

UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURÍMAC

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



**Colorantes Diff-Quik y Eosina-Nigrosina en la evaluación
morfológica de espermatozoides antes y después de la
criopreservación del semen del toro Holstein**

TESIS

PRESENTADA POR:

PERCY MALLMA MARCA

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

ABANCAY - PERÚ

2019



UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURÍMAC

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



TESIS

Colorantes Diff-Quik y Eosina-Nigrosina en la evaluación morfológica de espermatozoides antes y después de la criopreservación del semen del toro Holstein

Presentado por: PERCY MALLMA MARCA, para optar el título profesional de Médico Veterinario y Zootecnista

Sustentado y aprobado el 04 de junio de 2019 ante el jurado:


Presidente:


MVZ. Victor Raúl Cano Fuentes

Primer miembro:


MSc. Deliver Zea Gonzales

Segundo miembro:


MVZ. Juan Roberto Simcoo Quipe

Asesor:


Dr. Ulises Sandoval Quipe Gutiérrez

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac, por abrirme las puertas y por darme la oportunidad de formar parte de ella.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAMBA, por mostrarme el sendero del conocimiento y formación académica.

A mi padre Frido Mallma Cabrera por sus consejos, a mis hermanos y hermanas por apoyarme a dar un paso más de mi vida.

A Mery Quintanilla Dueñas por su paciencia y apoyo intelectual para el desarrollo del presente trabajo.

Al Dr. Ulises Sandro Quispe Gutiérrez, por asesorarme para llevar cabo el presente trabajo, ya que, sin su apoyo, su exigencia, sus consejos, sus críticas no hubieran sido posibles.

A MVZ. Víctor Raúl Cano Fuentes, MSc. Delmer Zea Gonzales y MVZ. Juan Roberto Soncco Quispe, miembros del jurado evaluador de esta Tesis, por su aporte esencial y participación activa en el desarrollo de esta investigación.

Al Sr. Demetrio Cconislla Arando y esposa por colaborarme con el cuidado del toro y las vacas en el centro experimental de Pachachaca.



Dedicatoria

Mi tesis la dedico a Dios todo poderoso y a Sta. Cecilia patrona de los músicos.

A mis tres amores, mi madre Mariel Marca Enciso, mi novia Mery Quintanilla Dueñas quien me dio el motivo más grande en mi vida para seguir adelante y a mi hija Alejandra Zoe Mallma Quintanilla.



ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
RESUMEN	2
ABSTRACT	3
CAPÍTULO I	4
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	4
1.1 Descripción del problema	4
1.2 Enunciado	5
1.3 Objetivos	5
1.4 Justificación	6
1.5 Delimitaciones	7
CAPÍTULO II	8
MARCO TEÓRICO	8
2.1 Antecedentes de la investigación	8
2.2 Marco referencial	11
2.2.1 Inseminación artificial (IA)	11
2.2.2 Colección del semen bovino	12
2.2.3 Conservación de semen	13
2.2.4 Congelación de semen	14
2.2.5 Descongelación de semen	14
2.2.6 Evaluación del semen	15
2.2.7 Tinciones para evaluar la morfología espermática	25
2.3 Definición de términos	28
CAPÍTULO III	29
DISEÑO METODOLÓGICO	29
3.1 Definición de variables	29
3.2 Operacionalización de variables	30
3.3 Hipótesis de la investigación	31
3.4 Tipo y diseño de la investigación	31
3.5 Población y muestra	31
3.5.1 Población	31
3.5.2 Muestra	31
3.6 Procedimiento de la investigación	32



3.6.1 Localización.....	32
3.6.2 Animales y diseño experimental.....	32
3.6.3 Colección y transporte de semen.....	32
3.6.4 Motilidad espermática	33
3.6.5 Coloración de espermatozoides.....	33
3.6.6 Coloración de muestras después de la congelación.....	34
3.6.7 Evaluación morfológica del espermatozoide	36
3.6.8 Análisis estadístico	36
3.7 Material de investigación	37
3.7.1 Materiales por procedimiento	37
3.7.2 Instrumentos de investigación.....	38
CAPÍTULO IV.....	39
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
4.1 Anomalías morfológicas de la cabeza de espermatozoides.....	39
4.2 Anomalías morfológicas del cuello de espermatozoide.....	41
4.3 Anomalías morfológicas de la cola de espermatozoide.....	42
CAPÍTULO V.....	45
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	45
a) Conclusiones.....	45
b) Recomendaciones	45
Referencias Bibliográficas	46
Anexos.....	56



ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Esquema de anomalías morfológicas de los espermatozoides.	18
Cuadro 2. Composición del colorante Eosina-Nigrosina (85).	27
Cuadro 3. Operacionalización de variables.....	30
Cuadro 4. Composición del dilutor Tris.....	35
Cuadro 5. Porcentaje (media \pm desviación estándar) de anomalías morfológicas de la cabeza de los espermatozoides de toro Holstein, antes y después de la congelación, utilizando tinciones Diff-Quik (DQ) y Eosina-Nigrosina (EN).	39
Cuadro 6. Porcentaje (media \pm desviación estándar) de anomalías morfológicas del cuello de los espermatozoides de toro Holstein, antes y después de la congelación, utilizando tinciones Diff-Quik (DQ) y Eosina-Nigrosina (EN).	41
Cuadro 7. Porcentaje (media \pm desviación estándar) de anomalías morfológicas de la cola de los espermatozoides de toro Holstein, antes y después de la congelación, utilizando tinciones Diff-Quik (DQ) y Eosina-Nigrosina (EN).	43
Cuadro 8. Ficha de registro de anomalías morfológicas de espermatozoides de semen de toro	57



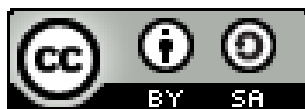
ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Espermatozoides normales del espermatozoide de toro.	20
Figura 2. Cabezas piriformes y angostas del espermatozoide de toro.....	20
Figura 3. Microcefalia y macrocefalia del espermatozoide de toro.	21
Figura 4. Vacuolas nucleares del espermatozoide de toro.	21
Figura 5. Pieza media distal doblada del espermatozoide de toro.....	22
Figura 6. Espermatozoides de cola corta o "stunp tail deffect".....	22
Figura 7. Pieza principal doblada del espermatozoide de toro.....	23
Figura 8. Piezas intermedias arqueada.	23
Figura 9. Gota citoplasmática proximal del espermatozoide de toro.	24
Figura 10. Gota citoplasmática distal del espermatozoide de toro.....	24
Figura 11. Espermatozoides anormales a) esperma normal, b) abaxial, c) macrocéfalo, d) microcéfalo, e) cabeza separada, f) contorno anormal, g) pera, h) estrecho, i) No desarrollado, j) Doble cabeza (77).....	25
Figura 12. Colección de muestra seminal, con la técnica de vagina artificial.....	57
Figura 13. Secado de muestras seminales en placas porta objetos después de la tinción con Diff - Quik.	58
Figura 14. Secado de muestras seminales en placas porta objetos después de la tinción con Eosina – Nigrosina.....	58
Figura 15. Espermatozoides con tinción Diff-Quik: (1) microcefalia, (2) cabeza cónica estrecha, (3) periforme, (4) acrosoma desprendido.	59
Figura 16. Espermatozoides con tinción Diff-Quik: (1) macrocéfalo, (2) dos cabezas, (3) cabeza normal desprendida, (4) cuello descentrado.	59
Figura 17. Espermatozoides con tinción Eosina-Nigrosina: (1) dos cabezas, (2) cuello descentrado, (3) dos colas, (4) cuello hinchado.....	60
Figura 18. Espermatozoides con tinción Eosina-Nigrosina: (1) dos cuellos, (2) macrocéfalo, (3) cola doblada, (4) espermatozoide con cola en muñón con tinción Diff-Quik.	60



Colorantes Diff-Quik y Eosina-Nigrosina en la evaluación morfológica de espermatozoides antes y después de la criopreservación del semen del toro Holstein

Esta publicación está bajo una licencia de Creative Commons.



Introducción

La criopreservación del semen para la inseminación artificial (IA) sirve como un instrumento para difusión del material genético de los animales, por lo que es necesario que el material fecundante de los machos sea sometido a tecnologías eficientes (1). El uso del semen de toro con altos niveles de anomalías espermáticas, no se recomienda para la IA porque probablemente conduciría a la subfertilidad (2). La morfología espermática es un factor determinante en la capacidad de fertilización del semen, ya que existe una correlación entre defectos espermáticos e infertilidad (3).

El examen morfológico del semen es una prueba de control de calidad. Cada eyaculado contiene una serie de espermatozoides anormales, pero si la proporción de estos es muy alta entonces nos encontraremos ante un semen de baja calidad (4). Existen varios procedimientos de tinción de espermatozoides, los cuales permiten evaluar los espermatozoides (5). La coloración con Diff-Quik o Eosina-Nigrosina son métodos de tinciones que favorecen la determinación morfológica de cabeza y cuello (pieza intermedia) del espermatozoide, además de valorar su forma, permitiendo la categorización de los espermatozoides (6).

Los estudios actuales sobre contrastación seminal persiguen como objetivo final identificar algún parámetro cinético, morfológico o bioquímico que indique el estado de la célula espermática (7). Las tinciones simples visualizan integralmente el espermatozoide y son sencillas su uso (8). La tinción Diff-Quik es un método de tinción simple que mancha la cabeza del esperma azul claro / violeta, el acrosoma azul pálido, la cola y pieza intermedia azul o rojizo (9). La tinción de eosina- nigrosina además de teñir a los espermatozoides, permite observar la morfología del espermatozoide (10). La evaluación morfológica de espermatozoides del toro es importante para predecir el resultado del espermatozoide congelado-descongelado en una inseminación artificial o programas de fertilización *in vitro*. Por tales consideraciones, se planteó el presente estudio con el objetivo de evaluar las anomalías morfológicas de espermatozoides, con dos colorantes en la criopreservación del semen del toro Holstein.



Resumen

El objetivo del estudio fue Evaluar la morfología espermática utilizando colorantes Diff-Quik (DQ) y Eosina-Nigrosina (EN) antes y después de la criopreservación del semen del toro Holstein. Se formaron 4 grupos de tratamientos (T), T1: Tinción DQ antes de congelación; T2: Tinción EN antes de congelación, T3: Tinción DQ después de congelación; T4: Tinción EN después de congelación del semen. Las muestras de semen se colectaron de un toro Holstein de 2 años de edad, utilizando vagina artificial, dos veces por semana hasta 10 colecciones, se evaluó el semen fresco y criopreservado, en distintos campos escogidos al azar. Se realizó el análisis de varianza mediante el procedimiento GLM del SAS y prueba de Tukey, bajo el diseño completamente al azar. Los defectos de la morfología de la cabeza gigante, pequeña, piriforme, cónica y estrecha, dos cabezas, defecto de acrosoma, normales desprendidas entre la coloración de DQ y EN son similares ($P > 0.05$), los defectos morfológicos del cuello de los espermatozoides: descentrado, doble, en espiral, granular son similares ($P > 0.05$) entre las tinciones de DQ y EN durante la pre y post congelación de semen. Hay mayor ($P \leq 0.05$) defecto de gota citoplasmática proximal en espermatozoides coloreados con EN versus DQ durante pre y post congelación de semen; las anomalías espermáticas de la cola corta, abaxial, dos colas, gota citoplasmática distal son similares ($P > 0.05$) con la coloración DQ y EN antes y post congelación de semen. Se identifica mayor porcentaje ($P > 0.05$) de anomalía de cola doblada con tinción de EN que DQ antes y después la congelación de semen de toro. Se concluye, que la coloración EN muestra mayores defectos del cuello antes de la congelación, de la cola antes y después de la congelación; siendo EN y DQ similares para identificar defectos de cabeza de espermatozoides de toro.

Palabras clave: Espermatozoide, anormalidad, anomalía, tinción, criopreservación.



Abstract

The objective of the study was to evaluate the sperm morphology using Diff-Quik (DQ) and Eosin-Nigrosine (EN) dyes before and after the cryopreservation of Holstein bull semen. Four treatment groups were formed (T), T1: DQ stain before freezing; T2: EN staining before freezing, T3: DQ staining after freezing; T4: EN staining after freezing of semen. Semen samples were collected from a 2-year-old Holstein bull, using artificial vagina, twice a week to 10 collections, fresh and cryopreserved semen was evaluated in different randomly selected fields. Analysis of variance was performed using the SAS GLM procedure and Tukey test, under the completely randomized design. The defects of the giant head morphology, small, piriform, conical and narrow, two heads, acrosome defect, normal detached between the coloration of DQ and EN are similar ($P > 0.05$), the morphological defects of the neck of the sperm : Off-center, double, spiral, granular are similar ($P > 0.05$) between the DQ and EN stains during the pre and post-freezing of semen. There is a greater ($P \leq 0.05$) proximal cytoplasmic drop defect in spermatozoa colored with EN versus DQ during pre- and post-freezing of semen; The spermatid anomalies of the short tail, abaxial, two tails, distal cytoplasmic droplet are similar ($P > 0.05$) with the coloration DQ and EN before and after freezing of semen. A higher percentage ($P > 0.05$) of bent tail anomaly is identified with EN D staining before and after the freezing of bull semen. It is concluded that the EN coloration shows greater defects of the neck before freezing, of the tail before and after freezing; being similar EN and DQ to identify head defects of sperm of bull.

Key words: Sperm, abnormality, anomaly, staining, cryopreservation.



CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Descripción del problema

Actualmente, las técnicas de tinción de espermatozoides fueron estandarizadas en laboratorios especializados en fertilidad, una preocupación persistente es la variabilidad, que puede afectar los resultados (11); El método utilizado para evaluar la morfología de los espermatozoides, diferencias individuales en la técnica de coloración o en la lectura de las muestras, pueden ser responsables de los cambios en los resultados (11). Existen colorantes y procedimientos diferentes de tinción que se utilizaron con éxito para evaluar la morfología de los espermatozoides, aunque pocos estudios han comparado su efectividad (12).

Las tinciones se han utilizado para analizar la estructura del espermatozoide, pero las diferencias relacionadas con la preparación, el tipo de tinte (13); la baja penetración de la tinción (11), podrían influir en los tipos de anomalías del espermatozoide, particularmente en defectos de la parte media, cabeza y acrosoma, así como gotas citoplasmáticas (14). Hechos que repercutirían negativamente en la morfología espermática (15). La proporción de anomalías del espermatozoide se correlacionan negativamente con la fertilidad, en particular las cabezas piriformes (2). La incidencia de morfologías anormales más allá de los valores esperables es indicio de problemas reproductivos (16). Es aceptable un 20% de anormalidades como límite máximo en una para procesos de biotecnología reproductiva (17).

Existe diferentes tinciones para la evaluación de la morfología de espermatozoides (18). Como la tinción Eosina-Nigrosina muestra el doble del porcentaje de espermatozoides anormales en comparación con otros colorantes (19). No obstante, permite la visualización de todas las regiones del espermatozoide sin afectar a la célula, y se puede usar para la mayoría de las especies (20). Tanto para semen fresco como congelado se puede evaluar adecuadamente (21). Además la coloración de Diff-Quik es un método confiable (22). Sin embargo, existe controversias de resultados entre tinciones en los defectos morfológicos del espermatozoide del toro Holstein.



1.2 Enunciado

- **General**

¿Cuál de los colorantes, Diff-Quik o Eosina-Nigrosina, permite observar mejor las anomalías morfológicas del espermatozoide, antes y después de la criopreservación del semen del toro Holstein?

- **Específicos**

a) ¿Qué colorante, Diff-Quik o Eosina-Nigrosina, permite observar mejor las anomalías morfológicas de la cabeza de espermatozoides, en la criopreservación de semen de toro Holstein?

b) ¿Cuál de los colorantes, Diff-Quik o Eosina-Nigrosina, permite observar mejor las anomalías morfológicas del cuello de espermatozoides, en la criopreservación de semen de toro Holstein?

c) ¿Qué colorante, Diff-Quik o Eosina-Nigrosina, permite observar mejor las anomalías morfológicas de la cola de espermatozoides, en la criopreservación de semen de toro Holstein?

1.3 Objetivos

- **General**

Evaluar la morfología espermática utilizando los colorantes Diff-Quik y Eosina-Nigrosina antes y después de la criopreservación del semen del toro Holstein.

- **Específicos**

a) Determinar el porcentaje de anomalías morfológicas de la cabeza de espermatozoides, utilizando colorante Diff-Quik y Eosina-Nigrosina, en la criopreservación del semen de toro Holstein.

b) Calcular el porcentaje de las anomalías morfológicas del cuello de espermatozoides, utilizando colorante Diff-Quik y Eosina-Nigrosina, en la criopreservación del semen de toro Holstein.



- c) Determinar el porcentaje de las anomalías morfológicas de la cola de espermatozoides, utilizando colorante Diff-Quik y Eosina-Nigrosina, en la criopreservación del semen de toro Holstein.

1.4 Justificación

La IA es la técnica de reproducción asistida en bovinos que más impacto ha tenido en la producción y mejoramiento genético (23). Es una biotecnología reproductiva más antigua y más difundida en la especie bovina. Es indispensable que el semen utilizado mantenga su capacidad de fertilización después del proceso de congelado-descongelado (24). La evaluación del espermatozoide es de importancia vital para la utilización en programas de IA en bovinos. Con espermatozoides seleccionados se acelera el mejoramiento mediante un aumento del progreso genético animal (25).

La morfología espermática es importante en la valoración de la fertilidad. Existe una alta correlación entre los defectos espermáticos e infertilidad, por lo que es importante visualizarlos (26). El uso de colorantes es esencial para visualizar la morfología del espermatozoide (27). Entre los parámetros tradicionales del análisis de calidad espermática, el estudio morfológico tiene gran importancia dada su relación con el potencial reproductivo (2). La evaluación de su forma a través de diferentes tinciones (28). La Eosina-Nigrosina tiene ventaja de ser rápida además de visualizar las anomalías de la pieza media y cola del espermatozoide (29). La Tinción Diff-Quik ayuda determinar la morfología espermática de la cabeza (13). Los colorantes Eosina-Nigrosina y Diff-Quik permitiría evaluar mejor las características morfológicas espermáticas del toro, para predecir la fertilidad.

Existen diversos métodos para analizar la morfología espermática, las tinciones dobles (Giemsa, William, Papanicolau) visualizan partes específicas del espermatozoide, mientras que las tinciones simples visualizan integralmente y son más sencillas (8). La tinción Diff-Quik es una técnica sencilla, rápida y de bajo costo (30). Esta tinciona la cabeza de morado pálido, mientras que la pieza media y la cola se tiñen de morado oscuro (31). También la tinción con Eosina-Nigrosina la cual permite la preparación rápida de un frotis que puede examinarse con un microscopio óptico convencional, la técnica sería una herramienta útil para la evaluación en condiciones de campo (32). La simplicidad de uso de colorantes, permitiría la utilización masiva y en campo para determinar, a través de la morfología espermática, la fertilidad del toro, siendo este una alternativa en los procesos de programas de IA con fines de mejoramiento genético en bovinos.



1.5 Delimitaciones

El presente estudio involucró los colorantes Diff-Quik y Eosina-Nigrosina en la evaluación morfológica de espermatozoides antes y después de la criopreservación del semen del toro Holstein. Cuya unidad de investigación fue semen colectado con 10 repeticiones. Se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, ubicado en Patibamba Baja, del distrito y provincia de Abancay, Apurímac, Perú. Durante agosto de 2017 a enero de 2018.



CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de la investigación

Los objetivos de este estudio fueron determinar las asociaciones de raza, edad y circunferencia escrotal (SC), y su interacción, sobre la prevalencia de anomalías de espermatozoides en los toros, Canadá. Se realizaron frotis de semen luego fueron teñidos con Eosina y Nigrosina. se obtuvieron informes de evaluación de 1642 evaluaciones de solidez en la reproducción de toros de 6 clínicas veterinarias en Alberta. La morfología del espermatozoides se determinó para al menos 100 espermatozoides por toro. Los defectos más comunes fueron la cabeza desprendida ($4.86\% \pm 5.71$), reflejo de la parte media distal ($6.19\% \pm 9.13\%$) y cola doblada ($1.01\% \pm 1.54\%$). Aunque la raza, la edad y la SC no afectaron significativamente la prevalencia de defectos en la cabeza o en la parte media, el espermatozoides morfológicamente normal o anormal, los defectos en la cola fueron más frecuentes en los toros Angus y Hereford en comparación con otras razas. En general, solo sobre la base de la morfología de los espermatozoides, 1363 (83.0%) toros fueron clasificados como criadores potenciales satisfactorios y el resto 279 (17.0%) como insatisfactorios ($> 30\%$ de espermatozoides anormales, $> 20\%$ de cabezas defectuosas, o ambas). Aunque no es significativamente diferente, la raza con el mayor porcentaje de criadores potenciales satisfactorios fue Limousin (90.6%) y la más baja fue Hereford (78.8%) (33).

Con los objetivos de comparar dos métodos diferentes para evaluar la morfología del espermatozoides de toro fueron evaluados por microscopía de campo claro (BF) con de frotis de semen seco de montura seca teñida con Eosina-Nigrosina (EN) y la microscopía de contraste por interferencia diferencial (DIC) de montura húmeda semen fijo en solución salina isotónica formal, ($n = 72$) fueron evaluados, se obtuvo eyaculados antes y después de la temporada de la reproducción obtenidos de 40 toros de 2 años de edad mediante electroeyaculación. Para ambos métodos, se contabilizaron 200 espermatozoides en diferentes campos, fueron categorizados como defectos mayores (MAD) y menores (MID). Hubo diferencias ($P \leq 0.05$) entre los métodos DIC y BF, MAD 23.3 / 16.1, MID 7.6 / 13.4, acrosoma 3.8 / 1.1, pieza media 9.2 / 11.7, cola 2.0 / 4.7, gota citoplasmática 8.3 / 4.2, pero no hubo diferencias ($P > 0.05$) en porcentaje de defectos en la cabeza del espermatozoides 7.5 / 8.3. Se observaron defectos de acrosoma, cola y gota citoplasmática en 98.2 / 80.5, 86.1 / 100 y 98.2 / 94.4 por ciento de los toros para DIC y BF, respectivamente ($P \leq 0.05$). Como el porcentaje



de espermatozoides normales no difirió entre los métodos, la evaluación por microscopía de campo claro de las preparaciones de EN se consideró un método satisfactorio para clasificar la buena crianza de los toros. Sin embargo, el DIC fue más efectivo en la visualización de defectos mayores, mientras que se consideró que BF (que incluía la preparación de frotis teñida) causaba más defectos menores. Por lo tanto, se consideró que DIC fue el método adecuado para la evaluación del semen en la morfología de los espermatozoides de toros (21).

El objetivo del estudio ha sido validar el Sperm-Class Analyzer® (SCA) para investigar el efecto de la estacionalidad y congelación-descongelación sobre los parámetros morfométricos de la cabeza del espermatozoide de macho cabrío. Para validar el SCA, se recogieron 16 eyaculados de 4 machos determinado el número de células a analizar y la influencia de 3 tinciones (Diff-Quik, Hemacolor y Hematoxilina de Harris) en la eficacia del análisis y valores morfométricos. La estacionalidad se valoró sobre 76 eyaculados recogidos de 2 machos durante 1 año. Los parámetros morfología, acrosoma y los morfométricos de tamaño (longitud, anchura, área y perímetro) y forma (elipticidad) de la cabeza, se compararon antes y después de congelar. Para valorar el efecto de la congelación-descongelación sobre los parámetros morfométricos en función de la congelabilidad de los eyaculados, estos se clasificaron en aptos o no aptos según los parámetros seminales evaluados antes y después de congelar. Analizar 100 espermatozoides por preparación empleando Diff-Quik, resultó el método más eficaz para valorar con el SCA la morfometría espermática. La estacionalidad influyó sobre los parámetros morfométricos, aumentando el tamaño de la cabeza y disminuyendo su elipticidad durante el otoño, y formas normales. Además, en los periodos más calurosos disminuyó el tamaño de la cabeza y aumentó su elipticidad. La congelación-descongelación redujo el tamaño de la cabeza y aumento su elipticidad. Estos cambios morfométricos podrían indicar daño celular ocurrido durante la congelación-descongelación y entonces valorar la congelabilidad de una muestra de esperma (34).

En una investigación uno de los objetivos fue evaluar la morfología con tinción Eosina-Nigrosina en la criopreservación de espermatozoides epididimarios de potro. Las muestras fueron evaluadas en 2 momentos: pre y post congelamiento. En el post congelamiento se realizaron 2 evaluaciones una que se tomó como control para las muestras que conservan plasma seminal, y tratamiento para las muestras que fueron centrifugadas y de las cuales el plasma ha sido eliminado. En el grupo control, la presencia de plasma seminal, demuestra que a pesar del bajo porcentaje de espermatozoides móviles que se observaron ($8.75\% \pm 5.2$ control vs. $2.5\% \pm 2.6$ tratamiento), existen diferencias significativas entre ambos grupos ($P=0.006$). Sin embargo, no se evidenciaron diferencias significativas en morfología:



anormalidades de cabeza $12.6\% \pm 6.2$ control vs. $8.6\% \pm 3.2$ tratamiento ($P=0.113$); anomalía de cuello $5.5\% \pm 2.3$ control vs. $7.6\% \pm 4.5$ tratamiento ($P=0.107$), anomalía de cola $46.6\% \pm 21.4$ control vs. $28.6\% \pm 22.3$ tratamiento ($P=0.025$). En conclusión, los espermatozoides epididimarios expuestos al medio Lactosa EDTA plasma seminal incrementan su motilidad, conservando la morfofisiología en el post congelamiento (35).

En un estudio evaluaron 47 toros entre 15 y 26 meses de edad, fueron utilizados para estudiar la relación entre la morfología de los espermatozoides con tinción Eosina-Nigrosina en semen fresco y la fertilidad (tasa de no retorno de 56 días) en semen congelado después de 11.749 inseminaciones. La morfología del espermatozoide se estudió en dos operaciones de congelación / toro en un microscopio de contraste de fase y las anomalías morfológicas se registraron como un porcentaje del número total de espermatozoides contados. Las categorías morfológicas utilizadas en este estudio fueron cabezas anormales, cabezas desprendidas, acrosomas anormales, gotas citoplasmáticas proximales, piezas intermedias anormales y colas anormales. El mayor valor medio registrado para las categorías investigadas se encontró para cabezas anormales (3.8%) pero la mayoría de las anomalías morfológicas solo ocurrieron en aproximadamente el 1% de todos los espermatozoides estudiados. Se encontraron efectos en las razas, con una incidencia algo mayor ($P < 0.05-0.01$) de anomalías en los espermatozoides y una menor fertilidad entre los SRB que entre los toros SLB. A pesar de la baja frecuencia de anomalías espermáticas, se encontraron correlaciones estadísticamente significativas ($p \leq 0.05-0.001$) entre cabezas anormales, bolsas nucleares y gotitas citoplásmicas proximales evaluadas en semen fresco y fertilidad (tasa de no retorno de 56 días) de semen congelado (36).

En este estudio prospectivo, la morfología de los espermatozoides equinos se evaluó utilizando 3 métodos de tinción Diff-Quik, Eosina-Nigrosina y SpermBlue. Nuestra hipótesis fue que SpermBlue permite una evaluación más fácil de la morfología de los espermatozoides del caballo y facilita una mejor identificación de las anomalías espermáticas, y la clasificación de la morfología de los espermatozoides difiere según la experiencia del evaluador. El semen se obtuvo de varias razas de caballos; Se recolectaron 40 muestras de sementales de entre 2 y 15 años de edad durante la temporada de reproducción 2016 y se almacenaron en una solución de formaldehído tamponada al 2% hasta el procesamiento. Para cada muestra, se realizaron 3 frotis de semen y se tiñeron con Diff-Quik, Eosina-Nigrosina y SpermBlue. Todos los parámetros morfológicos fueron evaluados con un microscopio óptico. Se examinaron 200 espermatozoides al azar y se clasificaron según sus características. Para la identificación de espermatozoides morfológicamente normales, no se encontraron diferencias significativas



entre los evaluadores con ninguno de los métodos de tinción utilizados. Por el contrario, se observaron diferencias significativas entre los evaluadores en la clasificación de algunas anomalías que afectan principalmente a la pieza intermedia y la cola (11).

Uno de los objetivos fue la evaluación morfológica de espermatozoides epididimarios de gatos, se examinó con dos métodos de tinción: una tinción secada al aire (Diff-Quik) y una tinción húmeda (Eosina-Nigrosina). Los espermatozoides del epidídimo presentan más anomalías porque el proceso de maduración no ha concluido. Los porcentajes de los espermatozoides morfológicamente normales fueron significativamente más bajos con Eosina-Nigrosina que con Diff-Quik (46.5% vs 53.4%; $P < 0.01$), ambos examinados por microscopía de campo claro. El análisis diferenciado de las anomalías espermáticas de cabeza, parte media y cola mostraron que ambos métodos pueden diferir en su capacidad para identificar las diversas anomalías, Aunque no se observaron diferencias significativas para las anomalías secundarias, cuando se estudiaron las gotas citoplásmicas se detectaron diferencias (1.6% frente a 8.2%; $P \leq 0.001$). Los resultados sugieren que las técnicas de tinción pueden alterar la morfología de los espermatozoides felinos, además en el espermatozoide epididimario se presenta más gotas citoplasmáticas que el espermatozoide eyaculado (37).

Uno de los objetivos del estudio fue analizar la morfología de los espermatozoides del gato utilizando la tinción Diff-Quik, que se usa en laboratorios de reproducción humana. Varios tipos de anomalías podrían caracterizarse con este método. Las anomalías en la tinción de la cabeza del espermatozoide observadas con el método de tinción Diff-Quik se correlacionaron fuertemente, y podrían predecir con precisión, los defectos del ADN espermático detectados en la misma muestra utilizando la prueba TUNEL. Por lo tanto, sugerimos que el análisis de la morfología del esperma con Diff-Quik se pueda usar en condiciones de campo para evaluar el estado del esperma, debido a la simplicidad del procedimiento y el equipo (9).

2.2 Marco referencial

2.2.1 Inseminación artificial (IA)

La IA es una de las técnicas más usadas por los ganaderos progresistas y consiste en la colocación del material seminal en el genital de la hembra, en la que elimina la participación del macho en forma directa, como sucede en la monta natural (38). Supondría numerosas ventajas en los programas de selección. La IA sigue siendo una herramienta viable, económica y eficiente en programas de mejoramiento genético de pequeños productores, no obstante, se hace necesario optimizar otros aspectos que afectan la fertilidad como la nutrición



y salud de hato (39). En la IA, las deficiencias seminales que llevan a fallas en la fertilización han sido definidas como compensables cuando son eliminadas o marcadamente reducidas al incrementar el número de espermatozoides en la dosis de inseminación. Mientras que las deficiencias son no compensables cuando los espermatozoides son capaces de recorrer el tracto femenino, llegar al sitio de fertilización, pero son incompetentes para llevar a cabo la misma y/o sostener el desarrollo embrionario (40).

2.2.2 Colección del semen bovino

Se considera que la obtención de semen es el primer paso dentro de un programa de congelación, preservación e inseminación artificial. Esta primera fase es de vital importancia para la obtención de muestras de óptima calidad, así como para la adecuada utilización de los sementales (41). La colección de semen depende de una buena y constante producción espermática para que la calidad del semen sea buena. Las técnicas de colección de semen están bastante desarrolladas en otros animales, especialmente en rumiantes domésticos en los cuales ya es un procedimiento de rutina (42). Existen básicamente tres métodos de colección de semen de los bovinos: método del masaje, vagina artificial y el método del electro eyaculador (43). Las condiciones de trabajo para coleccionar semen de bovino, el estado de salud del animal y la experticia del personal especializado que opera, son factores que deben tomarse en cuenta para mejorar la calidad del semen. Si se cuenta con reproductores de alto valor genético y se desea obtener el mayor número de dosis de semen de alta calidad, a fin de transmitir esas cualidades a un mayor número de descendientes, se dispone de dos recursos para aumentar el número de espermatozoides recogidos por unidad de tiempo, ellos son: la preparación sexual previa a la colección, cuyas ventajas son reconocidas y el aumento de la frecuencia de eyaculación. Estudios en la raza Holstein sugieren una frecuencia de colección de 2 eyaculados, 2 veces por semana para reproductores de 44 meses; En Brahman rojo y blanco se sugiere una frecuencia de 2 eyaculados una vez por semana para reproductores de 48 a 60 meses, recomendando una abstinencia sexual entre 5 y 7 días al iniciar el período de colección. El intervalo de colección de semen es de importancia debido a que una alta frecuencia puede afectar la concentración espermática y la madurez de los espermatozoides; por el contrario, una baja frecuencia de colección puede afectar la motilidad espermática y su vitalidad (44).



a) Método de la vagina artificial

La vagina artificial está constituida por un cilindro rígido de dimensiones diferentes en función de la edad del semental. En ambos extremos del cilindro se fija la camisa de caucho que delimita una cámara interior. El espacio interior se rellena de agua a 45 °C a través de una válvula, pudiendo insuflarse también aire con el objeto de incrementar la presión y facilitar la eyaculación del semental. En uno de los extremos del cilindro se acopla un embudo de caucho unido a un tubo de vidrio graduado, protegido de la luz y del frío por una funda protectora. El pene en erección se introduce en el interior de la vagina artificial y, gracias a las condiciones de temperatura y presión, se desencadena la eyaculación del macho (45).

La vagina artificial (VA) es el equipamiento más simple, económico y más utilizado en la obtención de semen, por el hecho que permite la simulación de la copula natural, permitiendo eyaculados más parecidos fisiológicamente a los naturales con una alta calidad. Los componentes usuales de una VA incluyen, un tubo rígido, una camisa interior de caucho o látex, conectada a una válvula que permite el llenado con agua caliente y la insuflación de aire, permitiendo ajustar la presión de la vagina, varias bandas elásticas de caucho permiten la sujeción del cono colector de látex, un tubo colector de semen y una cubierta protectora con aislamiento de temperatura y de los rayos solares (46).

2.2.3 Conservación de semen

La criopreservación es el proceso en el cual células o tejidos son congelados a muy bajas temperaturas, generalmente entre -80 y -196 °C, para detener las funciones vitales de una célula o un organismo y poderlo mantener en condiciones de vida suspendida por mucho tiempo; a esas temperaturas, cualquier actividad biológica, incluidas las reacciones bioquímicas que producirían la muerte de una célula, quedan efectivamente (47).

La criopreservación de semen es una importante biotecnología reproductiva, que busca promover la conservación del germoplasma masculino por tiempo indeterminado. Esta biotecnología, cuando se asocia a la inseminación artificial, representa un mecanismo eficiente para la promoción y difusión de material genético de excelente calidad. La criopreservación de semen proporciona una economía para el productor, al reducir los costos de alimentación y transporte de los reproductores, así como los riesgos de transmisión de enfermedades sexualmente transmisibles (48).



2.2.4 Congelación de semen

La congelación del semen bovino en vapores de nitrógeno líquido tiene su fundamento en establecer una corriente de nitrógeno atomizado mediante un ventilador que actúa a gran velocidad; de este modo se crea una corriente de aire frío que circula de forma continua enfriando el material seminal a través de las ampollas o pajuelas en las que se halla situado. Esta técnica requiere un perfecto control del ritmo de enfriamiento, en el que radica la mayor dificultad de la operación (49). Se estableció que a cada tipo celular le correspondía una velocidad de congelación óptima para garantizar su supervivencia tras la criopreservación. En lo referente al espermatozoide, la velocidad de congelación afecta a su supervivencia post descongelación y a la fertilidad. Una congelación excesivamente rápida provoca la formación de grandes cristales de hielo intracelular y los daños serán debidos a la disgregación de las membranas de orgánulos intracelulares. Por el contrario, una congelación excesivamente lenta causará daños relacionados con un gradiente osmótico excesivo durante la formación del hielo extracelular, con lo cual el daño ocurrirá como consecuencia de los “efectos solución” (50).

La congelación del material espermático presenta un gran número de ventajas. Entre ellas, destacamos las siguientes: preservación y uso de germoplasma sin limitaciones en el tiempo y en el espacio, prevención de riesgos sanitarios al poder transportar germoplasma congelado en lugar de trasladar animales vivos, y mejor manejo del espacio, ya que permite la conservación indefinida del material genético sin necesidad de ocupar grandes espacios en los programas de cría (51).

2.2.5 Descongelación de semen

Los pasos involucrados en la descongelación exigen máximo cuidado con el tiempo, la temperatura y la manipulación de la pajilla; así, por ejemplo, la descongelación de pajillas por más de 30 segundos en temperaturas mayores a los 37 °C redundará en mayor número de alteraciones espermáticas (52). Se hace rápidamente a temperatura ambiente o en un baño maría a 30 °C, para evitar la cristalización (53). El semen descongelado posee una vida mucho más corta, debido a que los protocolos de criopreservación producen un número potencial de factores de estrés que pueden producir cambios en el espermatozoide (54).

La descongelación de pajuelas, por tratarse de un proceso automatizado con tasas de enfriamiento estrictamente controladas, significó un gran avance. Al resultar menos traumáticos los procesos de congelación y descongelación fue posible disminuir de manera significativa el número de espermatozoides contenidos en cada dosis de semen (55).



2.2.6 Evaluación del semen

La fertilidad potencial de una muestra de semen probablemente va a depender de que contenga un número suficiente de espermatozoides viables, morfológicamente normales y funcionalmente competentes, capaces de alcanzar el oviducto y de establecer un reservorio oviductal, de llevar a cabo la fecundación del ovocito, y de contribuir al desarrollo embrionario. La evaluación del semen mediante técnicas *in vitro*, si ha de tener algún valor predictivo de su capacidad fecundante *in vivo*, debería incluir el estudio de tantas características espermáticas como sea posible, especialmente cuando se trata de dosis de semen congelado o cuando se están evaluando nuevos métodos de criopreservación (56).

2.2.6.1 Métodos de evaluación del semen

2.2.6.1.1 Evaluación macroscópica

a) Color

Generalmente el semen es de color blanco y la densidad de la muestra estará en relación directa con la concentración de espermatozoides. Las muestras más densas serán de color y aspecto más cremoso, mientras que las más diluidas, serán de aspecto lechoso y hasta completamente claro y transparente (57).

b) Volumen

El volumen promedio de semen presente en un eyaculado varía en las distintas especies animales, siendo en toros de 5 a 7 mL, dentro de un rango que oscila entre 1 a 2 mL en jóvenes y hasta 20 mL en individuos adultos de gran porte. El segundo eyaculado obtenido 15 a 20 minutos luego, del primero puede llegar a ser más voluminoso, pero esta diferencia podría no existir en el caso de una muy buena excitación antes de la primera recolección (58).

c) Olor

El olor natural es característico de cada especie animal y en general no es muy intenso (59).

d) pH

El pH normal del semen bovino es cercano a la neutralidad, con valores que van de 6,7 a 7. La presencia de un aumento del pH, es decir un eyaculado seminal con tendencia a la alcalinidad,



es indicador de alteraciones de tipo inflamatorio de uno de los órganos genitales, lo que podría corresponder a afecciones patológicas en el animal (60).

2.2.6.1.2 Evaluación microscópica

a) Motilidad

La motilidad se valora mediante la onda de movimiento del semen o según la proporción de la motilidad progresiva de los espermatozoides en una muestra. La valoración de la onda de movimiento es el sistema más simple para determinar la movilidad del semen fresco. Cuando el semen ha sido diluido extensivamente o congelado y descongelado se debe usar la valoración mediante la proporción de espermatozoides móviles. En este caso se utiliza el aumento 40X. Esta prueba nos permite estimar la proporción de espermatozoides vivos en la muestra (61).

La estimación visual de la motilidad tiene el inconveniente de ser altamente subjetiva, y sus resultados dependen en gran medida de la experiencia del observador, por lo que se han desarrollado sistemas de análisis de semen asistidos por computador que permiten una mayor objetividad y la evaluación de un mayor número de parámetros para definir el movimiento de los espermatozoides (62).

b) Motilidad masal

La motilidad masal, que hace referencia al comportamiento colectivo y de fluidez del movimiento de la gran mayoría de los espermatozoides dentro de una muestra seminal y se analiza en un campo de acción grande en un microscopio (63). La motilidad es sólo uno de los muchos requisitos que ha de reunir un espermatozoide para ser capaz de fecundar a un ovocito, sin embargo, ha sido y todavía es el parámetro más utilizado para valorar la calidad de un eyaculado o de una dosis de semen refrigerado o congelado. Para que la migración espermática a través del tracto genital de la hembra ocurra normalmente, y sobre todo para el establecimiento de un reservorio espermático en el oviducto, los espermatozoides han tener movimiento activo; pero, además, la motilidad es también una manifestación de integridad estructural y de competencia funcional del espermatozoide (49).



c) Motilidad individual

Consiste en estimar el porcentaje (0 a 100%) de espermatozoides con movimiento en una muestra de semen (64). Su importancia es debida al peso que tiene esta característica sobre la fertilidad (65).

Es una de las pruebas que se utiliza con mayor frecuencia para evaluar la calidad de semen diluido. En algunas especies, parece estar correlacionada con la capacidad fertilizante del espermatozoide. Si existe menos del 40% de espermatozoides con movimiento lineal progresivo, es menos probable que haya fertilidad. Debido a la influencia que tienen las variaciones de temperatura sobre la motilidad espermática, las muestras deben ser evaluadas tan pronto sea posible (66).

d) Análisis morfológico del espermatozoide

En el estudio de la morfología de las células espermáticas, se debe de utilizar un sistema de clasificación adecuado que permita evidenciar el máximo número de anomalías que puedan relacionarse con problemas de fertilidad. Estas anomalías podrían deberse a situaciones tales como: traumatismos e infecciones a nivel gonadal, disfunción en los túmulos seminíferos, alteraciones metabólicas y endocrinas que afecten directamente a la espermatogénesis y a la función del epidídimo y con alteraciones en la maduración de los espermatozoides. Por ello, una correcta evaluación del porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales y anormales de forma puede ser una información clave en el estudio básico del semen. Recientemente se está analizando la morfología espermática (sobre todo de la cabeza del espermatozoide) mediante sistemas informáticos (67).

El estudio de la cabeza del espermatozoide porta el material genético en forma de cromatina (cromosomas condensados asociados a protaminas), ya sea mediante la evaluación de su forma a través de diferentes tinciones o de las medidas morfométricas, a través de los sistemas computarizados de análisis seminal, tiene gran interés dado que, tanto la alteraciones de la forma, de las medidas morfométricas, así como de la integridad de la cromatina, han sido relacionadas con el potencial reproductivo de los toros (68).

La fertilidad potencial de una muestra de semen probablemente depende de que contenga un número suficiente de espermatozoides viables, morfológicamente normales y funcionalmente competentes, capaces de alcanzar el oviducto y de establecer un reservorio oviductal, de llevar a cabo la fecundación de ovocito y de contribuir al desarrollo embrionario (69).



e) Anormalidades morfológicas del espermatozoide

El análisis morfológico de los espermatozoides es una prueba de control de calidad que refleja el estado fisiológico o patológico de la funcionalidad de los testículos, epidídimos y glándulas accesorias del semental. Se producen por una espermatogénesis o espermiogénesis defectuosas, por herencia, enfermedades, estrés por calor o frío, exposiciones a condiciones medio ambientales adversas, reposo sexual prolongado (mayor de 60 días) o por el uso de técnicas inadecuadas en la manipulación del semen (70).

El espermatozoide maduro es una célula con motilidad activa, que se desplaza libremente en el líquido y consiste en una cabeza que contiene un núcleo con todos los rasgos genéticos que un padre le puede transmitir a su descendencia, y una cola o flagelo, que le proporciona la motilidad necesaria para su transporte al lugar donde se efectúa la fertilización y procura que su orientación sea la adecuada para penetrar a través de las capas que recubren el óvulo (71).

Si la proporción de anormalidades es más del 20%, nos encontramos ante un semen de baja fertilidad, entre las anormalidades más frecuentes se encuentran espermatozoides sin cola, cabeza grande, cabeza pequeña, cola reducida, cabeza adelgazada, rotura de cuello y acrosoma anormal (72). Las anormalidades son consideradas únicamente como una prueba importante para la calificación potencial de la fertilidad del macho, existen diferencias o controversias en cuanto a los niveles que deben ser aceptados como normales. Especial importancia adquieren estas diferencias, cuando se tratan de determinar los porcentajes de normalidad para la alteración de la cabeza (73).

Cuadro 1. Esquema de anomalías morfológicas de los espermatozoides.

PRIMARIAS		
Anormalidades de cabeza	Anormalidades de cuello	Anormalidades de la cola
Cabezas gigantes.	Unión del cuello fuera del eje (descentrado).	Cola corta (defecto de la cola en muñón).
Cabezas pequeñas.	Cuello doble.	Colas abaxiales, accesorias o múltiples.
Cabezas periformes.	Cuello en espiral.	Pieza media doblada, hinchada, abaxial, incompleta.
Cabezas cónicas y estrechas.	Cuello deshilachado, granular o hinchado.	
Anormales desprendidas.		
Formas teratoides.		Aplasia segmentaria de la



Defectos de acrosoma	pieza media y defectos de anormales desprendidas la vaina mitocondrial. Gota citoplasmática proximal.
----------------------	--

SECUNDARIAS

Anormalidades de cabeza	Anormalidades de cuello	Otras células
Cabezas normales desprendidas.	Unión del cuello fuera del eje (descentrado).	Células epiteliales. Eritrocitos.
Acrosoma roto, deforme o desprendido.	Pieza media distal doblada. Pieza principal doblada. Gota citoplasmática proximal y distal.	Formaciones de medusa. Células precursoras de esperma. Células redondas. Glóbulos blancos.

Adaptado y actualizado de “XX Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa” (74).

Las anomalías espermáticas se clasifican en tres grupos: primaria anomalías (aquellas que afectan la cabeza del esperma y acrosoma), anomalías secundarias (aquellas afectando a la gota citoplásmica de la pieza intermedia), y Anomalías terciarias [daños en la cola] (75).

Los tipos de anomalías de los espermatozoides se describen a continuación (76).

Espermatozoides normales

Formas comunes de cabezas de espermatozoides bovinos normales (a) y (b); (c) cabeza normal con perfil alargado y más delgado. (d), (e) y (f): progresión de variaciones de cabezas más cortas y anchas.



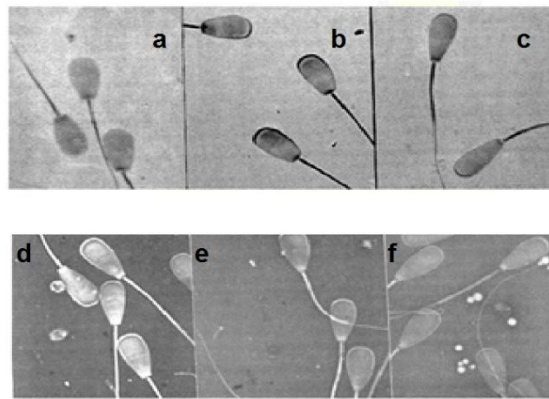


Figura 1. Espermatozoides normales del espermatozoide de toro.

Cabezas piriformes y angostas

Los espermatozoides con formas piriformes obvias (de pera) son anormales (a, b y c). En la mayoría de los casos se encuentran estas anomalías junto con otras e indican un defecto de espermatogénesis. El espermatozoide de la foto (d) tiene la cabeza más angosta en la porción acrosomal y post acrosomal. Este defecto espermático puede llegar a ser encontrado en disturbios severos de la espermatogénesis junto a espermatozoides con cabezas piriformes y otras anomalías y por lo tanto son considerados anormales.

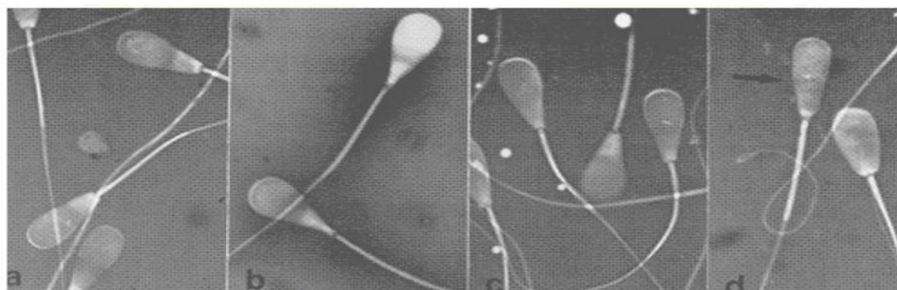


Figura 2. Cabezas piriformes y angostas del espermatozoide de toro.

Microcefalia y Macrocefalia

Existe una gran variación de formas y tamaños entre los espermatozoides con microcefalia y macrocefalia, generalmente se encuentran en proporción muy pequeña. Aparentemente estos defectos son ocasionados por una distribución desigual de los cromosomas durante la meiosis y generalmente la mayoría de estas células mueren o son fagocitadas por las células de Sertoli antes del llegar al estadio de espermátide. Esta es la razón por la cual no se encuentran en altos porcentajes en el extendido de semen, con excepción del síndrome llamado "cabeza plegada-cresta nuclear-cabeza gigante".

En las fotografías se indican los espermatozoides microcefálicos con la "m", los macrocefálicos con "M" y los normales con "n".

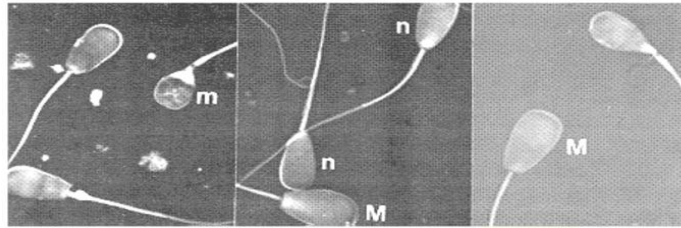


Figura 3. Microcefalia y macrocefalia del espermatozoide de toro.

Vacuolas nucleares

Las vacuolas nucleares se encuentran primariamente como una línea en la región ecuatorial de la cabeza del espermatozoide (defecto "diadema") como se las ve en las fotos (a), (b) y (c) o como una o dos vacuolas en el apex del núcleo como en la foto (d). Si observamos los espermatozoides con contraste diferencial (DIC) las vacuolas se asemejan a cráteres (a). Con la tinción de Feulgen brillan como diamantes (d) y por esa razón se lo llama diadema. En la foto (c) se ven las vacuolas en un preparado realizado con Eosina-Nigrosina, las vacuolas aparecen como puntos oscuros y deben diferenciadas de cristales o restos de la tinción.

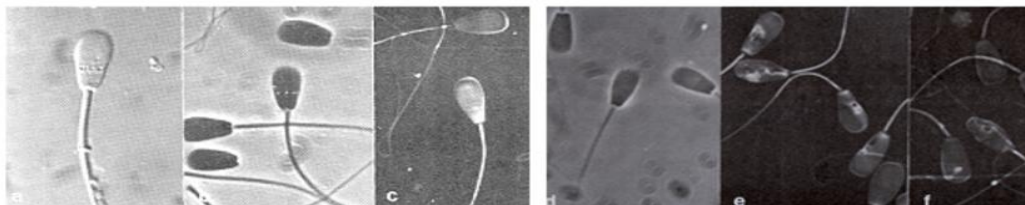


Figura 4. Vacuolas nucleares del espermatozoide de toro.

Pieza media distal doblada

En (a - e) son muestras con alta incidencia de este defecto. Nótese la variedad de formas dentro del mismo extendido y la combinación de este defecto junto con la torsión de la pieza principal. Los indicados en (d) y (e) se encuentran también asociados a fracturas de la pieza media o curvas dobles y estas se originan probablemente en los últimos pasos de la espermatogénesis.



Figura 5. Pieza media distal doblada del espermatozoide de toro.

Espermatozoides de cola corta o "stunp tail deffect"

Este defecto no es común, es muy bajo porque la mayoría de los espermatozoides no tienen una cola funcional. Los extendidos en el microscopio dan una primera impresión de una gran cantidad de espermatozoides decapitados. Pero una examinación con mayor aumento revela que la cola está reemplazada por un cuerpo pequeño o un muñón en el cuello. El muñón a menudo está cubierto por una gota citoplasmática y puede haber colas en muñón simples o dobles de 2 a 3 μm de largo además de diminutas colas enrolladas. Aunque la proporción de espermatozoides anormales puede variar desde el 15 al 100%, El defecto cola en muñón suele estar asociado con otros efectos como piezas intermedias tipo Dag y cabezas piriformes.

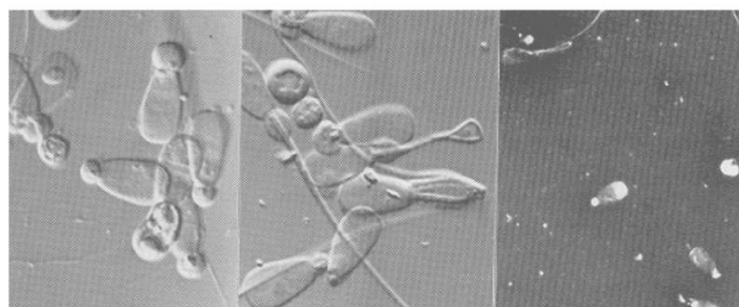


Figura 6. Espermatozoides de cola corta o "stunp tail deffect".

Pieza principal doblada

En este defecto se ve que la pieza principal se encuentra doblada haciendo un rulo ("loop") inmediatamente distal del ánulo. Se encuentra generalmente asociado con la presencia de espermatozoides con las piezas medias dobladas. En la mayoría de los casos se ve una gota citoplasmática distal en el centro del rulo. Este defecto aparentemente se origina en el epidídimo y no hay que confundirlo con el defecto producido por el shock hipotónico o por estrés por frío de los espermatozoides.

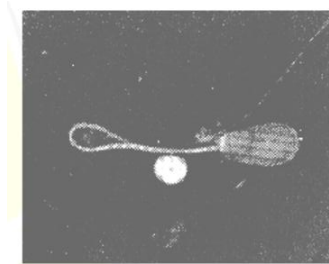


Figura 7. Pieza principal doblada del espermatozoide de toro.

Piezas intermedias arqueadas

Tienen forma de arcoíris o de U. Este defecto es producido por la tinción, pero puede haber algunos casos raros de toros con este defecto. Cuando evaluamos la motilidad individual vemos una gran cantidad de espermatozoides con movimientos en círculo. Para sacarse la duda siempre hay que comparar lo que se ve en la motilidad individual con lo observado en el preparado.

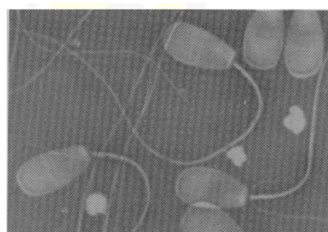


Figura 8. Piezas intermedias arqueada.

Gota citoplasmática proximal

Casi todos los espermatozoides que se encuentran en la cabeza del epidídimo tienen una gota citoplasmática en esta posición. Luego, a medida que van descendiendo hacia la cola del epidídimo el 90% de los espermatozoides tienen esta gota citoplasmática en la parte distal. Una alta incidencia de gotas proximales se puede ver en toros jóvenes. En toros adultos, las gotas proximales en el eyaculado son un signo de disturbio de la función epididimal o testicular. En la foto (c) algunas anomalías primarias como cabezas piriformes están aparentemente predispuestas a retener la gota citoplasmática proximal.

La foto (a) muestra una gota citoplasmática grande y redonda ubicada en la zona proximal de la pieza media. La foto (b) muestra la apariencia contraída de una gota proximal como se ve en una tinción de eosina-nigrosina. La foto (c) muestra una gota ubicada en la pieza media que ha migrado parcialmente.

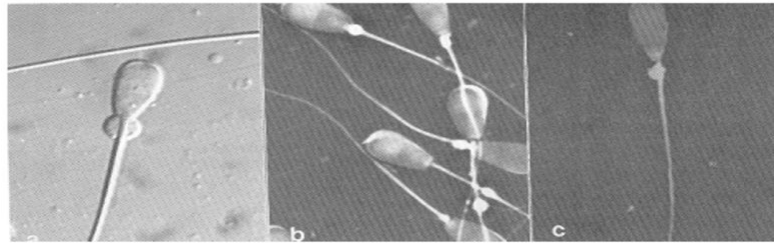


Figura 9. Gota citoplasmática proximal del espermatozoide de toro.

Gota citoplasmática distal

Entre el 65 y 95% de los espermatozoides almacenados en la cola del epidídimo tienen la gota citoplasmática en esta posición. Esta gota es liberada cuando los espermatozoides se mezclan con los fluidos seminales en la eyaculación

La foto (a) muestra una gota citoplasmática redonda y grande ubicada en la pieza media distal, La foto (b) muestra la gota contraída en la pieza media distal La foto (c) gota excéntrica común en preparados frescos.

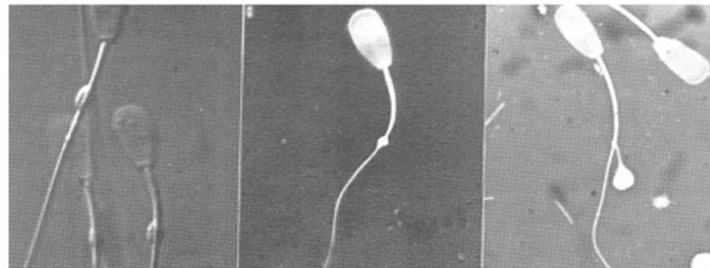


Figura 10. Gota citoplasmática distal del espermatozoide de toro.

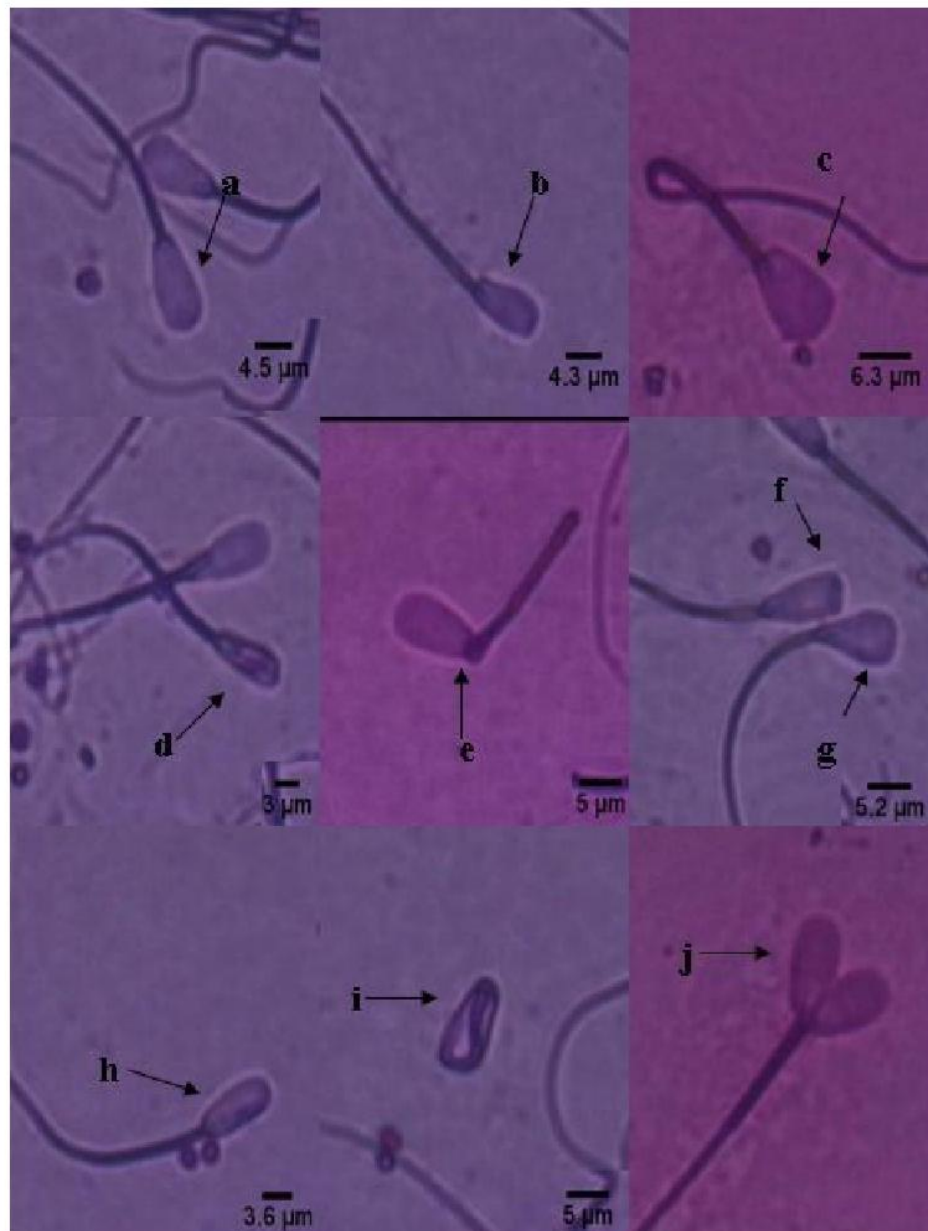


Figura 11. Espermatozoides anormales a) esperma normal, b) abaxial, c) macrocéfalo, d) microcéfalo, e) cabeza separada, f) contorno anormal, g) pera, h) estrecho, i) No desarrollado, j) Doble cabeza (77).

2.2.7 Tinciones para evaluar la morfología espermática

a) Tinción Diff-Quik

Es una técnica sencilla y rápida compuesta por un fijador (metanol), un colorante aniónico ácido (eosina) que tiñe positivamente las proteínas básicas de color rojo, y por una tiazina (azul de metileno o sus derivados) que tiñe el ADN de azul (78).

Es una técnica rápida de tinción de tipo Romanovsky, consiste en tres soluciones: un fijador alcohol metilo, una solución acuosa de eosina y una solución acuosa de azul metileno y azure A. Aunque los extendidos sanguíneos o las extensiones de muestras obtenidas mediante punción aspiración con aguja fina pueden ser teñidas en tan sólo 15 segundos con Diff-Quik®, los extendidos o improntas procedentes de estudios intraoperatorios, suelen presentar mayor espesor, por lo que pueden necesitar mayores tiempos para una óptima tinción (79).

Composición

- **Diff-Quik Fijador:** Solución de fijación (1 x 500 mL.)
Contiene verde sólido (0.002 g/L) en metanol.
- **Diff-Quik I:** Solución de tinción I (1 x 500 mL.)
Contiene Eosina Y (1.22 g/L) en un tampón de fosfato (pH 6.6) y ácido de sodio como conservante 0.1% (p/v).
- **Diff-Quik II:** Solución de tinción II (1 x 500 mL.)
Contiene tinción de Tiazina (1.1 g/L) con tampón fosfato (pH 6.6).

Diff-Quik presenta como componente aniónico a Eosina G y catiónico a una tinción tiazinica no especificada y en el área de reproducción es usada usualmente para la evaluación de la morfología espermática (80).

Diff-Quik es una tinción rápida. En varios trabajos reportaron que es un método confiable, especialmente para análisis de anomalías espermáticas cuando se trabaja con esta tinción (81).

Fundamento de coloración del Diff-Quik

La tinción de mayor empleo en citología veterinaria es, sin lugar a dudas, el colorante Diff-Quik, que es una modificación rápida de los colorantes tipo Romanowsky, sus grandes ventajas son que en la preparación del frotis solamente se requiere de fijación al aire, la coloración se efectúa en un máximo de 45 segundos, por lo tanto, en menos de un minuto están listas las muestras para iniciar su evaluación; son raras las precipitaciones de colorantes y las tinciones son adecuadas y permiten, con experiencia y conocimiento, evaluar fácilmente las características celulares (82).



b) Tinción Eosina-Nigrosina

También conocida como un test de vitalidad o de Williams Pollack, esta es una tinción supra vital, muy utilizada en el laboratorio clínico dentro del espermograma para determinar espermatozoides vivos y muertos, debido que en los espermatozoides muertos poseen gran permeabilidad de la membrana, permitiendo teñir su estructura de un color Rojo / Rosado distinguiéndose cabeza y cola del espermatozoide (83).

El colorante Eosina penetra a través de la membrana de los espermatozoides muertos tiéndolos de color rosa, en tanto que los vivos permanecen incoloros. La Nigrosina, por otra parte, dibuja en azul oscuro el perfil de los espermatozoides vivos. Se usa normalmente porque es eficaz, simple, además de permitir visualizar los espermatozoides prontamente, es una tinción denominada "vivos-muertos", permitiendo evaluar la integridad de la membrana al mismo tiempo que la morfología. La tinción produce un fondo oscuro (nigrosina) sobre el que los espermatozoides se presentan como objetos ligeramente rosados. Los espermatozoides vivos normales no se tiñen y aparecen de color blanco, mientras que los espermatozoides "muertos" (es decir aquéllos con pérdida de integridad de la membrana) toman la eosina y se observan con un color rosado (84).

Cuadro 2. Composición del colorante Eosina-Nigrosina (85).

Componente	Cantidad
Eosina (g)	0.67
Nigrosina (g)	0.5
Agua (mL)	100
Ph	9.4
Osmolaridad (mOsm/kg)	139

2.3 Definición de términos

Anormalidad

Anormalidad es una deformación producida por acción de fuerzas mecánicas aberrantes que distorsionan las estructuras de los tejidos normales produciendo alteraciones de la forma o posición de un segmento corporal; Aquello que en su funcionamiento o aspecto no es normal ni corriente, es raro, poco usual, y por caso es que se le suele atribuir normalmente una consideración negativa (86).

Espermatozoide

Los espermatozoides son únicos entre las células en forma y función. Los espermatozoides maduros son células terminales, el producto final de complejos procesos de desarrollo, que no pueden sufrir más división o diferenciación (75). Gameto masculino, destinado a la fecundación del óvulo (87).

Anormal

Que accidentalmente se halla fuera de su natural estado o de las condiciones que le son inherentes (87).

Anomalía

Defecto de forma o de funcionamiento (87). Es cualquier desviación de lo normal especialmente refiriéndose a un defecto congénito o de desarrollo.

Tinción

Es el proceso por el cual las moléculas de un colorante se adsorben a una superficie. El uso de colorantes permite cambiar el color de las células de los microorganismos y poder realizar la observación en microscopio (88). Consiste en aplicar diversas combinaciones de sustancias colorantes a las extensiones previamente fijadas (89).



CAPITULO III

DISEÑO METODOLÓGICO

3.1 Definición de variables

a) Variables independientes

- Tinción Diff-Quik: Se refiere al colorante hematológico que es aplicable a coloración de estructuras espermáticas.
- Tinción Eosina- Nigrosina: Es el colorante convencional que se usa para colorear las células espermáticas.

b) Variables dependientes

- Anormalidades de la cabeza de los espermatozoides: Es el porcentaje de espermatozoides con anormalidades en la cabeza del espermatozoide en el semen del toro Holstein.
- Anormalidades del cuello de espermatozoides: Es el porcentaje de espermatozoides que tienen anormalidades en el cuello del espermatozoide del semen del toro Holstein.
- Anormalidades de la cola de espermatozoides: Es el porcentaje de espermatozoides que tienen anormalidades en la cola del espermatozoide del semen del toro Holstein.



3.2 Operacionalización de variables

Cuadro 3. Operacionalización de variables.

Variab les	Dimensión	Indicador	Índice
Independientes			
Tinción Diff-Quik	Colorante de estructuras espermáticas.	Grado de tinción Diff-Quik sobre los espermatozoides antes y después de la congelación del semen.	Relación de la tinción Diff-Quik utilizado sobre espermatozoides de toro.
Tinción Eosina-Nigrosina	Colorante supravital de estructuras espermáticas.	Grado de tinción Eosina-Nigrosina sobre los espermatozoides antes y después de la congelación del semen.	Relación de la tinción Eosina-Nigrosina utilizado sobre espermatozoides de toro.
Variab les Dependientes			
Anomalías de la cabeza	Defectos de morfología de la cabeza de espermatozoides.	Porcentaje de anomalías de la cabeza de espermatozoides antes y después de la criopreservación de semen bovino.	Anomalías de la cabeza del esperma sobre el total de espermatozoides contados.
Anomalías del cuello	Defectos de morfología del cuello de espermatozoides.	Porcentaje de anomalías del cuello de espermatozoides antes y después de la criopreservación de semen bovino.	Anomalías del cuello del esperma sobre el total de espermatozoides contados.
Anomalías de la cola	Defectos de morfología de la cola de espermatozoides.	Porcentaje de anomalías de la cola de espermatozoides antes y después de la criopreservación de semen bovino.	Anomalías de la cola del esperma sobre el total de espermatozoides contados.



3.3 Hipótesis de la investigación

a) Hipótesis general

El colorante Diff-Quik permite identificar mejor que el colorante Eosina-Nigrosina, las anomalías morfológicas de los espermatozoides, en la criopreservación del semen del toro Holstein.

b) Hipótesis específicas

- El colorante Diff-Quik permite una mejor observación de las estructuras morfológicas que Eosina-Nigrosina de la cabeza de espermatozoides, en la congelación del semen de toro Holstein.
- El colorante Diff-Quik permite una mejor observación de las estructuras morfológicas que Eosina-Nigrosina del cuello de espermatozoides, en la congelación del semen de toro Holstein.
- El colorante Diff-Quik permite una mejor observación de las estructuras morfológicas que Eosina-Nigrosina de la cola de espermatozoides, en la congelación del semen de toro Holstein.

3.4 Tipo y diseño de la investigación

Según la intervención del investigador, esta investigación es de tipo experimental. Es prospectivo, longitudinal y de nivel investigativo “explicativo” (causa – efecto); además de ser “controlados” (90).

3.5 Población y muestra

3.5.1 Población

La población estuvo representada por semen de un toro de la raza Holstein.

3.5.2 Muestra

El método y tamaño muestral fue por conveniencia, que es un procedimiento no probabilístico (91). Se consideró 10 eyaculados de semen de toro.



3.6 Procedimiento de la investigación

3.6.1 Localización

El presente experimento fue realizado en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac, ubicado en Patibamba Baja del distrito y provincia de Abancay del departamento de Apurímac, Perú. Está localizado a 13° 38' 31.40" Latitud Sur y 72° 53' 17.03" Longitud Oeste, a 2180 m de altitud (92). El estudio fue realizado entre los meses de agosto a diciembre del 2017.

3.6.2 Animales y diseño experimental

Se utilizó un toro Holstein. de dos años de edad aproximadamente, con 300 kg de peso aproximadamente, clínicamente sano, con condición corporal buena, la alimentación fue a base de alfalfa más concentrado, con manejo al pastoreo en el Centro de Investigación de Pachachaca, ubicada a 13° 39' 47.69" Latitud Sur y 72° 56' 15.05" Longitud Oeste (92), perteneciente de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac.

Se formaron 4 grupos de tratamientos (T) según colorantes de espermatozoides, T1: Tinción Diff-Quik antes de congelación; T2: Tinción Eosina-Nigrosina antes de congelación; T3: Tinción Diff-Quik después de congelación; T4: Tinción Eosina-Nigrosina después de la congelación de semen. De cada eyaculado (n=10) el semen se distribuyó aleatoriamente a cada grupo de tratamiento. La evaluación morfológica de las anomalías espermáticas se realizó antes y después de la congelación de semen.

3.6.3 Colección y transporte de semen

El entrenamiento de la colección de semen del toro se realizó interdiariamente durante 2 meses, al inicio se utilizó una vaca en celo sujeta en un brete. La colección de semen se realizó dos veces por semana hasta completar los 10 eyaculados. Se utilizó la técnica de colección con vagina artificial, según la técnica descrita por Morillo (57) con algunas modificaciones, se utilizó un tubo rígido de 40 cm, fijados en ambos extremos con funda de látex que delimitaba una cámara interior, se utilizó agua a 45 °C colocadas por una válvula luego se insufló aire alcanzando una presión adecuada, en uno de los extremos del cilindro se colocó una funda colectora de látex en forma de embudo y en su extremo más angosto de esta fue unida el tubo colector seguidamente se protegió de la luz solar y del frío con una funda de algodón. para cada colección se realizó la limpieza de la zona genital del toro, luego se simuló la monta y se dirigió el pene al interior de la vagina artificial.



El eyaculado se transportó en una unidad motorizada desde el centro experimental Pachachaca de la UNAMBA al laboratorio de reproducción animal de la facultad de Medicina Veterinaria Y Zootecnia alrededor de 20 minutos en un termocooler con una temperatura de 37 °C para su evaluación.

3.6.4 Motilidad espermática

Motilidad masal

Las muestras seminales fueron evaluadas de acuerdo a la metodología propuesta por Maxwell y Evans (4). Se colocó 5 µL de espermatozoides colectados mediante vagina artificial sobre la lámina portaobjeto a 37 °C, se observó con microscopio óptico a 4X - 10X, se le dio la valoración subjetiva de 0 a 5 grados considerando 0 cuando hay ausencia de movimiento y 5 cuando existe ondas con movimiento vigoroso.

3.6.5 Coloración de espermatozoides

La coloración de las muestras de semen de toro Holstein se realizó en tres láminas portaobjetos (A, B y C) para cada colorante antes y después de la congelación.

3.6.5.1 Coloración Diff-Quik

Para para la coloración con Diff-Quik se tuvo como referencia la técnica de Nieto (93).

- a) **Dilución de semen para fijado:** se mezcló 5 µL de semen con 10 µL de cloruro de sodio a 0.9 %. A 37 °C en viales de 2 ml. Esta dilución se realiza con la finalidad de no observar espermatozoides sobrepuestos.
- b) **Frotis:** Se aspiró 5 µL del semen previamente diluido y se colocó sobre la lámina portaobjeto en la parte media de uno de los extremos de la lámina y con ayuda de otra lámina portaobjeto con una inclinación se realizó el extendido.
- c) **Secado:** se realizó con movimientos suaves de la mano de lado a lado en el aire durante varios segundos.
- d) **Solución de fijación:** la lámina portaobjetos se sumerge en la solución de fijación de Diff-Quick (solución de color transparente) durante un minuto, luego se procedió el secado al aire durante dos minutos.



- e) **Solución de tinción Diff-Quick I:** se sumergió la lámina en la solución de tinción I (color naranja) durante dos minutos y se procedió al secado al aire durante 4 minutos.
- f) **Solución de tinción Diff-Quick II:** Para finalizar se sumergió la lámina en la solución de tinción II (color azul) durante dos minutos, se extrajo la lámina y paso a ser enjuagada con agua estéril en un vaso de precipitado de 100 mL, para después realizar el secado al aire durante 4 a 5 minutos para su posterior evaluación.

3.6.5.2 Coloración con Eosina-Nigrosina

Para la tinción con Eosina-Nigrosina se utilizó el método de Cabrera y Pantoja (94)

- a) **Dilución del semen para fijado:** Para el fijado del semen en la lámina portaobjetos, se diluyó combinando 5 μ L de semen con 10 μ L de cloruro de sodio a 0.9 % a 37 °C en viales de 2 mL.
- b) **Frotis:** Se aspiró 2 μ L de Eosina, 2 μ L de Nigrosina y 5 μ L de semen diluido, se colocó sobre la lámina portaobjeto en la parte media de uno de los extremos y con ayuda de un tips se mezcla los tres elementos, con ayuda de otra lamina con una ligera inclinación se distribuyó a lo ancho de la lámina para luego extender la muestra.
- c) **Secado:** se movió la lámina portaobjetos con la mano de lado a lado durante varios segundos para secar rápidamente el frotis al aire.

3.6.6 Coloración de muestras después de la congelación

a) Preparación de dilutores y dilución

Los componentes sólidos del dilutor (Ácido cítrico, Glucosa y Fructuosa), se pesó en una balanza analítica, se preparó en tubos cónicos de 45 mL 24 h antes de su uso excepto la yema de huevo de gallina (huevo puesto en el día). Se formó dos fracciones A y B, la porción A contenía el dilutor base más espermatozoides, mientras la porción B contenía el dilutor más glicerol al 5%. La dilución fue 4: 1 (4 partes de dilutor y 1 parte de semen) unidas a una misma temperatura de 37 °C.

Cuadro 4. Composición del dilutor Tris

Tris	
Tris (g)	3.630
Ácido cítrico (g)	1.990
Glucosa (g)	0.500
Fructuosa (g)	0.4975
Yema de huevo (mL)	7
Glicerol (mL)*	5
Penicilina (UI)	100000
Agua bidestilada csp (mL)	100

* Usado para la fracción B del dilutor

b) Enfriamiento de espermatozoides

Se realizó durante 2 h hasta llegar a 15 °C, luego se colocó a refrigeración a 4 °C por 2 h hasta su equilibramiento. Luego se unió las dos fracciones.

c) Empajillado

Se utilizó pajuelas de 0.25 mL, previamente rotuladas y enfriadas, el llenado de las pajuelas fue por absorción manual con ayuda de una micropipeta, luego se selló con alcohol polivinílico y agua bidestilada en su extremo libre para luego ponerlo en la parrilla de congelamiento, este procedimiento se realizó bajo una temperatura de refrigeración a 5 °C dentro de la refrigeradora.

d) Congelación

Se realizó mediante el método convencional, haciendo uso de una caja de poliestireno previamente preparada para el procedimiento de congelación de semen, a la cual se le cargo de nitrógeno líquido a -196 °C hasta un nivel de 5 cm. Las pajuelas se colocaron sobre una parrilla de congelamiento a 4 cm del nivel de nitrógeno líquido, donde se encontraba a vapor de nitrógeno líquido que se encontraba en un promedio de -80 a -100 °C por espacio de 15 min. Luego se sumergió las pajuelas al nitrógeno líquido a -196 °C para su criogenización.

Luego rápidamente las pajuelas se colocaron en globets, luego en canes y canastas para ser almacenados en el tanque criogénico hasta su posterior evaluación.



e) Descongelación

El descongelamiento se realizó de manera rápida, se extrajeron las pajuelas del tanque de nitrógeno con ayuda de unas pinzas para evitar el cambio brusco de temperatura se utilizó un termo de descongelación a 37 °C colocando las pajuelas por 1 min, se cortó por el lado donde se selló con el alcohol polivinílico y se evaluó los espermatozoides descongelados.

3.6.7 Evaluación morfológica del espermatozoide

Para cada muestra seminal se contabilizó 200 espermatozoides en cada lamina (A, B y C) previamente tincionada antes y después de la congelación, el conteo se realizó en distintos campos escogidos al azar con un microscopio óptico con aceite de inmersión a 100 X de aumento, la evaluación morfológica se realizó según clasificación de Barth (74). Que se muestra en el **cuadro 1**. donde se clasifica anomalías primarias y secundarias, los espermatozoides teñidos con el colorante Diff-Quik se observaron de un color azul y los espermatozoides teñidos con el colorante Eosina-Nigrosina se observaron de color rosado.

3.6.8 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa de sistema de análisis estadístico (SAS) v 9.4. Las variables de respuesta al principio se comprobaron la normalidad mediante la prueba Shapiro-Wilk que fue a través del procedimiento UNIVARIATE, Luego se realizó el análisis de varianza mediante el Modelo Lineal General bajo el diseño completamente al azar con arreglo factorial 2A x 2B (factor A: tinción Diff-Quik y Eosina-Nigrosina; factor B: antes y después de la congelación). La comparación de medias se realizó con la prueba de Tukey determinando la significancia ($P \leq 0.05$) entre grupos.

El modelo estadístico fue:

$$Y = \mu + A + B + AB + e$$

Donde:

Y = Es la variable de respuesta (anomalías de cabeza, cuello, cola).

μ = Es la constante, media de las observaciones.

A = Es el efecto del factor dilutor con dos niveles: Diff-Quik y Eosina-Nigrosina.

B = Es el efecto del factor hora de refrigeración con 2 niveles: pre y post congelado.

AB = Es el efecto de la interacción de los factores A y B

e = Es el efecto del error experimental, que está distribuido como ε DNI (0, σ^2e).



3.7 Material de investigación

3.7.1 Materiales por procedimiento

Material biológico

- Semen de toro Holstein

Material para la obtención de muestras

- Vagina artificial
- Agua a 45 °C
- Tubo colector (tubo cónico de 15 ml)
- Termocooler
- Termómetro digital
- Vagina artificial
- Termo hervidor
- Funda de algodón para el tubo colector

Material para la evaluación espermática

- Microscopio
- Solución salina normal (0.99% NaCl)
- Tips de micropipetas
- Diff-Quik
- Eosina-Nigrosina
- Láminas portaobjetos y cubreobjetos
- Viales
- Guantes
- Jeringas descartables de 5, 10 mL
- Alcohol de 70°

Material de criopreservación de semen

- Tubos cónicos de 15 y 45 mL
- Baño maría
- Pajuelas de 0.25 mL
- Alcohol polivinílico
- Parilla de congelamiento
- Refrigeradora
- Nitrógeno líquido
- Caja de poliestireno



- Globets
- Canes y canastas
- Tanque criogénico
- Dilutor tris

3.7.2 Instrumentos de investigación.

El instrumento que se usó además de los materiales mencionados se describe en el formato de registros que figura en el anexo cuadro 8.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Anomalías morfológicas de la cabeza de espermatozoides

Los resultados de anomalías morfológicas de la cabeza del espermatozoide se muestran en el Cuadro 5. Los defectos de la morfología de la cabeza gigante, pequeña, piriforme, cónica y estrecha, dos cabezas, defecto de acrosoma, normales desprendidas entre la coloración de Diff-Quik (DQ) y Eosina-Nigrosina (EN) son similares ($P > 0.05$), antes y después de la congelación de espermatozoides de toro Holstein.

Cuadro 5. Porcentaje (media \pm desviación estándar) de anomalías morfológicas de la cabeza de los espermatozoides de toro Holstein, antes y después de la congelación, utilizando tinciones Diff-Quik (DQ) y Eosina-Nigrosina (EN).

Anomalías	Coloración	Pre congelación	Post congelación	Valor de P
Gigante	DQ	0.02 \pm 0.03	0.02 \pm 0.03	$P > 0.05$
	EN	0.00 \pm 0.00	0.02 \pm 0.03	$P > 0.05$
Pequeña	DQ	0.55 \pm 0.05	0.50 \pm 0.13	$P > 0.05$
	EN	0.33 \pm 0.08	0.38 \pm 0.13	$P > 0.05$
Piriforme	DQ	0.17 \pm 0.12	0.03 \pm 0.06	$P > 0.05$
	EN	0.15 \pm 0.05	0.03 \pm 0.06	$P > 0.05$
Cónica y estrecha	DQ	0.52 \pm 0.12	0.35 \pm 0.05	$P > 0.05$
	EN	0.32 \pm 0.06	0.15 \pm 0.10	$P > 0.05$
Dos cabezas	DQ	0.00 \pm 0.00	0.02 \pm 0.03	$P > 0.05$
	EN	0.02 \pm 0.03	0.05 \pm 0.05	$P > 0.05$
Defecto de acrosoma	DQ	0.03 \pm 0.03	0.00 \pm 0.00	$P > 0.05$
	EN	0.13 \pm 0.06	0.13 \pm 0.03	$P > 0.05$
Normales desprendidas	DQ	1.83 \pm 0.35	1.25 \pm 0.31	$P > 0.05$
	EN	1.77 \pm 0.10	1.73 \pm 1.26	$P > 0.05$
Total	DQ	3.12 \pm 0.70	2.17 \pm 0.61	$P > 0.05$
	EN	2.72 \pm 0.38	2.49 \pm 1.66	$P > 0.05$



Los resultados encontrados en el presente experimento sobre porcentaje de anomalías de la cabeza del espermatozoide, antes de la congelación, 3.12 ± 0.70 con tinción Diff-Quik, 2.72 ± 0.38 con Eosina-Nigrosina. Resultados son similares al utilizar tinción Eosina-Nigrosina en espermatozoides de semen fresco de toros, 4.86 ± 5.71 (33); sin embargo, son menores a 6.1 ± 2.8 (95); 8.3 ± 6.8 (21). En equinos, Rodríguez (35) reportó 1.5 ± 5.03 con tinción Eosina-Nigrosina; Murcia *et al.* (11) encontraron 2.7 ± 3.6 con Eosina-Nigrosina, mientras con Diff-Quik 3.3 ± 4.3 . En gatos, Jiménez *et al.* (37) encontraron 1.1 ± 0.3 para tinción EN, 7.1 ± 2.5 para tinción DQ.

La variabilidad de los resultados comparados, probablemente sean al efecto especie, aunque en la misma especie hay diferencias que se deberían a la frecuencia de colección de semen, edad entre otros factores no especificados. El intervalo de colección de semen es de importancia debido a que una alta frecuencia puede afectar la madurez de los espermatozoides (44). La técnica para la tinción puede afectar a la morfología, por lo que las extensiones no deben realizarse de forma brusca para evitar roturas en las cabezas, así como provocar la aparición de posturas anormales de los espermatozoides que enmascaran el resultado real, generando un número anormalmente alto de morfoanomalías (27). Aunque, el uso de Diff-Quik, permite mejor evaluación de anomalías, especialmente anomalías en la cabeza, que son más difíciles de detectar por microscopía óptica (96). Otros aspectos de diferencia, talvez se deba a los efectos de clima, la dominancia, edad, estación, raza, tipo de alojamiento o la alimentación, entre otras causas pueden condicionar la calidad del esperma (37).

Los resultados porcentuales de defectos de cabeza de los espermatozoides post congelación encontrados en el presente estudio 2.17 ± 0.61 con coloración Diff-Quik, 2.49 ± 1.66 con tinción Eosina-Nigrosina. Estos resultados son similares a los reportes de Söderquist *et al.* (36) quienes encontraron 3.8 ± 2.1 en espermatozoides de toros post congelados. En equinos, Rodríguez (35) encontró 6 ± 6.2 con Eosina-Nigrosina. En gatos, Jiménez *et al.* (37) encontraron 0.9 ± 0.3 para tinción EN, 1.6 ± 0.8 para tinción DQ.

Las diferencias probablemente sean por las mismas causas mencionadas para los defectos de cabeza de espermatozoides antes de la congelación. Pueden existir grandes variaciones de identificación de defectos de espermatozoides, dependiendo del sistema de clasificación, técnica de extensión y tinción de la muestra y del nivel de experiencia de los técnicos de laboratorio (37).



4.2 Anomalías morfológicas del cuello de espermatozoide

Los resultados de anomalías del cuello de espermatozoide se muestran en el cuadro 6, los defectos morfológicos del cuello de los espermatozoides: descentrado, doble, en espiral, granular son similares ($P > 0.05$) entre las tinciones de Diff-Quik y Eosina-Nigrosina durante la pre y post congelación de semen. Hay mayor ($P \leq 0.05$) defecto de Gota citoplasmática proximal en espermatozoides coloreados con EN versus DQ durante pre y post congelación de semen.

Cuadro 6. Porcentaje (media \pm desviación estándar) de anomalías morfológicas del cuello de los espermatozoides de toro Holstein, antes y después de la congelación, utilizando tinciones Diff-Quik (DQ) y Eosina-Nigrosina (EN).

Anomalías	Coloración	Pre congelación	Post congelación	Valor de P
Descentrado	DQ	0.05 \pm 0.05	0.03 \pm 0.03	$P > 0.05$
	EN	0.10 \pm 0.10	0.05 \pm 0.00	$P > 0.05$
Doble	DQ	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	$P > 0.05$
	EN	0.02 \pm 0.03	0.05 \pm 0.05	$P > 0.05$
Espiral	DQ	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	$P > 0.05$
	EN	0.02 \pm 0.03	0.00 \pm 0.00	$P > 0.05$
Granular	DQ	0.38 \pm 0.23	0.40 \pm 0.09	$P > 0.05$
	EN	0.40 \pm 0.09	0.10 \pm 0.09	$P > 0.05$
Gota citoplasmática proximal	DQ	0.18 \pm 0.10 ^a	0.08 \pm 0.10 ^a	$P > 0.05$
	EN	0.25 \pm 0.09 ^b	0.30 \pm 0.13 ^b	$P > 0.05$
Total	DQ	0.61 \pm 0.38 ^a	0.51 \pm 0.22	$P > 0.05$
	EN	0.79 \pm 0.34 ^b	0.50 \pm 0.27	$P \leq 0.05$

^{ab} Superíndices diferentes dentro de la columna expresan diferencia ($P \leq 0.05$).



Los resultados del presente experimento para porcentajes de anomalías morfológicas del cuello de espermatozoide antes de la congelación con tinción Diff-Quik fue 0.61 ± 0.38 , mientras con tinción Eosina-Nigrosina fue 0.79 ± 0.34 . Resultados que son inferiores en semen fresco de toro encontrados por Söderquist *et al.* (95) que informan 1.1 ± 0.9 . Con Eosina-Nigrosina; Vilakazi *et al.* (97) muestran valores de 2.6 ± 0.6 con tinción Eosina-Nigrosina; Freneau *et al.* (21) quienes reportaron 11.7 ± 6.1 teñidos con Eosina-Nigrosina. En equinos, en espermatozoides de semen fresco, con coloración Eosina-Nigrosina, Rodríguez (35) reporta 5.8 ± 3.8 ; Murcia *et al.* (11) reportan 5.4 ± 7.7 con Eosina-Nigrosina, 5.7 ± 8.1 teñidos con Diff-Quik. En gatos, Jiménez *et al.* (37) reportan 26.3 ± 2.5 con Eosina-Nigrosina, 16.1 ± 2.5 con Diff-Quik en espermatozoides antes de la congelación.

Los resultados de la presente investigación para porcentajes de anomalías morfológicas del cuello de espermatozoide post congelación con tinción Diff-Quik fue 0.51 ± 0.22 , mientras con tinción Eosina-Nigrosina fue 0.50 ± 0.27 . Son similares al reporte de Söderquist *et al.* (36) quienes encontraron 1.0 ± 0.8 de defectos de cuello de espermatozoides de toros post congelación coloreados con Eosina-Nigrosina. Son menores a los reportes de Rodríguez (35) quien encontró 5.5 ± 2.3 post congelamiento de espermatozoides de equinos coloreados con Eosina-Nigrosina. Jiménez *et al.* (37) post congelación de espermatozoides de gatos reportaron 30.1 ± 3.8 con EN, 23.3 ± 3.1 con tinción Diff-Quik.

Las diferencias de la cantidad de espermatozoides con defectos del cuello evaluados con los colorantes Diff-Quik y Eosina-Nigrosina, posiblemente es por razón de especie animal, veces de colección de semen y otros factores no especificados. El intervalo de colección de semen es de importancia debido a que una alta frecuencia puede afectar la madurez de los espermatozoides (44). Otros aspectos de diferencia, tal vez se deba a los efectos de clima, la dominancia, edad, estación, raza, tipo de alojamiento o la alimentación, entre otras causas pueden condicionar la calidad del esperma (37). Por otro lado, la diferencia entre Diff-Quik y Eosina-Nigrosina probablemente tenga relación con grado o intensidad de la tinción de cada colorante sobre las estructuras espermáticas, que evidenciarían los defectos.

4.3 Anomalías morfológicas de la cola de espermatozoide

Los resultados de los defectos de la cola del espermatozoide se muestran en el Cuadro 7. Las anomalías espermáticas de la cola corta, abaxial, dos colas, gota citoplasmática distal son similares ($P > 0.05$) con la coloración Diff-Quik y Eosina-Nigrosina antes y post congelación



de semen. Se identifica mayor porcentaje ($P > 0.05$) de anomalía de cola doblada con tinción de Eosina-Nigrosina que Diff-Quik antes y después la congelación de semen de toro.

Cuadro 7. Porcentaje (media \pm desviación estándar) de anomalías morfológicas de la cola de los espermatozoides de toro Holstein, antes y después de la congelación, utilizando tinciones Diff-Quik (DQ) y Eosina-Nigrosina (EN).

Anomalías	Coloración	Pre congelación	Post congelación	Valor de P
Corta	DQ	0.77 \pm 0.08	0.63 \pm 0.16	$P > 0.05$
	EN	1.12 \pm 0.03	1.03 \pm 0.25	$P > 0.05$
Abaxiales	DQ	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	$P > 0.05$
	EN	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	$P > 0.05$
Dos colas	DQ	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	$P > 0.05$
	EN	0.02 \pm 0.03	0.00 \pm 0.00	$P > 0.05$
Gota citoplasmática distal	DQ	0.23 \pm 0.10	0.22 \pm 0.03	$P > 0.05$
	EN	0.88 \pm 0.32	0.37 \pm 0.03	$P > 0.05$
Doblada	DQ	3.68 \pm 0.70 ^a	3.92 \pm 0.24 ^a	$P > 0.05$
	EN	7.12 \pm 0.85 ^b	6.75 \pm 0.57 ^b	$P > 0.05$
Total	DQ	4.68 \pm 0.88 ^a	4.77 \pm 0.43 ^a	$P > 0.05$
	EN	9.14 \pm 1.23 ^b	8.15 \pm 0.85 ^b	$P > 0.05$

^{ab} Superíndices diferentes dentro de la columna expresan diferencia ($P \leq 0.05$).

Los resultados porcentuales del presente estudio muestran defectos de cola de espermatozoides antes de congelación con colorante Diff-Quik 4.68 \pm 0.88, Eosina-Nigrosina 9.14 \pm 1.23. Resultados que son altos de anomalías espermáticas en el semen fresco de toros respecto al reporte de Freneau *et al.* (21) quienes identificaron un porcentaje de 4.7 \pm 2.3 con tinción Eosina-Nigrosina, también al reporte de Menon *et al.* (33) quienes informaron 1.01 \pm 1.5 de defectos de la cola de espermatozoides con tinción de Eosina-Nigrosina. En equinos, Rodriguez (35) encontró 12.6 \pm 7.34 de anomalías espermáticas antes de la congelación de semen con Eosina-Nigrosina; Murcia *et al.* (11) muestran en semen fresco 2.7 \pm 4.2 con Eosina-Nigrosina, 2.2 \pm 3.7 con Diff-Quik. Mota *et al.* (9) muestra valores para anomalías de la cola de espermatozoides 7.14 \pm 5.41 con tinción Diff-Quik en semen



fresco de gato; en la misma especie Jiménez *et al.* (37) antes de la congelación de espermatozoides de gatos reportaron 22.9 ± 2.3 con EN, 19.3 ± 2.3 con tinción Diff-Quik.

Las anomalías espermáticas porcentuales de la cola encontradas post congelación de semen de toro en el presente estudio fueron 4.77 ± 0.43 con Diff-Quik, 8.15 ± 0.85 con Eosina-Nigrosina. Resultados que son menores al estudio de Rodríguez (35) quien encontró 46.6 ± 21.4 de anomalías espermáticas post congelación de semen equino utilizando Eosina-Nigrosina. También Jiménez *et al.* (37) antes de la congelación de espermatozoides de gatos informaron 27.3 ± 2.3 con EN, 20.9 ± 1.7 con Diff-Quik.

Estos resultados últimos que son mayores a los resultados del presente estudio, posiblemente sea debido al factor de procedencia de espermatozoides del lugar del tracto reproductivo que fue del epidídimo, en este lugar podría estar mezclado los espermatozoides de la cola y parte del cuerpo del epidídimo, donde en este último los espermatozoides aún no tienen una maduración completa. La morfología de los espermatozoides epididimarios puede diferir de un eyaculado en un mismo individuo, esto puede deberse posiblemente a la exposición al plasma seminal al que son sometidos durante el proceso de eyaculación (98). Por otro lado, el tipo de colorante podría afectar la morfología del espermatozoide, uno de los inconvenientes que presenta el uso de la Eosina-Nigrosina es que, al ser un colorante hipotónico añadido a muestra no fijada químicamente, puede producir morfologías anormales en los espermatozoides, especialmente defectos en la cola (99).



CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

a) Conclusiones

- Las anomalías morfológicas de la cabeza del espermatozoide fueron similares con Diff-Quik y Eosina-Nigrosina antes y después de la criopreservación del semen de toro Holstein.
- Eosina-Nigrosina y Diff-Quik, fueron similares en la mayoría de las anomalías del cuello del espermatozoide de toro, siendo mejor Eosina-Nigrosina para las gotas citoplasmáticas antes y después de la criopreservación.
- La tinción con Eosina-Nigrosina para las anomalías de la cola de espermatozoides de toro fue superior frente a la coloración con Diff-Quik antes y después de la criopreservación.
- La evaluación morfológica de espermatozoides del toro es importante para predecir el resultado del espermatozoide congelado-descongelado en una inseminación artificial o programas de fertilización *in vitro*.

b) Recomendaciones

- Evaluar la fertilidad, utilizando métodos de tinción en inseminación artificial con semen criopreservado.
- Realizar estudios de comparación entre distintas edades, razas y época de año en bovinos.
- Evaluar la morfología del acrosoma con las distintas tinciones mencionados en el trabajo.
- Realizar estudios de comparación entre distintas especies.



Referencias Bibliográficas

1. Vale WG. Collection, processing and deep freezing of buffalo semen. *Buffalo J.* 1994;
2. Al-Makhzoomi A, Lundeheim N, Håård M, Rodríguez-Martínez H. Sperm morphology and fertility of progeny-tested AI dairy bulls in Sweden. *Theriogenology.* 2008;70(4):682–91.
3. Palacios CJ. Técnicas para la evaluación de la capacidad fecundante de los espermatozoides. *Memorias posgrado Reprod Bov CGR Colomb.* 2005;
4. Maxwell W, Evans G. Inseminación artificial de ovejas y cabras [Internet]. Zaragoza : 1990. 192-24 p. Available from: <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=UCC.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=130457>
5. Eliasson R. Semen Analysis. *Environ Health Perspect* [Internet]. 1978;24(June):81–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1637226/pdf/envhper00481-0081.pdf>
6. Alvarez Lleó C. Análisis integrado de morfología y movilidad espermática humana con el uso del sperm class analyzer. Vol. 53, *Occupational Medicine.* 2003. 246-248 p.
7. Hidalgo Ordóñez CO, Tamargo Miguel C, Díez Monforte C. Análisis del semen bovino. In: *Informacion gandra* [Internet]. 2005. p. 39–43. Available from: <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2794872&orden=181848&info=link>
8. García Artiga C, Fontanillas J, Pérez J, García-Cuenca I, Marín Rillo S, Pérez García T. Técnicas de tinción espermática. *Porci.* 1994;11–8.
9. Mota PC, Ramalho-Santos J. Comparison between different markers for sperm quality in the cat: Diff-Quik as a simple optical technique to assess changes in the DNA of feline epididymal sperm. *Theriogenology.* 2006;65(7):1360–75.
10. Balcázar Sánchez JA, Porras Almeraya A. *Manual de Practicas en Manejo Reproductivo de Ovinos y Caprinos.* Vol. 136, Universidad Nacional Autonoma de Mexico Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 2007.
11. Murcia-Robayo RY, Jouanisson E, Beauchamp G, Diaw M. Effects of staining method



- and clinician experience on the evaluation of stallion sperm morphology. *Anim Reprod Sci* [Internet]. 2017;188(November):165–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.11.021>
12. Sprecher DJ, Coe PH. Differences in bull spermograms using Eosin-Nigrosin stain, feulgen stain, and phase contrast microscopy methods. *Elsevier*. 1995;45:757–64.
 13. Jiménez Vaquero E. Aportaciones a la criopreservación del esperma del gato doméstico: Influencia de las soluciones crioconservadoras. Universidad de Córdoba, España. 2013;183.
 14. Pozor MA, Act D, Zambrano GL, Runcan E, Macpherson ML, Act D. Usefulness of Dip Quick Stain in Evaluating Sperm Morphology in Stallions. *Cut edge Appl equine Reprod*. 2012;
 15. Amann R., Seidel G., Mortimer R. Fertilizing potential in vitro of semen from young beef bulls containing a high or low percentage of sperm with a proximal droplet. *Theriogenology*. 2000;(00):1499–515.
 16. Cisale H. Nuevas tendencias en la valoración de la calidad seminal. *Sitio Argentino Prod Anim*. 2014;16:101–3.
 17. Flores J, Contreras P, Correa J, Amtmann C. *Archivos de Medicina Veterinaria*. Valdivia - Chile; 1975.
 18. Menkveld R, Lacquet FA, Kruger TF, Lombard CJ, Sanchez Sarmiento CA, De Villiers A. Effects of different staining and washing procedures on the results of human sperm morphology evaluation by manual and computerised methods. *Andrologia*. 1997;7:1–7.
 19. Bilgili SF, Renden JA, Sexton KJ. The influence of staining techniques and examiners on evaluation of the morphology of fowl spermatozoa. *Poult Sci*. 1985;64(12):2358–61.
 20. Van der Horst G, Maree L. SpermBlue: A new universal stain for human and animal sperm which is also amenable to automated sperm morphology analysis. *Biotech & Histochemistry*. 2010;28(1):189.
 21. Freneau GE, Chenoweth PJ, Ellis R, Rupp G. Sperm morphology of beef bulls



- evaluated by two different methods. *Anim Reprod Sci.* 2010;118(2–4):176–81.
22. Nieto-dionisio K, Urbina MT, Medina R, Benjamín I, Biber JL. Comparación entre Testsimplets® y Diff-Quik para la evaluación de la morfología espermática. *Rev Obs Ginecol.* 2011;71(1):28–33.
 23. Bertolini M, Bertolini LR. Advances in reproductive technologies in cattle: from artificial insemination to cloning. *Rev Med Vet Zoot.* 2009;56:184–94.
 24. Cormier N, Sirard M-A, Bailey JL. Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. *J Androl.* 1997;I(4).
 25. Oses M V., Teruel MT, Cabodevila JA. Utilización de semen bovino sexado en inseminación artificial, transferencia embrionaria y fertilización in vitro. *Rev Vet.* 2009;20(2):138–45.
 26. Tello Landeta ER. Efecto del diluyente sobre la viabilidad espermática para la conservación de semen a diferentes temperaturas en caninos. Vol. 119, Universidad Técnica de Ambato Facultad de Ciencias Agropecuarias. 2015.
 27. Alamo Santana D. Crioconservación y viabilidad espermática en la especie canina : Utilización de nitrógeno líquido vs ultracongelador de - 152 °C. Universidad de las Palmas de Gran Canaria. 2007.
 28. Madrid-Bury N, Pérez-Gutiérrez JF, Pérez-Garnelo S, Moreira P, Sanjuanbenito BP, Gutiérrez-Adán A, et al. Relationship between non-return rate and chromatin condensation of deep frozen bull spermatozoa. *Theriogenology.* 2005;64(2):232–41.
 29. Siemieniuch M, Dubiel A. Preservation of tomcat (*Felis catus*) semen in variable temperatures. *Anim Reprod Sci.* 2007;99(1–2):135–44.
 30. Betancur R, Suárez Ú, Alberto B. Técnicas para el análisis de la fertilidad potencial del semen equino. 2013;8:69–81.
 31. Kruger TF, Franken DR. Atlas of human sperm morphology evaluation. 2004;83.
 32. Bamba K. Evaluación of acrosomal integrity of boar spermatozoa by bright field microscopy using an Eosin-Nigrosin stain. *Theriogenology.* 1988;29(6):1245–51.
 33. Menon AG, Barkema HW, Wilde R, Kastelic JP. Asociaciones entre anomalías de



- esperma , raza , edad y circunferencia escrotal en toros de carne. *Can J Vet Res.* 2011;75(4):241–7.
34. Hidalgo Prieto M. Estudio del efecto de la congelación-descongelación sobre los parametro morfométricos del espermatozoide de macho cabrio. Universidad De Córdoba Facultad de Veterinaria; 2004.
 35. Rodriguez Sarria CM. Efecto del medio Lactosa EDTA-plasma seminal en la criopreservación de espermatozoides de *Equus caballus* “ potro .” Universidad Ricardo Palma; 2007.
 36. Söderquist L, Janson L, Larsson K, Einarsson S. Sperm morphology and fertility in A. I. bulls. *J Vet Med Ser A.* 1991;38(1–10):534–43.
 37. Jiménez E, Pérez-Marín CC, Millán Y, Agüera E. Subjective assessment to valuate feline sperm morphology using different staining techniques. Universidad de Córdoba Facultad de veterinaria; 2013.
 38. Díaz P, Fonseca V, Martínez P, Rey A. Inseminación artificial en bovinos. *Bibl Virtual Univers* [Internet]. 2003;1–30. Available from: http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/inseminacion_artificial/188-Inseminacion_2004.pdf
 39. Castro Cruz JA. Porcentajes de preñez y horarios de inseminación artificial en vacas criollas X normando en el municipio de Ciénega , Boyacá. Vol. 3. 2013.
 40. Guzman Cubas N. Evaluación seminal en toros por métodos manuales o computarizados. 2013;1–68. Available from: http://www.fvet.edu.uy/drupal-6.16/sites/default/files/biblio_cubas.pdf
 41. Vallecillo Hernandez AF. Caracterización reproductiva de toros de la raza marismeña como base a su conservación. *Dialnet.* 2011;12402.
 42. Pacheco J. Métodos de colección de semen en camélidos sudamericanos. *Revista Electrónica de Veterinaria* [Internet]. 2008;9(4):1–17. Available from: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n040408/040806.pdf>
 43. Angelino Olivera JN. Manual de evaluacion de semen en bovinos. Universidad Veracruzana Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia; 2009.



44. Vera Muñoz O, Muñoz G. Cómo mejorar la colección, manejo y calidad microbiológica del semen. *Man Ganad Doble Propos.* 2005;
45. Furman JW, Ball L, Seidel GE. Electroejaculation of bulls using pulse waves of variable frequency and length. *J Anim Sci.* 1975;40(4):665–70.
46. Villamizar Guerrero GD. Manual de procedimientos para la colecta y criopreservación de semen bovino para la empresa santa clara genética estado Paraná – Brasil [Internet]. Universidad Cooperativa de Colombia Facultad Medicina Veterinaria y Zootecnia; 2014. Available from: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0007125000277040/type/journal_article
47. Woods E, Thirumala S, Han X, Critser JK. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology.* 2004;48:146–56.
48. De Souza Castelo T, Rodrigues Frota T, Rodrigues Silva A. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. *Acta Vet Bras.* 2008;2(3):67–75.
49. Muiño Otero R. Evaluacion de la motilidad y viabilidad del semen bovino mediante el uso de sistemas casa y citometría de flujos: Identificacionde subpoblaciones espermáticas. Universidad Santiago de Compostela; 2008.
50. Mazur P, Cole KW. Roles of unfrozen fraction, salt concentration, and changes in cell volume in the survival of frozen human erythrocytes. *Cryobiology.* 1989;26(1):1–29.
51. Watson PF, Holt W V. Cryobanking the Genetic Resource: Wildlife Conservation for the Future? 1st Editio. Watson PF, Holt W V., C. RJ, Wildt DE, editors. Taylor & Francis: London; 2001. 113–122 p.
52. Correa J., Rodriguez M., Patterson D., Zavos P. Various temperatures and their effects on sperm viability, osmotic shock and sperm membrane functional integrity. *Theriogenology.* 1996;(96):413–20.
53. Boiso I. Principios básicos de criobiología. *Rev Iberoam Fertil* [Internet]. 2001;18:4–6. Available from: http://www.revistafertilidad.org/RecursosWEB/fertilidad/Fert_Jul_Ag01-Ponen3.pdf
54. Stornelli M, Sota D la R. Fertilidad y supervivencia del semen canino criopreservado.



- Analecta Vet [Internet]. 2006;25(2):29–38. Available from: http://old.fcv.unlp.edu.ar/analecta/volumenes/contenido/115_Stornelli_criopreservacion.pdf
55. Catena M, Cabodevila J, Taurus I. Evaluación de semen bovino congelado. Sitio Argentino Prod Anim [Internet]. 1999;1(1):1–9. Available from: http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/inseminacion_artificial/05-evaluacion_de_semen_bovino_congelado.pdf
56. Rodriguez-Martinez H, Larsson B, Zhang BR, Soderquist L. In vitro assessment of Viability and fertilizing capacity of bull spermatozoa. J Reprod Dev. 1997;43(1):1–11.
57. Morillo M, Salazar S, Castillo E. Evaluación del potencial reproductivo del macho bovino [Internet]. INIA. 2012. 63 p. Available from: http://www.sian.inia.gob.ve/pdfnpn/Eval_poten_repro_macho_bovino.pdf
58. Vera Castillo CA. Evaluación de la validez de la cria y analisis de semen para predecir la fertilidad del toro. Universidad de la Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias; 2011.
59. Bonadonna T. Reproduccion animal e inseminacion artificial. 2^a ed. Buenos Aires, Arg; 1989.
60. Jeyendran R., Van der Ven H., Perez-Pelaez M, Crabo B., Zaneveld L. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. J Reprod Ferti. 1984;70(1):219–28.
61. Cortés Gallego S. Efecto de la conservación sobre la fisiología espermática de semen caprino. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Biologicas; 2003.
62. Pineda González S, Pinilla Arenas SM. Comparación de dos diluyentes (lactosa-glicerol-yema de huevo; INRA-DFORMIDA-yema de huevo) en la preservacion de semen equino. Vol. 136. Universidad de la Salle. Facultad de Medicina Veterinaria; 2007.
63. Rodriguez Montaña DF. Diseño e implementación de una herramienta computacional para análisis asistido de motilidad espermatica en bovinos mediante técnicas de visión artificial. Universidad de Cundinamarca. Facultad de Ingenieria; 2016.



64. Fiser PS, Fairfull RW. The effect of glycerol-related osmotic changes on post-thaw motility and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiology*. 1989;26(1):64–9.
65. Graham JK, Mocé E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology*. 2005;64(3):492–504.
66. Who. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Fourth edi. Published on behalf of the World Health Organization by; 1992.
67. Ferrian S. Influencia de las características seminales del eyaculado de conejo sobre la calidad espermática post-descongelación [Internet]. Universidad Politecnica de Valencia; 2007. Available from: <http://riunet.upv.es/handle/10251/12203>
68. Ostermeier GC, Sargeant GA, Yandell BS, Evenson DP, Parrish JJ. Relationship of bull fertility to sperm nuclear shape. *J Androl*. 2001;22(4):595–603.
69. Muiño R, Fernández M, Areán H, Viana J., 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.
70. Barth AD. Bull breeding soundness evaluation manual. Third Edit. The Western Canadian Association of Bovine Practitioners, Saskatonn, CAN; 2000.
71. Knobil E, Neill J. Physiology of reproduction. 3rd Editio. Neill J, editor. Vol. 1, *Journal of Experimental Psychology: General*. 2005. 23-42 p.
72. Hafez B, Hafez ES. Reproduccion inseminacion artificial. Séptima Ed. McGraw-Hill Interamericana; 2000.
73. Diaz HO, Arancibia C C. Descripcion estadistica de las anormalidade espermaticas en bovinos. In: *Archivos de Medicina Veterinaria*. 1974.
74. Barth AD, Oko RJ. Abnormal morphology of bovine spermatozoa [Internet]. Ames : Iow. Vol. 69. 1989. 22-22 p. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1751-0813.1992.tb09864.x>
75. Ax R., Dally B., Didion R., Lenz CC, Love D., Hafez B, et al. Semen evaluation. In: Hafez B, Hafez ESE, editors. *Reproduction in Farm Animals*. Blackwell; 2000. p. 365–



- 75.
76. Barth AD. Bull breeding soundness. Third edit. by the western canadian association of bovine practitioners; 2013.
77. Purwantara B, Arifiantini RI, Riyadhi M. Sperm morphological assessments of friesian Holstein bull semen collected from three artificial insemination centers in Indonesia. *JIndonesian TropAnimAgric*. 2010;35(2):90–4.
78. Brito LFC, Greene LM, Kelleman A, Knobbe M, Turner R. Effect of method and clinician on stallion sperm morphology evaluation. *Theriogenology* [Internet]. 2011;76(4):745–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.04.007>
79. Saenz de SJ, Lacruz PC, Fernández IC, Fernández de, Mera J. J Lopez PD. XXIV Congreso de la sociedad española de anatomía patológica. XIX Congreso de la sociedad española de citología. *Revista española de patología*. 2009 May;
80. Sousa APM, Tavares RS, Velez De La Calle JF, Figueiredo H, Almeida V, Almeida-Santos T, et al. Dual use of Diff-Quik-like stains for the simultaneous evaluation of human sperm morphology and chromatin status. *Hum Reprod*. 2009;24(1):28–36.
81. Coetzee K, Bermes N, Krause W, Menkveld R. Comparison of normal sperm morphology outcomes from two different computer-assisted semen analysis systems. *Andrologia*. 2001;33(3):159–63.
82. Núñez Ochoa L, Bouda J. *Patología clínica veterinaria*. 1 ra edici. Mexico: Universidad Nacional Autónoma de México; 2007.
83. Parra Mayorga P. Comparación de la técnica de Eosina y Christmas tree para el rastreo de espermatozoides en casos de delitos sexuales en el centro de investigación de ciencias forenses ambato – Tungurahua, en el periodo julio – diciembre 2016 ”. Universidad Nacional de Chimborazo; 2017.
84. Cromakit. Eosina - Nigrosina para tincion de espermatozoides; para diagnostico “in vitro”. *Quim Clin Aplic*. 2011;34(July):43870.
85. Dott HM, Foster GC. A technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are eosinophilic in a differential ‘live/dead’ stain. *J Reprod Fert*.



- 1972;(29):443–5.
86. Kalter H. Congenital malformations : an inquiry into classification and nomenclature. *J med Genet.* 1998;35:661–5.
 87. RAE. Real Academia Española. 2018.
 88. Santanbrosio E, Ortega M, Garabaldi PA. Tinción y observación de microorganismos. [Internet]. Universidad Tecnológica Nacional; 2009. Available from: https://www.frro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5_anio/biotecnologia/practico4.pdf
 89. Blázquez MA. Memoria prácticas en empresa: Complejo asistencial de Ávila. 2010.
 90. Supo J. Cómo empezar una tesis. 2015. 70 p.
 91. Casal Jordi EM. Tipos de muestreo. *Cent Recer en Sanit Anim.* 2003;(1):3–7.
 92. Google E. Google Earth [Internet]. 2018. p. 88803149. Available from: <https://earth.google.com/web/@-13.64187874,-72.88803149,2295.33450139a,25.22413793d,35y,192.68380799h,0t,0r/data=ClkaVxJRChYweDA6MHg5ZDU0MDk4OGI1MmRmZDA3Gd5ab7ajSCvAIYmd2InVOFLAKiVGYWN1bHRhZ>
 93. Nieto Dionisio KD. Técnicas de reproducción asistida tinciones para la evaluación de la morfología espermática. Universidad Simón Bolívar; 2010.
 94. Cabrera V P, Pantoja A C. Viabilidad espermática e integridad del acrosoma en semen congelado de toros nacionales. *Rev Investig Vet del Peru.* 2012;23(2):192–200.
 95. Söderquist L, Janson L, Håård M, Einarsson S. Influence of season, age, breed and some other factors on the variation in sperm morphological abnormalities in Swedish dairy A.I. bulls. *Anim Reprod Sci.* 1996;44(2):91–8.
 96. Axné E, Forsberg L. Semen collection and assessment, and artificial insemination in the cat. *Recent Adv Small Anim Reprod.* 2002;9.
 97. Vilakazi DM, Webb EC. Effect of age and season on sperm morphology of friesland bulls at an artificial insemination centre in South Africa. *S Afr J Anim Sci* [Internet]. 2004;34(1). Available from: <http://www.jstor.org/stable/26913>



98. Axner E, Strom Holst B, Linde-Forsberg C. Morphology of spermatozoa in the cauda epididymidis before and after electroejaculation and a comparison with ejaculated spermatozoa in the domestic cat. *Theriogenology*. 1998;50(98):973–9.
99. Peña Martínez AI. Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Anim Reprod Sci*. 2004;82–83:209–24.



Anexos



Cuadro 8. Ficha de registro de anomalías morfológicas de espermatozoides de semen de toro

TINCIÓN CON DIFF QUIK Y EOSINA-NIGROSINA															
Muestra analizada N°		Antes de congelar						Después de congelar							
		Diff-Quik			Total	Eosina-Nigrosina			Total	Diff Quik			Eosina-Nigrosina		
N° células observadas por placa		A	B	C		A	B	C		A	B	C	A	B	C
IDENTIFICACIÓN DE PLACA PORTA OBJETOS															
Anomalías	Primarias	Cabeza	Gigantes (macrocéfalo)												
			Pequeñas												
			Periformes												
			Cónicas y estrechas (amorfos)												
			Dos cabezas												
		Cuello	Unión del cuello fuera del eje (descentrado)												
	Doble														
	Espiral														
	Cola	Deshilachado, granular o hinchado													
		Corta (defecto de la cola en muñón)													
		Abaxiales, accesorias o múltiples													
	Secundari	Cabeza	Dos colas												
			Cabezas normales desprendidas												
		Cuello	Acrosoma roto, deforme o desprendido												
Pieza media o principal doblada															
Gota citoplasmática proximal y distal															
Total															



Figura 12. Colección de muestra seminal, con la técnica de vagina artificial.

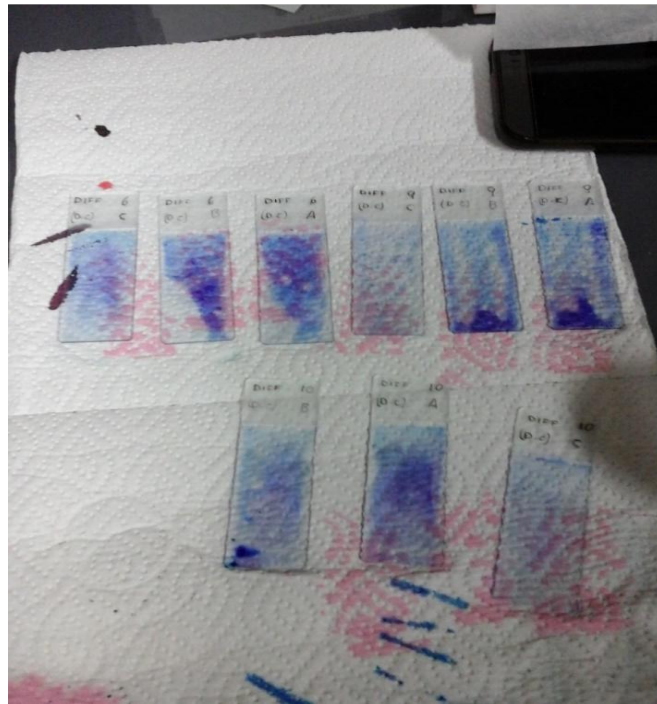


Figura 13. Secado de muestras seminales en placas porta objetos después de la tinción con Diff - Quik.

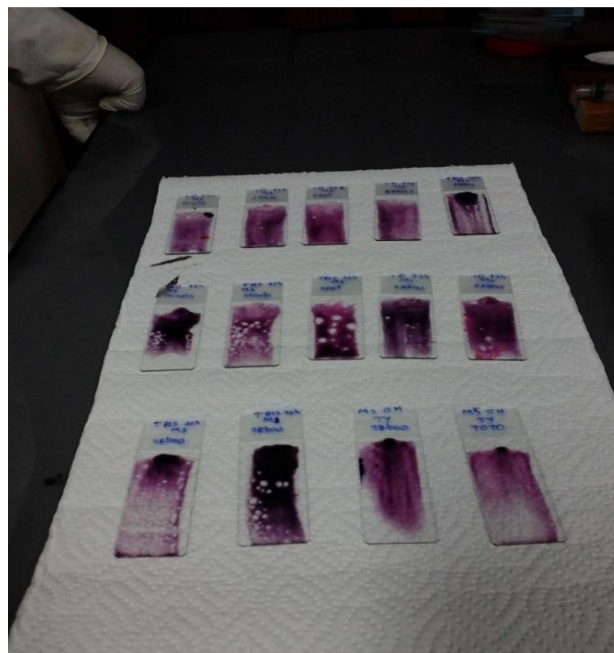


Figura 14. Secado de muestras seminales en placas porta objetos después de la tinción con Eosina – Nigrosina.

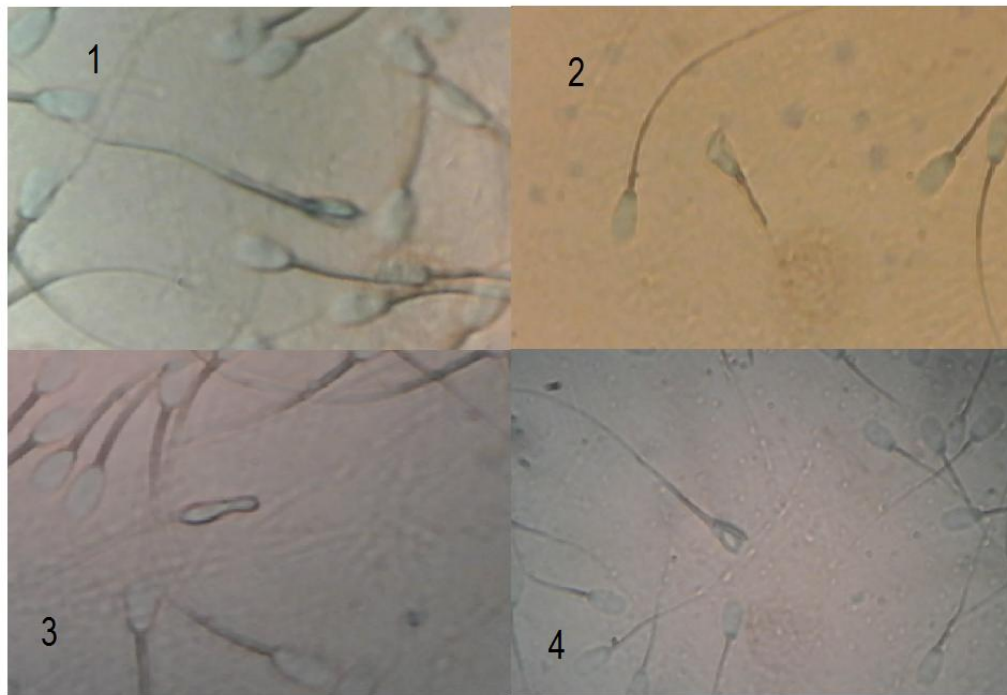


Figura 15. Espermatozoides con tinción Diff-Quik: (1) microcefalia, (2) cabeza cónica estrecha, (3) periforme, (4) acrosoma desprendido.

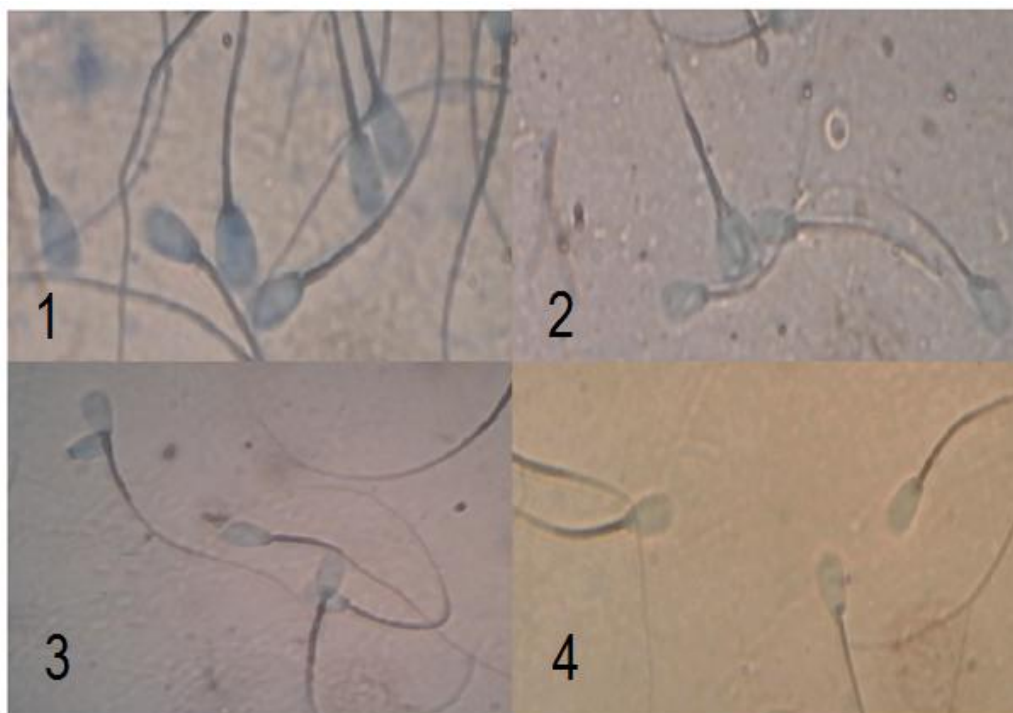


Figura 16. Espermatozoides con tinción Diff-Quik: (1) macrocéfalo, (2) dos cabezas, (3) cabeza normal desprendida, (4) cuello descentrado.

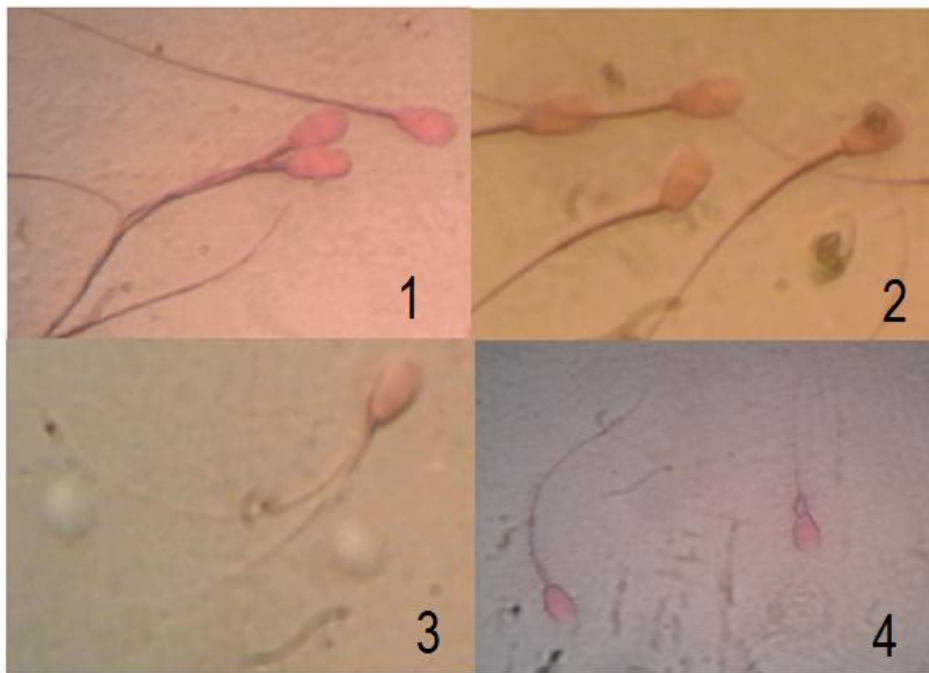


Figura 17. Espermatozoides con tinción Eosina-Nigrosina: (1) dos cabezas, (2) cuello descentrado, (3) dos colas, (4) cuello hinchado.

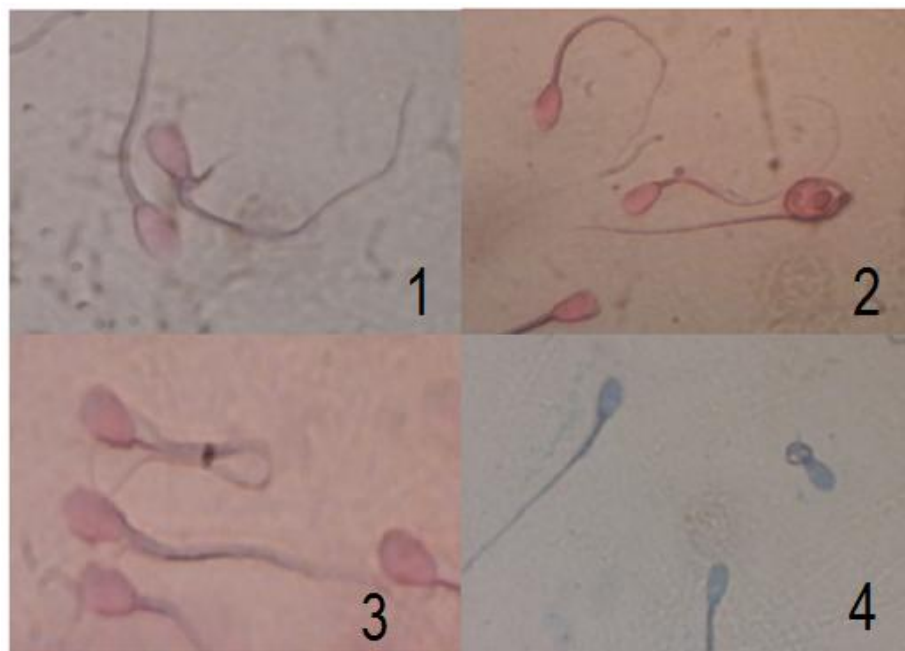


Figura 18. Espermatozoides con tinción Eosina-Nigrosina: (1) dos cuellos, (2) macrocéfalo, (3) cola doblada, (4) espermatozoide con cola en muñón con tinción Diff-Quik.