



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

FACULTAD AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES
RENOVABLES

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**EVALUACIÓN DE DOS DILUTORES
COMERCIALES (TRILADYL - ANDROMED) EN LA
VIABILIDAD ESPERMÁTICA DEL SEMEN BOVINO
REFRIGERADO A DIFERENTES HORAS POST-
COLECCIÓN**

Trabajo de tesis previo a la obtención del título de
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

AUTORA:

Michelle Alejandra Jaramillo Jaramillo

DIRECTOR:

Dr. Manuel Benjamín Quezada Padilla, Mg. Sc

Loja - Ecuador

2021

CERTIFICACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS

Dr. Manuel Benjamín Quezada Padilla, Mg.Sc

DIRECTOR DE TESIS

CERTIFICA

Que he revisado la presente tesis titulada **“EVALUACIÓN DE DOS DILUTORES COMERCIALES (TRILADYL – ANDROMED) EN LA VIABILIDAD ESPERMÁTICA DEL SEMEN BOVINO REFRIGERADO A DIFERENTES HORAS POST-COLECCIÓN”** realizada por la Srta. Egresada **MICHELLE ALEJANDRA JARAMILLO JARAMILLO**, la misma que **CULMINÓ DENTRO DEL CRONOGRAMA APROBADO**, cumpliendo con todos los lineamientos impuestos por la Universidad Nacional de Loja, por lo cual, **AUTORIZO QUE SE CONTINÚE CON EL TRÁMITE DE GRADUACIÓN.**

Loja, 26 de Agosto de 2020

Atentamente



MANUEL BENJAMÍN
QUEZADA PADILLA

Dr. Manuel Benjamín Quezada Padilla, Mg.Sc

Director de Tesis

CERTIFICACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

**EVALUACIÓN DE DOS DILUTORES COMERCIALES (TRILADYL – ANDROMED)
EN LA VIABILIDAD ESPERMÁTICA DEL SEMEN BOVINO REFRIGERADO A
DIFERENTES HORAS POST-COLECCIÓN**

POR

Michelle Alejandra Jaramillo Jaramillo

**Tesis presentada al tribunal de grado como requisito previo a la obtención del título de:
MÉDICO VETERINARIA ZOOTECNISTA**

HA SIDO APROBADO

Loja, 12 de Enero del 2021



**JORKY ROOSEVELT
ARMIJOS TITUANA**

Dr. Jorky Roosevelt Armijos Tituana, Mg. Sc.

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL



**ROCÍO DEL CARMEN
HERRERA HERRERA**

Dra. Rocío Del Carmen Herrera Herrera, Mg. Sc.

VOCAL



**EDGAR ENRIQUE
BENÍTEZ
GONZÁLEZ**

Dr. Edgar Enrique Benítez González, Ph.D.

VOCAL

AUTORÍA

Yo, **Michelle Alejandra Jaramillo Jaramillo**, declaro ser autora del presente trabajo de tesis que ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos, de posibles reclamos o acciones legales, por el contenido de la misma; los conceptos, ideas, resultados, conclusiones y recomendaciones vertidos en el desarrollo del presente trabajo de investigación, son de absoluta responsabilidad de su autor.

Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja, la publicación de mi tesis en el Repositorio Institucional-Biblioteca Virtual.

FIRMA:

AUTOR: Michelle Alejandra Jaramillo Jaramillo

CÉDULA: 1105891178

FECHA: 12 de enero de 2021

CARTA DE AUTORIZACIÓN

Yo, **Michelle Alejandra Jaramillo Jaramillo**, declaro ser la autora de la tesis titulada “EVALUACIÓN DE DOS DILUTORES COMERCIALES (TRILADYL – ANDROMED) EN LA VIABILIDAD ESPERMÁTICA DEL SEMEN BOVINO REFRIGERADO A DIFERENTES HORAS POST-COLECCIÓN”, como requisito para optar el grado de Médica Veterinaria Zootecnista, autorizo al Sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que con fines académicos, muestre al mundo la reproducción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera, en el Repositorio Digital Institucional (RDI); Las personas pueden consultar el contenido de este trabajo en el RDI, en las redes de información del país y del exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad. La Universidad Nacional de Loja, no se responsabiliza por el plagio o copia de la tesis que realice un tercero, con fines académicos, para constancia de esta autorización, firmo en la ciudad de Loja, a los 12 días del mes de Enero del año 2021.

FIRMA:

Autor: Michelle Alejandra Jaramillo Jaramillo

Cédula de identidad: 1105891178

Dirección: Loja, Rumania e Irlanda, Barrio Reinaldo Espinoza

Correo electrónico: majaramilloj@unl.edu.ec

Teléfono: 0967232932

DATOS COMPLEMENTARIOS

Director de Tesis:

Dr. Manuel Benjamín Quezada Padilla, Mg.Sc.

Tribunal de Grado:

Dr. Jorky Roosevelt Armijos Tituana, Mg. Sc. (Presidente)

Dra. Rocío Del Carmen Herrera Herrera, Mg. Sc. (Vocal)

Dr. Edgar Enrique Benítez González, Ph.D. (Vocal)

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi sincera gratitud a Dios por haberme bendecido y guiado a lo largo de mi vida, por ser el soporte y fortaleza en aquellos momentos de dificultad y debilidad.

A mis padres por su apoyo incondicional, por su esfuerzo, dedicación, paciencia, por su confianza y por todo lo que me han brindado a lo largo de mi carrera y de mi vida.

Agradezco a mi Director de Tesis Dr. Manuel Quezada y Dr. Hugo Viñan, quienes me guiaron académicamente con su experiencia y profesionalismo.

Michelle Alejandra Jaramillo Jaramillo

DEDICATORIA

Por su amor, cariño, comprensión, trabajo y sacrificio quiero dedicar esta tesis de grado a mis padres Mauro Jaramillo Churo y Martha Jaramillo Jaramillo, gracias por inculcar en mí, el ejemplo de esfuerzo, dedicación y valentía

A mis hermanas Alisson, Andrea y mi cuñado Anderson, por estar siempre pendientes cada paso que doy y sobre todo por creer siempre en mí.

Jonh Paul por tu apoyo fundamental durante todo el proceso, por estar siempre junto a mí en los momentos más difíciles.

Y sobre todo dedico este logro a ese ser de luz que hace que mis días sean maravillosos mi hija Sofía Guadalupe por ser mi fuente de inspiración y motivación para poder superarme y salir a delante.

Michelle Alejandra Jaramillo Jaramillo

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	XIV
ABSTRACT.....	XV
1. INTRODUCCIÓN	XV
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	2
2.1 Evaluación del Toro Reproductor	2
2.1.1 Examen clínico y físico general.....	3
2.1.2 Examen de órganos sexuales externos	4
2.2 Manejo Nutricional.....	6
2.3 Conducta Sexual del Macho.....	8
2.4 Colecta y valoración del semen bovino	9
2.5 Evaluación del Semen Bovino	12
2.5.1 Examen Macroscópico	12
2.5.2 Examen Microscópico.....	13
2.6 Refrigeración del Semen Bovino.....	15
2.6.1 Diluyentes utilizados para la refrigeración del semen bovino.....	16
2.6.2 Principios de preservación de semen.....	17
3. MATERIALES Y MÉTODOS	19
3.1. Materiales	19
3.1.1. Materiales de campo	19
3.1.2. Materiales de laboratorio	19

3.1.3.	<i>Materiales de oficina</i>	20
3.2.	Métodos	21
3.2.1.	<i>Ubicación</i>	21
3.2.2.	<i>Descripción e identificación de las unidades experimentales</i>	22
3.2.3.	<i>Manejo de las unidades experimentales</i>	22
3.2.4.	<i>Variables de estudio</i>	23
3.2.5.	<i>Metodología de evaluación</i>	24
3.2.6.	<i>Descripción de los tratamientos</i>	29
3.2.7.	<i>Diseño experimental</i>	30
3.2.8.	<i>Análisis estadístico</i>	31
4.	RESULTADOS	32
4.1.	Características Macro y Microscópicos de las Muestras Seminales de las Bovinos Brown Swiss y Holstein en Fresco	32
4.2.	Características Microscópicas de las Muestras Seminales de los Bovinos Brown Swiss y Holstein Post Refrigeración a Diferentes Horas con los Dilutores	34
4.3.	Características Microscópicas de las Muestras Seminales de los Bovinos Brown Swiss y Holstein Post Refrigeración	40
5.	DISCUSION	46
6.	CONCLUSIONES	51
7.	RECOMENDACIONES	52
8.	BIBLIOGRAFÍA	53
	ANEXOS	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Calificación del libido sexual del toro	8
Tabla 2. Calificación del toro según el libido	9
Tabla 3. Evaluación de la motilidad progresiva.....	14
Tabla 4. Anomalías morfológicas	15
Tabla 5. Variables de estudio.....	23
Tabla 6. Características de la concentración espermática.....	24
Tabla 7. Diseño experimental	31
Tabla 8. Características macro y microscópicas de las muestras seminales de las razas Brown Swiss y Holstein en fresco	32
Tabla 9. Características microscópicas de las muestras seminales de las razas Brown Swiss y Holstein post refrigeración a diferentes horas con los dilutores	34
Tabla 10. Motilidad Individual de las Muestras Seminales de los Bovinos Brown Swiss y Holstein Post Refrigeración a Diferentes Horas con el Dilutor AndroMed	35
Tabla 11. Vitalidad de las Muestras Seminales de los Bovinos Brown Swiss y Holstein Post Refrigeración a Diferentes Horas con el Dilutor AndroMed.....	36
Tabla 12. Motilidad Masal de las Muestras Seminales de los Bovinos Brown Swiss y Holstein Post Refrigeración a Diferentes Horas con el Dilutor Triladyl	37
Tabla 13. Motilidad Individual de las Muestras Seminales de los Bovinos Brown Swiss y Holstein Post Refrigeración a Diferentes Horas con el Dilutor Triladyl.....	38
Tabla 14. Vitalidad de las Muestras Seminales de los Bovinos Brown Swiss y Holstein Post Refrigeración a Diferentes Horas con el Dilutor Triladyl	39
Tabla 15. Motilidad Masal de las Muestras Seminales de los Bovinos Brown Swiss Post Refrigeración	40

Tabla 16. Motilidad Individual de las Muestras Seminales de los Bovinos Brown Swiss Post Refrigeración	41
Tabla 17. Vitalidad de las Muestras Seminales de los Bovinos Brown Swiss Post Refrigeración....	42
Tabla 18. Motilidad Masal de las Muestras Seminales de los Bovinos Holstein Post Refrigeración	43
Tabla 19. Motilidad Individual de las Muestras Seminales de los Bovinos Holstein Post Refrigeración	44
Tabla 20. Vitalidad de las Muestras Seminales de los Bovinos Holstein Post Refrigeración.....	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vagina Artificial Bovina	10
Figura 2. Motilidad progresiva	13
Figura 3. Prueba de Vitalidad	14
Figura 4. Límites de la Provincia de Gonzanama	21
Figura 5. Características Macroscópicas de las Muestras Seminales	33

**“EVALUACIÓN DE DOS DILUTORES COMERCIALES
(TRILADYL - ANDROMED) EN LA VIABILIDAD
ESPERMÁTICA DEL SEMEN BOVINO REFRIGERADO
A DIFERENTES HORAS POST-COLECCIÓN”**

RESUMEN

Entre las biotecnologías reproductivas que permiten potenciar la producción bovina es la inseminación artificial, técnica que presenta grandes ventajas en el progreso genético animal. Entre las limitantes de esta técnica se encuentra el bajo porcentaje de viabilidad espermática durante el procesamiento del semen refrigerado y crio preservado. El presente trabajo fue realizado en la parroquia Nambacola, cantón Gonzanamá, provincia de Loja. El objetivo de esta investigación fue evaluar dos dilutores comerciales (Triladyl - AndroMed) en la viabilidad espermática del semen bovino refrigerado a las 12, 24, 36 y 48 horas post-colección; se utilizaron 2 toros de la raza Brown Swiss y Holstein Friesian, con edades entre dos a cuatro años, con una buena condición corporal (3.5), los mismos que fueron colectados utilizando la vagina artificial; se extrajo 10 eyaculados por cada ejemplar obteniendo un total de 20 muestras. El semen fue diluido en AndroMed y Triladyl, posteriormente fue empajillado y refrigerado en pajuelas de 0.5 ml a una temperatura de 5 °C hasta el momento de su evaluación. En el análisis post refrigeración la raza bovina Brown Swiss obtuvo los mejores resultados para la valoración macro y microscópica con un volumen de 5.55 ml, una concentración espermática de 675 millones spz/ml, motilidad masal de 82.6%, motilidad individual de 74.6% y una vitalidad de 83%, mientras que la raza bovina Holstein demostró valores inferiores con un volumen de 3.7 ml, una concentración espermática de 500 millones spz/ml, motilidad masal de 76%, motilidad individual de 67.8% y una concentración espermática de 75.8%; en cuanto al tiempo de refrigeración post colección y dilutor utilizado según los valores obtenidos se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) a las 12 horas con el dilutor Triladyl presentando mejores características frente a los demás tratamientos con un 83.2%. Los resultados se analizaron mediante un análisis ANOVA, para evaluar el efecto de las diferentes horas con respecto a los dilutores y razas.

Palabras clave: AndroMed; Triladyl; refrigeración; Brown Swiss; Holstein Friesian.

ABSTRACT

Between the reproductive biotechnologies that allow enhance bovine production is the artificial insemination, a technique that present great advantages in the animal genetic progress. Between the limitations of this technique is the low percentage of sperm viability during procecution of chilled semen cryopreserved. The present work was realized in Nambacola parish, Gonzanamá canton, Loja province. The objetive of this research was to evaluate two commercial dilutors (Triladyl - AndroMed) in the spermatic viability of chilled bovine semen at 12, 24, 36 and 48 hours post-collection; 2 Brown Swiss and Holstein Friesian breed bulls were used, with ages between two and four years, with a good body condition (3.5), the same ones that were collected using the artificial vagina; 10 ejaculates were extracted for each specimen, obtaining a total of 20 samples. The semen was diluted in AndroMed and Triladyl, later it was packed and refrigerated in straws of 0.5ml at a temperature of 0.5°C until the moment of its evaluation. In the analysis postrefrigeration the Brown Swiss bovine breed got the best results to the valoration micro and macroscopic with a volume of 5.55ml, a spermatic concentration of 675 millions spz/ml, mass motility of 82.6%, individual motility of 74.6% and a vitality of 83%, while the Holstein bovine breed showed lower values with a volume of 3.7ml, a spermatic concentration of 500 millions spz/ml, mass motility of 76%, individual motility of 67.8% and a spermatic concentration of 75.8%, regarding the post-collection refrigeration time and dilutor used according the values obtained, statistically significant differences ($P < 0.05$) were found at 12 hours with the Triladyl dilutor presenting better characteristics compared to the other treatments with 83.2%. The results were analyzed using an ANOVA analysis, to evaluate the effect of the different hours with respect to diluters and races.

Keywords: AndroMed; Triladyl; refrigeration; Brown Swiss; Holstein Friesian.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, una de las técnicas más utilizadas en el mejoramiento genético en bovinos y otras especies de interés zootécnico es la inseminación artificial, que presenta grandes ventajas en el progreso genético animal, prevención de enfermedades reproductivas y rentabilidad, entre otras; entre las limitantes de esta técnica se encuentra el bajo porcentaje de viabilidad espermática durante el procesamiento del semen refrigerado y crio preservado.

Esta biotecnología reproductiva en el país se encuentra en proceso de difusión e implementación con buenos resultados. Según cifras del Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, en el Ecuador existe un total de 4,31 millones de cabezas de ganado vacuno a nivel nacional, de los cuales a la región sierra le corresponde un 51,69% y en la provincia de Loja se registra 138.125 bovinos (INEC, 2019). Por tanto, se hace imperante buscar alternativas que garanticen una buena viabilidad espermática durante el procesamiento del semen que será utilizado en la reproducción asistida a través de la inseminación artificial.

El semen bovino también puede llegar a ser conservado por períodos cortos, manteniéndolo refrigerado; la utilización del mismo ofrece ventajas adicionales como: preservar la viabilidad espermática, garantizar una mayor longevidad y menores daños celulares comparado al semen crio preservado (Rodríguez, 2019).

Los espermatozoides crio preservados presentan una disminución de la calidad seminal, esto debido al shock térmico (cambios osmóticos y formación de hielo celular) que se somete el esperma durante las fases de congelación, por lo tanto, se encuentra una alternativa más rentable en el uso del semen refrigerado debido a sus ventajas.

Los diluyentes comerciales con adición de proteína animal, como es la yema de huevo, han tenido éxito en trabajos investigativos, demostrando mayor ventaja en Motilidad Total y Vitalidad espermática, tomando en cuenta que el AndroMed (diluyente a base de lecitina de soya) es de fácil preparación, en comparación al Triladyl (diluyente a base de yema de huevo).

Considerando los aspectos citados anteriormente, en la presente investigación se planteó evaluar dos dilutores comerciales (Triladyl - AndroMed) tomando en cuenta alternativas que permitan conservar la viabilidad espermática del semen bovino, a través del análisis de características micro y macroscópicas en semen refrigerado a diferentes horas post-colección, con la finalidad de lograr una mayor longevidad y menores daños celulares.

Para la ejecución del presente trabajo de investigación, se plantearon los siguientes objetivos:

- Evaluar la calidad macroscópica del semen bovino en las dos razas.
- Determinar las características microscópicas del semen refrigerado a las 12, 24, 36 y 48 horas post colección utilizando dilutor AndroMed y Triladyl.
- Determinar las características microscópicas del semen refrigerado a las 12, 24, 36 y 48 horas post colección en las razas analizadas.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Evaluación del Toro Reproductor

La evaluación de la aptitud reproductiva es un método práctico y preciso, según diferentes parámetros: estado de salud del animal, aparato reproductor, características seminales, determinación de la libido y aptitud de monta (Vargas, 2012).

Haciendo referencia a esta evaluación se trata de un examen en el cual se puede llegar a reconocer animales sub fértiles e infértiles, donde los mismos pueden llegar a alterar el éxito de un hato reproductivo, según algunos estudios, entre el 3% y el 30% de los reproductores manejados no son del todo capaces para la reproducción, pues presentan algún tipo de alteración, algunos presentan una evaluación reproductiva no satisfactoria es decir infértiles o poco satisfactoria sub fértiles.

Así mismo se han encontrado diversos métodos de valoración; dentro de los más empleados está el expuesto por Parkinson, citado por Chapwanya et al., el cual implica tres aspectos: examen clínico, evaluación de la libido y evaluación de la calidad seminal; a través del análisis de estos aspectos se consigue determinar la aptitud y el potencial reproductivo que puede llegar a presentar un reproductor, siendo de gran importancia (Paéz, 2014).

Cabe señalar que se debe tener como principal objetivo lograr animales superiores que den origen a una progenie más fructífera y rentable, teniendo en cuenta que se debe llegar a seleccionar machos de excelente calidad para ser utilizados en monta natural o en programas de inseminación artificial.

Al mismo tiempo deberán ser escogidos aquellos reproductores que produzcan la mayor cantidad de espermatozoides viables y sobre todo aquellos que poseen de excelentes condiciones físicas para depositar el semen en la vagina de la hembra o en la vagina artificial en el lugar correcto; su aptitud de monta y deseo sexual deberán ser lo adecuadamente buenos como para saltar el mayor número de hembras en el menor tiempo posible (Vargas, 2012).

Sin embargo, hay que tener en cuenta uno de los factores de gran importancia dentro de esta evaluación, como es el medioambiente donde se explota el animal, siendo de gran significancia debido a la calidad de la alimentación, de los factores climáticos y del manejo que se le brinda al mismo. Los factores climáticos a tener en cuenta son la temperatura, la humedad relativa y la radiación solar, el estrés térmico implica efectos en los mecanismos termorreguladores, de la misma manera altera el proceso de producción de espermatozoides, deteriorando la calidad del eyaculado y, por ende, la fertilidad del toro (Cardozo, 2002).

2.1.1 Examen clínico y físico general

En la evaluación reproductiva del macho, el primer paso a realizar es el examen clínico general, dentro de la cual involucra la evaluación del estado físico del animal y en específico de los órganos sexuales externos e internos; de modo que deben ser evaluados por palpación o inspección, esencialmente el tren posterior, el estado puede ser considerado bueno, malo o irregular, basado en el examen visual de la condición corporal y peso del animal (Vargas, 2012).

Dentro del examen físico externo del toro debe tomarse en cuenta: su caminar, trotar, ver, oler y tener la capacidad de detectar y servir hembras en celo, cualquier elemento de los antes citados que afecte una de estas acciones presentara consecuencias, como una menor eficiencia reproductiva del macho (Ludeña, 2019).

Sin embargo, hay que tomar en cuenta un punto de gran importancia antes de llevar a cabo el examen físico clínico general al reproductor, ya que es beneficioso valorar su historia clínica debido a su gran valor, en esta parte se pueden conseguir datos relevantes con respecto a su identificación y origen que pueden indicarnos si es adecuado o no seleccionar dicho reproductor. De la misma manera, es fundamental obtener información acerca de la fertilidad de los padres y averiguar acerca de las patologías que hayan sufrido antes y que puedan llegar a afectar sus órganos y sistemas corporales (Cardozo, 2002).

2.1.2 Examen de órganos sexuales externos

2.1.2.1 Examen del prepucio.

La cavidad prepucial es uno de los principales lugares donde suelen presentarse infecciones genitales, razón por la cual se debe realizar una minuciosa inspección tanto en forma, tamaño, pendulosidad, orificio y aglutinación de pelos prepuciales, tomando en cuenta que se deberá palpar el orificio y cavidad prepucial en búsqueda de posibles abscesos, cicatrices o adherencias que pueden provocar Fimosis o parafimosis, para así descartar problemas que pueden llegar a incidir en la habilidad del macho para copular (Boggio, 2007).

2.1.2.2 Examen del pene.

El pene es una estructura fibro elástica que contiene una flexura sigmoidea que le da la posibilidad de expandirse al momento de la erección, es el órgano copulador en los machos, teniendo en cuenta que los problemas más comunes que afectan a toros jóvenes es la papilomatosis, anormalidades como desviaciones en "S", en espiral y en arco iris se debe realizar un examen del pene de la misma forma en que se debe examinar la integridad de la mucosa, presencia de cicatrices, abscesos, hematomas, heridas, papilomatosis, frenillo persistente, integridad del orificio uretral, anillo de pelos.

Sin embargo es conveniente comprobar estas afecciones únicamente en el momento de la monta ya que el pene debe estar en completa erección para que se manifiesten y puedan reconocer dichas anormalidades (Páez, 2014).

2.1.2.3 Examen del escroto.

El escroto del toro debe ser observado y evaluado en su integridad, se debe palpar detenidamente para determinar su delicadeza al tacto y descartar la presencia de cicatrices que demuestren deterioro del mismo, en igual forma hay que prestar atención a eventuales asimetrías, al desplazamiento de testículos y a la superficie de la piel y pelos del escroto (Barragán, 2017).

2.1.2.4 Circunferencia escrotal.

Al momento de evaluar el tamaño escrotal hay que tener en cuenta que está íntimamente correlacionado con volumen y peso testicular, al medir el mismo en forma objetiva se mide secundariamente el tamaño y peso de los testículos; de esta manera la circunferencia escrotal está influida por el peso, edad y raza, crecimiento y nutrición, factores muy importantes que deben tenerse en cuenta cuando se mida, para el Bos taurus se toma una circunferencia escrotal mínima de 31 cm a los 18 meses, para Bos indicus la medida mínima es de 27 cm a los 24 meses (Boggio, 2007).

2.1.2.5 Examen de Testículos.

Este examen se lleva a cabo por medio de inspección y palpación, los testículos cambian en cierta manera y durante el examen debe tomarse en cuenta la presencia de estas características con respecto a su tamaño, consistencia, desplazabilidad, aumento de temperatura, sensibilidad a la presión, forma y situación, aunque su estructura fundamental es igual.

Tomando en cuenta para realizar la inspección como palpación, se debe rodear la base del saco escrotal desde atrás con una mano realizando una pequeña presión con los pulgares y se desplaza el testículo hacia abajo hasta que el escroto esté tenso y sin pliegues (Barragán, 2017).

2.2 Manejo Nutricional

Dentro del manejo nutricional, la alimentación es un componente fundamental para una buena salud de los animales y así puedan demostrar su potencial productivo y reproductivo, los toros más fértiles son aquellos manejados en una excelente producción de pastos sin el suministro de grano, uno de las principales requerimientos es poseer una adecuada condición corporal para que cada macho pueda llegar a fecundar el mayor número posible de hembras en un corto período de tiempo (Gualancañay, 2012).

En el aspecto nutricional, es importante recalcar, que a parte de la calidad del alimento brindado, el vínculo que existe entre la energía y proteína, vitaminas y minerales, y sobre todo la cantidad y calidad del agua que se provea al animal, tomando en cuenta la época en que se encuentre de altas temperaturas, la deshidratación originada en estas condiciones producirá trastornos en el proceso de la espermiogénesis (Cardozo, 2002).

La condición corporal y sus cambios son mayormente indicadores del estado nutricional que del peso corporal, teniendo en cuenta que este es un método para evaluar el estado físico del macho, así mismo se lo realiza por medio de la evaluación visual, a través de la cual nos permite evaluar las reservas energéticas, siendo posible juzgar si las condiciones nutricionales de los toros son adecuadas para el servicio a campo.

La condición corporal del macho debe ser óptima; de 2.5 a 3 en un rango 1 - 5, machos con una nutrición deficiente y con bajo peso corporal pueden presentar problemas como testículos lesionados, es por ello que se debe mantener una alimentación equilibrada con administración de sales minerales y un correcto manejo de los reproductores para obtener características reproductivas favorables, es recomendable no escoger machos menores a 18 meses de edad con baja condición corporal (Vargas, 2012).

El suministro de raciones de energía en bajo porcentaje, administrados por tiempos prolongados a reproductores han presentado alteraciones en su libido y la producción de testosterona, de la misma forma la falta de proteína disminuye la libido y las características seminales de toros jóvenes; por otra parte, la carencia de vitamina A provoca deterioro testicular.

No obstante, el suministro deficiente de yodo suele ser causante de una baja libido y semen de baja calidad. Así mismo se puede señalar que, según estudios se ha comprobado que la administración de cobre, cobalto, zinc y manganeso, en la alimentación del reproductor mejoran notablemente su producción de espermatozoides y su fertilidad (Cardozo, 2002).

Tomando en cuenta que lo recomendable para que un toro reproductor presente un excelente potencial productivo y reproductivo, debe ser una adecuada nutrición, siendo la misma de un 2 a un 3% de su peso vivo de materia seca; así mismo las necesidades de agua que requiere un bovino van a variar dependiendo de algunos factores como la edad del animal, el clima en el que se encuentre y el consumo de materia seca, el mismo necesita alrededor de 60 - 80 litros/animal/día. De la misma manera los requerimientos de proteína oscilan entre 70 – 100 g/animal/día de proteína digestible por cada kilogramo de materia seca ingerida.

Los principales minerales que requieren los bovinos son: calcio, fosforo, magnesio, potasio, sodio, entre otros, de la misma forma unos se requieren en mayor cantidad que otros y tomando en cuenta que se debe administrar un consumo de sal mineralizada de 60 g/animal/día (Bueno, 2018).

2.3 Conducta Sexual del Macho

El comportamiento sexual del toro es de gran relevancia ya que es uno de los factores que intervienen en el éxito de la cópula y en la supervivencia de las crías, debe señalarse que este está estimado por el tiempo de reacción o habilidad sexual, libido y capacidad de servicio, valorados a partir de los 24 meses de edad. La libido se define como aquella habilidad o deseo de un toro para efectuar la copulación, siendo tan significativa como la calidad seminal para garantizar el éxito del programa reproductivo del hato; se lo valora de acuerdo al tiempo de reacción en un periodo de 10 minutos (Vargas, 2012).

Según la evaluación de la libido, descrita por Chenoweth (1981, 1990) está evaluada en una escala de puntaje de acuerdo a la actitud del macho al contacto con la hembra y se la expone de la siguiente manera:

Tabla 1.

Calificación del Libido Sexual del Toro

Calificación	Características
0	El toro no muestra interés sexual
1	Demuestra interés sólo una vez
2	Interés sexual más de una vez
3	Búsqueda activa con persistente interés sexual
4	Una monta o intento de monta sin servicio
5	Dos montas o intentos de monta sin servicio
6	Más de dos montas o intentos de monta sin servicio
7	Un servicio seguido de desinterés sexual
8	Un servicio seguido de interés con montas o intentos
9	Dos servicios seguidos de desinterés sexual
10	Dos o más servicios seguidos por interés sexual con montas
11	o intentos de monta

Autor: De la torre (1999)

Y la calificación está dada de la siguiente manera:

Tabla 2.
Calificación del Toro según el Libido

Calificación	Característica
0 – 3	Malo
4 – 6	Bueno
7 – 8	Muy bueno
9 – 10	Excelente

Autor: De la torre (1999)

2.4 Colecta y valoración del semen bovino

Se debe tener en cuenta que al momento de realizar el procedimiento para la refrigeración del semen, se debe llevar a cabo una correcta colecta seminal, evitando alteraciones en la misma (Ludeña, 2019).

Por consiguiente el proceso de colecta debe ser higiénico y se debe de evitar el shock térmico de los espermatozoides (Barragán, 2017).

La colecta del semen se puede realizar mediante dos métodos:

- Electro eyaculación
- Vagina artificial.

2.4.1 Estimulo sexual antes de la colecta.

En cuanto a la conducta sexual o de cortejo hay que tener en cuenta algunos factores como son el despertar sexual, exhibición sexual, erección, protrusión del pene, monta, introducción, eyaculación, desmonta y la retracción del pene, la preparación sexual antes de la colecta de semen del reproductor permite que aumente el número de células espermáticas obtenidas en un 100%, así mismo otro de las cualidades que aumenta el despertar sexual es la permisión de falsas montas, haciendo a la vez que el macho tenga una excitación intensa realizándolo por cinco a diez minutos.

Sin embargo, hay que tener cuidado al momento de llevar a cabo este periodo de estímulo, ya que los fluidos secretados por las glándulas sexuales accesorias pueden eliminar material contaminante proveniente de la uretra.

En esta etapa del proceso, se lo lleva a efecto con el objetivo de lograr la mayor cantidad y concentración de líquido seminal, donde se expone al macho a una estimulación visual y olfativa con la hembra en estro (Villamizar *et al.*, 2014).

2.4.2 Colecta de semen con vagina artificial.

La colecta seminal se la puede llevar a cabo mediante vagina artificial, siendo uno de los métodos mayormente utilizados, además es uno de los equipamientos más simples y económicos en la obtención de semen, permitiendo eyaculados más parecidos fisiológicamente a los naturales con una alta calidad (Villamizar *et al.*, 2014).

El proceso de colecta debe ser higiénico y evitando el shock térmico de los espermatozoides (Carpio, 2015).



Figura 1. Vagina Artificial Bovina

Autor: Phibro (2017)

La vagina artificial está compuesta por:

Cuerpo: está compuesta de un tubo cilíndrico de 40 - 50 cm de largo y 7 - 10 cm de diámetro, el cual tiene una abertura en la parte central con el fin de colocar el agua al momento de preparar la vagina artificial (Arieta *et al.*, 2014).

Funda o camisa interna: está conformada de un tubo de látex la cual pasa por dentro del cuerpo de la vagina artificial, con la finalidad de imitar que son las paredes de la vagina, la misma se afirma fijamente en ambos extremos con bandas de caucho para impedir que el agua que se encuentra entre la camisa interna y el cuerpo de la vagina artificial se salga.

Cono de látex: consiste en colocar en uno de los extremos opuestos del cuerpo, sujetándolo con bandas de caucho para evitar fugas.

Tubo colector de semen: se utiliza un tubo milimetrado, el mismo que se coloca en el extremo del cono, con el cual servirá para recolectar el semen; el mismo debe ser revestido a fin de que sirva de protección a las muestras seminales de la luz solar y de cambios de temperatura bruscos.

Al momento de hacer la colecta del semen se debe primeramente armar la vagina artificial e introducir agua a una temperatura de 42 °C, hasta llenar los dos tercios de su capacidad total.

Quispe (2019) recomienda que, al instante en que se vaya a recoger las muestras seminales, se debe tomar en cuenta que la temperatura óptima dentro de la vagina artificial debe ser de 38 - 39°C para que a lo que el toro introduzca el pene exista un adecuado estímulo y eyacule con normalidad.

Luego de tener preparada la vagina artificial, se aproxima el macho a la hembra en la fase de estro; cabe destacar que para un manejo adecuado y seguro esta técnica se debe llevar a cabo entre dos personas, la primera se encarga de sujetar al macho y la otra persona es quien realiza la colecta.

Una vez que el toro eyacula se procede a retirar la vagina artificial y el eyaculado o semen es colocado en el colector de vidrio para posteriormente evaluar en el laboratorio las características macro y microscópica, cuidando que la muestra seminal no entre en contacto con la luz solar o agua ni existan cambios bruscos de temperatura.

2.5 Evaluación del Semen Bovino

2.5.1 Examen Macroscópico

2.5.1.1 Volumen.

Un eyaculado bovino va desde 2 hasta 8 ml, teniendo en cuenta que para toros mayores de 2 años debe tener un eyaculado de no menos de 4 ml (Carpio, 2015).

Curbelo (2013) menciona que dicho valor puede variar de 2 – 12 ml en toros jóvenes, sin embargo los de menor talla producen menor volumen seminal.

Un eyaculado puede llegar a alcanzar de 800 a 2500 millones de espermatozoides por mililitro (Ludeña, 2019).

2.5.1.2 Densidad o color.

El semen del toro suele tener varias tonalidades, su aspecto se refiere a la viscosidad del eyaculado y se relaciona con la concentración espermática, puede llegar a ser de color blanco cremoso, cuando contiene gran cantidad de espermatozoides, a diferencia que cuando presenta bajo número de espermatozoides este muestra un color blanco – lechoso (Carvajal, 2006).

2.5.1.3 pH.

El pH se caracteriza por ser uno de los indicadores de la calidad seminal, en la cual a mayor concentración espermática mayor acidez, aquellos valores que estén por arriba de 6.9 nos muestran un semen de baja calidad, el semen del toro regularmente suele ser un poco ácido y fluctúa entre 6.2 - 6.8 (Carvajal, 2006).

Sin embargo Curbelo (2013) reporta valores de entre 6.5 a 7.0 o ligeramente mayor y se establece mediante el uso de una cinta colorimétrica.

2.5.2 *Examen Microscópico*

2.5.2.1 **Motilidad masal.**

La motilidad masal se conoce como el porcentaje y la tasa de espermatozoides de movimientos en masa, la cual se la evalúa de forma subjetiva, colocando una gota de semen fresco o diluido y directamente al microscopio de luz con objetivo de 40X, hay que tener en cuenta que la muestra se debe colocar sobre una lámina de porta objetos previamente calentada para evitar un shock térmico (Carua, 2014).

2.5.2.2 **Motilidad individual.**

Guataquira (2019) afirma que la motilidad individual es de gran importancia ya que es la habilidad del espermatozoide para moverse de forma progresiva, con la finalidad de facilitar el tránsito hacia el aparato reproductor de la hembra; se evalúa poniendo sobre el portaobjetos una gota de semen diluido, para ser observado en el microscopio.

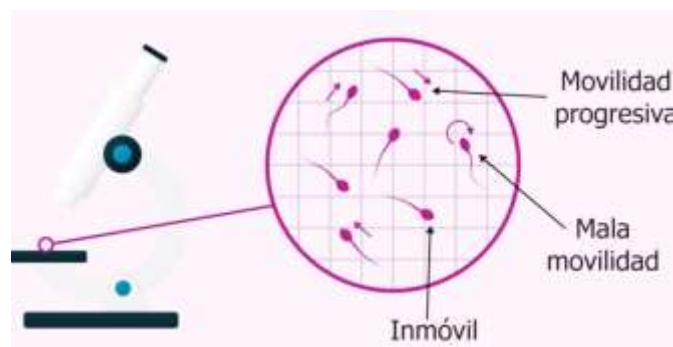


Figura 2. Motilidad individual

Fuente: Burgués (2017)

De acuerdo con el movimiento individual, el semen se clasifica de la siguiente manera:

Tabla 3.
Evaluación de la Motilidad Progresiva

Semen	Características
Muy bueno	Igual o mayor de 70 % de motilidad progresiva
Bueno	50 - 69 % de motilidad progresiva
Regular	30 - 49 % de motilidad progresiva
Malo	Menor de 29 % de motilidad progresiva

Autor: Damas (2010)

2.5.2.3 Vitalidad espermática.

La vitalidad espermática se la realiza con el fin de conocer la cantidad de espermatozoides vivos debido a la permeabilidad de la membrana plasmática a los colorantes vitales, uno de los procedimientos más utilizados es la técnica de tinción supra vital con una mezcla de colorantes, como eosina-nigrosina, de manera que las células que presentan una membrana plasmática funcional excluyen el colorante, a diferencia de que si la membrana esta alterada penetra el colorante y se tiñen de rojo (Damas, 2010).

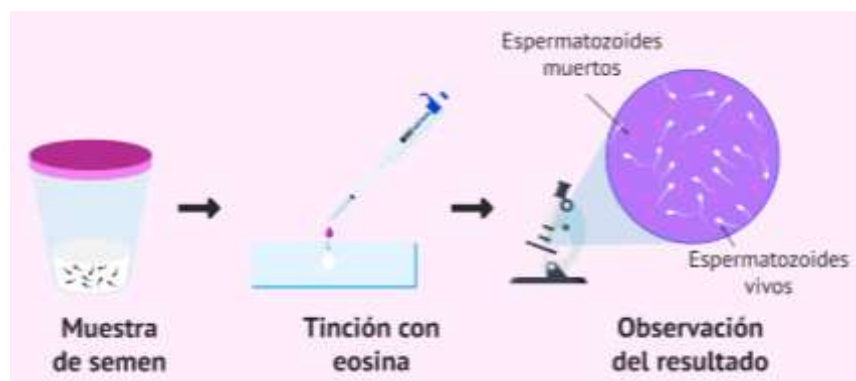


Figura 3. Prueba de Vitalidad
Autor: García (2015)

2.5.2.4 Morfología espermática.

La morfología del espermatozoide es una prueba de control de calidad y de la fertilidad potencial del toro, cada eyaculado contiene una serie de espermatozoides anormales, pero si presenta un alto porcentaje de estos tiene una probabilidad reducida de fertilizar (Damas, 2010).

Un semen de baja fertilidad ocurre habitualmente cuando el número de anomalías son mayores al 20%, las anormalidades primarias no deben superar el 5% y son determinantes de baja fertilidad, mientras que los defectos secundarios no están generalmente considerados como serios y no afecta la fertilidad (Guataquira, 2019).

Tabla 4.

Anomalías Morfológicas

Anormalidades Primarias	Anormalidades Secundarias
Subdesarrollados	Cabezas pequeñas normales
Formas dobles	Cabezas anchas pequeñas y gigantes
Defectos acrosomales	Cabezas normales libres
Cabezas angostas	Membrana acrosomal sueltas, plegadas, desprendidas
Defecto cráter	Implantación abaxial
Defecto forma de pera	Gotas distales
Contorno anormal	Flagelo doblado simple
Cabezas pequeñas anormales	Terminación del flagelo doblado
Cabezas sueltas anormales	
Piezas medias anormales	
Gotas proximales	

Autor: Carvajal (2006)

2.5.2.5 Concentración espermática.

El recuento de espermatozoides se realiza mediante el hemocitómetro de Neubauer, el cual se encarga de medir el número de espermatozoides por unidad de volumen y se encuentra íntimamente relacionada con la fertilidad de los machos (Carvajal, 2006).

2.6 Refrigeración del Semen Bovino

En la antigüedad se utilizaba semen refrigerado en programas de inseminación artificial, sin embargo con el pasar de los años se fue dejando atrás su uso y desde entonces el semen congelado es el más utilizado a nivel mundial, pero en la actualidad una serie de países han empezado a utilizar semen refrigerado con la finalidad de incrementar la productividad de toros de buena genética, una de las mayores ventajas del semen refrigerado, es el bajo número de espermatozoides utilizados por dosis inseminante. Por otro lado, su principal desventaja es su vida útil limitada, ya que no puede ser conservado por periodos largos (Rossi, 2012).

Algunas de las ventajas del semen refrigerado son preservar la viabilidad espermática, y por ende garantizar una optimización de toros genéticamente superiores y presenta menores daños celulares en comparación con el semen crio preservado (Rodríguez, 2019).

Según Damas (2010) menciona que se puede llevar a cabo programas de inseminación artificial con la uso de semen refrigerado, ya que se estima puede ser conservado de entre 2 y 4 días, un gran beneficio es la facilidad de transporte e implementación; al realizar el análisis del semen refrigerado a las 24 y 48 horas no presenta una disminución significativa en la motilidad, por otra parte a las 96 horas sigue sin presentar un marcado descenso en el porcentaje de viabilidad.

2.6.1 Diluyentes utilizados para la refrigeración del semen bovino

Los diluyentes al momento de ser preparados en el laboratorio se lo debe hacer de manera ordenada y llevando una aséptica adecuada, ya que van a ser utilizados en la preservación de espermatozoides, cabe destacar que tienen que ser isotónicos con el plasma seminal (320 mOsm/kg) al ser usados en semen refrigerado (Ludeña, 2019).

Según Rossi (2012) afirma que los dilutores deben tener diversos amortiguadores para evitar cambios de pH al neutralizar los ácidos producidos por el metabolismo de los espermatozoides, así mismo cumplir con la función de preservar a los espermatozoides de las alteraciones que se producen al haber un choque térmico, al mismo tiempo provee nutrientes y controla el crecimiento bacteriano, tomando en cuenta que no se debe ver alterada su fertilidad.

2.6.1.1 AndroMed.

AndroMed es un dilutor que se caracteriza por no poseer en su composición proteína de origen animal (yema de huevo) con la finalidad de ayudar a la conservación del semen refrigerado y crio preservado, el hecho que no presente componentes de origen animal es beneficioso teniendo en cuenta que ayuda a la prevención de efectos indeseados por hormonas, no existe un riesgo de contaminación microbiológica (Damas, 2010).

Está compuesto de fosfolípidos, TRIS, ácido cítrico, azúcares, antioxidantes, tampones, glicerina, agua de altísima pureza y antibióticos, de acuerdo a la Directiva de CE 88/407 (Tilosina, Gentamicina, Espectinomicina, Lincomicina).

2.6.1.2 Triladyl.

Triladyl se caracteriza por presentar en su composición yema de huevo lo cual resulta beneficioso ya que protege a las células espermáticas del choque térmico, sin comprometer los resultados de fertilidad (Vargas, 2012).

Este diluyente de semen de bovino está compuesto de “TRIS, ácido cítrico, azúcar, tampones, glicerina, antibióticos (Tilosina 5.7 mg, Gentamicina 28.6 mg, Espectinomicina 34.3 mg, Lincomicina 17.2 mg) agua de extrema pureza (Quispe, 2019).

2.6.2 Principios de preservación de semen

La refrigeración del semen presenta una serie de ventajas como es la preservación de la viabilidad espermática, aumenta su vida útil, un fácil transporte y menores daños celulares comparado al semen crio preservado (Rodríguez, 2019).

No obstante también presenta desventajas como son alteraciones morfológicas, ruptura de la membrana plasmática, degeneración acrosomal, lesiones en las mitocondrias, edema del acrosoma en el 50% de los espermatozoides, su actividad respiratoria disminuye, así como la glucólisis y se alterada la motilidad debido a una reducción en los niveles de ATP.

La reacción al shock debido al cambio de temperatura es diferente en cada especie, de tal modo se ve afectado el tiempo necesario para la capacitación espermática en el tracto genital de la hembra ya que es reducido (Damas, 2010).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

3.1.1. *Materiales de campo*

- Vagina artificial para bovinos
- Tubos de ensayo milimetrados
- Papel aluminio
- Termómetro para vagina artificial
- Termo transportador
- Cámara fotográfica
- Guantes de látex
- Cabos
- Overol
- Lápiz
- Libreta de anotaciones

3.1.2. *Materiales de laboratorio*

- Equipo de Refrigeración
- Microscopio
- Baño maría
- Micro pipetas
- Pajillas de 0.5 ml estériles
- Cámara de Neubauer
- Alcohol polivinilico
- Porta objetos
- Cubre objetos

- Platina caliente
- Tubos de ensayo
- Tubos plásticos de 5 ml
- Guantes de procedimiento
- Mandil
- Agua
- Fuentes plásticas
- Diluyente AndroMed®
- Diluyente Triladyl®
- Agua bidestilada
- Yema de huevo
- Eosina
- Nigrosina

3.1.3. *Materiales de oficina*

- Computadora
- Internet
- Impresora
- Hojas A4
- Libreta de apuntes
- Esferos

3.2. Métodos

3.2.1. Ubicación

El presente trabajo se realizó en dos fases: de campo y de laboratorio; la fase de campo se realizó en el cantón Gonzanamá, parroquia Nambacola de la provincia de Loja y la fase de laboratorio se llevó a cabo en el Centro de Biotecnología Reproductiva Animal (CEBIREA) de la Universidad Nacional de Loja.

3.2.1.1. Nambacola

La parroquia Nambacola está ubicada al noreste del cantón Gonzanamá, bañada en sus costados Norte y Este con las aguas del río Catamayo que sirve de límite natural con los cantones de Catamayo y Paltas, su ubicación astronómica es de 4° y $4^{\circ}11'3''$ de latitud Sur; y $79^{\circ}20'20''$ y $79^{\circ}32'40''$ de longitud occidental.

La misma que goza de una variedad de climas que van desde el subtropical, en tierras bajas; hasta el frío andino, en los pisos montañosos, mediando un clima templado, con temperatura promedio de 16°C , en época de verano; y con ligeras bajas de temperatura, en la época invernal.



Figura 4. Límites del Cantón Gonzanamá
Autor: Abad (2010)

3.2.1.2. Laboratorio de biotecnología reproductiva.

El análisis de las muestras seminales se lo realizó en el centro de biotecnología reproductiva Animal (CEBIREA) de la Universidad nacional de Loja se encuentra en la Quinta Experimental “Punzara” ubicado al sur - oeste de la Hoya de Loja, en el barrio Punzara, cuenta con las siguientes características meteorológicas:

- **Altitud:** 2160 msnm
- **Temperatura:** oscila de 12 – 18 °C con un promedio de 15.5 °C
- **Precipitaciones:** 1058 mm anuales
- **Humedad relativa:** media de 70 %

3.2.2. Descripción e identificación de las unidades experimentales

Se utilizó para la presente investigación reproductores bovinos de la raza Holstein Friesian y Brown Swiss 1 toro de cada raza con edades superiores a los 2 años, con buena condición corporal.

3.2.3. Manejo de las unidades experimentales

Los reproductores fueron sometidos a un mismo tipo de manejo, alimentación y un periodo de entrenamiento de 15 días en el proceso de salto y recolección seminal, tiempo en el cual fueron manejados con jáquimas hasta que se habituaron a saltar utilizando una hembra bovina como “maniquí”, además de permanecer separados de hembras bovinas durante el tiempo que duro la investigación.

3.2.4. Variables de estudio

Tabla 5.
Variables de estudio

Variable	Definición	Categorías	Unidades	Instrumentos
Volumen	Cantidad de eyaculado (ml) que existe en el tubo graduado que se utilizó en la colecta	Fresco	Mililitro	Tubo ensayo
Densidad	Análisis del eyaculado en el tubo graduado por medio de la visualización	Fresco	Porcentaje	Tubo de ensayo
pH	Introducir una banda indicadora de pH en una muestra de semen fresco	Fresco	Unidad	Bandas pH
Concentración espermática	Recuento de espermatozoides en la cámara de Neubauer	Fresco	Espermatozoides por mililitro	Cámara Neubauer
Motilidad masal	Análisis de muestra seminal, observando el número total de espermatozoides que se mueven por campo.	12 h 24 h 36 h 48 h	Porcentaje	Microscopio
Motilidad individual	Análisis de muestra seminal, se observó los espermatozoides que se mueven en forma rectilínea progresiva por campo.	12 h 24 h 36 h 48 h	Porcentaje	Microscopio
Vitalidad espermática	Cantidad de espermatozoides vivos y muertos, mediante tinción Eosina y Nigrosina	12 h 24 h 36 h 48 h	Porcentaje	Microscopio

Autor: Michelle Jaramillo J.

3.2.5. Metodología de evaluación

En la presente investigación se utilizó como método de recolección seminal la vagina artificial y la frecuencia de colecta fue de 2 veces por semana, durante 5 semanas, dándonos como resultado diez eyaculados por toro.

3.2.5.1. Tomas y registro de datos

Luego de obtener la muestra seminal se procedió a diluir con Triladyl y AndroMed en relación 1:1, posterior a esto fueron transportadas en hielo (temperatura de 5 °C aprox.) hasta llegar al laboratorio donde se realizó el examen microscópico.

3.2.5.2. Examen macroscópico

▪ Volumen

El volumen se determinó observando cuantos mililitros de semen existían en el tubo graduado que se utilizó en la colecta.

▪ pH

Se determinó a través de una banda indicadora de pH colorimétrica que va desde el 0 - 14, en la cual se introdujo una banda en semen fresco y se obtuvo su valor a través de la lectura de la misma.

▪ Densidad o color

Se analizó directamente en el tubo colector por medio de la visualización del eyaculado.

Tabla 6.
Características de la Concentración Espermática

Puntaje	Aspecto del semen	Densidad – concentración espermática
5	Cremoso	Densísimo; 1,5 a 2 x 10 ⁶ spz/ml
4	Cremoso – lechoso	Muy denso; 1 a 1,5 x 10 ⁶ spz/ml
3	Lechoso	Denso; 0,75 a 1 x 10 ⁶ spz/ml
2	Semiacuoso	Semi denso; 0,3 a 0,5 x 10 ⁶ spz/ml
1	Acuoso	Ralo; 0,2 x 10 ⁶ spz/ml

Autor: Ibáñez (2016)

3.2.5.3. Examen microscópico

▪ Concentración espermática

Al momento de examinar la concentración espermática del eyaculado se realizó el recuento de espermatozoides en la cámara de Neubauer, se tomó una muestra de 10 µl de semen diluido en 2000 µl de solución formolizada y se homogenizó la muestra, siendo esta una dilución de 1:200.

Posterior al procedimiento anterior se colocó una laminilla sobre la cámara de Neubauer, tomando una muestra de la solución formolizada, con la micro pipeta y se procedió a cargar ambos lados de la cámara de Neubauer se esperó por un tiempo de 3 a 5 minutos para que la muestra se sedimente.

Se procedió a llevar la cámara de Neubauer al microscopio de luz con objetivo de 20x o 40x, se contó en cinco cuadros de la cámara para un total de 25 cuadros, de forma diagonal o en forma de X, el resultado del conteo se multiplicó x 10.000 para calcular la concentración de espermatozoides/ml o siguiendo la siguiente fórmula:

$$\frac{A}{B \times N \times 10} = N^{\circ} \text{ de espermatozoides/ml}$$

A= Número total de espermatozoides contados

B= Factor de dilución 1:100= 100

N= Número de cuadros contados

10= Altura de la cámara

▪ Motilidad masal

La motilidad masal se valoró mediante la observación de una muestra de semen con un microscopio de contraste de fases y platina a 37 °C.

- **Motilidad individual**

Se procedió a colocar una gota de semen sobre un porta objetos cubriendo la misma con una laminilla cubre objetos, las cuales fueron temperadas a 37 °C, y se llegó a observar a los espermatozoides que se mueven en forma rectilínea progresiva, siendo estos los que atraviesan el campo de observación.

- **Vitalidad espermática**

La cantidad de espermatozoides vivos y muertos, se obtuvo utilizando: Tinción Eosina y Nigrosina, los mismos deben mantenerse a una temperatura de 37 °C (baño maría) para ser utilizados en los análisis, con la finalidad de evitar el shock térmico, para la evaluación se utilizaron dos gotas de Eosina y una gota de Nigrosina en dos gotas de semen homogenizando suavemente, se realizó un frotis y se procedió a observar con un objetivo de 40x, se tomó cinco campos diferentes para contar 200 células espermáticas, considerando muertas aquellas coloreadas y vivas aquellas que no absorbieron el colorante, expresando en porcentaje la frecuencia de vivos y muertos.

- **Anormalidades morfológicas**

Se valoró las anomalías morfológicas con la misma placa que se utilizó en el análisis de vitalidad, el frotis se observó con ayuda del microscopio de campo claro (aumento 40X), visualizando cinco campos y se contó el número y tipo de atipias, con la finalidad de estimar el porcentaje (%) de espermatozoides normales.

3.2.5.4. Preparación del dilutor

- **Triladyl**

En la elaboración del diluyente Triladyl se empleó un 20%, de tal modo se llegó a usar tres partes de agua bidestilada, una parte de yema de huevo y una parte de dicho diluyente, tomando en cuenta que todo debe ser previamente temperado a 37 °C.

- **AndroMed**

Al momento de la preparación del diluyente AndroMed® se tomó un 20% de dicho diluyente, así mismo se colocó una parte de AndroMed y cuatro partes de agua bidestilada previamente temperada a 37 °C.

3.2.5.5. Dilución del semen

Después de analizadas las características macroscópicas, los eyaculados se conservaron a baño-maría a 36 °C, al igual que los diluyentes, con el fin de evitar que se produzca un shock térmico en los espermatozoides y se realizó una pre dilución (1:1) incorporando el dilutor en la misma cantidad que el semen.

Una vez realizado todo el procedimiento se llevó a cabo la dilución final del eyaculado y se procedió a envasar en pajillas con los resultados de la evaluación seminal, se determinó el número de pajillas a obtener en función a la concentración espermática del eyaculado.

Fórmula para calcular dosis de pajillas:

$$\text{N}^\circ \text{ Dosis} = \frac{(\text{volumen (cc)} \times \text{Concent. esperm. (millones/cc)} \times \% \text{ motilidad} \times \% \text{ esperm. vivos})}{(\text{N}^\circ \text{ de espermatozoides/dosis})}$$

Donde:

- Volumen: volumen del semen colectado/cc.
- Concentración espermática: Concentración espermática en millones/cc.
- % Motilidad: motilidad expresada en porcentajes.
- % Vivos: Numero de espermatozoides vivos, en porcentaje.
- N° de espermatozoides por dosis: 30 millones.

Luego de haber realizado el procedimiento se selló el extremo abierto de las pajillas con alcohol poli vinílico y se procedió a colocar las pajillas en una bandeja de agua a 5 °C en un refrigerador estabilizándolas durante el periodo de análisis.

3.2.5.6. Proceso de refrigeración seminal

- **Refrigeración de pajuelas**

La refrigeración del semen se realizó siguiendo el protocolo que utiliza el Centro de Biotecnología Reproductiva Animal (CEBIREA) de la Universidad Nacional de Loja, se colocó las pajillas en una bandeja de agua y se las llevó a un refrigerador a 5 °C hasta el momento de su evaluación.

3.2.5.7. Evaluación del semen refrigerado

Luego de sacar las pajillas del refrigerador se introdujeron por 15 segundos a baño maría a 37°C, para evaluar los siguientes parámetros:

- **Motilidad masal**

Para evaluar la motilidad masal se consideró a los espermatozoides que se mueven en cualquier dirección, se realizó la visualización de 10 campos de observación y se contó un total de 100 espermatozoides, de los cuales se obtuvo un porcentaje de espermatozoides con movimiento.

- **Motilidad individual**

En cuanto a la motilidad individual se observó a los espermatozoides que se mueven en forma rectilínea progresiva, se realizó la visualización de 10 campos y se contó un total de 100 espermatozoides, de los cuales se obtuvo un porcentaje de espermatozoides con movimiento progresivo.

- **Vitalidad espermática**

Luego que se realizó la tinción con eosina y nigrosina, se procedió a contar 100 células espermáticas, tomando en cuenta los espermatozoides que se tiñeron y los que no y al final sacando el porcentaje de vivos y muertos.

- **Anormalidades Morfológicas**

Se contabilizó al mismo tiempo que la placa de vitalidad y se clasificó las malformaciones, se contó 100 espermatozoides y se anotó el porcentaje.

3.2.6. Descripción de los tratamientos

En la presente investigación se realizó cinco tratamientos:

- **Tratamiento 1 Control (T1C)**

La muestra seminal, se evaluó a las 0 horas (semen fresco) y se analizó motilidad total, motilidad progresiva, vitalidad y morfología.

- **Tratamiento 2 Triladyl (T2T)**

La muestra seminal, se evaluó luego de 12 horas de refrigeración con el dilutor Triladyl y se analizó motilidad total, motilidad progresiva, vitalidad y morfología.

- **Tratamiento 2 AndroMed (T2A)**

La muestra seminal, se evaluó luego de 12 horas de refrigeración con el dilutor AndroMed y se analizó motilidad total, motilidad progresiva, vitalidad y morfología.

- **Tratamiento 3 Triladyl (T3T)**

La muestra seminal, se evaluó luego de 24 horas de refrigeración con el dilutor Triladyl y se analizó motilidad total, motilidad progresiva, vitalidad y morfología.

- **Tratamiento 3 AndroMed (T3A)**

La muestra seminal, se evaluó luego de 24 horas de refrigeración con el dilutor AndroMed y se analizó motilidad total, motilidad progresiva, vitalidad y morfología.

- **Tratamiento 4 Triladyl (T4T)**

La muestra seminal, se evaluó luego de 36 horas de refrigeración con el dilutor Triladyl y se analizó motilidad total, motilidad progresiva, vitalidad y morfología.

- **Tratamiento 4 AndroMed (T4A)**

La muestra seminal, se evaluó luego de 36 horas de refrigeración con el dilutor AndroMed y se analizó motilidad total, motilidad progresiva, vitalidad y morfología.

- **Tratamiento 5 Triladyl (T5T)**

La muestra seminal, se evaluó luego de 48 horas de refrigeración con el dilutor Triladyl y se analizó motilidad total, motilidad progresiva, vitalidad y morfología.

- **Tratamiento 5 AndroMed (T5A)**

La muestra seminal, se evaluó luego de 48 horas de refrigeración con el dilutor AndroMed y se analizó motilidad total, motilidad progresiva, vitalidad y morfología.

3.2.7. *Diseño experimental*

Se realizó un arreglo factorial 2x2 (tratamiento y raza) y un diseño de bloques completamente al azar (DBCA) con cinco tratamientos y dos repeticiones cada uno.

Tabla 7.
Diseño Experimental

Factor	Raza	Variables	Tratamiento	Repeticiones
AndroMed	Brown Swiss	12 horas	T1AB12	10
		24 horas	T2AB24	
		36 horas	T3AB36	
		48 horas	T4AB48	
		12 horas	T1TB12	10
		24 horas	T2TB24	
		36 horas	T3TB36	
		48 horas	T4TB48	
Triladyl	Holstein Friesian	12 horas	T1TH12	10
		24 horas	T2TH24	
		36 horas	T3TH36	
		48 horas	T4TH48	
		12 horas	T1AH12	10
		24 horas	T2AH24	
		36 horas	T3AH36	
		48 horas	T4AH48	
2	2	4	16	40

Autor: Michelle Jaramillo J.

3.2.8. Análisis estadístico

El presente trabajo de investigación se basó en un análisis descriptivo, en cuanto a las variables de evaluación seminal tales como volumen, pH, densidad, concentración espermática, motilidad masal, motilidad individual y vitalidad espermática del semen refrigerado y la interacción de dos dilutores comerciales AndroMed - Triladyl; la información recogida, fue procesada a través de una estadística descriptiva (promedios, porcentajes, desviación estándar) y se presentó en cuadros y gráficos representativos e ilustrativos se realizó un análisis para comparar las medias de ambos factores en el software R versión 3.6.

4. RESULTADOS

4.1. Características Macro y Microscópicas de las Muestras Seminales de los Bovinos Brown Swiss y Holstein en Fresco

Tabla 8.

Características Macro y Microscópicas de las Muestras Seminales de los Bovinos Brown Swiss y Holstein en Fresco

RAZA	VARIABLES	PROMEDIO	DESV. ESTÁNDAR	MÍNIMO	MÁXIMO
Brown Swiss	pH	7	0	7	7
	Volumen	5.55	0.68	4.8	6.5
	Concentración espermática	675	46.49	610	750
Holstein	pH	7	0	7	7
	Volumen	3.7	0.78	2.3	4.8
	Concentración espermática	500	45.46	400	550

Fuente: Formulario de recolección de datos

Autor: Michelle Jaramillo J.

Como se observa en la **Tabla 8** las características macroscópicas de los eyaculados de las razas analizadas no presentan diferencia estadística en cuanto a pH, en lo referente a volumen y características microscópicas si existe diferencia estadística entre las razas Brown Swiss y Holstein; la raza Brown Swiss presenta un mayor promedio en volumen eyaculado en relación a la raza Holstein, 5.55 y 3.7 ml respectivamente; así mismo el valor promedio de concentración espermática en la raza Brown Swiss es mayor al que posee la raza Holstein con 675 y 500 millones spz/ml respectivamente.

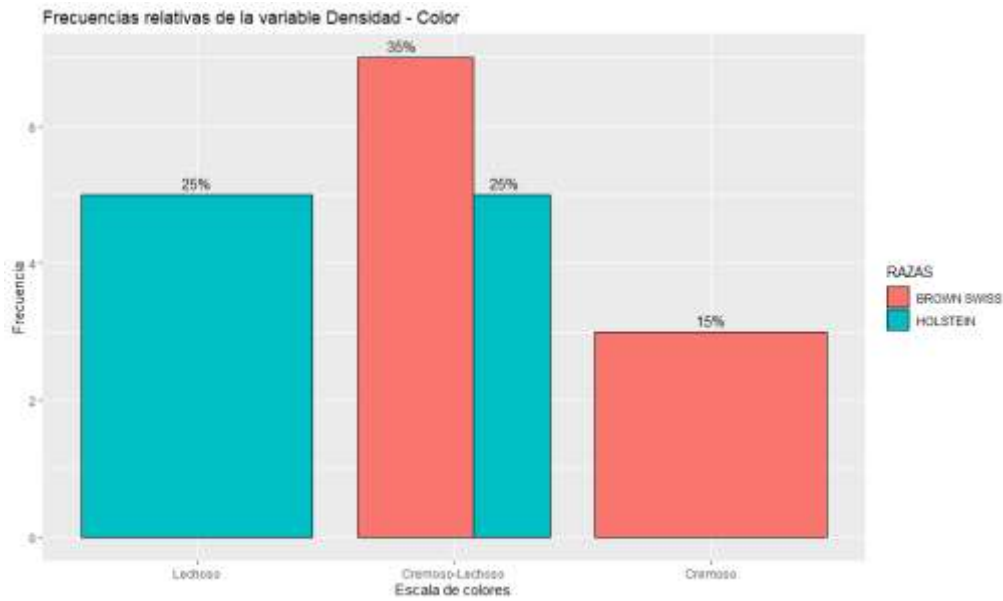


Figura 5. Características Macroscópicas de las Muestras Seminales de las Razas Brown Swiss y Holstein en Fresco

Fuente: Formulario de recolección de datos

Autor: Michelle Jaramillo J.

Como se aprecia en la **Figura 5.** la densidad del semen que presentó un mayor porcentaje es el cremoso – lechoso con un 35% y 25% en las razas Brown Swiss y Holstein respectivamente, a diferencia del aspecto lechoso del semen estuvo presente solo en la raza Holstein en un 25% y el aspecto cremoso fue el de menor presencia en el estudio realizado con un 15% en la raza Brown Swiss.

4.2. Características Microscópicas de las Muestras Seminales de los Bovinos Brown Swiss y Holstein Post Refrigeración a Diferentes Horas con los Dilutores

Tabla 9.
Motilidad Masal de las Muestras Seminales de los Bovinos Brown Swiss y Holstein Post Refrigeración a Diferentes Horas con el Dilutor AndroMed

MOTILIDAD MASAL				
TIEMPO	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTANDAR	MIN	MAX
0 horas	85.45%	0.0506	76%	92%
12 horas	81.70%	0.0489	73%	88%
24 horas	78.25%	0.0488	70%	86%
36 horas	74.85%	0.0486	68%	83%
48 horas	71.70%	0.0485	64%	79%

Fuente: Formulario de recolección de datos
Autor: Michelle Jaramillo J.

Como se aprecia en la **tabla 9**, la presencia de la motilidad masal disminuye conforme las horas aumentan. A las 12 horas existe una mayor presencia en promedio con un 81.70%, mientras que a las 48 horas ha disminuido su promedio con un 71.70%. Los datos que presentan una mayor dispersión con respecto al promedio, son los pertenecientes al inicio del experimento, es decir, dichos datos poseen mayor variabilidad con respecto al promedio. Además, el valor más bajo presente según la motilidad masal se presenta a las 48 horas con un 64%; por el contrario, el valor más alto presente se presenta al inicio del experimento, con un 92%.

Tabla 10.

Motilidad Individual de las Muestras Seminales de los Bovinos Brown Swiss y Holstein Post Refrigeración a Diferentes Horas con el Dilutor AndroMed

MOTILIDAD INDIVIDUAL				
TIEMPO	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTANDAR	MIN	MAX
0 horas	80.65%	0.0524	70%	87%
12 horas	75.15%	0.0482	66%	82%
24 horas	70.55%	0.0517	61%	79%
36 horas	65.65%	0.0484	57%	73%
48 horas	61.05%	0.0451	54%	69%

Fuente: Formulario de recolección de datos

Autor: Michelle Jaramillo J.

En lo referente a motilidad individual a las 12 horas existe un mayor promedio con un 75.15%, aquella disminuye conforme transcurre el tiempo hasta llegar a las 48 horas con 61.05% en promedio. Los datos que presentan una mayor dispersión son los pertenecientes al inicio del experimento, es decir, los datos tienen mayor variabilidad con respecto al promedio. Sin embargo, el valor más bajo presente según la motilidad individual se presenta a las 48 horas con un 54%; por el contrario, el valor más alto ocurre al inicio del experimento, con un 87% como se aprecia en la **Tabla 10**.

Tabla 11.

Vitalidad de las Muestras Seminales de los Bovinos Brown Swiss y Holstein Post Refrigeración a Diferentes Horas con el Dilutor AndroMed

VITALIDAD				
TIEMPO	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTANDAR	MIN	MAX
0 horas	85.30%	0.0486	77%	91%
12 horas	82.10%	0.0466	74%	89%
24 horas	78.40%	0.0472	71%	85%
36 horas	74.95%	0.0498	67%	84%
48 horas	71.95%	0.0505	63%	79%

Fuente: Formulario de recolección de datos

Autor: Michelle Jaramillo J.

Con respecto a la vitalidad a las 12 horas se evidencia que existe una mayor presencia en promedio con un 82.10%, la misma que disminuye conforme transcurre el tiempo hasta llegar a las 48 horas con un 71.95%. Los datos que presentan una mayor dispersión con respecto al promedio, son los pertenecientes a las 48 horas de recolección, es decir, los porcentajes tienen mayor variabilidad con respecto al promedio. No obstante, el valor más bajo presente según la vitalidad se observa a las 48 horas con un 63%; por el contrario, el valor más alto ocurre al inicio del experimento, con un 91% como se aprecia en la **Tabla 11**.

Tabla 12.

Motilidad Masal de las Muestras Seminales de los Bovinos Brown Swiss y Holstein Post Refrigeración a Diferentes Horas con el Dilutor Triladyl.

MOTILIDAD MASAL				
TIEMPO	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTANDAR	MIN	MAX
0 horas	85.65%	0.0492	76%	92%
12 horas	83.20%	0.0520	75%	90%
24 horas	82.50%	0.0481	72%	87%
36 horas	77.15%	0.0498	68%	85%
48 horas	74.25%	0.0459	66%	81%

Fuente: Formulario de recolección de datos

Autor: Michelle Jaramillo J.

Como se observa en la **Tabla 12.** en lo que concierne a la motilidad masal se evidencia que a las 12 horas existe una mayor presencia en promedio con un 83.20%, la cual disminuye conforme transcurre el tiempo hasta llegar a las 48 horas con una presencia del 74.25% en promedio. Así mismo los datos que presentan una mayor dispersión con respecto al promedio, son los pertenecientes a las 12 horas de la recolección, es decir, en dichos datos existe mayor variabilidad con respecto al promedio. Por otra parte, el valor más bajo presente según la motilidad masal se presenta a las 48 horas con un 66%; por el contrario, el valor más alto presente se lo refleja al inicio del experimento, con un 92%.

Tabla 13.

Motilidad Individual de las Muestras Seminales de los Bovinos Brown Swiss y Holstein Post Refrigeración a Diferentes Horas con el Dilutor Triladyl.

MOTILIDAD INDIVIDUAL				
TIEMPO	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTANDAR	MIN	MAX
0 horas	80.50%	0.0529	70%	87%
12 horas	75.50%	0.0505	67%	83%
24 horas	71.50%	0.0494	63%	79%
36 horas	67.10%	0.0456	59%	75%
48 horas	63.15%	0.0440	55%	70%

Fuente: Formulario de recolección de datos

Autor: Michelle Jaramillo J.

Como se aprecia en la **Tabla 13.** la motilidad individual disminuye conforme las horas aumentan. A las 12 horas existe una mayor presencia en promedio con un 75.50%, de esta manera a las 48 horas disminuye el promedio con un 63.15% en promedio. Los datos que presentan una mayor dispersión son los pertenecientes al inicio del experimento, es decir, los datos tienen mayor variabilidad con respecto al promedio. Por otra parte, el valor más bajo presente según la motilidad individual se presenta a las 48 horas con un 55%; por el contrario, el valor más alto ocurre al inicio del experimento, con un 87%.

Tabla 14.

Vitalidad de las Muestras Seminales de los Bovinos Brown Swiss y Holstein Post Refrigeración a Diferentes Horas con el Dilutor Triladyl.

VITALIDAD				
TIEMPO	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTANDAR	MIN	MAX
0 horas	85.50%	0.0470	77%	91%
12 horas	82.75%	0.0494	74%	90%
24 horas	80.65%	0.0508	73%	88%
36 horas	77.15%	0.0488	69%	85%
48 horas	74.25%	0.0453	67%	81%

Fuente: Formulario de recolección de datos

Autor: Michelle Jaramillo J.

Según la **Tabla 14.** se puede observar que la vitalidad disminuye conforme las horas aumentan, apreciando a las 12 horas un mayor promedio de 82.75%, aquella disminuye conforme transcurre el tiempo hasta llegar a las 48 horas con un 74.25%. Los datos que presentan una mayor dispersión con respecto al promedio, son los pertenecientes a las 24 horas de la recolección, es decir, los porcentajes tienen mayor variabilidad con respecto al promedio. De igual manera se puede evidenciar, que el valor más bajo presente según la vitalidad ocurre a las 48 horas con un 67%; mientras que, el valor más alto ocurre al inicio del experimento, con un 91%.

4.3. Características Microscópicas de las Muestras Seminales de los Bovinos Brown Swiss y Holstein Post Refrigeración

Tabla 15.

Motilidad Masal de las Muestras Seminales de los Bovinos Brown Swiss Post Refrigeración

MOTILIDAD MASAL				
TIEMPO	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTANDAR	MIN	MAX
0 horas	89.30%	0.0283	82%	92%
12 horas	85.95%	0.0347	76%	90%
24 horas	82.70%	0.0348	73%	87%
36 horas	79.45%	0.0372	70%	85%
48 horas	76.40%	0.0335	68%	81%

Fuente: Formulario de recolección de datos

Autor: Michelle Jaramillo J.

Como se aprecia en la **Tabla 15.** la motilidad masal en la raza bovina Brown Swiss a las 12 horas presenta un promedio de 85.95%, la cual disminuye conforme transcurre el tiempo hasta llegar a las 48 horas con una presencia del 76.40% en promedio. Los datos que presentan una mayor dispersión con respecto al promedio, son los pertenecientes a las 36 horas de recolección. Así mismo, el valor mínimo presente según la motilidad masal se presenta a las 48 horas con un 68%; y el valor máximo presente se observa al inicio del experimento, con un 92%.

Tabla 16.*Motilidad Individual de las Muestras Seminales de los Bovinos Brown Swiss Post Refrigeración*

MOTILIDAD INDIVIDUAL				
TIEMPO	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTANDAR	MIN	MAX
0 horas	84.10%	0.0348	75%	87%
12 horas	78.75%	0.0358	69%	83%
24 horas	74.70%	0.0369	65%	79%
36 horas	69.50%	0.0346	60%	75%
48 horas	65%	0.0354	57%	70%

Fuente: Formulario de recolección de datos**Autor:** Michelle Jaramillo J.

En la **Tabla 16.** se aprecia que la motilidad individual de la raza bovina Brown Swiss disminuye conforme las horas aumentan. Así mismo se evidencia que a las 12 horas existe una mayor presencia en promedio con un 84.10%, la cual disminuye conforme transcurre el tiempo hasta llegar a las 48 horas con una presencia del 65% en promedio. Los datos que presentan una mayor dispersión son los pertenecientes a las 24 horas de la recolección, es decir, los datos tienen mayor variabilidad con respecto al promedio. Tomando en cuenta que, el valor más bajo presente según la motilidad individual se presenta a las 48 horas con un 57%; mientras que, el valor más alto ocurre al inicio del experimento, con un 87%.

Tabla 17.*Vitalidad de las Muestras Seminales de los Bovinos Brown Swiss Post Refrigeración*

VITALIDAD				
TIEMPO	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTANDAR	MIN	MAX
0 horas	89.10%	0.0236	83%	91%
12 horas	86.15%	0.0327	77%	90%
24 horas	83.10%	0.0375	74%	88%
36 horas	79.75%	0.0354	71%	85%
48 horas	76.65%	0.0287	69%	81%

Fuente: Formulario de recolección de datos**Autor:** Michelle Jaramillo J.

En lo referente a la vitalidad cabe recalcar que el promedio disminuye conforme las horas aumentan. A las 12 horas existe una mayor presencia en promedio con un 86.15%, en efecto la misma disminuye conforme transcurre el tiempo hasta llegar a las 48 horas con una presencia del 76.65% en promedio. Los datos que presentan una mayor dispersión con respecto al promedio, son los pertenecientes a las 24 horas de la recolección, es decir, los porcentajes tienen mayor variabilidad con respecto al promedio. Sin embargo, el valor más bajo presente según la vitalidad se presenta a las 48 horas con un 69%; y, el valor más alto ocurre al inicio del experimento, con un 91% como se aprecia en la **Tabla17**.

Tabla 18.*Motilidad Masal de las Muestras Seminales de los Bovinos Holstein Post Refrigeración*

MOTILIDAD MASAL				
TIEMPO	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTANDAR	MIN	MAX
0 horas	81.80%	0.0350	76%	87%
12 horas	78.95%	0.0378	73%	89%
24 horas	75.75%	0.0337	70%	83%
36 horas	72.55%	0.0350	68%	80%
48 horas	69.55%	0.0347	64%	77%

Fuente: Formulario de recolección de datos**Autor:** Michelle Jaramillo J.

En la **Tabla 18.** se observa que en la motilidad masal disminuye conforme las horas aumentan, siendo evidente que a las 12 horas existe una mayor presencia en promedio con un 78.95%, mientras que, a las 48 horas disminuye el promedio con un 69.55%. Los datos que presentan una mayor dispersión con respecto al promedio, son los pertenecientes a las 12 horas de la recolección. Además, el valor más bajo presente según la motilidad total se presenta a las 48 horas con un 64%; por el contrario, el valor más alto presente se lo refleja al inicio del experimento, con un 87%.

Tabla 19.*Motilidad Individual de las Muestras Seminales de los Bovinos Holstein Post Refrigeración*

MOTILIDAD INDIVIDUAL				
TIEMPO	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTANDAR	MIN	MAX
0 horas	77.05%	0.0415	70%	82%
12 horas	71.90%	0.0335	66%	76%
24 horas	67.50%	0.0330	61%	74%
36 horas	63.25%	0.0358	57%	72%
48 horas	59.20%	0.0344	54%	68%

Fuente: Formulario de recolección de datos**Autor:** Michelle Jaramillo J.

Según la **Tabla 19.** con respecto a la motilidad individual nos muestra como disminuye conforme las horas aumentan, siendo evidente que a las 12 horas existe una mayor presencia en promedio con un 77.05%, mientras que a medida que disminuye el tiempo hasta llegar a las 48 horas con una presencia del 59.20% en promedio. Los datos que presentan una mayor dispersión son los pertenecientes al inicio del experimento, es decir, dichos datos tienen mayor variabilidad con respecto al promedio. No obstante, el valor más bajo presente según la motilidad progresiva ocurre a las 48 horas con un 54%; por el contrario, el valor más alto ocurre al inicio del experimento, con un 82%.

Tabla 20.*Vitalidad de las Muestras Seminales de los Bovinos Holstein Post Refrigeración*

VITALIDAD				
TIEMPO	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTANDAR	MIN	MAX
0 horas	81.70%	0.0336	77%	87%
12 horas	78.70%	0.0254	74%	83%
24 horas	75.95%	0.0312	71%	82%
36 horas	72.35%	0.0313	67%	79%
48 horas	69.55%	0.0375	63%	78%

Fuente: Formulario de recolección de datos**Autor:** Michelle Jaramillo J.

Como se aprecia en la **Tabla 20.** que existe una diferencia en los promedios en la vitalidad en la raza bovina Holstein en las diferentes horas post – refrigeración; se puede evidenciar que a las 12 horas existe una mayor presencia en promedio con un 78.70%, la misma que disminuye conforme transcurre el tiempo hasta llegar a las 48 horas con una presencia del 69.55%. Los datos que presentan una mayor dispersión con respecto al promedio, son los pertenecientes a las 48 horas de la recolección, es decir, dichos datos tienen mayor variabilidad con respecto al promedio. Finalmente, el valor más bajo presente según la vitalidad se presenta a las 48 horas con un 63%; por el contrario, el valor más alto ocurre al inicio del experimento, con un 87%.

5. DISCUSION

Los promedios individuales de volumen de semen eyaculado, obtenido por toro a la prueba t-student a un nivel de significancia ($P < 0,05$) respecto a la comparación de medias, indican que existe diferencia significativa marcada entre razas, con un mayor volumen de la raza Brown Swiss (5,55 ml) y un menor volumen de la raza Holstein (3,7 ml).

Los valores obtenidos por muestra fueron muy variables entre intervalo de colección y de un toro a otro como menciona Damas (2010), que obtuvo un promedio de volumen en la raza Brown Swiss de 6,52 ml, mientras que en la raza Holstein obtuvieron 5,30 ml, valores que no coinciden en el presente estudio, pero concuerdan con los datos obtenidos por Carua (2014) que presenta un volumen espermático de 5 ml en la raza Brown Swiss y 3 ml en la raza Holstein.

Según menciona Carua (2014) que el valor normal para el eyaculado de toros jóvenes (2 años) es de 1 - 3 ml, mientras que para toros adultos debe ser superior a 4 ml hasta 14 ml. Hafez (2007), afirma que el volumen puede variar dependiendo de varios factores como son: raza, edad, factores ambientales y habilidad del operario, así como también la frecuencia entre colectas disminuye el volumen, no obstante cabe señalar que los bovinos de razas lecheras suelen presentar un mayor volumen de eyaculado en comparación a las razas de carne.

El pH de las muestras de semen fue neutro, registrándose, mediante el uso de papel indicador de pH, un valor promedio de 7, el cual está entre los límites de 6,5 a 7,0 de pH seminal reportado por (Curbelo, 2013). Al respecto, Damas (2010) obtuvo resultados de 7 como promedio de pH, los cuales son similares a los alcanzados en el presente estudio.

La concentración espermática promedio según la prueba t-student, indica que existe diferencias significativas ($P < 0,05$) entre las dos razas, en la presente investigación en la raza Brown Swiss fue de 675 millones spz/ml y en la raza Holstein 500 millones spz/ml, estos valores son menores a lo reportado por Moncayo (2016) quien obtuvo una concentración de 699,3 millones spz/ml en bovinos de raza Holstein y en la raza Brown Swiss de 391,7 millones spz/ml.

Sin embargo, Zebadúa *et al.*, (2010) afirma que un eyaculado va desde 200 a 1000 millones spz/ml, tomando en cuenta que si existe un sobre manejo disminuirá la concentración espermática, tomando en cuenta que también presentará variación alguna en función a la especie, edad del animal, estado fisiológico en el que se encuentre el reproductor, método y frecuencia de recolección, cabe señalar que se suele encontrar valores superiores de concentración espermática atribuidas a una mayor circunferencia escrotal y la correlación entre el número de espermatozoides producidos por cm^2 de tejido testicular.

En cuanto a la motilidad masal según el análisis descriptivo, existe diferencia en el valor promedio de dichas razas, la cual a las 12 horas fue de 85,95% en la raza Brown Swiss y 78,95% en la raza Holstein, estos valores concuerdan a los obtenidos por Aquino (2017), el cual obtuvo una motilidad masal de 84,6% en semen refrigerado en toros Brown Swiss; sin embargo la motilidad masal fue superior a la reportada por Bach (2009) de 67.9% en la raza Holstein.

En la motilidad masal a las 12 horas con 81,7% y 83,2% en los dilutores AndroMed y Triladyl respectivamente, estos valores son similares a los que obtuvo Anchatuña (2017) con un 80,7% con dilutor AndroMed pre congelación; sin embargo Suárez (2015) presenta valores ligeramente inferiores en la motilidad masal 78,75% con el dilutor Triladyl.

De acuerdo con los resultados obtenidos se presume que una de las razones que se conserva la muestra seminal sin cambios considerables durante las primeras 12 horas de refrigeración con el diluyente Triladyl, puede ser debido a la composición del mismo, resultando beneficioso ya que protege a las células espermáticas del choque térmico, sin comprometer los resultados de fertilidad según lo expuesto por (Gadea); sin embargo hay que tener en cuenta que debido al estrés que sufre la membrana por el cambio de temperatura, se presenta una diferencia significativa entre las 12 y 48 horas post refrigeración.

Al evaluar la motilidad individual según el análisis descriptivo, se encontró diferencia en los promedios de las razas Brown Swiss y Holstein, a las 12 horas 78,75% y 71,90% respectivamente, estos resultados coinciden con los obtenidos por Anchatuña (2017) quien reporta una motilidad individual de 70,4% pre congelación en la raza Holstein. Sin embargo, Damas (2010), obtuvo una mayor motilidad individual con 87,5% en bovinos de raza Brown Swiss.

Se puede atribuir que la raza Brown Swiss presenta resultados superiores, debido a que se ha adaptado mejor a las condiciones ambientales en las que se desarrollan estos animales, sin embargo, otras de las razones pueden llegar a ser que este ejemplar pudo tener una mejor alimentación en comparación a la raza Holstein.

En cuanto a la vitalidad según el análisis descriptivo, existe diferencia en el valor promedio de las razas Brown Swiss y Holstein, con valores correspondiente a 86,15% y 78,70% respectivamente, estos datos coinciden con los datos reportados en el estudio de Cruz (2014) mismos que oscilan entre 60% y 91% y que son ligeramente superior a los resultados obtenidos en un estudio de la caracterización reproductiva de toros, las cuales están entre 72,3% y 85,7% como valor máximo respecto a la vitalidad; sin embargo estos valores son inferiores a los obtenidos por Moncayo (2016) con un 88,3% en la raza Brown Swiss y 92,3% en la raza Holstein.

Referente a la vitalidad según el análisis descriptivo, existe diferencia en los promedios a las 12 horas siendo los mejores resultados de los dilutores AndroMed y Triladyl, 82,1% y 82,75% respectivamente; estos resultados no coinciden con los obtenidos por Anchatuña (2017) con 75,98% en el dilutor AndroMed, sin embargo estos valores son similares a los obtenidos por Moncayo (2016) con un 82% y Carpio (2015) con un 82,5% con el dilutor Triladyl.

Los resultados expuestos permiten deducir que los tratamientos aplicados en diferentes tiempos provocaron ruptura en la membrana plasmática razón por lo cual existe una pérdida de viabilidad, todo esto debido a los cambios de temperatura presentados y debido a que presenta mejores resultados con el dilutor Triladyl puede atribuirse a el uso del dilutor a base de yema de huevo ya que contiene lipoproteínas de baja densidad que protegen los espermatozoides del enfriamiento.

El método de análisis descriptivo clasificó por grupos los resultados en los diferentes tiempos, determinando cuál fue el mejor en el análisis, se obtuvo una diferencia en los promedios en el dilutor Triladyl, en la raza Brown Swiss, a las 12 horas ubicándolo como mejor resultado en comparación al resto.

En un trabajo similar realizado con toros reproductores Holstein se encontró un análisis de motilidad masal, individual y vitalidad a diferentes tiempos los cuales discrepan con los resultados del presente trabajo, Anchatuña (2017) que probó 7 tiempos (2, 4, 8, 12, 16, 20, 24 horas) obtuvo valores inferiores a las 12 y 24 horas, los tiempos que son mayores a las 12 horas muestran diferencias estadísticamente significativas lo cual no disminuye la motilidad masal como para descartar su uso, por otro lado, se presume que la motilidad se ve alterada debido a una reducción en los niveles de ATP, debido a la refrigeración seminal en tiempos prolongados.

6. CONCLUSIONES

Luego de la evaluación de dos dilutores comerciales Triladyl – AndroMed en la viabilidad espermática del semen bovino refrigerado a diferentes horas post-colección se ha llegado a las siguientes conclusiones:

- Las características macroscópicas de los eyaculados de las razas analizadas no representaron diferencia significativa en relación al pH, en cuanto a la variable volumen la raza Brown Swiss presentó un mayor promedio con 5,5 ml, al igual que la densidad y color el que más predominó fue el cremoso-lechoso que representó el 35% para la misma raza, en lo que concierne a las características microscópicas la concentración espermática fue mayor con 675 spz/ml para la raza Brown Swiss.
- Se determinó que las características microscópicas como motilidad masal, motilidad individual y vitalidad de las muestras seminales de ambas razas post refrigeración, presentaron un mejor resultado a las 12 horas con el dilutor Triladyl.
- Finalmente, en lo que concierne las características microscópicas comparando ambas razas, en las muestras seminales post refrigeración se obtuvo un mayor promedio en la raza Brown Swiss.

7. RECOMENDACIONES

- Según los resultados obtenidos en el presente estudio y teniendo en cuenta que el semen refrigerado, presentó una mayor viabilidad espermática a las 12 horas empleando el dilutor Triladyl, se recomienda el uso del mismo y en vista que en nuestro medio no se han realizado estudios en el ámbito de semen refrigerado, se recomienda realizar más trabajos investigativos para contribuir al conocimiento del tema en mención.
- Se recomienda realizar estudios posteriores utilizando el semen refrigerado en el proceso de inseminación artificial, con el fin de obtener datos más precisos de su tasa de concepción.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Anchatuña, C. A. (2017). Efecto de distintos tiempos de equilibrio sobre la calidad espermática pre y post - congelación de semen bovino de toros reproductores Holstein Friesian (B.S. thesis). Quito: UCE.
- Aquino, M. A. (2017). Características seminales en toros de razas cárnicas y doble propósito.
- Argentino, S. (2016). Reproducción bovina. , 1–10.
- Arieta, R. d. J., Fernández, J., y Menchaca Peña, J. (2014). Métodos de extracción de semen bovino. *Redvet*, 15(6).
- Barragán, I. F. (2017). Evaluación del efecto crio protector de diferentes fuentes de antioxidantes en el semen bovino (B.S. thesis). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Boggio, J. (2007). Evaluación de la aptitud reproductiva potencial y funcional del toro. Capacidad de Servicio. URL: http://www.biblioteca.uach.cl/biblioteca_virtual/libros/2007/636.20824_B_OG.pdf (02/03/2017).
- Bueno, W. A. (2018). Índices productivos y reproductivos en vacunos Brown swiss, jersey y Holstein en altura-cooperativa Atahualpa Jerusalén, Cajamarca 1999-2013.
- Cardoso, J. (2002). Evaluación reproductiva del macho bovino en condiciones tropicales. Colombia.

- Carpio, S. V. (2015). Evaluación de dos diluyentes para la crio conservación de semen bovino: yema de huevo vs leche descremada (B.S. thesis).
- Carua, J. R. (2014). Evaluación de la crio conservación de espermatozoides colectados in vivo y post mortem en bovinos (*Bos taurus*) en el laboratorio de biotecnología de la reproducción de la carrera de medicina veterinaria de la universidad técnica de Cotopaxi (B.S. thesis). LATACUNGA/UTC/2014.
- Carvajal, G., C. (2006). Relación entre la prueba de reducción del azul de metileno con la actividad metabólica y los parámetros macro y microscópicos del semen fresco de bovino.
- Cruz, S. (2014). Estudio comparativo de 3 diluyentes (tris, citrato de sodio y Triladyl) en el procesamiento de semen bovino (Tesis Doctoral no publicada). Tesis profesional. División de Ciencia Animal, Universidad Autónoma Agraria.
- Curbelo, M. (2013). Relevamiento de laboratorios de procesamiento de semen bovino en Uruguay.
- Damas, R. E. (2010). Evaluación de dos dilutores comerciales en semen congelado de toros en el Banco Nacional. Universidad Nacional del Centro del Perú. Descargado de <http://repositorio.uncp.edu.pe/handle/UNCP/2895>
- Giraldo, J. (2007). Una mirada al uso de la inseminación artificial en bovinos. *Revista Lasallista de investigación*, 4(1), 51–57.
- Gualancañay, B. V. (2012). Manejo de toros donadores de semen (B.S. thesis).
- Guataquira, L. (2019). Evaluación in Vitro Del Semen En Bovinos. *Agüero, G. E. (2012). Evaluación de las Características Seminales de Sementales Bovinos mediante*

- el Analizador Seminal Computarizado (CASA). Universidad Central de Venezuela., 1–19.
- Hafez, B., Elsayed Saad Eldin. (2007). Reproducción e inseminación artificial en animales. McGraw-Hill.
- Ibáñez, F., Lisarrague, C., Callejas, S., y Cabodevilla, J. (2016). Facultad de Ciencias Veterinarias Inseminación Artificial a Tiempo Fijo: ¿Conviene utilizar semen “fresco” en lugar de congelado? Inseminación Artificial a Tiempo Fijo: ¿Conviene utilizar semen “fresco” en lugar de congelado? , 30.
- Ludeña, E. A. (2019). Evaluación de dos antioxidantes en la calidad seminal post congelación de dos biotipos de ganado bovino criollo de la provincia de Loja. (B.S. thesis). Loja.
- Moncayo, S. A. (2016). Evaluación de la calidad seminal de reproductores bovinos antes y después del proceso de crío prese. (B.S. thesis).
- Paéz, E. (2014, Abril 17). Evaluación de la aptitud reproductiva del toro. Universidad Nacional Abierta y a Distancia. Ciencia y Agricultura Colombia.
- Parada, D. O., Ariza Fernández, R. K., y cols. (2019). Efecto de dos diluyentes (agua de coco vs AndroMed) en la crío conservación del semen bovino.
- Plaza, M. J. (2016). Estudios Industriales: Orientación Estratégica para la toma de decisiones - Industria de Ganadería de Carne., 35. Recuperado de <http://www.espae.espol.edu.ec/publicaciones-de-espae/>

- Quispe, S. (2019). Evaluación de tres dilutores sobre características espermáticas antes y después de la congelación de semen bovino Holstein.
- Rodríguez, M. S. (2019). Efecto del diluyente, temperatura y tiempo de refrigeración en la calidad y fertilidad de muestra seminal de bovinos. *Revista Científica Estudios e Investigaciones*, 8, 203–204. doi: 10.26885 /rcei.foro. 2019.203
- Rossi, A. (2012). Efecto de la refrigeración y la adición de trehalosa en los parámetros de viabilidad microscópicos de semen bovino. , 66. Descargado de <http://bibliotecadigital.uca.edu.ar/repositorio/tesis/ efecto-refrigeracion-adicion-trehalosa-parametros.pdf>
- Ruiz, P. F. (2012). Proyecto de factibilidad para la creación de una empresa importadora de pajuelas de semen de ganado bovino para el mejoramiento y desarrollo productivo de la industria lechera del cantón Cayambe (B.S. thesis).
- Suárez, C. P. (2015). Fertilidad de semen congelado de toros nacionales Holstein usando los dilutores leche-yema, tris-yema y Triladyl.
- Vargas, W. D. (2012). Efecto de la adición de un surfactante natural (aloe vera) al diluyente Triladyl para crio conservación de semen bovino en toros reproductores de agso-genes, quito-pichincha.
- Villamizar, G. D., y cols. (2014). Manual de procedimientos para la colecta y crio preservación de semen bovino para la empresa santa clara genética estado parama-Brasil.

Zebadúa, M. A. O., Cruz, A. M., Rojas, J. L. R., Muñoz, B. S., López, J. L. C., Jiménez, E. O., Ávalos, V. C. (2010). Evaluación de sementales bovinos en el programa “ganado mejor” de la región centro de Chiapas, México, 34–38.

ANEXOS

ANEXO 1. EVALUACIÓN DE LAS MUESTRAS SEMINALES EN FRESCO Y POST REFRIGERACIÓN



(a) Análisis de pH



(b) Muestras a baño maría



(a) Análisis de la muestra en fresco



(b) Toma de muestra seminal



(a) Platina térmica



(b) Prueba de vitalidad



(a) Muestra de semen
en el microscopio



(b) Registro de resultados

ANEXO 2. FORMULARIO RECOLECCIÓN DE DATOS

MATRIZ DE EXAMEN										
Nombre del toro										
Fecha de colecta										
PRUEBAS MACROSCOPICAS 0 HORAS										
Ph					Volumen					
Motilidad Masal					Color					
PRUEBAS MICROSCOPICAS										
Concentración										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Total
Motilidad Total										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Total
Motilidad Progresiva										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Total
Vitalidad										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Total
Morfología										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Total

ANEXO 3. REGISTRO DE DATOS

MATRIZ DE EXAMEN											
Nombre del toro						Columba U21					
Fecha de colecta						11-12-2019					
PRUEBAS MACROSCOPICAS 8 HORAS											
Ph:						Volumen					
7						4.3					
Motilidad Masal						Densidad o Color					
						Huevo blanco					
PRUEBAS MICROSCOPICAS 8 HORAS											
Concentración											
1		2		3		4		5		Total	
10		14		10		15		14		670	
Motilidad Total											
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Total	
2	2	1	1	1	1	1	2	1	1	87%	
Motilidad Progresiva											
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Total	
2	2	2	2	2	2	2	1	1	2	81%	
Vitalidad											
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Total	
2	1	1	2	1	2	1	1	2	1	56%	
Morfología											
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Total	
2	2	2	2	2	2	1	2	1	2	20%	

MATRIZ DE EXAMEN											
Nombre del toro											
Fecha de colecta											
PRUEBAS MICROSCOPICAS											
12 Horas											
Motilidad Total											
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Total	
2	2	2	2	1	2	2	1	2	1	81%	
Motilidad Progresiva											
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Total	
2	0	2	2	2	2	2	2	2	3	75%	
Vitalidad											
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Total	
2	1	2	2	2	1	1	1	1	1	21%	
Morfología											
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Total	
1	2	2	2	2	1	2	2	1	2	19%	

MATRIZ DE EXAMEN										
Nombre del toro										
Fecha de colecta										
PRUEBAS MICROSCOPICAS										
24 Horas										
Motilidad Total										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Total
2	3	2	3	1	2	2	3	1	2	75%
Motilidad Progresiva										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Total
2	2	1	3	3	2	2	2	3	4	70%
Vitalidad										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Total
2	2	2	1	2	2	2	2	3	3	75%
Morfología										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Total
1	3	2	2	2	3	1	2	2	1	21%

MATRIZ DE EXAMEN										
Nombre del toro										
Fecha de colecta										
PRUEBAS MICROSCOPICAS										
36 Horas										
Motilidad Total										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Total
3	2	3	2	3	2	3	1	2	3	74%
Motilidad Progresiva										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Total
3	2	2	4	2	4	2	2	4	3	67%
Vitalidad										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Total
3	2	2	3	3	2	2	2	2	2	73%
Morfología										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Total
1	4	2	1	2	1	1	1	1	0	20%

MATRIZ DE EXAMEN

Nombre del toro _____
Fecha de colecta _____

PRUEBAS MICROSCOPICAS

48 Horas

Motilidad Total

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Total
3	3	3	3	3	2	4	3	3	3	30%

Motilidad Progresiva

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Total
3	4	3	4	3	5	3	4	5	4	62%

Vitalidad

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Total
3	4	3	3	3	3	3	3	3	2	71%

Morfología

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Total
4	2	5	3	1	0	1	1	2	0	20%