



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Facultad de Ciencias Agropecuarias

MAESTRIA EN REPRODUCCIÓN ANIMAL

TITULO:

“Evaluación de la calidad espermática de reproductores bovinos mediante el uso de sistemas de evaluación seminal convencional y sistema CASA (análisis seminal asistido por computadora) y su respuesta con la fertilidad por inseminación artificial”

**TESIS PREVIA A LA OBTENCION DEL TITULO DE MAGÍSTER
EN REPRODUCCIÓN ANIMAL**

AUTOR: Mvz. Dina Maricela Veloz Veloz

CI. 1720299302

DIRECTOR: Dr. Ricardo Horacio Alberio Arce

CI. AAA 558960

CUENCA, ECUADOR

2017

RESUMEN

El objetivo fue comparar los resultados de parámetros de calidad seminal bovina obtenidos por método convencional y sistema computarizado CASA, además de determinar si existen diferencias en la calidad de semen entre las razas JE, HO y BS. Para lo cual se colectaron muestras de 5 toros, se analizaron por el método convencional: motilidad individual (%), motilidad masal (1-5), concentración por cámara de Neubauer (10^6 sptz/ml) y motilidad individual post congelación (%); alícuotas del mismo eyaculado se analizaron por el método CASA midiendo las variables: motilidad total (%), motilidad progresiva (%), concentración (10^6 sptz/ml) y motilidad individual postcongelación (%). Se compararon resultados de cada raza, utilizando un test de rangos múltiples de Duncan para determinar diferencias estadísticas, obteniendo que en la mayoría de los parámetros el semen de JE tuvo conteos significativamente superiores a los de las otras razas. Además se compararon todos los resultados del método convencional con los de CASA en aquellos parámetros que son equivalentes en los dos métodos: motilidad (individual/total), concentración (Neubauer/CASA) y motilidad post congelación; para esta comparación se realizó un test de Student que demostró que existieron diferencias estadísticas entre ambos métodos en los tres parámetros estudiados. En el caso de Motilidad, el método convencional presentó un promedio de 79% para toda la población de muestras, frente al CASA, en concentración el método convencional presentó un resultado menor que CASA; mientras que en motilidad post-congelación los conteos más altos los presentó el método convencional frente al CASA. Se concluyó que los valores numéricos de calidad espermática difieren dependiendo del método de medición utilizado. En cuanto a la evaluación in vivo el mayor porcentaje de fertilidad lo obtuvo la raza JE.

Palabras claves: SEMEN BOVINO, EVALUACION CASA, EVALUACION CONVENCIONAL, MOTILIDAD ESPERMATICA, CONCENTRACION ESPERMATICA



ABSTRACT

The objective of this study was to compare the results of some parameters of seminal quality of bulls obtained by the Conventional method and also by the computerized CASA system, other objective was to determinate if there is any difference in seminal quality between JE, HO and BS bulls. Semen samples were collected from 5 bulls: Individual motility (%), Mass motility (1-5), Neubauer chamber concentration (10^6 spz/ml) and individual post-freezing motility (%). The same samples were by CASA method, which variables are: Total motility (%), Progressive motility (%), concentration (10^6 spz/ml) and total post-freezing motility (%). Results obtained by each breed of bulls in these parameters were compared using a Duncan multiple range test to assess statistical differences. The result was that Jersey bull's semen had the higher counts for most the variables compared with the other two. The entire population of results by the Conventional method was also compared against the entire population of results by CASA, in those parameters that are equivalent between the two methods: motility (individual vs total), concentration (Neubauer vs CASA) and post-freezing motility. This comparison was performed with a Student test that proved there were differences between the two methods in all the studied parameters. In the case of motility, the conventional method showed an average 79% against of the CASA system. In concentration the conventional method presented a lower result than CASA. Finally about the post-freezing motility the conventional method had the highest result against of CASA. The conclusion was that the numeric results of spermatic quality are different depending on which method is used. Regarding the live evaluation that the highest percentage of fertility was obtained the jersey breed.

Keywords: SEMEN BOVINE, CASA EVALUATION, CONVENTIONAL EVALUATION, SEMINAL MOTILITY, SEMINAL CONCENTRATION.



TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
TABLA DE CONTENIDOS	3
LISTA DE TABLAS.....	6
LISTA DE FIGURAS	7
ABREVIATURAS Y SIMBOLOGIA.....	8
CLÁUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL	11
AGRADECIMIENTO.....	12
DEDICATORIA.....	13
CAPITULO I: INTRODUCCIÓN.....	14
CAPITULO II: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Evaluación de la calidad del semen.....	17
2.1.1 Métodos de evaluación in vivo.....	17
2.1.2 Métodos de evaluación in vitro	17
2.2 Métodos de análisis seminal	18
2.2.1 Método convencional.....	18
2.2.1.1 Evaluación Macroscópica.....	18
2.2.1.1.1 Color	18
2.2.1.1.2 Volumen.....	19
2.2.1.1.3 Aspecto.....	20
2.2.1.1.4 Olor.....	21
2.2.1.1.5 pH.....	22
2.2.1.2 Evaluación Microscópica.....	22
2.2.1.2.1 Motilidad espermática.....	22
2.2.1.2.2 Motilidad Masal.....	23
2.2.1.2.3 Motilidad Individual	24



2.2.1.2.4	Vigor	26
2.2.1.2.5	Morfología espermática	26
2.2.1.2.6	Concentración espermática	30
2.2.2	Sistema De Análisis Computarizado.....	33
2.2.2.1	Sistema de Análisis Seminal Asistido por Computadora (CASA)	
	33	
2.3	Pruebas de permeabilidad de membrana.	37
2.3.1	Test de host.....	37
2.4	Diluyentes de semen.....	39
2.4.1	Funciones de un Diluyente:	39
2.5	Criopreservación de Semen.....	40
CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS		42
3.1	Materiales	42
3.1.1	Materiales Biológicos.....	42
3.1.2	Materiales Químicos	42
3.1.3	Materiales Físicos:.....	42
3.2	Método	43
3.2.1	Localización	43
3.2.2	Características de la unidad de análisis	44
3.2.3	Metodología	44
3.2.3.1	Colecta de semen	44
3.2.3.2	Análisis de semen:	44
3.2.3.3	Congelación de semen	47
3.2.3.4	Evaluación in vivo (fertilidad seminal)	48
3.2.4	Variables analizadas.....	48
3.2.5	Diseño experimental y pruebas estadísticas	48
CAPITULO IV: RESULTADOS.....		50



CAPITULO V: DISCUSIÓN	53
CAPITULO VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	57
6.1 Conclusiones	57
6.2 Recomendaciones	57
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	58
ANEXOS	66



LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Escala de evaluación de volumen seminal en toros.	20
Tabla 2. Esquema del grado de concentración espermática (número de espermatozoides por mm ³)	21
Tabla 3. Escala de evaluación de la motilidad individual de los espermatozoides.	25
Tabla 4. Esquema de comparación de los sistemas de clasificación de algunos defectos morfológicos.	29
Tabla 5. Valores mínimos recomendados por la Sociedad Internacional de Teriogenología	30
Tabla 6. Nomenclatura para análisis de semen	31
Tabla 7. Concentración espermática de acuerdo a su consistencia y apariencia.	32



LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de ondas de movimiento de masa microscópico.....	24
Figura 2. Esquema de un espermatozoide.....	26
Figura 3. Evaluación microscópica, anormalidades primarias y secundarias..	28
Figura 4. Conteo de espermatozoides en Cámara Neubauer.	33
Figura 5. Representación esquemática de las muestras seminales, mostrando parámetros cinéticos.	37
Figura 6. Representación esquemática de los típicos cambios morfológicos que sufren los espermatozoides humanos expuestos a un medio hiposmótico.....	38
Figura 7. Representación esquemática de espermatozoides reaccionados positivamente al test de host.....	39



ABREVIATURAS Y SIMBOLOGIA

CASA: Por sus siglas en inglés, Computer Assisted Semen Analysis (Análisis Seminal Asistido por Computadora).

HOST: Hypoosmotic Swelling test (Prueba Hiposmótica).

HO: Holstein

BS: Brown Swiss

JE: Jersey

MT: Motilidad Total.

MP: Motilidad Progresiva.

MM: Motilidad Masal.

MI: Motilidad Individual.

%MT: Porcentaje de Motilidad Total.

%MP: Porcentaje de Motilidad Progresiva.

%EI: Porcentaje de Espermatozoides Inmóviles.

IA: Inseminación Artificial.

ICSI: Intracitoplasmática.

MPPC: Motilidad Progresiva Pos Congelación.

MTPC: Motilidad Total Pos Congelación.

MIP: Motilidad Individual Progresiva.

MosPost: Motilidad Pos Congelación.

PEV: Porcentaje de Espermatozoides Vivos.



BCA: Bloques Completos al Azar.

MOT: Porcentaje de espermatozoides motiles.

VCL: Velocidad curvilineal.

VSL: Velocidad lineal.

VAP: Velocidad promedio en su trayectoria.

ALH: Amplitud lateral de la cabeza.

BCF: Frecuencia de batido.

DAP: Distancia en el camino promedio.

DCL: Distancia en línea curva.

DSL: Distancia en línea recta.



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Yo, Dina Maricela Veloz Veloz, en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Evaluación de la calidad espermática de reproductores bovinos mediante el uso de sistemas de evaluación seminal convencional y sistema CASA (análisis seminal asistido por computadora) y su respuesta con la fertilidad por inseminación artificial" reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 09 de noviembre de 2017

Dina Maricela Veloz Veloz

C.I: 1720299302



Cláusula de Propiedad Intelectual

Yo, Dina Maricela Veloz Veloz, autora del trabajo de titulación “Evaluación de la calidad espermática de reproductores bovinos mediante el uso de sistemas de evaluación seminal convencional y sistema CASA (análisis seminal asistido por computadora) y su respuesta con la fertilidad por inseminación artificial”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 09 de noviembre


Dina Maricela Veloz Veloz

C.I: 1720299302



AGRADECIMIENTO

A la Lic. Margoth Hernández, Subsecretaria de Ganadería – MAGAP, mi sincero agradecimiento por la confianza y apoyo depositado para emprender este nuevo reto profesional.

Al Dr. Ricardo Alberio PhD, mi agradecimiento por aportar con sus valiosos conocimientos en la culminación de esta investigación.

A ustedes compañeros de la CNPMG “El Rosario” gracias por el apoyo brindado, nada de esto sin ustedes.

A ustedes familia, mi eterno agradecimiento por el apoyo siempre brindado.

A los docentes y personal administrativo de la Universidad de Cuenca – Facultad de ciencias Agropecuarias – Carrera de Medicina Veterinaria y Zootécnica un sincero agradecimiento

Dina Maricela



DEDICATORIA

A mi hijo Rafa y a mi sobrina Eli, ustedes mi fortaleza. Los amo pequeños.

A Rafael y Edelina mis padres, gracias por su infinito amor, paciencia y apoyo.

A mi hermana Liss y a mi cuñado Juan, un ejemplo de lucha y tenacidad.

Los amo,

Dina Maricela



CAPITULO I: INTRODUCCIÓN

Al considerar la eficacia reproductiva de un hato se debe tener en cuenta tanto la importancia de la hembra como la del macho. En general, mayoritariamente, las investigaciones se han centrado en el análisis de la fertilidad de la hembra a pesar que la fertilidad del macho determinante en un sistema de reproducción debido al efecto multiplicador que este tiene en un sistema de apareo donde se usa un macho cada 25 hembras en promedio.

(Boggio, 2007), menciona precisamente que en servicio natural la relación toro hembra es 1/25 - 1/50, mientras que en inseminación artificial (IA), este efecto multiplicador es mucho mayor al llevar esta proporción a 1/10000 y aún más. Por esto es que se considera que el toro es responsable en un 80% o más, del mejoramiento que pueda lograrse en una población. Si una hembra falla lo que se pierde es un ternero; pero si falla el toro pueden perderse entre 25 y 50 (o más) terneros cada 100 hembras.

Entre las biotecnologías aplicadas a la reproducción, la IA ha demostrado ser la herramienta más exitosa para los programas de mejora genética de los animales de importancia zootécnica, especialmente en la industria bovina. (Hidalgo, Tamargo, & Diez, 2005)

El resultado de la IA es la consecuencia de una serie de eventos concatenados. Cuando se inseminan hembras fértiles, con una condición corporal adecuada, el programa de IA resultará exitoso si se cuenta con un sistema de detección de celos eficiente, si se utiliza semen de buena calidad y si la técnica la ejecutan inseminadores avezados (Catena & Cabodevila, 1999).

Cuando se habla de calidad del semen, en general lo que se espera del mismo es una capacidad fecundante aceptable biológica y productivamente. Por ello, uno de los objetivos prioritarios de la industria de la IA ha sido la predicción de la capacidad fecundante del semen comercializado. Es así, que a lo largo del tiempo han ido sucediendo y desarrollando diferentes métodos diagnósticos para predecir esta capacidad del semen. Para ello se ha recurrido a la evaluación de la motilidad, del volumen, de la concentración y de la morfología espermática como medidas básicas de la posible aptitud fecundante de un eyaculado. Pero a



estas metodologías simples se han agregado otras más complejas y en principio con mayor capacidad de predicción hasta las más actuales como la contrastación de semen bovino congelado mediante sistemas de análisis computarizado, citometría de flujo y test de funcionalidad espermática basada en la fecundación *in vitro*. (Muiño Otero, 2008)

Determinar si un toro tiene buena calidad seminal es tan importante como determinar su tamaño testicular y su libido que en alguna medida pueden estar vinculadas con la misma. Sin embargo, poca importancia tiene un toro de buena circunferencia escrotal y alta capacidad de servicio si su semen no es bueno. El estudio del semen es una manera de evaluar la capacidad fecundante del semen de un toro y algunas pruebas de laboratorio como las mencionadas son útiles para su predicción (agrobit.com, 2016)

La buena motilidad es sólo uno de los muchos requisitos que ha de reunir un espermatozoide para ser capaz de fecundar a un ovocito. A pesar de ser una variable que no siempre se relaciona con la capacidad fecundante, ha sido y todavía es el parámetro más utilizado para valorar la calidad de un eyaculado o de una dosis de semen refrigerado o congelado (Muiño, y otros, 2005)

Muchos investigadores, especialistas en reproducción animal están tratando de diseñar el “análisis seminal ideal”, que valore adecuadamente y prediga la fertilidad de una muestra seminal de la forma más precisa posible. Así, el análisis de semen ideal sería aquel que de forma sencilla y eficaz permitiera conocer de manera predictiva la capacidad fecundante de un eyaculado. (Mellisho, 2010)

Por lo antes descrito en el siguiente estudio comparamos “la evaluación de la calidad espermática de reproductores bovinos, determinada mediante el uso de sistemas de evaluación seminal convencional y sistemas automatizados (CASA) con su fertilidad cuando es usado por inseminación artificial”.



Objetivo general

Evaluar la calidad espermática de reproductores bovinos mediante el uso de sistemas de evaluación seminal convencional y sistema CASA y su respuesta con la fertilidad por inseminación artificial.

Objetivos específicos

1. Comparar datos de los valores de la calidad de seminal por raza mediante el sistema de evaluación convencional.
2. Comparar datos de los valores de la calidad seminal por raza mediante el sistema de Análisis Seminal Asistido por Computadora (CASA).
3. Determinar si existen diferencias entre los valores de la calidad seminal determinados por medio del método convencional y con el sistema CASA.
4. Determinar la capacidad fecundante de los toros mediante inseminación artificial. (In vivo)

Hipótesis

Hay diferencias en la calidad espermática entre las diferentes razas de bovinos estudiados.

Hay diferencias entre los valores de calidad seminal obtenidos por el método convencional el método CASA.

Hay diferencias entre los valores de la calidad seminal y el porcentaje de la capacidad fecundante de los toros mediante inseminación artificial.



CAPITULO II: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Evaluación de la calidad del semen

El análisis de calidad seminal representa una valiosa herramienta para evaluar el potencial fecundante de los machos de diferentes especies y complementa la valoración física del animal (Montes, Torres, Rugeles, Almanza, & Guimarães, 2012).

Muchos investigadores, especialistas en reproducción animal están tratando de diseñar el “análisis seminal ideal”, que valore adecuadamente y prediga la fertilidad de una muestra seminal. Así, el análisis de semen ideal sería aquel que de forma sencilla y eficaz permita conocer de manera predictiva la capacidad fecundante de un eyaculado. (Mellisho, 2010)

Según (Quintero, 2003), el análisis seminal o espermiograma incluye una serie de pruebas que evalúan diversos factores o funciones de la célula espermática. Como resultado del análisis seminal podemos calificar a la muestra como apta o no apta para su uso en IA.

En el análisis rutinario se incluye un examen macroscópico y microscópico del eyaculado en los que se mide el volumen, la concentración, la motilidad, el estado del acrosoma y las morfo anomalías espermáticas. (Gadea, 2005)

2.1.1 Métodos de evaluación in vivo

El método in vivo utilizado para determinar la fertilidad de un toro es por medio de IA o monta natural en número vacas. Este método es altamente costoso y se necesita de periodos largos de tiempo para obtener resultados fiables.

2.1.2 Métodos de evaluación in vitro

Los métodos in vitro han sido los más utilizados por ser económicos y rápidos en comparación con los métodos in vivo. No obstante, con estos métodos se estima la calidad del semen más no su fertilidad real. Para que una prueba de evaluación de semen sea ideal debe cumplir las siguientes características: objetiva, repetible, precisa, rápida, sencilla y de bajo costo. Se han desarrollado



diversas pruebas con estas características las mismas se han clasificado en: prueba de rutinaria (espermiograma), sistema CASA, pruebas funcionales, pruebas para valorar la integridad de la cromatina y test de interacción entre gametos.

2.2 Métodos de análisis seminal

2.2.1 Método convencional

El espermiograma clásico o convencional se caracteriza por ser una prueba sencilla que evalúa las características macroscópicas y microscópicas del semen. Las características macroscópicas incluyen el volumen, color, olor y pH. Mientras que las características microscópicas incluyen la motilidad en masa e individual, concentración, espermatozoides vivos-muertos y anormalidades de los espermatozoides.

Según (Muiño, y otros, 2005), entre los inconvenientes de las técnicas clásicas utilizadas para evaluar la calidad seminal son la subjetividad de las mismas, puesto que los resultados dependen en gran parte de la experticia del evaluador.

Cuando se evalúa semen, se estudia la calidad seminal, que está determinada por la comparación de los parámetros obtenidos al evaluar el semen de un toro con los valores que son considerados como normales para un toro reproductor adulto. (Vera Muñoz, 2008)

2.2.1.1 Evaluación Macroscópica

Las características macroscópicas a evaluar en un eyaculado bovino comprende:

2.2.1.1.1 Color

Depende de la cantidad de espermatozoides; cuando el semen es de buena calidad, presenta una coloración blanco lechosa o cremosa y cuando es de baja calidad su color es similar a leche aguada (Urdaneta & Olivares, 1985).

Generalmente el color del semen es blanco cremoso y a medida que disminuye la concentración del semen se hace más claro hasta llegar a la azoospermia, en



que el eyaculado es transparente por ausencia de espermatozoides. (Serrano, 1993)

A veces el semen es de color verdoso, lo cual indica la existencia de procesos necrotizantes, de carácter purulento, causados por algún órgano del aparato genital masculino. El semen puede estar coloreado de rojo vivo por la presencia de sangre cuando hay heridas recientes en el prepucio, el glande o la uretra, a menudo producidas durante la recolección artificial. La presencia de pus, indica inflamación. La sangre contiene eosinófilos, que presentan una enzima (amilasa) que destruye los factores de capacitación producidos en el epidídimo. (Cuberlo & Rodríguez, 2013)

2.2.1.1.2 Volumen

El volumen tiene estrecha relación con el medio ambiente, edad y genotipo ya que en los trópicos, la producción de espermatozoides y la calidad del semen disminuyen durante la estación caliente, es decir, las razas Bos indicus están mejor adaptadas al clima caliente, caso contrario, las razas Bos taurus poseen mayor superficie corporal por lo que resisten mejor los climas fríos, lo cual indica que poseen mejores características en la obtención de material seminal. (Brito, et al., 2002)

El volumen del eyaculado es principalmente aportado por las vesículas seminales y glándula prostática, con un pequeño aporte de las glándulas bulbouretrales y el epidídimo. El volumen del líquido seminal es esencial para obtener el número total de espermatozoides y células no espermáticas en el eyaculado. (Sarabia, 2015)

Menciona (Rutter & Russo, 2006) que, el volumen de eyaculado tiene un rango entre 2 y 12 cm, con un promedio entre 4 y 6 cm, se mide en el tubo colector graduado, y varía fisiológicamente en función de varios factores.

- Edad
- Raza
- Preparación sexual
- Tamaño testicular y características individuales



- Frecuencia de recolección
- Método de colección

En la siguiente tabla se describe la escala de evaluación de este parámetro.

Tabla 1. Escala de evaluación de volumen seminal en toros.

PARÀMETRO	VALORES		
	I (Bueno)	II (Regular)	III (Malo)
Volumen (ml)	3 – 5	2 – 4	< 2 – 4

Fuente: (Palma, INSEMINACION ARTIFICIAL, 2009)

2.2.1.1.3 Aspecto

El material espermático total es un líquido denso, cremoso, ligeramente amarillento, formando una suspensión de espermatozoides en un medio llamado plasma seminal. (Serrano, 1993)

Para (Hafez & Hafez, 2000), el semen debe tener aspecto opaco y relativamente uniforme, indicativo de alta concentración de células espermáticas. Las muestras translucidas contienen pocos espermatozoides, la muestra debe estar libre de pelos, suciedad y otros contaminantes. Debe desecharse el semen con aspecto lechoso o con fragmentos de material, pues ello indica infección, los toros pueden producir semen de color amarillo debido a la presencia inocua de rivoflavina. Esto no debe confundirse con orina, la cual tiene un olor característico. Los animales jóvenes y los de menor talla dentro de una especie producen menores volúmenes de semen.

El color normal suele ser blanco, blanco amarillento, marfil o inclusive hasta grisáceo. El tinte amarillento, cuando es fisiológico, está dado por la presencia de ciertos pigmentos. Los toros con estos pigmentos lo hacen siempre y por lo tanto la coloración de todos sus eyaculados está dentro de la gama de los amarillentos. La presencia de una variación de color en toros que habitualmente dan eyaculados amarillentos debe hacernos sospechar la presencia de algún trastorno o proceso patológico. Todo aquello que se aparte de estos colores se considera anormal y habrá que determinar el motivo de ese hallazgo. Como



colores anormales más frecuentes se describen los tonos verdosos, rojizo, parduzco.

Mediante la observación del aspecto y según la densidad aparente de un eyaculado puede estimarse aproximadamente, aunque de manera subjetiva, el grado de concentración espermática según la siguiente tabla.

Tabla 2. Esquema del grado de concentración espermática (número de espermatozoides por mm³)

SEMEN	CONCENTRACION APARENTE	ASPECTO
Muy denso	más de 1.300.000/mm ³	Cremoso
Denso	entre 800.000 y 1.300.000/mm ³	Lechoso
Semi-denso	entre 500.000 y 800.000/mm ³	Turbio
Ralo	entre 200.000 y 500.000/mm ³	Seroso
Oligozoospermico	menos de 200.000/mm ³	Seroso a acuoso
Azoospermico	ausencia de espermatozoides en el campo óptico	Acuoso

Fuente: (Rutter & Russo, 2006)

2.2.1.1.4 Olor

El semen fresco de toro tiene un olor típico producto de la espermia. El olor es un poco dulzón, recordando el de leche fresca; muchas veces se encuentra enmascarado por el olor típico del animal mismo y de la cavidad prepucial. El olor a orina es indeseable, así como el olor pútrido ya que confirman enfermedades del testículo y de las glándulas sexuales accesorias. (Vera C. A., 2011).

Según (Moncayo, 2016), el olor del semen es característico de cada especie animal (sui generis) y generalmente no es muy intenso. Si se mezcla con orina, puede tomar un olor urinoso, mientras que si el olor se intensifica a un olor de putrefacción, se debe a la mezcla de productos purulentos y restos necróticos, toma de mismo olor cuando el orificio del prepucio esta lesionado o presenta contaminación.



2.2.1.1.5 pH

Refleja el balance entre las diferentes secreciones, principalmente entre el pH alcalino de vesículas seminales y el ácido de la próstata. (López, Urbano, & Cárdenas, 2012)

El pH del semen varía normalmente en un rango muy estrecho (7,2 - 8,0), pocos son los trastornos capaces de alterarlo. Se ha sugerido que un pH elevado (> 8) puede considerarse un signo de infección seminal si se asocia a otros síntomas y signos de sospecha, mientras que un pH disminuido (< 7,2) se observa cuando existe un déficit de la función de las vesículas seminales, en especial en pacientes con el síndrome de ausencia funcional de los conductos eyaculadores. (Padrón, Fernández, & Gallardo, 1998)

Según (Rutter & Russo, 2006), varía entre 6,2 y 6,8 en un eyaculado normal; puede virar al pH alcalino en semiovesiculitis, epididimitis, cuando existe contaminación importante, o contiene muchos espermatozoides muertos.

2.2.1.2 Evaluación Microscópica

La evaluación microscópica según él (Instituto Nacional de Salud Animal, 2012) define como el análisis de una muestra de semen bovino para verificar viabilidad, motilidad y morfología.

Las características microscópicas que se evalúan en el semen de bovinos son: motilidad masal, motilidad individual, morfología y viabilidad y concentración espermática.

2.2.1.2.1 Motilidad espermática

La observación de la motilidad individual y la estimación del porcentaje de células con movimientos progresivos nos dan información de la integridad de la membrana de los espermatozoides, así como también de la integridad morfológica de los espermatozoides. (Brogliatti & Bó, 2013)

(Vera Muñoz, 2008), menciona que la evaluación de la motilidad indica la capacidad de movimiento de los espermatozoides.



La movilidad es uno de los parámetros más importantes en la evaluación de una muestra de semen. Un espermatozoide inmóvil es incapaz de atravesar el moco cervical y mucho menos las envolturas del ovocito. (López, Urbano, & Cárdenas, 2012)

Para (Miró, 2015), la motilidad espermática es uno de los parámetros para conocer tanto la calidad seminal como la correlación con la fertilidad. Hasta nuestros días, la motilidad se ha venido desarrollando de forma subjetiva mediante la observación al microscopio de los porcentajes de células motiles.

Destaca (Madrid-Bury, 2005), que es importante resaltar que al determinar la motilidad, no se toma en consideración, la habilidad de las células espermáticas para desarrollar ciertos procesos importantes para la fertilización in vivo, como son la capacitación, la reacción del acrosoma y la fertilización.

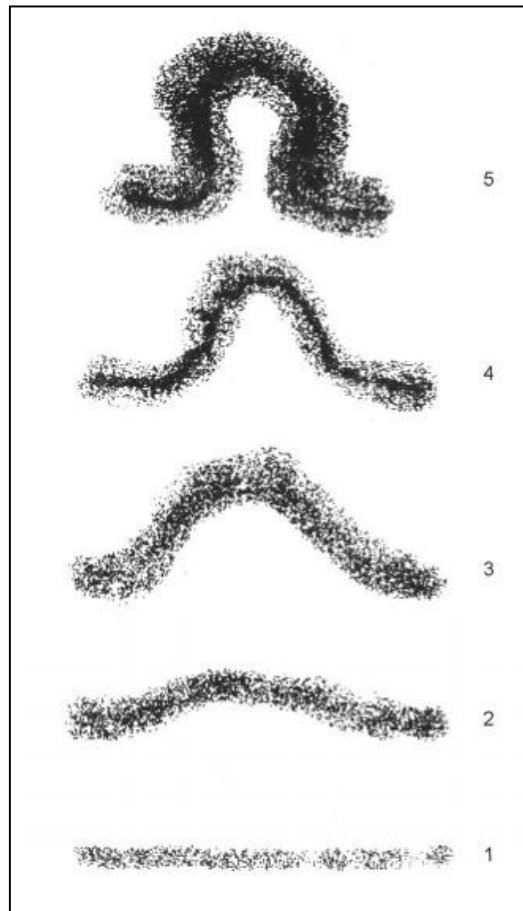
La valoración de la motilidad como único parámetro de calidad seminal no es suficiente para predecir la capacidad fecundante del semen, es sólo uno de los requisitos que ha de cumplirse, de ahí que la correlación existente entre la motilidad de una muestra de semen y su fertilidad real, aunque significativa, sea baja. (Muiño, y otros, 2005)

2.2.1.2.2 Motilidad Masal

(Díaz, García, & Rodríguez, 1989), se refiere a la motilidad masal (MM) como proporción de espermatozoides que presentan algún tipo de movimiento y a los que se les concede un porcentaje estimado, así también (Mesa, 2011) menciona que esta técnica se ha utilizado desde hace mucho tiempo como método rápido, aunque subjetiva, para determinar la concentración y viabilidad de los espermatozoides de un eyaculado.

El movimiento en masa depende de tres factores: concentración, porcentaje de células con movimiento progresivo y velocidad de movimiento de los espermatozoides. Cuando uno de estos factores se encuentra disminuido, las ondas rápidas en remolinos esperadas son severamente deprimidas o eliminadas. (Brogliatti, 2013)

Figura 1. Esquema de ondas de movimiento de masa microscópica.



Fuente: (Rutter & Russo, 2006)

La MM está directamente relacionada con la concentración espermática, el movimiento progresivo y el vigor de ese movimiento; así, a mayor cantidad de espermatozoides se formará una mayor cantidad de olas; se expresa en una escala de calificación subjetiva de 1 a 5. (Paez & Corredor, 2014).

2.2.1.2.3 Motilidad Individual

Esta variable evalúa el porcentaje de células móviles en semen diluido. Para la evaluación se usa una escala de 0 a 100 %, considerando que motilidades >70% son excelentes, entre 50 a 70% buenas, 30 a 50% regulares y < a 30% malas. (Hafez & Hafez, 2000).



(Rutter & Russo, 2006) Mencionan que se trata de evaluar el porcentaje de espermatozoides con:

- Movimiento progresivo rectilíneo.
- Movimiento en el lugar (circular, ondulatorio, etc.).
- Espermatozoides inmóviles (muertos o en estado de anabiosis)

La motilidad individual (MI) se determina por los movimientos progresivos del espermatozoide. Escala basada en la velocidad de movimiento de las células móviles, esto lo menciona (Barth, 2001).

Tabla 3. Escala de evaluación de la motilidad individual de los espermatozoides.

Escala	Características
0	Inmóviles o muertos.
1	Girando entre sí, sin movimiento progresivo.
2	Movimientos anormales, en ocasiones progresivo.
3	Con movimiento progresivo lento y ondulatorio.
4	Con movimientos progresivo rápido.
5	Con movimiento progresivo rectilíneo muy rápido

Fuente: (Rutter & Russo, 2006)

Es posible observar diversos patrones de movimiento. Los patrones generales de motilidad espermática en el semen diluido se presentan en un patrón de semiarco largo. El diluyente puede alterar un poco la motilidad, por lo general incrementando la velocidad de medición. Después de la dilución inicial, un porcentaje elevado de los espermatozoides puede mostrar un patrón de movimiento circular, que por lo general se resuelve después de 5 a 10 minutos en el diluyente.

Si los espermatozoides nadan en movimiento circular estrecho, ello significa que tal vez sufrieron choque por frío. El movimiento oscilatorio podría definirse como células envejecidas o en proceso de secarse. Los patrones de motilidad también se correlacionan con la fertilidad o subfertilidad en machos. La motilidad es rutinariamente evaluada por estimación visual del porcentaje de células móviles, por lo cual el resultado es subjetivo. (Cuberlo & Rodríguez, 2013)

2.2.1.2.4 Vigor

Es una medida del grado de intensidad del movimiento progresivo rectilíneo. Se evalúa sobre la misma preparación utilizada para estudiar el movimiento individual. Se mide en una escala subjetiva de 0 a 5. (Rutter & Russo, 2006)

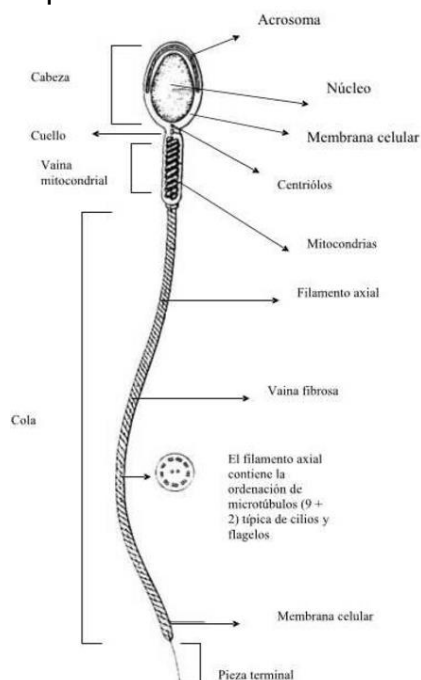
2.2.1.2.5 Morfología espermática

El análisis morfológico de los espermatozoides es uno de los principales componentes de la evaluación de las características de una muestra seminal. Se basa en la relación directa que hay entre la proporción de los espermatozoides normales en el eyaculado el tipo de defecto y su influencia sobre la fertilidad de los toros. (Rivera, 2013)

(Gualancañay, 2012), lo define al estudio de la forma del espermatozoide que permite determinar las posibilidades de fertilización de la célula. Aquellos eyaculados con una gran cantidad de células anormales tendrán menos posibilidades de ser fértiles.

Los espermatozoides del toro, miden de longitud entre 68 a 74 micras, y están constituidos por cabeza, cuello, pieza intermedia y cola.

Figura 2. Esquema de un espermatozoide.



Fuente: (Hidalgo, Tamargo, & Diez, 2005)



En general, se considera que un buen reproductor no debería tener más del 30% de anomalías espermáticas totales en el eyaculado (Vilanova & Balladares, 2005), sin embargo (Hafez & Hafez, 2000), indica que, en los toros cuando las células espermáticas exceden el 20% es característico que la fertilidad disminuirá. Cada muestra de semen contiene algunas células espermáticas anormales.

La evaluación morfológica se puede realizar por medio de una tinción con eosina-nigrosina o con tinta china. En la evaluación morfológica es necesario determinar la cantidad y el tipo de anomalías. (Paez & Corredor, 2014)

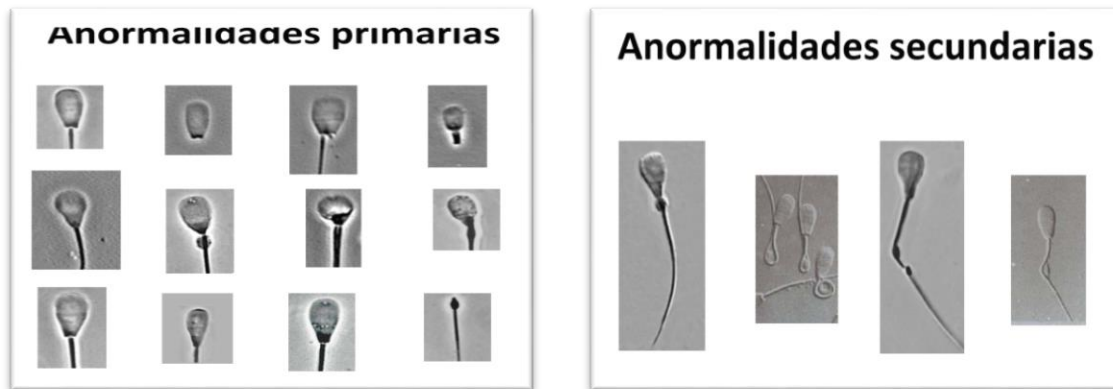
(Muiño, y otros, 2005), menciona que, se han establecido distintas clasificaciones de las anomalías espermáticas atendiendo a distintos criterios:

- a) dependiendo de si se originan en el testículo (anomalías mayores) o a lo largo del tránsito epididimal o tras la eyaculación (anomalías menores)
- b) si están asociadas a infertilidad o no (primarias o secundarias, respectivamente)
- c) de la región espermática implicada (anomalías de la cabeza, de la pieza intermedia o de la pieza principal).

Malformaciones Primarias y Secundarias

Según (Gomez & Migliorisi, 2015), es la clasificación más usada en la bibliografía, pero no por ello la más exacta. Las malformaciones primarias por definición, son aquellas que se originan dentro del testículo durante la espermatogénesis y malformaciones secundarias son aquellas que se originan dentro del epidídimo; cabe destacar que por definición se denota el origen y no la severidad del defecto.

Figura 3. Evaluación microscópica, anomalías primarias y secundarias.



Fuente: (Hincapie, 2015)

También lo señala (Buzón Cuevas, 2013), generalmente, los defectos primarios se consideran más severos y se creen que tienen su origen durante la espermatogénesis dentro del epitelio seminífero testicular. Este tipo de alteraciones son fácilmente detectadas mediante la evaluación morfológica y aportan una información muy valiosa ya que estas anomalías se consideran que están entre moderada y altamente relacionadas con la fertilidad de los sementales.

Existen otras clasificaciones. Una de ellas, bastante menos precisa, divide los trastornos de morfología espermática en defectos mayores y menores. Así, los defectos mayores están relacionados con las alteraciones de la fertilidad, mientras que los menores no producen trastornos de consideración en este aspecto. (Rutter & Russo, 2006)



Tabla 4. Esquema de comparación de los sistemas de clasificación de algunos defectos morfológicos.

DEFECTO	CLASIFICACIÓN PRIMARIA SECUNDARIA	CLASIFICACIÓN MAYORES- MENORES
Gota protoplasmática		
Proximal	Primaria	Mayor
Distal	Secundaria	Menor
Anormalidades de cola		
Enrollada compacta	Primaria	Mayor
Enrollada alrededor de la cabeza	Primaria	Mayor
Colas Dobladas	Secundaria	Menor
Defectos de pieza intermedia	Primaria	Mayor
Defectos de la cabeza		
Piriforme	Primaria	Mayor
Estrecha	Primaria	Mayor
Pequeña	Primaria	Mayor
Larga	Primaria	Mayor

Fuente: (Rutter & Russo, 2006)

Defectos primarios vs. Defectos secundarios: Los defectos primarios son más severos y se piensa que se originan mientras los espermatozoides todavía están dentro del epitelio seminífero de los testículos. Los defectos secundarios son menos serios y se originan durante el pasaje por el epidídimo o maltrato después de la eyaculación. Algunos autores cuestionan la utilidad o base fisiológica de este modelo de clasificación. (Reproduccion Animal, 2014)



Tabla 5. Valores mínimos recomendados por la Sociedad Internacional de Teriogenología

Requerimiento mínimo para la clasificación de un toro como potencialmente satisfactorio en la evaluación reproductiva (Sociedad internacional de Teriogenología)				
Circunferencia escrotal – CE (mínimo recomendado)		El mínimo recomendado es de 30% de espermatozoides con movimiento progresivo		
Edad	CE (cm)	Motilidad masal	Clasificación	Individual
< 15 meses	30	Remolinos rápidos	Muy buena	> 70%
> 15 < 18 meses	31	Remolinos lentos	Buena	50 – 69 %
> 18 < 21 meses	32	Oscilación generalizada	Regular	30 – 49 %
>21 < 24 meses	33	Oscilación esporádica	Mala	< 30 %
> 24 meses	34			

El valor mínimo recomendado de morfología es de 70% de células normales.

Para ser clasificado como un toro potencialmente satisfactorio requiere un examen físico satisfactorio y los valores mínimos aceptados para la circunferencia escrotal, motilidad individual y masal, morfología.

Cualquier toro que no cumpla con los requisitos mínimos se clasifica como un toro potencialmente insatisfactorio o clasificación dudosa o aplazada de acuerdo con el criterio del evaluador.

Fuente: (Paez & Corredor, 2014)

2.2.1.2.6 Concentración espermática

La concentración es un parámetro importante en la evaluación espermática, ya que existe una elevada correlación significativa entre el número de espermatozoides inseminados y la fertilidad del toro. (Gomez & Migliorisi, 2015)

Permite evaluar la capacidad de producción de espermatozoides del semental y calcular el número de dosis a producir por eyaculado. (González, Martínez, & Sánchez, 2013)

(Rutter & Russo, 2006), mencionan que, la cantidad, densidad o concentración de células espermática, se expresa en una unidad de volumen (mm^3 , o cm^3 , o ml), y su valoración tiene gran significación para la dilución del semen para IA. La concentración es variable, y un eyaculado de buena calidad debería estar entre 0,8 a 1 millón de espermatozoides por mm^3 . Los factores que influyen en la concentración son los mismos descriptos para el volumen del eyaculado.



Comúnmente, se establece que un toro ha alcanzado la pubertad cuando el semen tiene al menos 50×10^6 espermatozoides totales, con un 10% mínimo de movilidad progresiva o movimiento de cabeza. (Perry & Patterson, 2017)

Este parámetro no solo está influido por la edad, sino por el método de colección, la condición corporal, desarrollo sexual, madurez del toro, régimen de alimentación, estado de salud reproductiva, tamaño de los testículos y la época del año.

La terminología para semen se representa en el siguiente cuadro:

Tabla 6. Nomenclatura para análisis de semen

Parámetro	Criterio de evaluación	Nomenclatura
Volumen	Nulo	Aspermia
	Reducido	Hipospermia
	Aumentado	Hiperespermia
Concentración espermática	Cero	Azoospermia
	Reducido	Oligozoospermia
	Normal	Normozoospermia
	Aumentado	Polizoospermia
Motilidad espermática	Reducido	Astenozoospermia
Viabilidad espermática	Todos muertos	Necrozoospermia
Espermatozoides anormales	Alto porcentaje	Teratozoospermia

Fuente: (Hafez & Hafez, 2000)

Según lo menciona (Palma, 2011), existen 3 métodos de evaluación de la concentración de semen:

- 1) Por medio de la apariencia y consistencia del eyaculado: este método de evaluación subjetiva requiere experiencia.



Tabla 7. Concentración espermática de acuerdo a su consistencia y apariencia.

Consistencia – Apariencia	Concentración espermática (ml)	Concentración (x10⁹ ml) rango
Clara – Acuosa	0.2	0.1 – 0.3
Opaca	0.7	0.3 – 1.0
Lechosa	2.0	1.0 – 2.5
Lechosa – Cremosa	3.0	2.5 – 3.5
Cremosa	4.0	3.0 – 4.5
Cremosa – espesa	5.0	4.5 – 5.5

Fuente: (Palma, BIOTECNOLOGIA DE LA REPRODUCCION, 2011)

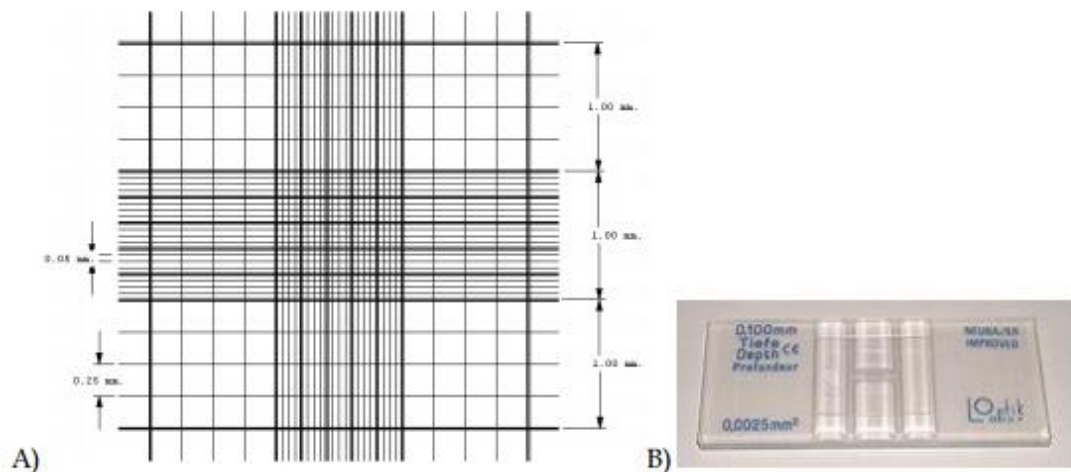
2) Determinación por medio del método espectrofotométrico: El espectrofotómetro mide la densidad espermática por dificultad que ofrece la suspensión de espermatozoides en una solución que los inmoviliza (por ej. formol citrato) al pasaje de los haces de luz. El aparato está acompañado de una tabla, confeccionada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

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

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

La concentración espermática, es determinada por medio de varios metodos tales como la camara de Neubauer, camara de Burker, densimetro de semen (Karras), fotometro de semen, entre otros. (Rouge, 2001).

Figura 4. Conteo de espermatozoides en Cámara Neubauer. A) Cuadriculas 5 x 5 y B) cámara Neubauer



Fuente: (Mellisho, 2010)

La determinación de la concentración espermática por medio de estas cámaras tiene un considerable error que varía en relación directa con la reducción de la superficie considerada en el recuento. El error aumenta con la concentración de la muestra (eyaculado 7 a 10%). Si además se emplean cubreobjetos no calibrados éste puede ser mayor aún. (Palma, 2011)

2.2.2 Sistema De Análisis Computarizado

2.2.2.1 Sistema de Análisis Seminal Asistido por Computadora (CASA)

En un intento de reducir esta incertidumbre, una gran variedad de biotécnicas han sido desarrolladas para crítica seminal, de los cuales uno de ellos es el sistema de evaluación informatizada de las características seminales (CASA). Desde hace varias décadas, numerosos investigadores han dedicado mucho trabajo y recursos para intentar eliminar la subjetividad inherente a la evaluación microscópica de la calidad del semen. Fruto de estas investigaciones fue el desarrollo de los sistemas computarizados para el análisis de la motilidad espermática. (Cuberlo & Rodríguez, 2013)



La evaluación del análisis de semen ha hecho que se instrumenten equipos semiautomáticos, los cuales permiten una visualización mayor de la velocidad y trayectoria de las células.

Estos métodos son:

- a) Fotografía con tiempo de exposición.
- b) Fotografía de exposición múltiple.
- c) Cinemicrografía y
- d) Videomicrografía.

Todos estos métodos tienen la desventaja de que el estudio de la muestra recogidas debe analizarse manualmente. Sin embargo, la videomicrografía resulto el primer paso para que luego se acoplara la computadora y desarrollar el sistema CASA (Computer Assisted Semen Analysis) o PAS (Programa para Análisis de Semen).

El CASA, desarrollado en la Universidad de Pennsylvania por Liu y Warne en 1977 y perfeccionado por Amann y Hammersatedt en 1980, se introduce en el mercado a principio de los 80, originalmente para la evaluación de semen humano. Con el paso de los años se ha ido perfeccionando y modernizándose. En la actualidad se utiliza también en veterinaria, tanto en el ámbito de la investigación, como en el de la industria de los centros de IA. (Cuadrado, Cubero, & Gómez, 2012)

El sistema involucra una cámara de video conectada a un microscopio de interfase y a una computadora que digitaliza las imágenes del tamaño y de los movimientos espermáticos. Las imágenes digitalizadas a través del tiempo permiten analizar la velocidad de las células, el movimiento rectilíneo, circular o lateral. (Brogliatti & Bó, 2013)

La utilización de equipos CASA es una práctica que cada vez se hace más habitual para evaluar en forma objetiva la motilidad espermática. (Madrid-Bury, 2005)

Según (Laboratorio de Estudios en Reproducción, 2016), la incorporación de los Sistemas CASA como metodología diagnóstica, ha significado un progreso real



en la estandarización del manejo del semen. El sistema suministra un método objetivo de excelente reproducibilidad, a través de un análisis directo de imágenes, así también lo señala (Quintero, 2003), el CASA realiza mediciones rápidas y objetivas de los parámetros de motilidad individual.

Los sistemas automáticos de medición de imágenes se basan en la captura sucesiva de espermatozoides en movimiento provenientes de un microscopio. Estas imágenes se digitalizan identificando las células espermáticas que contienen la primera imagen. Luego se procede al seguimiento de estas células en imágenes sucesivas y al establecimiento de las trayectorias definitivas. Las trayectorias se procesan matemáticamente, obteniendo así unos resultados numéricos precisos de espermatozoides en movimiento previamente diluidos en un medio adecuado y en el microscopio a 100-200 aumentos.

Análisis de motilidad: Establece una clasificación entre espermatozoides estáticos y móviles, y a su vez los móviles los clasifica según su trayectoria en progresivos y no progresivos. (Muiño Otero, 2008)

(Juarez, 2009), menciona que, las medidas cinéticas de los espermatozoides están basadas en las sucesivas posiciones del centroide de la cabeza espermática a través del tiempo. A partir de la geometría de las trayectorias se determinan velocidades y patrones de movimiento.

Según (Bernardi, Allende, Mazzeo, Monti, & Marini, 2011), las descripciones de motilidad con CASA incluyen:

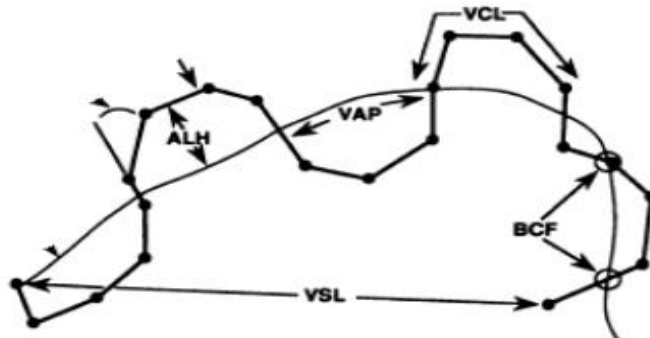
- Porcentaje de espermatozoides motiles (MOT): porcentaje de células que tienen movimiento.
- Porcentaje de espermatozoides progresivos (PRO): porcentaje de células que siendo motiles, describen un desplazamiento hacia delante.
- Concentración de espermatozoides progresivos por dosis.
- Velocidad curvilineal (VCL): velocidad calculada sobre el camino real del espermatozoide entre dos puntos de su trayectoria, expresada en micrones por segundo. Describe la motilidad real de los espermatozoides.
- Velocidad lineal (VSL): velocidad del espermatozoide sobre una línea recta entre dos puntos medida en micrones por segundo



- Velocidad promedio en su trayectoria (VAP): velocidad promedio del espermatozoide sobre el camino real del espermatozoide expresada en micrones por segundo.
- Linealidad ($LIN = (VSL/VCL) * 100$): desviación de la velocidad del camino real a la velocidad en línea recta expresada en porcentaje.
- Rectilineidad ($STR = (VSL/VAP) * 100$): desviación de la velocidad promedio a la velocidad en línea recta expresada en porcentaje.
- Amplitud lateral de la cabeza (ALH): distancia promedio del desplazamiento de la cabeza desde la posición media del camino, expresada en micrones.
- Frecuencia de batido (BCF): frecuencia de corte de los movimientos laterales de la cabeza del espermatozoide, expresada en Hertz (Hz).
- Distancia en el camino promedio (DAP): distancia promedio expresada en micrones por segundos.
- Distancia en línea curva (DCL): distancia recorrida calculada sobre el camino real del espermatozoide y expresada en micrones por segundo.
- Distancia en línea recta (DSL): distancia recorrida calculada sobre la línea recta que une el punto inicial con el final de la trayectoria, expresada en micrones por segundo.
- Los parámetros VCL, ALH y BCF se consideraron medidas que reflejan el vigor de los espermatozoides, y los parámetros VSL, STR y LIN la progresividad.

Figura 5. Representación esquemática de las muestras seminales, mostrando parámetros cinéticos.

Los puntos representan los puntos muestreados del CASA. ALH= Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza; VSL= Velocidad rectilínea (o progresiva); VCL= Velocidad curvilínea, y VAP= Velocidad de la trayectoria media y BCF= Frecuencia de batido.



Fuente: (Juarez, 2009)

2.3 Pruebas de permeabilidad de membrana.

2.3.1 Test de host

Se fundamenta en la suspensión de espermatozoides en un medio hiposmótico que ocasiona un desequilibrio osmótico entre el medio extracelular y el intracelular, situación que la célula compensa fisiológicamente difundiendo agua al compartimento intracelular y como consecuencia, el espermatozoide aumenta su volumen con consecuentes cambios morfológicos en los flagelos, como dilatación y enrollamiento de los mismos. (Hernandez & Carrillo-Gonzales, 2015).

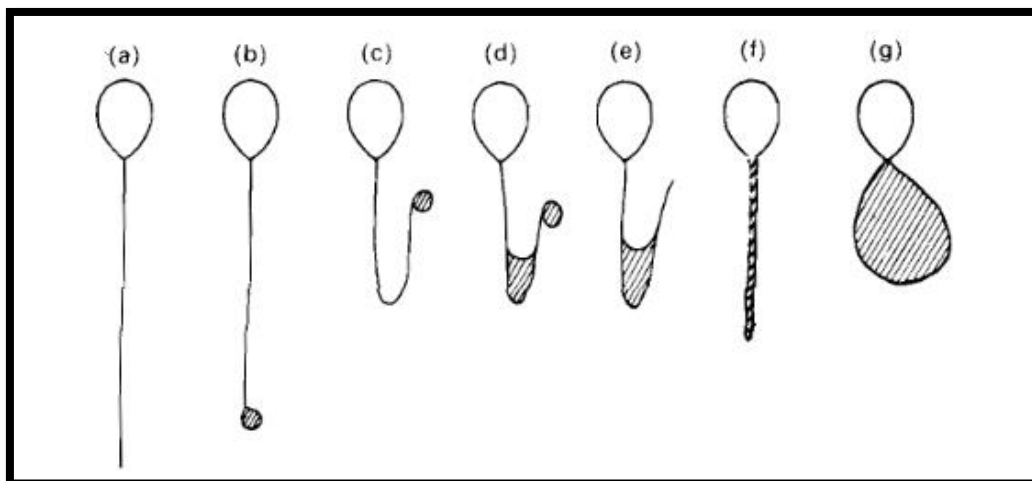
Según el test de endósmosis (Hypoosmotic Swelling test, HOST), consiste en someter a los espermatozoides a un medio de presión osmótica más baja que la fisiológica, lo que causa una entrada de agua en la célula en un intento de equilibrar la presión osmótica interna con la del medio externo. Para que esta respuesta se produzca, la membrana plasmática del espermatozoide debe de estar íntegra y con los mecanismos de intercambio de fluidos funcionando

correctamente. La entrada de agua provoca en estas células un hinchamiento y enrollamiento del flagelo. Las células con la membrana física o funcionalmente dañada no experimentarán cambios en la forma del flagelo.

El estudio de la estabilidad de la membrana de la cola complementa el examen de la vitalidad. Habitualmente se realiza sometiendo a los espermatozoides a un choque hiposmótico moderado (HOS test). Las colas cuya membrana plasmática mantiene una buena capacidad osmorreguladora se hincharán como consecuencia de la entrada de líquido y adoptarán patrones fácilmente reconocibles. (Bassas Arnau, 2009)

Figura 6. Representación esquemática de los típicos cambios morfológicos que sufren los espermatozoides humanos expuestos a un medio hiposmótico.

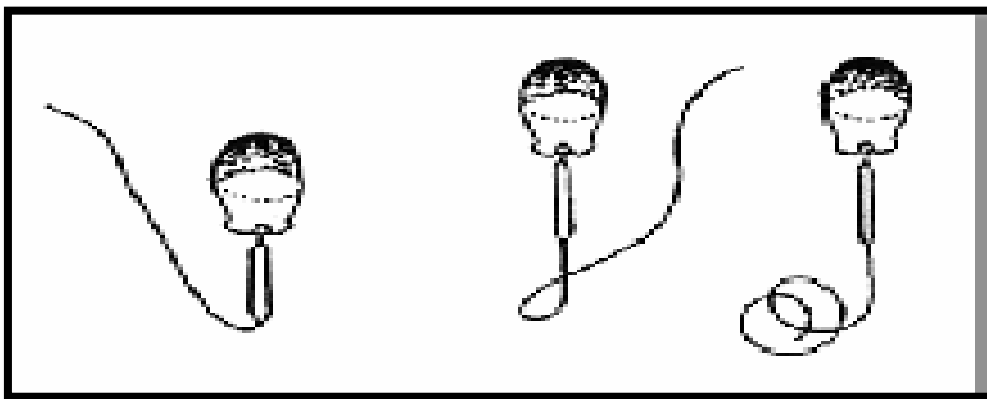
a: sin cambios; **b-g:** varios tipos de cambios en la cola. La región de la cola que muestra hinchazón aparece sombreada.



Fuente: (OMS, 2001)

(Hincapié, 2015) menciona que, para que esta respuesta se produzca la membrana plasmática debe estar íntegra. Los espermatozoides con alteraciones físicas no experimentarán cambios en la forma del flagelo (endosmosis negativa).

Figura 7. Representación esquemática de espermatozoides reaccionados positivamente al test de host.



Fuente: (Rubio & Quintero, 2006)

2.4 Diluyentes de semen

(López J. , 2014), lo define como compuestos químicos o conjunto de sustancias que tienen como objetivo preservar la viabilidad y fertilidad del semen, y que tienen la característica de aumentar el volumen del eyaculado. (Muiño Otero, 2008) Un diluyente seminal debe reunir una serie de propiedades básicas relacionadas con su pH, capacidad tampón, osmolaridad, y fuerza iónica. Además, debe aportar una fuente de energía, no debe deteriorarse durante el almacenamiento previo a su uso, debe proteger a los espermatozoides durante el enfriamiento, congelación, descongelación y finalmente, debe ser resistente al crecimiento bacteriano.

2.4.1 Funciones de un Diluyente:

(López J. , 2014) Lo describe,

1. Proveer nutrientes a los espermatozoos, como fuente de energía.
2. Proteger los espermatozoos contra los efectos dañinos de un enfriado rápido.
3. Proveer un buffer para prevenir efectos nocivos de cambios de PH, al formarse ácido láctico, resultante del metabolismo de la glucosa por los espermatozoos.
4. Mantener una presión osmótica y un balance electrolítico adecuado.
5. Inhibir el crecimiento bacteriano.



6. Aumentar el volumen de semen de modo que pueda ser utilizado para múltiples inseminaciones.
7. Proteger los espermatozoos del congelado.

2.5 Criopreservación de Semen

La estandarización en la criopreservación de semen, hizo que la IA fuese más accesible a los productores, lo que permitió que en los años 60 la industria lechera mejorara su valor de cría por el reemplazo del stock genético a través de la IA. (Restrepo, 2008)

La criopreservación es el proceso en el cual las células son congeladas a muy bajas temperaturas, generalmente entre -80°C y -196°C (punto de ebullición del nitrógeno líquido) para disminuir las funciones vitales de la célula u organismo y poderlo mantener en condiciones de vida suspendida por mucho tiempo. A esas temperaturas, cualquier actividad biológica, incluidas las reacciones bioquímicas que producirían la muerte de una célula, quedan efectivamente detenidas. (Rivera, 2016)

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, Sanchez, Velasco, & Cruz, 2007), también lo afirman (Ribeiro, Munita, Yumi, Mello, & Ferreira, 2014). La criopreservación de semen es una importante biotecnología reproductiva, que busca promover la conservación del germoplasma masculino por tiempo indeterminado. Esta biotecnología, cuando se asocia a la IA, representa un mecanismo eficiente para la promoción y difusión de material genético de excelente calidad.

Los espermatozoides sometidos a criopreservación están sujetos a una serie de alteraciones en su estructura, tales como dilatación y rompimiento a nivel de la membrana, con cambios de permeabilidad en la misma. Hay cambios en la estructura de fosfolípidos y proteínas (siendo clasificados 27 tipos entre la SM40 y la SM391), que traen como consecuencia una reducción en su motilidad y viabilidad espermáticas. (Lozano, 2009)



El principal desarrollo en criopreservación de semen bovino fue dado en Estados Unidos por Phillips y Lardy (1940), con el desarrollo de un diluyente para semen de yema de huevo-fosfato. Salisbury et al, en 1941, mejoraron el medio con la adición de citrato como buffer. El glicerol fue adicionado posteriormente como crioprotector para la criopreservación de semen de toro. En la industria de la IA, la mayoría de los diluyentes para la congelación de espermatozoides bovinos, contienen yema de huevo, leche o componentes derivados de esas sustancias, útiles para proteger los espermatozoides del choque térmico y/o el daño de la congelación y descongelación. (Restrepo, 2008)

La calidad del semen criopreservado se puede ver afectada en una mayor forma que el semen fresco, y aún mucho más cuando este semen es requerido para tecnologías como la fertilización in vitro e inyección intracitoplasmática (ICSI), entre otras. (Lozano, 2009)

Una de las cuestiones importantes relacionadas con la eficiencia de las técnicas de criopreservación es la velocidad de reducción de la temperatura durante el congelamiento. El tipo de curva utilizada durante la congelación tiene influencia directa en el grado de las lesiones celulares, debido a procesos de deshidratación y formación de cristales de hielo intracelulares. (Ribeiro, Munita, Yumi, Mello, & Ferreira, 2014)



CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Materiales Biológicos

- 2 toros Holstein Friesian (HO), identificados como 01HO01 (Sham) y 01HO02 (Orion).
- 1 toro Jersey (JE), identificado como 01JE01 (Che Pibe).
- 2 toros Brown Swiss (BS), identificados como 01BS01 (Tu Andy) y 01BS02 (Tammy).

En todos los casos con edades comprendidas entre 18 y 36 meses

3.1.2 Materiales Químicos

- Diluyente de semen bovino libre de proteína animal AndroMed® (Minitub)
- Solución NaCl 3.5% formolada
- Fructosa
- Gel lubricante no espermicida
- Agua bidestilada
- Nitrógeno líquido

3.1.3 Materiales Físicos:

- Material de sujeción
- Vagina artificial
- Tubos graduados de colección de semen
- Termómetro
- Papel secante
- Papel parafilm
- Baño María
- Platinas térmicas
- Vasos de precipitación
- Probetas
- Tubos Eppendorf



- Pipetas
- Puntas de pipetas
- Porta objetos
- Cubre objetos
- Cámaras Leja
- Cámara de Neubauer
- Estufa
- Microscopio de contraste de fase
- Sistema de Análisis Seminal Asistido por Computadora- CASA (Sperm Vision Production. Version 1.01)
- Impresora de pajuelas
- Envasadora y selladora de pajuelas MPP1 (Minitub)
- Vitrina de refrigeración
- Congelador automático ICE-CUBE (Minitub)
- Tanques criogénicos
- Tijeras
- Jeringas
- Ecógrafo
- Guantes de manejo
- Guantes ginecológicos
- Registros de observación
- Cámara fotográfica

3.2 Método

3.2.1 Localización

La investigación se realizó en la Central Nacional de Producción y Mejoramiento Genético “El Rosario”, ubicado en Tambillo, cantón Mejía, provincia de Pichincha, perteneciente al Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca. Ubicada a 3000 msnm, con un clima templado frío y una temperatura promedio de 10° C.

Las muestras fueron colectadas, evaluadas y procesadas en el Laboratorio de Procesamiento de Material Genético del mencionada Central.



3.2.2 Características de la unidad de análisis

Se seleccionó 5 toros reproductores alojados en dicha Central, distribuidos en las siguientes razas: 2 toros Holstein Friesian, 1 toro Jersey y 2 toros Brown Swiss, en edades comprendidas entre 18 y 36 meses.

Los reproductores fueron ubicados en toriles de 50m x 5m, bajo un sistema a pastoreo. Complementariamente los toros fueron alimentados con una dieta a base de concentrado y heno.

Previo al ingreso a la Central, los reproductores cumplieron con los análisis sanitarios según la resolución 077 de AGROCALIDAD.

3.2.3 Metodología

De dio inicio a la presente investigación 04 de abril del 2016.

3.2.3.1 Colecta de semen

Para la colecta de semen se utilizó el método de la vagina artificial, que consiste en un tubo rígido cubierto con una camisa de látex llenada con agua caliente a 45° C. En el extremo del tubo se colocó un cono de látex en el cual se insertó un tubo milimetrado para contener el semen del reproductor.

Previo a la colecta de semen cada reproductor fue bañado y estimulado para la sucesiva eyaculación. Durante la colecta, al momento de la protrusión del pene, se desvió éste con la mano y se lo introdujo en la vagina artificial donde se depositó el semen.

Una vez que se obtuvo la muestra seminal, se trasladó inmediatamente al laboratorio y fue colocado en el baño maría a una temperatura de 36° C.

De cada reproductor se evaluaron 11 eyaculados diferentes. Los eyaculados fueron colectados una vez por semana.

3.2.3.2 Análisis de semen:

De la muestra seminal se procedió a realizar las pruebas rutinarias de laboratorio.



a) Macroscópicas

Del mismo tubo en que se colectó el semen, determinó:

- Volumen: cantidad de semen colectado en el tubo graduado.
- Color: cremoso, lechoso, acuoso y traslucido.
- pH: se utilizó una cinta de medir pH cuyo rango varió de 0 a 14.

b) Microscópicas

En 3 tubos de ensayo identificados como A, B y C se colocaron muestras para posteriores análisis (CASA, motilidad individual, cámara de Neubauer, respectivamente). Esto se realizó con cada eyaculado, los tubos con las muestras fueron ubicados sobre platinas térmicas a 37°C.

c) Análisis convencional

- **Motilidad en masa**

Se valoró en una escala de 0 a 5, descartando eyaculados con motilidad inferior a 3. Para su determinación se colocó 10 µl de semen puro en un portaobjetos precalentado a 37°C y se observó al microscopio a un aumento de 10X. La valoración se realizó en una escala de 1 a 5, correspondiendo 5 a la motilidad en torbellino y 1 totalmente inmóviles

- **Motilidad individual**

Tubo B: se realizó una dilución 1:30 del semen con diluyente comercial (AndroMed® Minitub). De esta solución se tomaron 10 µl que se colocaron entre un porta y un cubreobjetos precalentados a 37°C. Se observó al microscopio a un aumento de 20X y 40X y se determinó, en porcentaje los espermatozoides con motilidad progresiva, realizando el conteo de 100 espermatozoides.

- **Concentración**



Tubo C: se tomó una muestra de semen puro y se realizó una dilución 1:200 con una solución de NaCl al 3.5% formolada. De esta solución se tomaron 10 μ l que fueron depositados en una cámara Neubauer y donde luego de dejar reposar durante 5 minutos se dio inicio el conteo y posterior cálculo, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración espermática} = a \times b \times c \times d \times e$$

a: número de espermatozoides contados en 5 cuadros

b: total de cuadrantes de la cámara (n = 25)

c: 200, que es la dilución utilizada

d: 100, es la profundidad de la cámara de Neubauer.

e: 1000, valor que permite expresar la concentración espermática en ml.

- **Vitalidad**

Se utilizó para ello la tinción con eosina nigrosina. Se colocaron 2,5 μ l de eosina y 5 μ l de nigrosina en un portaobjetos y posteriormente se añadió 5 μ l de semen puro mezclando el conjunto durante unos 10 segundos y a partir de esta mezcla se realizó un frotis. Al transcurrir 15 segundos y logrado el secado total del frotis, se inició el conteo de espermatozoides vivos (sin coloración) y espermatozoides muertos (teñidos de rosa). Se contabilizó como mínimo 3 campos en los que se contó 100 espermatozoides en total y se estimó el porcentaje respectivo de vivos y muertos.

- **Anormalidades**

Se utilizó el mismo frotis mencionado anteriormente para determinar la cantidad de células anormales detectadas, las anomalías observadas, las cabezas sueltas, la pieza media distal doblada, la presencia de gota citoplasmática proximal y distal, entre otras, realizando el conteo de 100 espermatozoides y expresando las anomalías en forma porcentual.



d) Análisis computarizado

Tubo A: la muestra de semen puro colocada en el tubo A se diluyó a 1:30 con diluyente comercial AndroMed®. De esta solución se tomaron 3 µl que fueron colocados en la cámara de Leja precalentada a 37° C, y evaluando en el sistema CASA (Sperm Vision Production. Version 1.01). Entre ellas fueron determinadas: porcentaje de motilidad total (%MT), porcentaje de motilidad progresiva (%MP) y porcentaje de espermatozoides inmóviles (%EI). Además determinó la concentración espermática (millones/ml).

Esta evaluación fue realizada en 8 campos de la cámara leja.

Las observaciones en el equipo CASA fueron hechas bajo microscopio de contraste de fase con un aumento de 20X.

e) Test funcionalidad espermática (Host test)

Se colocaron 200 µl de solución hiposmótica (fructosa diluido en agua destilada a 100 mOsm/L) en la estufa a 37°C por 30 minutos. Posteriormente se agregaron 20 µl de semen puro y se mantuvo la incubación a la misma temperatura por 60 minutos. Luego se colocaron 10 µl de la solución que estuvo en la estufa sobre un portaobjetos precalentado a 37° C y se cubrió con un cubreobjetos. Después de 60 segundos se colocó el portaobjetos en la platina térmica y se observó bajo microscopio con lentes de 20X y 40X. Se contó hasta un total 100 espermatozoides y de ahí se determinó el porcentaje de células que reaccionaron al test. Se consideraron como positivos a los espermatozoides que presentaban una hinchazón de las colas o que estas estaban dobladas o enrolladas.

3.2.3.3 Congelación de semen

Una vez evaluado el semen, se envasó en pajillas de 0.5 cc a una concentración de 30×10^6 . Posterior al envasado las pajuelas se colocaron en una vitrina de refrigeración a una temperatura de 5° C durante un período de 2 horas. Al culminar el tiempo de equilibrio (2 hs más), se congelaron las dosis seminales



utilizando un congelador automático (ICE CUBE- Minitube). Posterior a las 72 horas de congelación, se realizó una evaluación post congelación en el sistema CASA y convencional, en esta evaluación las variables que fueron evaluadas son:

- Motilidad total, motilidad progresiva e inmóviles (CASA): se colocó 10 μ l de semen post congelado entre un porta y cubreobjetos precalentados a 37°C. Se observó al microscopio a un aumento de 40X. El programa expuso el resultado en forma porcentual.
- Motilidad individual (convencional): Se colocaron 10 μ l de semen post congelado entre porta y cubreobjetos precalentados a 37°C. Se observó al microscopio a un aumento de 20 y 40X y se determinaron, en porcentaje, los espermatozoides con motilidad progresiva, realizando el conteo de 100 espermatozoides.

3.2.3.4 Evaluación in vivo (fertilidad seminal)

Para esta evaluación in vivo, se inseminaron 50 vacas por cada toro en estudio, los lotes de pajuelas utilizados para la inseminación fueron los mismos que se evaluaron in vitro.

Para determinar la gestación de las vacas, se realizó un chequeo ginecológico con ecografía a los 45 días post inseminación.

3.2.4 Variables analizadas

- Motilidad total
- Motilidad progresiva
- Inmóviles
- Concentración espermática (CASA y Neubauer)
- Fertilidad del material genético

3.2.5 Diseño experimental y pruebas estadísticas

Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el programa estadístico SPSS 22, de acuerdo a un Diseño Completamente al Azar. Se realizó un test de



separación de medias Duncan para determinar diferencias significativas en los parámetros seminales entre las tres razas incluidas en este estudio.

Adicionalmente se compararon las mediciones obtenidas a través del sistema convencional y del sistema CASA de las variables en estudio, utilizando el Test de comparación de medias de Student. Se realizaron en total tres comparaciones: Motilidad individual (convencional) vs Motilidad total (CASA), Neubauer (convencional) vs Concentración (CASA), y Motilidad Post Congelación igualmente entre ambos métodos.



CAPITULO IV: RESULTADOS

Cuadro 1. Comparación de parámetros seminales del método convencional entre tres razas de reproductores.

Raza	Motilidad individual (%)	Neubauer (10 ⁶ /ml)	Motilidad Postcongelación (%)
Jersey	86.81 ± 1.81 ^{Ω a}	1036.77 ± 3.22 _a	73.18 ± 2.36 ^a
Holstein	80.68 ± 1.11 ^b	816.20 ± 3.05 _b	67.72 ± 1.53 ^a
Brown Swiss	73.41 ± 1.06 ^c	572.41 ± 2.35 _c	59.09 ± 1.82 ^b

^{abc} Medias con letras diferentes son estadísticamente diferentes

^Ω Valores corresponden a media ± Erros estándar (n=22, para Jersey n=11)

En el Cuadro 1. Se pueden observar las diferencias que hubo entre las razas de reproductores. En el caso de Motilidad individual y Concentración Neubauer, las muestras de Jersey fueron las que obtuvieron los valores más altos. Igualmente en el caso de Motilidad Post Congelación Jersey obtuvo los resultados más altos, que son estadísticamente iguales a los de Holstein, ambos siendo mejores que Brown Swiss.

Para el caso de Concentración Neubauer, no hubo diferencias entre Holstein y Brown Swiss, ambos teniendo valores menores que Jersey, mientras que Brown Swiss fue la raza con la menor motilidad, siendo estadísticamente menor a Jersey y Holstein.

Cuadro 2. Tabla de contingencia con la distribución de resultados de Motilidad Masal, parámetro del método convencional.

Raza	Motilidad masal (1 – 5)			
	2	3	4	5
Brown Swiss	0	13	9	0
Holstein	3	4	3	12
Jersey	0	0	6	5

En el Cuadro 2 se observan los resultados de las mediciones de Motilidad masal, la cual se mide en una escala de 1 a 5. Ninguna de las observaciones obtuvo un



resultado de 1, y las tres únicas observaciones que fueron asignadas un valor de 2, pertenecen a Holstein. Se realizó un Test exacto de Fisher que dio como resultado un valor de 32.3, que indica con un grado de significancia de >0.001 que si hubo relación entre la variable Raza y la variable Motilidad masal, en definitiva si hay diferencias estadísticas entre las razas.

Cuadro 3. Comparación de parámetros seminales del método CASA entre tres razas de reproductores.

Raza	Concentración ($10^6/ml$)	Motilidad total (%)	Motilidad progresiva (%)	Inmóviles (%)	Motilidad Postcongelación (%)
Jersey	1237.23 \pm 23.04 ^{Ωa}	77.03 \pm 2.2 ^a	70.23 \pm 2.66 ^a	20.22 \pm 0.95 ^b	60.43 \pm 2.23 ^{ab}
Holstein	820.67 \pm 13.19 ^b	79.50 \pm 1.99 ^a	72.53 \pm 1.80 ^a	20.39 \pm 0.99 ^b	63.24 \pm 1.54 ^a
Brown Swiss	608.98 \pm 15.12 ^c	70.88 \pm 1.62 ^b	63.20 \pm 1.62 ^b	28.21 \pm 1.20 ^a	55.65 \pm 1.54 ^b

^{abc} medias con letras diferentes son estadísticamente diferentes

^Ω Valores corresponden a media \pm Erros estándar (n=22, para Jersey n=11)

En el Cuadro 3. se tiene la comparación entre razas de los parámetros del método CASA; en el caso de los parámetros Concentración, Motilidad total, Motilidad Progresiva y Motilidad Postcongelación la raza Jersey fue la que obtuvo los valores más altos, en algunos casos: motilidad total, motilidad progresiva y postcongelación, no hubo diferencias entre Jersey y Holstein.

El único parámetro en el que Brown Swiss tuvo valores estadísticamente más altos fue en los Inmóviles.

Cuadro 4. Comparación de medias entre parámetros análogos del método convencional y del método CASA.

Parámetro	Resultado CASA	Resultado Convencional
Motilidad (%)	75.56 \pm 1.25 ^{Ω*}	79.00 \pm 0.98
Concentración ($10^6/ml$)	819.31 \pm 14.06 [*]	762.83 \pm 19.8
Motilidad Post congelación (%)	59.64 \pm 1.07 [*]	65.36 \pm 1.28

* Indica diferencia significativa, determinada mediante Test de Student

^Ω Valores corresponden a media \pm Error estándar (n=22, para Jersey n=11)



En el Cuadro 4 se realiza una comparación entre el método CASA y el convencional para los parámetros detallados a la izquierda. En el caso de motilidad, se compararon los parámetros análogos Motilidad individual (Convencional) y Motilidad total (CASA); para concentración se compararon: Neubauer (convencional) con Concentración CASA, y para motilidad post congelación se hizo la comparación entre las dos variables homónimas de los dos métodos. Los valores T obtenidos encada una de estas comparaciones fueron: 2.16, 2.08 y 3.42 respectivamente, todos los cuales exceden el valor T tabular, determinando que hubo diferencias en todos los casos con una significancia de: 0.033, 0.033 y 0.001 respectivamente.

Cuadro 5. Diferencias estadísticas en cuanto a fertilidad detectadas por el método Duncan.

Raza	Fertilidad (%)
Jersey	58.18 ± 3.77*a
Holstein	41.36 ± 4.28c
Brown Swiss	50.00 ± 4.49b

* Valores corresponden a Media ± Error estándar (n=11)

En el cuadro 5 se observa la diferencia entre razas sobre el parámetro de fertilidad, obteniendo que para la raza Jersey un porcentaje más alto sobre la raza Brown Swiss, mientras que la raza Holstein presenta un porcentaje de fertilidad estadísticamente bajo en comparación con las dos razas.



CAPITULO V: DISCUSIÓN

El conocimiento de la fertilidad o de la capacidad fecundante del semen de cada toro es un elemento central en el éxito de la IA y por consecuencia, su predicción in vitro es uno de los principales objetivos en la producción de semen bovino (Hidalgo, Tamargo, & Diez, 2005). La calidad del eyaculado ha sido evaluada con el espermograma clásico, que está basado en la aplicación de una serie de pruebas de una ejecución relativamente simple (Gadea J. , 1997). Entre los inconvenientes de las técnicas clásicas utilizadas para evaluar la calidad seminal, su subjetividad es una de las principales limitantes, puesto que los resultados dependen en gran parte de la experticia del evaluador (Muiño, et al., 2005).

Esta investigación tuvo como propósito evaluar la calidad espermática de reproductores bovinos mediante el uso de sistemas de evaluación seminal convencional y fue contrastada con valores de cinética espermática determinada por el sistema CASA y en ambos casos, estos valores fueron relacionados con la fertilidad obtenida por el uso de estos eyaculados en IA.

5.1. Valores de la calidad de seminal por raza mediante el sistema de evaluación convencional.

Motilidad Individual

Al evaluar el porcentaje de motilidad individual (MI), la raza jersey presentó mayor MI con un promedio 86.81% mientras que para Holstein y Brown Swiss sus porcentajes son menores 80.68% y 73.41% respectivamente; valores que son inferiores a los obtenidos por (Moncayo, 2016) en la cual varía entre el 85% y 96% para las razas Holstein y Brown Swiss; en este sentido Rubio y colaboradores (2007) independientemente de la raza bovina obtienen MI de 62.91%; sin embargo, (Vera Muñoz, 2008) califica eyaculados con MI superiores al 80% como muy bueno correspondiendo a los valores obtenidos para Holstein y Jersey y una calificación de Bueno para eyaculados con MI de 70 – 80% correspondiendo a Brown Swiss. Los datos obtenidos se encuentran dentro del requerimiento mínimo para la clasificación de un toro como potencialmente



satisfactorio en la evaluación reproductiva planteada por Sociedad Internacional de Teriogenología, esto lo cita (Paez & Corredor, 2014)

Concentración - Neubauer

La concentración espermática obtenida por el método de conteo con la cámara de Neubauer, presentó para la raza Jersey una mayor concentración con un promedio de $1036.77 \pm 3.22 \times 10^6$ spz/ml, seguido de Holstein con un promedio de $816.20 \pm 3.05 \times 10^6$ spz/ml y una menor concentración para Brown Swiss con un promedio de $572.41 \pm 2.35 \times 10^6$ spz/ml, que concuerda con el estudio realizado por (Moncayo, 2016), donde menciona que la raza Holstein presentó mayor concentración espermática con un promedio de $699,3 \times 10^6$ spz/ml y la raza Brown Swiss mostró menor concentración entre las razas en estudio con un promedio de $391,7 \times 10^6$ spz/ml, este estudio lo relacionó con resultados de (Medina, Sanchez, Velasco, & Cruz, 2007), en el que reportaron una concentración espermática promedio de $434,5 \pm 41.6 \times 10^6$ spz/ml. Por otra parte (Kumar U. , y otros, 2015) en la evaluación de la calidad de semen en toros puros y mestizos de raza jersey, como resultado obtiene que, la concentración media de espermatozoides en los toros de Jersey puros y cruzados fue de $1171,01 \pm 56,09$ y $1093,488 \pm 48,25$ millones / ml.

Según (Palma, 2009), afirma que un eyaculado se considera bueno si contiene un número mayor a 800×10^6 espermatozoides por mililitro, por el contrario un eyaculado es malo cuando el número de espermatozoides por mililitro se encuentra por debajo de 500×10^6 . De igual manera lo afirma Porras (2009) mencionando en su manual que, un eyaculado se considera de muy buena concentración al contener entre 750 y 1000×10^6 espermatozoides por mililitro y con una calificación regular al contener entre 250 y 400×10^6 espermatozoides por mililitro.

(Palma, 2010), menciona que existe un considerable error en la determinación de la concentración espermática por medio de la cámara de Neubauer, pues este varía en relación directa con la reducción de la superficie considerada en el recuento, al emplear cubreobjetos no calibrados, además, el error aumenta con la concentración de la muestra (eyaculado 7 a 10%). A esto concuerdan (Rodríguez, Franco, & Jiménez), donde mencionan que la variabilidad de los



resultados puede ser del 7,1 al 12%, sin embargo, es una técnica que requiere de experiencia para realizarla adecuadamente y toma alrededor de 15 minutos por muestra. (Palma, 2010), en su estudio menciona también que la variación podría ser significativamente menor (Coeficiente de variación, $CV= 12,3$), indicando que la exactitud de la determinación varía con los laboratorios y el personal.

Motilidad Post congelación

En el caso de Motilidad Post Congelación Jersey obtuvo los resultados más altos 73,18%, que son estadísticamente iguales a los de Holstein 67.72% , ambos siendo mejores que Brown Swiss 59.09%.

En un estudio realizado por (Kumar U. , y otros, 2015) la motilidad postcongelación es de 46.11%, siendo inferior a los obtenidos en este estudio, asimismo, Cabrera y Pantoja (2012) en su investigación de viabilidad espermática e integridad del acrosoma en semen congelado de toros nacionales arrojan valores menores al 63%; mientras que Madrid-Bury (2005) obtuvieron respuestas mayores a este estudio 76.7% – 85.5%. El porcentaje perdido de motilidad post congelación es mínimo y se encuentran dentro de los parámetros establecidos por la Central para calificar como viable a un lote.

Motilidad Masal

Se observan los resultados de las mediciones de Motilidad masal, la cual se mide en una escala de 1 a 5. Ninguna de las observaciones obtuvo un resultado de 1, y las tres únicas observaciones que fueron asignadas un valor de 2, pertenecen a Holstein. Se realizó un Test exacto de Fisher que dio como resultado un valor de 32.3, que indica con un grado de significancia de >0.001 que si hubo relación entre la variable Raza y la variable Motilidad masal, en definitiva si hay diferencias estadísticas entre las razas; siendo estos valores resultantes similares a los revelados por Muiño (2008).

Estas características se encuentran dentro de los parámetros establecidos para toros en actividad reproductiva de acuerdo con (Palma, 2011); al respecto Mellisho (2010) mencionan que para la evaluación de semen fresco el mejor indicador es la MM.



5.2 Valores de la calidad de seminal por raza mediante el sistema de evaluación computarizado CASA

Cuando se utiliza un sistema CASA se debe tener en cuenta que los resultados que proporciona únicamente son aplicables y repetibles en otro laboratorio de análisis seminal, siempre y cuando se utilice el mismo equipo.

Se tiene la comparación entre razas de los parámetros del método CASA; al respecto para los parámetros Concentración, Motilidad total, Motilidad Progresiva y Motilidad Postcongelación la raza Jersey fue la que obtuvo los valores más altos, en algunos casos: motilidad total, motilidad progresiva y postcongelación, no hubo diferencias entre Jersey y Holstein.

El único parámetro en el que Brown Swiss tuvo valores estadísticamente más altos fue en los Inmóviles.

5.3 Comparación de medias entre el método convencional y del método CASA.

En el caso de motilidad, se compararon los parámetros análogos Motilidad individual (Convencional) y Motilidad total (CASA); para concentración se compararon: Neubauer (convencional) con Concentración CASA, y para motilidad post congelación se hizo la comparación entre las dos variables homónimas de los dos métodos. Los valores T obtenidos encada una de estas comparaciones fueron: 2.16, 2.08 y 3.42 respectivamente, todos los cuales exceden el valor T tabular, determinando que hubo diferencias en todos los casos con una significancia de: 0.033, 0.033 y 0.001 respectivamente.

Guzmán (2013) en una investigación similar, muestra la correlación estadística entre ambos métodos, obteniendo diferencias numéricas, para la concentración de 0,866 y para la motilidad de 0,420, estadísticamente no obtiene diferencias significativas entre las características seminales.

(Agüero, 2012), en su estudio demuestra que no obtiene diferencias entre la motilidad individual medida a través de pruebas rutinarias (57,1 + 5,6%) y la motilidad individual medida a través del sistema CASA (58,2 + 7,0%),



obteniéndose una alta correlación entre ambos métodos ($r= 0,60$; $P\leq 0,008$), indicando que este último método es un instrumento que se puede utilizar en la evaluación rutinaria de semen fresco en el laboratorio.

Las técnicas tradicionales de evaluación de la motilidad espermática a pesar de que son usuales, rápidas y prácticas, presentan un carácter subjetivo que implica una gran variación en los laboratorios que oscila de 30 a 60 %. Esto puede ser debido a que están sujetas a diferentes interpretaciones que dependen en gran medida de la experiencia del operador, lo que ocasiona un error humano, el cual juega un papel definitivo en la selección de los reproductores Rodríguez y Martínez (2003). Los diferentes instrumentos CASA han demostrado altos niveles de precisión y fiabilidad utilizando diferentes metodologías de clasificación de espermatozoides (Verstegen, Iguer-Ouada, & Onclin, 2002) Jouannet, P y colaboradores (1976), mencionan que, la motilidad es principalmente determinada por la observación microscópica. La subjetividad, la falta de precisión y la variabilidad de los resultados que son importantes desventajas. El principal problema está relacionado con la estandarización y optimización de los equipos y procedimientos.

5.4 Determinar la capacidad fecundante de los toros mediante inseminación artificial. (In vivo)

En el caso de fertilidad, se determinó el porcentaje de fertilidad por raza, obteniendo para la raza jersey un 58.18 ± 3.77 , seguido de Brown Swiss de 49.27 ± 4.49 y Holstein con un porcentaje de 42.72 ± 4.28 . En una investigación realizada por Echeverría y col. (2011), en el cual obtiene que para el grupo genético 75% jersey es más eficiente reproductivamente que el grupo genético Holstein.

CAPITULO VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

- Sobre los resultados obtenidos en esta investigación y al valorar la calidad seminal en tres razas se concluye que tanto los valores de la calidad



seminal evaluados mediante el sistema convencional y computarizado presentan diferencias entre razas, obteniendo valores altos para la raza Jersey, sin embargo los datos arrojados para cada parámetro evaluado se encuentran dentro de los rangos seminales viables que se encuentran citados por varios autores.

- Las conclusiones derivadas en la determinación de diferencias entre los valores de la calidad seminal por medio del método convencional y con el sistema CASA, se evidencia diferencias en todos los casos, en tal efecto se puede mencionar que los sistemas análisis seminal asistido por computadora proveen mediciones más confiables, imparciales y repetibles, respecto al examen convencional.
- Podemos concluir en referencia a la evaluación in vivo que el mayor porcentaje de fertilidad lo obtuvo la raza jersey, sin embargo la efectividad in vivo está influenciado por varios factores que no fueron tomados en cuenta en la realización de este estudio.

6.2 Recomendaciones

- Incorporar sistemas de evaluación computarizado en los centros de evaluación espermática proporcionara datos fiables y precisos.
- Poner a disposición esta investigación a fin de que los datos obtenidos sirva como una herramienta al momento de elegir un sistema de evaluación de eyaculados bovinos.
- Evaluar factores que pueden interferir en el porcentaje de fertilidad, así permitirá obtener valores

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

agrobit.com. (2016, agosto 3). *agrobit.com*. Retrieved from <http://www.agrobit.com>



- Agüero, G. (2012). Evaluación de las Características Seminales de Sementales Bovinos mediante el Analizador Seminal Computarizado (CASA) . *UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA*.
- Barth, A. (2001). Importancia de la calidad seminal y el uso de FIV para el estudio de efectos espermáticos. *Memorias V Simposio Internacional de Reproducción Animal- INRA*.
- Bassas Arnau, L. (2009). Exploración de la Función Testicular. *Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición*.
- Bernardi, S., Allende, R., Mazzeo, R., Monti, J., & Marini, P. (2011). Evaluación de los cambios ocasionados en espermatozoides bovinos por variaciones en el manejo de las dosis durante su manipulación en inseminación artificial. *InVet vol.13 no.2* .
- Boggio, J. (2007). Evaluación de la aptitud reproductiva potencial y funcional del toro. Valdivia: *Universidad Austral de Chile*.
- Brito, L., Silva, A., Rodríguez, L., Vieira, F., Deragon, L., & Kastelic, J. (2002). Effects of environmental factors, age and genotype on sperm production and semen quality in bos indicus and bos taurus ai bulls in brazil. *Animal Reproduction Science*, 71.
- Brogliatti, G. (2013). Evaluación de la capacidad reproductiva del toro y su impacto de calidad seminal. *XLI Jornadas Uruguayas de Buiatría*.
- Brogliatti, G., & Bó, G. (2013). Introducción a la Calidad Seminal. *Aulas virtuales*. Retrieved 10 02, 2016, from <http://www.fca.proed.unc.edu.ar/mod/book/tool/print/index.php?id=5335&chapterid=893>
- Buzón Cuevas, A. (2013, Septiembre). Análisis cinético y morfométrico del espermatozoide del caballo empleando el sistema Sperm Class Analyzer. *Universidad de Cordova*, 173.



- Cabrera, P., & César, P. (2012). Viabilidad espermática e integridad del acrosoma en semen congelado de toros nacionales. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*.
- Catena, M., & Cabodevila, J. (1999). Evaluación de semen bovino congelado. *Sitio Argentino de Producción Animal*, 9.
- Cuberlo, M., & Rodríguez, Z. (2013). Revelantamiento de laboratorios de procesamiento de semen bovino en Uruguay. *Universidad de la República*.
- Díaz, M., García, P., & Rodríguez, M. (1989). Técnica de Inseminación Artificial en el Conejo. *Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, MADRID*.
- Farrell, P., Presicce, G., Brockett, C., & Foote, R. (1998). Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology*, 871-879.
- Gadea. (2005). Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility.
- Gadea, J. (1997). Predicción de la fertilidad "in vivo" de los eyaculados de verraco mediante parámetros rutinarios de contrastación seminal, pruebas bioquímicas y el test homólogo de penetración "in vitro". *Universidad de Murcia*, 116.
- Gadea, J. (2001). La evaluación de la capacidad fecundante de los espermatozoides porcinos mediante la fecundación in vitro. *Universidad de Murcia*.
- Gomez, V., & Migliorisi, L. (2015). Protocolo para la evaluación de semen en rumiantes. *Sitio Argentino de Producción Animal*.
- González, J., Martínez, Y., & Sánchez, D. (2013). Análisis seminal equino y bovino. *Espermatozoides In Vitro*, 5.
- Gualancañay, B. (2012). Manejo de toros donadores de semen. *Escuela Superior Politécnica de Chimborazo*.



- Guzmán, N. (2013). Evaluación seminal en toros por métodos manuales o computarizados. *Universidad de la República*.
- Hafez, E., & Hafez, B. (2000). Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. *Kiawah Island, South Carolina USA: McGraw-Hill Interamericana*.
- Hernandez, D., & Carrillo-Gonzales, D. (2015). Aplicación del test hipoosmotico (host) en la evaluacion de calidad seminal en ovinos criollos de pelo colombiano. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal*.
- Hidalgo, C., Tamargo, C., & Diez, C. (2005). Análisis de semen bovino. *Tecnología Agroalimentaria*, 5.
- Hincapie, J. (2015). Evaluación de Semen bovino.
- Instituto Nacional de Salud Animal. (2012). Evaluación microscopica de semen bovino congelado a particulares. *Instituto Nacional de Salud Animal*, 1-4.
- JOUANNET, P., VOLOCHINEI, B., DEGUENT, P., SERRES, C., & DAVID, a. G. (1976). Light Scattering Determination of Various Characteristic Parameters of Spermatozoa Motility in a Serie of Human Sperm. *Laboratoire d' Histologie - Université Paris Sud*, 36-49.
- Juarez, J. (2009, Septiembre). Efecto de la velocidad de enfriamiento en la congelabilidad de los espermatozoides de porcino. *Master Interuniversitario en Mejora Genética animal y biotecnología de la Reproducción*, 98.
- Kumar, U., Gawande, A., Sahatpure, S., Patil, M., K, L. C., Bonde, S. W., . . . Poharkar, A. a. (2015). Assessment of semen quality in pure and crossbred Jersey bulls. *Veterinary World*.
- Laboratorio de Estudios en Reproducción. (2016). *Análisis de Semen*. Retrieved from <http://www.lab-ler.com.ar/semen.php>
- López, J. (2014). Criopreservación de Semen. *Recordando la reproducción*.



- López, J., Urbano, A., & Cárdenas, M. (2012). Manual de laboratorio para el análisis del semen.
- Lozano, H. (2009). Factores que afectan la calidad seminal en toros. *Rev. Med. Vet. Zoot.*
- Madrid-Bury, N. (2005). ¿Es posible predecir la fertilidad en los toros? *Manual de Ganadería Doble Proposito.*
- Medina, V., Sanchez, E., Velasco, Y., & Cruz, P. (2007). Crioconservación de semen bovino usando un congelador programable (cl-8800) y determinación de su calidad postdescongelación por medio de un sistema de análisis espermático asistido por computador (CASA). *Universidad de Los Llanos.*
- Mellisho, E. (2010). Evaluación seminal de calidad seminal. *Manual de Laboratorio de Reproducción Animal, 7.*
- Miró, M. (2015). Gestión de la reproducción en el macho.
- Moncayo, S. (2016, Enero). Evaluación de la calidad seminal de reproductores bovinos antes y después del proceso de criopreservación.
- Montes, J., Torres, M., Rugeles, C., Almanza, R., & Guimarães, J. (2012). Inducción in vitro de la reacción acrosómica con heparina en semen congelado de toros brahman y gyr. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica.*
- Muiño Otero, R. (2008). EVALUACION DE LA MOTILIDAD Y VIABILIDAD DEL SEMEN BOVINO MEDIANTE EL USO DE SISTEMAS CASA Y CITOMETRIA DE FLUJO: IDENTIFICACION DE SUBPOBLACIONES ESPERMATICAS. *Universidad de Santiago de Compostela.*
- Muiño, R., Fernandez, M., Areal, H., Viana, J., Lopez, M., Fernandez, A., & Peña, A. (2005). NUEVAS TECNOLOGIAS APLICADAS AL PROCESADO Y EVALUACION DEL SEMEN BOVINO EN CENTROS DE INSEMINACION ARTIFICIAL. 175-177.



- OMS. (2001). Técnicas para determinar vitalidad de los espermatozoides. In OMS, *Manual de Laboratorio para el examen del semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical* (p. 185). España: Editorial Medica Panamericana.
- Padrón, R., Fernández, G., & Gallardo, M. (1998). Interpretación del análisis seminal. *Rev Cubana Endocrinol.*
- Paez, E., & Corredor, E. (2014). Evaluación de la aptitud reproductiva del toro. *Ciencia y agricultura*, 11.
- Palma, G. (2009). *Inseminación artificial. REPROBIOTEC.*
- Palma, G. (2010). Determinación de la concentración de células espermáticas en el eyaculado. *Biotecnologías de la reproducción.*
- Perry, G., & Patterson, D. (2017). Determinación de la fertilidad reproductiva de toros padres. *Producción Animal.*
- Porras, A., Páramo, R., Rangel, L., Alarcón, M., Hidalgo, C., Cerón, J., . . . Flores, H. (2009). MANUAL DE PRACTICAS DE REPRODUCCION ANIMAL. *Universidad Nacional Autónoma de México.*
- Quintero. (2003). Estudio sobre la dinámica de poblaciones espermáticas en semen de caballo, cerdo y conejo.
- Reproduccion Animal. (2014). *Evaluación del semen: Morfología espermática.* Tomadode:///C:/Documents%20and%20Settings/SpermVision/My%20Documents/Downloads/1808544960.Laboratorio_8_Morfologia_Espermatica_2011.pdf
- Restrepo, G. (2008). *Biotecnologías reproductivas aplicables a la reproducción bovina en Colombia.* Medellín.
- Ribeiro, A., Munita, L., Yumi, M., Mello, M., & Ferreira, F. (2014). Criopreservación de espermatozoides bovinos extraídos de la cola del epididimo utilizando los métodos convencional y automatizado. *Universidad Austral de Chile.*



- Rivera, M. (2013, 05 24). *Manual de biotecnología reproductivas en bovinos*. Retrieved 08 28, 2016, from <http://manualbiotecnologiareproductiva.blogspot.com/p/tecnicas-de-reproduccon.html>
- Rivera, M. (2016). CRIOPRESERVACION DE CELULAS REPRODUCTIVAS. *Prosegran*.
- Rodríguez, P., Franco, E., & Jiménez, C. (n.d.). ESTANDARIZACION DE LA PRUEBA PARA ESPECTROFOTOMETRIA EN LA MEDICION DE CONCENTRACION DE SEMEN BOVINO, EQUINO, PORCINO, OVINO Y CANINO. *Universidad Nacional*.
- Rodríguez-Martínez. (2003). Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? *Reprod Domest Anim*.
- Rouge, M. (2001). *Counting Cells with a Hemacytometer*. Colorado State University. Retrieved Junio 02, 2015, from <http://arbl.cvmb.colostate.edu/hbooks/pathphys/reprod/semeneval/hemacytometer.html>
- Rubio, G., Gonzalez, D., Gonzalez, Y., Madrid Bury, N., & Quintero Moreno, A. (2007). ¿Puede el ORT Complementar las Pruebas Clásicas de Valoración Seminal y Predecir.
- Rubio, J., & Quintero, A. (2006). *Uso de las pruebas de resistencia osmotica para valorar la funcionalidad espermatica en toros*. ---: ---.
- Rutter, B., & Russo, A. (2006). *Bases para la evaluación de la aptitud reproductiva del toro*. Buenos Aires.
- Sarabia, L. (2015). *ESPERMIOGRAMA, Según los criterio de OMS 2012*. Retrieved from <https://es.scribd.com/doc/98228428/ESPERMIOGRAMA-Segun-los-criterios-de-la-OMS-5%C2%AA-Edicion>.
- Serrano, A. (1993). Conceptos sobre la reproduccion en bovinos. 52.
- Urdaneta, R., & Olivares, R. (1985). Colección, evaluación y procesamiento del semen de toros. *FONAIAP*.



Vera Muñoz, O. (2008). Evaluación seminal comparativa pre y postcongelación en machos bovinos. *Reproducción bovina*.

Vera Muñoz, O. (2008). *Fisiología de los espermatozoides bovinos*.

Vera, C. A. (2011). Evaluación de la validéz de la cria y análisis de semen para predecir la fertilidad del toro. *Universidad de Cuenca*.

Verstegen, j., Iguer-Ouada, M., & Onclin. (2002). Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*.

Vilanova, L., & Balladares, P. (2005). LA EVALUACION ANDROLOGICA: JUSTIFICACION Y METODOS. *Manual de Ganadería de Doble Propósito*.

ANEXOS

Anexo 1. Raza y reproductores que conformaron el grupo de estudio.

RAZA	PRODUCTOR	IDENTIFICACION	TOTAL
Hol stien Friesian	Sham	01HO01	2
	Orion	01HO02	
Jersey	Che Pibe	01JE01	1
Brown Swiss	Tu Andy	01BS01	2
	Tammy	01BS02	

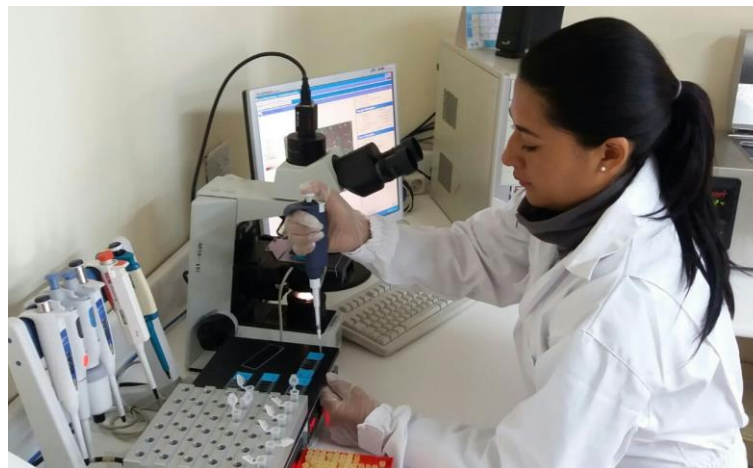
Anexo 2. Fotografías de las actividades realizadas durante el estudio.



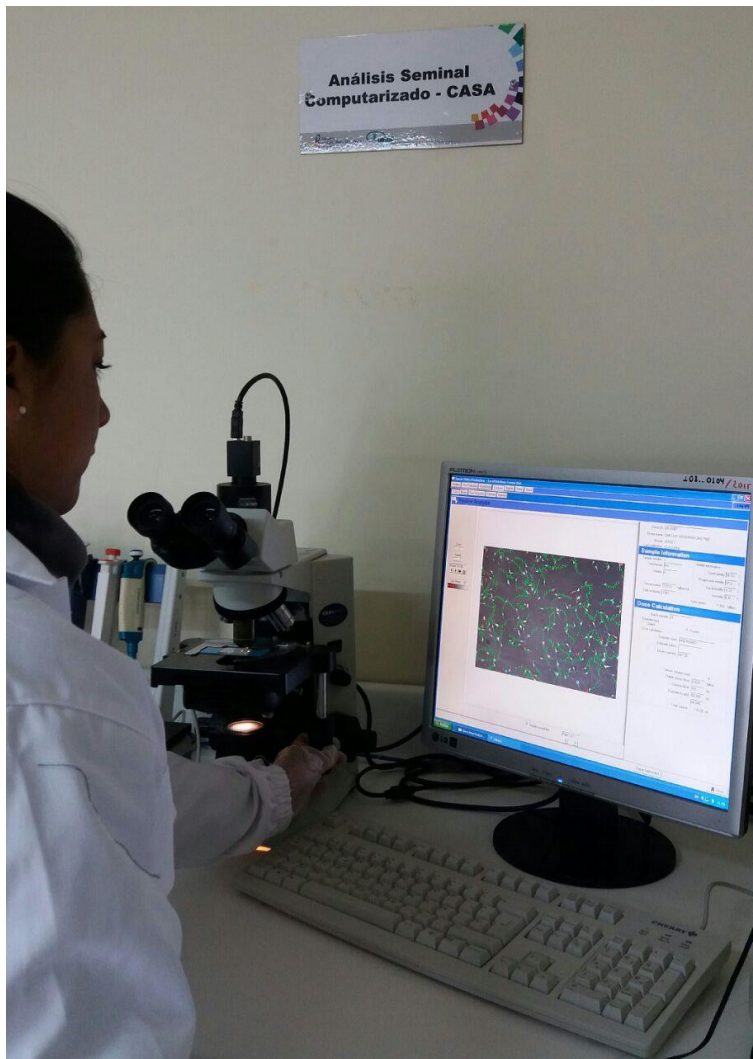
Colecta de semen a los reproductores con el método de vagina artificial.



Muestra de semen colectada en tubos graduados.



Toma de muestra de semen para análisis.



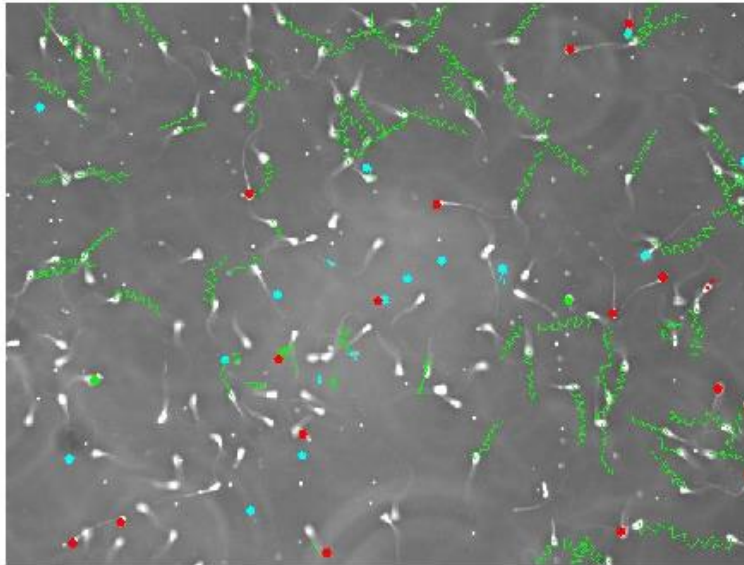
Análisis de semen a través del sistema CASA.



SpermVision Semen Analysis

Donor name: **FONTANA WINDBROOK ARKEAS SHAM1HO001**

Breed: **HOLSTEIN**



Legend

- Progressive motility
- Local motility
- Immotile

Technician: **MV**

Sample Number: **1**

Extender:

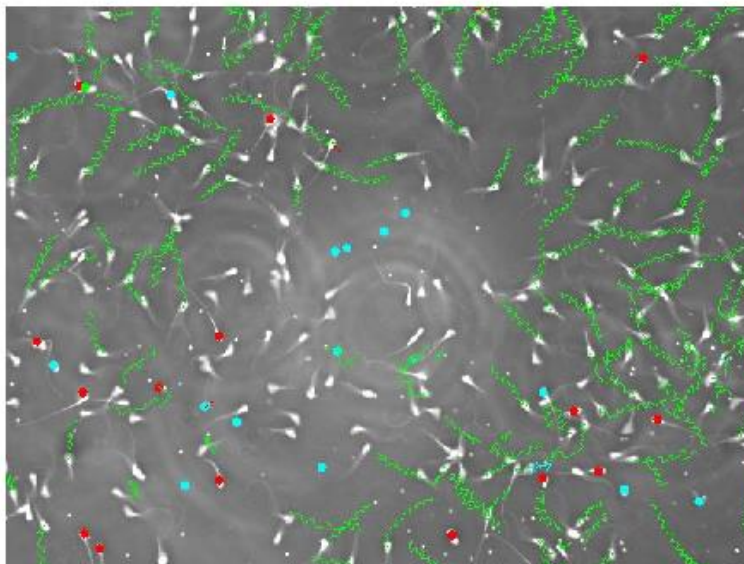
Volume (ml): 6	Progressive motility: 69,78%
Concentration (B/ml): 0,591	Local motility: 16,75%
Total cells (B): 3,25	Immotile: 13,47%
Total viable cells (B): 2,27	Total motility: 86,53%

Análisis reportado por el sistema CASA (01HO01).

SpermVision Semen Analysis

Donor name: **SAN LUIS PLANET ORION SLD** Donor ID: **01HO002**

Breed: **HOLSTEIN**



Legend

- Progressive motility
- Local motility
- Immotile

Technician: **MV**

Sample Number: **1**

Extender:

Volume (ml): 7	Progressive motility: 73,86%
Concentration (B/ml): 0,752	Local motility: 15,11%
Total cells (B): 4,89	Immotile: 11,02%
Total viable cells (B): 3,61	Total motility: 88,98%

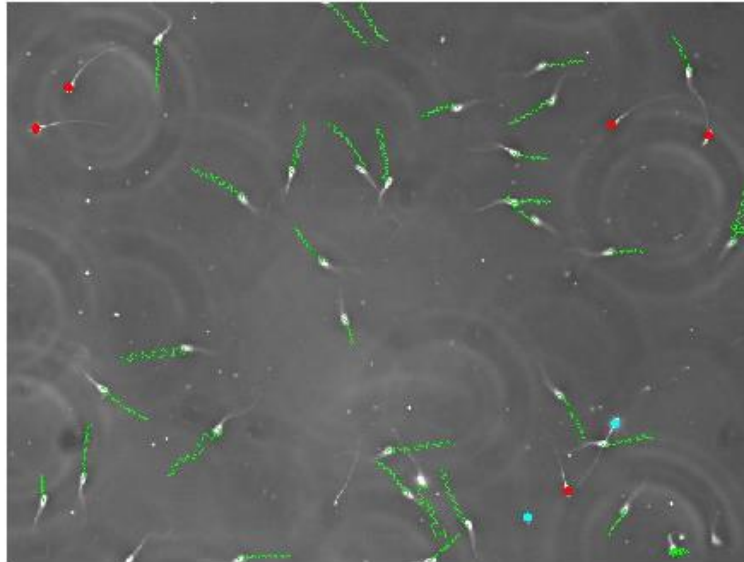


Análisis reportado por el sistema CASA (01HO02).

SpermVision Semen Analysis

Donor name: **MIRAFLORES VIGOR TU ANDY** ID: **01BS001**

Breed: **BROWN SWISS**



Legend

- Progressive motility
- Local motility
- Immotile

Technician: **CR**

Sample Number: **1**

Extender:

Volume (ml): **4**

Progressive motility: **84,06%**

Concentration (B/ml): **0,160**

Local motility: **3,05%**

Total cells (B): **0,64**

Immotile: **12,89%**

Total viable cells (B): **0,54**

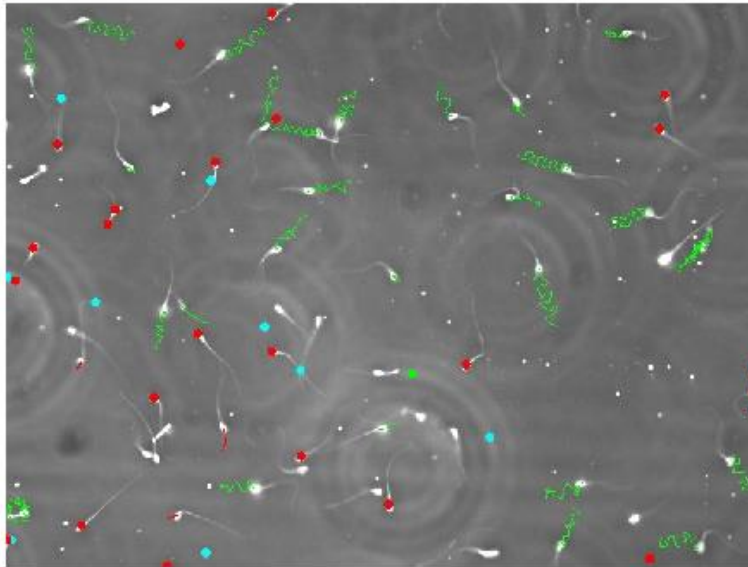
Total motility: **87,11%**

Análisis reportado por el sistema CASA (01BS01).

SpermVision Semen Analysis

Donor name: **CAMPOCERRADO WONDERMENTE, GIBIN, BS002**

Breed: **BROWN SWISS**



Legend

- Progressive motility
- Local motility
- Immotile

Technician: **MV**

Sample Number: **1**

Extender:

Volume (ml): **4**

Progressive motility: **46,49%**

Concentration (B/ml): **0,356**

Local motility: **16,75%**

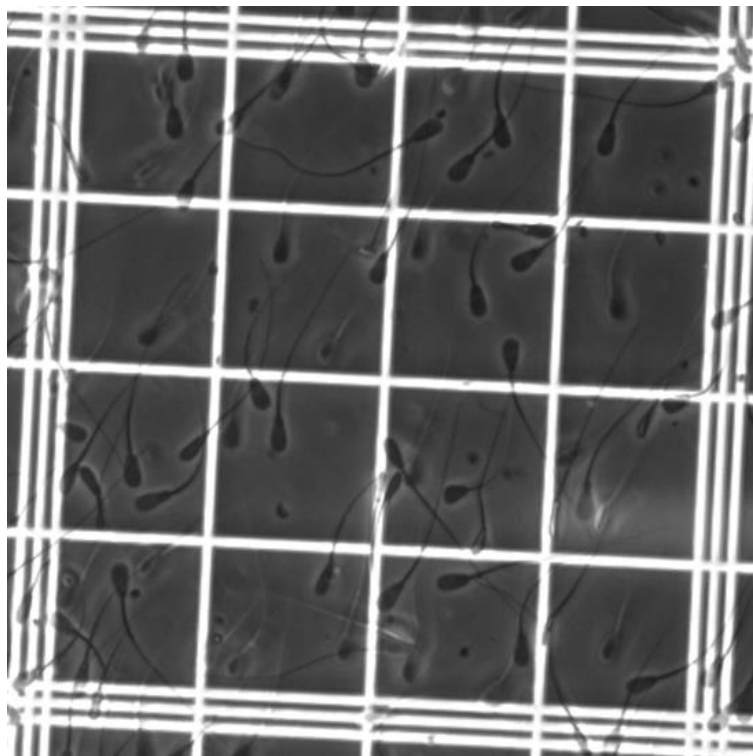
Total cells (B): **1,43**

Immotile: **36,76%**

Total viable cells (B): **0,66**

Total motility: **63,24%**

Análisis reportado por el sistema CASA (01BS02).



Conteo de espermatozoides (01HO02) en la cámara de Neubauer.



ANEXO 3. REGISTRO DATOS INSEMINACIÓN ARTIFICIAL					
FECHA PROCESAMIENTO	FECHAS INSEMINACIÓN	% PREÑEZ			Total general
		BROWN SWISS	HOLSTEIN	JERSEY	
09/05/2016	08/06/2016	60			60
	16/06/2016	40			40
	21/06/2016		30		30
	23/06/2016		40		40
	28/06/2016			40	40
13/05/2016	02/07/2016			60	60
	26/07/2016	40			40
	01/09/2016		40		40
	12/09/2016		60		60
	30/09/2016	40			40
17/05/2016	09/07/2016			40	40
	11/08/2016	60			60
	05/10/2016	40			40
	27/10/2016		40		40
	07/11/2016		60		60
20/05/2016	26/06/2016	70			70
	23/09/2016			60	60
	16/10/2016	50			50
	30/10/2016		40		40
	03/11/2016		40		40
25/05/2016	23/07/2016		10		10
	06/08/2016			60	60
	13/10/2016	60			60
	18/10/2016	50			50
	30/10/2016		50		50
06/06/2016	06/07/2016		30		30
	11/07/2016	30			30
	22/07/2016	30			30
	05/08/2016	60			60
	14/08/2016		30		30
	10/09/2016		40		40
	26/09/2016	70			70
	02/10/2016		70		70
	07/10/2016		30		30
	11/10/2016			50	50
	19/10/2016	40			40
	23/10/2016		40		40
	28/10/2016	60			60
	01/11/2016			60	60
20/11/2016			80	80	
	20/07/2016		50		50

09/06/2016	03/08/2016	80			80
	10/08/2016		50	50	50
	11/08/2016	50			50
	16/08/2016		20		20
	17/08/2016	40			40
	04/09/2016	30			30
	29/09/2016			70	70
	27/10/2016		40		40
	07/11/2016	60			60
	11/11/2016			70	70
	12/11/2016		40		40
	24/11/2016	40			40
	02/12/2016		60		60
Total general		50	41,36	58,18	48,18

Anexo 4. Fotografías inseminación artificial.



Inseminación técnicos MAGAP



Diagnóstico de preñez por ecografía



Imágenes diagnóstico de preñez