

**UNIVERSIDAD NACIONAL
TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS**



**FACULTAD DE INGENIERÍA ZOOTECNISTA, AGRONEGOCIOS
Y BIOTECNOLOGÍA
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA ZOOTECNISTA**

**TESIS PARA OBTENER
EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERA ZOOTECNISTA**

**EFECTO DEL TIEMPO DE REFRIGERACIÓN EN LOS
PARÁMETROS DE VIABILIDAD MICROSCÓPICOS DE
SEMEN BOVINO POST DESCONGELAMIENTO DE LA
RAZA ABERDEEN ANGUS ROJO (GRECO) EN LA
ESTACIÓN EXPERIMENTAL DE CHACHAPOYAS-2018**

Autora:

Bach. Yuri Ekaterine Isique Jaramillo

Asesor:

Ing. César Augusto Maraví Carmen

Registro: (.....)

CHACHAPOYAS – PERÚ

2021

DEDICATORIA

A mis padres y a toda mi hermosa familia, por haberme forjado a lograr mis propósitos, gran parte de ello se los debo a ustedes entre los que se incluye este peldaño de mi formación académica, sin ustedes nada hubiese sido posible.

AGRADECIMIENTO

A Dios, por iluminarme siempre en todo mi camino profesional.

A mis padres, por los buenos ejemplos de esfuerzo, perseverancia y constancia para seguir adelante.

A mis maestros, compañeros y amigos, por brindarme lo mejor de ellos; su tiempo, esfuerzos y enseñanzas durante mi trayectoria universitaria.

A través de este trabajo quiero exteriorizar mi más sincero agradecimiento a mi Universidad y mi Facultad, por acogerme durante esta etapa de mi vida y por darme las facilidades de seguir creciendo como persona y profesional.

También quisiera expresar mi agradecimiento al Instituto de Investigación en Ganadería y Biotecnología – IGBI por el apoyo para la realización de este trabajo de investigación.

Como no agradecer a mi asesor por el apoyo y orientación durante la ejecución de este trabajo.

**AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO
RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS**

Dr. Policarpio Chauca Valqui

RECTOR

Dr. Miguel Ángel Barrena Gurbillón

VICERECTOR ACADÉMICO

Dra. Flor Teresa García Huamán

VICERECTORA DE INVESTIGACIÓN

M. Sc. Nilton Luis Murga Valderrama

**DECANO DE LA FACULTAD DE INGENIERÍA ZOOTECNISTA,
AGRONEGOCIOS Y BIOTECNOLOGÍA**

VISTO BUENO DEL ASESOR DE LA TESIS

Yo *César A. Maraví Carmen*, docente a tiempo completo de la carrera profesional de Ingeniería Zootecnista, en la Facultad de Ingeniería Zootecnista, Agronegocios y Biotecnología hago constar que he asesorado el proyecto de tesis titulado “**EFFECTO DEL TIEMPO DE REFRIGERACIÓN EN LOS PARÁMETROS DE VIABILIDAD MICROSCÓPICOS DE SEMEN BOVINO POST DESCONGELAMIENTO DE LA RAZA ABERDEEN ANGUS ROJO (GRECO) EN LA ESTACIÓN EXPERIMENTAL DE CHACHAPOYAS-2018**”, presentado por la bachiller Yuri Ekaterine Isique Jaramillo, egresada de la Facultad de Ingeniería Zootecnista, Agronegocios y Biotecnología de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas dando el visto bueno a la presente tesis.

Se expide la presente, a solicitud del interesado para los fines que se estimen convenientes.



Ing. CÉSAR A. MARAVÍ CARMEN
ASESOR

JURADO EVALUADOR DE LA TESIS



M. Sc. HUGO FRIAS TORRES
PRESIDENTE



M. Sc. REINER PEDRO GABRIEL REÁTEGUI INGA
SECRETARIO



Mg. MILTON JAILER TRIGOSO YALTA
VOCAL

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS



REGLAMENTO GENERAL
PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE
BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

ANEXO 3-O

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

Los suscritos, miembros del Jurado Evaluador de la Tesis titulada:

EFECTO DEL TIEMPO DE REPERTEGACION EN LOS MARHETADOS DE VIAGETIADAO HICOCOSÓPTIDOS DE SEMEN UNIFORM POST PASIVNGE

IMPACTO DE LA DAZA ALERDOR EN ANGUS ROSO (CROCELEA) EN LA ESTACION EXPERIMENTAL DE CHALVADOMAS - 2018

presentada por el estudiante ()/egresado (x) Yuri Ekatarina Isique Saramillo

de la Escuela Profesional de Ingeniería Zootécnica

con correo electrónico institucional 0810270101@untrm.edu.pe

después de revisar con el software Turnitin el contenido de la citada Tesis, acordamos:

- La citada Tesis tiene 10 % de similitud, según el reporte del software Turnitin que se adjunta a la presente, el que es menor (x) / igual () al 25% de similitud que es el máximo permitido en la UNTRM.
- La citada Tesis tiene _____ % de similitud, según el reporte del software Turnitin que se adjunta a la presente, el que es mayor al 25% de similitud que es el máximo permitido en la UNTRM, por lo que el aspirante debe revisar su Tesis para corregir la redacción de acuerdo al Informe Turnitin que se adjunta a la presente. Debe presentar al Presidente del Jurado Evaluador su Tesis corregida para nueva revisión con el software Turnitin.



Chachapoyas, 25 de marzo del 2021


SECRETARIO


PRESIDENTE


VOCAL

OBSERVACIONES:

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE LA TESIS



REGLAMENTO GENERAL
PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE
BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

ANEXO 3-Q

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

En la ciudad de Chachapoyas, el día 02 de Julio del año 2020, siendo las 9:00am horas, el aspirante: Yuri Ekatarina Toque Jaramillo, defiende en sesión pública presencial () / a distancia (X) la Tesis titulada: "EFECTO DEL TIEMPO DE REFRIGERACIÓN EN LOS PARÁMETROS DE VIABILIDAD MICROSCÓPICOS DE SEMEN BONTARDI POST DESCONGELAMIENTO DE LA RAZA ABERDEENIANGLUS DDTG (GRECO) EN LA ESTACIÓN EXPERIMENTAL DE CHACHAPOYAS - 2018", teniendo como asesor a Ing. César Augusto Maraví Carmen para obtener el Título Profesional de Ingeniera Zootecnista, a ser otorgado por la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas; ante el Jurado Evaluador, constituido por:

Presidente: M.Sc. Hugo Efraim Torres

Secretario: M.Sc. Reiner Pedro Gabriel Redtegui Trigo

Vocal: Mg. Milton Jailer Triguero Yalta

Procedió el aspirante a hacer la exposición de la Introducción, Material y métodos, Resultados, Discusión y Conclusiones, haciendo especial mención de sus aportaciones originales. Terminada la defensa de la Tesis presentada, los miembros del Jurado Evaluador pasaron a exponer su opinión sobre la misma, formulando cuantas cuestiones y objeciones consideraron oportunas, las cuales fueron contestadas por el aspirante.

Tras la intervención de los miembros del Jurado Evaluador y las oportunas respuestas del aspirante, el Presidente abre un turno de intervenciones para los presentes en el acto de sustentación, para que formulen las cuestiones u objeciones que consideren pertinentes.

Seguidamente, a puerta cerrada, el Jurado Evaluador determinó la calificación global concedida a la sustentación de la Tesis para obtener el Título Profesional, en términos de:

Aprobado (X)

Desaprobado ()

Otorgada la calificación, el Secretario del Jurado Evaluador lee la presente Acta en esta misma sesión pública. A continuación se levanta la sesión.

Siendo las 10:30 am horas del mismo día y fecha, el Jurado Evaluador concluye el acto de sustentación de la Tesis para obtener el Título Profesional.


SECRETARIO


VOCAL


PRESIDENTE

OBSERVACIONES:

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS	iv
VISTO BUENO DEL ASESOR DE LA TESIS	v
JURADO EVALUADOR DE LA TESIS	vi
CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS	vii
ACTA DE SUSTENTACIÓN DE LA TESIS	viii
ÍNDICE GENERAL	ix
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xiv
I. INTRODUCCIÓN	15
II. MATERIAL Y MÉTODO	18
2.1. Ubicación del estudio	18
2.2. Detalles y Genealogía del toro aberdeen angus rojo.	18
2.3. Procedimiento de la Investigación.....	19
2.3.1. Limpieza del donador.....	19
2.3.2. Armado y preparación de la vagina artificial.	19
2.3.3. Preparación del donador.....	19
2.3.4. Colecta del semen.	19
2.3.5. Dilución del semen.....	20
2.3.6. Refrigeración de las muestras.	20
2.3.7. Análisis de la muestra.	20

2.4. Diseño y análisis de la investigación	21
2.4.1. Diseño experimental.....	21
2.4.2. Análisis estadístico	21
2.4.3. Comparación de medias	22
III. RESULTADOS	23
3.1. Porcentaje de motilidad	23
3.2. Concentración	24
3.3. Viabilidad espermática	25
IV. DISCUSIÓN	27
V. CONCLUSIONES	29
VI. RECOMENDACIONES	30
VII.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31
ANEXOS.....	34

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Análisis de Varianza (ANVA).....	21
Tabla 2. Análisis de varianza y comparación de medias (Duncan) para la variable porcentaje de motilidad espermática.....	23
Tabla 3. Análisis de varianza y comparación de medias (Duncan) para la variable concentración de espermatozoides (millones/ml).....	24
Tabla 4. Análisis de varianza y comparación de medias (Duncan) para la variable viabilidad de los espermatozoides (porcentaje de espermatozoide vivos y de muertos).....	26
Tabla 5. Porcentaje de motilidad y concentración espermática a diferentes tiempos de refrigeración.....	34
Tabla 6. Análisis de varianza de la motilidad espermática a diferentes tiempos de refrigeración.....	35
Tabla 7. Análisis de varianza de la concentración espermática de a diferentes tiempos de refrigeración.....	35
Tabla 8. Viabilidad espermática a diferentes tiempos de refrigeración.....	36
Tabla 9. Análisis de varianza de la viabilidad espermática (porcentaje de espermatozoides vivos) a diferentes tiempos de refrigeración.....	37
Tabla 10. Análisis de varianza de la viabilidad espermática (porcentaje de espermatozoides muertos) a diferentes tiempos de refrigeración.....	37

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Ubicación del estudio.....	18
Figura 2. Porcentaje de motilidad espermática a diferentes tiempos de refrigeración.....	23
Figura 3. Concentración de espermatozoides (millones/ml) a diferentes tiempos de refrigeración.....	24
Figura 4. Vitalidad espermática (porcentaje de vivo y de muertos) a diferentes tiempos de refrigeración.....	25
Figura 5. Sistema CASA.....	38
Figura 6. Viabilidad espermática.....	38

RESUMEN

Con el objetivo de evaluar el tiempo de refrigeración en los parámetros de viabilidad microscópicos de semen bovino post descongelamiento de la raza aberdeen angus rojo, mediante una vagina artificial se colectó el semen de un reproductor de la raza descrita, en la Estación Experimental Chachapoyas, de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, se realizó la dilución con Andromed según indicaciones del fabricante y se evaluaron los parámetros de motilidad, concentración y viabilidad a las 3, 6, 9 y 12 horas de refrigeración denominados como T1, T2, T3 y T4 respectivamente. Para la determinación de motilidad y concentración espermática se usó un DCA con cuatro tratamientos y cinco repeticiones por tratamiento, mientras que para la concentración espermática un DCA con sub muestreo con cuatro tratamientos, dos repeticiones por tratamiento y tres muestras por repetición. Los resultados fueron procesados con el software SAS versión 2019, mediante el análisis de varianza y la comparación de medias por la prueba Duncan. No se encontró diferencias significativas ($p > 0,05$) para motilidad, concentración y viabilidad espermática entre los tratamientos.

Palabras clave: Aberdeen angus rojo, refrigeración, parámetro.

ABSTRACT

In order to evaluate the refrigeration time in the microscopic viability parameters of post-thawed bovine semen of the red angus aberdeen breed, the semen of a breeder of the described breed was collected through an artificial vagina at the Chachapoyas Experimental Station, from the Universidad Nacional Toribio Rodriguez de Mendoza de Amazonas, dilution with Andromed was performed according to the manufacturer's indications and the parameters of motility, concentration and viability were evaluated at 3, 6, 9 and 12 hours of refrigeration named as T1, T2, T3 and T4 respectively. For the determination of motility and sperm concentration an ACD with four treatments and five replicates per treatment was used, while for sperm concentration an ACD with sub-sampling with four treatments, two replicates per treatment and three samples per replicate was used. The results were processed with the SAS software version 2019, through the analysis of variance and the comparison of means by the Duncan test. No significant differences ($p > 0.05$) were found for sperm motility, concentration and viability between treatments.

Keywords: Red aberdeen angus, cooling, parameter.

I. INTRODUCCIÓN

En 1949 se descubrió que el glicerol tenía una acción crioprotectora sobre los espermatozoides, desde entonces la inseminación artificial (IA) con semen congelado empezó a practicarse de manera generalizada en los bovinos. Pero la comunidad científica siempre ha estado preocupada por desarrollar pruebas de laboratorio que ayuden a prever de una forma más concisa la capacidad fecundante del semen para poder identificar si un protocolo de congelación funciona bien o no en la IA (Muiño, 2008). Asimismo, Lewis (2007) menciona que el semen es uno de los fluidos biológicos más variables que existen, debido a que los espermatozoides pueden alterar su comportamiento en relación a los cambios ambientales, de temperatura, métodos de procesamiento, conservación, entre otros factores (Gravance et al., 1998).

Moron y Moron (2015) mencionan que para garantizar la calidad seminal de un bovino donde los espermatozoides cumplan las características requeridas ya sea para una fertilización in vitro o para una inseminación artificial, se debe realizar un examen completo del potencial reproductivo del macho que se va a colectar, efectuando una exploración física, sanitaria y una evaluación macroscópica y microscópica del eyaculado utilizando una técnica in vitro como el sistema CASA (Computer Assisted Semen Analysis). Esta técnica se basa en capturar las imágenes de los espermatozoides en movimiento, luego los digitaliza para identificar y observar las células espermáticas en imágenes sucesivas, estableciendo las trayectorias definitivas de los espermatozoides (Barragán 2017; González 2018). Estas trayectorias son determinadas por la velocidad del movimiento de la cabeza y la frecuencia de los cambios de dirección que realiza cada espermatozoide y finalmente son procesadas matemáticamente para obtener los resultados numéricos (Hidalgo et al. 2005A).

La evaluación clásica y rutinaria de los parámetros espermáticos debe medir volumen, pH, concentración, movimiento espermático, morfología, entre otros (Hidalgo et al. 2005B). La motilidad del espermatozoide determina la calidad seminal, siendo una característica muy importante para calificar y evaluar si las células seminales tienen la capacidad de recorrer el tracto genital de la hembra y poder lograr la fecundación (Turner, 2003). Por otro lado, la viabilidad de los espermatozoides es un parámetro muy asociado con la fertilidad que refleja el grado de integridad de la membrana plasmática y acrosomal del espermatozoide (Uwland, 1984).

Brito y Reinoso (2017) indican que las características básicas que se valoran macroscópicamente en un eyaculado son el volumen, color y aspecto. El volumen es expresado en mililitros (ml) y normalmente un toro joven puede eyacular alrededor de 2 ml y en adultos puede ser mayor o igual a 4 ml pudiendo llegar hasta 12 ml. El color y aspecto óptimo de un eyaculado debe ser cremoso, si tiene un aspecto lechoso o incluso uno claro ya no son deseables, además si el semen presenta colores rojizos o amarillentos son desechados ya que estos colores nos están indicando que las muestras son contaminadas.

Las características básicas que se valoran microscópicamente de un eyaculado son la motilidad masal e individual, este parámetro muestra la capacidad de movimiento de los espermatozoides y la morfología ya que estas características son muy importantes para que el espermatozoide desempeñe su función biológica presentando una estructura típica de cabeza, cuello, parte intermedia y cola (Nuñez 2015, citado por González 2018).

La congelación produce daños irreversibles en el acrosoma y membranas plasmáticas provocando una expansión y alteración, además ocasiona cambios en el medio osmótico, altera el mecanismo del calcio modificando la actividad enzimática. Por lo que la actividad de una membrana bioquímicamente activa es muy importante para la capacitación espermática, la reacción acrosómica, y la posterior unión de los espermatozoides al ovocito. Asimismo, los cambios posteriores a la congelación desestabilizan las membranas espermáticas asemejándose a los cambios sufridos en la capacitación fisiológica del esperma afectando así la fertilidad de los espermatozoides del semen congelado (Tartaglione et al., 2004).

Según varios estudios realizados se determinó que después de la congelación la calidad de los espermatozoides varía de acuerdo al tiempo de equilibrio. En 1972 se propuso un tiempo de equilibrio entre 3 a 5 minutos con una temperatura de 5 °C ó 25 °C, demostrando que durante ese tiempo el glicerol penetraba en los espermatozoides del toro (Anchatuña, 2017). Asimismo, Purdy et al. (2010) indican que el eyaculado se puede mantener por 24 horas a 5 °C antes de la criopreservación sin modificar la fertilidad del semen. Por otro lado, Guimaraes et al. (2010) encontraron que los espermatozoides tenían una mejor supervivencia durante 4 horas de equilibrio a 5 °C.

En la actualidad aún existe una controversia con los tiempos de equilibrio o de congelación antes del empajillado para obtener una mayor calidad de los

espermatozoides, en el presente estudio se probaron cuatro tiempos de refrigeración de semen bovino de la raza aberdeen angus rojo para evaluar los parámetros de calidad seminal como el porcentaje de espermatozoides progresivos móviles, la concentración de espermatozoides por mililitro de semen y la viabilidad espermática en los diferentes tiempos de refrigeración. Además, poder estimar el mejor tiempo de refrigeración.

II. MATERIAL Y MÉTODO

2.1. Ubicación del estudio

La investigación se realizó en la estación experimental de Chachapoyas del Instituto de Investigación en Ganadería y Biotecnología (IGBI) de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas ubicada en el distrito y provincia de Chachapoyas departamento de Amazonas – Perú.



Figura 1: Ubicación del estudio tomado de Google Earth.

2.2. Detalles y Genealogía del toro aberdeen angus rojo.

- Nombre del toro: UNTRM HERITAGE BLUE CUB GRECO.
- Número de registro: 01.
- Fecha de Nacimiento: 10/09/2014.
- Padre: Brown Heritage U6509.
- Madre: Marcar cabernet 019-RG COL 36744-AR.
- Abuelo paterno: Beckton Heritage- N013.
- Abuela paterna: Brow Ms L806-S6944.
- Abuelo materno: Pampeano 177 Blue Cub 62T-RG ARG 745999.
- Abuela materna: La corona Brujo 019 T.E.-RG COL 25493.

2.3. Procedimiento de la Investigación

2.3.1. Limpieza del donador.

Utilizando una tijera se realizó el corte de los pelos del orificio prepucial (dejando aproximadamente un centímetro de largo), se lavó externamente la zona del prepucio con agua y jabón neutro y el lavado interno se hizo con una solución fisiológica utilizando una pipeta adaptada a una jeringa (50 ml), luego se secó cuidadosamente con papel absorbente.

2.3.2. Armado y preparación de la vagina artificial.

Se armó colocando la manga de látex por el interior del tubo (base de la vagina artificial) y doblando los extremos por la parte exterior del tubo sujetando ambos lados con ligas. El llenado de la vagina se realizó, retirando la tapa de la válvula y colocando agua a una temperatura promedio de 50 °C, después se agregó aire para proporcionar la presión adecuada. Luego se colocó el tubo Falcon en la parte más estrecha del embudo de látex sujetado a la base de la vagina artificial por el lado opuesto a la válvula de llenado. Luego se colocó la camisa aislante que cubre el tubo o cono para recibir el eyaculado y a su vez evitar el shock térmico, después se untó gel lubricante de 10 a 15 cm de la entrada de la vagina.

2.3.3. Preparación del donador.

Se realizó la permisión de falsas montas por un tiempo de diez minutos para lograr una excitación intensa e incrementar el deseo sexual y el volumen del eyaculado.

2.3.4. Colecta del semen.

Se esperó el momento que el toro monte para luego desviar el pene hacia la derecha y juntarla con la entrada de la vagina artificial, una vez que el toro hizo el empuje de la cadera hacia adelante (golpe del riñón) se inclinó la vagina hacia el lado del vaso colector para luego retirar una vez que el toro haya bajado.

- a. Análisis macroscópico del semen. Una vez recolectado el semen, se evaluó las características físicas del semen como: color normal y volumen. Ambas características se determinaron mediante la observación directa del tubo colector milimetrado.

b. Análisis microscópico de semen. Se tomó la muestra en una pipeta de 0,5 microlitros para colocar la muestra al porta objeto, el cual se mantuvo a una temperatura de 37 °C.

2.3.5. Dilución del semen.

Cada muestra de semen colectado se diluyó con andromed en una relación 1:1 es decir por cada 1 ml de semen 1 ml de andromed.

2.3.6. Refrigeración de las muestras.

Una vez hecha la dilución final, se refrigeró las muestras a 5 °C por 3; 6; 9 y 12 horas y posteriormente se descongeló las pajillas de semen a una temperatura de 38,5 °C por 60 segundos, a continuación, se colocó una gota (10 µl) de semen sobre un portaobjetos a 37 °C y se colocó sobre esta un cubreobjetos, también a la misma temperatura para luego realizar las evaluaciones microscópicas.

2.3.7. Análisis de la muestra.

Después de haber refrigerado las muestras de semen a diferentes, se realizó el análisis microscópico de motilidad individual y la contabilización de espermatozoides vivos y muertos. Para la determinación de la motilidad individual, se tomó una gota de la muestra y se colocó sobre un portaobjeto con un cubreobjetos y se analizó mediante el sistema CASA. Para la determinación de la viabilidad espermática es decir el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos se realizó una coloración del semen, luego se contó unos 100 espermatozoides por campo. Utilizando la tinción eosina-nigrosina, esto consistió en tomar una gota de la muestra de semen, colocarlo en un porta objetos y luego colocar una gota de eosina-nigrosina y hacer un frotis para luego observar al microscopio, donde los vivos no se colorearon y los muertos se tiñeron totalmente.

– Protocolo empleado para Eosina Nigrosina. Se pesó 0,69 g de eosina y 0,90 g de cloruro de sodio para agregarle a los 100 ml de agua destilada y calentar brevemente para que se diluya, luego se agregó 10 g de nigrosina y se llevó a ebullición, luego se filtró usando papel filtro hasta obtener el producto final.

2.4. Diseño y análisis de la investigación

2.4.1. Diseño experimental.

Se usó un Diseño Completamente al Azar (DCA) distribuido en cuatro tratamientos T1 (3 h), T2 (6 h), T3 (9 h) y T4 (12 h) con 5 repeticiones cada tratamiento, utilizando el siguiente modelo aditivo lineal.

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} : Observación del i-ésimo tiempo de refrigeración en la j-ésima repetición.

μ : Media general.

τ_i : Efecto del i-ésimo tiempo de refrigeración.

ε_{ij} : Error experimental del efecto de los tiempos de refrigeración.

2.4.2. Análisis estadístico

Se usó un DCA con cuatro tratamientos y cinco repeticiones por tratamiento para determinar motilidad y concentración espermática y un DCA con submuestreo para determinar la viabilidad espermática con cuatro tratamientos, dos repeticiones por tratamiento y tres muestras por repetición. Los datos obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANVA), con el uso del software estadístico SAS versión 2019, con un nivel de significación (α) del 5 % y un nivel de confianza (1- α) del 95 %.

Tabla 1

Análisis de Varianza (ANVA)

Fuente de Variación	Grados de libertad (gl)	Suma de cuadrados (SC)	Cuadrados medios (CM)	F_c
Tratamiento	t-1	$\frac{\sum_{i=1}^t Y_i^2}{r_i} - \frac{Y_{..}^2}{\sum_{i=1}^t r_i}$	$\frac{SC_{trat}}{gl_{trat}}$	$\frac{CM_{trat}}{CM_{error}}$
Error experimental	t(r-1)	SC _{tot} - SC _{trat}	$\frac{SC_{error}}{gl_{error}}$	
Total	tr-1	$\sum_{i=1}^t \sum_{j=1}^r Y_{ij}^2 - \frac{Y_{..}^2}{tr}$		

2.4.3. Comparación de medias

La comparación de medias para resultados significativamente diferentes, se realizó mediante la prueba de Duncan ($\alpha = 0,05$).

III. RESULTADOS

3.1. Porcentaje de motilidad

Dentro de los tratamientos el T2 mostró mayor porcentaje de motilidad (84,36 %) seguido por el T1 (81,40 %) tal y como se muestra en la figura 2 y tabla 2. Siendo los menores valores encontrados en T3 y T4 (78,86 y 73,32 %, respectivamente). No encontrando diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0,05$).

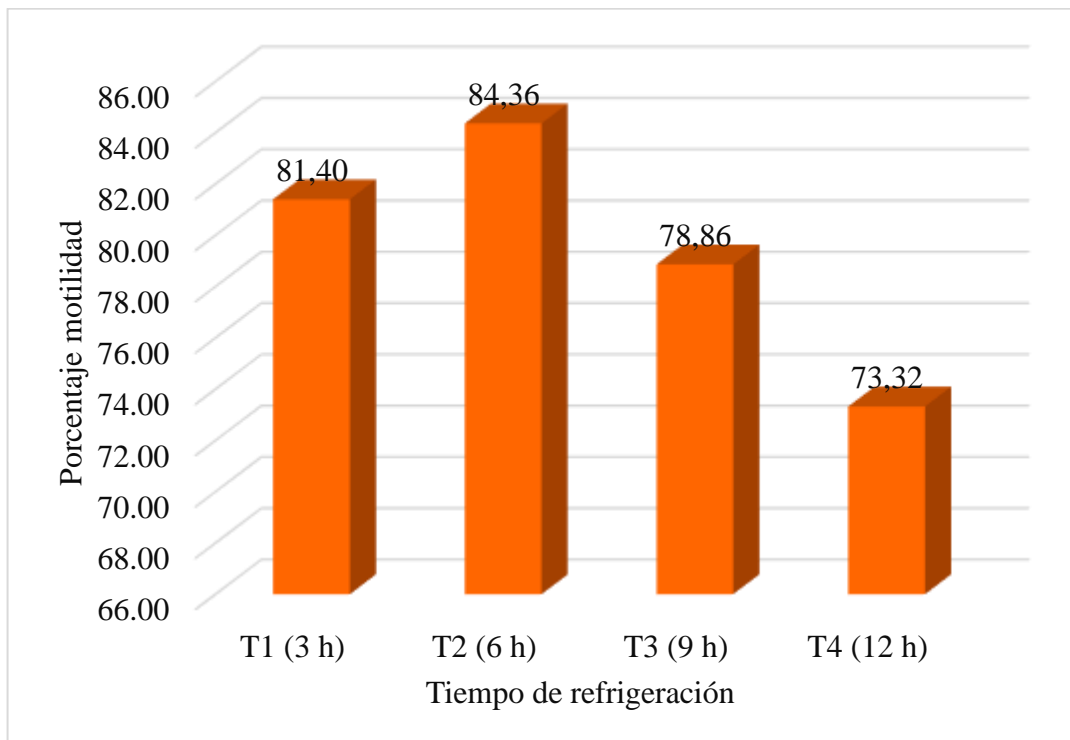


Figura 2: Porcentaje de motilidad espermática a diferentes tiempos de refrigeración.

Tabla 2

Análisis de varianza y comparación de medias (Duncan) para la variable porcentaje de motilidad espermática.

Tratamiento	Porcentaje de motilidad	Agrupación Duncan
T1	81,40	A
T2	84,36	A
T3	78,86	A
T4	73,32	A

T1: 3 h; T2: 6h; T3: 9 h y T4: 12 h.

Las medias que no comparten una letra dentro de una misma columna muestran diferencia estadística ($p < 0,05$).

3.2. Concentración

Dentro de los tratamientos el T3 mostró mayor concentración con 1206,80 millones de espermatozoides por mililitro seguido por el T2 con 1124,60 tal como se muestra en la figura 3 y tabla 3. Encontrando menores concentraciones en T4 y T1 (978,90 y 819,70, respectivamente). No encontrando diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0,05$).

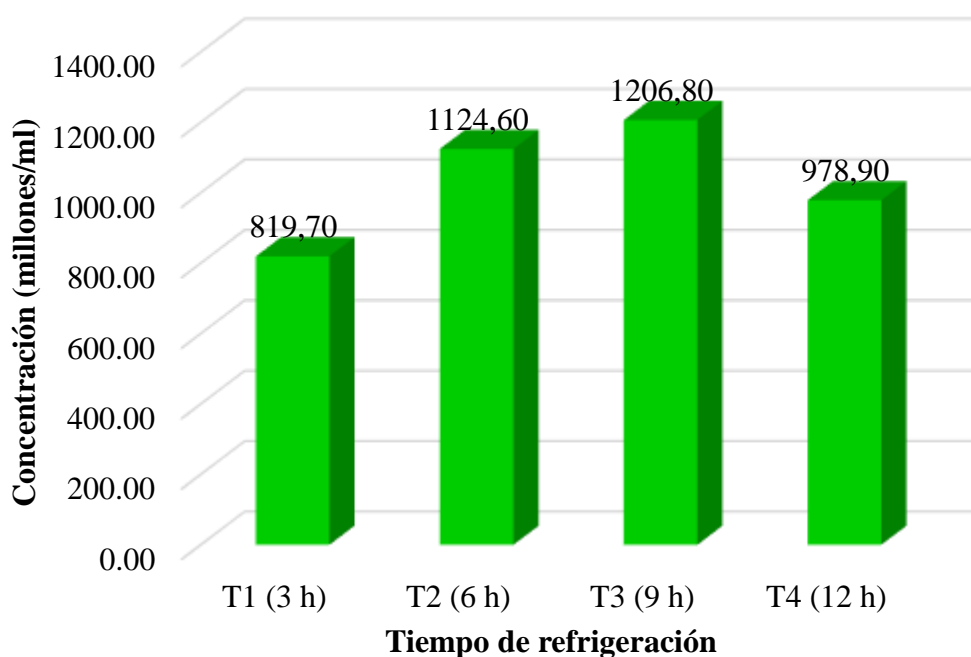


Figura 3: Concentración de espermatozoides (millones/ml) a diferentes tiempos de refrigeración.

Tabla 3

Análisis de varianza y comparación de medias (Duncan) para la variable concentración de espermatozoides (millones/ml).

Tratamiento	Concentración (millones/ml)	Agrupación Duncan
T1	819,70	A
T2	1124,60	A
T3	1206,80	A
T4	978,90	A

T1: 3 h; T2: 6h; T3: 9 h y T4: 12 h.

Las medias que no comparten una letra dentro de una misma columna muestran diferencia estadística ($p < 0,05$).

3.3. Viabilidad espermática

Dentro de los tratamientos el T4 mostró mayor porcentaje de espermatozoides vivos con alrededor de 77,10 % y 22,91 % de muertos, seguido por el T3 con 74,41 % vivos y 25,60 % muertos tal y como se muestra en la figura 4 y tabla 4. Encontrando menores porcentajes de espermatozoides vivos en T1 y T2 (72,38 y 65,10 %, respectivamente) y mayor porcentaje de mortalidad alrededor de 27,62 % para T1 y 34,90 % para T2. No encontrando diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0,05$).

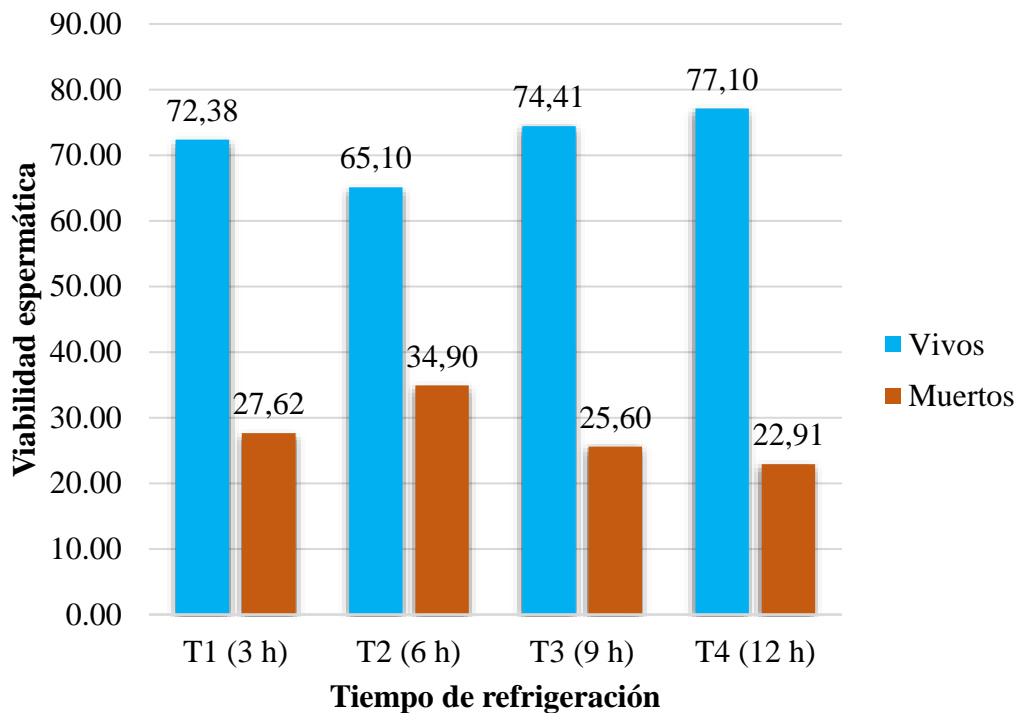


Figura 4: Viabilidad espermática (porcentaje de vivo y de muertos) a diferentes tiempos de refrigeración.

Tabla 4

Análisis de varianza y comparación de medias (Duncan) para la variable viabilidad de los espermatozoides (porcentaje de espermatozoide vivos y de muertos).

Tto	Porcentaje de esp. Vivos	Agrup. Duncan	Porcentaje de esp. Muertos	Agrup. Duncan
T1	72,38	A	27,62	A
T2	65,10	A	34,90	A
T3	74,41	A	25,60	A
T4	77,10	A	22,91	A

T1: 3 h; T2: 6h; T3: 9 h y T4: 12 h.

Las medias que no comparten una letra dentro de una misma columna muestran diferencia estadística ($p < 0,05$).

IV. DISCUSIÓN

En esta investigación los valores promedios de motilidad post descongelación a una temperatura de 38,5 °C por 60 segundos, que se encontraron son de 73,32 a 84,36 % tal como se observa en la tabla 2 no encontrando ninguna diferencia estadística entre los tratamientos ($p > 0,05$). Estos valores son similares a lo reportado por Papa et al. (2015) quienes encontraron un 76.3% de motilidad pos descongelación a 37 °C por 30 segundos, al evaluar viabilidad y fertilidad de los espermatozoides utilizando glicerol en el semen de toros nelore refrigerado a 5 °C por 24 h. A su vez, estos valores están por encima de 44,40 a 53,70 % reportado por Murphy et al. (2017), quienes no encontraron ninguna diferencia estadística ($p > 0,05$) para motilidad seminal post descongelación a una temperatura de 37 °C por 30 segundos al evaluar los parámetros de calidad de los espermatozoides y la tasa de parto después de la IA durante cuatro tiempos de equilibrio (6, 24, 48 y 72 h) a 4 °C en semen de toros holstein. Además, los valores encontrados en este estudio (58,30 a 69,90 %) están por encima de lo reportado por Trigos (2017) quien tampoco encontró ninguna diferencia estadística ($p > 0,05$) para motilidad al evaluar la viabilidad de los espermatozoides en semen fresco de bovinos refrigerados a -5 °C por 72 horas utilizando dos dilutores (agua de coco y leche descremada).

En esta investigación se encontró una concentración promedio (millones/mililitro) post descongelación de 1032,50 millones de espermatozoides por mililitro tal como se muestra en la tabla 3, no encontrando ninguna diferencia estadística ($p > 0,05$), este valor es superior a 915,75 millones/ml, reportado por Mejía (2017), quien no encontró ninguna diferencia estadística para esta característica ($p > 0,05$) al evaluar antes y después de la congelación del semen de ganado criollo obtenido con vagina artificial y electroeyaculador, refrigerados a 5 °C por 2 horas y posteriormente descongelado a 35 °C por 40 segundos. Pero el valor encontrado en esta investigación está por debajo de lo reportado por Trigos (2017), quien encontró un promedio de 1811 millones/ml y a su vez tampoco encontró ninguna diferencia estadística ($p > 0,05$) al evaluar la viabilidad de los espermatozoides en semen fresco de bovinos refrigerados a -5 °C por 72 horas utilizando dos dilutores (agua de coco y leche descremada) descongelados a 38.5 °C por 60 segundos.

En esta investigación los valores promedios de viabilidad espermática es decir el porcentaje de espermatozoides vivos que se encontraron fueron de 65,10 a 77,10 % y

22,91 a 34,90 % de espermatozoides muertos, tal como se muestra en la tabla 4; no encontrándose ninguna diferencia estadística entre los tratamientos ($p > 0,05$). Estos valores son similares a los reportados por Murphy et al. (2017) quienes encontraron valores de 53.40 a 61.30% de viabilidad (espermatozoides vivos) al evaluar el efecto de aumentar el tiempo de equilibrio del semen de toros Holstein diluido por 6, 24, 48 y 72 h a 4 °C antes de la congelación sobre los parámetros de calidad del espermatozoide y la tasa de parto después de la inseminación artificial, además encontraron una diferencia significativa a ($p < 0.01$). los valores encontrados en este trabajo también son similares a lo reportado por Trigoso (2017) quien encontró valores de 51 a 81 % de espermatozoides vivos y 19 a 49 % espermatozoides muertos, quien a su vez tampoco encontró ninguna diferencia estadística ($p > 0,05$) al evaluar la viabilidad espermática en semen fresco de bovinos refrigerados a -5 °C por 72 horas utilizando dos dilutores (agua de coco y leche descremada) descongelados a 38.5 °C por 60 segundos. Pero los valores que se encontró en esta investigación están por debajo de 75,98 y 78,23 % de espermatozoides vivos y por encima de 21,77 a 24,02 % de espermatozoide muertos, valores reportados por Anchatuña (2017), quien tampoco encontró ninguna diferencia estadística para esta característica de evaluación ($p > 0,05$) al evaluar diferentes tiempos de equilibrio (2, 4, 8, 12, 16, 20 y 24 horas a 5 °C) sobre la calidad espermática antes y después de la congelación del semen bovino de toros reproductores holstein friesian.

Los resultados encontrados en este estudio difieren de lo reportado por los autores antes mencionado, debido a que hay factores ambientales, sanitarios, genéticos y además cada ejemplar expresa sus características reproductivas de forma individual, que influyen en la calidad seminal de los sementales como la motilidad, concentración y viabilidad espermática tal y como lo menciona Vallecillo (2011) al realizar una caracterización reproductiva de toros de la raza marismeña para su conservación.

V. CONCLUSIONES

- Los valores de motilidad de los espermatozoides evaluados después de los cuatro tiempos de congelación durante 3; 6; 9 y 12 horas, no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$), indicando que los tiempos no fueron influyentes en este parámetro.
- Los valores de concentración de espermatozoides por mililitro, tampoco mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$) para los cuatro tiempos de refrigeración, indicando que tampoco fueron influyentes en este parámetro.
- Los valores de viabilidad espermática en los cuatro tiempos de refrigeración, tampoco mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$) para los cuatro tiempos de refrigeración, indicando que tampoco fueron influyentes en este parámetro.
- Los tiempos de refrigeración evaluados en esta investigación no tienen influencia significativa en los parámetros evaluados (porcentaje de motilidad, concentración y viabilidad espermática), por lo que no se puede estimar el mejor tiempo.

VI. RECOMENDACIONES

- Se debe realizar trabajos de esta índole más periódicamente para poder identificar los posibles factores que influyen en una calidad seminal, además se debería utilizar más animales con características similares para poder tener una información más representativa de la región.
- Cuando se requiera hacer más estudios de este carácter se debería comparar los tiempos de refrigeración entre otras razas que se trabajen en la región y así poder identificar los tiempos que se adecúen para cada una.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anchatuña, C. A. (2017). *Efecto de distintos tiempos de equilibrio sobre la calidad espermática pre y post-congelación de semen bovino de toros reproductores Holstein Friesian*. Informe final de investigación para obtener el título de Médico Veterinario Zootecnista. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Central del Ecuador. Quito – Ecuador. 55 pp.
- Brito, D. M. y Reinoso, N. Y. (2017). *Evaluación cuali-cuantitativa de semen colectado con electroeyaculador (EE) de toros tratados con y sin tranquilizante*. Tesis para obtener el Título de Médicas Veterinarias Zootecnistas. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Cuenca. Cuenca – Ecuador. 88 pp.
- González, D. F. (2018). *Técnicas in vitro para la valoración espermática en bovinos*. Seminario de profundización en reproducción bovina. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Cooperativa de Colombia. Ibagué – Tolima. 20 pp.
- Gravance, C.G.; Vishwanath, R.; Pitt, C.; Garner, D.L. & Casey, P.J. (1998). *Effects of cryopreservation on bull sperm head morphometry*. Journal of Andrology. 19 (6), 704-709.
- Guimaraes, T.; Ribeiro, V. R.; Paes, R.; Furugen, A.; Lucas, L.; Gilli, F.; Matias, J. A. & De Andrade, V. J. (2010). *Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry*. Animal Reproduction Science. 120. Núm. 1 – 4. Pp. 31 – 38.
- Hidalgo, C. O., Tamargo, C. y Diez, C. (2005A). *Análisis del semen bovino. Tecnología Agroalimentaria*. Vol. 2. Pp. 39 – 43.
- Hidalgo, M., Rodríguez, I., Dorado, J., Sanz, J. & Soler, C. (2005B). *Effect of sample size and staining methods on stallion sperm morphometry by the Sperm Class Analyzer*. Veterinarni Medicina. Vol. 50. Num. 1. Pp. 24 – 32.
- Lewis, S. (2007). *Is sperm evaluation useful in predicting human fertility. Reproduction in Domestic Animals*. Vol. 134. Pp. 31 – 40.
- Mejía, J. E. (2017). *Evaluación pre y post congelación del semen obtenido con vagina artificial y electroeyaculador en el ganado criollo. Tesis para obtener el título de*

Magister en Reproducción Animal. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Cuenca. Cuenca, Ecuador. 54 pp.

- Moron, D. A. y Moron, L. M. (2015). *Evaluación de la calidad seminal en toros reproductores en invierno y verano en el Departamento del Cesar*. Trabajo Final para obtener el Grado Académico de Especialista en Reproducción Bovina. Universidad Nacional de Córdoba. Barranquilla, Colombia. 27 pp.
- Muiño, R. (2008). *Evaluación de la motilidad y vialidad del semen bovino mediante el uso de sistemas casa y citometría de flujo: identificación de subpoblaciones espermáticas*. Tesis para obtener el grado de Doctor. Facultad de Veterinaria. Universidad de Santiago de Compostela. 157 pp.
- Murphy, E. M., Eivers, B., O'Meara, C. M., Lonergan, P. & Fair, S. (2018). *Effect of increasing equilibration time of diluted bull semen up to 72 h prior to freezing on sperm quality parameters and calving rate following artificial insemination*. Theriogenology. Vol. 108. Num. 1. Pp. 217 – 222.
- Papa, P. M., Maziero, R. D., Guasti, P. N., Junqueira, C. R., Freitas-Dell, C. P., Papa, F. O., Vianna, F. P., Alvarenga, M. A., Crespilho, A. M. & Dell'Aqua, J. A. (2015). *Effect of glycerol on the viability and fertility of cooled bovine semen*. Theriogenology. Vol. 83. Num. 1. Pp. 107 – 113.
- Purdy, P. H., Mocé, E., Stobart, R., Murdoch, W. J., Moss, G. E., Larson, B., Ramsey, S., Graham, J. K. & Blackburn, H. D. (2010). *The fertility of ram sperm held for 24 h at 5 °C prior to cryopreservation*. Animal Reproduction Science. Vol. 118. Num. 2 – 4. Pp. 231 – 235.
- Tartaglione, C. M. & Ritta, M. N. (2004). *Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen*. Theriogenology. Vol. 62. Num. 7. Pp. 1245 – 1252.
- Trigoso, M. (2017). *Efecto del uso de dos dilutores (agua de coco y leche descremada) para la viabilidad espermática en semen fresco de bovinos*. Tesis para obtener el grado de Ingeniero Zootecnista. Facultad de Ingeniería Zootecnista, Agronegocios y Biotecnología. Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas. Chachapoyas, Perú. 40 pp.

- Turner, R. M. (2003). *Tales from the Tail: What Do We Really Know about Sperm Motility?*. Journal of Andrology. Vol. 24. Pp. 790 – 803.
- Uwland, J. (1984). *Correlation between the number of inseminated spermatozoa and results of fertilization in dairy cattle*. Verband tussen het aantal geïnsemineerde zaadcellen en de bevruchtingsresultaten bij melkvee. Vol. 109. Num. 10. 405 – 412.
- Vallecillo, A. F. (2011). *Caracterización reproductiva de toros de la raza marismeña como base a su conservación*. Tesis Doctoral. Departamento de Genética. Córdoba, España. 130 pp.
- Vishwanath, R. & Shannon, P. (2000). *Storage of bovine semen in liquid and frozen state*. Animal Reproduction Science. Vol. 62. Num. 2000. Pp. 23 – 53.

ANEXOS

Tabla 5

Porcentaje de motilidad y concentración espermática a diferentes tiempos de refrigeración.

Tiempo de refrigeración (horas)	Muestra	Motilidad (%)	Concentración (millones/ml)
T1 (3)	1	81,00	873,60
	2	76,00	1427,10
	3	67,30	654,10
	4	84,30	715,30
	5	98,40	428,60
T2 (6)	1	97,00	292,20
	2	78,80	1440,90
	3	86,10	1090,30
	4	64,10	1248,20
	5	95,80	1551,20
T3 (9)	1	57,30	701,50
	2	60,80	986,90
	3	94,20	1237,00
	4	89,70	909,30
	5	92,30	2199,50
T4 (12)	1	89,70	1373,30
	2	61,20	752,80
	3	79,30	827,60
	4	78,60	1555,90
	5	57,80	384,70

Tabla 6*Análisis de varianza de la motilidad espermática a diferentes tiempos de refrigeración.*

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F Valor	P Valor
Tratamiento	3	329,15	109,72	0,53	0,67
Error	16	3304,75	206,55		
Total	19	3633,91			

Tabla 7*Análisis de varianza de la concentración espermática de a diferentes tiempos de refrigeración.*

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F Valor	P Valor
Tratamiento	3	435067,73	145022,58	0,60	0,62
Error	16	3848620,91	240538,81		
Total	19	4283688,64			

Tabla 8*Viabilidad espermática a diferentes tiempos de refrigeración.*

Tiempo de refrigeración (horas)	Muestra	Campo	Viabilidad espermática (%)	
			Vivos	Muertos
T1 (3)	1	1	83,05	16,95
		2	75,00	25,00
		3	91,80	8,20
	2	1	66,67	33,33
		2	63,89	36,11
		3	53,85	46,15
T2 (6)	1	1	81,71	18,29
		2	84,42	15,58
		3	83,78	16,22
	2	1	28,57	71,43
		2	75,76	24,24
		3	36,36	63,64
T3 (9)	1	1	75,00	25,00
		2	80,00	20,00
		3	75,00	25,00
	2	1	75,00	25,00
		2	70,00	30,00
		3	71,43	28,57
T4 (12)	1	1	77,78	22,22
		2	79,59	20,41
		3	81,69	18,31
	2	1	76,32	23,68
		2	76,00	24,00
		3	71,19	28,81

Tabla 9

Análisis de varianza de la viabilidad espermática (porcentaje de espermatozoides vivos) a diferentes tiempos de refrigeración.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F Valor	P Valor
Tratamiento	3	475,54	158,51	0,73	0,55
Error	20	4343,15	217,16		
Total	23	4818,69			

Tabla 10

Análisis de varianza de la viabilidad espermática (porcentaje de espermatozoides muertos) a diferentes tiempos de refrigeración.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F Valor	P Valor
Tratamiento	3	475,54	158,51	0,73	0,55
Error	20	4343,15	217,16		
Total	23	4818,69			



Figura 5: Sistema CASA, utilizado para la evaluación de las diferentes características en estudio de esta investigación.

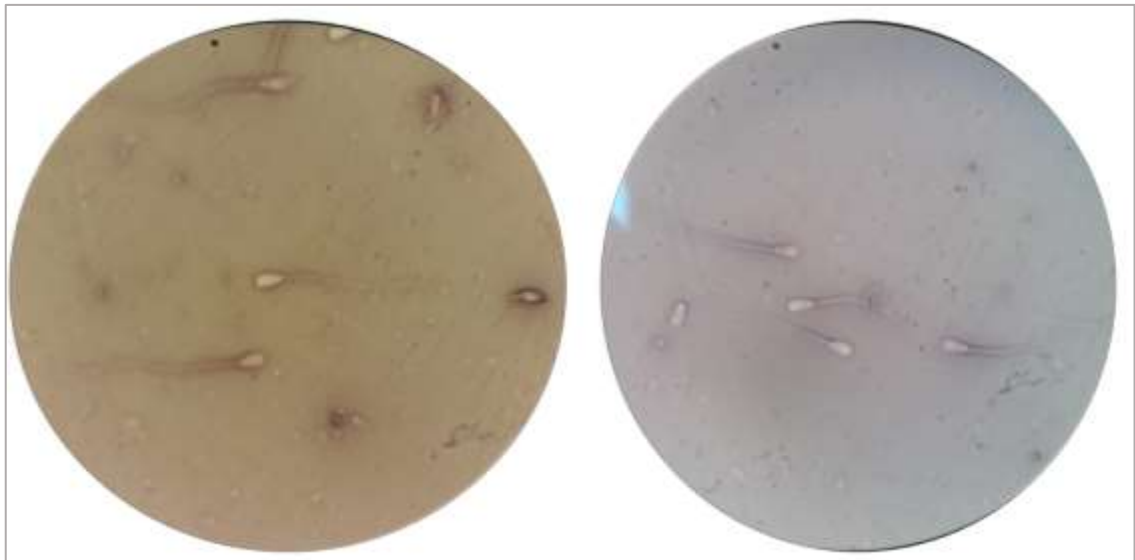


Figura 6: Viabilidad espermática observada en diferentes campos para contabilizar el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos.