

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano**  
**Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria**  
**Ingeniería Agronómica**



Proyecto Especial de Graduación  
**Evaluación de la calidad seminal pre y pos criopreservación y  
validación de la prueba de reducción del azul de metileno en toros  
Brahman y Jersey**

Estudiantes

Keytlin Giorlenis Quijano De Gracia

Karla Jisselle Ramírez Alvarenga

Asesores

John Jairo Hincapié, D.Sc.

Rogel Castillo, M.Sc.

Honduras, junio 2023

**Autoridades**

**SERGIO RODRIGUEZ ROYO**

Rector

**ANA M. MAIER ACOSTA**

Vicepresidenta y Decana Académica

**CELIA O. TREJO RAMOS**

Directora Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria

**HUGO ZAVALA MEMBREÑO**

Secretario General

## Contenido

Índice de Cuadros.....	5
Índice de Anexos.....	6
Resumen .....	7
Abstract.....	8
Introducción.....	9
Materiales y Métodos.....	12
Colecta del Semen.....	12
Volumen.....	13
Color.....	13
Olor .....	14
pH.....	14
Motilidad Masal (MM).....	14
Motilidad Individual (MI).....	15
Concentración.....	15
Dilución, Empaque y Congelación.....	16
Evaluación Poscongelado.....	17
Calidad Biológica.....	17
Prueba de Reducción del Azul de Metileno.....	18
Procedimiento.....	19
Tratamientos.....	19
Tratamiento 1 .....	20
Tratamiento 2 .....	20
Variables Analizadas .....	20
Diseño Experimental y Análisis Estadístico .....	20

Circunferencia Escrotal .....	22
Volumen.....	23
pH.....	23
Concentración Espermática .....	24
Motilidad Masal .....	24
Motilidad Individual .....	25
Motilidad Individual Poscongelado.....	25
Comparación de Motilidad Individual entre Semen Fresco y Poscongelado entre razas.....	27
Color.....	28
Tiempo de Reducción del Azul de Metileno 0.01% en Semen Fresco .....	28
Tiempo de Reducción del Azul de Metileno 0.01% en Semen Diluido en Fresco.....	29
Tiempo de Reducción del Azul de Metileno 0.01% en Semen Diluido Congelado-Descongelado .....	29
Correlaciones .....	30
Análisis de Regresión Lineal Simple .....	32
Conclusiones .....	34
Recomendaciones.....	35
Referencias.....	36

### Índice de Cuadros

Cuadro 1 Clasificación de los eyaculados bovinos de acuerdo con el aspecto, densidad, concentración y sus características. ....	14
Cuadro 2 Clasificación de los eyaculados bovinos de acuerdo con la motilidad masal.....	15
Cuadro 3 Clasificación de los eyaculados bovinos de acuerdo con la motilidad individual. ....	15
Cuadro 4 Clasificación de la calidad biológica del semen bovino de acuerdo con la motilidad individual poscongelado.....	18
Cuadro 5 Valores medios para la circunferencia escrotal (cm), volumen (mL) y pH seminal para las razas Brahman y Jersey.....	24
Cuadro 6 Valores medios para la Concentración Espermática ( $10^6$ /mL), Motilidad Masal (%) y Motilidad Individual (%) para las razas Brahman y Jersey .....	25
Cuadro 7 Valores medios de la Motilidad Individual Poscongelado (MIP %) y la Calidad Biológica (MIP % $\times$ concentración de espermatozoides por dosis) para las razas Brahman y Jersey. ....	27
Cuadro 8 Valores medios para la Motilidad Individual (%) en fresco y poscongelado para las razas Brahman y Jersey.....	28
Cuadro 9 Valores porcentuales del color del semen para las razas Brahman y Jersey. ....	28
Cuadro 10 Valores medios del tiempo de reducción del azul de metileno al 0.01% en semen fresco, semen diluido a $30 \times 10^6$ espermatozoides/mL y semen diluido congelado-descongelado para las razas Brahman y Jersey.....	30
Cuadro 11 Análisis de correlación de Pearson para parámetros micro y macroscópicos en toros Brahman y Jersey.....	32
Cuadro 12 Análisis de regresión lineal simple para la predicción entre el tiempo de reducción del azul de metileno 0.01% en semen fresco y concentración ( $10^6$ /mL).....	33

### Índice de Anexos

Anexo A Análisis de correlación de Pearson para Brahman .....	40
Anexo B Análisis de correlación de Pearson para Jersey .....	41
Anexo C Colecta de semen en campo.....	42
Anexo D Evaluación de parámetros macroscópicos .....	43
Anexo E Evaluación de parámetros microscópicos .....	44
Anexo F Preparación del diluyente .....	44
Anexo G Prueba de reducción del azul de metileno (0.01%).....	46
Anexo H Empaque y congelación de semen .....	47
Anexo I Gráfico de regresión lineal simple entre TRAM fresco y concentración .....	48

## Resumen

La evaluación de la aptitud reproductiva es un examen que permite identificar toros fértiles, subfértiles o infértiles, que puedan afectar la productividad. Los objetivos de esta investigación fueron determinar la calidad seminal pre y pos criopreservación, evaluando parámetros macro y microscópicos como circunferencia escrotal, volumen, pH, color, concentración, motilidad masal (MM) y motilidad individual (MI) en fresco y diluido; además, se utilizó la prueba de reducción de azul de metileno (TRAM), y se determinaron las correlaciones que existen entre todos estos parámetros. Se utilizaron 10 toros Brahman y 10 toros Jersey, en un Diseño Completamente al Azar (DCA) con dos tratamientos (dos razas) y 10 repeticiones por tratamiento. Se aplicó la prueba t-Student para muestras independientes, la correlación de Pearson y una regresión lineal simple entre el TRAM y la concentración. Se encontró diferencia ( $P \leq 0.05$ ) entre Brahman (T1) y Jersey (T2) en el volumen, con valores de 8.75 mL y 5.80 mL, respectivamente. No se encontró diferencias ( $P > 0.05$ ) entre T1 y T2, para circunferencia escrotal, pH, concentración espermática, MM y MI en fresco, con valores de 36.7 cm y 36.7 cm; 6.80 y 6.50;  $317 \times 10^6/\text{mL}$  y  $562.9 \times 10^6/\text{mL}$ ; 91% y 91.40%; 94.50% y 94.4%, respectivamente. No se encontraron diferencias ( $P > 0.05$ ) entre T1 y T2, para motilidad individual poscongelado (MIP), calidad biológica, TRAM en fresco, TRAM en semen diluido fresco, TRAM en semen diluido congelado-descongelado con valores de 64.5% y 71.5%;  $19.35 \times 10^6$  espermias viables/dosis y  $21.45 \times 10^6$  espermias viables/dosis; 8.2 minutos y 5.8 minutos; 14.3 minutos y 14.4 minutos; 33.9 minutos y 30.6 minutos, respectivamente. Para el color, la mayor proporción fue blanco cremoso. Se encontraron correlaciones positivas entre circunferencia escrotal y concentración ( $r = 0.47$ ), volumen y TRAM en semen fresco ( $r = 0.47$ ), MM y MI ( $r = 0.51$ ), concentración y MIP ( $r = 0.44$ ), MI y MIP ( $r = 0.47$ ); también correlaciones negativas entre concentración y TRAM ( $r = 0.57$ ), MI y TRAM ( $r = 0.55$ ). Con los resultados del análisis de regresión se obtuvo el siguiente predictor  $Y = (749.08) (-44.16) (X)$ .

*Palabras clave:* Aptitud reproductiva, calidad seminal, concentración, criopreservación.

### Abstract

The evaluation of reproductive aptitude is a test that allows to identify fertile, subfertile or infertile bulls, which can affect productivity. The objectives of this research were to determine the seminal quality pre and post cryopreservation, evaluating macro and microscopic parameters such as scrotal circumference, volume, pH, color, concentration, mass motility (MM) and individual motility (IM) in fresh and diluted form; in addition, the methylene blue reduction test (MBRT) was used, and the correlations that exist between all these parameters were determined. Ten Brahman and 10 Jersey bulls were used in a Completely Randomized Design (CRD) with two treatments (two breeds) and 10 replicates per treatment. The t-Student test for independent samples, Pearson's correlation and a simple linear regression between MBRT and concentration were applied. A difference ( $P \leq 0.05$ ) was found between Brahman (T1) and Jersey (T2) in volume, with values of 8.75 mL and 5.80 mL, respectively. No difference ( $P > 0.05$ ) was found between T1 and T2, for scrotal circumference, pH, sperm concentration, MM and IM in fresh, with values of 36.7 cm and 36.7 cm, 6.80 and 6.50,  $317 \times 10^6/\text{mL}$  and  $562.9 \times 10^6/\text{mL}$ , 91% and 91.40%, and 94.50% and 94.4 %, respectively. No differences ( $P > 0.05$ ) were found between T1 and T2, for individual post-freezing motility (IPM), biological quality, MBRT in fresh, MBRT in fresh diluted, MBRT in frozen-thawed diluted; with values 64.5% and 71.5%,  $19.35 \times 10^6$  sperms per dose and  $21.45 \times 10^6$  sperms per dose, 8.2 minutes and 5.8 minutes, 14.3 minutes and 14.4 minutes, and 33.9 minutes and 30.6 minutes, respectively. For color, the highest proportion was creamy white. Positive correlations were found between scrotal circumference and concentration ( $r = 0.47$ ), volume and MBRT in fresh semen ( $r = 0.47$ ), MM and IM ( $r = 0.51$ ), concentration and MIP ( $r = 0.44$ ), IM and MIP ( $r = 0.47$ ); also, negative correlations between concentration and MBRT ( $r = 0.57$ ), IM and MBRT ( $r = 0.55$ ). With the results of the regression analysis, the following predictor  $Y = (749.08) (-44.16) (X)$  was obtained.

*Keywords:* Concentration, cryopreservation, reproductive aptitude, semen quality.

## Introducción

Los bovinos son considerados la base de la ganadería en todas o la mayoría de las regiones del planeta, debido a la especificidad de sus sistemas digestivos que les permiten convertir la materia vegetal en proteínas de alto valor biológico para el ser humano (Cruz Zambrano 2006). Hoy en día, el reto de los ganaderos que se dedican a la crianza de bovinos ya sea de carne o de leche, es optimizar los procesos reproductivos para mejorar los rendimientos del hato.

Durante el proceso de crianza de ganado en casi todas las regiones, existen factores que frenan el incremento de la eficiencia reproductiva, normalmente se destacan los bajos índices de natalidad y los altos índices de mortalidad; estos altos índices de mortalidad se deben principalmente a la desnutrición, la fertilidad del hato también se encuentra ligada a una buena nutrición, un animal mal nutrido tiene como principal objetivo sobrevivir, no reproducirse. Por esta razón, se debe brindar una alimentación balanceada al toro, que supla todos sus requerimientos de mantenimiento, producción y reproducción, para que tenga un buen desempeño como reproductor debido a que, el toro representa hasta un 85% de la eficiencia y el buen desempeño reproductivo del hato, ya que contribuye con el 50% de la genética para la formación del nuevo ser (Cardozo et al. 2002).

Es por lo que en cada ganadería se debe integrar la producción con la reproducción, optando por hacer evaluaciones de los toros para lograr una reproducción eficiente. De acuerdo con Páez-Barón y Corredor-Camargo (2014) la evaluación de la aptitud reproductiva del toro es un examen que permite identificar animales subfértiles e infértiles que pueden llegar a afectar el éxito de un programa reproductivo en una explotación pecuaria, ya que, como lo demuestran algunos estudios, aproximadamente entre el 3% y el 30% de los toros utilizados no son del todo aptos para la reproducción, pues tienen una evaluación reproductiva no satisfactoria (infértil) o poco satisfactoria (subfértil). Obtener resultados de una evaluación de aptitud reproductiva, puede marcar una gran diferencia en la reproducción del hato, ya que se pueden descartar los sementales con baja fertilidad,

logrando una mayor cantidad de preñez en las hembras y así, alcanzar las metas tanto reproductivas como productivas, que permitan aumentar los ingresos.

Según Sequeira (2013) la reproducción del hato es la base para mantener una economía animal perfecta. La poca fertilidad conduce a grandes pérdidas en la producción, que en ocasiones puede cesar por completo. Para aumentar la competitividad y mantener una alta tasa de producción, se hace uso de algunas herramientas de manejo reproductivo como la inseminación artificial (IA).

Con el uso de la inseminación artificial en producciones intensivas de ganado lechero, se obtiene un mayor control reproductivo con el objetivo de evitar las pérdidas de tiempo en el ciclo reproductivo de la vaca, además, se tiene un mayor número de hembras por toro, lo que disminuye el costo que sería tener más sementales de buena genética. La IA es de gran utilidad en los manejos reproductivos hoy en día, una de las formas de medir el éxito de estos programas de inseminación depende de las tasas de concepción o la cantidad de hembras que resultan preñadas después del proceso, su nivel de éxito también depende del valor genético que los sementales transmiten a sus crías; si no se cumplen las dos condiciones anteriores no habría razón para seguir haciendo uso de la inseminación artificial (Shannon 1968).

La inseminación artificial va de la mano con la criopreservación, Ramos (1996) la define como una técnica mediante la cual el material biológico puede ser mantenido viable por tiempo indefinido. 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 (Cloud et al. 1990).

La criopreservación de semen implica varios pasos generales: dilución, crioprotección, refrigeración y congelación, almacenamiento y descongelación, que afecta la estructura y función de los espermatozoides (Hammerstedt et al. 1990).

Un gran número de protocolos de congelación han sido desarrollados, debido principalmente a las diferencias observadas entre especies, como respuesta a las tasas de congelación y

descongelación empleadas (Medina-Robles et al. 2007). Sin embargo, según Chaveiro et al. (2006) el proceso de congelación y descongelación del semen de toro afecta en promedio el 30% de los espermatozoides y reduce el porcentaje de espermatozoides móviles en aproximadamente un 50%. Esta es la principal razón por la que se debe trabajar en mejorar las técnicas de criopreservación de semen, para así garantizar una mejor calidad reproductiva.

Considerando los protocolos que se deben seguir al momento de congelación y descongelación de semen, en este trabajo se evaluará las diferencias que hay en la calidad seminal pre-criopreservación y pos-criopreservación, mediante la prueba bioquímica de reducción del azul de metileno, aplicado a los grupos raciales Brahman y Jersey.

En la actualidad se han desarrollado una serie de pruebas bioquímicas aplicadas para medir la actividad metabólica de los espermatozoides; estas pruebas deben ser complementarias al proceso rutinario del examen de la fertilidad de un eyaculado y del toro propiamente dicho. Dentro de estas pruebas se mencionan: la prueba de reducción del azul de metileno, reducción de la resazurina, evaluación de las dehidrogenasas endógenas activas en el sistema mitocondrial de los espermatozoides, medición de la fructólisis y de la respiración celular, pruebas de las catalasas entre otras (Holý 1987).

El objetivo general de esta investigación fue determinar la calidad seminal pre y pos criopreservación y validar la prueba de reducción del azul de metileno en toros Brahman y Jersey como predictor de la calidad seminal; y como objetivos específicos evaluar la calidad seminal pre y pos-criopreservación, mediante parámetros macroscópicos: volumen, pH, color, olor y microscópicos: concentración, motilidad masal e individual; y el tiempo de reducción del azul de metileno en semen fresco, diluido y poscongelado. Determinar las correlaciones tanto positivas como negativas que existen entre los parámetros evaluados. Desarrollar mediante una regresión lineal simple, un modelo matemático para predecir una variable dependiente, a través de una independiente.

## **Materiales y Métodos**

El estudio se desarrolló entre septiembre/2022 y marzo/2023 en las instalaciones del laboratorio de biotecnología de la reproducción animal de Zamorano, ubicado en el Valle del Río Yegüare a 32 km de Tegucigalpa, la capital de Honduras, con una precipitación promedio anual, altura sobre el nivel del mar y temperatura promedio anual de 1100 mm, 800 msnm y 26 °C, respectivamente.

### **Colecta del Semen**

Se utilizaron 10 toros Jersey y 10 toros Brahman con edades comprendidas entre los 18-30 meses, con una condición corporal para los Jersey entre 3-4 en la escala de 1 a 5 y para los Brahman entre 6.5-7.5 en la escala de 1 a 9.

Los toros fueron inmovilizados en una manga de manejo, se cortaron los pelos del prepucio (brocha) y se lavó con solución salina la parte interna del prepucio y las zonas circundantes, posteriormente se secó con papel toalla. Es importante verificar que en la zona de colecta no haya acumulación de lodo, polvo, o material de cama que pueda contaminar el semen al momento de la eyaculación.

Todos los toros fueron desparasitados, vitaminados y certificados libres de Brucelosis y Tuberculosis, así como con todas las vacunas vigentes contra enfermedades reproductivas de origen viral y bacteriano. Además, su estado de salud fue evaluado por el Médico Veterinario de la universidad.

Se utilizó el método del electroeyaculador, para el cual se utilizó un equipo ElectroJac 5 Ideal Instruments® con una escala de voltaje entre 10 y 24 voltios y 32 ciclos. El eyaculado fue colectado en colectores estériles protegidos de la luz directa del sol y depositados en un termo a 37 °C y enviados al laboratorio de reproducción animal de Zamorano.

Una vez en el laboratorio, el eyaculado fue depositado en un tubo de policarbonato de 15 mL a temperatura de 37 °C y se procedió a la evaluación de los parámetros macroscópicos: volumen, color, olor, pH; a continuación, se describe cada uno de ellos.

### **Volumen**

Está en relación directa con la edad, raza, estimulación sexual, intensidad de trabajo, nutrición, circunferencia escrotal, época del año. En general se considera normal un volumen entre 5-6 mL (extremos 2-12 mL); su medición se hace directamente con la graduación del tubo.

### **Color**

Se encuentra relacionado directamente con la concentración de espermatozoides. Un eyaculado de buena calidad debe ser blanco, lechoso, grisáceo lechoso o amarillo cremoso. Los eyaculados con menor concentración presentarán colores desde lechoso traslúcido hasta claro y transparente, los cual se presenta en animales con oligospermia (bajo volumen), oligozoospermia (bajo conteo de espermatozoides) o azoospermia (ausencia de espermatozoides) (Holý 1987). Otras coloraciones que se pueden presentar son verde-amarillento lo cual indica presencia de riboflavina, la cual se produce en las glándulas seminales y es inocuo, sin embargo, no se recomienda para la criopreservación. La presencia de sangre se aprecia en eyaculados de color rosado (color pardo es sangre vieja que ya se coaguló) y se atribuye a lesiones de la uretra peneana. En los casos de coloraciones azul-verdoso se corresponden a la contaminación con pus y se pueden apreciar grumos en las paredes del tubo al inclinarlo y dejar deslizar el semen por las paredes. Holý (1987) presenta la relación directa entre la coloración, la densidad y la concentración (Cuadro 1).

## Cuadro 1

*Clasificación de los eyaculados bovinos de acuerdo con el aspecto, densidad, concentración y sus características.*

Aspecto	Densidad	Concentración aprox./mL	Características del semen
Cre moso	3	> 1 millón	amarillento, blanco amarillento
Lechoso, opaco	2	500.000- 1 millón	blanco puro
Opalescente	1	200.000-500.000	blanco, blanco verdoso, blanco azulado
Acuoso	0	< 200.000	gris, gris verdoso, gris blanquecino, gris amarillento, gris azulado

*Nota.* Adaptado de Holý (1987)

## Olor

En general, cada especie presenta un olor característico, y en el caso del bovino no es la excepción. Este olor es mediado por el lípido espermina (Rosas 1997); si se presentara un olor diferente (orina, materia fecal, putrefacción) se recomienda descartarlo.

## pH

El rango para semen fresco oscila entre 6.2 y 6.8; sin embargo, al utilizar diluyentes los valores se incrementan a rangos de 6.8 - 7.2. De acuerdo con Holý (1987) se presenta una relación directa entre la acidez y la fertilidad (mayor acidez, mayor fertilidad). Para su medición se utilizará el papel tornasol.

Una vez realizadas las pruebas macroscópicas, se procedió a la evaluación microscópica, en la cual se analizaron los siguientes parámetros: motilidad en masa e individual, concentración, las cuales se describen a continuación:

### Motilidad Masal (MM)

La MM se relaciona directamente con la capacidad de movimiento de los espermatozoides. Para su evaluación se colocaron una gota del eyaculado fresco directamente en el portaobjetos el cual debe estar a 37 °C, y se observó en el microscopio de contraste de fase a 10X; se utilizaron para la clasificación la escala establecida por Madrid y Quintero (2005) (Cuadro 2).

## Cuadro 2

*Clasificación de los eyaculados bovinos de acuerdo con la motilidad masal.*

Valor	Clasificación	Descripción	Porcentaje
1	Pobre	No hay ondas. Movimiento espermático vibrátil	< 30
2	Aceptable	Ondas ligeras con movimiento apenas perceptibles	31-60
3	Bueno	Ondas aparentes. Remolinos con movimiento moderado	61-80
4	Muy bueno	Ondas oscuras con movimientos rápidos	81-100

*Nota:* Adaptado de Madrid y Quintero (2005)

## Motilidad Individual (MI)

La MI hace referencia al porcentaje de espermatozoides que presentan movimientos progresivos rectilíneos en una muestra de semen (Zemjanis 1987); se considera como único movimiento normal el rectilíneo progresivo; los movimientos oscilantes, circulares, retroactivos se consideran anormales. Para su evaluación se colocó en un portaobjetos una gota del eyaculado fresco a 37 °C, y se cubrió con una laminilla atemperada; se debe observar en el microscopio de contraste de fase a 20X. Se utilizó la clasificación cualitativa establecida por Zemjanis (1987) (Cuadro 3).

## Cuadro 3

*Clasificación de los eyaculados bovinos de acuerdo con la motilidad individual.*

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

*Nota.* Tomado de Zemjanis (1987)

## Concentración

Este parámetro relaciona la cantidad de espermatozoides que se encuentran en una unidad de volumen bien sea en milímetros o centímetros cúbicos; para calcular este parámetro se utilizará el equipo de espectrofotometría Spermacue (Minitüb®), en el cual se deposita una gota del eyaculado puro sin diluir, y posteriormente se obtiene la lectura del número espermatozoides  $\times 10^6$  /mL; en general en bovinos la concentración es muy variable, con rangos desde  $100 \times 10^6$  hasta  $3.2 \times 10^9$ /mL; se consideran muy buenos eyaculados aquellos que contienen de  $800 \times 10^6$  a  $1 \times 10^9$ /mL. Por otra parte,

los eyaculados con concentraciones inferiores a  $250 \times 10^6/\text{mL}$  no se recomienda utilizarlos para la criopreservación y uso en IA, ya que poseen baja fertilidad (Holý 1987).

### Dilución, Empaque y Congelación

Se utilizaron pajuelas de 0.5 mL con de  $30 \times 10^6$  espermatozoides de concentración para el cálculo del número de dosis se utilizó el siguiente procedimiento utilizando las fórmulas [1], [2] y [3]:

$$\text{Concentración espermatozoides vivos/mL} = \text{Concentración/mL} \times \% \text{ de MI} \quad [1]$$

Luego se aplica la fórmula [2]:

$$\text{Concentración total} = (\text{Concentración espermatozoides vivos/mL}) (\text{volumen total}) \quad [2]$$

Luego fórmula:

$$\text{Número de dosis} = (\text{concentración total}) / 30 \times 10^6 \quad [3]$$

Para el cálculo del diluyente se utilizó las fórmulas [4] y [5]:

$$\text{Volumen total} = \text{número de dosis} \times 0.5\text{mL} (\text{volumen de la pajuela}) \quad [4]$$

$$\text{Volumen de diluyente requerido} = \text{volumen total} - \text{volumen del eyaculado} \quad [5]$$

En general los diluyentes tienen como objetivo abastecer a los espermatozoides de nutrientes (energía), proteger contra el choque de frío (evitar la formación de hielo); además de lo anterior deben presentar una presión osmótica isotónica con el semen puro (300-380 mOsm/kg), pH entre 6.8 y 7.2, capacidad buffer, contener electrolitos (sulfatos, tartratos, fosfatos, citratos, acetatos); la mayoría de los diluyentes contienen yema de huevo o leche además de glicerol (protegen de los cambios de temperatura); además se les adicionan antibióticos (aprobados por la Certified Semen Services CSS) como: gentamicina, tylosina, lincomicina, espectinomicina.

Se utilizó el diluyente comercial de Continental One Step®, cuyo protocolo de preparación consiste en (por cada 100 mL de diluyente):

2.42% TRIS (compuesto orgánico (hidroximetil)aminometano, de fórmula  $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$ ; también conocido como Tris base, THAM, trometamina, trometanol o 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol)

1.38% ácido cítrico

1.00% fructosa

20% yema de huevo

7% glicerol

5.5 mg de tylosina

27.5 mg de gentamicina

16.5 mg de lincospectin

33 mg espectinomicina

Toda la mezcla se mantuvo 30-35 °C en baño maría, al igual que el eyaculado

Se realizó predilución 1:1, estabilizando por 10 minutos (durante este tiempo se evaluó el semen).

Se realizó la dilución total, empaque y sellado las pajuelas a temperatura ambiente (20-23 °C).

Se equilibró a 4 – 5 °C por cuatro horas.

Luego se realizó equilibrio en los vapores de nitrógeno líquido a 4 cm de altura (-120 °C) por 10 minutos.

Se empacó en las escalerillas y transfirió al tanque de nitrógeno líquido

### **Evaluación Poscongelado**

Los dos principales factores que están involucrados en la fertilidad del semen congelado son la calidad del semen y el número de espermatozoides de calidad, y esto está determinado por la viabilidad y morfología espermática, así la viabilidad está dada por: la motilidad progresiva individual (Rosas 1997).

### **Calidad Biológica**

Es muy importante tomar en cuenta que, pese a que todo el proceso de congelación se realizó bajo óptimas condiciones, siempre se presenta una pérdida de espermatozoides de alrededor la

tercera parte, así como una cantidad considerable en el momento de la descongelación (Suárez 2015).

Para la evaluación de la calidad biológica se utilizó la fórmula [6]:

$$\text{Espermas viables/dosis} = \text{concentración} \times \% \text{ motilidad progresiva individual poscongelado} \quad [6]$$

La interpretación de la motilidad progresiva individual en el poscongelado se da en porcentaje con incrementos de 5 puntos porcentuales; el rango oscila de 25-40% (Cuadro 4). Para esta evaluación se descongeló una dosis seminal a 37 °C/45 segundos, se colocaron una gota en un portaobjetos atemperado a 37 °C y cubierto con una laminilla atemperada; se observó primero a 20X y luego en 40X en el microscopio de contraste de fase.

#### **Cuadro 4**

*Clasificación de la calidad biológica del semen bovino de acuerdo con la motilidad individual poscongelado.*

Concentración	% Motilidad individual	Número de espermias viables	Resultado
30,000,000	20	6,000,000	No adecuada
	25	7,500,000	No adecuada
	30	9,000,000	No adecuada
	35	10,500,000	Aprobada
	40	12,000,000	Aprobada
	45	13,500,000	Aprobada
	50	15,000,000	Aprobada

*Nota.* Adaptado de Rosas (1997)

#### **Prueba de Reducción del Azul de Metileno**

Durante los procesos de la respiración celular de los espermatozoides y con ello a los sistemas enzimáticos principalmente las deshidrogenasas, se liberan átomos de hidrógeno, los cuales pueden reducir a sus aceptores, representados en este caso por el azul de metileno, a una leucobase incolora.

El tiempo que dura el proceso de decoloración se encuentra relacionado y depende de la intensidad del metabolismo de las células espermáticas y de la densidad del semen, así como también por algunos otros factores como temperatura, pH, estado osmótico, concentración del azul de metileno entre otros (Holý 1987).

Por lo anterior y tomando en cuenta que el metabolismo de las células espermáticas es más o menos constante, es posible, de acuerdo con el tiempo de decoloración, y en condiciones ambientales de laboratorio controladas, evaluar la actividad metabólica y con ello relacionarla con la fertilidad.

Según Holý (1987) la decoloración varía entre dos y 20 minutos, con un promedio de tres a 12 minutos, sin embargo, esto va a depender de la concentración espermática, la actividad metabólica de las células espermáticas y la concentración del azul de metileno. Se considera que existe una correlación negativa entre el tiempo de la decoloración y la fertilidad de los eyaculados normales. De acuerdo con este mismo autor, se sugiere que el semen utilizado en la inseminación artificial debe reducir el azul de metileno durante tres a 10 minutos.

### ***Procedimiento***

En un tubo Eppendorf atemperado se vertió 0.2 mL de semen congelado y 0.2 mL de azul de metileno, al 0.01%.

Se mezcló cuidadosamente, mediante la agitación con la pipeta.

El semen coloreado se aspiró inmediatamente en un tubo capilar y se tapó ambos extremos con plastilina.

El tubo capilar con la columna de semen se colocó en baño maría a 38 °C, y se anotó el tiempo de inicio y final dado por la decoloración.

Todas estas evaluaciones se realizaron para cada uno de los 20 toros colectados. Cada muestra fue expuesta al azul de metileno al 0.01%. Se utilizó para estas pruebas semen fresco, semen diluido y semen congelado/descongelado, estando estos dos últimos empacados a  $30 \times 10^6$  espermatozoides.

### **Tratamientos**

Se estudió el efecto de la raza (Brahman y Jersey) sobre la prueba del tiempo de reducción del azul de metileno al 0.01%. Para el semen diluido se utilizó la concentración de  $30 \times 10^6$  espermatozoides/0.5 mL.

**Tratamiento 1**

Toros Jersey. Tiempo de reducción del azul de metileno al 0.01% en semen fresco sin diluir, semen diluido y semen congelado/descongelado.

**Tratamiento 2**

Toros Brahman. Tiempo de reducción del azul de metileno al 0.01% en semen fresco sin diluir, semen diluido y semen congelado/descongelado.

**Variables Analizadas**

Se analizaron las siguientes variables.

Concentración, volumen, motilidad masal e individual y pH, para cada una de las razas.

Tiempo de reducción del azul de metileno 0.01% por razas en semen fresco.

Correlación entre el tiempo de reducción en la prueba de azul de metileno del semen bovino fresco y la concentración, la motilidad masal y motilidad individual en fresco.

Correlación entre la circunferencia escrotal y la concentración espermática.

Calidad biológica poscongelado .

Tiempo de reducción del azul de metileno 0.01% en semen diluido y congelado/descongelado por razas.

Correlación entre el tiempo de reducción en la prueba de azul de metileno 0.01% con semen diluido y congelado/descongelado con la motilidad masal, motilidad individual en fresco, motilidad individual poscongelado y calidad biológica poscongelado.

**Diseño Experimental y Análisis Estadístico**

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con dos tratamientos (dos razas) y 10 repeticiones por tratamiento. Para el análisis de los datos se aplicó la prueba t-Student para muestras independientes, los valores porcentuales fueron corregidos con la función arcoseno, y se aplicó la correlación de Pearson. Para la variable no paramétrica "color" se aplicó la prueba de distribución de frecuencias Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ). Se realizó un análisis de regresión lineal simple entre el tiempo de

reducción del azul de metileno en semen fresco y la concentración espermática. Todos los procedimientos estadísticos se realizaron utilizando el paquete "Statistical Analysis System" (SAS Versión 2014), el valor de significancia exigido fue de  $P \leq 0.05$ .

## Resultados y Discusión

### Circunferencia Escrotal

Las diferencias no fueron significativas entre las razas (Cuadro 5). Estos resultados superan lo sugerido por Viquez (2018) quien concluye que los toros Brahman a los 24 meses deben alcanzar una circunferencia escrotal promedio de 31.5 cm. Por otra parte, un estudio realizado por Ruíz et al. (2010) en toros *Bos taurus* y *Bos indicus* con edades promedio de 32.94 y 31.90 meses, respectivamente, describen un promedio en circunferencia escrotal de 36.86 cm en *Bos taurus* y 36.22 cm en *Bos indicus*, similar a los resultados obtenidos en este estudio.

Wenkoff (1997) expone que la medición de la circunferencia escrotal es una forma altamente repetible y exacta para predecir la producción potencial de espermatozoides en los toros. La circunferencia escrotal está altamente correlacionada con el peso del parénquima testicular ( $r = 0.95$ ) y está directamente relacionada con el número potencial de espermatozoides producidos. Fisiológicamente está demostrado que cada gramo de parénquima testicular (87% del peso bruto testicular) produce en promedio 15 millones de células espermáticas por día, por lo tanto, la producción total de espermatozoides de los testículos debería de ser de aproximadamente  $6000 \times 10^6$ /día. El crecimiento testicular es más rápido en los toros jóvenes. El máximo tamaño testicular es alcanzado a los cuatro a seis años. En toros de cinco a ocho años o más viejos, la circunferencia escrotal puede ser una medición menos exacta de la producción espermática, debido a que algunos de los túbulos seminíferos pueden volverse inactivos sin reducción de la circunferencia escrotal. Además, existe una correlación negativa entre las anomalías espermáticas y el tamaño testicular. La incidencia de anomalías espermáticas se incrementan conforme la circunferencia escrotal decrece.

La heredabilidad del tamaño testicular ha sido reportada entre moderada a muy alta (0.4 a 0.75); en ganado de carne, hay una alta correlación negativa entre la medición de la circunferencia escrotal y la edad a la cual las hijas alcanzan la pubertad ( $> -0.71$ ). Las hembras hijas de toros con un

tamaño testicular arriba del promedio alcanzan la pubertad a una edad más temprana (Wenkoff 1997).

### **Volumen**

Los resultados obtenidos presentan diferencias ( $P \leq 0.05$ ) entre ambas razas (Cuadro 5). Según Gómez y Miglorisi (2007) un toro al alcanzar los 24 meses de edad debe tener un volumen de eyaculado mayor de 4 mL, puede variar entre 2 y 12 mL, lo que indica que el rango de volumen encontrado en este estudio es muy bueno, esto también puede estar influido por el método de colecta utilizado, pues se espera que utilizando el método de electroeyaculación el volumen sea mayor comparado con el método de vagina artificial debido a la duración del estímulo eléctrico (Silva et al. 2012). De igual manera el volumen del eyaculado se puede ver influenciado por la edad, época, la frecuencia de servicios del toro y tamaño de los testículos, principalmente. Los toros jóvenes producen los eyaculados menos voluminosos, pero después de los dos años de edad, deben producir más de 4 mL de semen (Lamothe 1997).

### **pH**

No se observaron diferencias en este parámetro ( $P > 0.05$ ; Cuadro 5). Ruíz et al. (2010) realizaron un estudio en toros *Bos taurus* y *Bos indicus* en los que obtuvieron un promedio de 7.09, que difiere de los resultados de este estudio, estas diferencias se pueden atribuir a la concentración espermática, dietas, estado ácido básico del toro en el momento de la colecta principalmente. Sin embargo, Contreras y Lasso (2012), explican que un pH normal en semen bovino es cercano a la neutralidad en un rango de 6 a 7, estando los valores obtenidos en este estudio dentro del rango sugerido por estos autores. Por otra parte, Lamothe (1997) concluye que cuando hay una mayor concentración espermática, hay un pH más bajo (ácido), ya que a medida que hay más espermatozoides, estos metabolizan o utilizan los azúcares (fructosa) y los convierten en ácido láctico; es por esta razón que a mayor acidez hay mayor fertilidad. En cuanto al semen del toro, este autor sugiere que el pH es un poco ácido, oscila normalmente entre 6.5 y 6.9.

### Cuadro 5

Valores medios para la circunferencia escrotal (cm), volumen (mL) y pH seminal para las razas Brahman y Jersey.

Raza	Circunferencia escrotal (cm)	EE	Volumen (mL)	EE	pH	EE
Brahman	36.7	0.7000	8.75	1.1885	6.80	0.0816
Jersey	36.7	0.5972	5.80	0.5437	6.50	0.1491
Probabilidad	1.00		0.0424		0.0945	

### Concentración Espermática

Los resultados obtenidos no demostraron una diferencia ( $P > 0.05$ ) entre los grupos Brahman y Jersey (Cuadro 6). Un estudio realizado por Rehman et al. (2016), encontraron que los toros Jersey mostraron una concentración media de  $1560 \times 10^6/\text{mL}$ . Por otra parte, Christensen et al. (2005), encontraron que la concentración media para la raza Jersey es de  $1199 \times 10^6$  espermatozoides/mL. Para la raza Brahman, Vásquez et al. (2003), encontraron que el promedio de concentración espermática es de  $538.4 \times 10^6/\text{mL}$ . Estos resultados presentados por estos autores superan a los obtenidos en esta investigación; estas diferencias posiblemente se atribuyen al número de toros muestreados, la edad, frecuencia de servicios, la época del año, el tipo de colecta utilizado y la alimentación. Por su parte Lamothe (1997) concluye que la concentración espermática del bovino varía en amplios límites, oscilando entre menos de 200 y más de 1000 millones/mL.

### Motilidad Masal

Esta técnica se ha utilizado desde hace mucho tiempo como método rápido para determinar la concentración y viabilidad de los espermatozoides de un eyaculado. Cuanto más grande es la intensidad en la formación de los remolinos, mayor es la motilidad y el número de espermatozoides móviles. Los distintos eyaculados van desde la ausencia de ondas o cualquier tipo de motilidad hasta la presencia de ondas prominentes con movimientos muy rápidos. Las diferencias no fueron significativas entre grupos raciales (Cuadro 6). Ambos grupos raciales presentaron motilidades masales  $\geq$  a 90% clasificadas como muy buenas (Madrid y Quintero 2005). Cala et al. (2016),

obtuvieron que en condiciones tropicales la motilidad masal para Brahman es de  $2.3 \pm 1.3\%$  (en escala de 1-4: siendo 1=pobre; 2=aceptable; 3=bueno; 4= muy bueno).

### Motilidad Individual

Las diferencias no fueron significativas entre los dos grupos raciales evaluados (Cuadro 6). La raza Brahman presentó un porcentaje de motilidad individual de 94.50, mientras que la raza Jersey mostró 94.40, ambos porcentajes son considerados muy buenos según la escala descrita en el Cuadro 3 (Zemjanis 1987). Esto difiere del estudio realizado por Roa et al. (2014), quienes encontraron en su investigación una motilidad individual de  $58.1 \pm 3.5\%$  para la raza Brahman. Por otra parte, Lamothe (1997) concluye que las muestras seminales con gran motilidad individual indican altos porcentajes de espermatozoides vivos y está correlacionadas con altas tasas de fertilidad en los machos.

### Cuadro 6

*Valores medios para la Concentración Espermática (10<sup>6</sup>/mL), Motilidad Masal (%) y Motilidad Individual (%) para las razas Brahman y Jersey*

Raza	Concentración (10 <sup>6</sup> /mL)	EE	Motilidad Masal (%)	EE	Motilidad Individual (%)	EE
Brahman	317.0	1.3319	91.00	0.0219	94.50	0.0096
Jersey	562.9	2.2476	91.40	0.0328	94.40	0.0224
Probabilidad	0.0544		0.6979		0.8427	

### Motilidad Individual Poscongelado

No se encontraron diferencias entre razas ( $P > 0.05$ ; Cuadro 7). Los resultados de este estudio difieren de la investigación realizada por Dode et al. (2005) quienes encontraron un descenso en la motilidad individual poscongelado considerable, una de estas muestras presentó un declive del 60% indicando la sensibilidad individual que presentan los espermatozoides; al comparar estos resultados con los de nuestro estudio encontramos que se obtuvo motilidades poscongelado muy buenas, superiores al 60%, ya que la media de disminución de la MI para el Brahman fue de 30% y para el Jersey del 20%, estando estos valores influenciados posiblemente por el tipo de diluyente utilizado, la curva de enfriamiento y la concentración de espermatozoides/dosis. De acuerdo con Rosas (1997) pocas dosis

de semen bovino presentan más de un 50% de motilidad progresiva individual al poscongelado. Lo más común es encontrar motilidades progresivas individuales dentro del rango de 25 a 45%. El espermatozoide normal presenta un movimiento recto, progresivo (hacia adelante) y rápido, mientras rota sobre su eje longitudinal. Esta rotación es producida por un movimiento tridimensional (helicoidal) de la cola. A este tipo de motilidad es la que se le denomina progresiva individual (Amann 1988). Generalmente, los toros de razas lecheras, en nuestro caso Jersey, presentan mayor recuperación espermática al poscongelado que los toros de razas productoras de carne, como Brahman.

### **Calidad Biológica**

No se encontraron diferencias significativas entre razas (Cuadro 7). Quispe (2018) realizó un estudio con diferentes diluyentes, siendo el Continental® One Step el que presentó la mejor calidad biológica ( $18 \times 10^6/\text{mL}$ ); en este estudio se obtuvo mejores resultados para la raza Brahman y Jersey, siendo  $19.35 \times 10^6/\text{mL}$  y  $21.45 \times 10^6/\text{mL}$ , respectivamente.

Salisbury y VanDemark (1961) propusieron que la relación de la calidad del semen y la fertilidad dependía del número de espermias depositados en la hembra al momento de la inseminación. De acuerdo con esto, el máximo de fertilidad para una población dada de hembras bovinas es obtenida al incrementar a un cierto nivel (valor umbral), el número de espermias con una característica de calidad y al incrementar el número de espermias por encima del valor umbral ya no se logra mejorar la fertilidad. Para validar esta propuesta, Sullivan y Elliott (1968) usaron la motilidad progresiva como la característica de fertilidad del semen y compararon la fertilidad de varios toros utilizando dosis de semen congelado con diferentes cantidades de espermias móviles al descongelado. Las cantidades fueron de 5, 10 y 15 millones de espermias con motilidad progresiva al poscongelado. En este experimento, ellos demostraron un incremento de la fertilidad de los 5 a los 10 millones, la cual no cambió de los 10 a los 15 millones de espermias móviles por dosis al descongelado.

Por otra parte, Rosas (1997) explica que se requiere que las dosis contengan un mínimo de  $10 \times 10^6$ /mL de calidad biológica poscongelado (aproximadamente un 33% de los espermatozoides de la dosis debe seguir siendo viables) para ser usada en una población bovina, todos los datos de este estudio se encuentran dentro de ese rango (Cuadro 4). La cantidad de espermatozoides que es necesario envasar para obtener estos  $10 \times 10^6$  /mL dependerá de la calidad del eyaculado, de los medios de dilución y de las curvas de enfriamiento y congelación que se implementen al momento de realizar la criopreservación.

### Cuadro 7

*Valores medios de la Motilidad Individual Poscongelado (MIP %) y la Calidad Biológica (MIP % x concentración de espermatozoides por dosis) para las razas Brahman y Jersey.*

Raza	Motilidad Individual Poscongelado (%)	EE	Calidad biológica ( $10^6$ /mL)	EE
Brahman	64.50	3.7602	19.35	1.1280
Jersey	71.50	3.0777	21.45	0.9233
Probabilidad	0.1669		0.1669	

### Comparación de Motilidad Individual entre Semen Fresco y Poscongelado entre razas

Se observaron diferencias significativas en ambas razas, mostrando la Brahman una disminución del 30% y la Jersey 22.9% con una media de 26.45% de disminución, lo cual coincide con Chaveiro et al. (2006) quienes concluyen que el proceso de congelación y descongelación del semen de toro afecta en promedio el 30% de los espermatozoides y puede reducir el porcentaje de espermatozoides móviles hasta en aproximadamente un 50%, lo anterior en dependencia el diluyente utilizado, curvas de enfriamiento y de descongelación. Por otra parte, la motilidad individual en semen poscongelado (64.50%, 71.50%) supera lo sugerido por Catena y Cabodevila (1999) quienes indican que un semen de buena calidad que ha sido recientemente descongelado debe presentar un 40-50% de motilidad individual.

**Cuadro 8**

*Valores medios para la Motilidad Individual (%) en fresco y poscongelado para las razas Brahman y Jersey.*

	Motilidad individual (%)			
	Brahman	EE	Jersey	EE
Semen fresco	94.5	0.0096	94.4	0.0224
Semen poscongelado	64.5	0.0401	71.5	0.0335
Probabilidad	<0.0001		<0.0001	

**Color**

El color del semen depende de la concentración de espermatozoides. El semen de buena calidad tiene un color blanco lechoso, blanco amarillento o amarillo cremoso (Lamothe 1997). Tanto en toros Brahman como Jersey el color prevaleciente fue blanco cremoso con 40 y 50%, respectivamente. El color blanco lechoso tuvo presencia en el 10% de la población Brahman evaluada, y 40% de Jersey. El color opalescente, se encontró solo en la raza Brahman con 30%, mientras que para la raza Jersey el valor fue nulo. Por otra parte, el color amarillo también presentó valores bajos, con solo 20% en la raza Brahman, y 10% en la raza Jersey. Según el estudio de Aquino (2017), el 80% de los toros de razas cárnicas evaluados presentaron un color blanco cremoso en la evaluación seminal, lo que difiere de los resultados de este estudio.

**Cuadro 9**

*Valores porcentuales del color del semen para las razas Brahman y Jersey.*

Raza	Blanco cremoso (%)	Blanco lechoso (%)	Opalescente (%)	Amarillo (%)
Brahman	40	10	30	20
Jersey	50	40	0	10

**Tiempo de Reducción del Azul de Metileno 0.01% en Semen Fresco**

Durante la respiración de los espermatozoides se liberan átomos de hidrógeno, que pueden convertir sus aceptores -en este ejemplo, el azul de metileno- en una leucobase incolora. La intensidad del metabolismo de los espermatozoides, la densidad del semen, la temperatura, el pH, el estado

osmótico, el contenido de azul de metileno y otras variables influyen en el tiempo que tarda en completarse el proceso de decoloración (Holý 1987). No se encontraron diferencias ( $P > 0.05$ ; Cuadro 9) entre los tratamientos. Según Holý (1987), la decoloración en semen fresco varía entre 2 a 20 minutos, con un promedio de 3 a 12 minutos; lo que concuerda con los resultados obtenidos en esta investigación.

#### **Tiempo de Reducción del Azul de Metileno 0.01% en Semen Diluido en Fresco**

No se encontraron diferencias ( $P > 0.05$ ; Cuadro 9) entre los tratamientos. Un diluyente se considera aquella solución acuosa que permite aumentar el volumen del eyaculado preservando las características funcionales de los espermatozoides lo que mantiene un nivel de fertilidad adecuado (León 2006). Sin embargo, al diluirse el eyaculado, la concentración del semen disminuye, reduciendo así la actividad metabólica en la muestra, lo que aumenta medianamente el tiempo de reducción de azul de metileno al 0.01%. El estudio realizado por Atul-Arif et al. (2020), demostraron que diluyentes One-Step, como el utilizado en nuestra investigación (Continental One Step®), conservan una mayor integridad de la membrana y viabilidad espermática que las muestras diluidas con Three-Step.

#### **Tiempo de Reducción del Azul de Metileno 0.01% en Semen Diluido Congelado-Descongelado**

No se encontraron diferencias ( $P > 0.05$ ; Cuadro 9) entre los tratamientos; sin embargo, si se presentó un aumento en el tiempo de reducción del azul de metileno al 0.01%, esto es atribuido en gran parte a la alteración de la función y de la estructura de la membrana del espermatozoide después de la criopreservación (Parks y Graham 1992).

La membrana espermática (ME) abarca cinco componentes diferentes: acrosoma, segmento ecuatorial, región post-acrosomal, pieza intermedia y cola, además de lo anterior participa: en el reconocimiento y transporte de moléculas, activa los sistemas moleculares para el reconocimiento del oocito. La integridad de la ME es vital para el metabolismo espermático, así como para los eventos

involucrados en la fecundación: la capacitación, la reacción acrosómica y la fusión con el oocito (Rubio-Guillen et al. 2009).

Los periodos críticos para la sobrevivencia espermática durante la criopreservación son la fase inicial del congelamiento y el periodo de retorno a condiciones fisiológicas. Por lo tanto, las bajas temperaturas (asociadas al aumento de la rigidez de la membrana) y la rapidez (décimas de segundo) con la que suceden los cambios osmóticos en los procesos de congelación y descongelación hacen muy difícil el movimiento de moléculas a través de la membrana mediante procesos de transporte activo (dependientes de ATP), la disminución de temperatura desde 25 °C a 10 °C reduce en un 60% la actividad de las bombas dependientes de ATP en consecuencia, los procesos de difusión y ósmosis son los que predominan en los momentos de estrés osmótico. Así entonces, la lesión celular crio-inducida se explica en función de la formación de hielo intracelular y el estrés osmótico al que se ven sometidas las membranas celulares durante la congelación, y es en este momento en que los crioprotectores actuarían reduciendo la cantidad de hielo formado a una temperatura determinada (Ávila-Portillo et al. 2006).

#### **Cuadro 10**

*Valores medios del tiempo de reducción del azul de metileno al 0.01% en semen fresco, semen diluido a  $30 \times 10^6$  espermias/mL y semen diluido congelado-descongelado para las razas Brahman y Jersey.*

Raza	Tiempo (minutos) de reducción del azul de metileno al 0.01%					
	Semen fresco	EE	Semen diluido fresco	EE	Semen diluido congelado-descongelado	EE
Brahman	8.20	1.3646	14.30	2.0388	33.9	3.8077
Jersey	5.80	0.8406	14.40	1.2037	30.6	1.6344
Probabilidad	0.1516		0.9668		0.4410	

#### **Correlaciones**

Se encontró una correlación positiva moderada ( $r = 0.4749$ ) entre la circunferencia escrotal y concentración (Cuadro 10), lo que significa que a medida que aumenta la circunferencia escrotal,

aumenta la concentración. Esto concuerda con los hallazgos de Pérez et al. (2014), quienes encontraron una correlación alta y positiva ( $P < 0.0001$ ), entre las variables concentración espermática y circunferencia escrotal ( $r = 0.94$ ).

Se observó también una correlación negativa ( $r = -0.5797$ ; Cuadro 10) entre concentración y tiempo de reducción de azul de metileno al 0.01% en semen fresco, de manera que al aumentar la concentración disminuye el tiempo de reducción de azul de metileno. De igual manera, se encontró una correlación positiva entre concentración y motilidad individual poscongelado ( $r = 0.4453$ ; Cuadro 10), por lo tanto, a medida que aumenta la concentración aumenta la motilidad individual poscongelado.

Se encontró una correlación positiva entre el volumen del eyaculado y el tiempo de reducción de azul de metileno 0.01% en semen fresco ( $r = 0.4769$ ; Cuadro 10), esto difiere de los resultados de Carvajal (2006) donde no se encontró correlación positiva entre el volumen y tiempo de reducción de azul de metileno ( $P = 0.496$ ).

Para los parámetros motilidad individual y tiempo de reducción de azul de metileno 0.01% en semen fresco, se encontró una correlación negativa ( $r = -0.5552$ ), es decir, a medida que aumenta la motilidad individual en fresco disminuye el tiempo de reducción de azul de metileno al 0.01%. Esto concuerda con los resultados de Carvajal (2006) quien encontró una correlación negativa ( $<0.0001$ ) entre motilidad individual y tiempo de reducción de azul de metileno (TRAM). Por otra parte, se encontró correlación positiva entre motilidad masal y motilidad individual en fresco ( $r = 0.5172$ ; Cuadro 10), de manera que a medida que aumenta la motilidad masal aumenta la motilidad individual en fresco. Esto concuerda con el trabajo de López y Mellado (2001), donde la correlación más alta que se encontró fue entre motilidad masal y motilidad individual en fresco y el desplazamiento de los espermatozoides. También se encontró una correlación positiva entre los parámetros motilidad individual y motilidad individual poscongelado ( $r = 0.4738$ ; Cuadro 10), a mayor sea la motilidad individual en fresco mayor será la motilidad individual poscongelado.

Hasta el momento, no se ha comprobado que una característica seminal por sí sola pueda predecir la capacidad fertilizante de un toro (Zhang et al. 1997), es por esta razón que se estudia la correlación que existe entre las características seminales.

### Cuadro 11

*Análisis de correlación de Pearson para parámetros micro y macroscópicos en toros Brahman y Jersey.*

	Circunferencia escrotal	Tiempo de reducción del azul metileno 0.01% en semen fresco	Motilidad Masal	Motilidad individual poscongelado
Concentración	0.4749 0.0344	-0.5797 0.0074		0.4453 0.0491
Volumen		0.4769 0.0335		
Motilidad Individual		-0.5552 0.011	0.5172 0.0195	0.4738 0.0348

*Nota.* Fila superior corresponde al coeficiente de correlación de Pearson; Fila inferior corresponde al valor de la probabilidad ( $P \leq 0.05$ ).

### Análisis de Regresión Lineal Simple

Tomando en cuenta el análisis de correlación anterior, y considerando los datos de concentración y tiempo de reducción de azul de metileno al 0.01%, se realizó un análisis de regresión lineal simple con el fin de obtener una guía que permita predecir el comportamiento de una variable dependiente utilizando los datos de una variable independiente, como se muestra en el Cuadro 11. Por ejemplo, si se tiene una muestra que tardó 5.5 minutos en reducir el azul de metileno, se puede predecir que tendría aproximadamente entre  $523.85 - 484.11 \times 10^6/\text{mL}$  de concentración según esta guía. El modelo de predicción para la concentración  $Y = (\beta_0) + (\beta_1) (X)$ , a partir de un valor dado de tiempo de reducción de azul de metileno al 0.01% ( $X$ ) es:  $Y = (749.08) + (-44.16) (X)$ . De acuerdo con Holý (1987) el semen de mejor calidad para utilizar en la inseminación artificial o en monta natural debe reducir el azul de metileno al 0.01% en 10 minutos o menos, lo que coincide con concentraciones  $\geq 307 \times 10^6$  espermatozoides/mL (Cuadro 12).

**Cuadro 12**

*Análisis de regresión lineal simple para la predicción entre el tiempo de reducción del azul de metileno*

*0.01% en semen fresco y concentración (10<sup>6</sup>/mL).*

Tiempo de reducción del azul de metileno 0.01% en semen fresco (minutos)	Concentración ( $\times 10^6$ /mL)
$\leq 1$	$\geq 704.91$
1.1-2	700.94-660.75
2.1-3	656.78-616.59
3.1-4	612.17-572.43
4.1-5	568.01-528.27
5.1-6	523.85-484.11
6.1-7	479.69-439.94
7.1-8	435.53-395.78
8.1-9	391.37-351.62
9.1-10	347.21-307.46
10.1-11	303.04-263.30
11.1-12	258.88-219.14
12.1-13	214.72-174.98
13.1-14	170.56-130.81
14.1-15	126.40-86.65
15.1-16	92.24-42.49
$> 16.1$	$\leq 38.07$

### Conclusiones

Bajo las condiciones de este estudio, los parámetros: pH, concentración, motilidad individual y masal en fresco, motilidad individual poscongelado y calidad biológica, tiempo de reducción del azul de metileno al 0.01% (TRAM) en el semen fresco, diluido y congelado-descongelado para las razas Brahman y Jersey fueron similares, sin embargo, la raza Brahman presentó el mayor volumen de eyaculado.

Se encontraron correlaciones positivas entre circunferencia escrotal y concentración, volumen y tiempo de reducción del azul de metileno al 0.01% en semen fresco, motilidad masal y motilidad individual, concentración y motilidad individual poscongelado, motilidad individual y motilidad individual poscongelado; también correlaciones negativas entre concentración y tiempo de reducción del azul de metileno al 0.01% en semen fresco, motilidad individual y tiempo de reducción del azul de metileno al 0.01% en semen fresco.

Con los resultados del análisis de regresión lineal simple se obtuvo un predictor matemático, con el que se elaboró una tabla guía que permite estimar el valor de concentración espermática mediante el tiempo de reducción del azul de metileno al 0.01%.

### **Recomendaciones**

Repetir el mismo estudio en diferentes épocas (verano-invierno) del año, con toros de edades superiores y comparar los resultados.

Realizar la colección mediante el método de vagina artificial para comparar los resultados obtenidos mediante la electroeyaculación, para el tiempo de reducción de azul de metileno al 0.01% en fresco, diluido y poscongelado.

## Referencias

- Amann R. 1988. Relationships between computerized evaluations of spermatozoal motion and competitive fertility index: Proceedings of the Twelfth Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction. [sin lugar]: [sin editorial].
- Aquino M. 2017. Características seminales en toros de razas cárnicas y doble propósito [Tesis de grado]. Lima, Perú: Universidad Nacional Agraria La Molina; [consultado el 3 de mar. de 2023]. <https://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12996/3431/aquino-davalos-marco-antonio.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- Atul-Arif A, Maulana T, Mulyaawati E, Purwantara B, Iis-Arifiamtimi R, Memili E. 2020. Comparative analysis of various step-dilution techniques on the quality of frozen Limousin bull semen. *Veterinary World*; [consultado el 26 de mar. de 2023]. 13(11):2422–2428. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.2422-2428>.
- Ávila-Portillo L, Madero J, López C, León M, Acosta L, Gómez C, Delgado L, Gómez C, Lozano J, Reguero, et al. 2006. Fundamentos de criopreservación. *Rev Colomb Obstet Ginecol*. 57(4):291–300. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-74342006000400008](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-74342006000400008).
- Cala D, Palacio A, Rojas H, Yunis J. 2016. Evaluación andrológica en toros de 18 a 24 meses en Arauca, Colombia. *Avances de investigación en medicina veterinaria y producción animal*; [consultado el 3 de mar. de 2023]. 121–124.
- Cardozo J, Velázquez J, Rodríguez G, Prieto E, Tarazona G, Espitia A. 2002. Evaluación reproductiva del macho bovino en condiciones tropicales. Álvaro Morales Aguilar. Colombia: Corpoica. 60 p; [consultado el 23 de ene. de 2023]. <https://repository.agrosavia.co/handle/20.500.12324/16507>.
- Carvajal CG. 2006. Relación entre la prueba de reducción del azul de metileno con la actividad metabólica y los parámetros macro y microscópicos del semen fresco de bovino [Tesis de grado]. Honduras: Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano; [consultado el 16 de mar. de 2023]. <https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/34b59786-3fc9-4dfb-a64e-f43491ca2244/content>.
- Catena M, Cabodevila J. 1999. Evaluación del semen bovino congelado. *Taurus*. 1(3):18–31.
- Chaveiro A, Machado L, Frijters A, Engel B, Woelders H. 2006. Improvement of parameters of freezing medium and freezing protocol for bull sperm using two osmotic supports. *Theriogenology*. 65(9):1875–1890. eng. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.10.017.
- Christensen P, Boelling D, Myrup K, Riis I, Jensen J. 2005. Relationship Between Sperm Viability as Determined by Flow Cytometry and Nonreturn Rate of Dairy Bulls. *Journal of Andrology*; [consultado el 3 de feb. de 2023]. 26(1):1–152. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/j.1939-4640.2005.tb02878.x>.
- Cloud JG, Miller WH, Levanduski MJ. 1990. Cryopreservation of Sperm as a Means to Store Salmonid Germ Plasm and to Transfer Genes from Wild Fish to Hatchery Populations. *The Progressive Fish-Culturist*. 52(1):51–53. doi:10.1577/1548-8640(1990)052%3C0051:COAAM%3E2.3.CO;2.
- Contreras M, Lasso M. 2012. Calidad del Semen en Toros Mestizos (*Bos taurus* y *Bos Indicus*) de Panamá. *Revista Científica Universitaria*. 1(1):1–10.

- Cruz Zambrano A. 2006. Principales factores que afectan la prolificidad del ganado vacuno en latinoamerica. REDVET; [consultado el 31 de ene. de 2023]. 7(10). [https://www.researchgate.net/publication/26445064\\_Principales\\_factores\\_que\\_afectan\\_la\\_prolificidad\\_del\\_ganado\\_vacuno\\_en\\_latinoamerica](https://www.researchgate.net/publication/26445064_Principales_factores_que_afectan_la_prolificidad_del_ganado_vacuno_en_latinoamerica).
- Dode M, Silva T, Melo N, Martins C. 2005. Evaluación andrológica de reproductores bovinos de razas naturalizadas brasileñas. *Veterinaria (Montevideo)*. 40(159-160):53–60.
- Gómez V, Miglorisi L. 2007. Protocolo para la evaluación de semen en rumiantes. Argentina: UNLP. 9 p; [consultado 2010].
- Hammerstedt R, Graham J, Nolan J. 1990. Cryopreservation of Mammalian Sperm: What We Ask Them to Survive. *Journal of Andrology*. 11(1):73–88. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/j.1939-4640.1990.tb01583.x>.
- Holý L. 1987. Biología de la reproducción bovina, Introducción al proceso del examen de la fertilidad de la hembra y el macho. 2ª ed. Cuba: Editorial Científico-Técnica, La Habana Cuba.
- Lamothe C. 1997. Memorias del VI curso de actualización en reproducción animal: Características del eyaculado. Villahermosa, Tabasco: Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. 12 p.
- León C. 2006. Elaboración de diluyente de semen porcino [Tesis agroindustrial]. Quito. 122 p.
- López G, Mellado M. 2001. Estimación de la concentración y motilidad de espermatozoides de toros y machos cabríos utilizando un patrón de fotografías de eyaculados y pruebas de nado ascendente. *Agrociencia*; [consultado el 16 de mar. de 2023]. 35(4):407–412. <https://www.redalyc.org/pdf/302/30235404.pdf>.
- Madrid N, Quintero A. 2005. Curso Teórico Práctico: Un día para el toro. Evaluación de sementales. Maracaibo, Estado Zulia. [Investigación]. Venezuela: Universidad de Zulia.
- Medina-Robles VM, Sanchez-Carvajal E, Velasco-Santamaria YM, Cruz-Casallas PE. 2007. Crioconservación de semen bovino usando un congelador programable (CL-8800) y determinación de su calidad postdescongelación por medio un sistema de análisis espermático asistido por computador (CASA). *Oniroquia*. 11(1):75–86. <https://www.redalyc.org/pdf/896/89611108.pdf>.
- Páez-Barón EM, Corredor-Camargo ES. 2014. Evaluación de la aptitud reproductiva del toro. *Ciencia y Agricultura*; [consultado el 31 de ene. de 2023]. 11(2):49–59. <https://www.redalyc.org/pdf/5600/560058659007.pdf>.
- Parks JE, Graham JK. 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*. 38(2):209–222. eng. doi:10.1016/0093-691X(92)90231-F.
- Pérez J, Chacón L, Otero R, Cardona J, Andrade F. 2014. Relación entre la circunferencia escrotal, el crecimiento testicular y parámetros de calidad de semen en toros de raza Guzarat, desde la pubertad hasta los 36 meses de edad. *Red Med Vet*; [consultado el 14 de mar. de 2023]. (27):73–87. <http://www.scielo.org.co/pdf/rmv/n27/n27a07.pdf>.
- Quispe G. 2018. Evaluación comparativa de la calidad seminal y funcional de semen crio preservado comercial de origen nacional en bovinos lecheros de tres centros de colección seminal [Tesis]. Perú: Universidad Católica de Santa María. 115 p.
- Ramos S. 1996. Anotaciones sobre inseminación artificial. Bogotá: Universidad de la Salle.

- Rehman H, Alhidary I, Khan R, Qureshi MS, Sadique U, Khan H, Yaqoob SH. 2016. Relationship of Age, Breed and Libido with Semen Traits of Cattle Bulls. *Pakistan J. Zool*; [consultado el 3 de feb. de 2023]. 48(6):1793–1798. [http://www.zsp.com.pk/pdf48/1793-1798%20\(26\)%20QPJZ-0251-2015-F%2013-8-16%20Revised.pdf](http://www.zsp.com.pk/pdf48/1793-1798%20(26)%20QPJZ-0251-2015-F%2013-8-16%20Revised.pdf).
- Roa N, D'Enjoy DE, Linares T, Martínez N, Marín C. 2014. Características seminales de toros Brahman y mestizos (*Bos indicus* x *Bos taurus*) ubicados en el Llano Central Venezolano. *Mundo Pecuario*; [consultado el 3 de mar. de 2023]. 10(1):1–8. <http://www.revencyt.ula.ve/storage/repo/ArchivoDocumento/mundopec/v10n1/art02.pdf>.
- Rosas J. 1997a. Determinación de la calidad biológica del semen congelado en Universidad Juárez Autónoma de Tabasco e Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias. [Investigación]. México: Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias.
- Rosas J. 1997b. Memorias del VI curso de actualización en reproducción animal: Determinación de la calidad biológica del semen congelado. Tabasco, México: Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. 69 p.
- Rubio-Guillen J, Quintero-Moreno A, González D. 2009. Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides de toros. *Rev. Cient. Maracaibo*. 19(4):382–389. [https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0798-22592009000400010](https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592009000400010).
- Ruíz B, Ruiz H, Mendoza P, Oliva M, Gutiérrez F, Rojas R, Herrera J, Ruíz D, Aguilar G, León H, et al. 2010. Caracterización reproductiva de toros *Bos taurus* y *Bos indicus* y sus cruizas en un sistema de monta natural y sin reposo sexual en el trópico Mexicano. *Revista Científica UDO Agrícola*; [consultado el 3 de feb. de 2023]. 10(1):94–102.
- Salisbury GW, VanDemark NL. 1961. *Physiology of reproduction and Artificial Insemination of Cattle*. San Francisco and London: Freeman and Co.
- Sequeira LT. 2013. Manual compendio sobre reproducción animal. Nicaragua: [sin editorial]. 108 p.
- Shannon P. 1968. Advances in semen dilution. *New Zealand Society of Animal Production*; [consultado el 24 de ene. de 2023]. 28:23–31. <https://www.sciquest.org.nz/browse/publications/article/168985>.
- Silva, Pedrosa VB, Silva JB, Herrera LG, Eler JP, Albuquerque LG. 2012. Parámetros genéticos de las características andrológicas en la especie bovina. *Arch. med. vet.* 44(1):1–11. doi:10.4067/S0301-732X2012000100002.
- Suárez CP. 2015. Fertilidad de semen congelado de toros nacionales holstein usando los dilutores leche-yema, tris-yema y triladyl [Tesis de Posgrado]. Perú: Universidad Nacional Agraria La Molina. spa. <https://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/20.500.12996/1828>.
- Sullivan J, Elliott F. 1968. Bull fertility as affected by an interaction between motile spermatozoa concentration and fertility level in artificial insemination. *VI Int Congr Anim Reprod Artif Insemination*. 2:1307–1310. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301160534>.

- Vásquez L, Vera O, Arango J. 2003. Testicular growth and semen quality in peripuberal Brahman bulls. *Livestock Research for Rural Development*; [consultado el 3 de feb. de 2023]. 15(10). <http://www.lrrd.cipav.org.co/lrrd15/10/vasq1510.htm>.
- Viquez C. 2018. Factores ambientales, genéticos y de manejo que afectan la circunferencia escrotal y el peso corporal de toretes cebú en costa rica [Tesis de posgrado]. Costa Rica: Universidad Nacional; [consultado el 3 de feb. de 2023]. <https://repositorio.una.ac.cr/bitstream/handle/11056/20680/5CarolinaV%C3%ADquez.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- Wenkoff M. 1997. Memorias del VI curso de actualización en reproducción animal: Evaluación de la capacidad reproductiva de los toros. Villahermosa, Tabasco: Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. 69 p.
- Zemjanis R. 1987. *Reproducción Animal. Diagnósticos y técnicas terapéuticas*. México.
- Zhang BR, Larsson B, Lundeheim N, Rodriguez-Martinez H. 1997. Relationship between embryo development in vitro and 56-day nonreturn rates of cows inseminated with frozen-thawed semen from dairy bulls. *Theriogenology*. 48(2):221–231. eng. doi:10.1016/s0093-691x(97)84069-1.

## Anexos

### Anexo A

#### *Análisis de correlación de Pearson para Brahman*

	pH	Tiempo de reducción del azul metileno 0.01% en semen fresco
Concentración	-0.71256 0.0207	
Motilidad Individual		-0.71651 0.0197

Fila superior corresponde al coeficiente de correlación de Pearson

Fila inferior corresponde al valor de la probabilidad ( $P \leq 0.05$ )

## Anexo B

### *Análisis de correlación de Pearson para Jersey*

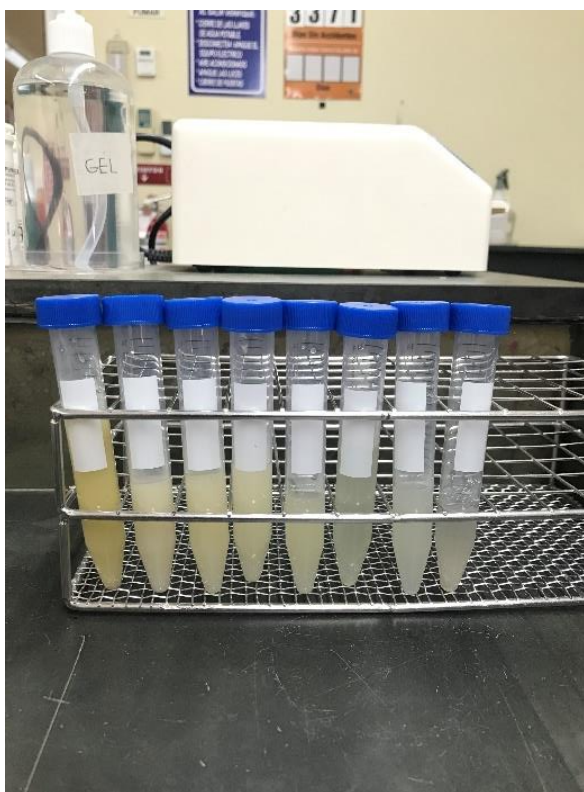
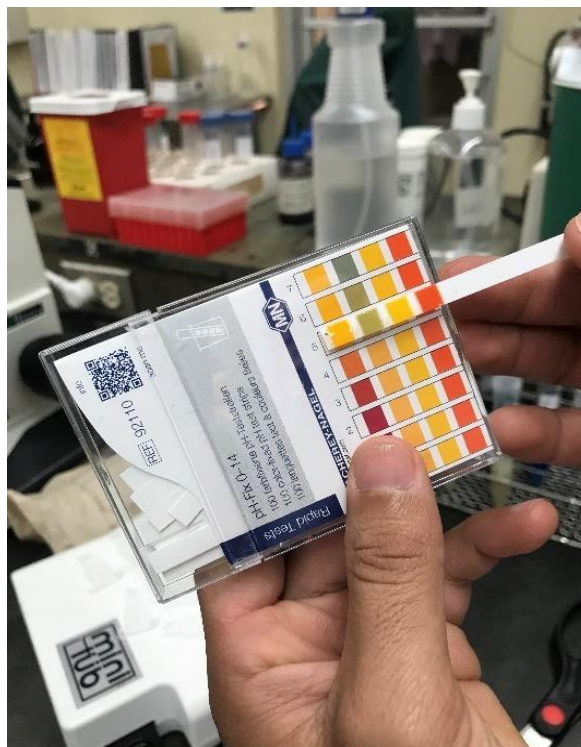
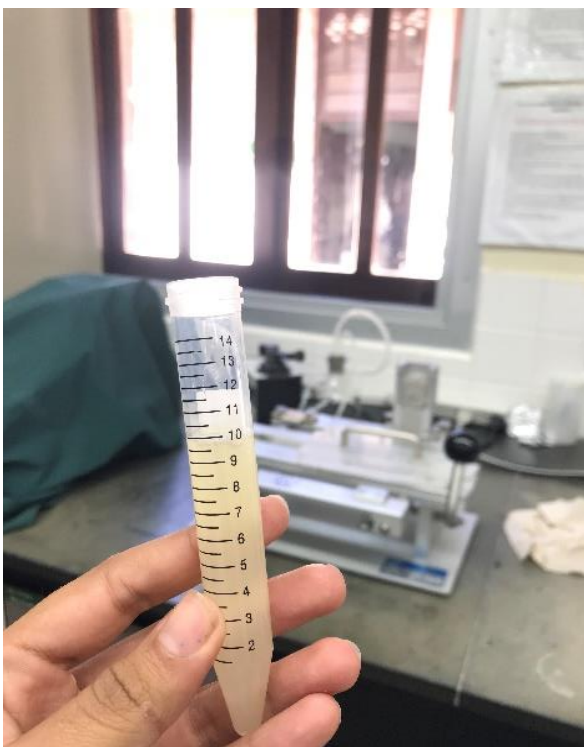
	Concentración	Tiempo de reducción del azul metileno 0.01% en semen fresco	Motilidad individual poscongelado	Calidad biológica	Motilidad masal
Circunferencia escrotal	0.8648 0.0012	-0.6329 0.0495	0.9037 0.0003	0.9037 0.003	
Concentración		-0.7121 0.0209	0.6288 0.0515		
Motilidad individual		-0.7238 0.0179	0.6428 0.045	0.6428 0.045	0.8048 0.005
Motilidad masal		-0.8313 0.0029			

Fila superior corresponde al coeficiente de correlación de Pearson

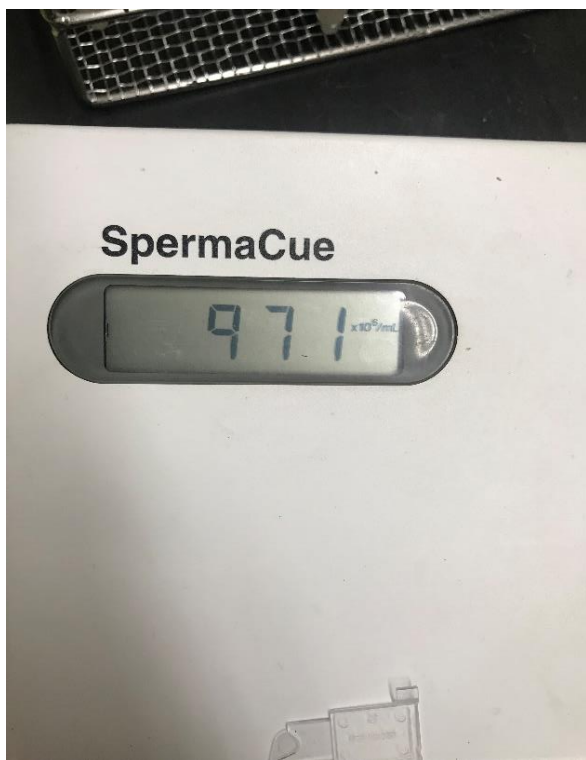
Fila inferior corresponde al valor de la probabilidad ( $P \leq 0.05$ )

**Anexo C***Colecta de semen en campo*

## Anexo D

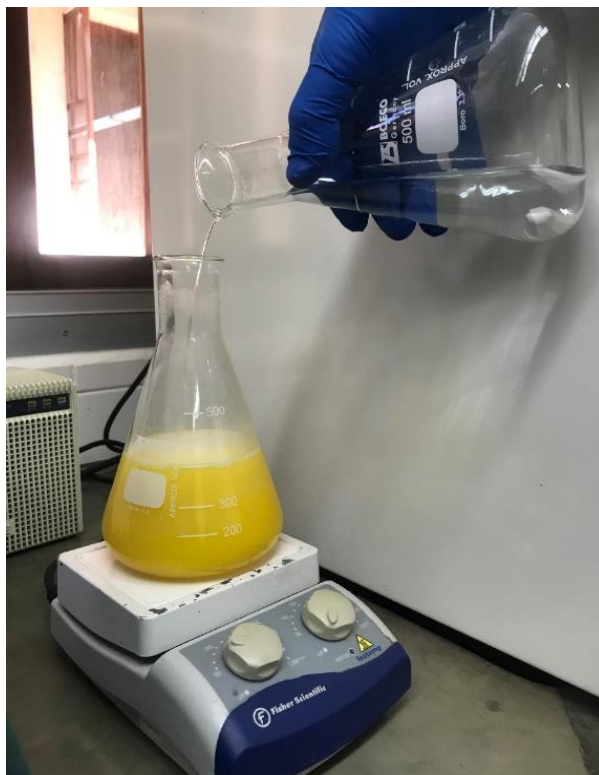
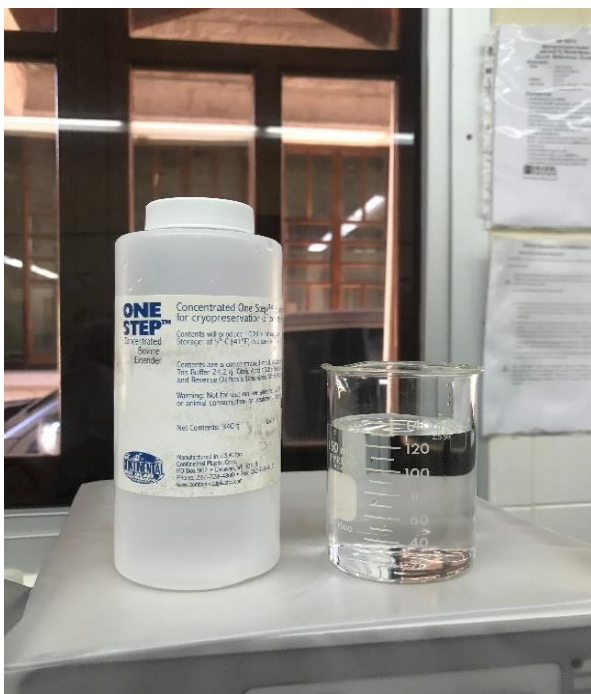
*Evaluación de parámetros macroscópicos*

## Anexo E

*Evaluación de parámetros microscópicos*

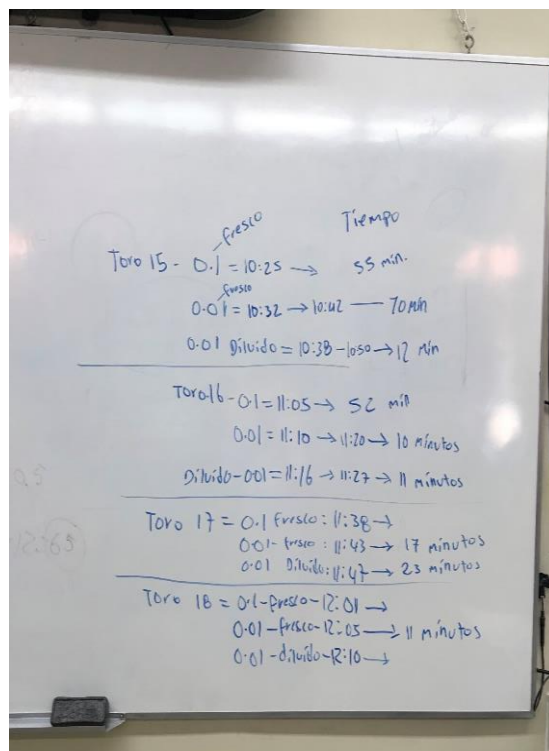
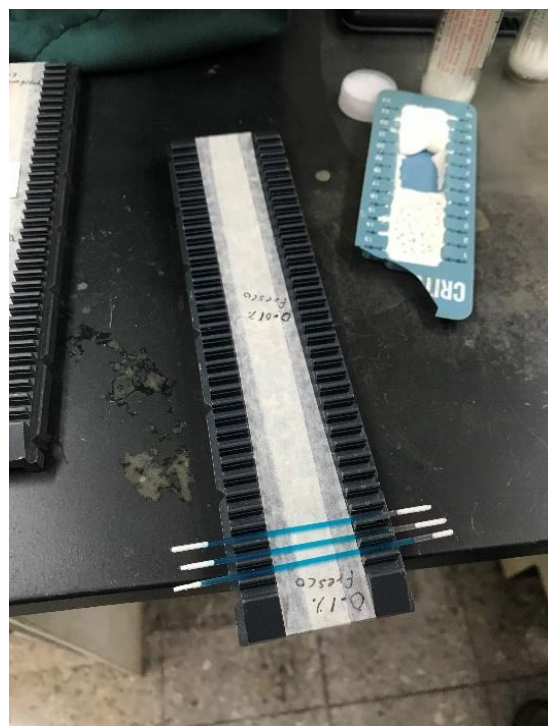
## Anexo F

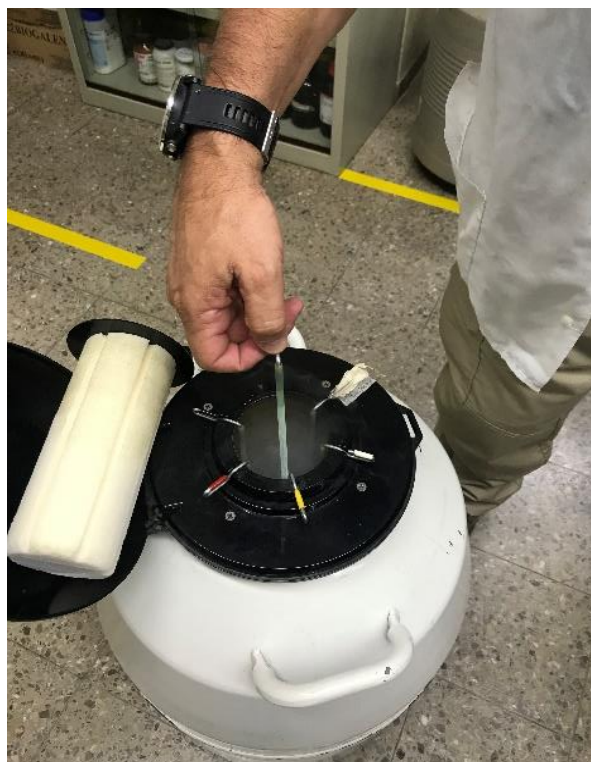
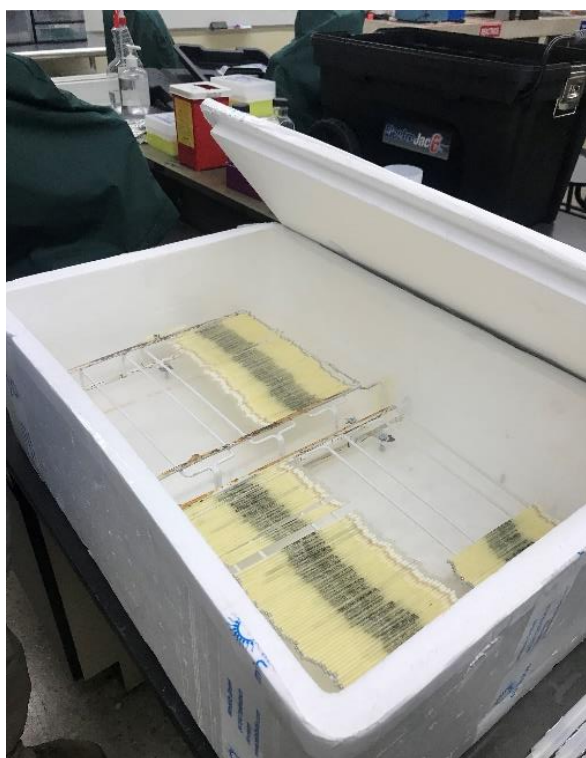
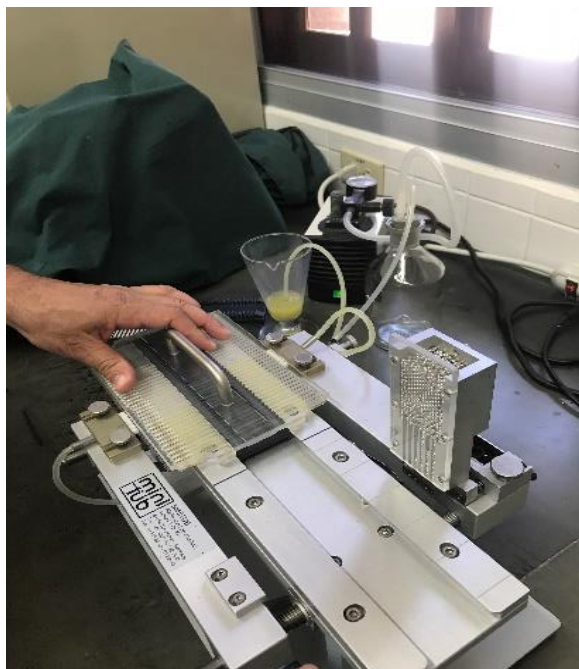
### Preparación del diluyente



## Anexo G

## Prueba de reducción del azul de metileno (0.01%)



**Anexo H***Empaque y congelación de semen*

## Anexo I

Gráfico de regresión lineal simple entre TRAM fresco y concentración

