

UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURÍMAC

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA**



INFORME FINAL DE INVESTIGACIÓN

**Viabilidad de inseminación artificial con semen congelado local e
importado en bovinos Holstein**

Presentado por:

Ulises Sandro Quispe Gutiérrez

Abancay, Perú

2024



Agradecimiento

Esta investigación fue financiada por el III concurso de proyectos de investigación científica y tecnológica para docentes, financiados con fondos de canon, sobrecanon y regalías mineras de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac.

A Harrison Rodas Solis, por haber apoyado el presente proyecto.



Viabilidad de inseminación artificial con semen congelado local e importado en bovinos Holstein

Línea de investigación:

Ciencias veterinarias

Esta publicación está bajo una Licencia Creative Commons



ÍNDICE

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
RESUMEN	2
ABSTRACT	3
CAPÍTULO I	4
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	4
1.1 Descripción del problema	4
1.2 Enunciado del problema	5
1.2.1 Problema general	5
1.2.2 Problemas específicos	5
1.2.3 Justificación de la investigación	5
OBJETIVOS E HIPÓTESIS	7
2.1 Objetivos de la investigación	7
2.2.1 Objetivo general	7
2.2.2 Objetivos específicos	7
2.2 Hipótesis de la investigación	7
2.2.3 Hipótesis general	7
2.2.4 Hipótesis específicas	8
2.3 Operacionalización de variables	9
CAPÍTULO III	10
MARCO TEÓRICO REFERENCIAL	10
3.1 Antecedentes	10
3.2 Marco teórico	13
3.2.1 Inseminación artificial	13
3.2.1.1 Factores que influyen la inseminación artificial	14
3.2.1.2 Mejora de la tecnología de inseminación artificial	14
3.2.2 Obtención y manejo del semen	15
3.2.2.1 Métodos de obtención del semen	15
3.2.2.2 Manejo del semen	16
3.2.3 Criopreservación	17
3.2.3.1 Efectos perjudiciales de la criopreservación sobre el espermatozoide	19
3.2.3.2 Diluyentes en la congelación de semen	20



3.2.3.3	Técnicas de criopreservación espermática	22
3.2.4	Evaluación del semen	23
3.2.4.1	Características macroscópicas del semen	23
3.2.4.2	Características microscópicas del semen	24
3.2.4.3	Descongelación de semen	25
3.2.5	Sincronización del celo e inseminación	25
3.2.6	Eficiencia reproductiva y tasa de preñez	27
3.3	Marco conceptual	28
CAPÍTULO IV		30
METODOLOGÍA		30
4.1	Tipo y nivel de investigación	30
4.1.1	Tipo de investigación	30
4.1.2	Nivel de investigación	30
4.2	Diseño de la investigación	30
4.3	Población y muestra	30
4.3.1	Población	30
4.3.2	Muestra	30
4.4	Procedimiento	31
4.4.1	Animal	31
4.4.2	Colección de semen	31
4.4.3	Evaluación del semen fresco	31
4.4.4	Dilución y congelación del semen	32
4.4.5	Descongelado del semen	32
4.4.6	Evaluación de la motilidad total de los espermatozoides	32
4.4.7	Evaluación de la motilidad progresiva de los espermatozoides	33
4.4.8	Evaluación de vitalidad de espermatozoides	33
4.4.9	Evaluación de la permeabilidad de la membrana plasmática de los espermatozoides	33
4.1.1	Inseminación artificial de bovinos	34
4.1.2	Evaluación de la tasa de preñez	34
4.2	Análisis estadístico	34
CAPÍTULO V		36
RESULTADOS Y DISCUSIONES		36
5.1	Análisis de resultados	36
5.1.1	Motilidad total espermática	36
5.1.2	Motilidad progresiva espermática	36
5.1.3	Vitalidad espermática	36



5.1.4	Permeabilidad de la membrana plasmática del espermatozoide	36
5.1.5	Tasa de preñez	37
5.2	Discusión	37
CAPÍTULO VI		41
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		41
6.1	Conclusiones	41
6.2	Recomendaciones	41
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		42
ANEXOS		46



ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1 Operacionalización de las variables	9
Tabla 2. Promedio (porcentaje \pm desviación estándar) de parámetros de espermatozoides del semen descongelado local y semen importado.....	37
Tabla 3. Tasa de preñez de vacas inseminadas con semen descongelado.....	37

INTRODUCCIÓN

La ganadería lechera en Apurímac, está basada principalmente con la genética de bovinos Holstein, cuya población es menor que los bovinos criollos. El mejoramiento genético de los bovinos a nivel del departamento de Apurímac, en particular en los distritos de la provincia de Abancay está en inicios. El Gobierno Regional de Apurímac, a través de varios proyectos y en diferentes épocas, intervino con la finalidad de mejorar la calidad genética de los bovinos para elevar la producción de leche de los bovinos cruzados y criollos, con resultados poco significantes.

El mejoramiento productivo de los animales pasa por programas de mejoramiento genético, este utiliza como herramienta la inseminación artificial, que es una biotecnología reproductiva más usada en el mundo; sin embargo, esta tecnología en Abancay tiene poca aceptación por los ganaderos, debido a diferentes factores, entre ellos el costo y la baja preñez que se obtiene. Por otro lado, la producción de semen congelado comercialmente no está reportado en Abancay, cuya implementación requiere de animales de alto valor genético, equipos y materiales de laboratorio. Con fines de investigación y de enseñanza en la universidad se formuló un proyecto con el objetivo de evaluar el semen congelado local e importado en la viabilidad de inseminación artificial en bovinos; cuyos resultados se presentan en el presente informe final.



RESUMEN

El objetivo del estudio fue evaluar el semen congelado local e importado en la viabilidad de inseminación artificial en bovinos Holstein. Se evaluó los parámetros espermáticos del semen descongelado local e importado, luego se determinó la tasa de preñez a los 45 días mediante ultrasonografía. Se encontró mayor ($P \leq 0.05$) porcentaje de motilidad total, motilidad progresiva, vitalidad y permeabilidad de la membrana plasmática de los espermatozoides en semen descongelado importado que en el semen local. La tasa de preñez fue similar ($P > 0.05$) en vacas inseminadas con semen descongelado local o importado. Se concluyó que el semen descongelado importado presenta mejores parámetros espermáticos que el semen local descongelado; sin embargo, la tasa de preñez fue similar en vacas inseminadas.

Palabras clave: *Vaca, criopreservación, motilidad, espermatozoide, gestación.*

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate evaluate local and imported frozen semen in the feasibility of artificial insemination in Holstein cattle. The sperm parameters of local and imported thawed semen were evaluated, then the pregnancy rate was determined at 45 days by ultrasonography. A higher percentage ($P \leq 0.05$) of total motility, progressive motility, vitality and permeability of the plasma membrane of sperm was found in imported thawed semen than in local semen. The pregnancy rate was similar ($P > 0.05$) in cows inseminated with local or imported thawed semen. It was concluded that imported thawed semen presents better sperm parameters than thawed local semen; However, the pregnancy rate was similar in inseminated cows.

Keywords: *Cow, cryopreservation, motility, sperm, gestation.*



CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Descripción del problema

La cantidad de leche bovina producida en el mundo, como alimento proteico para el hombre, es insuficiente. En la Sierra del Perú la leche es esencial para la alimentación de los niños; sin embargo, los niveles de producción de leche por vaca son bajos, por otro lado, la disponibilidad de la leche es escasa, el costo es elevado. En consecuencia, existe déficit de consumo de leche por el hombre en particular por los niños, el mismo que tienen relación con la desnutrición infantil y presentación de enfermedades.

La ganadería lechera en Apurímac y en el Perú, está basada principalmente con genética de bovinos Holstein, cuya población es mucho menor que los bovinos criollos. El mejoramiento genético de los bovinos en el departamento de Apurímac, en particular en los distritos de Abancay está en inicios. El Gobierno Regional de Apurímac a través de la Dirección Regional Agraria, actualmente está ejecutando el Proyecto “Mejoramiento de la cadena productiva de ganado vacuno de leche en 35 distritos en las provincias de Abancay, Antabamba, Aymaraes, Cotabambas y Grau de la Región Apurímac”, como este proyecto y otros fueron implementados varias veces y en diferentes décadas, con la finalidad de mejorar la producción láctea. Sin embargo, no fueron ni es suficiente.

Una herramienta que se usa para el mejoramiento genético de los bovinos es la inseminación artificial, esta tecnología requiere semen sea fresco o congelado, este a su vez requiere entre otros factores, animales de alto valor genético, equipamiento y materiales para el procesamiento de criopreservación del semen. Desafortunadamente en Abancay la producción de semen congelado no existe comercialmente, solo a nivel

de investigación existen algunos reportes de criopreservación de semen. En efecto, la inseminación artificial en bovinos en Apurímac depende del semen producidos en otras regiones y en el extranjero, de esta forma se eleva el costo de la inseminación, a este se suma la baja tasa de preñez de la vaca producto de varios factores.

1.2 Enunciado del problema

1.2.1 Problema general

¿Cómo son afectados los parámetros espermáticos y la tasa de preñez utilizando semen descongelado local o importado en la inseminación en bovinos?

1.2.2 Problemas específicos

- ¿Cómo afecta el semen bovino criopreservado local o importado sobre la motilidad total de espermatozoides descongelados?
- ¿Cómo afecta el semen bovino criopreservado local o importado sobre la motilidad progresiva de espermatozoides descongelados?
- ¿Cómo afecta el semen bovino criopreservado local o importado sobre la vitalidad de espermatozoides descongelados?
- ¿Cómo afecta el semen bovino criopreservado local o importado sobre la permeabilidad de la membrana plasmática de espermatozoides descongelados?
- ¿Cuál es el efecto de la inseminación con semen bovino criopreservado local o importado sobre tasa de preñez de vacas?

1.2.3 Justificación de la investigación

La desnutrición crónica de los niños en Apurímac es crítica, la pobreza extrema también. Para ayudar a reducir la desnutrición, indiscutiblemente la proteína animal presente en leche de la vaca es una alternativa para la lucha contra la desnutrición de los niños. Por tanto, implica aumento de la producción láctea bovina, con costos bajos y disponibilidad para la población humana. Por otro lado, es importante la participación del gobierno regional y

nacional, para que implementen proyectos de desarrollo de ganado bovino con fines del desarrollo humano integral.

Para el mejoramiento genético de los bovinos, orientado a elevar la producción láctea, es esencial el uso de la inseminación artificial. Para la implementación de esta tecnología es importante la adquisición de animales de alto valor genético, equipos de alta tecnología e insumos y materiales. Para reducir los costos de inseminación, una alternativa es la producción local de semen congelado, que esta sirva para fines de investigación y de enseñanza a los estudiantes de la ciencia animal. Colateralmente, los insumos de esta tecnología reproductiva servirían para estudios en otras especies animales locales. Los estudios de criopreservación, la misma técnica y utilización de dilutores de semen comerciales y de producción local y otros factores son importantes.

El buen manejo del semen y la utilización de buenos dilutores del semen son factores importantes en el éxito de la inseminación. La calidad del semen es expresada por los parámetros espermáticos. Estos deben ser evaluados antes de la inseminación, teniendo valores porcentuales por encima de los estándares, se tendrá alta tasa de preñez de las vacas. Es importante la comparación de la producción de semen congelado localmente y de semen importado con fines de inseminación bovina. Bajo las consideraciones expuestas, se planteó el presente estudio con el objetivo de evaluar el semen congelado local e importado en la viabilidad de inseminación artificial en bovinos.



CAPÍTULO II

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1 Objetivos de la investigación

2.2.1 Objetivo general

Evaluar el semen congelado local e importado en la viabilidad de inseminación artificial en bovinos Holstein.

2.2.2 Objetivos específicos

- Determinar la motilidad total de espermatozoides post descongelado de semen bovino criopreservado local e importado.
- Determinar la motilidad progresiva de espermatozoides post descongelado de semen bovino criopreservado local e importado.
- Estimar la vitalidad de espermatozoides post descongelado de semen bovino criopreservado local e importado.
- Observar la permeabilidad de la membrana plasmática de espermatozoides post descongelado de semen bovino criopreservado local e importado.
- Diagnosticar la tasa de preñez de vacas, inseminadas con semen criopreservado local e importado.

2.2 Hipótesis de la investigación

2.2.3 Hipótesis general

Las características espermáticas del semen congelado local o importado son similares que viabilizan la inseminación artificial en bovinos Holstein.



2.2.4 Hipótesis específicas

- Después de la descongelación del semen criopreservado local o importado, el porcentaje de motilidad total de espermatozoides es similar, encontrándose alrededor de 60%.
- Post descongelación del semen criopreservado local o importado, el porcentaje de motilidad progresiva de espermatozoides es similar, encontrándose alrededor de 50%.
- Después de la descongelación del semen criopreservado local o importado, el porcentaje de vitalidad de espermatozoides es similar, encontrándose cercanos a 60%.
- Después de la descongelación del semen criopreservado local o importado, el porcentaje de permeabilidad de membrana plasmática de los espermatozoides es similar, encontrándose alrededor de 45%.
- Después de la inseminación artificial con semen congelado local o importado se obtienen tasas de preñeces similares en vacas Holstein, oscilando alrededor de 60%.

2.3 Operacionalización de variables

Tabla 1 Operacionalización de las variables.

Variables	Indicador	Índice/Escala
Independientes		
Semen local	Cantidad de pajuelas con semen congelado local	
Semen importado	Cantidad de pajuelas con semen congelado importado	
Dependientes		
Motilidad total	Número de espermatozoides con cualquier tipo de movimiento	$\% \text{ de motilidad total} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de espermatozoides con cualquier tipo de movimiento}}{\text{N}^\circ \text{ total de espermatozoides contabilizados}} \times 100$
Motilidad progresiva	Número de espermatozoides con movimiento progresivo	$\% \text{ de motilidad progresiva} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de espermatozoides con movimiento progresivo}}{\text{N}^\circ \text{ total de espermatozoides móviles}} \times 100$
Vitalidad	Número de espermatozoides vivos	$\% \text{ de vitalidad} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de espermatozoides con tinción positiva}}{\text{N}^\circ \text{ total de espermatozoides contabilizados}} \times 100$
Permeabilidad de la membrana plasmática	Número de espermatozoides positivos a la prueba de HOST	$\% \text{ de Integridad funcional} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de espermatozoides positivos a HOST}}{\text{N}^\circ \text{ total de espermatozoides contabilizados}} \times 100$
Tasa de preñez	Número de vacas preñadas a 45 días post inseminación artificial	$\% \text{ de Preñez} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de vacas preñadas}}{\text{N}^\circ \text{ total de vacas inseminadas}} \times 100$

CAPÍTULO III

MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

3.1 Antecedentes

El estudio del material seminal importado concluye que las características de motilidad, morfología y supervivencia son satisfactorias, por tanto, se puede utilizar como instrumento de mejoramiento genético en los hatos. La motilidad espermática de semen descongelado importado que usaron dilutor yema de huevo fue $46.7 \pm 9.1\%$; la supervivencia espermática fue mejor en la pajilla de 0.25 ml que en las pajillas grandes de 0.50 ml (36.5% vs 31.7%). Un alto porcentaje (66%) de las pajillas contenían entre 10 y 30 millones de espermatozoides por dosis, lo cual garantiza una alta posibilidad de eficiencia en la fertilidad. Si se considera que las empresas importadoras de semen eran 18 en 1997 y se redujeron a 15 en 1998, se puede afirmar que el uso de la inseminación artificial permanece estancado. Esto corrobora la evidencia de que existe un nicho de mercado amplio para mejorar la ganadería utilizando el genoma seleccionado durante años por países de economías desarrolladas, pero con la condición necesaria de estudiar su comportamiento mediante pruebas de evaluación genética en el ecosistema tropical (1).

Con el objetivo de evaluar la asociación entre parámetros convencionales y computarizados de calidad seminal con la evaluación por citometría de flujo de semen bovino congelado. El semen de 10 eyaculados de cinco toros fue congelado. Se evaluó la movilidad total (MT), movilidad progresiva (MP), vitalidad del esperma (VE) y la integridad funcional de la membrana se evaluaron mediante la tinción con eosina-nigrosina y la prueba hipoosmótica (HOST). Se hallaron correlaciones positivas entre $\Delta\psi M$ -Alto y $\Delta\psi M$ -Medio con diferentes parámetros de calidad seminal ($p < 0.05$). La mayoría de los coeficientes de regresión para las poblaciones de espermatozoides con

mayor $\Delta\psi M$ y estabilidad de membrana, indicaron incrementos significativos en la calidad del semen congelado-descongelado ($p < 0.05$). Se concluye que la actividad mitocondrial y la estabilidad de membrana evaluadas por citometría de flujo, están asociadas con la calidad espermática estimada por métodos convencionales y computarizados, en el semen bovino criopreservado (2).

Este estudio se realizó para determinar la calidad del semen fresco y congelado de toros Bali y Simmental. Se utilizaron dos toros Bali y dos toros Simmental de 5-6 años. Los parámetros observados en el semen congelado fueron motilidad, viabilidad, membrana plasmática intacta y otros. Los resultados mostraron que el semen congelado de las razas Bali y Simmental no mostró diferencias significativas ($P > 0.05$) en términos de motilidad, membrana plasmática intacta, pero la viabilidad del toro Bali fue significativamente mayor que el semen congelado de las razas Bali y Simmental. La del toro Simmental y la anormalidad del toro Simmental fue significativamente mayor que la del toro Bali. En conclusión el toro Bali como el Simmental tienen la misma calidad de semen fresco, pero el toro Bali tuvo mejor viabilidad y anormalidad en comparación con los de la raza Simmental congelado (3).

El diluyente OptiXcell® disponible comercialmente se comparó con los diluyentes convencionales en cuanto a la congelabilidad y la fertilidad in vivo del semen de toro. Se recogió semen de tres toros frisonos durante cinco semanas (réplica) y los eyaculados calificados (motilidad $> 60\%$, concentración $> 0,5$ mil millones/ml, volumen > 1 ml) se diluyeron (37°C ; 50×10^6 espermatozoides/ml) con OptiXcell®, yema de huevo triscítrica y diluyentes de yema de huevo y citrato. El semen diluido se enfrió a 4°C en 2 horas, se equilibró durante 4 horas y se vertió en pajitas de 0.5 ml. Las pajuelas se mantuvieron sobre vapores de nitrógeno líquido durante 10 minutos y se sumergieron en nitrógeno líquido. Los porcentajes de motilidad de los espermatozoides después de la descongelación y de integridad de la membrana plasmática se registraron más altos ($P < 0,05$) en OptiXcell® en comparación con la yema de huevo triscítrica seguida de un diluyente de yema de huevo y citrato. La viabilidad del esperma (%) se registró mayor ($P < 0,05$) en OptiXcell® en comparación con la yema de huevo triscítrica y el diluyente de citrato de yema de huevo. Se registró una tasa de fertilidad más alta ($P < 0,05$) con el semen congelado en OptiXcell® en comparación con la yema de huevo triscítrica y el diluyente de yema de huevo-citrato.

En conclusión, OptiXcell® es superior a los diluyentes convencionales en cuanto a la calidad de los espermatozoides del semen de toro congelado-descongelado y produjo tasas de fertilidad más altas en condiciones de campo (4).

Con objetivos de determinar la comparación del diluyente a base de yema de huevo Tris, Triladyl® y Optixell® en la calidad postdescongelación, los parámetros CASA y la fertilidad in vivo de espermatozoides de toro de búfalo Nili Ravi. Muestras de semen (n = 35) de cinco toros se diluyeron en Tris a base de yema de huevo, Triladyl®, diluyente Optixell® y se congelaron en pajuelas de 0,50 ml. La motilidad total y motilidad progresiva del espermatozoide postdescongelación fue mayor ($p < 0,05$) en el diluyente Optixell en comparación con el diluyente a base de yema de huevo Triladyl y Tris. Las tasas de fertilidad (68,18%, 45,45%, 55,4%) fueron mayores ($p < 0,05$) en búfalas inseminadas con dosis de semen congelado en diluyente Optixell que con el diluyente Tris a base de yema de huevo y Triladyl® respectivamente. Se concluye que el diluyente Optixell® mejora la calidad del semen postdescongelación y la fertilidad en búfalas Nili Ravi (5).

La extracción de semen fresco de 3 toros Simmental mediante método vaginal artificial se realizó dos veces por semana. El semen fresco con una motilidad $> 70\%$ se procesó posteriormente hasta congelarlo utilizando un método de dilución en un solo paso, y los diluyentes comerciales utilizados fueron Andromed®, Optixcell® y Steridyl®. El semen diluido se envasó en pajuelas, se equilibró, se congeló y se almacenó para realizar más pruebas. Los resultados mostraron que los diluyentes comerciales afectaron significativamente la motilidad, la viabilidad, la membrana plasmática intacta, las anomalías y la tasa de recuperación del semen congelado ($P < 0,05$). Los diluyentes comerciales con diferentes fuentes de lecitina reportaron diferentes resultados sobre la calidad del semen congelado. Steridyl® tiene una capacidad más óptima para mantener la calidad del semen congelado de ganado Simmental, seguido de Optixcell® y Andromed® (6).

3.2 Marco teórico

3.2.1 Inseminación artificial

La historia de la investigación sobre la inseminación artificial tiene más de dos siglos y su aplicación comercial abarca ya 75 años. Es apropiado reflexionar sobre la contribución de este poderoso método de dispersión de genes. La inseminación artificial sigue siendo una de las tecnologías de reproducción asistida más importantes. Los tres pilares para su aplicación son: es sencillo, económico y exitoso. Los notables avances logrados en otras tecnologías de reproducción asistida tienen el potencial de generar descendencia rápidamente. El desafío para que cualquiera de estas tecnologías reproductivas alcance un uso generalizado es igualar a la inseminación artificial en cuanto a simplicidad, economía y éxito (7).

La inseminación artificial es una tecnología crucial para los productores ganaderos de todo el mundo. Esta tecnología ha brindado a los productores acceso a genética de primer nivel sin tener que poseer físicamente toros superiores. La mejora de esta tecnología puede tener un gran impacto en la industria ganadera, especialmente en aquellos sectores de la industria que dependen en gran medida de la inseminación artificial (8). En la actualidad, la IA es una técnica madura en la cría de ganado lechero y establecida en todo el mundo. Además, produce tasas de preñeces similares a las del apareamiento natural (9). En el ganado bovino, la inseminación artificial desempeña no sólo un papel vital en el establecimiento exitoso de la preñez, que es un requisito previo para el inicio de la lactancia posterior, sino también en la aceleración del mejoramiento genético y la facilitación de la distribución del semen de toros genéticamente selectos (10)

Uno de los esfuerzos para aumentar la población de ganado es mediante la utilización de tecnología de inseminación artificial. Esta es una tecnología reproductiva cuyo objetivo es aumentar la eficiencia de la reproducción e inclusión la distribución de genética superior, así como prevenir la propagación de enfermedades (3). La inseminación artificial representa la técnica inicial y más sencilla para aumentar la productividad y ha demostrado eficacia en especies ganaderas como el ganado vacuno, búfalos, ovejas y cabras (11). La inseminación artificial ha demostrado ser una tecnología confiable para que los productores de ganado mejoren el progreso genético



y controlen las enfermedades venéreas en sus rebaños. Sin embargo, cuando el programa de inseminación artificial no es adecuado a las condiciones de la granja, puede disminuir la eficiencia reproductiva al aumentar el intervalo parto-concepción y, por lo tanto, aumentar el intervalo entre partos en comparación con el servicio natural (12)

3.2.1.1 Factores que influyen la inseminación artificial

Uno de los factores que influye en la tasa de éxito de la inseminación artificial es la calidad del semen congelado. Por lo tanto, siempre se debe mantener su calidad para poder mantener una buena fertilidad (3). Asimismo, la raza, la edad y el período de producción de semen tienen un efecto significativo sobre las características del semen bovino (13). Existen otros factores que influyen en la preñez, factores de “vaca” y “semen” que afectan la tasa de fertilización. Otros factores que influyen en la fertilización incluyen la competencia del inseminador, el manejo del semen, el lugar de depósito del semen, la inseminación heterospermica y el momento de la inseminación (10).

Aunque se ha trabajado mucho para mejorar la eficiencia de la inseminación artificial, todavía hay muchas áreas que continúan experimentando mejoras, incluidos los procedimientos de análisis de semen, las técnicas de selección de espermatozoides, las tecnologías de sexado de espermatozoides y los métodos de almacenamiento de semen. El trabajo futuro continuará perfeccionando los protocolos que se utilizan para la IA y seguirá aumentando las tasas de preñez en todas las especies de ganado (8).

3.2.1.2 Mejora de la tecnología de inseminación artificial

A pesar de sus enormes contribuciones a la producción ganadera, existen numerosas formas en que se puede mejorar la inseminación artificial. Estas mejoras están impulsadas por nuevas tecnologías y una comprensión más profunda de la fisiología reproductiva. La industria de la inseminación artificial tiene muchas tecnologías prometedoras que se están investigando y adoptando para su uso. Estas tecnologías utilizan nuevos paradigmas relacionados con la fisiología reproductiva para impulsar mejores resultados de inseminación artificial. Estas tecnologías se han aplicado al análisis de semen, la selección de espermatozoides y el almacenamiento de semen (8).



El almacenamiento de semen también es un problema en todas las especies y el uso de protocolos eficaces de selección de esperma dará como resultado espermatozoides más robustos para el almacenamiento y, por lo tanto, mejorará también este aspecto de la industria (8). El objetivo de una inseminación es asegurar que haya una reserva adecuada de espermatozoides competentes, capacitados y móviles en la región caudal del istmo oviductal, el sitio del principal reservorio de espermatozoides en la vaca, en el momento de la ovulación para asegurar la fertilización (10).

3.2.2 Obtención y manejo del semen

En general, el semen congelado se utiliza para la inseminación artificial en bovinos; las muestras de semen se descongelan justo antes de su uso y se depositan en el cuerpo del útero. El número de espermatozoides introducidos varía alrededor de diez millones de espermatozoides vivos (20 millones congelados por pajuela) (9).

3.2.2.1 Métodos de obtención del semen

Entre los principales métodos de obtención del semen se tiene:

a) Vagina artificial

Es el método de elección para la obtención de semen en los machos rumiantes. Consiste en la utilización de un tubo rígido que contiene una válvula, y en cuyo interior se introduce una manga de látex, que se pliega en ambos extremos. La recámara que se forma entre la pared del látex y la pared del tubo se llena con agua caliente a una temperatura de entre 42 y 45 °C, lo que constituye un estímulo para la eyaculación. La obtención de semen se realiza al montar al macho sobre una hembra, un macho o un maniquí; en el toro se prefiere que sea un buey u otro macho (14).

b) Electroeyaculación

La electroeyaculación consiste en la obtención del semen mediante la estimulación de los nervios que controlan el proceso de la erección y de la eyaculación al aplicar pulsos de electricidad por vía rectal. Se utiliza en los machos que no aceptan la vagina artificial, como es el caso de los bovinos de razas de carne, carneros o chivos no entrenados y machos incapacitados para la monta. En los machos de otras especies domésticas se aplica muy rara vez y generalmente con anestesia. Es el método de elección en las especies silvestres (14).

3.2.2.2 Manejo del semen

Actualmente, la mayor parte del semen de toro se congela en pajuelas francesas de 0,25 o 0,50 ml y se almacena en nitrógeno líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Además de facilitar el envasado, etiquetado, almacenamiento y transporte del semen, las pajuelas también facilitan un control más uniforme de la congelación y descongelación, lo que en última instancia conduce a una mejor recuperación del esperma después de la descongelación. Sin embargo, una gran desventaja de las pajuelas es su vulnerabilidad a un mal manejo, especialmente las pajuelas de 0.25 ml, que son las más populares en Europa y Canadá. Las pajuelas de 0.25 ml tienen una gran relación superficie-volumen, en comparación con las pajitas de 0.5 ml, lo que las hace vulnerables a las rápidas fluctuaciones de temperatura (10).

Con el descubrimiento del glicerol como agente crioprotector eficaz para el esperma de los mamíferos y la utilidad del nitrógeno líquido para el almacenamiento y distribución eficaz del semen congelado, el uso de la inseminación artificial se ha convertido en la biotecnología reproductiva más antigua, útil y extendida para la mejora genética del ganado, especialmente ganado lechero (15).

La criopreservación de semen, si bien ofrece ventajas como almacenamiento prolongado y propagación genética, también presenta desafíos. Estos incluyen la disminución de la calidad del esperma debido a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), alteraciones en la estructura del esperma y fluctuaciones de temperatura. Además, el efecto de la criopreservación difiere entre el ganado vacuno y los búfalos, y estos últimos exhiben una peor viabilidad y fertilidad del semen debido a las susceptibilidades inherentes a la composición de los lípidos. La generación y las implicaciones de las ROS, especialmente el peróxido de hidrógeno, contribuyen significativamente al daño del ADN del esperma y a las alteraciones funcionales (11).

Diskin (10) basándose en las recomendaciones de otros autores se pueden deducir las siguientes recomendaciones generales:

- Dentro del tanque de almacenamiento de nitrógeno líquido, tener los botes que contienen las pajuelas claramente etiquetados.
- Mantener un inventario actualizado de pajuelas de semen, códigos de toros y su ubicación dentro del tanque de nitrógeno líquido.



- Al ubicar las pajuelas, mantenga el recipiente por debajo de la línea de congelación y evite levantarlo durante demasiado tiempo en el proceso. Si no se puede localizar una pajita de semen en 10 segundos, baje el recipiente al nitrógeno líquido antes de continuar la búsqueda.
- Retire la pajuela con unas pinzas, elimine el exceso de nitrógeno líquido y colóquela en agua a 35 °C durante 45 s (rango de 30 a 60 s). Descongele sólo suficientes pajitas que puedan inseminarse en 10 minutos (ver más adelante). Si se están descongelando varias pajitas, evite el contacto directo entre pajitas durante el proceso de descongelación.
- Antes de cargar la pistola inseminación artificial, precaliéntela, especialmente si el ambiente es frío. Esto se puede hacer acariciándolo vigorosamente con una toalla de papel limpia, colocándolo cerca de su cuerpo durante unos minutos antes o usando una unidad calentadora de armas inseminación artificial diseñada específicamente.
- Retire la pajuela del baño de agua, séquela con un paño, insértela en la pistola de inseminación artificial, con el extremo del tapón de algodón primero y corte la pajita unos 7 mm por debajo del extremo ondulado.
- Coloque de forma segura la funda de inseminación artificial sobre el arma cargada.
- Si hay un retraso (>10 a 15 s) antes de la inseminación, envuelva la pistola cargada en una toalla para proporcionar protección higiénica y térmica o colóquela en un calentador de armas.
- En ambientes muy cálidos, es importante que las armas de inseminación artificial cargadas estén protegidas de la radiación solar y de la elevación y temperaturas superiores a 35 °C.
- Limpiar la vulva de la vaca con papel toalla antes de la inseminación.

3.2.3 Criopreservación

El semen congelado tiene muchas ventajas sobre el semen fresco o enfriado. El manejo del semental antes y durante el proceso de congelación es extremadamente importante para obtener semen congelado/descongelado de buena calidad. La frecuencia de la eyaculación afectará la calidad del semen congelado, así como la edad del semental y raza. Además, la concentración inicial antes de la congelación también afecta la motilidad post-descongelación. Otros factores que afectan la congelabilidad incluyen el tipo de crioprotector y el nivel de glicerol. La tasa de enfriamiento de menos 10 a menos



50 °C no parece afectar la motilidad post descongelación, pero la concentración dentro de una pajuela de 0.5 mL afecta la motilidad. El manejo y almacenamiento adecuados del semen congelado es extremadamente importante y el semen de semental puede durar indefinidamente si se mantiene en nitrógeno líquido. Se ha estimado que los espermatozoides mantenidos en nitrógeno líquido no cambiarán su composición hasta dentro de 50,000 años (16).

La criopreservación de espermatozoides es un proceso secuencial de reducción de temperatura, deshidratación de la célula, congelación, almacenamiento y luego descongelación. A diferencia de otras células del cuerpo, los espermatozoides deberían ser menos sensibles al daño de la criopreservación debido a su bajo contenido de agua y la alta fluidez de sus membranas (17). La criopreservación es una herramienta esencial para preservar los espermatozoides con fines de manejo zootécnico y de inseminación artificial. La criopreservación se asocia con daño a los espermatozoides a través de diferentes niveles de lesión de la membrana plasmática y estrés oxidativo. Las nanopartículas se utilizan a menudo para defenderse de los radicales libres y el estrés oxidativo generado durante todo el proceso de criopreservación (18).

La criopreservación de semen representa la técnica reproductiva más utilizada en la ganadería actual. No sólo facilita la conservación de genética (preservación de germoplasma), sino que también permite acelerar la mejora genética al permitir la difusión de toros probados en progenie a escala global con el consiguiente beneficio de aumentar la productividad y obtener valiosos rasgos genéticos económicos. También cabe señalar que, aunque se han introducido ajustes de enfriamiento/descongelación con el fin de proteger el esperma, estos cambios han logrado un éxito relativamente moderado en términos de salvaguardar su viabilidad e integridad funcional. La vitrificación y la liofilización se consideran alternativas prometedoras con respecto a preservar la viabilidad de los espermatozoides en el tiempo. Sin embargo, su inserción en el mercado no se ha materializado debido principalmente a la variabilidad de los resultados, no sólo entre diferentes especies sino también entre individuos de una misma especie. Por lo tanto, la aplicabilidad y la aceptación pública de la vitrificación y liofilización del esperma requerirán investigación adicional y ajustes de procedimientos para superar su nivel actual de éxito (19).



La formación de hielo extracelular, modifica el equilibrio isotónico debido al aumento de la concentración de solutos disueltos en el medio extracelular, mientras que en el interior de las células no se ha producido ningún cambio. Debido a la naturaleza semipermeable de la membrana celular, se crea un gradiente de concentración de soluto entre los espacios extracelular e intracelular que puede causar una mayor presión en el lado de la solución que tiene una menor concentración de solutos. La diferencia de presión entre los espacios extracelular e intracelular desencadena un flujo de agua desde la región menos concentrada hacia la región de mayor concentración. Por tanto, la consecuencia de la formación de hielo extracelular es la evacuación de agua del medio intracelular al espacio extracelular provocando la deshidratación celular (19).

El descubrimiento de las acciones crioprotectoras del glicerol permitió congelar los espermatozoides y, aunque posteriormente se examinaron cientos de posibles agentes crioprotectores, el glicerol sigue siendo, casi sin excepción, el crioprotector de elección para los espermatozoides de todas las especies. Sin embargo, a pesar de una amplia experimentación para optimizar su uso, la base de las propiedades crioprotectoras del glicerol y precisamente por qué debería ser más eficaz que otros agentes crioprotectores aún no están claras (20). Aunque la criopreservación de esperma de toro ha avanzado más que la de otras especies, todavía existen grandes lagunas en las bases de conocimiento y tecnología. La viabilidad del esperma después de la descongelación es todavía baja y difiere significativamente entre los toros reproductores (17).

3.2.3.1 Efectos perjudiciales de la criopreservación sobre el espermatozoide

Ugur (17) describen los siguientes efectos perjudiciales:

- Cambios de la membrana.- La principal causa de daño celular en la criopreservación es el daño sufrido por la membrana plasmática.
- Especies reactivas de oxígeno (ROS).- Las ROS, se sabe que estas moléculas son productos de una reducción incompleta del oxígeno molecular y la toxicidad está asociada con la inactivación de proteínas debido a la ionización, la peroxidación lipídica y el daño del ADN.
- Desafíos moleculares.- La identificación de determinantes moleculares clave de la congelabilidad del esperma ayudará al desarrollo de mejores diluyentes y

proporcionará información para predecir mejor la fertilidad y la supervivencia del espermatozoide mediante la criopreservación.

3.2.3.2 Diluyentes en la congelación de semen

Los diluyentes más típicos para congelar espermatozoides incluyen los siguientes: un crioprotector no permeable (leche o productos lácteos; yema de huevo o derivados de la yema tales como lipoproteínas de baja densidad o fosfolípidos); un crioprotector permeable (más comúnmente glicerol); un tampón orgánico (típicamente Tris-hidroximetilaminometano); uno o más azúcares como sustrato energético u osmótico (glucosa, fructosa, lactosa, rafinosa, sacarosa o trehalosa); solutos para ajustar el pH y la osmolaridad (citrato de sodio, ácido cítrico); y antibióticos (penicilina, estreptomycin) (15).

Los diluyentes para congelar espermatozoides contienen tampones, carbohidratos (glucosa, lactosa, rafinosa, sacarosa y trehalosa), sales (citrato de sodio, ácido cítrico), yema de huevo y antibióticos. Se está estudiando el uso de diferentes crioprotectores, como trehalosa o glicerol, así como diferentes concentraciones de yema de huevo y otros constituyentes en diluyentes de semen (21). El choque de frío sufrido durante la congelación y descongelación reduce la calidad del espermatozoide. Se han desarrollado varios diluyentes para disminuir el daño criogénico y mejorar la viabilidad posterior a la descongelación. Los diluyentes basados con yema de huevo, algunos complementados con glicerol; aunque, existen preocupaciones sobre la bioseguridad con el uso de proteína animal (17).

El descubrimiento de componentes de los medios como la yema de huevo, los productos lácteos y, más recientemente, la lecitina de soja, que protegen los espermatozoides no sólo durante el enfriamiento sino también durante la congelación. La calidad del semen y la fertilidad del semen congelado se han estancado un poco con los diluyentes y los métodos de procesamiento de semen convencionales. Sin embargo, la preocupación por el potencial de los diluyentes convencionales de origen animal que incluyen yema de huevo o subproductos lácteos como vector para la propagación de enfermedades ha generado un mayor interés en el desarrollo de diluyentes de semen que no sean de origen animal. Los estudios que utilizan diluyentes a base de lecitina de soja disponibles comercialmente demuestran el potencial de los subproductos de la soja en diluyentes de

semen de origen vegetal. Sin embargo, la composición precisa, el costo y la validación de la calidad y fertilidad del semen post-descongelación han limitado hasta ahora la amplia aceptación del diluyente a base de soja como método de elección en la inseminación del ganado (15).

Las tendencias actuales incluyen el uso de nanopartículas y nanovesículas naturales o artificiales, como exosomas y liposomas, para mejorar la criopreservación del semen. Las nanopartículas funcionan principalmente como antioxidantes con efectos significativos en comparación con los metales o extractos de plantas. Las moléculas funcionales presentes en el interior de los exosomas como miARN, ARNm y proteínas están involucradas en una amplia variedad de interacciones fisiológicas que pueden ayudar a resolver problemas relacionados con la fertilidad de los gametos masculinos. Los liposomas, con su contenido de fosfolípidos y cadenas lipídicas, pueden reemplazar los esqueletos lipídicos dañados de los espermatozoides congelados/descongelados. Dado que los liposomas están actualmente disponibles como producto comercial para la criopreservación de semen, las nanopartículas y nanoformulaciones, así como los vehículos eléctricos y exosomas derivados del tracto reproductivo o las células madre, deben cumplir con las prácticas de fabricación, mediciones de control de calidad y protocolos de seguridad y eficacia adecuados para fines comerciales en la inseminación artificial (18).

Se han desarrollado varios diluyentes y se han complementado con productos químicos para reducir el daño criogénico o el estrés oxidativo con distintos niveles de éxito. Se han descubierto conocimientos más detallados sobre la morfología y función de los espermatozoides mediante la aplicación de herramientas avanzadas en la biología molecular y celular moderna (17).

Dilutor Tris – yema de huevo

Compuesto por Tris (3.028 g), ácido cítrico (1.675 g), glucosa (1.25 g), penicilina (1000 IU/mL), estreptomina (1000 µg/mL) en 80 mL de agua bidestilada, al que se adiciona yema de huevo de gallina (20%) y glicerol 5% (22)

Liposoma



El diluyente a base de liposomas sin proteína animal, uno comercial es el Optixcell (23).

3.2.3.3 Técnicas de criopreservación espermática

a) Técnica de congelación convencional

Los métodos de congelación para la criopreservación de espermatozoides se pueden caracterizar ampliamente en tres modos básicos de congelación: congelación equiaxial, congelación direccional y vitrificación. La congelación equiaxial se conoce como congelación convencional, se utilizan pajuelas de plástico de 0,25 o 0,5 ml llenas de semen extendido, se colocan a una altura de 4 a 5 cm por encima del vapor de nitrógeno líquido durante no mayor a 15 minutos, luego se sumerge al nitrógeno líquido para su almacenamiento (24).

Con frecuencia se utiliza el método de dos pasos y se utiliza glicerol a 7%. La refrigeración dura de 2 h hasta 5 °C y luego se agrega la fracción glicerolada en una o dos veces espaciadas 10 min, y el equilibrio se mantiene durante 2 a 2,5 h antes de la congelación (21).

b) Técnica de congelación direccional

En esta técnica, después de una etapa inicial de siembra, la muestra de semen avanza a una velocidad constante a través de un gradiente de temperatura lineal. Para empezar, gracias a la propagación controlada de las muestras a través de un gradiente de temperatura predefinido, se puede lograr un enfriamiento muy preciso y homogéneo. Esta propagación de la muestra también da como resultado una siembra continua, controlando así el crecimiento de los cristales de hielo en una dirección opuesta a la dirección en la que se mueve la muestra. La disipación de calor de la muestra se logra principalmente de dos maneras. El bloque metálico altamente conductor del calor que rodea la muestra elimina eficazmente el calor de la muestra congelada. Debido al gradiente de temperatura, el calor se aleja continuamente del frente de hielo hacia la fracción no congelada de la muestra, evitando así daños a las células (25).



c) **Vitrificación de espermatozoides**

La vitrificación es un proceso de transformación de una solución que contiene una alta concentración de crioprotector en un estado similar al vidrio mediante enfriamiento ultrarrápido. Implica tiempos de equilibrio cortos, velocidades de enfriamiento rápidas, ningún equipo costoso como un biocongelador programado y no hay daño físico a las células debido a los cristales de hielo. Es relativamente más barato, mucho más rápido y de aplicación más sencilla que los métodos de congelación convencionales (24).

3.2.4 Evaluación del semen

Son necesarios análisis exhaustivos de los espermatozoides mediante el uso de diversos métodos integrados para evaluar la morfología celular a niveles moleculares y celulares relacionados con la función celular. Por ejemplo, las técnicas más relevantes, avanzadas y estandarizadas deben aplicarse correctamente para capturar el contenido genético, funcional y epigenético de los espermatozoides. Para mejorar la criopreservación, se deben evaluar mediante técnicas contemporáneas los predictores precisos de la motilidad, la viabilidad, la funcionalidad de la membrana, la actividad mitocondrial y los parámetros de apoptosis de los espermatozoides. El sistema CASA, establecido por primera vez en 1980, ha evolucionado hasta convertirse en una técnica y un software informáticos precisos que proporcionan mediciones cuantitativas para evaluar la motilidad y la cinemática de los espermatozoides de forma objetiva y precisa (17).

Después de la obtención del semen, éste se coloca en un baño maría a 30 – 32 °C y se procede a evaluar las características macroscópicas: color, volumen y aspecto; microscópicas: motilidad, morfología y concentración espermática (14).

3.2.4.1 Características macroscópicas del semen

a) Volumen

El volumen del semen obtenido se mide directamente en el tubo o recipiente graduado de recolección (14). Se mide en un tubo graduado, evitar presencia de burbujas de aire (26).

b) Color

El color del semen es blanco marfil, otros colores pueden indicar alteraciones (presencia de pus, orina o sangre) (14)

c) Aspecto

El aspecto varía dependiendo de la concentración espermática, siendo lechoso en los bovinos (Valencia, 2018).

3.2.4.2 Características microscópicas del semen

a) Motilidad total

La motilidad espermática normalmente se valora de forma subjetiva, utilizando microscopía, es el método más simple, rápido y barato (26). Se coloca una gota de semen extendido en un portaobjetos de vidrio y se sobrepone una laminilla cubreobjetos, luego se observa usando un microscopio con un calentador de platina incorporado y un microscopio de contraste de fase. El porcentaje de motilidad total de espermatozoides oscila entre 70 - 90% (27).

b) Movimiento progresivo

Para evaluar el movimiento progresivo y lineal, se coloca una gota pequeña de semen sobre un portaobjetos previamente calentado a 41 °C, luego se coloca un cubreobjetos y se observa al microscopio (objetivo 40 x). El porcentaje de células con movimiento progresivo se calcula subjetivamente, al hacer una estimación general del campo que se está observando. Una buena muestra debe tener al menos 70% de motilidad (14). El porcentaje de espermatozoides que son progresivamente móviles se puede evaluar con la metodología de motilidad mencionada anteriormente (27).

c) Vitalidad

Para la evaluación de la vitalidad de los espermatozoides se usa tinción de Eosina 2% - Nigrosina 4%, los espermatozoides muertos se tifican de rojo rosáceo, los vivos no se colorean. El frotis de semen teñidos con eosina-nigrosina se observa mejor con microscopio a 100x con aceite de inmersión (28).



d) Permeabilidad de la membrana plasmática

La funcionalidad de la membrana espermática se evalúa mediante la prueba hipoosmótica (HOST). Para ello se incuban 20 μL de semen a 37 °C durante 60 minutos en una solución de 150 mOsm/Kg que contiene D-fructosa (13,5g/L) y citrato de sodio (7,3g/L). Después del período de incubación, las muestras se fijan en 0.5 ml de formalina salina. Posteriormente, se clasifican espermatozoides según presencia o ausencia de enrollamiento de la cola bajo microscopía óptica (Oliveira et al., 2018).

e) Concentración espermática

La concentración se mide utilizando un hemocitómetro, un colorímetro o un espectrofotómetro. Un hemocitómetro es un portaobjetos de microscopio con cámaras marcadas con precisión. El número de espermatozoides por cámara se cuenta manualmente. Esto lleva mucho tiempo, sin embargo, es muy preciso (27). Se contabiliza número de espermatozoides por 1 mL de semen (Valencia, 2018). La concentración de espermatozoides varía desde 2×10^8 espermatozoides/ml en toros jóvenes hasta 1.8×10^9 espermatozoides/ml en toros maduros (Ax R.L. et al., 2000).

3.2.4.3 Descongelación de semen

La supervivencia del esperma después de la descongelación puede ser consistentemente pobre para ciertos animales individuales, incluso aunque los parámetros previos a la congelación parezcan normales. Los mecanismos que pueden subyacer a tales diferencias en la criosensibilidad aún no están claros (20).

3.2.5 Sincronización del celo e inseminación

La estimulación hormonal ya es una estrategia consistente y bien probada que se utiliza para superar el anestro posparto en ganado vacuno. Básicamente, las hormonas que normalmente se producen durante el ciclo estral de la vaca se pueden administrar en dosis fisiológicas para inducir la ciclicidad y sincronizar con precisión el crecimiento folicular, el estro y la ovulación. Además, se pueden utilizar dos opciones de apareamiento después de la estimulación hormonal: servicio. Estas estrategias mejoran la eficiencia reproductiva de los rebaños en comparación con el servicio natural sin



inducción o sincronización del estro. Después del primer servicio sincronizado, la estrategia más común adoptada para que las vacas no preñadas queden preñadas pronto es la introducción de toros de limpieza hasta el final de la temporada de reproducción (12).

La sincronización de celo con $\text{PGF}_{2\alpha}$ causa la regresión de cuerpo lúteo maduro, su efectividad dependerá de la ciclicidad del hato. Sincronización del desarrollo folicular y la ovulación utilizando GnRH y $\text{PGF}_{2\alpha}$, este protocolo es para controlar el desarrollo folicular y la ovulación, consiste en administrar GnRH en el día 0, luego $\text{PGF}_{2\alpha}$ en el día 7, GnRH a los 36-48 h e inseminación a las 15 h. Hay otros protocolos referidos a la sincronización del desarrollo folicular y la ovulación utilizando progestágenos y estrógenos (30).

El inicio de la ovulación fértil en vacas no cíclicas es probablemente la forma principal en que los productores de carne pueden mejorar la fertilidad en respuesta a la sincronización del estro y los protocolos de inseminación a tiempo fijo. El uso de presincronización basada en progestina antes de la implementación de un protocolo inseminación a tiempo fijo para vacas y novillas mejora la fertilidad de manera más efectiva que otras intervenciones de presincronización hormonal. Por el contrario, la suplementación con una progestina después de la inseminación a tiempo fijo no mejora la fertilidad en vacas de carne, pero la administración de hCG para inducir un cuerpo lúteo accesoria y aumentar las concentraciones de progesterona puede mejorar eficazmente las tasas de preñez en el ganado de carne. El desarrollo de protocolos inseminación a tiempo fijo que reducen los factores molestos asociados con la sincronización de la ovulación y la inseminación artificial brindan a los productores de ganado herramientas eficientes y efectivas para mejorar la genética en sus operaciones (31).

La difusión de procedimientos reproductivos eficientes, como los programas reproducción natural programada, inseminación artificial programada y Resynch, ya sea solos o en combinación, permite la producción de una mayor cantidad de tasa de preñez temprano y fertilidad. Estas tecnologías pueden contribuir a mejorar la eficiencia de la producción y, en consecuencia, mejorar la rentabilidad del ganado (12). Los protocolos para inseminación a tiempo fijo se pueden dividir ampliamente en dos de las siguientes



bases farmacológicas: (1) protocolos de tipo Ovsynch que utilizan la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) y (2) protocolos que utilizan compuestos de estradiol (E2) más tratamiento con progesterona (protocolos E2/P4) (32).

3.2.6 Eficiencia reproductiva y tasa de preñez

Se sostiene comúnmente que la eficiencia reproductiva es el principal factor que afecta la producción y la eficiencia económica. En rebaños que utilizan inseminación artificial, la tasa de detección de celo y la tasa de parto determinan la eficiencia reproductiva. Estos dos factores también determinan la compacidad del parto y el intervalo entre partos. La detección del celo es una tarea especializada y requiere un seguimiento preciso e inseminación del animal en el tiempo especificado para un resultado exitoso. Las tasas de detección de celo se miden por el número de vacas presentadas para ser inseminadas. La detección del estro en las vacas es una tarea que requiere mucho tiempo. Junto con una tasa de concepción decreciente, el aumento del tamaño de los rebaños y los sistemas de alojamiento confinados, los problemas asociados con la detección del estro se exacerban cuando las vacas se presentan repetidamente para inseminación (7).

La eficiencia reproductiva está estrechamente ligada a la rentabilidad de los hatos lecheros y, por lo tanto, las operaciones lecheras exitosas buscan lograr altas tasas de preñez a los 21 días con el fin de reducir el intervalo entre partos y los días en leche del hato. Hay varios factores que impactan el desempeño reproductivo, incluido el programa de manejo reproductivo específico, la pérdida de condición corporal y el manejo nutricional, la genética de las vacas y la comodidad de las vacas proporcionada por las instalaciones y los programas de manejo. Para lograr altas tasas de embarazo a los 21 días, se debe aumentar la tasa de servicio y la preñez por inseminación artificial. Actualmente, existen ajustes en los protocolos de inseminación artificial programada y el uso de programas de presincronización que pueden aumentar la eficiencia reproductiva, incluso hasta el punto de que la fertilidad es mayor con algunos programas de inseminación a tiempo fijo en comparación con la inseminación después del celo permanente (32).

Los conceptos emergentes sobre el ambiente ovárico, la fisiología reproductiva y el desarrollo de la farmacología apoyan constantemente el avance de la reproducción

asistida. En los últimos años, la biotecnía relacionada con la sincronización del desarrollo folicular y la manipulación del ciclo estral bovino ha avanzado rápida y consistentemente. El uso combinado de inseminación artificial programada, superovulación, recolección de óvulos, producción de embriones in vitro y transferencia de embriones programada tienen un gran potencial para mejorar los resultados reproductivos y difundir información seleccionada genética, disminuyendo el intervalo de generaciones y mejorando la ganancia genética del rebaño. Sin embargo, varios factores pueden potencialmente afectar la eficiencia de estos procedimientos. El conocimiento de las particularidades de los grupos genéticos, la manipulación del crecimiento folicular, los predictores de la población folicular y los aspectos metabólicos y ambientales que interfieren con el ambiente ovárico y, en consecuencia, con la cantidad y calidad de los ovocitos, es crucial para optimizar los programas reproductivos (33).

El ambiente periconcepcional juega un papel importante en la cría natural y asistida del ganado vacuno. Los cambios en la nutrición, la temperatura, el estado metabólico o el estado de salud durante la reproducción natural pueden afectar el éxito reproductivo y la salud de la descendencia. Asimismo, los cambios en la composición del medio o la presencia de factores estresantes a los que están expuestos los gametos o embriones también pueden influir en el éxito reproductivo y la salud de la descendencia en reproducción asistida. Las investigaciones recientes sobre el manejo de la salud del rebaño y el seguimiento de las crías nos ayudarán a mejorar el manejo del ganado lechero de alta producción, y los recientes avances de las tecnologías “ómicas” pueden permitir la aplicación de nuevos métodos moleculares para la identificación de moléculas de señalización que están imponiendo marcas epigenéticas en gametos y embriones durante las primeras etapas de la vida, lo que afecta también el éxito reproductivo y la salud de la descendencia (9).

3.3 Marco conceptual

Espermatozoide

Gameto masculino, destinado a la fecundación del óvulo (34).

Semen



Conjunto de espermatozoides y sustancias fluidas que se producen en el aparato genital masculino de los animales y de la especie humana (34).

Criopreservación

Se define como la preservación de materiales biológicos, incluidas células animales, plantas y material genético como el semen a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ en nitrógeno líquido (11).

Diluyente del semen

El semen recién recolectado puede ser preservado durante el manejo y el almacenamiento, puede mezclarse con diferentes medios denominados diluyentes (14).

Inseminación artificial

La inseminación artificial consiste en la introducción de espermatozoides en el tracto genital femenino con el fin de conseguir una preñez (9).

Preñez

Tiempo que dura la gestación de una hembra (34).

Tasa de preñez

La tasa de preñez se define como el porcentaje de hembras que quedan preñadas en comparación con el número total de hembras tratadas (31).

CAPÍTULO IV

METODOLOGÍA

4.1 Tipo y nivel de investigación

4.1.1 Tipo de investigación

El tipo de investigación fue experimental.

4.1.2 Nivel de investigación

Es de nivel fue explicativo.

4.2 Diseño de la investigación

El diseño fue experimental se formaron dos grupos (G), G1: semen descongelado local; G2: semen descongelado importado, donde se evaluaron los parámetros espermáticos del semen descongelado y la tasa de preñez en vacas inseminadas.

4.3 Población y muestra

4.3.1 Población

La población estuvo compuesta por pajuelas de semen bovino congelado local e importado.

4.3.2 Muestra

El método muestral fue no probabilístico, cuyo tamaño muestral fue por conveniencia, distribuidas para inseminación: 29 con semen descongelado local, 15 con semen descongelado importado; mientras para evaluación de los parámetros espermáticos fueron las diferencias.



4.4 Procedimiento

4.4.1 Animal

Se utilizó un toro Simmental-Fleckvieh de 16 m de edad, clínicamente sano, vacunado y desparasitado, con buena condición corporal. La alimentación fue a base de forrajes locales (alfalfa, rye Grass y otros) complementados con concentrado comercial según requerimiento nutricional de la NRC. El animal fue entrenado para colectar semen durante alrededor de un mes, en el centro de producción y experimental Pachachaca de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac ($13^{\circ}39'28''S$ $72^{\circ}55'23''W$), allí se colectó el semen.

4.4.2 Colección de semen

El semen se colectó por método de vagina artificial, dos veces por semana. Se armó la vagina artificial, colocando la funda recta al ducto del cilindro del tubo y por el otro extremo la funda cónica junto al tubo cónico de 15 mL, luego se colocó agua a $43^{\circ}C$ hasta cubrir las dos terceras partes del cilindro, luego se insufló aire hasta obtener una presión adecuada. Cubriendo la vagina artificial para evitar la exposición del sol.

Para la colección, al toro se acercó al brete de monta donde estuvo una vaca, se realizó la falsa monta, a la segunda o tercera monta se colectó el semen. Inmediatamente, al semen colectado se añadió dilutores, luego se transportó en una termo a $37^{\circ}C$ hacia el laboratorio aproximadamente en 30 minutos, arribado al laboratorio se mantuvo en baño María a $36^{\circ}C$.

4.4.3 Evaluación del semen fresco

La evaluación del semen se realizó en el Laboratorio de Histopatología, Embriología y Reproducción Animal, específicamente en el área Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac ($13^{\circ}38'31''S$ $72^{\circ}53'17''W$).

La evaluación macroscópica del semen fresco tuvo los siguientes resultados: volumen de 4.2 ± 1.1 mL; color blanco cremoso, una concentración de $1350 \pm 305 \times 10^6$ de espermatozoides/mL de semen, $pH=7.0$. Por otro lado, se realizó la evaluación microscópica del semen fresco y descongelado. Los parámetros



espermáticos evaluados fueron la motilidad total, motilidad progresiva, vitalidad y permeabilidad de la membrana citoplasmática de los espermatozoides.

4.4.4 Dilución y congelación del semen

Se utilizaron dos diluyentes, uno comercial basado en liposomas (Optixcell); otro Tris-yema de huevo, compuesto por 3.028 g de Tris, 1.675 g de ácido cítrico, 1.25 g glucosa, 1000 IU/mL penicilina, 1000 µg/mL estreptomicina diluidos en 80 mL de agua bidestilada, más 20% de yema de huevo de gallina y 5% glicerol. Se colocó 40×10^6 espermatozoides/mL de semen diluido por pajuela de 0.5 mL. El semen diluido, previamente enfriado se colocó a refrigeración a 5 °C por 4 h para el equilibrio. La congelación del semen fue mediante técnica convencional de dos pasos, que consiste en colocar el semen diluido, inicialmente en refrigeración, una parte de semen diluido más glicerol al 5% y la otra sin glicerol. Culminado el periodo de equilibramiento, se realizó el empajillado en pajuelas de 0.5 mL y sellados con alcohol polivinílico. Las pajuelas fueron llevadas a vapor de nitrógeno líquido a 4 cm sobre la superficie del mismo durante 15 minutos, luego fueron sumergidas al nitrógeno líquido propiamente, durante este proceso se controló la temperatura con los sensores de una termocupla. Luego, las pajuelas fueron almacenadas en el tanque criogénico.

4.4.5 Descongelado del semen

Para el descongelamiento del semen, se retiró la pajuela del tanque criogénico hacia la terma descongeladora que contenía agua. La descongelación de las pajuelas se realizó a 36 °C por 1 minuto.

4.4.6 Evaluación de la motilidad total de los espermatozoides

Para la evaluación de la motilidad total espermática, se colocó 10 µL de semen descongelado sobre la lámina portaobjeto, luego cubierta por laminilla cubreobjeto, se mantuvo sobre platina térmica a 37 °C, enseguida se observó utilizando un microscopio a objetivo 40x. Se contabilizó 200 células espermáticas que tenían cualquier tipo de movimiento. Se utilizó la siguiente fórmula para determinar el porcentaje de la motilidad total espermática:

$$\% \text{ de motilidad total espermática} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de espermatozoides con cualquier tipo de movimiento}}{\text{N}^\circ \text{ total de espermatozoides contabilizados}} \times 100$$



4.4.7 Evaluación de la motilidad progresiva de los espermatozoides

La evaluación de la motilidad progresiva de los espermatozoides, se realizó bajo las mismas condiciones que la evaluación de motilidad total de los espermatozoides. Se contabilizó 200 células espermáticas que tenían el tipo de movimiento progresivo. Se utilizó la siguiente fórmula para determinar el porcentaje de la motilidad progresiva de los espermatozoides:

$$\% \text{ de motilidad progresiva espermática} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de espermatozoides con tipo de movimiento progresivo}}{\text{N}^\circ \text{ total de espermatozoides móviles}} \times 100$$

4.4.8 Evaluación de vitalidad de espermatozoides

La evaluación de la vitalidad espermática, se hizo con el colorante Eosina al 2% y Nigrosina al 4%. Se colocaron 10 μL de cada colorante y semen descongelado sobre una lámina portaobjeto cubierta por laminilla portaobjeto. Hasta antes de la mezcla de los colorantes y el semen, se mantuvieron a 37 °C en platina térmica, luego se realizó el frotis con otra lámina portaobjeto, el secado se hizo al ambiente. Se evaluó con microscopio a objetivo 100x, utilizando aceite de inmersión. Los espermatozoides teñidos de rojo rosáceo se consideraron como muertos y los no coloreados como espermatozoides vivos. Se contabilizaron 200 células espermáticas. Para calcular la vitalidad se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de vitalidad espermática} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de espermatozoides sin tinción}}{\text{N}^\circ \text{ total de espermatozoides contabilizados}} \times 100$$

4.4.9 Evaluación de la permeabilidad de la membrana plasmática de los espermatozoides

La evaluación de la permeabilidad de la membrana plasmática espermática (endosmosis), se realizó mediante la prueba de solución hipoosmótica (HOST=Hipo Osmotic Swelling Test) que contenía 1.47 g de citrato de sodio; 2.7 g de fructosa diluido en 100 mL agua destilada. Se colocó 1 mL de solución HOST al que se adicionó 0.1 mL de semen descongelado, incubados a 37 °C por 45 min en viales de 2 ml dentro de baño María. Se agregó 5 μL de formaldehído al 4%.



Luego se colocó 10 μ L a lámina portaobjeto, luego cubierto por laminilla cubreobjeto, donde se observaron con microscopio a objetivo de 40x. Los espermatozoides con cola enrollada se consideraron como positivos al HOST. Se contabilizaron 200 células espermáticas. Para determinar la endosmosis se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Integridad funcional de la membrana plasmática espermática} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de espermatozoides positivos a HOST}}{\text{N}^\circ \text{ total de espermatozoides contabilizados}} \times 100$$

4.1.1 Inseminación artificial de bovinos

La inseminación se realizó mediante la técnica recto vaginal, la pajueta con semen descongelado, ya cortada, se colocó al catéter de inseminación, luego fue cubierto por una funda inseminadora, en seguida se colocó la camisa de inseminación. Se evacuó las heces de la vaca, se limpió la región urogenital. Se colocó el catéter de inseminación vía transvaginal, guiado con la una de las manos desde el recto, se orientó el extremo anterior del catéter de inseminación hacia el orificio externo del cervix atravesando por el mismo hasta llegar al cuerpo o al inicio de los cuernos uterinos donde se depositó el semen. Previamente, se detectó el celo de la vaca mediante visualización de los signos clásico de celo, se inseminó aproximadamente a 12 h de iniciado el celo. Las vacas Holstein inseminadas fueron de los productores de bovinos locales.

4.1.2 Evaluación de la tasa de preñez

La evaluación de la tasa de preñez, fue a los 45 días post inseminación mediante ultrasonografía con transductor transrectal a una frecuencia de 7 MHz. Para el cálculo de la cantidad de vacas preñadas se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Preñez} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de vacas preñadas}}{\text{N}^\circ \text{ total de vacas inseminadas}} \times 100$$

4.2 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el software estadístico InfoStat (2020e). Se comprobó la normalidad con la prueba de Shapiro-Wilk y homogeneidad de varianzas

con Levene, se transformaron los datos a valores angulares cuando fueron necesarios. Para el modelo estadístico, se consideró como variable independiente al semen congelado local o importado, se retiró el factor dilutores porque no hubo diferencia, siendo las variables de respuesta el porcentaje de motilidad total, motilidad progresiva, vitalidad, permeabilidad de la membrana plasmática. La comparación de los grupos se realizó mediante la prueba de T de muestra independiente. Mientras para porcentaje de preñez se utilizó Ji cuadrado. Se consideró que hubo diferencia cuando $P \leq 0.05$.



CAPÍTULO V

RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1 Análisis de resultados

5.1.1 Motilidad total espermática

Los resultados de la motilidad total espermática se muestran en la Tabla 2. Se encontró mayor ($P \leq 0.05$) porcentaje de motilidad espermática total en el semen descongelado importado frente al semen local.

5.1.2 Motilidad progresiva espermática

Los resultados de la motilidad progresiva espermática se encuentran en la Tabla 2. Los espermatozoides procedentes del semen descongelado importado tuvieron mayor ($P \leq 0.05$) porcentaje de motilidad progresiva espermática, respecto a los espermatozoides del semen local descongelado.

5.1.3 Vitalidad espermática

Los resultados sobre vitalidad se muestran en la Tabla 2. Hubo diferencia entre semen descongelado local e importado, encontrándose mayor ($P \leq 0.05$) porcentaje de vitalidad en semen descongelado importado versus semen local.

5.1.4 Permeabilidad de la membrana plasmática del espermatozoide

Los resultados sobre permeabilidad de la membrana plasmática de los espermatozoides se observan en la Tabla 2. Se encontró mayor ($P \leq 0.05$) porcentaje de integridad de la membrana plasmática de espermatozoides en semen descongelado importado que en el semen local.



Tabla 2. Promedio (porcentaje \pm desviación estándar) de parámetros de espermatozoides del semen descongelado local y semen importado.

Semen	Motilidad total (%)	Motilidad progresiva (%)	Vitalidad (%)	HOST (%)
Local	54.96 \pm 7.23 ^a	41.96 \pm 6.50 ^a	58.55 \pm 7.22 ^a	39.49 \pm 7.16 ^a
Importado	62.13 \pm 5.94 ^b	49.53 \pm 8.86 ^b	65.39 \pm 6.21 ^b	46.81 \pm 5.26 ^b
p valor	0.004	0.006	0.006	0.002

Superíndices con letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencia estadística ($P \leq 0.05$).

HOST = Permeabilidad de la membrana plasmática del espermatozoide.

5.1.5 Tasa de preñez

Los resultados de la tasa de preñez se muestran en la Tabla 3. Vacas inseminadas con semen descongelado local o importado muestran porcentajes de gestación similares ($P > 0.05$).

Tabla 3. Tasa de preñez de vacas inseminadas con semen descongelado

Semen	n	Preñez
Local	29	14/29 (48.3%)
Importado	15	8/15 (53.3%)
p valor		0.751

5.2 Discusión

Los resultados del presente estudio muestran que las características espermáticas de semen local versus importado presentan diferencia. En general los valores seminales de semen descongelado importado muestran mejores características que las del semen local. La motilidad espermática total del semen local 54,96% encontrada en el presente

estudio es similar a 49.7% de motilidad espermática de semen descongelado de toro Simmental que utilizaron dilutor Steridyl (Komariah et al., 2023). También, se encuentra dentro del rango de 49.3% a 48.7% (29), de 55.9% a 58.1% 58.1% (35) de motilidad total de espermatozoides descongelados, previamente criopreservados con los dilutores Optixcell y Triladyl, respectivamente. Por otro lado, los resultados del presente estudio con semen importado fue 63.13% de motilidad total de espermatozoides descongelados, este resultado es similar a 61.7% de motilidad espermática del semen descongelado de toros Simmental (Adiputra et al., 2022). Sin embargo, hay informes con valores diferentes, Sabogal & Obando (1) reportaron 46.7% de motilidad espermática de semen descongelado importado; 45.6% (diluido con Tris) y 56.51% (diluido con liposomas) de motilidad espermática de semen descongelado (36).

La motilidad progresiva de espermatozoides encontrada en el presente estudio fue ~42%. Estos resultados concuerdan con los reportes de (37) quienes encontraron 42.1 y 40.4%; (38) 51.9 y 48.5% de motilidad progresiva espermática del semen descongelado diluidos con Optixcell y Tris-yema de huevo. Sin embargo, otros estudios reportan porcentajes menores de motilidad progresiva congelados con diferentes dilutores, 20.4% con Tris yema de huevo (39), 24.0 a 31.1 % con Tris, Liposomas (36), 26.5, 30.3, 35.1% con Tris yema de huevo, Triladyl, Optixcell (5). Otros informan contrariamente mayores porcentajes de motilidad progresiva de espermatozoides en comparación al presente estudio, 59.1% (Tahmasbian et al., 2022), ~80% (41) de motilidad progresiva espermática. La criopreservación del semen a nivel comercial posiblemente tenga mejor control de calidad; por tanto, los parámetros espermáticos reflejan mejores valores. Esta afirmación tiene relación con el uso los dilutores comerciales Triladyl y Otxicell en la congelación del semen, estos dilutores presentan mayores porcentajes de motilidad progresiva espermática respecto al uso dilutor Tris yema de huevo (5).

El porcentaje de vitalidad (~58%) encontrados en la presente investigación, es similar a 55.7% (42); menor a 70.1% Tahmasbian et al (40), 80.3% (6) de vitalidad de los espermatozoides descongelados. El porcentaje de la permeabilidad de la membrana plasmática de los espermatozoides descongelados (~39%) son similares a 41.3% (42); 33.8% Tahmasbian et al (40) de permeabilidad de la membrana plasmática de los espermatozoides descongelados.



La motilidad es uno de los parámetros más importantes relacionados con la capacidad de fertilización del semen (4), (39). En la congelación de semen se usa dilutores a base de liposomas que presentan una composición y concentración de fosfolípidos adecuados; además, su preparación en el campo es fácil (36), (39). Otro dilutor que se usa en la criopreservación de semen es Tris más yema de huevo, esta provee lipoproteínas de baja densidad que reducen la pérdida de fosfolípidos de la membrana de los espermatozoides, reduciendo los efectos negativos del choque térmico en la congelación del semen (29). En general, los parámetros espermáticos en el presente estudio del semen congelado local e importado fueron distintos. Estas diferencias podrían atribuirse a la técnica del congelamiento del semen. La composición de los diluyentes del semen, la técnica utilizada y materiales afectan la congelación del semen (41). Las pajuelas del semen importado, procedían de una empresa dedicada a la criopreservación, esta empresa probablemente utilice equipos calibrados con altos estándares. Mientras el procedimiento para la congelación del semen local fue utilizando la técnica convencional, el semen procedía de un toro de alrededor de 1.5 años de edad, este factor y otros posiblemente hayan afectado los parámetros espermáticos.

La tasa de gestación encontrada en la presentada investigación fue similar entre vacas inseminadas con semen local (48.3%) o importado (53.3%). Estos resultados son respaldados por Ansari et al. (4) quienes informaron tasas de fertilidad en vacas de 52% utilizando semen congelado con dilutor yema de huevo triscítrica y 51% con diluyente de yema de huevo y citrato; también, Naz et al (5) informaron 45.5% de tasa de preñez utilizando dilutor Tris- yema de huevo en semen congelado. Otros estudios, reportaron valores más altos ~70% de tasa de no retorno de celo (43); 62.8% de tasa de parto inseminada con semen diluido con Triladyl (44). La inseminación requiere detección del estro a tiempo, esta necesita mano de obra y tiempo, y está propensa a errores. La baja detección del estro principalmente está sujeta a influencias animales, humanas y ambientales. La detección deficiente o inadecuada del estro es la causa principal del bajo riesgo de inseminación y de la ineficiencia reproductiva en los rebaños lecheros (45).

Finalmente, las diferencias en los parámetros espermáticos de semen local e importado, pueden deberse al menor tamaño de muestra utilizado en esta investigación, otro factor podría ser la condición corporal del animal, el desempeño reproductivo y el manejo propiamente de los bovinos. Sin embargo, la calidad del semen congelado localmente



sería suficiente para lograr una gestación similar con semen importado. Por otro lado, la oferta del país de semen importado y nacional cubre sólo el 5.1% de las necesidades de vacas en edad reproductiva (Salinas Rivera et al., 2018). Por tanto, hay demanda de uso de semen sean nacional o importado, considerando los resultados de la presente investigación orientan usar cualquiera de las pajuelas congeladas, sea con semen local o importado que tendrían resultados similares de tasas de preñez.

Conclusión

Los parámetros espermáticos evaluados, porcentaje de motilidad total, porcentaje de motilidad progresiva, vitalidad y permeabilidad de la membrana plasmática de los espermatozoides del toro, resultaron diferentes en semen descongelado local o importado. La tasa de preñez fue similar en vacas inseminadas con semen congelado local o importado.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

- Los mayores porcentajes de los parámetros espermáticos motilidad total, motilidad progresiva, vitalidad y permeabilidad de la membrana plasmática de los espermatozoides, se encontraron en el semen importado en comparación al semen local descongelado.
- La tasa de gestación de las vacas inseminadas fue similar al utilizar semen local o importado.

6.2 Recomendaciones

- Se recomienda continuar con los estudios espermológicos.
- Se recomienda repetir las variables de estudio del presente experimento con análisis de semen computarizado (sistema CASA).
- Evaluar otros parámetros espermáticos del toro a nivel molecular.
- Se recomienda que la parte administrativa realice los procesos de adquisiciones de los materiales y equipo sin demora en tiempo y forma.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sabogal R, Obando H. Caracterización del material seminal bovino importado a Colombia. Colombia; 2000.
2. Varela E, Rojas M, Restrepo G. Association between conventional and computerized sperm quality parameters with flow cytometric evaluation of frozen bovine semen. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Peru*. 2020 Nov 24;31(4):e19023.
3. Adiputra KDD, Maulana T, Kaiin EM, Hasbi H, Sonjaya H. The Semen Quality Of Bali And Simmental Bulls Reared In Technical Implementation Unit Of Regional Artificial Insemination Center At Pucak, South Sulawesi. *Adv Anim Vet Sci*. 2022 Dec 1;10(12):2562–70.
4. Ansari MS, Rakha BA, Akhter S. Cryopreservation of bull semen in OptiXcell® and conventional extenders: Comparison of semen quality and fertility. *Anim Sci Pap Rep*. 2017;35(3):317–28.
5. Naz S, Umair M, Iqbal S. Comparison of Tris egg yolk-based, Trilady1® and Optixell® extender on post-thaw quality, Kinematics and in vivo fertility of Nili Ravi Buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Andrologia*. 2018 Oct 1;e13063.
6. Komariah, M. L. Zuhdi, M. A. Tahar, T. Maulana. Frozen Semen Quality of Simmental Cattle in Various Commercial Diluents. *Jurnal Ilmu Produksi dan Teknologi Hasil Peternakan*. 2023 Jan 29;11(1):41–7.
7. Vishwanath R. Artificial insemination: the state of the art. *Theriogenology*. 2003;59:571–84.
8. Zuidema D, Kerns K, Sutovsky P. An exploration of current and perspective semen analysis and sperm selection for livestock artificial insemination. Vol. 11, *Animals*. MDPI; 2021.
9. Van Eetvelde M, Heras S, Leroy JLMR, Van Soom A, Opsomer G. The Importance of the Periconception Period: Immediate Effects in Cattle Breeding and in Assisted Reproduction Such as Artificial Insemination and Embryo Transfer. In: Fazeli A, Holt W V., editors. *Periconception in Physiology and Medicine* [Internet]. Estonia: Springer; 2017. p. 41–68. Available from: <http://www.springer.com/series/5584>
10. Diskin MG. Review: Semen handling, time of insemination and insemination technique in cattle. Vol. 12, *Animal*. Cambridge University Press; 2018. p. s75–84.
11. Venkatesh S, Murugavel K, Hemalatha H, Kantharaj S, Shalini G. Semen additives for improving frozen-thawed buffalo and cattle semen – a review. *Cryo-Letters*. 2024 Jul 1;45(4):194–211.



12. Baruselli PS, Ferreira RM, Sá Filho MF, Bó GA. Review: Using artificial insemination v. natural service in beef herds. *Animal*. 2018 Jun 1;12(s1):s45–52.
13. Kefelegn S, Alemayehu L, Asrat T. Effect of breed, age and period of production on bovine semen quality used for artificial insemination. *International Journal of Livestock Production*. 2021 Mar 31;12(1):43–8.
14. Valencia J. Inseminación artificial. In: Rangel Porta L, Hernández Medrano JH, editors. *Fisiología Reproductiva de los Animales Domésticos*. 1ra ed. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2018. p. 265–83.
15. Layek SS, Mohanty TK, Kumaresan A, Parks JE. Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders. *Anim Reprod Sci*. 2016 Sep 1;172:1–9.
16. Squires EL. Semen cryopreservation-challenges and perspectives. *Revista brasileira de reprodução animal [Internet]*. 2013;37(2):136–9. Available from: www.cbpa.org.br
17. Ugur MR, Saber Abdelrahman A, Evans HC, Gilmore AA, Hitit M, Arifiantini RI, et al. Advances in Cryopreservation of Bull Sperm. *Front Vet Sci*. 2019 Aug 27;6:268.
18. Saadeldin IM, Khalil WA, Alharbi MG, Lee SH. The current trends in using nanoparticles, liposomes, and exosomes for semen cryopreservation. *Animals*. 2020;10(12):1–16.
19. Grötter LG, Cattaneo L, Marini PE, Kjelland ME, Ferré LB. Recent advances in bovine sperm cryopreservation techniques with a focus on sperm post-thaw quality optimization. *Reproduction in Domestic Animals*. 2019 Apr 1;54(4):655–65.
20. Curry MR. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Rev Reprod*. 2000;5:46–52.
21. Barbas JP, Mascarenhas RD. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank*. 2009;10(1):49–62.
22. Kadirvel G, Kumar S, Kumaresan A. Lipid peroxidation, mitochondrial membrane potential and DNA integrity of spermatozoa in relation to intracellular reactive oxygen species in liquid and frozen-thawed buffalo semen. *Anim Reprod Sci*. 2009 Aug;114(1–3):125–34.
23. IMV Technologies. Optixcell [Internet]. 2024. Available from: www.imv-technologies.com
24. Kumar A, Prasad JK, Srivastava N, Ghosh SK. Strategies to Minimize Various Stress-Related Freeze-Thaw Damages during Conventional Cryopreservation of Mammalian Spermatozoa. *Biopreserv Biobank*. 2019 Dec 1;17(6):603–12.
25. Arav A, Saragusty J. Directional freezing of spermatozoa and embryos. *Reprod Fertil Dev*. 2014;26(1):83–90.



26. Muiño R, Fernández M, Areán H, Viana JL, López M, Fernández A, et al. Nuevas tecnologías aplicadas al procesado y evaluación del semen bovino en centros de inseminación artificial. ITEA. 2005;101(3):175–91.
27. Ax R.L., Dally M., Didion B.A., Lenz R.W., Love C.C., Varner D.D., et al. Evaluación del semen. In: Hafez ESE, Hafez B, editors. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7ªed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2000. p. 375–86.
28. Chaudhari D, Patel J, Hadiya K, Dhami A. Influence of Seasons and Extenders on Quality and Freezability of Gir Bull Semen under Middle Gujarat Climate. *The Indian Journal of Veterinary Sciences & Biotechnology* [Internet]. 2018;13(3):95–100. Available from: <http://dx.doi.org/10.21887/ijvsbt.v13i3.10632>
29. Oliveira MKB, Zandonaide JPB, Severo NC, Gomes AL, Igarasi MS, Quintal APN, et al. Comparação de diluidores comerciais na motilidade, funcionalidade e integridade da membrana plasmática do espermatozoide bovino. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*. 2018;25(2):67–71.
30. Tribulo H, Bo G. Biotecnologías reproductivas. In: Galina C, Valencia J, editors. Reproducción de animales domésticos. 3ra ed. México: LIMUSA; 2008. p. 543–74.
31. Lamb GC, Dahlen CR, Larson JE, Marquezini G, Stevenson JS. Control of the estrous cycle to improve fertility for fixed-time artificial insemination in beef cattle: a review. Vol. 88, *Journal of animal science*. 2010.
32. Cardoso Consentini CE, Wiltbank MC, Sartori R. Factors that optimize reproductive efficiency in dairy herds with an emphasis on timed artificial insemination programs. *Animals*. 2021 Feb 1;11:301.
33. Baruselli PS, Batista EOS, Vieira LM, Sales JN de S, Gimenes LU, Ferreira RM. Intrinsic and extrinsic factors that influence ovarian environment and efficiency of reproduction in cattle. *Anim Reprod*. 2017;14(1):48–60.
34. RAE. <https://dle.rae.es/>. 2024. Diccionario de la lengua española.
35. Fleisch A, Malama E, Witschi U, Leiding C, Siuda M, Janett F, et al. Effects of an extension of the equilibration period up to 96 hours on the characteristics of cryopreserved bull semen. *Theriogenology*. 2017 Feb 1;89:255–62.
36. Kumar P, Saini M, Kumar D, Balhara AK, Yadav SP, Singh P, et al. Liposome-based semen extender is suitable alternative to egg yolk-based extender for cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Anim Reprod Sci*. 2015 Aug 1;159:38–45.
37. Chaudhary PJ, Dhami AJ, Chaudhari DV, Pathan MM. Leakage of transaminases during cryopreservation of cattle and buffalo semen in egg yolk tris and soya bean milk based extenders. *Indian Journal of Animal Reproduction*. 2018;39(2):32–5.
38. Singh A, Bhakat M, Mohanty TK, Mondal S, Yadav SK, Kumar P, et al. Effect of Tris-egg Yolk, Soya Milk, and Liposome-based Extenders on Sahiwal (*Bos indicus*)



Sperm Quality during Pre-and Post-Cryopreservation Stages. *CryoLetters* [Internet]. 2019;40(2):94–102. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/333191935>

39. Singh AK, Kumar A, Honparkhe M, Kaur S, Kaur H, Ghuman SPS, et al. Comparison of in vitro and in vivo fertilizing potential of buffalo bull semen frozen in egg yolk-, soya bean lecithin- and liposome-based extenders. *Reproduction in Domestic Animals*. 2018 Feb 1;53(1):195–202.
40. Tahmasbian H, Ayen E, Khaki A. Evaluation of the effects of hesperidin on fresh and frozen-thawed semen quality using two different cryopreservation methods in Simmental bull. *Anim Reprod*. 2022;19(3):e20220042.
41. Miguel-Jimenez S, Rivera del Alamo MM, Álvarez-Rodríguez M, Hidalgo CO, Peña AI, Muiño R, et al. In vitro assessment of egg yolk-, soya bean lecithin- and liposome-based extenders for cryopreservation of dairy bull semen. *Anim Reprod Sci*. 2020 Apr 1;215:106315.
42. Olfati Karaji R, Daghigh Kia H, Ashrafi I. Effects of in combination antioxidant supplementation on microscopic and oxidative parameters of freeze-thaw bull sperm. *Cell Tissue Bank*. 2014;15(3):461–70.
43. Murphy EM, O'Meara C, Eivers B, Lonergan P, Fair S. Comparison of plant- and egg yolk-based semen diluents on in vitro sperm kinematics and in vivo fertility of frozen-thawed bull semen. *Anim Reprod Sci*. 2018 Apr 1;191:70–5.
44. Kang SS, Kim UH, Lee SD, Yang BC, Yang BS, Cho SR. Effect of Optixcell and Triladyl extenders on frozen-thawed sperm motilities and calving rates following artificial insemination in Hanwoo. *Korean Journal of Agricultural Science*. 2019;46(1):195–204.
45. Colazo MG, Mapletoft RJ. A review of current timed-AI (TAI) programs for beef and dairy cattle. *The Canadian Veterinary Journal* [Internet]. 2014;55:772–80. Available from: <http://beefrepro.unl.edu/resources.html>.
46. Salinas Rivera JL, García Salas MEC, Cárdenas Medina MG, Cabrera Villanueva PC, Pallette Pallette AE, Rodríguez Franco GJ, et al. Oferta de semen bovino lechero importado y nacional en el Perú del 2003 al 2014. *Anales Científicos*. 2018 Jun 22;79(1):137–43.



ANEXOS











