación y se anota la cantidad en ml, el volumen de los eyaculados de toros es un parámetro que presenta una baja repetitividad, ya que este depende de la edad y condición del animal, factores ambientales y destreza del operario. El volumen de cada eyaculado disminuye con las frecuencias de recogida a lo largo de cada extracción. (Hafez y Hafez, 2000)

#### *3.12.1.2. Color*

Generalmente el color del semen bovino es de color blanco marfil, las muestras más densas serán de color y aspecto más cremoso, mientras que las más diluidas serán de aspecto lechoso y hasta completamente claro y transparente. En algunos toros se pueden observar eyaculados de color amarillento o amarillo limón; esto corresponde a un pigmento llamado riboflavina, aminoácidos y carotenos que se produce en las glándulas seminales y que es inocuo. (Almela Veracruz, 2014)

También se puede observar una coloración rojiza, la cual indica la presencia de sangre fresca, mientras que un color pardo señala la presencia de sangre más vieja, una coloración gris indica suciedad, mientras que los eyaculados con muy pocos espermatozoides tienen una coloración amarillo-verdosa. (Almela Veracruz, 2014)

### 3.12.1.3. Olor

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

### 3.12.1.4. pH

Se evalúa extrayendo una gota de semen del tubo y colocándola sobre una cinta de pH. Se considera un pH normal, entre 6.2 y 6.8. Es muy importante conocer que al medir el pH no se debe introducir la tira dentro del tubo para no alterar el semen con el reactivo de la misma (Gomez y Migliorisi, s. f.).

## **3.12.2. Evaluación Microscópica**

Finalizada la evaluación macroscópica se continúa con la evaluación microscópica, que consta de los siguientes pasos:

### 3.12.2.1. Motilidad Masal (MM)

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. La valoración de la onda de movimiento es el sistema más simple para determinar la motilidad del semen fresco. (Vallecito, 2011)

La motilidad masal, se determina depositando una gota de la muestra seminal sin diluir sobre un porta-objetos atemperado a 37° C en una placa térmica, y visualizando sobre la

muestra en un microscopio óptico a 10 X. Se evalúa de forma subjetiva el movimiento de las células espermáticas en su conjunto, y se les da una valoración 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 observan movimientos en ondas. (Evans y Maxwell, 1990; Hafez y Hafez, 2000)

El siguiente cuadro muestra la clasificación espermática masal:

**Cuadro 1: Escala numérica y descriptiva para determinar la motilidad espermática masal del Toro**

Células móviles %	Valor descriptivo	Valor numérico
80 – 100	Muy bueno	5
60 – 80	Bueno	4
40 – 60	Regular	3
20 – 40	Pobre	2
0 – 20	Muy pobre	1

(Zemjanis, 1981)

#### 3.12.2.2. Motilidad Individual (MI)

La motilidad individual (MI) de una muestra de semen se expresa como el porcentaje (%) de células móviles bajo un campo microscópico. Un espermatozoide de motilidad individual es aquel que se mueve de un punto a otro en una línea más o menos recta. (Hafez y Hafez, 2000)

La motilidad individual es uno de los parámetros más importantes de un análisis seminal (Hidalgo - Ordoñez, Tamargo, y Diez, 2005). Y según Muiño (2008), este parámetro es el más utilizado para valorar la calidad de un eyaculado o de una dosis seminal que, tras la

dilución del eyaculado, o la descongelación de dosis de semen congelado, se estima el porcentaje de espermatozoides individuales que están en movimiento.

Por su parte Saacke (1972) indica que las dosis descongeladas con una motilidad individual inferior al 40% se descartan para la Inseminación Artificial. La motilidad individual puede evaluarse de forma subjetiva o mediante un sistema de imágenes asistido por ordenador. (Almela Veracruz, 2014)

El método tradicional para determinar la motilidad individual consiste en utilizar una gota de semen que se deposita entre un porta y un cubreobjetos para evaluar el movimiento de los espermatozoides, determinando de forma más o menos precisa, el porcentaje de células móviles presentes en la muestra, e incluso realizar una valoración de si el tipo de movimiento observado es normal o no. (Almela Veracruz, 2014)

El examen de la motilidad debe hacerse con la ayuda de un microscopio con un aumento de entre 200X a 400X y a una temperatura de 37°C, la cual puede mantenerse constante con una platina calentadora termorregulable adherida al microscopio. Esta valoración es cuanti-cualitativa, ya que se evalúa la tasa de espermatozoides en movimiento de 0 a 100%. (Villena, 2006)

El siguiente cuadro muestra la clasificación espermática individual:

**Cuadro 2: Clasificación Espermática para determinar la motilidad individual del toro**

<b>Valor %</b>	<b>Clasificación</b>	<b>Descripción</b>
91 - 100	Muy bueno	Ondas oscuras con movimientos rápidos
71 - 90	Bueno	Ondas aparentes. Remolinos con movimiento moderado

51 - 70	Aceptable	Ondas ligeras con movimiento apenas perceptibles
0 - 50	Pobre	No hay ondas. Movimiento espermático vibrátil

---

(Vera, 2001)

### 3.12.2.3. *Morfología Espermática*

Para una interacción normal del espermatozoide con el microambiente del tracto genital femenino y con las envolturas del ovocito, debe tener motilidad progresiva y 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-Martínez, 1999).

A medida que aumenta la proporción de espermatozoides anormales en el eyaculado, descende la capacidad fecundante del mismo (Howard & 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% han de descartarse para la congelación (Barth y Oko, 1989).

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 comprobaron que no eran capaces de atravesar la zona pelúcida (Thundathil, et al., 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.

#### *3.12.2.4. Concentración*

La determinación de la concentración de espermatozoides es una prueba importante de la calidad del semen ya que es la que define el potencial de fertilidad del animal colectado. Una vez encontrada la concentración del semen y el volumen del eyaculado se podrá obtener el valor de dilución y el número de dosis inseminante para lograr grados adecuados de fertilidad. Por lo general la concentración que se obtiene en el eyaculado de toro es de  $20 \times 10^6$  de espermatozoides /ml (Cabrera y Pantoja, 2012).

La concentración puede ser obtenida mediante la colocación de una alícuota de semen fresco en la cámara de Neubauer, para luego realizar el conteo. Pero con el avance de la ciencia se puede obtener la concentración de espermatozoides con la utilización de un fotómetro calibrado para bovinos (Cabrera y Pantoja, 2012).

### **3.13. Vitalidad espermática**

El término vitalidad espermática es utilizado para referirse a los espermatozoides con membrana plasmática intacta, es un factor importante en la evaluación de la calidad del semen ya que una membrana plasmática intacta mantiene las actividades metabólicas intracelulares que interactúa con la zona pelúcida y plasmalema de un ovocito para una fertilización exitosa (Bradley, 1999).

La ruptura de la membrana plasmática indica la pérdida de vitalidad celular, aunque una membrana plasmática intacta no siempre indica que la célula sea viable. Para la valoración de vitalidad las técnicas de tinción vital permiten diferenciar los espermatozoides vivos de los muertos debido a la permeabilidad de la membrana plasmática a los colorantes vitales, por tanto, aquellas células que presentan una membrana plasmática funcional no permiten el paso del colorante, mientras que si esta alterada el colorante penetra en el interior de la célula y aparece teñida (Bajo y Coroleu, 2009).

### **3.14. Tinción vital**

Para Tartaglione y Ritta (2004), el método más usado es la tinción con eosina – nigrosina (E-N) que también se utiliza para la valoración de morfo anomalías, algunos autores describen el uso de otras tinciones como el verde rápido/eosina, eosina/azul de anilina, tripán azul/Giemsa o amarillo de naftol/eritrosina.

También se usan tinciones comerciales como el “*Spermac*”. La evaluación morfológica de la integridad de la membrana plasmática se realiza usando el microscopio óptico de contraste de fases (1000 X, contabilizando 200 células) o la óptica de contraste diferencial de interferencia o Nomarski (Bradley, 1999; Hidalgo-Ordóñez, Tamargo, y Diez, 2005; Álamo-Santana, 2007).

El procedimiento muestra una extensión donde aparecen células vivas de color blanco sobre un fondo púrpura, o teñidas de rosa si están muertas (Iguer-Ouada y Verstegen, 2001).

Para medir la vitalidad de una muestra de semen en análisis de rutina, se utilizan colorantes vitales, tales como la combinación E-N, con la que los espermatozoides muertos se teñirán de color rojo o rosa, mientras que los vivos quedarán sin teñir (Quintero-Moreno, Rubio-Guillén, y González, 2009).

### **3.15. Crio preservación**

La crio conservación mantiene el material biológico por tiempo indefinido (Ramos, 1996), por medio de la congelación de la célula espermática a muy bajas temperaturas  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Hafez y Hafez, 2002), generando una disminución de su metabolismo hasta una etapa de inactividad celular (Watson y Morris 1987), permitiendo de este modo mantener la biodiversidad y asegurar la conservación física de una especie (Medina-Robles, Velasco-Santamaría, y Cruz-Casallas, 2005).

Un crio preservante debe proveer a la célula una serie de características sean estas proporcionar nutrientes como fuente de energía, protección del efecto perjudicial del enfriamiento rápido, propiciar taponamiento para evitar variaciones del pH perjudicial en la medida que ácido láctico es formado, mantener la presión osmótica y el equilibrio electrolítico apropiado, inhibir el crecimiento bacteriano, aumentar el volumen del semen de forma que pueda ser utilizado para múltiples inseminaciones, proteger a la células espermáticas durante a congelación (Hafez y Hafez, 2002).

La tecnología de la crio conservación de esperma es una de las más importantes Técnicas de Reproducción Asistida (ART) en animales de granja (Agca, 2012), mediante el cual, el material biológico puede ser mantenido viable por tiempo indefinido (Ramos, 1996).

Esta tecnología constituye una alternativa para el establecimiento de bancos genéticos, los cuales ayudan a mantener la biodiversidad y asegurar la conservación física de una especie (Medina-Robles, Velasco-Santamaría, y Cruz-Casallas, 2005).

Los efectos de la crio conservación sobre la función espermática y la fertilidad han sido ampliamente estudiados y descritos, particularmente en bovinos (Anchordoguy, et al.,1987).



Un gran número de protocolos de congelación han sido desarrollados, debido principalmente a las diferencias observadas entre especies, como respuesta a las tasas de congelación y descongelación empleadas. Por esta circunstancia, las técnicas y procedimientos actuales deben ser validados empleando el semen de la especie de interés, y de esta forma lograr su conservación a largo plazo sin afectar su capacidad fecundante (Woelders, Matthijs, y Engel, 1997).

Varias tasas de enfriamiento y descongelación han sido ensayadas en la crioconservación seminal de diferentes especies sin que se haya determinado con exactitud una curva estándar (Hochi, Semple, y Leibo, 1996). Esto se debe a que los resultados dependen de factores como el diluyente, el crio protector usado y el tamaño del sistema de empaque, así como también de la calidad seminal, parámetro altamente variable entre individuos (Landsverk, 2000)

### **3.16. Dilución y adaptación de semen**

El Proceso de adaptación consiste en realizar una primera dilución en una proporción 1 a 1 en un tiempo de diez minutos permitiendo una mejor adaptación del semen al diluyente, una vez obtenido el semen colectado se adiciona 3 ml del diluyente a una temperatura previamente establecida del medio o lugar donde que se vaya a realizar todo el trabajo de dilución, cumplidos 10 minutos se le adicionan el restante del diluyente para así completar una dilución 1 a 1 (Guerrero, 2014).

Esta dilución es muy importante para mantener la viabilidad espermática hasta que la concentración sea calculada y consecuentemente el volumen final sea definido (Guerrero, 2014).

### **3.17. Envasado del semen bovino**

Generalmente existen tres tipos de envases en que se comercializa el semen congelado, y estos son:

### **3.17.1. Ampollas**

Son ampollas de vidrio, de 1 cm de capacidad, similares a las que actualmente vienen con agua destilada o suero fisiológico, fue el primer método de envasado de semen para congelar. Actualmente no se utiliza debido a su mayor costo y lugar de almacenamiento (Cavestany y Mendez, 1993).

### **3.17.2. Pajuelas (Paillettes)**

Existen básicamente tres tipos de pajuelas:

La pajuela francesa, de 113 mm de largo y un volumen de 0,5 cc (es la más común). La "mini - pajuela", de igual largo que la anterior, pero de 0,25 cc de volumen. El "Minitub", de origen alemán, que es una pajuela de aproximadamente la mitad de largo que las anteriores y un volumen de 0,25 cc. (Cavestany y Mendez, 1993)

Al respecto Nuñez y Fernández (2001), mencionan que el procedimiento para envasar y congelar es simple, se asegura la pajilla por la porción superior (extremidad cerrada), colocando la opuesta en el semen diluido y llenarla por aspiración, enseguida se golpea suavemente en la punta con el objetivo de que quede una pequeña parte sin semen en la extremidad para poder taparla posteriormente con polvo de alcohol polivinílico, posteriormente se congela el semen en un termo de boca ancha exponiéndolo a vapores de nitrógeno líquido, para enseguida sumergir las pajillas en él donde alcanzarán una temperatura de -196°C.

### **3.17.3. Pellets (Pastillas)**

Es la forma más económica de procesamiento de semen, así como de conservación, ya que ocupa mucho menos espacio que las pajuelas o ampollas. La principal crítica que se

le realiza a este tipo de procesamiento es la falta de identificación (Cavestany y Mendez, 1993).

### **3.18. Crio conservación del semen bovino**

La crio conservación es una técnica mediante la cual el material biológico puede ser mantenido viable por tiempo indefinido (Ramos, 1996).

Como se sabe, se refiere a la aplicación de las bajas temperaturas para la conservación de materiales biológicos (Bonadonna, 1986).

El mayor desafío para las células en el proceso de congelación no es resistir a las bajas temperaturas del nitrógeno líquido, sino mantener la viabilidad en un rango de temperaturas, entre los  $-15$  y  $-60$  °C (en el cual se producen los mayores daños) que las células experimentan por dos ocasiones, es decir, durante la congelación y durante la descongelación, a  $-196$  °C no se producen reacciones térmicas, puesto que debajo de los  $-130$  °C no existe agua en el estado líquido (Mazur, 1984).

La congelación lenta permite una deshidratación celular progresiva que provoca un aumento de la concentración intracelular de solutos lo que impide la formación de cristales intracelulares, a medida que el medio extracelular se va congelando las células quedan atrapadas en canales de solución sin congelar, siendo los niveles de supervivencia espermática muy altos si permanece sin congelar alrededor del 15 % del agua extracelular (Amann y Pickett, 1987).

Para las células espermáticas, la tasa óptima de descenso de la temperatura oscila entre 10 y  $-100$  °C/minutos, ya que velocidades superiores o inferiores provocan una disminución de la supervivencia (Rodriguez, et al.,1975).

### **3.19. Tiempo de equilibramiento**

La mezcla de semen y diluyente se deja reposar durante varias horas antes de congelarla, para permitir que las células espermáticas se equilibren con el diluyente (normalmente a 5°C), un tiempo aproximado de 4 a 6 h es óptimo, dependiendo del medio utilizado, pasado este tiempo de equilibrio es evaluado nuevamente el semen, en el que deberá tener mínimamente una motilidad progresiva de 50% (Giles, 1993).

El propósito del equilibramiento es permitir la traslocación del agua y por lo tanto reducir los efectos dañinos de la nucleación del hielo intracelular durante el proceso de congelamiento y descongelamiento (Vishwanath y Shannon, 2000).

### **3.20. Almacenamiento del semen**

Giles (1993), recomienda una vez transcurridas las 3 horas de equilibrio, el semen debe ser conservado de manera que permita una aplicación fácil y rápida, por eso el mismo es colocado en pajillas de 0.5 ml para posterior refrigeración o congelamiento.

Al respecto Salamon y Maxwell (2000), mencionan que el congelamiento de semen en pajillas se realiza por medio de suspensión en vapores de nitrógeno líquido y la velocidad de enfriamiento se regula por la distancia de las pajillas a nivel del nitrógeno líquido.

Por su parte Lahnsteiner, et al. (2000), mencionan que la curva de enfriamiento es importante para el congelamiento de pajillas, obteniéndose los mejores resultados cuando la temperatura disminuye en forma de una parábola.

Sin embargo Maxwell y Watson (1996), mencionan que dichas condiciones se consiguen al suspender las pajillas a una altura de entre 4 y 6 cm sobre el espejo de nitrógeno líquido (-196°C), y la altura que ha demostrado ser idónea para congelamiento de pajillas de 0.25 y 0.5 ml es de 4 cm.

Independientemente del método de envasado, el semen congelado se almacena sumergido en nitrógeno líquido (-196°C) en contenedores especiales de diferentes capacidades que se consiguen fácilmente de manera comercial (Evans y Maxwell, 1990).

Una consideración importante cuando se almacena semen por largos periodos de tiempo es la disminución en la fertilidad de dicho semen durante el almacenamiento (Salamon y Maxwell, 2000).

Por su parte Yoshida (2000), menciona que la viabilidad del semen crio preservado no excede los 50 años.

Al respecto Salamon y Maxwell (2000), señalan que la fertilidad del semen almacenado por 27 años permanece inalterable, por lo que durante largos periodos de tiempo es factible y posibilita el establecimiento de bancos de recursos genéticos.

### **3.21. Descongelación**

Durante el proceso de congelación – descongelación, el punto de cambio de sólido a líquido es un factor importante en la recuperación espermática, el espermatozoide que sobrevivió a la congelación hasta – 196°C (nitrógeno líquido) debe atravesar un ascenso de temperatura y una descongelación pasando dos veces por la temperatura crítica (Aisen, 2004).

La mayoría de los investigadores utilizan para el semen congelado en pajillas, el método de inmersión directa en agua a 35°C durante 30 segundos, también puede realizarse a 37°C durante 10 segundos, la rehidratación es una función de la tasa de descongelamiento (Guerrero, 2014).

El descongelamiento se debe realizar en baño maría de la siguiente manera:

- Paleta o pajilla fina mínimo a 34 a 37 grados por 21 segundos

- Paleta o pajilla media mínimo 35 a 37 grados por 30 segundos

La temperatura del agua deberá ser media con un termómetro y no deberá sobrepasar los lineamientos establecidos y la inmersión de la pajilla en el agua debe realizarse de forma completa e inmediata y deberá sobrepasar los 30 segundos (Guerrero, 2014).

### **3.22. Análisis Post – Congelación**

La evaluación adecuada de la calidad seminal después de la descongelación de espermatozoides es de alto interés para la industria de la inseminación artificial (IA), ya que puede proporcionar información sobre la capacidad fecundante de los espermatozoides crío preservados. La evaluación del semen post – descongelado consta de los siguientes parámetros: motilidad individual y concentración.

#### **3.22.1. Motilidad individual**

En el cual se indica por medio del Departamento de Medicina del Rodeo y Teriogenología de la Universidad de Saskatchewan, Canadá y que se corresponden con las normas ISO 9002, los valores son: 0 horas el 25% y a las 2 horas de 15% de espermatozoides motiles (Gómez y Migliorisi, 2007).

#### **3.22.2. Concentración**

La concentración de una pajuela de 0,25ml, es de 20 millones, pero a la descongelación deberá haber por pajuela un mínimo de 10 millones de espermatozoides motiles, luego a esta se la multiplica el resultado por 5 millones y después por el porcentaje de espermatozoides móviles obteniendo la fracción total de espermatozoides móviles por dosis inseminante (Gómez y Migliorisi, 2007).

## **4. MATERIALES Y METODOS**

## 4.1. Localización



**Figura 8: Estación Experimental de Choquenaira**

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de crío-conservación de la Estación Experimental de Choquenaira, dependiente de la Facultad de Agronomía de la Universidad Mayor de San Andrés. Está ubicada en la comunidad de Choquenaira a 8.0 km de la población de Viacha, provincia Ingavi y a 38 km de la ciudad de La Paz, situada a una altura de 3870 msnm, geográficamente se halla a 14°16'45" Latitud Sur y 65°34'23" Longitud Oeste (Pacheco, 2000).

La temperatura mínima promedio es de - 3.4 °C y la máxima promedio es de 15.6 °C, la humedad relativa media anual en la zona es de 37.8 % (Holdrige, 1982).

Según Arguedas (2006), las precipitaciones en la comunidad de Choquenaira son estacionales e irregulares en intensidad y periodicidad presentando una precipitación anual de 400 a 600 mm. En los últimos años las precipitaciones se concentran en los meses de diciembre a marzo, alcanzando el 72 % de toda la precipitación. La presencia de heladas en la región es muy frecuente y la poca precipitación origina épocas de sequías prolongadas teniendo como consecuencia una sola producción al año.

## 4.2. MATERIALES

#### 4.2.1. Material biológico

- Para realizar el presente estudio se utilizaron cuatro toros sementales, de los cuales dos de ellos son de raza Holstein: Toro River, con edad de 1 año y 7 meses; Toro Osman, con edad de 4 años y 9 meses. Y los otros dos toros son de la raza Pardo Suizo: Toro Nerón, con edad de 2 años y 5 meses; Toro Líder, con edad de 2 años y 5 meses. Todos pertenecientes a la Estación Experimental de Choquenaira.



**Figura 11: Toro Holstein "River"**



**Figura 13: Toro Holstein "Osman"**



**Figura 7: Toro Pardo Suizo "Nerón"**



**Figura 8: Toro Pardo Suizo "Líder"**

#### 4.2.2. Material de laboratorio

- Microscopio
- Baño María
- Toallas de absorción
- Peachimetro
- Mufla
- Destilador de agua
- Hornilla eléctrica
- Termos de nitrógeno líquido
- Refrigerador
- Centrifugadora



- Pinza
- Termómetro
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Probeta Graduada de vidrio
- Vasos de precipitados de vidrio.
- Pajuelas de 0,5 ml.
- Cámara de Neubauer.
- Micropipetas Graduadas
- Detergente biodegradable
- Tubos de Ensayo de 10 ml
- Tubos de Ensayo de 3 ml
- Tips para Micropipetas
- Pipetas Pasteur
- Gradillas
- Pipeta de Glóbulos Rojos
- Polvo de alcohol Polivinílico

#### **4.2.3. Reactivos**

- Dilutor comercial (Andromed).
- Yema de huevo
- Eosina – nigrosina
- Aceite de Inmersión

#### **4.2.4. Material de campo**

- Vagina artificial.

#### **4.2.5. Material de Gabinete**

- Computadora e impresora
- Libreta de apuntes
- Bolígrafos
- Tabla de registros

### **4.3. METODOLOGIA**

#### **4.3.1. Alimentación de los sementales**

- Los sementales seleccionados fueron alimentados con heno y ensilaje durante todo el tiempo que duró el experimento además de agua a disposición.

#### **4.3.2. Preparación de los sementales para la colecta del semen**

- Primeramente, se realizó el lavado del prepucio del semental con agua corriente y con la ayuda de una manguera.
- Durante el proceso de lavado se procedió a cortar aquellos pelos del prepucio considerados los más largos e innecesarios y aquellos contaminados.
- Posterior a ello se esperó un tiempo prudente para que el prepucio pueda quedar seco y así obtener muestras más limpias y libre de contaminación.

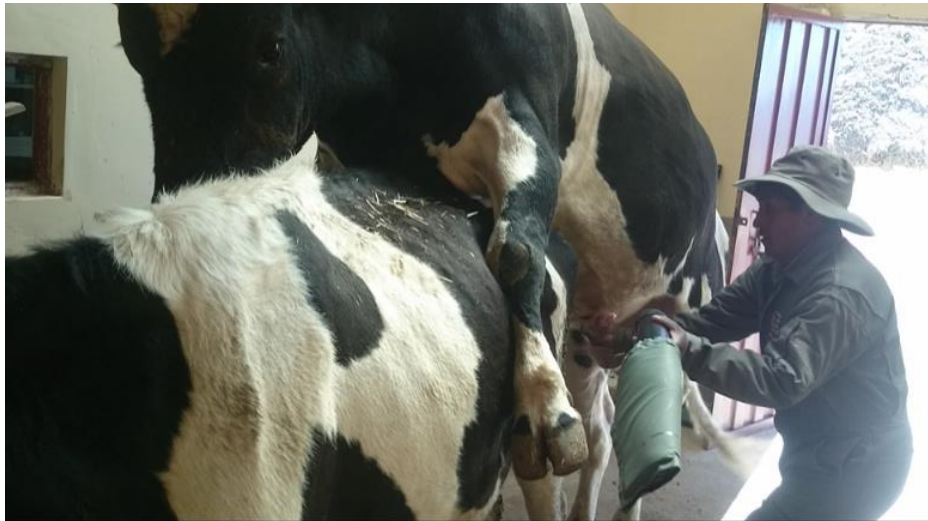
#### **4.3.3. Proceso de colección del semen**

Para realizar el presente trabajo, se procedió con la colecta del semen en los animales en estudio de forma individual.

Las muestras de semen fueron tomadas utilizando una vagina artificial, que está compuesto de un cuerpo rígido de caucho, una válvula exterior, una camisa interna o funda de látex. En el extremo de la vagina artificial se acopla un cono flexible de látex y un tubo colector graduado protegido con una funda térmica, esto para proteger a la muestra de la luz directa y de la temperatura exterior.

Una vez que el semental montó a la hembra se procedió a desviar el pene lateralmente hacia la vagina artificial, hasta que efectuó el golpe del riñón, que de forma característica acompañan a la eyaculación, posterior a esto se retiró la vagina artificial.

La colecta se realizó en la misma estación experimental en la sala de montas, utilizando un brete y una vaca como maniquí, sujeta con una soga por el cuello.



**Figura 15: Proceso de colecta del semen**

#### **4.3.4. Manejo del semen eyaculado**

El resultado de los exámenes de laboratorio debe considerarse con sumo cuidado. En primer lugar, hay que tener en cuenta que el eyaculado contiene células vivas, con un metabolismo muy activo que necesita datos precisos de temperatura, de recolección, y conservación, así como de estrictas medidas de higiene de los elementos de recolección que tienen contacto directo con él (Rutter y Russo, 2006).

- Cada superficie que entró en contacto con el semen estaba con una temperatura mínima de 35 °C y un máximo de 37 °C.
- Se evitó la exposición directa de la muestra del semen al sol.
- Se evitó la contaminación con tierra, bosta, orina, etc.
- La vagina artificial, al momento de la colección del semen la temperatura fue de 45 a 48°C, la presión ha sido regulada de acuerdo al reproductor.

#### **4.3.5. Preparación de los materiales previo a la evaluación seminal**

Previo a la llegada del semen al laboratorio se deben tener preparados los materiales necesarios como el baño maría, el cual debe estar conectado y atemperado colocando

dentro de esta la tinción de eosina y el dilutor, además de preparar el material de laboratorio sobre la mesa de forma ordenada teniendo siempre una planilla a la mano de modo que no se pueda olvidar ningún detalle (Cavestany y Mendez, 1993).

- Los materiales se lavaron con agua destilada y jabón neutro.
- Se preparó el Microscopio limpiando los objetivos del mismo.
- Se preparó el Baño María atemperada a 37 °C.
- Se preparó la placa térmica con temperatura de 37 °C.
- Se preparó el dilutor Andromed y yema de huevo
- Se atemperó los tubos de ensayo necesarios.
- Se atemperó la pieza rotatoria de la centrifugadora.
- Se atemperó los porta y cubreobjetos.
- Se preparó las micro pipetas con sus respectivos tips.
- Se atemperó la Eosina nigrosina.

#### **4.3.6. Análisis del semen colectado**

Tras la recogida de cada eyaculado, se trasladó inmediatamente al laboratorio, donde se valoraron las características macro y microscópicas de cada uno de los eyaculados, con el objeto de determinar la calidad seminal. En una primera instancia se realizó la evaluación macro y microscópicas estableciendo la comparación de la calidad de las muestras entre toros, concluida esta primera etapa se procedió a implementar los tratamientos respectivos dentro de las características microscópicas de las cuales se representará en los resultados finales únicamente la variable de respuesta “motilidad individual” con los diferentes tratamientos de reducción parcial del plasma seminal.

Las características que se valoraron son las siguientes:

- Características macroscópicas
- Características microscópicas

#### 4.3.6.1. Características macroscópicas

Para el examen macroscópico se valoraron los siguientes parámetros.

- Volumen
- Color
- pH
- Olor

❖ **Volumen:** Se realizó con ayuda del tubo graduado y el valor se obtuvo a través de la lectura directa el cual se expresó en mililitros (ml).

❖ **Color:** Se evaluó por medio de la visualización directa del eyaculado dentro del tubo colector.

Generalmente, el semen bovino es de color blanco, las muestras más densas serán de color y aspecto más cremoso, mientras que las más diluidas serán de aspecto lechoso y hasta completamente claro y transparente, cabe mencionar que los eyaculados con muy pocos espermatozoides pueden presentar una coloración amarillo-verdosa. En algunos toros se observan eyaculados de color amarillento, debido a un pigmento llamado riboflavina producida por las glándulas seminales. También se puede observar una coloración rojiza, que indica la presencia de sangre fresca, mientras que un color pardo señala la presencia de sangre más vieja y una coloración gris indica suciedad (Rosenberger, 1981).

❖ **pH:** Se midió con la ayuda de un peachimetro.

❖ **Olor:** Se percibió mediante el olfato, directamente de la muestra. El olor será evaluado de forma subjetiva, este debe ser imperceptible e inodoro.

De acuerdo a Rosas (1997), el olor de las muestras seminales es determinado por el contenido de un lípido llamado "espermina".

#### 4.3.6.2. *Características microscópicas*

Para la valoración microscópica de semen fresco se estudiaron las siguientes características.

- Motilidad Masal
- Motilidad Individual
- Concentración
- Morfología

##### ❖ **Motilidad Masal**

La motilidad masal es juzgada de acuerdo con los movimientos en remolino observados en una sola gota de semen sin diluir. Se utiliza una escala de 1 a 5 en la que el 1 es "no movimiento" y 5 es "máximo movimiento". Se observa al microscopio en menor aumento (10X) (Olivares y Urdaneta, 1985).

Se procedió con la observación en el microscopio óptico a 10X, en el que se colocó una gota de semen puro sobre un portaobjetos temperado a 37°C, esto gracias a una platina térmica existente en el laboratorio, evaluando en el borde de la gota las ondas efectuadas por los espermatozoides, en donde los valores de motilidad masal obtenidos fue de 3 a 5, teniendo un promedio de 4 que es equivalente al 70% de espermatozoides vivos motiles.

##### ❖ **Motilidad Individual**

La evaluación de la motilidad individual se expresó en porcentajes. Esto se logró diluyendo el semen colectado, colocando una gota de semen puro sobre un portaobjetos

atemperado a 37 °C, esto con la ayuda de una pipeta Pasteur, a la que posteriormente se colocó otras dos gotas de dilutor preparado anteriormente y se procedió a la mezcla del mismo. Terminada esta operación se puso un cubreobjetos y se observó en el microscopio a diferentes campos con un aumento de 40X, donde se valoró los espermatozoides que presentaban un movimiento rectilíneo progresivo, y se consideró anormales a aquellos que presentaban un movimiento circular o de vibración estática en el lugar.

El porcentaje de los espermatozoides con movimiento rectilíneo progresivo que se obtuvo a lo largo del trabajo asciende de un 30% a un 70%, de los cuales la mayoría de los valores sobrepasan el 50% de motilidad individual por lo que se consideró que el experimento es aceptable.

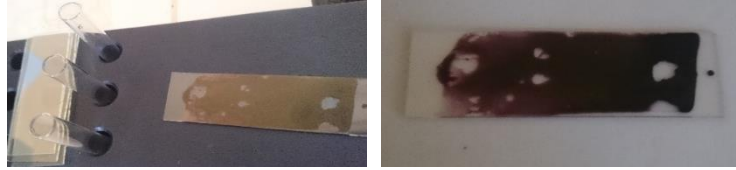
#### ❖ **Concentración**

Se procedió a homogenizar la muestra de semen agitando suavemente el tubo colector cónico, luego se realizó la dilución, utilizando agua fría estéril. Con la pipeta de dilución de glóbulos rojos se aspiró cuidadosamente el semen y el líquido diluyente por separado, hasta obtener una dilución estándar de 1: 100 luego se mezcló agitando por unos minutos. Posteriormente se llevó a observar a la cámara de Neubauer colocando 10 ul de muestra de semen diluido, se dejó reposar para después realizar el conteo de espermatozoides en cinco cuadrantes.

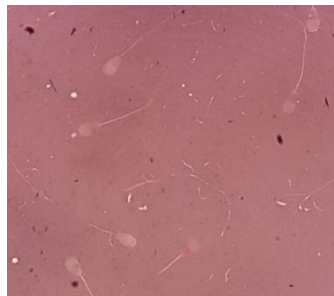
#### ❖ **Morfología**

Para el caso de la morfología se colocó una gota de semen a un porta objetos con una gota de eosina-nigrosina, la cual se homogenizó (mezcla) y se le realizó un frotis, posteriormente se colocó una gota de aceite de inmersión y se llevó al microscopio observando en 10 puntos de la muestra, realizando un conteo de 10 espermatozoides por punto observado, donde se pudo apreciar espermatozoides con las colas enrolladas, colas sueltas y cabezas dobles, además de los espermatozoides vivos y muertos, los

cuales fueron reconocidos por tener las cabezas teñidas de un color violeta en el caso de los espermatozoides muertos y en contraste se consideró espermatozoides vivos a aquellos que presentaban las cabezas incoloras.



**Figura 10: Tinción Vital y Frotis de la muestra de semen**



**Figura 11: Morfología de los espermatozoides**

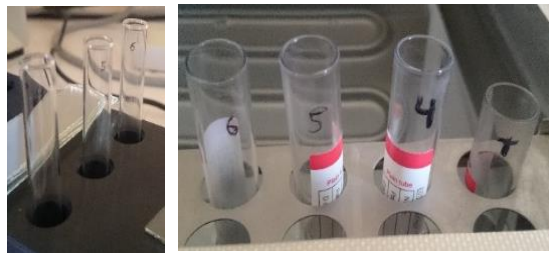
#### **4.3.7. Centrifugación y dilución del semen**

Paralelamente a las evaluaciones macroscópicas y microscópicas, se procedió a la centrifugación y a la dilución del semen a las que se retiró diferentes porcentajes del plasma seminal (40%, 50% y 60%), esto bajo el siguiente detalle:

- Se atemperó el tubo colector con la muestra de semen y cuatro tubos de ensayo extras de 10ml en agua atemperada a 37 °C, los tubos de ensayo fueron previamente rotulados con los diferentes porcentajes de remoción del plasma seminal y un tratamiento testigo.
- En la placa térmica se atemperó otros tres tubos de ensayo de 3ml, de igual manera rotulados con los diferentes porcentajes de remoción del plasma seminal que deberían ser retirados de cada uno de ellos.



- Seguidamente se homogenizó suavemente el semen en el tubo colector
- Con la ayuda de una micro pipeta se distribuyó a 1ml de semen puro colectado en los tubos de 3ml atemperados anteriormente.
- Los tubos de 3ml atemperados y con contenido seminal de 1ml, se los introdujo en la centrifugadora para realizar la centrifugación de los mismos a 3500 rpm por el lapso de 10 min.
- Terminada la operación de la centrifugadora, se extrajeron los tubos de ensayo y se procedió a retirar los diferentes porcentajes de plasma seminal que son de 40%, 50% y 60%, esto con la ayuda de una micro pipeta.
- Una vez que se retiró estos porcentajes del plasma seminal, se procedió a traspasar estas muestras a los tubos de ensayo de 10ml atemperados anteriormente, para finalmente realizar la dilución de los mismos adicionando el diluyente Andromeden una proporción de 1:5 (1ml de semen y 5ml de dilutor)



**Figura 12: Atemperación de los tubos de ensayo**



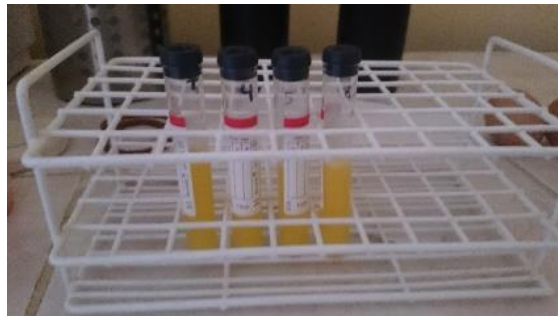
**Figura 13: Centrifugación de las muestras de semen**



**Figura 14: Medición para la extracción del plasma seminal**

#### **4.3.8. Periodo de adaptación a 5 °C**

Una vez mezclados el semen con el diluyente, se procedió con el periodo de adaptación al frío. El semen diluido se dejó a 5°C para su equilibramiento, por el lapso de cuatro horas.



**Figura 15: Periodo de adaptación de las muestras**

#### **4.3.9. Rotulado de pajuelas**

Las pajuelas se identificaron con un marcador indeleble con el siguiente detalle: Porcentaje de remoción del plasma seminal (40%, 50% y 60%)

#### **4.3.10. Envasado del semen**

El envasado se realizó en pajuelas de cloruro de polivinilo, con una capacidad de 0.5 ml, mide 133 mm de longitud y 3 mm de diámetro interno. Para el llenado de las pajuelas se procedió de la siguiente manera:

- Se montó las pajuelas de forma individual de acuerdo al porcentaje de plasma removido en el soporte (15/ soporte).
- Se succionó el semen a las pajuelas con una presión de 30 a 60 mm Hg.
- Colocando las pajuelas en forma perpendicular en el polvo de alcohol polivinílico de 3 mm, se selló el extremo abierto.
- Cerradas las pajuelas se colocó las mismas dentro del refrigerador de manera que pueda mantener la temperatura constante de 5°C, hasta su posterior congelación.

#### **4.3.11. Congelado del semen**

- Se colocaron las pajillas en una canastilla previamente enfriada mediante el vapor de nitrógeno líquido de los termos de almacenamiento y con la ayuda de una toalla que evitó la salida del vapor de nitrógeno se procedió al congelamiento gradual.
- El congelado se realizó sobre vapores de nitrógeno líquido, de 5 °C se descendió a -70 y luego a -120 y -130 °C, manteniendo las pajuelas en forma vertical.
- La duración del congelado fue de 10 minutos.
- Una vez congelada las pajuelas se las sumergió en nitrógeno líquido a – 196 °C, hasta el momento de su uso.



**Figura 16: Congelado de las muestras de semen**

#### **4.3.12. Almacenamiento del semen congelado**

Las pajillas de semen congelado fueron almacenadas en tanques con nitrógeno líquido a -196 °C.

#### **4.3.13. Descongelación de las pajillas**

Luego de un periodo de congelación de 30 minutos, se procedió con el descongelado de las 4 pajillas en baño María a 37 °C, por 45 segundos. Se extrajo una a una las pajillas (testigo, 40%, 50% y 60%) y se secó con toalla de papel, se cortó un extremo de la pajilla para luego observar la muestra.

#### **4.3.14. Análisis del semen post congelación**

Para el análisis post congelación, se valoró la variable de respuesta Motilidad individual, el cual se determinó colocando una gota de semen entre el porta y cubreobjetos que estaban atemperadas, posteriormente se procedió a evaluar en el microscopio óptico a 40X, y se observaron 10 campos para calcular el porcentaje de espermatozoides con movilidad.

#### **4.3.15. Diseño Experimental**

Los diseños empleados para realizar el presente trabajo fueron:

Diseño Completamente al Azar, este diseño se lo empleó en dos puntos:

Primero. - Se lo empleo en la "Primera Parte", para la obtención de datos macro y microscópicos en las muestras de semen fresco, comparando la calidad de muestras entre toros.

Segundo. - Se lo empleo en la “Cuarta Parte”, para la obtención de datos pre y post congelación con los diferentes tratamientos empleados en las muestras de semen, comparando la calidad de muestras con tratamientos entre toros.

Diseño de Bloques al Azar, este diseño se empleó para realizar la comparación entre tratamientos, aplicando a las muestras los diferentes porcentajes de reducción del plasma seminal (Testigo y RPPS del 40%, 50% y 60%) pre y post congelación, y de esta manera identificar cuál de los cuatro tratamientos es el mejor antes y después de la congelación.

El criterio empleado para la evaluación de la viabilidad de las muestras antes y post congelación dentro del Laboratorio de crio-conservación de la Estación Experimental de Choquenaira (Viacha), se basó principalmente con el examen de la variable de respuesta “motilidad individual” la que expresa el porcentaje de células móviles bajo el campo microscópico, este criterio se empleó en ambos diseños experimentales, tanto en el DCA como en el DBA. Las muestras en las que se aplicó los tratamientos se describen a continuación.

#### **4.4. Modelo estadístico**

- **Diseño Completamente al Azar (Comparación entre Toros)**

$$X_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$$

**Donde:**

$X_{ij}$ = Observación cualquiera

$\mu$  = Media general

$\alpha_i$ = Efecto del i-ésimo Tratamiento

$\varepsilon_{ij}$ = Error experimental

- **Diseño de Bloques al Azar (Comparación entre tratamientos pre y post congelación)**

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

**Donde:**

$X_{ij}$ = Observación cualquiera

$\mu$  = Media general

$\beta_j$  = Efecto del j-esimo bloque

$\alpha_i$ = Efecto del i-ésimo Tratamiento (**Reducción de Plasma Seminal**)

$\varepsilon_{ij}$ = Error experimental

- **Tratamientos**

T1 = Testigo

T2 = Reducción parcial del plasma seminal del 40%

T3 = Reducción parcial del plasma seminal del 50%

T4 = Reducción parcial del plasma seminal del 60%

## **5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

A continuación, se describen los resultados del trabajo en cuatro partes:

En la primera parte se describen las características macroscópicas y microscópicas cualitativas y cuantitativas de todas las variables de respuesta obtenidas a partir del semen fresco, que hacen referencia a la comparación entre toros, procurando un énfasis a la variable de respuesta “motilidad individual”.

En la segunda parte se presentan los resultados microscópicos, enfocándonos únicamente en la variable de respuesta “motilidad individual”, realizando la comparación entre tratamientos de Reducción Parcial del Plasma Seminal en un porcentaje del 40%, 50%, 60% y un Testigo, los cuales se evaluaron pre congelación.

En la tercera parte se presentan los resultados microscópicos, enfocándonos únicamente en la variable de respuesta “motilidad individual”, realizando la comparación entre

tratamientos de Reducción Parcial del Plasma Seminal en un porcentaje del 40%, 50%, 60% y un Testigo, los cuales se evaluaron post congelación.

Finalmente en la cuarta parte se presentan como datos adicionales los resultados microscópicos obtenidos, únicamente de la variable de respuesta “motilidad individual”, en la que se realizó la comparación entre toros con los diferentes tratamientos de Reducción Parcial del Plasma Seminal en un porcentaje del 40%, 50%, 60% y un Testigo, los cuales se evaluaron pre y post congelación.

## 5.1. Primera Parte

### 5.1.1. Características macro y microscópicas

#### 5.1.1.1. Características macroscópicas

##### 5.1.1.1.1. Color del semen fresco

En el Cuadro 3 se observan las características macroscópicas del Color del semen por toro y repetición.

**Cuadro 3: Características macroscópicas de color del semen fresco**

Repetición	Toro	Color
1	Pardo “Nerón”	Blanco cremoso
2	Pardo “Nerón”	Blanco cremoso
3	Pardo “Nerón”	Blanco cremoso
1	Holstein “River”	Amarillo cremoso
2	Holstein “River”	Blanco amarillento
3	Holstein “River”	Amarillo cremoso

1	Pardo “Líder”	Crema
2	Pardo “Líder”	Crema
3	Pardo “Líder”	Crema
1	Holstein “Osman”	Blanco cremoso
2	Holstein “Osman”	Blanco amarillento
3	Holstein “Osman”	Blanco amarillento

---

**Fuente: elaboración propia**

En el toro Pardo Suizo “Nerón”, se observó el color blanco cremoso en las tres repeticiones; en el toro Holstein “River”, se observó el color amarillo cremoso para la primera y tercera repetición, mientras que en la segunda repetición se observó un color blanco amarillento; en el toro Pardo Suizo “Líder”, se observó el color crema en las tres repeticiones y finalmente en el toro Holstein “Osman”, se observó el color blanco cremoso para la primera y segunda repetición, mientras que en la tercera repetición se observó el color blanco amarillento.

Observando los resultados obtenidos, se puede apreciar que los cuatro animales en estudio proporcionan muestras con un color crema en general, lo cual es un indicador de que estos animales son aptos para la colecta de muestras por encontrarse en excelentes condiciones de salud, ya que el color depende de la concentración de espermatozoides y de las secreciones de las glándulas anexas, por lo que se concluye que las muestras colectadas de semen son de buena calidad.

Al respecto Quilla (2014), encontró en toros de la raza Holstein características similares en cuanto al color del semen que van de colores como el blanco cremoso, cremoso granuloso, blanco amarillento, blanco lechoso y cremoso.



Por su parte Kantuta (2009), encontró características similares en cuanto al color del semen, los cuales variaron entre lechoso amarillento y cremoso, indicando que existe una buena concentración de espermatozoides, en el color cremoso.

#### 5.1.1.1.2. Olor del semen fresco

En el Cuadro 4 se observa las características macroscópicas de Olor del semen fresco colectado por toro y repetición.

**Cuadro 4: Características macroscópicas de olor del semen fresco**

Repetición	Toro	Olor
1	Pardo “Nerón”	Leche fresca
2	Pardo “Nerón”	Leche fresca
3	Pardo “Nerón”	Leche fresca
1	Holstein “River”	Leche fresca
2	Holstein “River”	Leche fresca
3	Holstein “River”	Leche fresca
1	Pardo “Líder”	Leche fresca
2	Pardo “Líder”	Leche fresca
3	Pardo “Líder”	Leche fresca
1	Holstein “Osman”	Leche fresca
2	Holstein “Osman”	Leche fresca
3	Holstein “Osman”	Leche fresca

**Fuente: elaboración propia**

Realizadas las evaluaciones macroscópicas correspondientes en el caso de la variable de respuesta “olor del semen fresco”, se identificó un olor a “leche fresca de vaca” para todas las repeticiones y para todos los animales en estudio.

Por lo que se concluye que las muestras colectadas son de buena calidad por no presentar olores extraños, ya que esto depende también de las glándulas anexas en el aparato reproductor del macho, por proporcionar la sustancia llamada espermina que acompaña a los espermatozoides en cada eyaculado obtenido.

#### 5.1.1.1.3. *Volumen del semen fresco*

En el Cuadro 5 se observan los promedios del volumen de semen fresco entre toros, donde se puede evidenciar que existe diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

Luego de realizar las colectas respectivas se obtuvieron resultados variables en cuanto a la comparación entre volúmenes de los animales seleccionados, donde el toro Líder presentó una muestra con un promedio de 8.83 ml, siendo superior estadísticamente al toro Osman con 7.17 ml, al toro Nerón con 5.83 y al toro River con 4.83 ml.

Al respecto Kantuta (2009) obtuvo un volumen promedio de 11.6 ml, siendo este resultado superior a los encontrados en el presente trabajo, esta superioridad puede ser debido a factores ambientales, a factores alimenticios o a factores de manejo de los animales.

Por su parte Quilla (2014) al igual que Kantuta, obtuvo un volumen promedio de 8.06 ml, el cual es un dato similar a los encontrados en los animales en estudio con los que se trabajó a lo largo del presente trabajo de investigación.

Hafez y Hafez (2000), mencionan que el volumen de los eyaculados de toros es un parámetro que presenta una baja repetitividad, ya que este depende de la edad y condición del animal, factores ambientales y destreza del operario. El volumen de cada eyaculado disminuye con las frecuencias de recogida a lo largo de cada extracción.

**Cuadro 5: Promedios de volumen de semen fresco por Toro**

Animal	Medias (ml)	Prueba Duncan 5%
Líder	8,83	A
Osman	7,17	AB
Nerón	5,83	B
River	4,83	B

**Fuente: elaboración propia**

#### 5.1.1.1.4. *pH del semen fresco*

En el cuadro 6 se puede apreciar los promedios del pH de semen fresco, donde se puede evidenciar que no existen diferencias estadísticas ( $Pr > 0.05$ ).

Las muestras obtenidas del toro Líder presentó un pH de 7, el toro Osman presentó un pH de 6.93, el toro Nerón presentó un pH de 6.83 y el toro River presentó un pH de 6.83, el toro Líder presentó un pH neutro a comparación de los otros toros que de igual manera son datos cercanos al pH neutro los cuales están dentro del rango que indica (Macías, et al., 2003), que el pH es un indicador de las secreciones de los testículos y las glándulas accesorias se encuentran en condiciones normales.

Al respecto Kantuta (2009), obtuvo un pH de 7.0 (neutro) en promedio, indicando que las secreciones se encuentran normales, resultado que se asemeja a los datos encontrados en el presente estudio de investigación.

Por su parte Quilla (2014), obtuvo un pH de 6.8 en promedio, lo cual es un indicador de que las secreciones obtenidas se encuentran dentro de un rango de normalidad, siendo este resultado un dato similar a los que se logró obtener en el presente trabajo de investigación.

**Cuadro 6: Promedios de pH de semen fresco por Toro**

Animal	Medias	Prueba Duncan 5%
Líder	7	A
Osman	6,93	A
Nerón	6,83	A
River	6,83	A

**Fuente: elaboración propia**

#### 5.1.1.2. *Características microscópicas*

##### 5.1.1.2.1. *Motilidad masal*

En el cuadro 7 se observa los promedios de la variable motilidad masal entre toros del semen fresco, donde se puede evidenciar que existe diferencias altamente significativas, esto debido a que entre toros no pueden ser iguales los movimientos en remolinos de las muestras que proporcionan en cada una de las colectas.

En el toro Líder presentó un promedio de motilidad masal de 5, siendo superior estadísticamente al toro River con 4, al toro Nerón con 4 y al toro Osman con 3, los toros River y Nerón presentaron promedios similares estadísticamente. Esto significa que las muestras colectadas son de buena calidad ya que la motilidad masal nos indica la capacidad de movimientos en remolino de los espermatozoides, por lo que la viabilidad en las muestras colectadas es bastante alta.

Por su parte en la Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito Picerno (2016), realizó el análisis en el semen fresco de las razas Holstein, Pizan y Brown Swiss, obteniendo un promedio de motilidad masal de 4 según la escala de valoración de motilidad masal para

las tres razas en estudio, siendo un valor intermedio a los encontrados en el presente trabajo.

Al respecto Padilla y Castaneda (2006), obtuvieron en Zamorano - Honduras un promedio de 4 en la escala de valoración de la motilidad masal, esto en las razas Brahman, Romagnola, Pardo Suizo, Holstein y Angus, dato que está en un punto intermedio con respecto a los encontrados en el presente trabajo, al igual que en el anterior caso.

**Cuadro 7: Promedios de motilidad masal en el semen fresco entre toros**

Animal	Medias	Prueba Duncan 5%
Líder	5	A
River	4	A
Nerón	4	B
Osman	3	C

**Fuente: elaboración propia**

#### 5.1.1.2.2. *Motilidad individual*

En el cuadro 8 se observa el análisis de varianza de la variable motilidad individual entre toros del semen fresco, donde debido a que se trabajó con cuatro toros, estos no son iguales en cuanto a la calidad seminal, por lo que se evidencia q existe una diferencia altamente significativa.

El coeficiente de variación es de 2.40 % y está clasificado de bajo de acuerdo a Calzada (1983), demostrando que los datos son altamente confiables.

**Cuadro 8: Análisis de varianza de Motilidad Individual del semen fresco**

Fuente de variación	Grados de libertad	Sumatoria de cuadrados	Cuadrados medios	F - calculado	Pr. > f
Animal	3	342.72	114.24	51.18	0,0001 **
Error experimental	8	17.86	2.23	-----	-----
Total	11	360.57	-----	-----	-----

C.V. = 2.40%

**Fuente: elaboración propia**

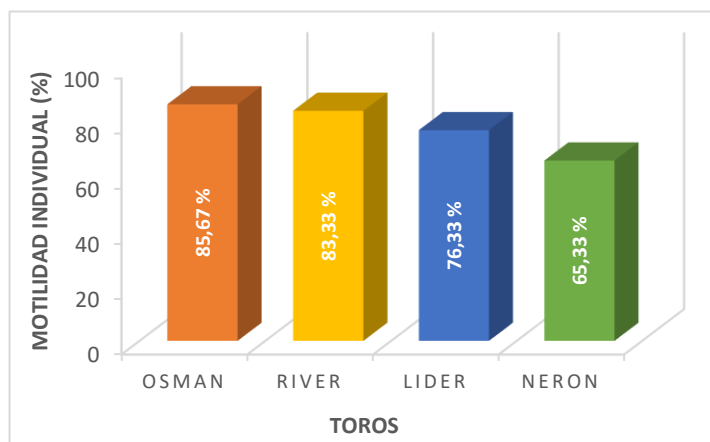
En el cuadro 9 se observa los promedios de motilidad individual por toro, donde el toro de la raza Holstein “Osman” con una edad de 4 años y 9 meses, presentó uno de los promedios más elevados de motilidad individual con un valor de 85.67%, siendo superior estadísticamente al toro de la raza Holstein “River” con una edad de 1 año y 7 meses, que presentó un promedio de motilidad individual de 83.33%, al toro de la raza Pardo Suizo “Líder” con una edad de 2 años y 5 meses, que presentó un promedio de 76.33% de motilidad individual y al toro de la raza Pardo Suizo “Nerón” con una edad de 2 años y 5 meses, que presentó un promedio de 65.33% de motilidad individual. Los toros de la raza Holstein Osman y River presentaron promedios similares estadísticamente.

Esto significa que las muestras colectadas son de buena calidad por apreciar el movimiento individual de las células espermáticas de forma progresiva y rectilínea el cual es un indicador de la viabilidad del semen ya que puede aplicarse en un programa de inseminación.

Por su parte Kantuta (2009) obtuvo una motilidad individual de 82%, siendo este valor inferior al encontrado en el presente trabajo y pudiendo ser influenciados este valor por la edad del semental.

Así mismo Quilla (2014), al igual que Kantuta (2009), obtuvo una motilidad individual de 72%, siendo este resultado aún más inferior del que se logró encontrar en el presente trabajo.

En la figura 17 están representados los valores promedios de la variable de respuesta motilidad individual de semen fresco por toro



Fuente: elaboración propia

**Figura 17: Promedios de motilidad individual del semen fresco por toro**

**Cuadro 9: Promedios de motilidad individual de semen fresco por toro**

Animal	Medias (%)	Prueba Duncan 5%
Osman	85,67	A
River	83,33	A
Líder	76,33	B
Nerón	65,33	C

Fuente: elaboración propia

#### 5.1.1.2.3. Concentración de semen fresco

En el Cuadro 10 se observa los promedios de la variable concentración de semen fresco, donde se evidencia que entre las unidades experimentales (toros en estudio) existe diferencias altamente significativas.

Donde el toro Líder se alcanzó una concentración en promedio de  $1.26 \times 10^9$  millones de espermatozoides/ml, siendo superior estadísticamente al toro River que alcanzó una concentración de  $1.10 \times 10^9$  millones de espermatozoides/ml, al toro Nerón que alcanzó una concentración de  $9.55 \times 10^8$  millones de espermatozoides/ml y al toro Osman que alcanzó una concentración de  $7.08 \times 10^8$  millones de espermatozoides/ml, en esta oportunidad para la variable de respuesta concentración del semen fresco no hubo datos de concentraciones similares estadísticamente.

Por su parte Kantuta (2009), obtuvo una concentración de  $8.2 \times 10^5$  millones/ml, siendo este valor de concentración espermática inferior a los que se obtuvieron en las tres repeticiones realizadas a lo largo del presente estudio de investigación.

Al respecto Quilla (2014), obtuvo una concentración promedio de  $1.023 \times 10^6$  millones/ml, de modo similar al anterior caso este valor de concentración espermática es inferior a los que se lograron obtener en el presente trabajo de investigación.

**Cuadro 10: Promedios de concentración de semen fresco por toro**

Animal	Medias (Millones de espermatozoides/ml)	Prueba Duncan 5%
Lider	$1.26 \times 10^9$	A
River	$1.10 \times 10^9$	B
Neron	$9.55 \times 10^8$	C
Osman	$7.08 \times 10^8$	D

Fuente: elaboración propia



#### 5.1.1.2.4. *Porcentaje de espermatozoide vivos del semen fresco por toro*

En el cuadro 11 se observa los promedios de la variable porcentaje de espermatozoides vivos del semen fresco, donde se puede evidenciar que no existe diferencias significativas entre las unidades experimentales en cuanto al porcentaje de espermatozoides vivos.

Se puede apreciar que el toro River y el toro Osman alcanzaron un promedio de 83% de espermatozoides vivos, siendo superiores estadísticamente a los toros Nerón que alcanzó un promedio de 79.67% y al toro Líder que alcanzó un promedio de 77%, los toros River y Osman alcanzaron promedios similares estadísticamente (83%).

Por su parte Kantuta (2009), encontró un promedio de 72% de espermatozoides vivos en semen sin congelar, dato que en comparación con los obtenidos en el presente trabajo es inferior con respecto a los toros River y Osman.

Al respecto Quilla (2014), de igual manera encontró un promedio de 75% de espermatozoides vivos, dato que de igual forma es inferior con respecto a los datos que se obtuvo en el presente trabajo y de los toros mencionados con anterioridad.

**Cuadro 11: Promedio de los porcentajes de espermatozoides vivos del semen fresco por toro**

Animal	Medias (%)	Prueba Duncan 5%
River	83	A
Osman	83	A
Nerón	79,67	A
Líder	77	A

**Fuente: elaboración propia**

5.1.1.2.5. *Porcentaje de espermatozoide muertos del semen fresco por toro*

En el cuadro 12 se observan los promedios de la variable porcentaje de espermatozoides muertos del semen fresco por toro, donde se puede evidenciar que no existe diferencias significativas entre las unidades experimentales en cuanto al porcentaje de espermatozoides muertos.

El toro Líder alcanzó un porcentaje de espermatozoides muertos de 23% siendo superior estadísticamente al toro Nerón que alcanzó un promedio de 20.33% de espermatozoides muertos, también fue superior al toro Osman que alcanzó un promedio de espermatozoides muertos de 17% al igual que el toro River que de igual manera alcanzó un promedio de 17%.

**Cuadro 12: Promedios de espermatozoides muertos del semen fresco por toro**

Animal	Medias (%)	Prueba Duncan 5%
Líder	23	A
Nerón	20,33	A
Osman	17	A
River	17	A

**Fuente: elaboración propia**

5.1.1.2.6. *Porcentaje de espermatozoides normales del semen fresco por toro*

En el cuadro 13 se observan los promedios de la variable porcentaje de espermatozoides normales del semen fresco por toro, donde se puede evidenciar que existe una diferencia altamente significativa entre las unidades experimentales.

El toro Osman alcanzó un promedio de espermatozoides normales de 95.67%, siendo superior estadísticamente a los toros River que alcanzó un promedio de 93.67%, al toro Líder que alcanzó un promedio de 87.67% y al toro Nerón que alcanzó un promedio de espermatozoides normales de 62.33%, los toros Osman y River alcanzaron promedios similares estadísticamente.

Kantuta (2009) encontró un promedio de 83% de espermatozoides vivos en semen sin congelar. Al respecto (Quilla, 2014), encontró en la Estación Experimental de Choquenaira un promedio de 78.56% de espermatozoides normales en el semen fresco, datos que son inferiores a los encontrados en el presente trabajo de investigación.

**Cuadro 13: Promedio de los porcentajes de espermatozoides normales del semen fresco por toro**

Animal	Medias (%)	Prueba Duncan 5%
Osman	95,67	A
River	93,67	A
Líder	87,67	B
Nerón	62,33	C

Fuente: elaboración propia

*5.1.1.2.7. Porcentaje de espermatozoides anormales del semen fresco por toro*

En el cuadro 14 se observan los promedios de la variable porcentaje de espermatozoides anormales del semen fresco por toro, donde se puede evidenciar que existe una diferencia altamente significativa entre las unidades experimentales.

El toro Nerón alcanzó un promedio de espermatozoides anormales de 37.67%, siendo superior estadísticamente a los toros Líder que alcanzó un promedio de 12.33%, al toro

River que alcanzó un promedio de 6.33% y al toro Osman que alcanzó un promedio de espermatozoides anormales de 4.33%, los toros Osman y River alcanzaron promedios similares estadísticamente.

**Cuadro 14: Promedio de los porcentajes de espermatozoides anormales del semen fresco por toro**

Animal	Medias (%)	Prueba Duncan 5%
Nerón	37,67	A
Líder	12,33	B
River	6,33	C
Osman	4,33	C

Fuente: elaboración propia

## 5.2. Segunda Parte

### 5.2.1. Características microscópicas

#### 5.2.1.1. Motilidad individual con los diferentes tratamientos de reducción parcial de plasma seminal pre congelación (Comparación entre tratamientos)

En el cuadro 15, se observa el análisis de varianza de la variable Motilidad Individual realizada en las tres repeticiones con los diferentes tratamientos aplicados al semen fresco (testigo, RPPS 40%, 50% y 60%) pre congelación, donde se puede evidenciar que existe diferencias altamente significativas entre tratamientos.

El coeficiente de variación es de 7.60% que está clasificada como un valor bajo de acuerdo a Calzada (1983), indicando que los datos son confiables.

**Cuadro 15: Análisis de varianza de motilidad individual con diferentes tratamientos de reducción de plasma seminal pre congelación (Comparación entre tratamientos)**

Fuente de variación	Grados de libertad	Sumatoria de cuadrados	Cuadrados medios	F - calculado	Pr. > f
<b>ANIMAL</b>	3	808.35	269.45	14.10	0,0001 **
<b>TRATAMIENTO</b>	3	272.00	90.67	4.74	0,0062 **
<b>Error</b>	41	783.45	19.11	-----	-----
<b>Total</b>	47	1863.80	-----	-----	-----
<b>C.V. = 7.60%</b>					

Fuente: elaboración propia

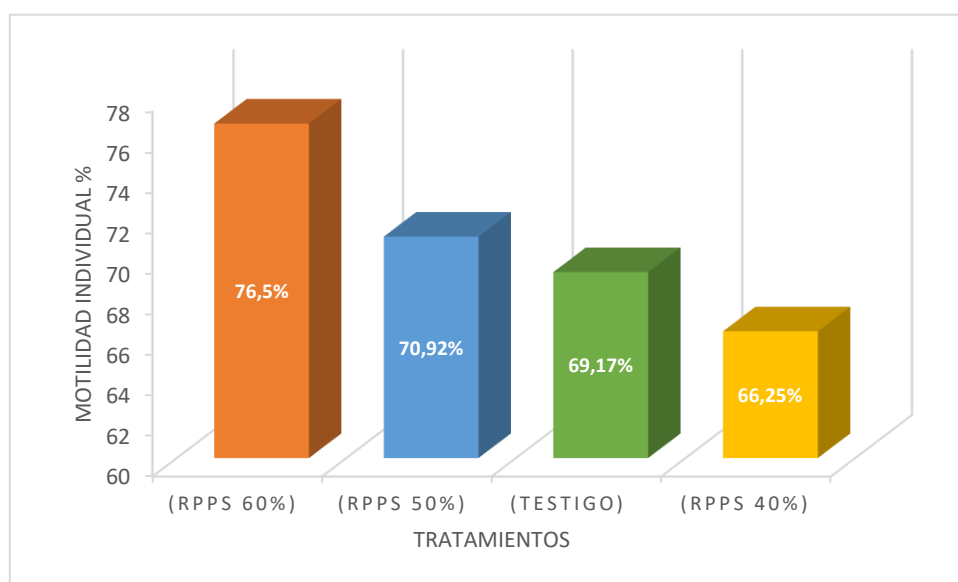
En el cuadro 16 se observa los promedios de la variable de respuesta “motilidad individual” a la que se le aplicó los diferentes tratamientos de reducción del plasma seminal (Testigo, RPPS de 40%, 50% y 60%) pre congelación, donde el tratamiento con RPPS del 60% obtuvo un promedio de células espermáticas pre congelación de 76.50%, siendo superior estadísticamente al tratamiento con RPPS del 50% que obtuvo un promedio de células espermáticas pre congelación de 70.92%, al tratamiento con RPPS Testigo que obtuvo un promedio de células espermáticas pre congelación de 69.17% y al tratamiento con RPPS del 40% que obtuvo un promedio de células espermáticas pre congelación de 66.25%, donde los tratamientos con RPPS del 50% y el Testigo obtuvieron promedios similares estadísticamente.

Al respecto Padilla y Castaneda (2006), obtuvieron en las razas Brahman, Romagnola, Pardo Suizo, Holstein y Angus, esto en Zamorano – Honduras un promedio de motilidad individual pre congelación de 64.50% en el caso del testigo y un promedio de 69.75% en el caso del tratamiento con una reducción parcial del plasma seminal del 50%, datos que son similares a los encontrados en el presente trabajo.

Por su parte Aké-López y Sánchez-Encalada (1997), obtuvieron de 6 toros cebú comercial (*Bos indicus*), esto en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Yucatán, un promedio de motilidad individual pre congelación

de 65.5% para el testigo y un promedio de 66.80% para el tratamiento con una reducción parcial del plasma seminal del 50%, siendo estos datos, un tanto similares a los encontrados en el presente trabajo de investigación.

En la figura 18 se representan los valores promedios de la variable de respuesta motilidad individual con diferentes tratamientos de reducción de plasma seminal pre congelación (Comparación entre tratamientos).



Fuente: elaboración propia

**Figura 18: Promedios de tratamientos en motilidad individual pre congelación**

**Cuadro 16: Promedios de motilidad individual con diferentes tratamientos de reducción de plasma seminal pre congelación (Comparación entre tratamientos)**

Tratamientos	Medias (%)	Prueba Duncan 5%
T4 (RPPS 60%)	76.50	A
T3 (RPPS 50%)	70.92	AB
T1 (TESTIGO)	69.17	B
T2 (RPPS 40%)	66.25	B

Fuente: elaboración propia

### 5.3. Tercera Parte

#### 5.3.1. Características microscópicas

##### 5.3.1.1. Motilidad individual con los diferentes tratamientos de reducción parcial de plasma seminal post congelación (Comparación entre tratamientos)

En el cuadro 17, se observa el análisis de varianza de la variable Motilidad Individual realizada en las tres repeticiones con los diferentes tratamientos aplicados al semen fresco (testigo, RPPS 40%, 50% y 60%) post congelación, donde se puede evidenciar que existe diferencias altamente significativas entre tratamientos.

El coeficiente de variación es de 8.48% que está clasificada como un valor bajo de acuerdo a Calzada (1983), indicando que los datos son confiables.

**Cuadro 17: Análisis de varianza de motilidad individual con diferentes tratamientos de reducción de plasma seminal post congelación (Comparación entre tratamientos)**

Fuente de variación	Grados de libertad	Sumatoria de cuadrados	Cuadrados medios	F - calculado	Pr. > f
<b>ANIMAL</b>	3	484.52	161.51	9.23	0,0001 **
<b>TRATAMIENTO</b>	3	236.12	78.71	4.5	0,0081 **
<b>Error</b>	41	717.25	17.49	-----	-----
<b>Total</b>	47	1437.89	-----	-----	-----

**C.V. = 8.48%**

Fuente: elaboración propia

En el cuadro 18 se observa los promedios de la variable de respuesta motilidad individual a la que se le aplico los diferentes tratamientos de reducción del plasma seminal (Testigo,

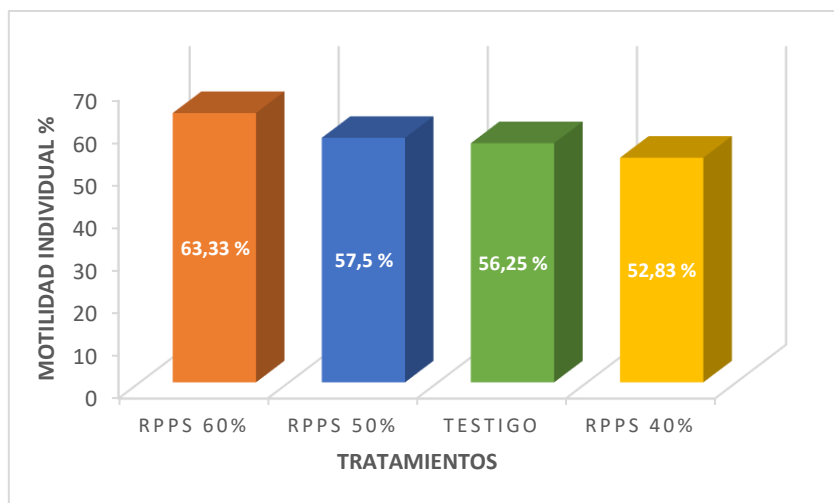
RPPS de 40%, 50% y 60%), donde el tratamiento con RPPS 60% obtuvo un promedio de recuperación de células espermáticas post congelación de 63.33%, siendo superior estadísticamente al tratamiento con RPPS 50% que obtuvo un promedio de recuperación de células espermáticas post congelación de 57.50%, al tratamiento con RPPS Testigo que obtuvo un promedio de recuperación de células espermáticas post congelación de 56.25% y al tratamiento con RPPS 40% que obtuvo un promedio de recuperación de células espermáticas post congelación de 52.83%, donde los tratamientos con RPPS del 50% y el Testigo obtuvieron promedios similares estadísticamente.

Al respecto Padilla y Castaneda (2006), obtuvieron en las razas Brahman, Romagnola, Pardo Suizo, Holstein y Angus, esto en Zamorano – Honduras un promedio de 36.75% en el caso del testigo y un promedio de 40.15% en el caso del tratamiento con una reducción parcial del plasma seminal del 50%, datos que son inferiores a los encontrados en el presente trabajo.

Por su parte Aké-López y Sánchez-Encalada (1997), obtuvieron de 6 toros cebú comercial (*Bosindicus*), esto en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Yucatán, un promedio de motilidad individual post congelación de 25% para el testigo y un promedio de 28.3% para el tratamiento con una reducción parcial del plasma seminal del 50%, siendo estos datos inferiores a los que se encontró en el presente trabajo de investigación.

En la figura 19 se observan los promedios de la variable de respuesta motilidad individual con diferentes tratamientos de reducción de plasma seminal post congelación (Comparación entre tratamientos).





Fuente: elaboración propia

**Figura 19: Promedios de tratamientos en motilidad individual post congelación**

**Cuadro 18: Promedios de motilidad individual con diferentes tratamientos de reducción de plasma seminal post congelación (Comparación entre tratamientos)**

Tratamientos	Medias (%)	Prueba Duncan 5%
T4 (RPPS 60%)	63.33	A
T3 (RPPS 50%)	57.50	AB
T1 (TESTIGO)	56.25	B
T2 (RPPS 40%)	52.83	B

Fuente: elaboración propia

## 5.4. Cuarta Parte

### 5.4.1. Características microscópicas pre y post congelación (Comparación de tratamiento entre toros)

5.4.1.1. *Motilidad individual con los diferentes tratamientos de reducción parcial de plasma seminal pre congelación por toro (Comparación de tratamientos entre toros)*

En el cuadro 19, se observa el análisis de varianza de la variable Motilidad Individual con los diferentes tratamientos de reducción parcial de plasma seminal (testigo, RPPS 40%, 50% y 60%), haciendo la comparación entre los toros en estudio pre congelación, donde se puede evidenciar que existe diferencias altamente significativas entre tratamientos.

El coeficiente de variación es de 7.76% y está clasificado como un valor bajo de acuerdo a Calzada (1983), demostrando que los datos son altamente confiables.

**Cuadro 19: Análisis de varianza de motilidad individual con diferentes tratamientos de reducción parcial del plasma seminal pre congelación por toro (Comparación de tratamientos entre toros)**

Fuente de variacion	Grados de libertad	Sumatoria de cuadrados	Cuadrados medios	F – calculado	Pr. > f
Tratamientos	15	1225.87	81.72	4.10	0.0004 **
Error experimental	32	637.93	19.94	-----	-----
Total	47	1863.80	-----	-----	-----
C.V. = 7.76%					

**Fuente: elaboración propia**

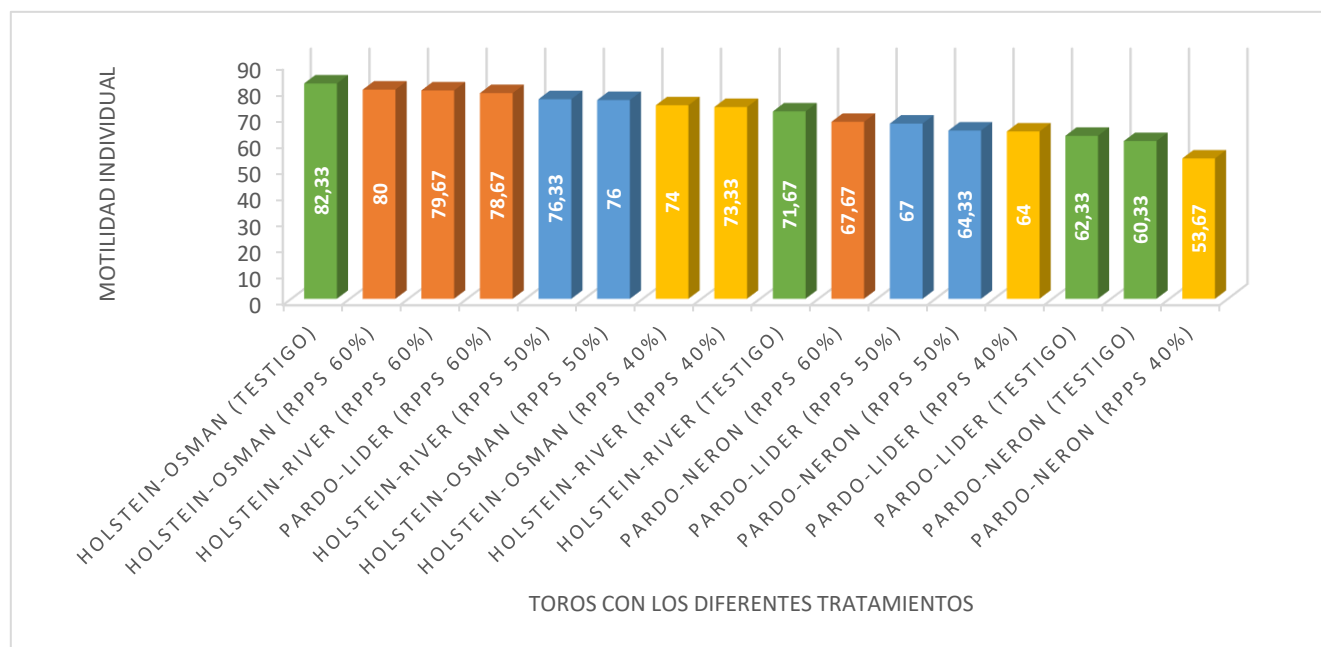
En el Cuadro 20 se observan los promedios de motilidad individual con los diferentes tratamientos de reducción parcial de plasma seminal (testigo, reducción parcial del plasma seminal de 40%, 50% y 60%) pre congelación en los cuatro toros en estudio, donde el toro Holstein “Osman” con el tratamiento de reducción parcial del plasma seminal Testigo obtuvo un promedio de 82.33%, con el tratamiento de reducción parcial del plasma seminal del 60% obtuvo un promedio de 80%, seguido del toro Holstein “River” con el tratamiento de reducción parcial del plasma seminal del 60% obtuvo un promedio de 79.67%, seguido del toro Pardo Suizo “Lider” con el tratamiento de reducción parcial del plasma seminal de 60% obtuvo un promedio de 78.67%, el toro Holstein “River” con el tratamiento de reducción parcial del plasma seminal del 50% obtuvo un promedio del 76.33%, seguido por el toro Holstein “Osman” que con el tratamiento de reducción parcial

del 50% obtuvo un promedio de 76%, el mismo que con el tratamiento de reducción parcial del plasma seminal del 40% obtuvo un promedio de 74%, el toro Holstein “River” con tratamiento de reducción parcial del plasma seminal de 40% obtuvo un promedio de 73.33%, el mismo que con el tratamiento de reducción parcial del plasma seminal Testigo obtuvo un promedio de 71.67%, el toro Pardo Suizo “Nerón” con el tratamiento de reducción parcial del plasma seminal del 60% obtuvo un promedio de 67.67%, el toro Pardo Suizo “Líder” con tratamiento de reducción parcial del plasma seminal de 50% obtuvo un promedio de 67%, el toro Pardo Suizo “Nerón” con tratamiento de reducción parcial del plasma seminal de 50% obtuvo un promedio de 64.33%, el toro Pardo Suizo “Líder” con el tratamiento de reducción parcial del plasma seminal del 40% obtuvo un promedio de 64%, mismo que con el tratamiento con reducción parcial del plasma seminal Testigo obtuvo un promedio de 62.33%, el toro Pardo Suizo “Nerón” con tratamiento de reducción parcial del plasma seminal Testigo obtuvo un promedio de 60.33%, mismo que finalmente con el tratamiento de reducción parcial del plasma seminal del 40% obtuvo un promedio de 53.67%.

Al respecto Padilla y Castaneda (2006), obtuvieron en las razas Brahman, Romagnola, Pardo Suizo, Holstein y Angus, esto en Zamorano – Honduras un promedio de motilidad individual pre congelación de 64.50% en el caso del testigo y un promedio de 69.75% en el caso del tratamiento con una reducción parcial del plasma seminal del 50%, datos que son inferiores a los encontrados en el presente trabajo.

Por su parte Aké-López y Sánchez-Encalada (1997), obtuvieron de 6 toros cebú comercial (*Bosindicus*), esto en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Yucatán, un promedio de motilidad individual pre congelación de 65.50% para el testigo y un promedio de 66.80% para el tratamiento con una reducción parcial del plasma seminal del 50%, siendo estos datos inferiores a los que se encontró en el presente trabajo de investigación.

En la figura 20 están representados los valores promedios de la variable de respuesta motilidad individual con diferentes tratamientos de reducción de plasma seminal pre congelación por toro (Comparación de tratamientos entre toros)



Fuente: elaboración propia

Figura 20: Promedios de tratamientos en motilidad individual pre congelación por toro

Cuadro 20: Promedios de motilidad individual con diferentes tratamientos de reducción parcial de plasma seminal pre congelación por toro (Comparación de tratamientos entre toros)

Tratamientos	Medias (%)	Prueba Duncan 5%
HOLSTEIN/RIVER (RPPS 60%)	82.33	A
HOLSTEIN/RIVER (RPPS 50%)	80	AB
HOSTEIN/OSMAN (TESTIGO)	79.67	AB
PARDO SUIZO/NERON (RPPS 60%)	78.67	AB
HOLSTEIN/RIVER (RPPS 40%)	76.33	ABC
HOLSTEIN/RIVER (TESTIGO)	76	ABC

HOLSTEIN/OSMAN (RPPS 60%)	74	ABCD
PARDO SUIZO/LIDER (RPPS 60%)	73.33	ABCDE
PARDO SUIZO/NERON (RPPS 50%)	71.67	ABCDE
HOLSTEIN/OSMAN (RPPS 50%)	67.67	BCDE
PARDO SUIZO/NERON (TESTIGO)	67	BCDE
HOLSTEIN/OSMAN (RPPS 40%)	64.33	CDEF
PARDO SUIZO/NERON (RPPS 40%)	64	CDEF
PARDO SUIZO/LIDER (RPPS 50%)	62.33	DEF
PARDO SUIZO/LIDER (RPPS 40%)	60.33	EF
PARDO SUIZO/LIDER (TESTIGO)	53.67	F

---

Fuente: elaboración propia

*5.4.1.2. Motilidad individual con los diferentes tratamientos de reducción parcial de plasma seminal post congelación por toro (Comparación de tratamientos entre toros)*

En el cuadro 21, se observa el análisis de varianza de la variable Motilidad Individual con los diferentes tratamientos de reducción parcial de plasma seminal (testigo, RPPS 40%, 50% y 60%), haciendo la comparación entre los toros en estudio post congelación, donde se puede evidenciar que existe diferencias altamente significativas entre tratamientos.

El coeficiente de variación es de 8.69% y está clasificado como un valor bajo de acuerdo a Calzada (1983), demostrando que los datos son altamente confiables.

**Cuadro 21: Análisis de varianza de motilidad individual con diferentes tratamientos de reducción parcial de plasma seminal post congelación por toro (Comparación de tratamientos entre toros)**

Fuente de variacion	Grados de libertad	Sumatoria de cuadrados	Cuadrados medios	F - calculado	Pr. > f
Tratamientos	15	849.99	56.67	3.08	0.0036 **
Error experimental	32	587.90	18.37	-----	-----
Total	47	1437.89	-----	-----	-----
C.V. = 8.69%					

**Fuente: elaboración propia**

En el Cuadro 22 se observan los promedios de motilidad individual con los diferentes tratamientos de reducción parcial de plasma seminal (testigo, reducción parcial del plasma seminal de 40%, 50% y 60%) post congelación en los cuatro toros en estudio, donde el toro Holstein “River” con el tratamiento de reducción parcial del plasma seminal del 60% obtuvo un promedio de 68.67%, con el tratamiento de reducción parcial del plasma seminal del 50% obtuvo un promedio de 65.67%, el toro Holstein “Osman” con el tratamiento Testigo obtuvo un promedio de 63.33%, seguido del toro Pardo Suizo “Nerón” con el tratamiento de reducción parcial del plasma seminal de 60% obtuvo un promedio de 63%, el toro Holstein “River” con el tratamiento de reducción parcial del plasma seminal del 40% obtuvo un promedio del 62.33%, con el tratamiento Testigo obtuvo un promedio de 61.67%, el toro Holstein “Osman” con tratamiento de reducción parcial del plasma seminal de 60% obtuvo un promedio de 61%, el toro Pardo Suizo “Líder” con tratamiento de reducción parcial del plasma seminal del 60% obtuvo un promedio de 60.67%, el toro Pardo Suizo “Nerón” con tratamiento de reducción parcial del plasma seminal de 50% obtuvo un promedio de 59.67%, el toro Holstein “Osman” con tratamiento de reducción parcial del plasma seminal de 50% obtuvo un promedio de 57%, el toro Pardo Suizo “Nerón” con el tratamiento Testigo obtuvo un promedio de 55.67%, el toro Holstein “Osman” con tratamiento de reducción parcial del plasma seminal de 40% obtuvo un promedio de 55%, el toro Pardo Suizo “Nerón” con tratamiento de reducción parcial del plasma seminal de 40% obtuvo un promedio de 49% y finalmente el toro Pardo Suizo “Líder” con tratamiento de reducción parcial del plasma seminal de 50% obtuvo un

promedio de 47.67%, con reducción parcial del plasma seminal de 40% obtuvo un promedio de 45% y con reducción parcial del plasma seminal Testigo obtuvo un promedio de 44.33%.

Al respecto Padilla y Castaneda (2006), obtuvieron en las razas Brahman, Romagnola, Pardo Suizo, Holstein y Angus, esto en Zamorano – Honduras un promedio de 36.75% en el caso del testigo y un promedio de 40.15% en el caso del tratamiento con una reducción parcial del plasma seminal del 50%, datos que son inferiores a los encontrados en el presente trabajo.

Por su parte Aké-López y Sánchez-Encalada (1997), obtuvieron de 6 toros cebú comercial (*Bos indicus*), esto en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Yucatán, un promedio de motilidad individual post congelación de 25% para el testigo y un promedio de 28.3% para el tratamiento con una reducción parcial del plasma seminal del 50%, siendo estos datos inferiores a los que se encontró en el presente trabajo de investigación.

En la figura 21 se presentan los valores promedios de la variable de respuesta motilidad individual con diferentes tratamientos de reducción parcial de plasma seminal post congelación por toro (Comparación de tratamientos por toro)



Fuente: elaboración propia

**Figura 21: Promedios de tratamientos en motilidad individual post congelación por toro**

**Cuadro 22: Promedios de motilidad individual con diferentes tratamientos de reducción parcial de plasma seminal post congelación por toro (Comparación de tratamientos entre toros)**

Tratamientos	Medias (%)	Prueba Duncan 5%
HOLSTEIN/RIVER (RPPS 60%)	68.67	A
HOLSTEIN/RIVER (RPPS 50%)	65.67	A
HOLSTEIN/OSMAN (TESTIGO)	63.33	AB
PARDO SUIZO/NERON (RPPS 60%)	63	AB
HOLSTEIN/RIVER (RPPS 40%)	62.33	AB
HOLSTEIN/RIVER (TESTIGO)	61.67	ABC
HOLSTEIN/OSMAN (RPPS 60%)	61	ABC
PARDO SUIZO/LIDER (RPPS 60%)	60.67	ABC
PARDO SUIZO/NERON (RPPS 50%)	59.67	ABC



HOLSTEIN/OSMAN (RPPS 50%)	57	ABCD
PARDO SUIZO/NERON (TESTIGO)	55.67	ABCD
HOLSTEIN/OSMAN (RPPS 40%)	55	ABCD
PARDO SUIZO/NERON (RPPS 40%)	49	BCD
PARDO SUIZO/LIDER (RPPS 50%)	47.67	CD
PARDO SUIZO/LIDER (RPPS 40%)	45	D
PARDO SUIZO/LIDER (TESTIGO)	44.33	D

---

**Fuente: elaboración propia**

A través de los análisis realizados en las muestras experimentales en estas últimas tres partes se obtuvo los siguientes resultados:

En primer lugar, se realizó el análisis correspondientes a las muestras de semen con los diferentes porcentajes de reducción parcial del plasma seminal (Testigo, 40%, 50% y 60%), esto comparando los cuatro tratamientos en las tres repeticiones, evaluando la variable de respuesta “motilidad individual”, en la que claramente sobresale como uno de los mejores planteamientos el tratamiento número cuatro (T4, RPPS 60%), con el que se logra obtener una mejora en cuanto a la recuperación de las células espermáticas pre y post congelación.

En segundo lugar, se realizó el análisis correspondiente pre y post congelación a las muestras de semen con los diferentes porcentajes de reducción parcial del plasma seminal (Testigo, 40%, 50% y 60%), realizando la comparación entre animales (toros), evaluando de igual manera la variable de respuesta “motilidad individual”, donde si observamos primeramente los datos de la evaluación realizada a las muestras por toro de pre congelación, se puede apreciar que el tratamiento uno (T1, Testigo) sobresale en el caso del toro Osman, y el tratamiento cuatro (T4, RPPS 60%) sobresale en los toros River, Líder y Nerón. Ahora bien si observamos los datos de la evaluación realizada a las muestras por toro post congelación, se puede apreciar que el tratamiento cuatro (T4,

RPPS 60%) sobresale en los toros River, Nerón y Líder, sin embargo, en el toro Osman, por más de ser relegado de un primer lugar a un tercer puesto luego de la post congelación, aun sobresale el tratamiento número uno (T1, Testigo) y como segundo lugar el tratamiento número cuatro (T4, RPPS 60%), por lo que no se descarta que este último logra obtener buenos resultados de recuperación de las células espermáticas post congelación.

Un motivo por el que el tratamiento uno (T1, Testigo) pudo sobresalir al tratamiento cuatro (T4, RPPS 60%), en el caso del toro Osman, podría deberse a la edad del animal, ya que los animales seleccionados Nerón, River, y Líder son aproximadamente similares en edad a excepción del toro Osman que fue uno de los toros más longevos dentro del grupo en estudio.

Finalmente, en este estudio se pudo evidenciar que existen diferencias significativas entre los diferentes tipos de tratamientos aplicados a las muestras de semen, si bien existe una diferencia entre la motilidad individual de las muestras de semen con los diferentes tratamientos en comparación con las muestras del grupo testigo, podríamos decir q están son muy ligeras. La superioridad observada probablemente se deba en parte a que la valoración se realiza en forma subjetiva y también a un efecto de concentración, ya que al centrifugar el semen y retirarle parte del plasma seminal hace que haya una mayor concentración de espermatozoides. En cuanto a las muestras de semen pre congelado, tanto la muestra testigo como las experimentales presentaron una reducción en el porcentaje de motilidad individual en comparación con las muestras en estado fresco, esto podría deberse al descenso de la temperatura por debajo de los 20°C que causa que el espermatozoide presente cambios biofísicos sobre todo en la membrana plasmática el cual afecta su motilidad individual. El proceso de congelación también provoco un efecto detrimental sobre la motilidad individual de los espermatozoides tanto en el testigo como en las muestras experimentales, esta disminución de motilidad individual comparada con la motilidad individual de pre congelación, se considera normal debido a los procesos por los que tiene que atravesar las muestras de semen, y en específico al choque térmico durante la congelación. En

cuanto al porcentaje de muestras viables post congelación, los datos obtenidos muestran que la remoción de una parte del plasma seminal tiene un efecto benéfico, sobre todo empleando el tratamiento numero cuatro (T4, RPPS 60%), ya que este tratamiento experimental presento un mayor porcentaje de recuperación de las células espermáticas post congelación.

## **6. CONCLUSIONES**

### **Primera Parte (Comparación entre toros)**

En el caso del color del semen fresco, se observó colores que variaron de “Blanco cremoso”, a “Amarillo cremoso”, a “Blanco amarillento”, y color “Crema”.

En el caso del olor del semen fresco se identificó en general un olor a “Leche fresca”.

Para el volumen del semen fresco se presentaron volúmenes que variaron de 8.83 ml a 7.17ml, 5.83ml y 4.83ml.

Para el pH, el semen fresco del toro Líder presentó un valor de 7; Osman presentó un pH de 6.93, Nerón un pH de 6.83 y River un pH de 6.83.

En los promedios de motilidad individual en el semen fresco por toro se logró observar que el toro de la raza Holstein “Osman” con edad de 4 años y 9 meses presentó una motilidad individual de 85.67%, siendo superior estadísticamente al toro de la raza Holstein “River” con edad de 1 año y 7 meses que presentó un promedio de 83.33%, al toro de la raza Pardo Suizo “Líder” con edad de 2 años y 5 meses que presentó un promedio de 76.33% y finalmente el toro de la raza Pardo Suizo “Nerón” con edad de 2 años y 5 meses que presentó un promedio de motilidad individual de 65.33%.

Para la concentración de semen fresco, el toro Líder alcanzó una mayor concentración, siendo superior estadísticamente a los toros River, Nerón y Osman.

Para el porcentaje de espermatozoides vivos en el semen fresco, el toro River alcanzó el mayor promedio, siendo superior a los toros Osman, Nerón y Líder.

Para el porcentaje de espermatozoides muertos en el semen fresco, el toro Líder alcanzó el mayor promedio, siendo superior a los toros Nerón, Osman y River.

Para el porcentaje de espermatozoides normales en el semen fresco, el toro Osman alcanzó el mayor promedio, siendo superior a los toros River, Líder y Nerón.

Para el porcentaje de espermatozoides anormales en el semen fresco, el toro Nerón alcanzó el mayor promedio, siendo superior a los toros Líder, River y Osman.

### **Segunda Parte (Comparación entre muestras experimentales pre congelación)**

Entre los promedios de motilidad individual realizados pre congelación en las muestras experimentales se observó que existen diferencias altamente significativas estadísticamente, ya que se apreció una superioridad en cuanto al contenido de células

espermáticas móviles dentro del mismo, esto se logró empleando el tratamiento número cuatro que es mediante la reducción parcial del plasma seminal de un 60% (RPPS 60%), concluyendo finalmente que la remoción de una parte del plasma seminal es benéfico ya que influye en la motilidad individual de las muestras pre congelación.

### **Tercera Parte (Comparación entre muestras experimentales post congelación)**

Entre los promedios de motilidad individual realizados post congelación en las muestras experimentales se observó que existen diferencias altamente significativas estadísticamente, ya que se apreció una superioridad en cuanto a la recuperación de las células espermáticas móviles dentro del mismo, esto se logró empleando el tratamiento número cuatro que es mediante la reducción parcial del plasma seminal de un 60% (RPPS 60%), concluyendo finalmente que la remoción de una parte del plasma seminal es benéfico ya que influye en la motilidad individual de las muestras post congelación.

### **Cuarta Parte (Comparación entre toros con las diferentes muestras experimentales)**

Entre los promedios de motilidad individual realizado pre congelación con las diferentes muestras experimentales comparando entre toros, se observó que existen diferencias altamente significativas estadísticamente, ya que el tratamiento número uno (T1, Testigo) sobre sale en caso del toro Osman, seguido por el tratamiento número cuatro (RPPS 60%), sin embargo se puede apreciar que en los tres toros restantes sobresale el tratamiento cuatro (RPPS 60%), por lo que se concluye que al retirar parte del plasma seminal es benéfico ya que influye en la motilidad individual de las muestras pre congelación.

Entre los promedios de motilidad individual realizado post congelación con las diferentes muestras experimentales comparando entre toros, se observó que existen diferencias altamente significativas estadísticamente, ya que el tratamiento número cuatro (T4, RPPS 60%) sobresale en tres de los toros en estudio, sin embargo en uno de ellos sobresale el tratamiento número uno (Testigo) aunque el tratamiento cuatro (RPPS 60%) se encuentra en segundo lugar, concluyendo finalmente que el tratamiento cuatro (RPPS 60%) es benéfico ya que influye en la motilidad individual de las muestras a través de una recuperación de las células espermáticas post congelación.

## 7. RECOMENDACIONES

- Se recomienda aplicar el método de reducción parcial del plasma seminal a todos los toros donadores de semen, evaluando siempre que existe respuestas positivas, ya que en algunos no mejora el porcentaje de motilidad individual, mientras que en otros es posible que este método ayude a la calidad de las muestras.
- Realizar investigaciones en cuanto al porcentaje ideal que se debe reducir de plasma seminal.
- Realizar estudios complementarios reduciendo porcentajes menores o mayores del plasma seminal, a los del presente trabajo para observar la calidad de las muestras donadas por los toros.
- Realizar estudios utilizando otro tipo de diluyentes para el proceso de crioconservación.
- Realizar investigaciones en otros animales como ovinos y porcinos con el método de reducción parcial del plasma seminal y la centrifugación de las muestras.
- Realizar investigaciones en otros animales de interés ganadero empleando el tratamiento de remoción parcial del plasma seminal de un 60% observando si este porcentaje de remoción influye en la recuperación de células espermáticas post congelación al igual que en el ganado vacuno.
- Capacitar al técnico procesador de semen en la manipulación, proceso de envasado y crio preservación de las muestras seminales.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Agca, Y. (2012). *Genome resource banking of biomedically important laboratory animals. Theriogenology 78: 1653-1665.*
- Aisen, E. G. (2004). *Reproduccion Ovina y Caprina.* Buenos Aires - Argentina: Editorial Intermedica.
- Aké-López, R., & Sánchez-Encalada., W. (1997). *Efecto de la remoción parcial del plasma seminal sobre la congelabilidad del semen bovino.* Yucatan - Mexico.
- Álamo-Santana, D. (2007). *Crioconservación y viabilidad espermática en la especie canina: utilización de nitrógeno líquido vs. ultracongelador de -152°C.* Tesis Doctoral. ULPG. Las Palmas - España.
- Alberto, R. J., Ivan, G. J., Antonio, V. G., Valeria, S. M., Daniel, M. P., Horacio, Á. G., . . . Fernando, D. L. (2018, 09 21). EFECTO DE LOS CRIOPRESERVADORES DE SEMEN CONGELADO BOVINO EN LA EXTRACCION DE DNA. MEXICO.
- Amann, R. P., & Pickett, B. W. (1987). *Principles of Cryopreservation and a Review of Cryopreservation of Stallion Spermatozoa. Equine Veterinary Science 7: 145 - 176.*
- Anchordoguy, T., Rudolph, A., Carpenter, J., & Crowe, J. (1987). *Mode of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. Cryobiology. 24: 324-31.*
- Angelino, O. J. (2009). *Manual de evaluación de semen en bovinos. Trabajo Práctico Educativo. FMVZ, Universidad Veracruzana. Veracruz, Ver.,Méx. pp. 30-37.* Mexico.
- Arguedas, R. (2006). *“Estudio de la suplementación de llamas lactantes y gestantes en condiciones de pastoreo en pradera nativa”.* Tesis de Grado. Universidad Mayor de San Andrés.
- Bajo, J. M., & Coroleu, B. (2009). *Fundamentos de reproducción. Médica Panamericana.* Madrid - España.
- Barszcz, K., Wiesetek, D., Wąsowicz, M., & Kupczyńska, M. (2012). *Bull Semen Collection and Analysis for Artificial Insemination. Journal of Agricultural Science, 4(3).*

- Barth, A. D., & Oko, R. J. (1989). *Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa*. Iowa State University Press.
- Bonadonna, T. (1986). *Reproducción Animal e Inseminación Artificial, primera edición*. Buenos Aires - Argentina 57- 234 p.: Editorial Hemisferio Sur S.A.
- Bradley, L. T. (1999). *Cryopreservation of Bovine Spermatozoa*. Master Science. Thesis. University of Guelph. Canada.
- Brogliatti, G., & Bó, G. (12 de septiembre de 2018). *Evaluación de la aptitud reproductiva del toro (Facultad de Ciencias Agropecuarias)*. Guest User.
- Cabrera, P., & Pantoja, C. (2012). *Viabilidad Espermática e Integridad del Acrosoma en Semen Congelado de Toros Nacionales*. Peru: Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, 23(2), 192-200.
- Cabrera, V. P., & Gutierrez, G. (2010). *Inseminación Artificial Como Herramienta de Mejora del Rendimiento Lechero*. Lima - Perú: Editorial de Extensión y Proyección Social.
- Calzada, J. (1983). *Métodos estadísticos para la investigación*. Lima - Peru: Milagros.
- Cancino, A. S. (2009). *Comparación de la motilidad postdescongelado del semen bovino criopreservado mediante la utilización de la técnica manual y automática con el diluyente comercial One Step*. Tesis Licenciatura. FMVZ, Universidad Veracruzana. Veracruz, Ver., Méx. p. 32. Mexico.
- Cardozo, J. A., Fernández, J. M., Forcada, F., Abecia, A., Muiño-Blanco, T., & Cebrían-Pérez, J. A. (2006 ). *Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analysed by twodimensional polyacrilamide gel electrophoresis*. *Theriodenology*; 66 (4): 841-50.
- Cavestany, D., & Mendez, J. (1993). *MANUAL DE INSEMINACION ARTIFICIAL EN BOVINOS*. Montevideo - Uruguay: Hemisferio Sur S.R.L.
- Crespo, E., & Moreno, A. Q. (2014). *Calidad seminal de toros criollo limonero*. *Revista Científica*, 24(6), 518-525.
- Curbelo, M. C., & Rodriguez, Z. R. (2013). *Relevamiento de laboratorios de procesamiento de semen bovino en Uruguay*. Recuperado el 26 de 06 de 2016, de <https://www.colibri.udelar.edu.uy/handle/123456789/2730>. Uruguay.
- D. (n.d.).



- Deutscher, H. G. (2010). *Aparato reproductor del toro*. Universidad de Nebraska (en línea): Consultado 12 de febrero de 2014. Disponible en: <http://66.147.240.184/~ganader1/articulos/?seccion=ver&categoria=reproduccion&nda=rep012>.
- Duarte, E. C. (2008). *Efecto de la aplicación de oxitocina sobre la calidad seminal en bovinos en el trópico húmedo*. Tesis Licenciatura. FMVZ, Universidad Veracruzana. Veracruz, Ver., Méx. p. 2. Mexico.
- Evans, G., & Maxwell, W. (1990). *Inseminación Artificial de Ovejas y Cabras*. 1era. Edición . Zaragoza-España.: Editorial Acribia, SA.
- Fizer, P. S., & Fairfull, R. W. (1986). *The effects of rapid Cooling (cold shock). Of ram semen, photoperiod, and egg yolk in diluents on me survival of spermatozoa before and after freezing* *Criobiology* 23: 518 - 524.
- Gallego, L. S. (s. f. ). *EFEECTO DE LA CONSERVACIÓN SOBRE LA FISIOLOGÍA ESPERMÁTICA DE SEMEN CAPRINO*. Madrid, España.
- Giles, R. M. (1993). *Evaluación y procesamiento de semen*. Memorias del 1er curso intensivo de Reproducción bovina. Noviembre 29, 30, Diciembre 1, 2, 3, y 4. pp. 1-4. Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán de Rosado, Sinaloa, Mexico. Mexico.
- Gloobe, H. (1989). *ANATOMIA APLICADA DEL BOVINO*. San Jose: Servicio Editorial del Instituto Interamericano de Cooperacion para la Agricultura (IICA).
- Gómez, M., & Migliorisi, A. L. (2007). *Protocolo para la evaluación de semen en rumiantes*. Cátedra Reproducción Animal Facultad de Cs. Veterinarias-UNLP. Buenos Aires - Argentina.
- Gomez, V., & Migliorisi, L. (s. f.). *Reproduccion Animal (Facultad de Ciencias Veterinarias - UNLP)*. Argentina.
- Gran, D. G., & Dott, H. M. (1976). *The ultrastructure of knobbed bull spermatozoa*. *J. Reprod. Fertil.* 47 (2), 407-408.
- Guerrero, G. D. (2014). *MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA LA COLECTA Y CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN BOVINO PARA LA EMPRESA SANTA CLARA GENÉTICA ESTADO PARANÁ – BRASIL*. BUCARAMANGA - COLOMBIA.

- Hafez, E. S. (2002). *Preservación y Criopreservación de Gametos y Embriones. En Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. Hafez, E. S. E y B. Hafez. Pp. 441-452. 7ª Edición. México, D. F.: Ed. Mc-Graw-Hill.*
- Hafez, E. S., & Hafez, B. (2000). *Reproduccion e Inseminacion Artificial en Animales Mc Graw Hill Interamericana.*
- Hafez, E., & Hafez, B. (2002). *Reproducción e inseminación artificial en animales 6ta edicion McGraw-Hill Interamericana. México, DF. Capitulo 1, 7, 13, 25, 30.*
- Hernandez, R. I. (s. f. ). *Anatomía del aparato reproductor masculino bovino.*
- Hidalgo-Ordóñez, C. O., Tamargo, M. C., & Diez, C. (2005). *Análisis del Semen Bovino. Tecnología Agroalimentaria. Boletín Informativo SERIDA. 2: 39-43.*
- Hochi, S., Semple, E., & Leibo, S. P. (1996). *Effect of cooling and warming rates during Cryopreservation on survival of in vitro-produced bovine embryos. Theriogenology. 46: 837-47.*
- Holdrige, H. (1982). *Artificial insemination of a bactrian camel (Camelus bactrianus). International Zoo Yearbook.*
- Howard, T. H., & Pace, 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.*
- Iguer-Ouada, M., & Verstegen, J. P. (2001). *Long-Term Preservation of Chilled Canine Semen: Effect of Commercial and Laboratory Prepared Extenders. Theriogenology. 55: 671-684.*
- Knobil, E., & Neil, J. D. (2003). *Spermatogenesis, Overview. Encyclopedia of reproduction vol.4. M – Pri. San Diego California.*
- Lahnsteiner, F., Berger, B., Horvarth, A., Urbanyi, B., & Weismann, T. (2000). *Cryopreservation of spermatozoa in cyprinid fishes. Theriogenology. 54:1477-1498.*
- Landsverk, K. (2000). *Packaging and distribution – Their impact on fertility. In: Johnston LA and Gutherie HD. (Editors). IV International Conference on Boar semen preservation. Maryland, USA. 137-139.*

- Macías, J. G., Magaña, A., Montoya, L. A., Rojas, L. A., & Villalba, L. A. (2003). *Evaluación del semen (En línea) Consultado 6.jun.2012. Disponible en: [www.visionveterinaria.com/articulos/119.htm](http://www.visionveterinaria.com/articulos/119.htm).*
- Mamani, J. (2007). *Introducción a la zootecnia*. Puno - Peru.
- Marquez, J. G. (2013, OCTUBRE 06). GENERALIDADES DE LA GANADERIA BOVINA. Chile.
- Maxwell, W., & Watson, P. (1996). *Recent progress in the preservation of ram semen. Anim. Reprod. Sci. 42: 55 - 65.*
- Mazur, P. (1984). *Freezing of living cells: mechanisms and implications. Am J Physiol. 247: 125-142.*
- McDonal, L. E. (1978). *Reproduccion y endocrinologia veterinaria. Trad. Dra. Georgina Guerrero. 2 ed. . Mexico: Nueva Editorial Interamericana, S A. 466p.*
- Medina-Robles, V. M., Velasco-Santamaría, Y. M., & Cruz-Casallas, P. E. (2005). *Aspectos generales de la crioconservación espermática en peces teleósteos. Rev Col Cien Pec 18: 34-48.*
- Melgar, M. S. (2017, 07 31). USO DE LA TECNICA DE INSEMINACION ARTIFICIAL COMO PILAR FUNDAMENTAL DEL MEJORAMIENTO GENETICO DE BOVINOS. MEXICO.
- Montero, A. (28 de noviembre de 2008). *Definicion y Estructura del Espermatozoide (En línea) (Citado el: 29 de noviembre de 2013) <http://es.scribd.com/doc/8481761/definicion-y-Estructura-Del-Espermatozoide>.*
- Morillo, M., Salazar, S., & Castillo, E. (2012). *Evaluación del potencial reproductivo del macho bovino. Maracay, VE, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias. pp. 23-28.*
- Moura, A. A., Koc, H., Chapman, D. A., & Killian, G. J. (2006). *Identification of proteins in the accessory sex gland fluid associated with fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. J Androl; 27: 201-11.*
- Muños, O. V. (16 de junio de 2011). *Fisiología de los espermatozoides bovinos. (En línea) (Citado el: 29 de noviembre de 2013) [http://www.avpa.ula.ve/libro\\_desarrollosost/pdf/capitulo\\_40.pdf](http://www.avpa.ula.ve/libro_desarrollosost/pdf/capitulo_40.pdf).*

- Nuñez, J. F., & Fernández, D. R. (2001). *Biotécnicas de la Reproducción Caprina y Ovina*. Ceará - Brasil: Editorial Fortaleza.
- Olivares, R., & Urdaneta, R. (1985). *Colección, Evolución y procesamiento del semen*. *Revista de difusión de tecnología agrícola y pesquera del FONAIAP No. 17*(En línea) Consultado 6 jun.2012. Disponible en: [www.ceniap.gov.ve/bdigital/fdivul/fd17/texto/coleccion.htm](http://www.ceniap.gov.ve/bdigital/fdivul/fd17/texto/coleccion.htm).
- Ordóñez, C. O., Miguel, C. T., & Monforte, C. D. (s. f. ). *Análisis del semen bovino*.
- Ortíz, N. (1999). *Estudio de las características espermáticas y de la criopreservación en espermatozoides epididimarios de ciervo ibérico obtenidos postmortem*. España: Universidad de Castilla- La Mancha.
- Pacheco, C. (2000). *Efecto de la tripsina y colagenasa sobre el acrosoma espermatozoide y su relación con la fertilidad del semen de alpaca*. MVZ Thesis, *Prog Med Vet Zootec Univ Catol Santa Maria*. Arequipa - Peru.
- Padilla, Á. H., & Castaneda, M. R. (Noviembre 2006). *Efecto de la disminución parcial del plasma seminal sobre la calidad biológica del semen bovino poscongelado*. Zamorano - Honduras.
- Pelayo, C. d. (1958). *LOS TOROS SEMENTALES*. Madrid - España: Graficas Uguina.
- Perez, P. R., Barrios, B., Muiño, B. T., & Celebrian, P. J. (2001). *Seasonal differences in ram seasonal plasma revealed by partition in an aqueous two-phase system*. *J Chromat*; 760: 113-121.
- Picerno, S. A. (2016). *Evaluación de la calidad seminal de reproductores bovinos antes y después del proceso de criopreservación*. Quito - Ecuador.
- Porrás, A., & Páramo, R. (2009). *Manual de prácticas de reproducción animal*. Mexico: UNAM.
- Quilla, G. Q. (2014). *SUPLEMENTACIÓN DEL SELENIO SOBRE LA CALIDAD ESPERMÁTICA DE SEMENTALES BOVINOS (Bos taurus) EN LA ESTACIÓN EXPERIMENTAL DE CHOQUENAIRA – LA PAZ*. La Paz.
- Quintero-Moreno, A. A., Rubio-Guillén, J. L., & González, D. M. (2009). *Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides de toros*. *Rev Cient FCV-LUZ*. 19.

- Ramos, S. (1996). *Anotaciones sobre inseminación artificial*. . Santa Fé de Bogotá. 92 p.: Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad de la Salle.
- Rangel, P. L. (2007). *Evaluación de la salud de sementales bovinos. Reproducción bovina, FMVZ-UNAM*.
- Rodriguez, O. L., Brendtson, W. E., Ennen, B. D., & Pickett, B. W. (1975). *Effects of Rates of Freezing, Thawing and Level of Glycerol on the Survival of Bovine Spermatozoa in Straws. J. Anim. Sci. 41, 129-136*.
- Rodríguez-Martínez, H. (1999). *Nuevas técnicas de evaluación de la fertilidad en el macho. II Congreso Ibérico de Reproducción Animal. pp: 302-316*.
- Rosas, J. (1997). *Fisiología y mejoramiento animal. INIFAP-SAGAR. Memorias del VI Curso de Actualización en reproducción animal. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias. Tabasco - Mexico*.
- Rosenberger, G. (1981). *Exploración clínica de los bovinos*. Buenos Aires - Argentina: Hemisferio Sur.
- Rutter, B., & Russo, A. (2006). *BASES PARA LA EVALUACION DE LA APTITUD REPRODUCTIVA DEL TORO*. Buenos Aires - Argentina.
- Salamon, S., & Maxwell, W. (2000). *Storage of ram semen. Anim. Reprod. Science 62:77 - 111*.
- Salisbury, W. G., Vandemark, L. N., & Lodge, R. J. (1961; 1978). *Fisiología de la Reproducción e Inseminación Artificial de los Bovinos*. Zaragoza - España: Editorial ACRIBIA.
- Sanchez, J. F. (1999). *EVALUACION DE SEMENTALES BOVINOS*. Mexico: "Corrella".
- Sanchez, R. C. (2003). *Crianza y Producción de Ganado Vacuno Leche*. Lima - Peru: Ediciones Ripalme.
- Setchell, B. (1998). *Head and the testis. J. Reprod. And Fertil 114: 179-194*.
- Strzezek, J., Wysocki, P., Kordan, W., & Kuklinska, M. (2005). *Preteomics of boar seminal plasma – current studies and possibility of their application in biotechnology of animal reproduction. Reprod Biol; 5: 279-90*.
- Tartaglione, C. M., & Ritta, M. N. (2004). *Prognostic Value of Spermatological Parameters as Predictors of in Vitro Fertility of Frozen-Thawed Bull Semen. Theriogenology. 62: 1245-1252*.

- Thundathil, J., Palasz, A. T., Barth, A. D., & Mapletoft, R. (2002). *Plasma membrane and acrosomal integrity in bovine spermatozoa with the knobbed acrosome defect. Theriogenology. 58 (1), 87-102.*
- Valenzuela, J. L. (7 de noviembre de 2009). *Manual de Evaluacion de Semen en Bovinos. (En línea)*  
<http://cdigital.uv.mx/bitstream/12345678/147/1/JOSe%20NICOLaS%ANGELINO%20OLIVERA.pdf>.
- Vallejo, M., Gutierrez, J., Alonzo, L., Cañon, J., Revuelta, J., Goyache, F., & Cima, M. (1992). CARATERISTICAS DE LAS CANALES DE LAS RAZAS BOVINAS ASTURIANAS. II VALORACION CUANTITATIVA Y PREDICCION DE L COMPOSICION TISULAR DE CANALES EN LA RAZA ASTURIANA DE LA MONTAÑA. MADRID, ESPAÑA.
- Velasco, M. A., & Miller, A. B. (2014). MEJORAMIENTO REPRODUCTIVO MEDIANTE UN PROGRAMA DE INSEMINACIÓN ARTIFICIAL A TIEMPO FIJO EN GANADO BOVINO EN EL PIEDEMONTE ARAUCANO, COLOMBIA. CORDOBA, COLOMBIA.
- Vera, M. O. (2001). *Evaluación seminal comparativa pre y postcongelación en machos bovinos. En: Reproducción Bovina. C. González-Stagnaro. Maracaibo-Venezuela. : Fundación Girarz 15: 251-262.*
- Vera, M. O., & Muñoz, M. G. (2005). *Manual de Ganadería Doble Propósito. Como mejorar la colección, manejo y calidad microbiológica del semen. Instituto de Reproducción Animal e Inseminación Artificial, FCV, UCV. Maracay. Dpto. Biología de los Organismos. Universidad Simon Bolivar. Caracas.*
- Vishwanath, R., & Shannon, P. (2000). *Storage of bovine semen in liquid and frozen state. Anim. Reprod. Sci. 62:23-53.*
- Woelders, H., Matthijs, A., & Engel, B. (1997). *Effects of trehalose and sucrose, osmolality of the freezing medium and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing. Cryobiology 35:93-105.*
- Yoshida, M. (2000). *Conservation of sperms: current status and new trends. Anim. Reprod. Sci. 60-61:349-355.*

Zemjanis, R. (1981). *Reproducción animal, diagnóstico y técnicas terapéuticas. 6ta Ed.*  
Mexico: Ed. Limusa. 253 p.