

**UNIVERSIDAD NACIONAL AMAZÓNICA DE MADRE  
DE DIOS**

**FACULTAD DE INGENIERÍA**

**ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA  
VETERINARIA - ZOOTECNIA**



**TESIS**

**“Comparación de la motilidad y viabilidad espermática de toros  
*Bos indicus* utilizando dos métodos de congelación  
en Madre de Dios”**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO –  
ZOOTECNISTA**

**AUTOR:**

Bach. HUAMAN HUANQQUE, Nancy Delia

**ASESOR:**

Mg. Sc. TICONA ADUVIRI, Wilebaldo Blair

**CO-ASESOR:**

Dra. MADUEÑO PORTILLA, Roxana

**Puerto Maldonado, septiembre de 2025**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AMAZÓNICA DE MADRE  
DE DIOS**

**FACULTAD DE INGENIERÍA**

**ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA  
VETERINARIA - ZOOTECNIA**



**TESIS**

**“Comparación de la motilidad y viabilidad espermática de toros  
*Bos indicus* utilizando dos métodos de congelación  
en Madre de Dios”**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO –  
ZOOTECNISTA**

**AUTOR:**

Bach. HUAMAN HUANQQUE, Nancy Delia

**ASESOR:**

Mg. Sc. TICONA ADUVIRI, Wilebaldo Blair

**CO-ASESOR:**

Dra. MADUEÑO PORTILLA, Roxana

**Puerto Maldonado, septiembre de 2025**



## **DEDICATORIA**

A Dios, quien ha sido mi guía y mi fortaleza que necesitaba para completar esta etapa de mi formación profesional.

A mi padre Julio Huaman Aima (†) y mi madre Narcisa Huanqque Condori por darme la vida y brindarme su amor; y a mis queridos hermanos por ser el pilar más importante de mi vida y por demostrarme siempre su cariño y apoyo incondicional.

A mi esposo Willer Hurtado quien me acompaña y está presente en mi vida, con su amor y fortaleza, compartiendo conmigo momentos importantes y siempre dispuesto a escucharme y apoyarme.

A mi amado hijo Gadiel Willer quien es la fuerza y el motivo para seguir adelante, te has convertido en mi sostén desde que naciste.

## **AGRADECIMIENTO**

Al señor Jesucristo, mi señor y Dios, por enseñarme el camino correcto de la vida, guiándome y fortaleciendo cada día con su Santo Espíritu.

A la Universidad Nacional Amazónica de Madre de Dios por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios superiores y lograr mi formación académica y especialmente a la Carrera Profesional de Medicina Veterinaria – Zootecnia.

A los docentes de la Carrera Profesional de Medicina Veterinaria – Zootecnia que me dieron su conocimiento y sabiduría para desarrollarme en mi vida y formación profesional.

A mi Asesor Mg. Sc. Wilebaldo Blair Ticona Aduviri quien me brindó su colaboración permanente durante toda la ejecución y elaboración de este trabajo investigativo, a la Dra. Roxana Madueño Portilla por su apoyo en el trabajo de investigación, al Ing. Dante Hermes Marca Choquecahua que con sus conocimientos y experiencias compartidas dio realce durante la ejecución de la tesis, al Dr. Julio Málaga Apaza (†) por su confianza y apoyo incondicional, y al Ph. D. Bernardo Roque Huanca, por el apoyo en el análisis estadístico y la revisión del manuscrito.

Al MVZ. Cesar Días Barrueta administrador del Centro de Desarrollo Ganadero – CEDEGA por su valiosa colaboración en la ejecución del trabajo de tesis, facilitando las instalaciones y los equipos adecuados.

A los jurados de tesis Dr. René Eduardo Huanca Frías, Mg. Sc. Freddy Lot Yujra Pampa, al Mg. Dennis Casiano Llana López, por sus sabios consejos y orientaciones.

A mis padres Sr. Julio y Sra. Narcisa quienes me inculcaron valores, a no rendirme, a seguir adelante, a la cual debo mi formación como profesional y como ser humano.

A mi esposo Willer por su paciencia, comprensión y solidaridad a lo largo de la ejecución de la tesis, sin su apoyo no habría podido completarlo y a mi hijo Gadiel quien es mi inspiración para lograr todos los objetivos.

A mis hermanos Julio Cesar, Clorinda, Betsabel, Sharmely y Laidy porque con sus oraciones, consejos y palabras de aliento hicieron de mí una mejor persona y que siempre están presentes en todos mis sueños y metas.

A mis compañeros y amigos por su apoyo y motivación de seguir adelante.

## INFORME DE ORIGINALIDAD

6%

INDICE DE SIMILITUD

4%

FUENTES DE INTERNET

3%

PUBLICACIONES

3%

TRABAJOS DEL  
ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

1

[tesis.ucsm.edu.pe](https://tesis.ucsm.edu.pe)

Fuente de Internet

1%

2

Submitted to Universidad Nacional  
Amazonica de Madre de Dios

Trabajo del estudiante

1%

3

[repositorio.unamad.edu.pe](https://repositorio.unamad.edu.pe)

Fuente de Internet

1%

4

[hdl.handle.net](https://hdl.handle.net)

Fuente de Internet

1%

5

Benito Lopez, Diannett. "Indicadores  
fisiológicos, endocrinos y bioquímicos en  
alpacas a gran altitud", Universidad Nacional  
del Altiplano de Puno (Peru)

Publicación

1%

6

[repositorio.unap.edu.pe](https://repositorio.unap.edu.pe)

Fuente de Internet

1%

7

[dspace.esPOCH.edu.ec](https://dspace.esPOCH.edu.ec)

Fuente de Internet

1%

[repository.ucc.edu.co](https://repository.ucc.edu.co)

## **PRESENTACIÓN**

La actividad ganadera es de fundamental importancia para la prosperidad económica y social del área rural y la seguridad alimentaria del país, donde la reproducción constituye como uno de los pilares más importantes de la producción, y la criopreservación de semen, como el principal soporte de las técnicas reproductivas asistidas, la misma que depende del manejo de la recolección, evaluación, congelación y descongelación, donde la motilidad y viabilidad son los aspectos más sensibles que pueden afectar la fertilidad, la tasa de preñez y el desempeño reproductivo del hato ganadero.

Durante décadas, la criopreservación convencional de semen ha sido la técnica más utilizada a nivel mundial, permitiendo la conservación del material genético de animales reproductores por largos períodos de tiempo. Esta tecnología ha contribuido significativamente a la economía del productor ganadero, al reducir los costos asociados con la alimentación, el transporte y el mantenimiento de los animales reproductores. Actualmente, la criopreservación automatizada surge como una alternativa innovadora que mejora el control del proceso de congelación y la eficiencia reproductiva; sin embargo, aún existe limitada información sobre sus beneficios, sobre todo para ámbitos de trópico, en especial con el ganado *Bos indicus*.

El presente estudio muestra los resultados de una investigación comparativa sobre la criopreservación de semen, entre el método convencional y el método automatizado, evaluado a través de los indicadores más importantes de la calidad del semen, la motilidad y la viabilidad espermática, en un período antes de la congelación y en otro después de la descongelación, realizado en un ecosistema trópico húmedo, en toros cebú, a fin de conocer y mejorar el manejo de la técnica de congelación de semen con fines de reproducción y mejora genética del ganado.

## RESUMEN

Los métodos de congelación representan una herramienta útil en la reproducción asistida en el ganado bovino, sin embargo, pueden tener efectos perjudiciales sobre la calidad espermática. El presente estudio tuvo como objetivo comparar la motilidad y viabilidad espermática de toros *Bos indicus* utilizando dos métodos de congelación en Madre de Dios. Se utilizaron cinco toros *Bos indicus* de 3 a 4 años de edad y  $714.9 \pm 43.2$  kg, pertenecientes al Centro de Desarrollo Ganadero – CEDEGA del Gobierno Regional de Madre de Dios. El semen fue colectado mediante electroeyaculación y posteriormente procesado mediante los métodos de congelación convencional y automatizado; la motilidad y viabilidad espermática fueron evaluadas antes de la congelación y después de la descongelación, y los datos se evaluaron mediante ANOVA de dos vías, con un nivel de significancia de  $\alpha = 0.05$ . Los resultados mostraron una reducción significativa ( $p < 0.05$ ) en la motilidad espermática del 21.6% con la congelación convencional ( $75.2 \pm 4.3$  vs  $53.6 \pm 2.3$ ) y del 18.1% con el automatizado ( $75.2 \pm 4.3$  vs  $57.1 \pm 3.6$ ). Asimismo, la viabilidad espermática disminuyó significativamente ( $p < 0.05$ ) en 24.4% con el método convencional ( $81.3 \pm 3.7$  vs  $56.9 \pm 2.4$ ) y 21.2% con la automatizado ( $81.3 \pm 3.7$  vs  $60.2 \pm 2.2$ ), además, se encontraron interacciones significativas entre las variables evaluadas ( $p < 0.05$ ). Se concluye que el método automatizado resulta más eficiente para conservar la motilidad y viabilidad espermática.

**Palabras clave:** Congelación, descongelación, espermatozoides, motilidad y viabilidad.

## ABSTRACT

Freezing methods are a useful tool in assisted reproduction in cattle, but they can have adverse effects on sperm quality. The objective of this study was to compare sperm motility and viability in *Bos indicus* bulls using two freezing methods in Madre de Dios. Five *Bos indicus* bulls aged 3 to 4 years and weighing  $714.9 \pm 43.2$  kg, belonging to the Livestock Development Center (CEDEGA) of the Regional Government of Madre de Dios, were used. Semen was collected by electroejaculation and then processed using conventional and automated freezing methods; sperm motility and viability were evaluated before freezing and after thawing, and the data were evaluated using two-way ANOVA, with a significance level of  $\alpha = 0.05$ . The results showed a significant reduction ( $p < 0.05$ ) in sperm motility of 21.6% with conventional freezing ( $75.2 \pm 4.3$  vs.  $53.6 \pm 2.3$ ) and 18.1% with automated freezing ( $75.2 \pm 4.3$  vs.  $57.1 \pm 3.6$ ). Likewise, sperm viability decreased significantly ( $p < 0.05$ ) by 24.4% with the conventional method ( $81.3 \pm 3.7$  vs.  $56.9 \pm 2.4$ ) and by 21.2% with the automated method ( $81.3 \pm 3.7$  vs.  $60.2 \pm 2.2$ ). Furthermore, significant interactions were found between the variables evaluated ( $p < 0.05$ ). It is concluded that the automated method is more efficient in preserving sperm motility and viability.

**Key words:** Freezing, thawing, spermatozoa, motility and viability.

## **INTRODUCCIÓN**

Las biotecnologías reproductivas constituyen los principales avances de la producción animal en los últimos años, donde la criopreservación de semen es la herramienta fundamental en la inseminación artificial, posibilitando la mejora genética de los animales (1), donde la colección, utilización y crioconservación del semen es uno de los aspectos importantes de esta biotecnología, que puede proporcionar rendimientos favorables o desfavorables en la producción ganadera (2).

La inseminación artificial, desde su implantación, se ha utilizado como la herramienta de la reproducción animal asistida, mediante el uso de semen criopreservado, luego de su dilución, crioprotección, refrigeración y congelación (3), donde la manipulación incorrecta de la criopreservación, incluido el almacenamiento y la descongelación de los espermatozoides, puede dañar la función y la estructura de los espermatozoides, sobre todo la motilidad y viabilidad espermática, lo que conlleva a una disminución en la fertilidad y el rendimiento reproductivo (2).

Aún no se ha desarrollado una técnica adecuada en la recolección, empaquetamiento y congelamiento de semen (4), debido a las limitantes en costos, equipos, insumos, materiales, personal de expertos en biotecnología reproductiva bovina (5), por lo que es necesario buscar la alternativa más eficiente que posibilite una mayor motilidad y viabilidad espermática, a fin de mejorar la tasa de preñez, para la obtención de ganado de alto valor genético, mejorar la producción y los ingresos económicos.

## INDICE

PRESENTACIÓN

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN

|                                             |    |
|---------------------------------------------|----|
| CAPITULO I: PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN ..... | 1  |
| 1.1 Descripción del problema .....          | 1  |
| 1.2 Formulación de problema .....           | 2  |
| 1.2.1 Problema general .....                | 2  |
| 1.2.2 Problemas específicos .....           | 2  |
| 1.3 Objetivos .....                         | 2  |
| 1.3.1 Objetivo general .....                | 2  |
| 1.3.2 Objetivos específicos .....           | 2  |
| 1.4 Variables .....                         | 3  |
| 1.4.1 Variables independientes .....        | 3  |
| 1.4.2 Variables dependientes .....          | 3  |
| 1.5 Hipótesis de investigación .....        | 3  |
| 1.6 Operacionalización de variables .....   | 4  |
| 1.7 Justificación .....                     | 5  |
| 1.8 Consideraciones éticas .....            | 6  |
| CAPITULO II: MARCO TEORICO .....            | 7  |
| 2.1 Antecedentes de estudio .....           | 7  |
| 2.2 Marco Teórico .....                     | 9  |
| 2.2.1 Selección de toros .....              | 9  |
| 2.2.2 Condición corporal .....              | 10 |
| 2.2.3 Colección de semen .....              | 10 |

|                                                     |                                             |    |
|-----------------------------------------------------|---------------------------------------------|----|
| 2.2.4                                               | Métodos de recolección de semen .....       | 11 |
| 2.2.5                                               | Manejo de semen .....                       | 11 |
| 2.2.6                                               | Evaluación macroscópica del semen .....     | 12 |
| 2.2.7                                               | Evaluación microscópica del semen.....      | 12 |
| 2.2.8                                               | Concentración espermática .....             | 12 |
| 2.2.9                                               | Motilidad espermática .....                 | 13 |
| 2.2.10                                              | Viabilidad espermática .....                | 13 |
| 2.2.11                                              | Dilutores de semen.....                     | 14 |
| 2.2.12                                              | Empajillamiento de semen .....              | 14 |
| 2.2.13                                              | Métodos de Congelación de semen .....       | 15 |
| 2.2.14                                              | Tipos de congelación.....                   | 15 |
| 2.2.15                                              | Congelamiento de semen.....                 | 16 |
| 2.2.16                                              | Descongelamiento de semen .....             | 17 |
| 2.3                                                 | Definición de términos .....                | 17 |
| CAPITULO III: METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN ..... |                                             | 19 |
| 3.1                                                 | Tipo de estudio .....                       | 19 |
| 3.2                                                 | Diseño del estudio .....                    | 19 |
| 3.3                                                 | Población y muestra .....                   | 20 |
| 3.3.1                                               | Población.....                              | 20 |
| 3.3.2                                               | Muestra .....                               | 20 |
| 3.4                                                 | Métodos y técnicas .....                    | 21 |
| 3.4.1                                               | Materiales y equipos.....                   | 21 |
| 3.4.2                                               | Selección de toros <i>Bos indicus</i> ..... | 22 |
| 3.4.3                                               | Técnicas .....                              | 24 |
| 3.4.4                                               | Congelación de semen.....                   | 26 |
| 3.4.5                                               | Almacenamiento.....                         | 27 |

|                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.4.6 Descongelación de las pajillas .....                                | 27 |
| 3.4.7 Análisis del semen motilidad y viabilidad de post congelación ..... | 27 |
| 3.5 Métodos de evaluación Motilidad y Viabilidad espermática. ....        | 27 |
| 3.5.1 Determinación de la motilidad espermática.....                      | 27 |
| 3.5.2. Determinación de la viabilidad espermática .....                   | 28 |
| 3.5.3. Concentración espermática.....                                     | 29 |
| 3.6 Tratamiento de los datos .....                                        | 29 |
| CAPÍTULO IV: RESULTADOS DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN .....                | 31 |
| 4.1 Motilidad espermática.....                                            | 31 |
| 4.2 Viabilidad espermática.....                                           | 33 |
| CONCLUSIONES .....                                                        | 37 |
| SUGERENCIAS.....                                                          | 38 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                                          | 39 |
| ANEXOS.....                                                               | 45 |

## ÍNDICE DE TABLA

|                  |                                                                                                                               |    |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabla 01.</b> | Población de toros en el Centro de Desarrollo Ganadero.....                                                                   | 20 |
| <b>Tabla 02.</b> | Animales utilizados para la colección de semen.....                                                                           | 23 |
| <b>Tabla 03.</b> | Características seminales de toros <i>Bos indicus</i> .....                                                                   | 25 |
| <b>Tabla 04.</b> | Motilidad espermática de semen de toros <i>Bos indicus</i> mediante congelación convencional y automatizada.....              | 31 |
| <b>Tabla 05.</b> | Viabilidad espermática de semen de toros <i>Bos indicus</i> preservados mediante congelación convencional y automatizada..... | 34 |
| <b>Tabla 06.</b> | Cantidad de animales toros <i>Bos indicus</i> en el Centro de Desarrollo Ganadero – CEDEGA.....                               | 48 |
| <b>Tabla 07.</b> | Selección de toros para la recolección de semen y la evaluación respectiva.....                                               | 49 |
| <b>Tabla 08.</b> | Volumen eyaculado de semen recolectados de toros (ml) por semana.....                                                         | 50 |
| <b>Tabla 09.</b> | Evaluación del color del semen recolectados de los toros semanalmente.....                                                    | 50 |
| <b>Tabla 10.</b> | Evaluación del pH del semen recolectados de toros semanalmente.....                                                           | 51 |
| <b>Tabla 11.</b> | Motilidad masal de semen (valor descriptivo) recolectados de toros.....                                                       | 51 |
| <b>Tabla 12.</b> | Motilidad individual espermática del semen (%) recolectados de toros semanalmente.....                                        | 52 |
| <b>Tabla 13.</b> | Viabilidad espermática del semen (%) recolectados de toros semanalmente.....                                                  | 52 |
| <b>Tabla14.</b>  | Concentración espermática del semen (%) recolectados de toros semanalmente.....                                               | 53 |
| <b>Tabla 15.</b> | Viabilidad espermática del semen pos- congelación (%), que fueron congelados de forma mecánica.....                           | 53 |
| <b>Tabla 16.</b> | Viabilidad espermática del semen post congelación (%), que fueron congelados de forma convencional.....                       | 54 |

|                  |                                                                                                                         |    |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabla 17.</b> | Motilidad individual espermática (%) del semen de toros pos-congelación, que fueron congelados de forma mecánica.....   | 54 |
| <b>Tabla 18.</b> | Motilidad individual espermática (%) del semen de toros pos-congelación, que fueron congelados de forma convencional... | 55 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                 |                                                                                                                                                  |    |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Fig 01.</b>  | Motilidad espermática de toros <i>Bos indicus</i> pre - congelación y pos - descongelación.....                                                  | 32 |
| <b>Fig 02.</b>  | Viabilidad espermática de toros <i>Bos indicus</i> pre -congelación y pos - descongelación.....                                                  | 34 |
| <b>Fig. 03.</b> | Centro de Desarrollo Ganadero – CEDEGA, lugar donde se realizó la ejecución del trabajo de investigación.....                                    | 56 |
| <b>Fig. 04.</b> | Desparasitación en toros con albendazol y doramectina.....                                                                                       | 56 |
| <b>Fig. 05.</b> | Selección y evaluación de toros reproductores <i>Bos indicus</i> .....                                                                           | 57 |
| <b>Fig. 06.</b> | Evaluación de la condición corporal y peso de los animales (toros).....                                                                          | 57 |
| <b>Fig. 07.</b> | Medida de la Circunferencia escrotal y limpieza del prepucio de los toros <i>Bos indicus</i> seleccionados antes de la recolección de semen..... | 58 |
| <b>Fig. 08.</b> | Materiales y equipos para la recolección de semen.....                                                                                           | 58 |
| <b>Fig. 09.</b> | Uso del electroeyaculador para la obtención de semen en toros <i>Bos indicus</i> .....                                                           | 59 |
| <b>Fig. 10.</b> | Recolección de semen a través de un colector comercial.....                                                                                      | 59 |
| <b>Fig. 11.</b> | Materiales y equipos del laboratorio de biotecnología Reproductiva – CEDEGA.....                                                                 | 60 |
| <b>Fig. 12.</b> | Uso del dilutor comercial Andromed para la dilución del semen de toros <i>Bos indicus</i> .....                                                  | 60 |
| <b>Fig. 13.</b> | Evaluación de la motilidad y viabilidad espermática en toros <i>Bos indicus</i> antes de la congelación.....                                     | 61 |
| <b>Fig. 14.</b> | Empajillado de semen de toros <i>Bos indicus</i> para su conservación.....                                                                       | 61 |
| <b>Fig. 15.</b> | Proceso de congelación de semen con el método convencional y automatizado.....                                                                   | 62 |

|                 |                                                                                                                                                    |    |
|-----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Fig. 16.</b> | Almacenamiento de pajillas en el tanque criogénico para su mantenimiento y conservación.....                                                       | 62 |
| <b>Fig. 17.</b> | Proceso de descongelación de semen de toros <i>Bos indicus</i> .....                                                                               | 63 |
| <b>Fig. 18.</b> | Evaluación de la viabilidad y motilidad espermática pos - congelación.....                                                                         | 63 |
| <b>Fig. 19.</b> | Laboratorio de Biotecnología reproductiva donde se realizó la evaluación del semen juntamente con los asesores, personal encargado y de apoyo..... | 64 |

## INDICE DE ANEXOS

|                  |                                                                                             |    |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Anexo 01.</b> | Matriz de operacionalización de las variables.....                                          | 46 |
| <b>Anexo 02.</b> | Matriz de consistencia.....                                                                 | 47 |
| <b>Anexo 03.</b> | Tablas de recopilación de datos y toma de información del<br>proyecto de investigación..... | 48 |
| <b>Anexo 04.</b> | Panel Fotográfico de la ejecución del trabajo de<br>investigación.....                      | 56 |

## CAPITULO I: PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

### 1.1 Descripción del problema

El ganado cebú (*Bos indicus*) y sus cruzamientos con el ganado europeo (*Bos taurus*) constituyen más de la mitad de la población bovina a nivel mundial, desempeñando un papel fundamental en la producción de carne, así como en la provisión de leche, especialmente en regiones tropicales (6). En estas zonas, la actividad reproductiva es un componente importante para garantizar el incremento sostenido de la población animal y, por ende, la seguridad alimentaria. A pesar del desarrollo de diversas biotecnologías reproductivas, la monta natural continúa siendo el método predominante de reproducción bovina, seguida por la inseminación artificial y la transferencia de embriones (7).

La criopreservación de semen bovino es una herramienta consolidada dentro de las tecnologías de reproducción asistida. Tanto el método convencional como el automatizado han permitido mejorar la eficiencia de los programas reproductivos, especialmente en razas de ganado europeo (*Bos taurus*) (8); ambos métodos, se basan en la preservación del semen a bajas temperaturas con el objetivo de mantener su viabilidad durante periodos prolongados, se han consolidado como pilares fundamentales de la inseminación artificial, contribuyendo significativamente al mejoramiento genético (9).

Sin embargo, el impacto de estas tecnologías ha sido más evidente en el ganado europeo (*Bos Taurus*), con resultados menos consistentes en razas adaptadas a climas tropicales, como el cebú (*Bos indicus*) (10). Diversos estudios realizados en *Bos taurus* han mostrado que la calidad espermática, especialmente en términos de motilidad y viabilidad, no presenta diferencias significativas entre los métodos convencional y automatizado, pese a la

diferencia de costos entre ambos; de manera similar, en otras especies como el búfalo (*Bubalus bubalis*), también se ha observado una eficacia comparable entre ambos métodos (11). No obstante, existe una escasa evidencia científica específica que analicen de manera comparativa la eficiencia de estos métodos de congelación en toros *Bos indicus*, especialmente bajo condiciones tropicales; dificulta la toma de decisiones informadas respecto a la selección de uno u otro método en los programas de reproducción de esta especie en contextos tropicales (12).

## **1.2 Formulación de problema**

### **1.2.1 Problema general**

¿Cuál será la motilidad y viabilidad espermática de toros *Bos indicus* utilizando dos métodos de congelación en Madre de Dios?

### **1.2.2 Problemas específicos**

¿Cuál será la motilidad espermática de toros *Bos indicus* utilizando el método de congelación convencional y automatizado en Madre de Dios?

¿Cuál será la viabilidad espermática de toros *Bos indicus* utilizando el método de congelación convencional y automatizado en Madre de Dios?

## **1.3 Objetivos**

### **1.3.1 Objetivo general**

- Comparar la motilidad y viabilidad espermática de toros *Bos indicus* utilizando dos métodos de congelación en Madre de Dios.

### **1.3.2 Objetivos específicos**

- Determinar la motilidad espermática de toros *Bos indicus* utilizando el método de congelación convencional y automatizado en Madre de Dios.
- Determinar la viabilidad espermática de toros *Bos indicus* utilizando el método de congelación convencional y automatizado en Madre de Dios.

## **1.4 Variables**

### **1.4.1 Variables independientes**

- Método de congelación: convencional y automatizado.

### **1.4.2 Variables dependientes**

- Motilidad espermática.
- Viabilidad espermática.

## **1.5 Hipótesis de investigación**

El método de congelación convencional y automatizado tiene efecto sobre la motilidad y viabilidad espermática en toros *Bos indicus* de Madre de Dios.

## 1.6 Operacionalización de variables

| DEFINICION<br>CONCEPTUAL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | DEFINICIONES<br>OPERACIONALES                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | DIMENSIONES                                | INDICADORES                               | ITEMS        |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|-------------------------------------------|--------------|
| <p><b>VARIABLE INDEPENDIENTE</b></p> <p><b>Método de congelación</b></p> <p><b><i>Congelación convencional</i></b></p> <p>Método manual de congelación de espermatozoides que emplea vapor de nitrógeno líquido. Se caracteriza por ser accesible y de bajo costo.</p> <p><b><i>Congelación automatizada</i></b></p> <p>Método de congelación de espermatozoides donde se utiliza un equipo de congelación, con un protocolo estándar establecido.</p>                                                                                                                                            | <p>Las pajillas fueron refrigeradas a 4 °C durante 4 horas, luego colocadas a 6 cm sobre nitrógeno líquido por 20 minutos en una caja de poliestireno y, finalmente, sumergidas en nitrógeno líquido para su conservación.</p> <p>Las pajillas fueron congeladas en un equipo automatizado siguiendo un protocolo estándar para semen bovino, que consistió en un enfriamiento a -0,25 °C/min hasta 5 °C por 180 minutos, luego a -5 °C/min hasta -120 °C, y finalmente fueron sumergidas en nitrógeno líquido.</p> | <p>Método de congelación espermática</p>   | <p>Porcentaje (%) de espermatozoides.</p> | <p>1 - 2</p> |
| <p><b>Momento de evaluación</b></p> <p><b><i>Pre-congelación.</i></b></p> <p>Etapla inicial del proceso de criopreservación, donde el semen es evaluado, tratado con crioprotectores y enfriado progresivamente para preservar su motilidad y viabilidad ante el almacenamiento en nitrógeno líquido.</p> <p><b><i>Pos-descongelación</i></b></p> <p>Fase posterior a la descongelación en la que se evalúan parámetros de calidad espermática, como la motilidad y viabilidad, con el propósito de verificar su estado y aptitud funcional para su uso en técnicas de reproducción asistida.</p> | <p>El semen fue evaluado antes de su congelación mediante análisis de motilidad masal y progresiva y viabilidad, tras la dilución con el medio crioprotector y la estabilización a 4 °C.</p> <p>Luego descongelar las pajillas en un baño maría a 37 °C durante 30 segundos, el semen fue analizado microscópicamente para evaluar la motilidad y la viabilidad espermática mediante tinción eosina y nigrosina.</p>                                                                                                | <p>Semen fresco y descongelado.</p>        |                                           |              |
| <p><b>VARIABLE DEPENDIENTE</b></p> <p><b>MOTILIDAD Y VIABILIDAD</b></p> <p>Son parámetros fundamentales que reflejan la capacidad de los espermatozoides para desplazarse de manera eficiente y mantenerse funcionales, siendo ambos factores determinantes para lograr una fertilización exitosa.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                            | <p>Motilidad espermática: Se evaluó mediante observación microscópica de la motilidad en masa, calificando el movimiento en una escala de 0 a 5 según la formación de “olas”.</p> <p>Viabilidad espermática: Se determinó mediante tinción eosina-nigrosina, diferenciando espermatozoides vivos (no teñidos) y muertos (teñidos) mediante observación microscópica tras la preparación de un frotis.</p>                                                                                                           | <p>Motilidad y Viabilidad espermática.</p> |                                           |              |

## 1.7 Justificación

El ganado *Bos indicus* se caracteriza por su resistencia, buena producción de leche y carne, notable aumento de peso diario, habilidad materna y fertilidad, por lo que, en comparación con el ganado europeo, soporta mejor el calor, debido a su metabolismo más bajo (13). Su piel pigmentada y pelos de color claro le ofrecen protección contra la radiación solar, resistencia a parásitos, siendo una raza resistente que triunfa en los trópicos hostiles (6).

La reproducción del ganado *Bos indicus* es un factor importante para el mantenimiento de la población y el reemplazo del efectivo animal, para lo cual las tecnologías de reproducción animal asistida han apoyado de sobremanera para lograr una mayor producción (14), siendo necesario desarrollar nuevas alternativas a fin de mejorar el desempeño reproductivo de los animales.

La crioconservación del semen es un procedimiento que tiene como propósito facilitar el almacenamiento indefinido del semen, para su uso posterior en la inseminación artificial, con un impacto importante y positivo en la producción animal y la calidad del producto, como mecanismo eficaz para acortar el tiempo de mejora genética (14).

La recogida y congelación de semen animal maximiza el uso de los recursos humanos, técnicos, científicos y económicos, lo que se traduce en un aumento de la producción de carne y leche, mayores ingresos económicos para los productores (15).

La criopreservación del semen es muy importante porque afecta a la viabilidad, motilidad y concentración de los espermatozoides, y comienza con la recogida, evaluación, congelación y descongelación del semen justo antes de la inseminación (9), donde se deben evaluar las pajillas que contienen semen, ya que estas suelen tener una baja viabilidad de los espermatozoides y, por lo tanto, una baja tasa de preñez (15).

El procedimiento de selección de semen bovino previo a la criopreservación es el paso importante para mejorar la calidad y fertilidad del semen post-descongelado (9), por lo que es necesario buscar alternativas de congelamiento de semen que puedan tener una mejor conservación y, en

consecuencia, mejorar la viabilidad y concentración espermática, lo que repercutiría en un mejor desarrollo de la producción ganadera y además del interés tanto de profesionales y ganaderos (16). Por las consideraciones expuestas, el trabajo de investigación tuvo como objetivo comparar la motilidad y viabilidad espermática de toros *Bos indicus* utilizando dos métodos de congelación en Madre de Dios.

### **1.8 Consideraciones éticas**

La investigación se realizó con toros *Bos indicus* con un manejo responsable y adecuado tratando de evitar en lo posible el estrés del animal, brindándoles un ambiente libre con forraje y agua limpia a disposición durante todo el día, así mismo la disposición de sombra y cuidado permanente y para expresar un comportamiento normal, evitando el miedo y angustia, en el marco de los principios del bienestar animal (17). Antes de la investigación los toros fueron vacunados y desparasitados, y durante el estudio estuvieron exentos de procedimientos dolorosos. Los datos se recopilaron bajo la orientación de un asesor y co-asesor a fin de minimizar error en el manejo animal y el registro de información.

## **CAPITULO II: MARCO TEORICO**

### **2.1 Antecedentes de estudio**

Según Ribeiro et al. (15), en su trabajo de investigación "Cryopreservation of bovine spermatozoa from the epididymal tail using conventional and automated methods". explicaron que este estudio comparó la crioconservación de semen recogido de epidídimos bovinos después del sacrificio mediante métodos convencionales y automatizados, donde se obtuvieron los siguientes resultados: viabilidad espermática, motilidad pos-congelación y viabilidad pos-congelación con los métodos de congelación convencional y automático fueron del 80,1%, 44,4%, 37,6%, 65,7% y 61,7%, respectivamente.

La Investigación realizada por Medina (18) "Crioconservación de semen bovino usando un congelador programable (CL 8800) y determinación de su calidad pos-descongelación por medio de un sistema de análisis asistido por computador (CASA)". El objetivo de este estudio era evaluar un protocolo de congelación de semen bovino utilizando un congelador programable CL-8800 y un diluyente compuesto por Tris (2,42%), ácido cítrico (1,8%), fructosa (1,0%), glicerol (7%) y yema de huevo (20%). Tras la congelación por el método de congelación automatizada, la motilidad espermática pos-congelación fue del 43,1%.

Por otro lado, Londoño (19) con la tesis titulada "Frecuencia de alteraciones morfológicas espermáticas en toros Brahman entre 20 y 32 meses de edad en condiciones de pastoreo" el estudio se realizó en la hacienda Casa Nare, Municipio de Puerto Nare, la población estuvo constituida por once toros de los que se realizó la recolección de semen. Los resultados mostraron que el

volumen del eyaculado promedio de los toros era de 5.54 ml y obtuvo un 70% de motilidad individual.

Mejía (5) reporta en su tesis titulada “Evaluación pre y post congelación del semen obtenido con vagina artificial y electroeyaculador en el ganado criollo”. Se recolectó semen de tres toros biotipo criollo utilizando Vagina Artificial modelo IMV (VA T1=30) y Electro eyaculador electrónico portátil marca Standard Precisión Electronics®, con el dilutor AndroMed® se procedió a diluir el semen, después ser envasado en pajillas de 0,25 ml y donde fueron sometidos a vapores de nitrógeno líquido durante 10 minutos y luego dejándolos directamente en el nitrógeno líquido logrando obtener una temperatura de -196 °C y se almacenó en tanques criogénicos. Luego de 30 días se descongeló para evaluar mediante microscopia óptica, donde se encontró una motilidad de 77.34% en toros.

Según Torres (20) reporta en su tesis titulada “Criterios de selección y manejo reproductivo del toro Brahman en sistemas ganaderos de la Orinoquia”. Utilizó toros de la raza Brahman seleccionados de forma cuidadosa y rigurosa. En su investigación obtuvo un resultado de 75.4% de motilidad espermática.

Cabrera y Pantoja (21) en su trabajo de investigación “Viabilidad espermática e integridad del acrosoma en semen congelado de toros nacionales”. Se utilizaron cuatro toros (2 Hosltein y 2 Brown Swiss) del Banco Nacional de Semen, Lima-Perú”. Donde se recolectó semen con un volumen promedio de 4.33 ml y se evaluó viabilidad espermática con un resultado de 83.8%.

Murtina et al. (22) publicaron en una investigación titulada “The traits of fresh and frozen semen on Brahman Bulls”. El objetivo del presente estudio era determinar la calidad y los parámetros del semen fresco y congelado de toros Brahman de 4 años de edad. Se realizó la recolección de semen de 5 toros dos veces por semana utilizando una vagina artificial y los resultados mostraron que la viabilidad espermática fue del 78.94 %.

Por otro lado, Aquino (23) con su investigación titulada: “Características seminales en toros de razas cárnicas y doble propósito”. Se utilizaron nueve toros de razas especializadas para la producción cárnica, se procedió a la

evaluación de la calidad, con la recolección de semen, dilución, refrigeración, congelación y almacenamiento de las pajillas de semen, este último paso se pudo hacer utilizando tanques criogénicos de gran tamaño donde se colocaron las pajillas y se almacenan a una temperatura de  $-196^{\circ}\text{C}$ . Las características promedio del semen obtenido fueron una motilidad individual de 80.6%, una concentración de  $1345.8 \times 10^6$  spz/ml y una motilidad post-congelación de 58.9 % por el método de congelación convencional.

Acosta (24) realizó una investigación titulada “Comparación de la viabilidad espermática de bovinos gemelos homocigotos Aberdeen Angus por citometría de flujo”. Se realizaron diez recolecciones cada una utilizando tres repeticiones por colecta, evaluando características macroscópicas (volumen y pH), microscópicas (motilidad masal, motilidad individual, concentración espermática y morfología). Se obtuvo un volumen promedio de eyaculado es de 6.49 ml respectivamente y con una concentración espermática de  $1172.27 \times 10^6$  spz/ml.

Damas (25) en su investigación titulada “Evaluación de dos Dilutores comerciales en semen congelado de Toros en el Banco Nacional”, con la finalidad de analizar el efecto de dos dilutores comerciales (Bioxcell y AndroMed) sobre la viabilidad espermática post refrigerado y post descongelado, a través de observaciones de motilidad, vitalidad y prueba de Host, se encontró al post congelado motilidad con AndroMed  $65,04 \pm 2,05$  %, y para la viabilidad con AndroMed  $63,47 \pm 4,61$  %.

## **2.2 Marco Teórico**

### **2.2.1 Selección de toros**

La selección de toros se realiza mediante el examen físico general, evalúa el estado general del animal, particularmente en lo que respecta a los órganos sexuales externos e internos (26). Este examen físico incluye una estimación de la condición corporal, la postura y los genitales externos e internos (pene, testículos y vesículas seminales) y la exclusión de los bovinos machos con anomalías que interfieren con la libido (apetito sexual) o la capacidad de montar y limitan o impiden la función reproductiva (27).

### **2.2.2 Condición corporal**

La condición corporal en vacunos se refiere al estado de reservas de grasa y músculo en el cuerpo de un animal. Es un indicador visual y táctil que ayuda a evaluar la salud y el estado nutricional del ganado. La condición corporal se mide en una escala que generalmente va de 1 a 5 o de 1 a 9, donde 1 indica un estado de extrema delgadez y 5 o 9 indica un exceso de grasa corporal. La escala específica puede variar según el sistema de puntuación utilizado (28).

La gestión de la condición corporal es esencial para asegurar el bienestar de los animales y optimizar la productividad en términos de reproducción, producción de leche y ganancia de peso. Un programa de manejo nutricional adecuado y la capacidad de reconocer signos visuales y táctiles de cambios en la condición corporal son herramientas valiosas para los productores de ganado (29).

### **2.2.3 Colección de semen**

Este proceso es una combinación de muchos factores, prácticas, conocimientos y habilidades para lograr el mejor rendimiento de los toros y producir semen de alta calidad (30).

Los toros con buena capacidad reproductiva producen y eyaculan volúmenes significativos de esperma. La implementación de estímulos novedosos y cambios frecuentes en el entorno debería permitir que la mayoría de los toros logren entre 4 y 6 eyaculaciones por semana (3). En cuanto a la producción espermática, se espera que los toros jóvenes generen entre 10.000 y 20.000 millones de espermatozoides por semana, mientras que los toros adultos deben alcanzar entre 40.000 y 60.000 millones semanalmente. Si no se alcanzan estos niveles de producción, es necesario evaluar y ajustar los procedimientos de manejo durante la recolección de semen para optimizar su eficiencia (31).

## **2.2.4 Métodos de recolección de semen**

- **Electroeyaculador**

La electro-eyaculación (EE) es un método confiable para obtener muestras de semen de machos reproductores. Método más utilizado generalmente en toros jóvenes, carneros y machos no entrenados es la vagina artificial con el fin de obtener una muestra de semen para un examen de aptitud reproductiva (32). Este método utiliza un equipo de electroeyaculador compuesto por transductor la caja de transporte, la sonda rectal, la unidad de control, el cargador de batería, el cable de energía, el cable de conexión de la sonda, el mango, el cono y el envase de colección; que no es más que un electrodo conectado a una batería que genera una estimulación rítmica descargando menos de 20 voltios (33).

En el toro, previo a la inserción de una sonda en el recto, se debe realizar un masaje transrectal sobre la zona de las glándulas sexuales accesorias (p. ej., vesículas seminales, próstata) para excitar sexualmente al animal y relajar el esfínter anal (34) donde se introduce la sonda y se administra impulso eléctrico (tensión 8-16 V) durante 1 a 2 segundos con una pausa de 0,5-2 segundos hasta que se produce la eyaculación. Durante la estimulación, el voltaje del impulso aumenta gradualmente (33).

- **Vagina artificial**

Es el método más común de recolección de semen, que intenta imitar las condiciones fisiológicas de los animales. La vagina artificial es un tubo cilíndrico de 7 cm de diámetro y de 35 a 40 cm de largo, fabricado en plástico resistente (35), con un revestimiento de goma que se aprieta y envuelve alrededor del extremo del tubo para formar una cámara llena de agua caliente (45 a 46°C) y aire para alcanzar la temperatura y la presión necesaria para la eyaculación (32).

## **2.2.5 Manejo de semen**

El manejo del semen de toro es una parte importante de la reproducción bovina y se lleva a cabo en programas de inseminación artificial (IA) para

mejorar la genética del ganado, se evalúa el volumen, concentración de espermatozoides, motilidad, viabilidad, morfología y capacidad para resistir los procedimientos de congelación y descongelación (36). Se necesitan análisis exhaustivos de los espermatozoides mediante el uso de diversos métodos integrados para evaluar su morfología a niveles moleculares y celulares que están relacionados con la función espermática (37). Para mejorar la crioconservación, se necesita una tecnología avanzada que permita predecir y evaluar con precisión la motilidad, viabilidad, funcionalidad de la membrana, actividad mitocondrial y parámetros apoptóticos de los espermatozoides (10).

### **2.2.6 Evaluación macroscópica del semen**

La evaluación macroscópica del semen en toros es el primer paso del análisis seminal y permite valorar características físicas como volumen (5-8 mL), color (blanco opalescente a cremoso), pH (6.4-6.8), consistencia y presencia de contaminantes. Alteraciones en estos parámetros pueden indicar infecciones, inflamaciones o contaminación. Esta evaluación es clave para decidir si el eyaculado es apto para el análisis microscópico y uso en la inseminación artificial (5).

### **2.2.7 Evaluación microscópica del semen**

La evaluación microscópica del semen en toros permite analizar la calidad espermática mediante parámetros como la motilidad (masal y progresiva), concentración, morfología, viabilidad e integridad de la membrana plasmática. Estos se determinan usando técnicas como tinciones, hemocitómetro, espectrofotometría y pruebas funcionales como el HOST. Estos análisis son fundamentales para definir la aptitud del semen para inseminación artificial o criopreservación (22).

### **2.2.8 Concentración espermática**

La concentración espermática es la cantidad de espermatozoides en un eyaculado, se ha especulado que la calidad del semen del ganado vacuno es inferior a la del vacuno lechero, pero hay pocos estudios científicos disponibles en la literatura (38). La concentración de espermatozoides del

semen de toro se determina utilizando un espectrofotómetro estandarizado. En primer lugar, se mide la concentración de espermatozoides a una longitud de onda de 535 nm utilizando un fotómetro precalentado y calibrado. Se pone a cero el fotómetro con solución salina normal y se mezcla una muestra de 20 µl de semen con 2 mL de solución de NaCl al 0,9% p/v (39).

### **2.2.9 Motilidad espermática**

La motilidad espermática se evalúa comúnmente mediante observación al microscopio de contraste de fase con platina a 37 °C. Esta evaluación puede realizarse de manera masal o individual, dependiendo de la concentración espermática de la muestra (38). La motilidad masal, aplicada en eyaculados con alta concentración, se valora subjetivamente en una escala de 0 a 5: un valor de 5 indica la presencia de remolinos u ondas vigorosas y rápidas, mientras que un valor de 0 refleja la ausencia total de movimiento ondulatorio (40).

Por otro lado, la motilidad individual se determina tras diluir el semen fresco o al descongelar pajillas, observando el porcentaje de espermatozoides móviles, diferenciando entre motilidad progresiva (movimiento rectilíneo hacia adelante) y no progresiva (movimiento errático o en círculos). Pajillas con menos del 40 % de motilidad progresiva generalmente se descartan para programas de inseminación artificial (41). Si bien este método visual es sencillo y rápido, su principal limitación es la subjetividad, ya que los resultados dependen en gran medida de la experiencia del evaluador y pueden sobreestimarse, especialmente en muestras con alta densidad espermática (42).

### **2.2.10 Viabilidad espermática**

La viabilidad del esperma bovino significa la capacidad de mantener su integridad estructural y funcional para fecundar con éxito un óvulo. La viabilidad del semen es fundamental en los programas de cría de bovinos, ya que afecta directamente al rendimiento de la fecundación y al éxito de la concepción (43). Aquí hay algunos factores que afectan la viabilidad espermática en bovinos: congelación y descongelación, almacenamiento,

calidad de semen y otros, el control continuo de estos factores y las buenas prácticas de cría son esenciales para garantizar la viabilidad del semen y el éxito del programa de cría (44).

Este método se utiliza para contar los espermatozoides vivos del eyaculado recogido colocando dos gotas de Eosina y luego tres gotas de Nigrosina, se realiza un frotis con la mezcla y se deja secar por unos segundos con la platina caliente a 37°C en el borde del portaobjetos y añadiendo una gota de espermatozoides en el portaobjetos con un ángulo de 30-40°. Secar rápidamente y observar 200 células con un microscopio óptico de 1000 aumentos. Si los espermatozoides están muertos, la membrana plasmática segrega eosina (41).

#### **2.2.11 Dilutores de semen**

Los diluyentes de semen proporcionan algunos nutrientes para el proceso metabólico de los espermatozoides, protegen contra el choque de frío, amortiguan los efectos de las toxinas, los ácidos producidos por el metabolismo de los espermatozoides y ayudan a mantener la presión osmótica y el equilibrio mineral requeridos del semen (45).

Los espermatozoides son células vivas sexuales o gametos propiamente del macho que no pueden soportar periodos largos de vida a causa de los efectos del medio externo después de la eyaculación del animal, estos surgen por el contacto con el oxígeno, al aumento de la hipertonicidad del medio, a la falta de humedad, al aumento de las excreciones celulares entre otros (46).

#### **2.2.12 Empajillamiento de semen**

Actualmente, la mayor parte del semen de toro se congela en pajillas de 0,25 o 0,5 ml y es almacenada en un tanque criogénico con nitrógeno líquido a una temperatura de -196 °C (36). Las pajillas no sólo facilitan el envasado, etiquetado, almacenamiento y transporte del semen, sino que también proporcionan un control más uniforme de la congelación y descongelación, lo que en última instancia se traduce en mejores tasas de recuperación de espermatozoides tras la descongelación del semen (23).

### **2.2.13 Métodos de Congelación de semen**

La congelación de semen es una herramienta fundamental dentro de las tecnologías de reproducción asistida, ya que permite la preservación y almacenamiento a largo plazo de un número ilimitado de gametos (espermatozoides) mediante el uso de nitrógeno líquido (47). Esta técnica es ampliamente empleada en programas de reproducción animal, especialmente en individuos con alto valor genético y resulta particularmente valiosa en especies con poblaciones amenazadas o en peligro de extinción (18).

- **Método convencional**

La congelación convencional, se caracteriza por un descenso progresivo de la temperatura mediante la exposición del semen a vapores de nitrógeno líquido, sin un control digital preciso del proceso de enfriamiento (30). Este método no emplea dispositivos automatizados para regular de manera exacta la velocidad de enfriamiento, lo que puede provocar una formación irregular de cristales de hielo intracelulares. Dichas variaciones pueden comprometer la viabilidad espermática al generar daños estructurales en la membrana celular y en los orgánulos del espermatozoide (25).

- **Método automatizado**

La congelación automatizada permite establecer y controlar de forma precisa la curva de enfriamiento mediante sistemas computarizados. Esta precisión reduce considerablemente la formación de cristales de hielo de gran tamaño, disminuyendo el daño celular asociado al proceso de congelación (15). Al optimizar tanto la velocidad como las condiciones térmicas del procedimiento, se logra preservar de manera más eficiente la integridad estructural y funcional del espermatozoide, lo que se traduce en una mayor calidad pos-descongelación (18).

### **2.2.14 Tipos de congelación**

La velocidad de enfriamiento previa a la criopreservación del semen es crucial para reducir el daño celular durante el proceso de congelación. Antes del desarrollo de técnicas de crioconservación, la inseminación artificial se realizaba con semen fresco o refrigerado (44); sin embargo, el descubrimiento

de crioprotectores y los avances en la formulación de diluyentes permitieron reemplazar progresivamente estas formas por el semen criopreservado, debido a sus múltiples ventajas (48). Actualmente, se emplean principalmente dos tipos de congelación:

- **Congelación lenta**

Consiste en un enfriamiento gradual de las pajillas de semen, en 2 o 3 etapas, durante 2 a 4 horas, ya sea manual o mediante un congelador semiprogramable (49). Las muestras, previamente diluidas con crioprotectores, se enfrían inicialmente de temperatura ambiente a 5 °C a razón de 0,5–1 °C/min, luego hasta -80 °C a una velocidad de 1–10 °C/min, y finalmente se sumergen en nitrógeno líquido a -196 °C para su almacenamiento criogénico (15).

- **Congelación rápida**

En este método, las pajillas cargadas con semen y crioprotector se enfrían inicialmente a 4 °C durante 4 horas. Luego se colocan durante 10 minutos a 7 cm por encima del nivel de nitrógeno líquido (vapor), y finalmente se sumergen en nitrógeno líquido a -196 °C; durante todo el proceso, las pajillas se mantienen en posición horizontal para asegurar una congelación uniforme y minimizar el gradiente térmico entre los extremos (43).

### **2.2.15 Congelamiento de semen**

El proceso que permite estabilizar a las células seminales a temperaturas criogénicas se denomina criopreservación, conocido también como un aspecto aplicado de la criobiología del estudio de la vida a bajas temperaturas (3). Los numerosos avances en las técnicas de crioconservación han permitido desarrollar métodos capaces de mantener a bajas temperaturas distintos tipos de células, incluidos gametos tanto de la hembra y del macho, pequeños organismos multicelulares e incluso organismos complejos como embriones (22). La temperatura utilizada para congelar los espermatozoides es de -196 °C, temperatura esencial para detener las funciones vitales de los espermatozoides y restaurarlas tras la descongelación (30).

### 2.2.16 Descongelamiento de semen

El descongelamiento de semen bovino es una etapa crítica en el proceso de inseminación artificial, ya que afecta directamente la viabilidad y la capacidad de fertilización de los espermatozoides, el procedimiento de descongelación del semen congelado y su posterior manipulación deben ser adecuados (31). En la mayoría de los casos, el semen bovino crioconservado se descongela sumergiendo las pajillas en un baño de agua a 37°C durante 30-60 segundos. Sin embargo, una técnica inadecuada de manipulación del semen provoca fluctuaciones de temperatura, lo que da lugar a una viabilidad deficiente tras la descongelación (32).

## 2.3 Definición de términos

- **Motilidad espermática:** Capacidad de los espermatozoides para moverse activamente, lo cual es esencial para que puedan llegar al ovocito y lograr la fertilización (16).
- **Viabilidad espermática:** Es la capacidad de los espermatozoides para conservar su estructura y función, lo que determina su potencial para fertilizar un óvulo. En los análisis seminales, se evalúa el porcentaje de espermatozoides vivos como indicador de su fertilidad (30).
- **Congelación de semen:** La congelación consiste en criopreservar los espermatozoides para preservar su capacidad de fecundación y se utilizan diluyentes para mantener su estructura (5).
- **Recolección de semen:** El semen se obtiene por vagina artificial en animales dóciles como el *Bos taurus*, y por electroeyaculación en ejemplares nerviosos o agresivos como el *Bos indicus* o toros de lidia (30).
- **Dilutores seminal:** Se trata de soluciones acuosas que aumentan el volumen del eyaculado hasta la cantidad necesaria, mantiene las características funcionales de los espermatozoides y conserva los niveles adecuados de fertilidad (18).
- **Electroeyaculador:** Dispositivo utilizado para recolectar semen mediante estimulación eléctrica de los nervios que controlan la eyaculación. Se introduce una sonda en el recto del toro, emitiendo impulsos que provocan

la salida del semen. Es útil en toros que no pueden ser colectados con vagina artificial, especialmente en campo (32).

- **Descongelación de semen:** Proceso mediante el cual el semen congelado es devuelto a temperatura fisiológica (usualmente 37 °C) de manera controlada antes de su uso. Una descongelación inadecuada puede comprometer la motilidad y viabilidad espermática (50).
- **Método convencional:** Técnica manual que enfría progresivamente el semen mediante vapores de nitrógeno líquido, sin control exacto de la temperatura, lo que puede generar cristales de hielo intracelulares que afectan la viabilidad espermática (25).
- **Método automatizado:** Técnica que emplea sistemas digitales para regular con precisión la curva de enfriamiento, reduciendo el daño celular y preservando mejor la calidad espermática tras la descongelación (18).

## CAPITULO III: METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

### 3.1 Tipo de estudio

El presente estudio se enmarcó dentro del enfoque cuantitativo, ya que se recolectaron y analizaron datos numéricos mediante procedimientos estadísticos. Este enfoque permitió evaluar de forma objetiva la eficacia de los métodos de congelación en la calidad espermática, a través de indicadores medibles como motilidad y viabilidad.

### 3.2 Diseño del estudio

Se trató de un estudio cuasi-experimental con medidas repetidas, en el cual se manipularon dos variables independientes: el método de congelación (convencional y automatizado) y el momento de evaluación (antes y después de la congelación). El diseño se orientó a evaluar la calidad espermática de toros *Bos indicus* sometidos a ambos métodos de criopreservación.

La investigación se desarrolló en el Centro de Desarrollo Ganadero – CEDEGA, perteneciente al Gobierno Regional de Madre de Dios, ubicado en el distrito de Tambopata, provincia de Tambopata, región Madre de Dios. Este centro se encuentra en una zona tropical, a 219 m.s.n.m., en las coordenadas 12°38'30,29" de latitud sur y 69°17'03,52" de longitud oeste (51), a 16 kilómetros al margen derecho de la carretera interoceánica Puerto Maldonado–Cusco.

### 3.3 Población y muestra

#### 3.3.1 Población

La población estuvo conformada por 56 toros del Centro de Desarrollo Ganadero – CEDEGA, clínicamente sanos, en edad reproductiva, disponibles para la selección; sin embargo, solo 15 toros (26.8%) no castrados reunieron las condiciones de buena aptitud reproductiva, mientras que los restantes estuvieron castrados, con defectos o fueron de otra especie (Tabla 01).

**Tabla 01.** Población de toros en el Centro de Desarrollo Ganadero

| Estado       | Razas              | No. Animales | (%)  |
|--------------|--------------------|--------------|------|
| No castrados | <i>Bos indicus</i> | 15           | 26.8 |
| Castrados    | <i>Bos indicus</i> | 36           | 64.2 |
| Defectuosos  | <i>Bos indicus</i> | 3            | 5.4  |
| Otras razas  | <i>Bos taurus</i>  | 2            | 3.6  |
| Total        |                    | 56           | 100  |

En la Tabla 01, se observa una distribución de la población de toros en el Centro de Desarrollo Ganadero – CEDEGA, clasificados según su estado reproductivo y grupo racial. Se registró un total de 56 animales, de los cuales el 96.4% corresponde a ejemplares de la raza *Bos indicus*. Dentro de este grupo, el 64.2% son toros castrados, el 26.8% son toros no castrados, y el 5.4% presenta alguna condición que los clasifica como defectuosos. El 3.6% restante corresponde a animales de otras razas, específicamente *Bos taurus*.

#### 3.3.2 Muestra

La muestra estuvo conformada por 5 toros *Bos indicus*, clínicamente sanos, con una edad comprendida entre 3 a 4 años, buena condición corporal, libres de defectos anatomopatológicos reproductivos, seleccionados a partir de los 15 toros con aptitud reproductiva, bajo los principios para maximizar la producción de semen, tales como la evaluación del tamaño testicular, desarrollo y función del epidídimo, conducta y libido, y estimulación sexual.

### **3.4 Métodos y técnicas**

#### **3.4.1 Materiales y equipos**

- **Materiales de campo y escritorio**

Tubo de ensayo graduado

Equipos de colección de semen

Electroejaculador

Naricera (mocheta)

Vaso colector

- **Materiales de laboratorio**

Vaso precipitado

Filtro de colección

Guantes quirúrgicos

Papel toalla x 6

Suero fisiológico

Baño maría

Tubos de ensayo de 20, 100 y 250 ml

Porta objeto

Pipeta mecánica

Cámara de Neubauer

Microscopio

Medio de dilutor

Pajillas de 0.5

Equipo de congelación automática de semen

Congeladora Cryopreservation Systems CL8800i- CRYOBATH

Refrigeradora

Alcohol polivinílico

Agua bidestilada

Congeladora artesanal

Nitrógeno líquido

Corta pajilla

- **Dilutor**  
Andromed
- **Equipo de laboratorio**  
Estereoscopio  
Platina térmica  
Puntas de pipeta y pipeta mecánica

### 3.4.2 Selección de toros *Bos indicus*.

Para el trabajo se seleccionaron un total de 5 toros de  $3 \pm 4$  años de edad relativa (casi adultos), con  $714.9 \pm 43.2$  kg de peso vivo,  $5.6 \pm 0.4$  puntos de condición corporal (moderada-buena) y  $37.4 \pm 0.77$  cm de perímetro escrotal (Tabla 02). Los toros pasaron por un examen de aptitud reproductiva: examen físico (forma general, órganos sexuales internos y externos), examen de libido, recolección y evaluación del semen, a fin de identificar los toros fértiles, infértiles y subfértiles.

Los pesos vivos fueron estimados utilizando una cinta bovinométrica, a partir de medidas corporales como el perímetro torácico y el largo corporal, aplicando la fórmula propuesta por Schaeffer:

$$PV = \frac{PT^2 * LC}{10838}$$

Donde:

PV, peso vivo (kg); PT, perímetro torácico (cm); LC, largo diagonal del cuerpo, desde la punta de encuentro hasta la punta de anca (cm).

La condición corporal de los animales se dedujo a partir de las nueve escalas de uso en el ganado *Bos indicus* (cebú), moderada-buena, con las costillas entre visibles-invisibles, y espinas dorsales entre visibles-invisibles pero fácilmente palpables (52).

- **Criterios de inclusión:**

Toros clínicamente sanos, libres de enfermedades reproductivas, de buena condición corporal, de buenas características fenotípicas, de alto valor genético, de buena circunferencia escrotal y de buena libido.

- **Criterios de exclusión:**

Toros castrados, con defectos congénitos, con enfermedades y patologías reproductivas, de especie distinta al *Bos Indicus*, infértiles y subfértiles (53).

**Tabla 02.** Animales utilizados para la colección de semen.

| Orden No.          | Toro No. | Edad (años) | Peso vivo (kg) | CC (puntaje) | EPR (sí/no) | CE (cm) |
|--------------------|----------|-------------|----------------|--------------|-------------|---------|
| 1                  | Toro 02  | 4           | 686.8          | 6.0          | No          | 38.0    |
| 2                  | Toro 13  | 3           | 697.4          | 5.5          | No          | 36.3    |
| 3                  | Toro 27  | 4           | 710.2          | 5.5          | No          | 37.4    |
| 4                  | Toro 39  | 4           | 790.5          | 6.0          | No          | 38.3    |
| 5                  | Toro 51  | 4           | 689.6          | 5.0          | No          | 37.2    |
| Promedio           |          | 3.8         | 714.9          | 5.6          |             | 37.4    |
| Desv. Estándar     |          | 0.4         | 43.2           | 0.4          |             | 0.77    |
| Coef. Variabil., % |          | 11.7        | 6              | 7.4          |             | 2       |

CC: Condición corporal, EPR: Enfermedades y patologías reproductivas, CE: Circunferencia escrotal.

Los toros *Bos indicus* fueron de propiedad del Centro de Desarrollo Ganadero – CEDEGA del Gobierno Regional de Madre de Dios, por lo que su disponibilidad, manejo y uso dependieron de las decisiones técnicas y administrativas de la Gerencia de Desarrollo Económico del Gobierno Regional de Madre de Dios. La evaluación de la aptitud reproductiva incluye tres componentes: el examen físico (conformación general, órganos sexuales internos y externos), la evaluación de la libido, la colecta y evaluación del semen (52).

Los animales estuvieron en un sistema extensivo, pastoreo de 6-8 horas, por lo que sus requerimientos energéticos se estimaron en función del peso vivo y la actividad física, según modelos de predicción: un requerimiento

aproximado de energía neta de mantenimiento de 8.99 Mcal/día ( $EN_m = 76.5 * EBW_{kg}^{0.75}$ ),  $EN_m$ , kcal/día =  $76.5 \text{ kcal}/EBW_{kg}^{0.75}$

Donde:

$$EBW = BW * 0.96$$

$$k_m = \frac{EN_m}{EM_m} = 0.67$$

$$EM_m, \text{ kcal/día} = 113.84 \text{ kcal}/EBW_{kg}^{0.75}$$

Según el modelo de predicción, un animal de 706.5 kg de peso vivo, requiere 15.13 Mcal EM/día para su mantenimiento; y con una alimentación basada en pasturas de *Brachiaria brizantha*, cuyo contenido de energía metabolizable es de 2.15 Mcal/kg MS (54), consume un mínimo de 7.04 kg de materia seca de los pastos o *ad libitum*, así como agua limpia y fresca a libre disposición, sin ningún tipo de suplementación de alimento ni minerales, excepto sal común durante el trabajo de recolección, por lo tanto, se siguió el programa de alimentación establecido en el Centro de Desarrollo Ganadero – CEDEGA.

### 3.4.3 Técnicas

- **Recolección de semen**

La recolección de semen se realizó en las instalaciones del Centro de Desarrollo Ganadero – CEDEGA, utilizando un brete especial de sujeción para garantizar la inmovilización segura de los toros. Previamente, se llevó a cabo la limpieza y desinfección (antisepsia) del prepucio y la región perineal, con el fin de evitar contaminaciones en la muestra seminal (30).

El procedimiento de recolección se efectuó mediante un electroeyaculador, introduciendo un transductor por la vía rectal del animal. Este dispositivo emitió estímulos eléctricos leves y controlados hacia el sistema reproductor, provocando la erección y posterior eyaculación. El semen fue recolectado en un vaso colector, el cual se mantuvo protegido de la luz solar directa para preservar su viabilidad y motilidad espermática (31).

- **Evaluación de semen**

Después de haber obtenido el eyaculado (semen) de los toros en el brete, los tubos colectores con semen se trasladaron al laboratorio de biotecnología reproductiva donde fueron procesados y evaluados (55).

**Volumen:** El volumen corresponde a la cantidad en mL de semen colectado en el tubo colector graduado (9).

**Color:** Corresponde a la tonalidad del semen que va del blanco cremoso al acuoso, siendo patológicos, los colores rosado, amarronado y verdoso (56).

**pH:** Se determinó colocando una gota de semen sobre una tira indicadora de pH. El procedimiento se repitió para cada eyaculado y se registraron los valores. Se consideró normal un pH entre 6.2 y 6.8 (57).

- **Calidad del semen antes de la congelación**

En la Tabla 03, se muestran las características seminales de los 5 toros que fueron recolectados. El número de animales fue de cinco (n=5), el promedio de volumen seminal eyaculado fue de 6.65 ml, de motilidad espermática 75.16 %, Viabilidad espermática 80.8 % y de concentración espermática  $1284 \times 10^6$  spz/ml.

**Tabla 03.** Características seminales de toros *Bos indicus*.

| Variables                | (n) | Promedio | D.S. | Min. (%) | Máx. (%) |
|--------------------------|-----|----------|------|----------|----------|
| Volumen (ml)             | 5   | 6.65     | 0.56 | 6.06     | 7.4      |
| Motilidad (%)            | 5   | 75.16    | 3.75 | 69.6     | 72.2     |
| Viabilidad (%)           | 5   | 80.8     | 2.89 | 77.2     | 84.6     |
| Concentración ( $10^6$ ) | 5   | 1284     | 132  | 1106     | 1446     |

Los valores promedios se encuentran dentro de los parámetros normales definidos para los bovinos (32).

- **Dilución de semen**

Luego de la colección se hizo una pre-dilución por adición de dilutor al semen en una proporción de 1:1 en baño maría a 32 °C, dejándose reposar durante 10 minutos para permitir que los espermatozoides se adapten y acostumbren al dilutor; después se llevó a cabo la dilución final agregando el semen pre-diluido en el dilutor. Los frascos de semen diluido se dejaron durante 10 minutos a una temperatura de laboratorio de aproximadamente 20°C. en este tiempo, se realizó una evaluación preliminar adecuado y se empezó con el empajillado (25).

- **Empajillado de semen**

Se utilizó pajillas vacías de 0.5 ml, la cual se comenzó a llenar de semen diluido en las pajillas, succionando el semen por el extremo que tiene el cordón y se selló el extremo abierto de las pajillas con alcohol polivinílico. Para poder identificar y diferencia el toro en el cual se hizo la recolección del semen, se utilizaron pajillas de diferentes colores y con un marcador manual. Todo el proceso se realizó en una cámara fría a una temperatura de 4 a 5 °C (57).

### **3.4.4 Congelación de semen**

#### **a) Congelación convencional**

Para empezar con la congelación convencional es necesario contar con una caja de poliestireno con una medida de 20 x 30 cm que contiene nitrógeno líquido; por otro lado, las pajillas fueron acomodadas en una canastilla prefabricada y refrigeradas a 4 °C (47), durante 4 horas, en una nevera doméstica, luego las pajillas fueron transferidas para una caja de poliestireno donde fueron acomodadas a 6 cm por encima de la superficie líquida durante 20 minutos. Finalmente, las pajillas fueron inmersas en nitrógeno líquido y posteriormente almacenadas en un termo de nitrógeno líquido a una temperatura de -196°C (15).

#### **b) Congelación automatizada**

Para la congelación Automatizada se utilizó un congelador Freeze control Cryopreservation Systems CL8800i. El congelador requiere nitrógeno líquido y a través del control de sensor se puede medir la temperatura; una vez

realizada el empajillado se procedió a congelar las pajillas colocándolas de uno en uno en la congeladora antes mencionada, durante 10 min. hasta que llegue a una temperatura de  $-120^{\circ}\text{C}$ . Finalmente, las pajillas fueron inmersas en nitrógeno líquido y posteriormente almacenadas en un termo criogénico que tiene nitrógeno líquido a una temperatura de  $-196^{\circ}\text{C}$  (18).

#### **3.4.5 Almacenamiento**

Las pajillas de semen congelado fueron almacenadas en tanques criogénicos con nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$  en las instalaciones del Centro de Desarrollo Ganadero – CEDEGA, en el laboratorio de biotecnología reproductiva.

#### **3.4.6 Descongelación de las pajillas**

Después de un periodo de congelación de 30 minutos, se procedió con el descongelado de las pajillas en baño María a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 30 segundos y luego se procedió a secar con una toalla de papel, se realizó el corte en un extremo de la pajilla para luego observar la muestra (58).

#### **3.4.7 Análisis del semen motilidad y viabilidad de post congelación**

Para el análisis post congelación, se evaluó la motilidad y viabilidad espermática, el cual fue el mismo proceso antes mencionado en la evaluación del microscópico del semen.

### **3.5 Métodos de evaluación Motilidad y Viabilidad espermática.**

#### **3.5.1 Determinación de la motilidad espermática**

La motilidad espermática fue evaluada mediante un examen microscópico, llevado a cabo tras la finalización de la evaluación macroscópica del semen. Esta evaluación microscópica comprendió los siguientes pasos:

- **Motilidad masal**

Para realizar la motilidad masal se colocó una gota de semen con una micropipeta, para luego ponerlo sobre un portaobjeto para su evaluación en el microscopio con objetivo de 10x y con platina temperada a  $32^{\circ}\text{C}$  (37), se clasificó de forma subjetiva en una escala de 0 a 5, con una puntuación de 5 cuando se observan oleadas o remolinos con movimientos rápidos y

vigorrosos, y de 0 cuando no se observa movimiento en ondas; la evaluación se realizó antes del congelado (59).

- **Motilidad individual**

La motilidad individual se determinó colocando una gota de semen en una placa portaobjetos a temperatura de 37 °C y cubriéndolo con un cubreobjetos, se observó bajo un microscopio con un aumento de 40X, a fin de medir el porcentaje de espermatozoides que tuvieron un movimiento rectilíneo y de forma continua; el valor se expresó en porcentaje; siendo el tamaño mínimo aceptable de la muestra el 60% (60). La evaluación se realizó antes de la congelación y después de la descongelación del semen.

La motilidad espermática se evaluó subjetivamente tras diluir los espermatozoides con un diluyente adecuado y descartar las muestras con una viabilidad inferior al 60%. Los espermatozoides con una motilidad entre el 60% y el 85% se consideraron de "buena" calidad y los espermatozoides con una viabilidad superior al 85% se consideraron de "excelente" calidad (40).

### **3.5.2. Determinación de la viabilidad espermática**

Para evaluar el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva, se colocó una pequeña gota (~3 mm de diámetro) de semen en un portaobjetos precalentado y se puso un cubreobjetos tibio sobre este. Es fundamental que la gota sea lo suficientemente pequeña como para garantizar que se pueda observar una sola capa de esperma (35). El análisis se realizó antes del proceso de congelación y tras la descongelación del semen.

La viabilidad espermática se determinó mediante la técnica de la tinción con eosina 5%, nigrosina 10%, a fin de cuantificar la proporción de espermatozoides vivos y muertos se calculó mediante una técnica de tinción, donde se utilizaron 3 gotas de eosina, 2 gotas de nigrosina en aproximadamente 10 uL de semen y se homogenizaron lentamente mediante tinción con los colorantes sobre el porta objeto identificado y secada a temperatura del laboratorio (61). El porcentaje de espermatozoides vivos se estimó mediante la siguiente fórmula:

$$E_{\text{vivos}}, \% = \frac{n}{N} * 100$$

Donde:

$E_{\text{vivos}}$  = Espermatozoides vivos.

$n$  = Número de espermatozoides vivos.

$N$  = Número total de espermatozoides.

### 3.5.3. Concentración espermática

Se utilizó la cámara de Neubauer para determinar la concentración de espermatozoides; para ello, el semen se diluyó en una proporción de 1:200, ya que es la adecuada para el ganado bovino. La dilución se realizó con NaCl al 3%, es decir, se añadieron 3980  $\mu\text{l}$  de NaCl al 3% y 20  $\mu\text{l}$  de semen completo (62). Tras la dilución y fijación del semen, se colocó una gota de semen (10  $\mu\text{l}$ ) en la cámara de recuento celular de Neubauer y se calculó la concentración de semen según la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración espermática (espermatozoides/mm}^3\text{)} = A \times B \times C \times D$$

Donde:

$A$  = Número de espermatozoides contados en 5 cuadrados,

$B = 5$ , estima el total de cuadrantes de la cámara ( $n = 25$  cuadros),

$C = 200$ , ya que la dilución para el semen bovino es 1:200,

$D = 10$ , representa la profundidad de la cámara, la cual es 0,1 mm.

A continuación, se multiplico por 1000 para saber la concentración de espermatozoides/mL (24).

## 3.6 Tratamiento de los datos

Los datos se expresaron en medidas de tendencia central y dispersión, tales como promedio y desviación estándar, respectivamente. La motilidad y la viabilidad espermática se evaluaron mediante el análisis de varianza de dos vías, en diseño completamente al azar, experimento factorial  $2 \times 2$ , con dos métodos de criopreservación (convencional y automatizado) y dos momentos

de evaluación (antes y después de la congelación), con cinco repeticiones por tratamiento, sujeta a una prueba de hipótesis de contraste bilateral:

$H_0$ : La calidad de semen es similar entre métodos de criopreservación y momento de evaluación.

$H_1$ : La calidad de semen es diferente entre métodos de criopreservación y momento de evaluación.

El análisis de varianza estuvo sujeto al siguiente modelo aditivo lineal fijo, bajo los supuestos de que los datos tienen una distribución normal, con varianzas homogéneas y observaciones independientes (63).

$$y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_j + (\tau\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

$$\text{con } i = 1, 2, \dots, a; j = 1, 2, \dots, b$$

Donde:

- $y_{ijk}$  : Variable respuesta.
- $\mu$  : Media general.
- $\tau_i$  : Variación entre métodos (convencional y automatizado).
- $\beta_j$  : Variación entre momentos (antes y después).
- $\tau\beta_{ij}$  : Interacción entre métodos y momentos.
- $\varepsilon_{ijk}$  : Variación entre observaciones.

Las medias se compararon mediante la prueba de rango múltiple de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ); la normalidad, mediante la prueba de Shapiro-Wilk y las significancias se calcularon con el programa VassarStats de acceso libre (64).

## CAPÍTULO IV: RESULTADOS DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

### 4.1 Motilidad espermática

En la Tabla 04, se observa los resultados de la motilidad espermática evaluada antes y después de la congelación.

**Tabla 04.** Motilidad espermática de semen de toros *Bos indicus* mediante congelación convencional y automatizada.

| Momento de evaluación | Método de congelación |                   | Promedio         | (p-valor) |        |        |
|-----------------------|-----------------------|-------------------|------------------|-----------|--------|--------|
|                       | Convencional          | Automatizado      |                  | Mt        | Mm     | Mt*Mm  |
| Antes                 | 75.2% $\pm$ 4.3%      | 75.2 % $\pm$ 4.3% | 75.2% $\pm$ 4.3% |           |        |        |
| Después               | 53.6% $\pm$ 2.3%      | 57.1% $\pm$ 3.6%  | 55.4% $\pm$ 3.4% |           |        |        |
| Promedio              | 64.4% $\pm$ 11.4%     | 66.1% $\pm$ 9.9%  |                  | 0.0212    | <.0001 | 0.0212 |

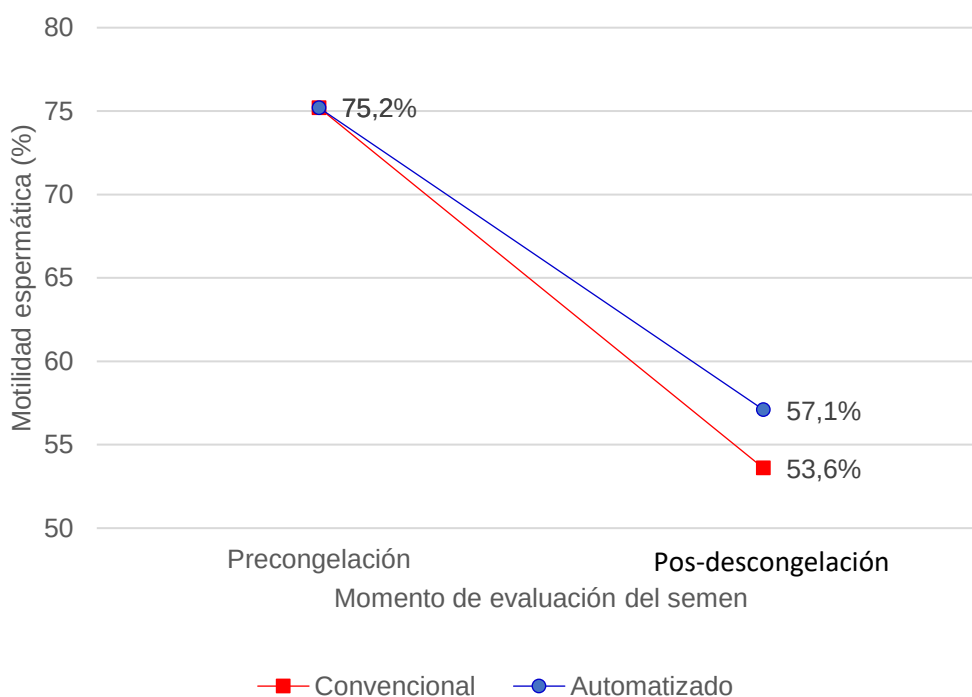
Mt: Método de congelación; Mm: Momento de evaluación; Interacción entre método y Momento.

En promedio, antes de la congelación, la motilidad progresiva espermática fue de 75.2%  $\pm$  4.3%; después de la congelación, la motilidad disminuyó a 55.4%  $\pm$  3.4%, con un descenso de 19.8%, siendo evidente la pérdida de la calidad de semen por efecto de la congelación. El método de congelación también tuvo efecto en la calidad de semen, donde el método automatizado superó solo en 2% al método de congelación convencional; sin embargo, esa pequeña diferencia fue significativa ( $p < 0.05$ ), evidenciando una mejor conservación de la calidad del semen. Los efectos principales del modelo indican que tanto el método de congelación como el momento de evaluación tuvieron efecto ( $p < 0.05$ ) sobre la motilidad del semen.

Los efectos simples indican que el método automatizado ( $57.1\% \pm 3.6\%$ ) superó en 3.5% al método convencional ( $53.6\% \pm 2.3\%$ ) en mantener la motilidad espermática después de la congelación, evidenciando una mejor protección de la calidad del semen.

Los efectos combinados del método de congelación y el momento de evaluación indican que el descenso de la motilidad espermática desarrolla una tendencia opuesta, con un descenso mayor del método convencional, con relación al método automatizado, evidenciando dependencia entre variables, donde la calidad de semen varía entre métodos de criopreservación.

**Fig 01.** Motilidad espermática de toros *Bos indicus* pre-congelación y pos-descongelación.



Según la Figura 01, antes de la congelación, tanto la congelación automatizada como la convencional mostraron una motilidad espermática del 75.2%. Sin embargo, al descongelar, la motilidad espermática fue del 57.1% con la congelación automatizada y del 53.6% con la congelación convencional. Esto sugiere que la congelación automatizada conserva mejor la motilidad espermática después de la descongelación en comparación con la convencional.

En la motilidad espermática de semen recolectado de Toros, se encontró un valor promedio de 75.2 (%), cifra que coincide con lo evaluado por Acosta (24) quien obtuvo motilidad espermática de 76%; de igual forma Aquino (23) encontró una motilidad individual promedio de 81%. Medina (18) encontró 87% de motilidad espermática en toros San Martineros. Ribeiro et al. (15) obtuvo una motilidad espermática de 79.7 %. Mejía (5) encontró 77.34% de motilidad en toros. Londoño (19) obtuvo 70% de motilidad individual. Damas (25) obtuvo en su investigación 86.5%, mientras que Torres (20) encontró 75.4% de motilidad espermática en su estudio, dichos valores son normales recomendados por la Sociedad Internacional de Teriogenología (65).

En el trabajo de investigación se logró obtener una motilidad de espermatozoides pos-congelado de 57.12% utilizando el método de congelación automatizada y 53.6% con el método convencional, según Ribeiro (15) registro una motilidad de 44.4% y 37.6% con los métodos automatizado y convencional, por otro lado, Damas (25) obtuvo 65.04% de motilidad de post congelación con el método convencional, Medina (18) con un 43.1% con el método automático y Aquino (23) con un 60.0 % con el método convencional.

#### **4.2 Viabilidad espermática**

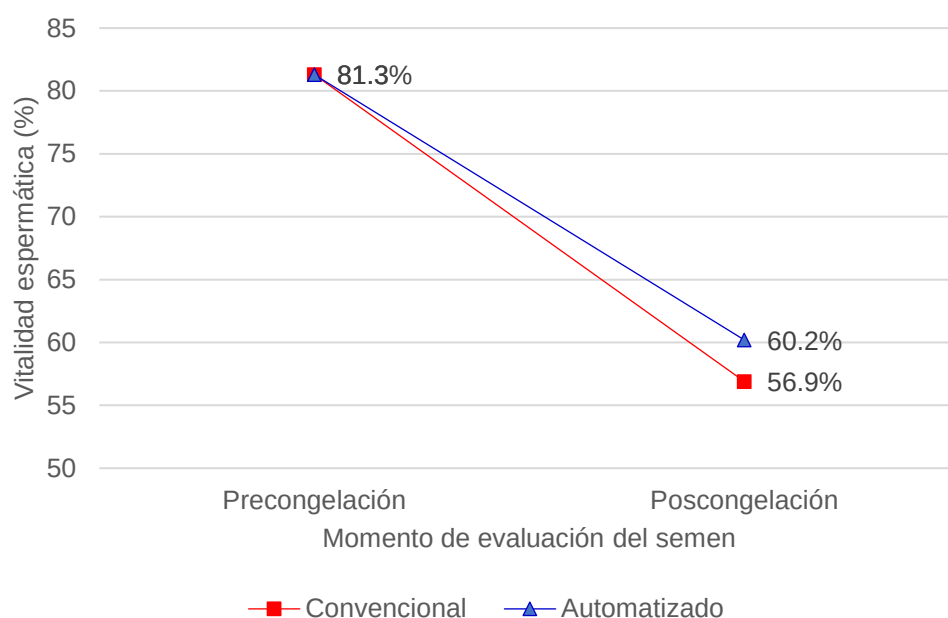
En la Tabla 05 resume los resultados de la viabilidad espermática del semen antes y después de la congelación, para ambos métodos. Los efectos principales del análisis de los datos indican que la congelación disminuye significativamente ( $p < 0.05$ ) la viabilidad espermática, desde un nivel alto ( $81.3\% \pm 3.6 \%$ ) hasta un nivel bajo ( $58.5\% \pm 2.8 \%$ ), con un descenso de 22.8% por efecto de la congelación. En forma similar, la congelación automatizada ( $70.7\% \pm 11.1\%$ ) conserva mejor ( $p < 0.05$ ) la viabilidad espermática que la congelación convencional ( $69.1\% \pm 12.7\%$ ).

**Tabla 05.** Viabilidad espermática de semen de toros *Bos indicus* preservados mediante congelación convencional y automatizada.

| Momento de evaluación | Método de congelación |                   | Promedio         | (p-valor) |        |         |
|-----------------------|-----------------------|-------------------|------------------|-----------|--------|---------|
|                       | Convencional          | Automatizada      |                  | Mét.      | Mom.   | Mét*Mom |
| Antes                 | 81.3 % $\pm$ 3.7%     | 81.3% $\pm$ 3.7%  | 81.3% $\pm$ 3.6% |           |        |         |
| Después               | 56.9% $\pm$ 2.4%      | 60.2% $\pm$ 2.2%  | 58.5% $\pm$ 2.8% |           |        |         |
| Promedio              | 69.1% $\pm$ 12.7%     | 70.7% $\pm$ 11.1% |                  | 0.0098    | <.0001 | 0.0098  |

Los efectos simples del análisis de los datos indican que la viabilidad espermática habiendo sido alta (81.3%  $\pm$  3.7%) antes de la congelación; es decir, el mismo valor para ambos métodos, fue significativamente diferente ( $p < 0.05$ ) entre la congelación automatizada y convencional, con una mejor viabilidad con el método automatizado (60.2%  $\pm$  2.2%) que con el método convencional (56.9 % $\pm$  2.4%), con una brecha de 3.3% (Figura 02).

**Fig 02.** Viabilidad espermática de toros *Bos indicus* pre-congelación y pos-descongelación.



La interacción entre el método de congelación y el momento de evaluación fue significativa ( $p < 0.05$ ), evidenciando que la viabilidad espermática depende del método de congelación y el momento de evaluación; es decir, la viabilidad, habiendo sido la misma en el semen fresco antes de la congelación

(81.3%), disminuyó en forma diferente después de la congelación, una a 56.9% y la otra a 60.2%, con pendientes divergentes no paralelas y una brecha de 3.3%.

Los datos consignados en la figura evidencian que la viabilidad espermática disminuye ( $p < 0.05$ ) en ambos métodos de congelación, con una pérdida del 22.8% después de la criopreservación; sin embargo, la pérdida fue mucho más acentuada con el método de congelación convencional que con el automatizado, evidenciando la interacción entre ambos factores.

Los resultados son concordantes con lo reportado por Castro (38) quien indica que el proceso de criopreservación genera alteraciones estructurales en los espermatozoides, lo que conlleva a una reducción significativa en la motilidad, viabilidad espermática y capacidad fecundante, afectando negativamente el potencial reproductivo.

La viabilidad espermática promedio del semen recolectado del presente estudio de investigación fue de 81.3 %, según Ribeiro, et al., (15) reportaron una viabilidad promedio de 80.1%, mientras que Cabrera y Pantoja (21) el resultado de su investigación obtuvieron una viabilidad promedio de 83.8%, por otra parte Murtina et al., (22) reportaron una viabilidad promedio de 78.94%. Medina (18) obtuvo en su trabajo de investigación una viabilidad de 90% en toros y Damas (25) reportó en su trabajo de investigación una viabilidad individual de 84.5%.

En la investigación realizada la viabilidad espermática pos- congelación con el método automatizado fue de 60.16% y el método convencional 56.92%. Según Ribeiro (15) reportó un 65.7% con el método convencional y un 61.7% método automatizado. Medina (18) obtuvo en su trabajo de investigación una viabilidad de 40% en toros por el método automatizado, por otro lado, Damas (25) reportó 63.47% de viabilidad espermática de post congelación con el método convencional. En ambos casos los resultados hallados se encuentran dentro de los valores aceptables.

Los procesos que suceden durante la criopreservación del semen, en donde aproximadamente 10 a 50% de los espermatozoides de un eyaculado no

resisten a este proceso y mueren (66), lo que provoca una reducción de la viabilidad y motilidad espermática en la pos-descongelación.

La viabilidad espermática, después de la motilidad, es el factor más importante para la fertilidad potencial del macho, debido a que solo los espermatozoides vivos pueden garantizar el éxito de la reproducción (67).

## CONCLUSIONES

La motilidad espermática del semen de toros *Bos indicus* disminuye con la congelación, siendo mayor la disminución con la congelación convencional que con la automatizada.

La viabilidad espermática del semen de toros *Bos indicus* disminuye con la congelación, siendo mayor la disminución con la congelación convencional que con la automatizada.

## SUGERENCIAS

Implementar el uso del método automatizado para la congelación de semen bovino, debido a su mayor eficacia en la preservación de la motilidad y viabilidad espermática en toros *Bos indicus*, aspecto clave en programas de reproducción asistida.

Durante la recolección de semen con electroeyaculador, es fundamental aplicar los estímulos eléctricos de forma lenta, progresiva y controlada, preservando tanto el bienestar del animal como la calidad del semen.

Evitar situaciones de estrés durante la recolección de semen en toros *Bos indicus*, debido a su carácter temperamental y naturaleza nerviosa. El estrés puede comprometer significativamente la calidad seminal, disminuyendo la motilidad y viabilidad espermática, lo que afecta directamente la eficacia de los programas de reproducción asistida.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ax, R. Dally, M. Didion, B. Lenz, R. Love, C. Varner, D. Hafez, B. Bellin, M. Semen evaluation. Reproducción e Inseminación Artificial en animales. Séptima edición. Mc Graw-Hill, México. 2002; 375 – 86.
2. Schenk, K. Suh, T. Cran, D. Seidel, G. Cryopreservation of flow sorted bovine spermatozoa. Theriogenology. 1999; 52(8): 1375 – 1391.
3. Brito, D. Reinoso, N. Evaluación cuali-cuantitativa de semen colectado con electroeyaculador (ee) de toros tratados con y sin tranquilizante. 2017.
4. Jerez, R. Gil, L. Luño, V. Gonzalez, N. Olaciregui, M. Use of Andromed (R) as cooling ovine semen extender. 2012.
5. Mejía, J. Evaluación pre y post congelación del semen obtenido con vagina artificial y electroeyaculador en el ganado criollo. 2017.
6. Rubio, M. Ngapo, T. Huerta, N. Tropical beef: is there an axiomatic basis to define the concept?. Foods. 2021; 10(5): 1025.
7. Vásquez, M. Molina, R. Breeding methods and reproductive parameters of Zebu cattle with genealogical records in Costa Rica. Agron Mesoam. 2021; 32(1): 19 – 33.
8. Stewart, D. Storage of bull spermatozoa at low temperaturas. Vet Rec. 1951; 63(1): 65 – 66.
9. Ugur, M. Saber, A. Evans, H. Gilmore, A. Hitit, M. Arifiantini, R. Purwantara, B. Kaya, A. Memili, E. Advances in cryopreservation of bull sperm. Front Vet Sci. 2019; 6(1): 268.
10. Bailey, J. Bilodeau, J. Cormier, N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. J Androl. 2000; 21(1): 5 –11.
11. Forero, R. Celeghini, E. Raphael, C. Andrade, A. Bressan, F. Arruda, R. Effects of bovine sperm cryopreservation using different freezing techniques and cryoprotective agents on plasma, acrosomal and mitochondrial membranas. Andrologia. 2012; 44(1): 154 – 9.
12. Kabir, A. Hossain, M. Deb, G. Shejuty, F. Das, D. Noman, A. Comparison between Manual and Automated Cryopreservation Techniques and Effects of Different Semen Extenders on Post-Thaw Semen Quality of

- Buffalo. Preprints. 2022; 11: 520.
13. Leon, L. Flores, H. La importancia del temperamento en la producción de ganado de carne bovina. Orinoquia. 2016; 20(2): 1 – 9.
  14. Crowe, A. Lonergan, P. Butler, S. Invited review: Use of assisted reproduction techniques to accelerate genetic gain and increase value of beef production in dairy herds. J Dairy Sci. 2021; 104(12): 12189 – 206.
  15. Ribeiro, L. Munita, M. Yumi, M. Mello, F. Cryopreservation of bovine spermatozoa from the epididymal tail using conventional and automated methods. Arch Med Vet. 2014; 46(1): 31 – 8.
  16. Gonzáles, H. Gonzáles, H. Biotecnología reproductiva: una alternativa para mejorar la producción animal. Biotempo. 2005; 5(1): 5 – 11.
  17. Fraser, D. Duncan, I. Edwards, S. Grandin, T. Gregory, N. Fraser, D. Duncan, I. Grandin, S. Gregory, T. General principles for the welfare of animals in production systems: the underlying science and its application. Vet J. 2013; 198(1): 19 – 27.
  18. Medina, V. Crioconservación de semen bovino usando un congelador programable (CL 8800) y determinación de su calidad postdescongelación por medio de un sistema de análisis asistido por computador (CASA). Rev Orinoquia. 2007; 11(1): 75 – 86.
  19. Londoño, M. Frecuencia de alteraciones morfológicas espermáticas en toros Brahman entre 20 y 32 meses de edad en condiciones de pastoreo. Tesis de Pregrado. Corporación Universitaria La Salle. 2022.
  20. Torres, G. Criterios de selección y manejo reproductivo del toro Brahman en sistemas ganaderos de la Orinoquia. 2021.
  21. Cabrera, P. Pantoja, C. Viabilidad espermática e integridad del acrosoma en semen congelado de toros nacionales. Rev Investig Vet del Perú. 2012; 23(2): 192 – 200.
  22. Murtina, T. Purwono, P. Junaidi, A. Suryaningsih S. The traits of fresh and frozen semen on Brahman Bulls. J Unsyiah. 2012; 2(1): 22 – 4.
  23. Aquino, M. Características seminales en toros de razas cárnicas y doble propósito. 2017.
  24. Acosta, E. Comparación de la viabilidad espermática de bovinos gemelos homocigotos Aberdeen Angus por citometría de flujo. 2019.

25. Damas, R. Evaluación de dos dilutores comerciales en semen congelado de toros en le Banco Nacional. 2010.
26. Calle, C. Evaluación de semen bovino utilizando medios comerciales de criopreservación, provincia de morona santiago, Ecuador. 2020.
27. Kang, S. Kim, U. Lee, M. Lee, S. Cho, S. Spermatozoa motility, viability, acrosome integrity, mitochondrial membrane potential and plasma membrane integrity in 0.25 mL and 0.5 mL straw after frozen-thawing in Hanwoo bull. J Anim Reprod Biotechnol. 2020; 35(4): 307 – 14.
28. Nicholson, J. Sayers, R. Repeatability, reproducibility and sequential use of condition scoring of Bos indicus cattle. Trop Anim Health Prod. 1987 Sep; 19(3): 127 – 35.
29. Palma, M. Chayer, R. Pinto, A. Rubio, R. Condición corporal: evaluación del impacto de sugerencias profesionales sobre resultados reproductivos. 2017.
30. Villamizar, G. Manual de procedimientos para la colecta y criopreservación de semen bovino para la empresa Santa Clara genética Estado Paraná – Brasil. 2014.
31. Schenk, J. Principles of maximizing bull semen production at genetic centers. Animal. 2018; 12: 142 – 7.
32. Mancheno, M. Díaz, A. Effect of the method of extraction of the semen in the spermatic quality of Sahiwal bulls. Researchgate. 2018; 1(1): 2 – 3.
33. Napolitano, F. Arney, D. Mota, D. De Rosa G. Reproductive Technologies and Animals welfare. Anim Welf. 2020; 1: 18 – 25.
34. Rangel, P. Evaluación de la salud de sementales bovinos. Tesis de pregrado. 2007.
35. Yoelinda, V. Arifiantini, R. Agil, M. Setiadi, D. Hastuti, Y. Manansang, J. Sajuthi, D. The use of transrectal massage combined with artificial vagina as semen collection in javan banteng (*Bos javanicus*) bull. Web Conf. 2020; 11: 1 – 4.
36. Larson, J. Miller, D. Can Relative Spermatozoal Galactosyl transferase Activity be Predictive of Dairy Bull Fertility? J Dairy Sci. 2000; 83(11): 2473 – 9.
37. Viquez, L. Evaluación de la calidad seminal en bovinos (*Bos indicus*) y la

- estructura subpoblacional del eyaculado mediante un sistema CASA-Mot. 2020.
38. Castro, W. Valoración espermática de semen bovino criopreservado con tres curvas de temperatura en la hacienda la victoria del cantón bucay. 2022.
  39. Morrell, J. Văleanu, A. Lundeheim, N. Sperm quality in frozen beef and dairy bull semen. *Acta Vet Scand.* 2018; 60(41): 1 – 10.
  40. Muiño, R. Rivera, M. Rigau, T. Rodríguez, J. Peña, A. Evaluación de la motilidad y viabilidad del semen Bovino mediante el uso de sistemas casa y citometría de flujo: identificación de subpoblaciones espermáticas. *Anim Reprod Sci.* 2008; 1 – 15.
  41. Muñoz, O. Muñoz, G. Cómo mejorar la colección, manejo y calidad microbiológica del semen. Manual de ganadería doble propósito. Ediciones Astro Data, SA Venez. 2005; 19 – 25.
  42. Phillips, N. Evans, G. McGowan, M. Measures used to assess frozen-thawed semen in Australian livestock semen processing centres. *Aust Vet Journal.* 2005; 82(5): 309 – 310.
  43. Pereira, G, Becker, E. Siqueira, L. Ferreira, R. Severo, C. Truzzi, V. et al. Assessment of bovine spermatozoa viability using different cooling protocols prior to cryopreservation. *Ital J Anim Sci.* 2010; 9(4): 88.
  44. Rossi, A. Efecto de la refrigeración y la adición de trehalosa en los parámetros de viabilidad microscópicos de semen bovino. 2012.
  45. Herman, H. The artificial insemination of dairy goats and sheep. *Artif Insemin embryo Transf dairy beef cattle.* 1994.
  46. Cabrera, P. Integridad de la membrana citoplasmática en semen refrigerado y congelado de toros usando dos dilutores sintéticos. 2021.
  47. Arango, J. Diseño e implementación de un sistema automático y de control para el congelamiento de semen bovino. Tesis de Pregrado. Universidad de Pamplona. 2017.
  48. Kumar, S. Millar, J. Watson, P. The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. *Cryobiology.* 2003; 46(3): 246 – 53.
  49. Papa, P. Maziero, R. Guasti, P. Junqueira, C. Freitas, C. Papa, F. Vianna,

- M. Crespilho, A. Dell'Aqua, J. Effect of glycerol on the viability and fertility of cooled bovine semen. *Theriogenology*. 2015; 83(1): 107 – 13.
50. Chaveiro, A. Machado, L. Frijters, A. Engel, B, Woelders, H. Improvement of parameters of freezing medium and freezing protocol for bull sperm using two osmotic supports. *Theriogenology*. 2015; 65(9): 107 – 13.
  51. Vargas, C. Crecimiento folicular y niveles séricos de progesterona en vacas criollas sometidas a protocolos de sincronización de celo en el Centro de Desarrollo Ganadero (CEDEGA) – Puerto Maldonado. Tesis de Pregrado. Universidad Nacional Amazónica Madre de Dios. 2018; 1 – 72.
  52. Nicholson, M. Butterworth, M. A guide to condition scoring of zebu cattle. International Livestock Centre for Africa. 2008; 1 – 27.
  53. Páez, E. Corredor, E. Evaluación de la aptitud reproductiva del toro. *Cienc y Agric*. 2014; 11(2): 49 – 59.
  54. Mutimura, M. Ebong, C. Rao, I. Nsahlai, I. Effect of cutting time on agronomic and nutritional characteristics of nine commercial cultivars of *Brachiaria* grass compared with Napier grass during establishment under semi-arid conditions in Rwanda. *African Journal of Agricultural Research*. 2017; 12(35): 1 – 13.
  55. Moncayo, S. Evaluación de la calidad seminal de reproductores Bovinos antes y después del proceso de criopreservación. Tesis de pregrado. Universidad Politecnica Salesiana. Ecuador. 2016; 1 – 81.
  56. Gómez, M. Migliorisi, L. Protocolo para la evaluación de semen de rumiantes. Mar de Plata, Argentina: Universidad Nacional de la Plata. 2009; 1 – 9.
  57. Viñan, H. Adición de metil – B – ciclodextrina cargada de colesterol sobre la criopreservación de semen de toros Holstein Friesian. Tesis de postgrado. Universidad Nacional Agraria la Molina. 2017.
  58. Villa, N. Valencia, J. Gómez, G. Henao, F. The effect of errors regarding frozen semen insemination on bovine sperm morphophysiology. Tesis de Pregrado. Universidad de los Llanos. 2015.
  59. Maroto, M. Evaluación de la motilidad del semen fresco utilizando dos diluyentes comerciales en diferentes hora de extracción. Tesis de pregrado. Universidad Nacional de Córdoba. 2020; 1 – 36.

60. Whittier, W. Bailey, T. Predicting Bull Fertility. Extension Veterinarians, Cattle, Department of Large Animal Clinical Sciences, Virginia Maryland Regional College of Veterinary Medicine, Virginia Tech. 2009; 1 – 9.
61. Steven, P. Brinsko, S. Hartman, D. Manual of Equine Reproduction. 2011; 1 – 132.
62. Oliva, L. Comparación de las características seminales de Bovinos gemelos homocigotos Aberdeen Angus, en la Región Amazonas. Tesis de pregrado. Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas. 2022.
63. Sawyer, S. Analysis of variance: The fundamental concepts. Journal of Manual & Manipulative Therapy. 2017; 17(2): 1 – 38.
64. Lowry, R. One-Way Chi-Square “Goodness of Fit” Test. VassarStats: Website for Statistical Computation. 2021; 1 – 3.
65. Kennedy, S. Spitzer, J. Hopkins, F. Higdon, H, Bridges, J. Breeding soundness evaluations of 3648 yearling beef bulls using the 1993. Society for Theriogenology Guidelines. 2002; 58(5): 947 – 961.
66. Watson, P. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Animal Reproduction Science. 2000; 60(1): 481 – 492.
67. Kumar, S. Kumar, A. Shahi, G. Yeasmin, F. Relationship between semen quality parameters and field fertility of bulls. J. Emb. Trans,. 2012; 27(1): 21 – 8.

## **ANEXOS**

## Anexo 01. Matriz de operacionalización de las variables

| DEFINICION<br>CONCEPTUAL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | DEFINICIONES<br>OPERACIONALES                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | DIMENSIONES                         | INDICADORES                        | ITEMS |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|-------|
| <p><b>VARIABLE INDEPENDIENTE</b></p> <p><b>Método de congelación</b></p> <p><i><b>Congelación convencional</b></i></p> <p>Método manual de congelación de espermatozoides que emplea vapor de nitrógeno líquido. Se caracteriza por ser accesible y de bajo costo.</p> <p><i><b>Congelación automatizada</b></i></p> <p>Método de congelación de espermatozoides donde se utiliza un equipo de congelación, con un protocolo estándar establecido.</p>                                                                                                                                            | <p>Las pajillas fueron refrigeradas a 4 °C durante 4 horas, luego colocadas a 6 cm sobre nitrógeno líquido por 20 minutos en una caja de poliestireno y, finalmente, sumergidas en nitrógeno líquido para su conservación.</p> <p>Las pajillas fueron congeladas en un equipo automatizado siguiendo un protocolo estándar para semen bovino, que consistió en un enfriamiento a -0,25 °C/min hasta 5 °C por 180 minutos, luego a -5 °C/min hasta -120 °C, y finalmente fueron sumergidas en nitrógeno líquido.</p> | Método de congelación espermática   | Porcentaje (%) de espermatozoides. | 1 - 2 |
| <p><b>Momento de evaluación</b></p> <p><i><b>Pre-congelación.</b></i></p> <p>Etapla inicial del proceso de criopreservación, donde el semen es evaluado, tratado con crioprotectores y enfriado progresivamente para preservar su motilidad y viabilidad ante el almacenamiento en nitrógeno líquido.</p> <p><i><b>Pos-descongelación</b></i></p> <p>Fase posterior a la descongelación en la que se evalúan parámetros de calidad espermática, como la motilidad y viabilidad, con el propósito de verificar su estado y aptitud funcional para su uso en técnicas de reproducción asistida.</p> | <p>El semen fue evaluado antes de su congelación mediante análisis de motilidad masal y progresiva y viabilidad, tras la dilución con el medio crioprotector y la estabilización a 4 °C.</p> <p>Luego descongelar las pajillas en un baño maría a 37 °C durante 30 segundos, el semen fue analizado microscópicamente para evaluar la motilidad y la viabilidad espermática mediante tinción eosina y nigrosina.</p>                                                                                                | Semen fresco y descongelado.        |                                    |       |
| <p><b>VARIABLE DEPENDIENTE</b></p> <p><b>Motilidad y viabilidad espermática</b></p> <p>Son parámetros fundamentales que reflejan la capacidad de los espermatozoides para desplazarse de manera eficiente y mantenerse funcionales, siendo ambos factores determinantes para lograr una fertilización exitosa.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                | <p>Motilidad espermática: Se evaluó mediante observación microscópica de la motilidad en masa, calificando el movimiento en una escala de 0 a 5 según la formación de “olas”.</p> <p>Viabilidad espermática: Se determinó mediante tinción eosina-nigrosina, diferenciando espermatozoides vivos (no teñidos) y muertos (teñidos) mediante observación microscópica tras la preparación de un frotis.</p>                                                                                                           | Motilidad y Viabilidad espermática. |                                    |       |

## Anexo 02. Matriz de consistencia

| TITULO: Comparación de la motilidad y viabilidad espermática de toros <i>Bos indicus</i> utilizando dos métodos de congelación en Madre de Dios                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| NOMBRE DEL TESISISTA: NANCY DELIA HUAMAN HUANQQUE                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| PROBLEMA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | OBJETIVO                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | HIPÓTESIS                                                                                                                                                                      | VARIABLES/INDICADORES                                                                                                                                                                              | METODOLOGÍA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| <p><b>Problema general</b></p> <p>¿Cuál es la comparación de la motilidad y viabilidad espermática de toros <i>Bos indicus</i> utilizando los métodos de congelación convencional y automatizado en Madre de Dios?</p> <p><b>Problemas específicos</b></p> <p>¿Cuál es la motilidad espermática según método de congelación convencional y automatizado?</p> <p>¿Cuál es la viabilidad espermática según método de congelación convencional y automatizado?</p> | <p><b>Objetivo general</b></p> <p>Comparar la motilidad y viabilidad espermática de toros <i>Bos indicus</i> utilizando dos métodos de congelación en Madre de Dios.</p> <p><b>Objetivos específicos</b></p> <p>Determinar la motilidad espermática según método de congelación convencional y automatizado.</p> <p>Determinar la viabilidad espermática según método de congelación convencional y automatizado.</p> | <p>El método de congelación convencional y automatizado tiene efecto perjudicial sobre la motilidad y viabilidad espermática en toros <i>Bos indicus</i> de Madre de Dios.</p> | <p><b>Variables independientes</b></p> <p>Método de congelación: convencional y automatizado.</p> <p><b>Variables dependientes</b></p> <p>Motilidad espermática.</p> <p>Viabilidad espermática</p> | <p><b>Enfoque: Cuantitativo</b><br/> <b>Diseño:</b> Cuasi-experimental.<br/> <b>Tipo:</b> Comparativo.</p> <p><b>Métodos:</b><br/> <b>comparación de la motilidad.</b><br/> <b>Comparación de la viabilidad.</b><br/> Dilución del semen.<br/> Empajillado del semen.<br/> Congelación del semen.<br/> Almacenamiento<br/> Descongelación de las pajillas<br/> Análisis del semen post congelación.<br/> <b>Análisis estadísticos.</b><br/> Análisis de varianza de dos vías en diseño completamente al azar 2x2: método de colección (convencional y automatizado), momento de evaluación (antes de la congelación y después de la descongelación)<br/> <b>Técnicas instrumentales de muestreo:</b><br/> Motilidad.<br/> Viabilidad.<br/> Microscopio (cámara de Neubauer)<br/> Tinción (eosina-nigrosina)<br/> <b>De recolección de datos:</b><br/> Registro de datos en cuaderno de campo.<br/> Registro de datos de laboratorio.<br/> <b>De análisis:</b><br/> Rango múltiple de Tukey (<math>\alpha = 0.05</math>); prueba de Shapiro-Wilk; programa Vassar Stats de acceso libre.<br/> <b>Población:</b> Toros con aptitud reproductiva<br/> <b>Muestra:</b> 5 toros seleccionados (criterios de inclusión y exclusión).</p> |

**Anexo 03.** Tablas de recopilación de datos y toma de información del proyecto de investigación.

**Tabla 06.** Cantidad de animales toros *Bos indicus* en el Centro de Desarrollo Ganadero – CEDEGA.

| NÚMERO DE ANIMAL (TORO) | EDAD | CC  | ENFERMEDADES Y PATOLOGIA REPRODUCTIVAS (SI) o (NO) | OBSERVACIONES          |
|-------------------------|------|-----|----------------------------------------------------|------------------------|
| TORO 01                 | 3    | 3.5 | NO                                                 | NINGUNA                |
| TORO 02                 | 4    | 6   | NO                                                 | NINGUNA                |
| TORO 03                 | 3    | 6   | NO                                                 | NINGUNA                |
| TORO 04                 | 2.5  | 4   | NO                                                 | NINGUNA                |
| TORO 05                 | 4    | 6   | SI                                                 | ORQUITIS               |
| TORO 06                 | 3    | 5   | SI                                                 | HIPOPLASIA TESTICULAR  |
| TORO 07                 | 2    | 5   | NO                                                 | CASTRADO               |
| TORO 08                 | 2    | 6   | NO                                                 | CASTRADO               |
| TORO 09                 | 2    | 5   | NO                                                 | CASTRADO               |
| TORO 10                 | 2    | 4.5 | NO                                                 | NINGUNA                |
| TORO 11                 | 4    | 3.5 | NO                                                 | NINGUNA                |
| TORO 12                 | 2    | 4.5 | NO                                                 | NINGUNA                |
| TORO 13                 | 3    | 5.5 | NO                                                 | NINGUNA                |
| TORO 14                 | 6    | 4.5 | NO                                                 | NINGUNA                |
| TORO 15                 | 3    | 5.5 | NO                                                 | ANGUS                  |
| TORO 16                 | 4    | 6   | NO                                                 | NINGUNA                |
| TORO 17                 | 4    | 4   | SI                                                 | PAPILOMATOSIS          |
| TORO 18                 | 3    | 7   | NO                                                 | NINGUNA                |
| TORO 19                 | 3    | 5.5 | NO                                                 | NINGUNA                |
| TORO 20                 | 3    | 4   | NO                                                 | CRUZADO                |
| TORO 21                 | 2    | 6   | NO                                                 | CASTRADO               |
| TORO 22                 | 1    | 5   | NO                                                 | CASTRADO               |
| TORO 23                 | 2    | 6   | NO                                                 | CASTRADO               |
| TORO 24                 | 1    | 5   | NO                                                 | CASTRADO               |
| TORO 25                 | 2    | 5   | NO                                                 | CASTRADO               |
| TORO 26                 | 3    | 7   | NO                                                 | CASTRADO               |
| TORO 27                 | 4    | 5.5 | NO                                                 | NINGUNA                |
| TORO 28                 | 1    | 6   | NO                                                 | CASTRADO               |
| TORO 29                 | 2    | 6   | NO                                                 | CASTRADO               |
| TORO 30                 | 3    | 6.5 | NO                                                 | CASTRADO               |
| TORO 31                 | 4    | 5.5 | NO                                                 | CASTRADO               |
| TORO 32                 | 6    | 6   | NO                                                 | CASTRADO               |
| TORO 33                 | 1    | 5   | NO                                                 | CASTRADO/PAPILOMATOSIS |
| TORO 34                 | 2    | 5.5 | NO                                                 | CASTRADO               |
| TORO 35                 | 2    | 6   | NO                                                 | CASTRADO               |
| TORO 36                 | 2    | 5   | NO                                                 | CASTRADO               |
| TORO 37                 | 1    | 6   | NO                                                 | CASTRADO               |

|         |   |     |    |          |
|---------|---|-----|----|----------|
| TORO 38 | 3 | 7   | NO | CASTRADO |
| TORO 39 | 4 | 6   | NO | NINGUNA  |
| TORO 40 | 2 | 5   | NO | CASTRADO |
| TORO 41 | 2 | 5.5 | NO | CASTRADO |
| TORO 42 | 1 | 5   | NO | CASTRADO |
| TORO 43 | 4 | 6   | NO | CASTRADO |
| TORO 44 | 2 | 5   | NO | CASTRADO |
| TORO 45 | 2 | 5   | NO | CASTRADO |
| TORO 46 | 3 | 6   | NO | CASTRADO |
| TORO 47 | 2 | 5.5 | NO | CASTRADO |
| TORO 48 | 4 | 6   | NO | CASTRADO |
| TORO 49 | 2 | 5   | NO | CASTRADO |
| TORO 50 | 3 | 6.5 | NO | CASTRADO |
| TORO 51 | 4 | 5   | NO | NINGUNA  |
| TORO 52 | 1 | 5   | NO | CASTRADO |
| TORO 53 | 1 | 4   | NO | CASTRADO |
| TORO 54 | 2 | 5.5 | NO | CASTRADO |
| TORO 55 | 1 | 6   | NO | CASTRADO |
| TORO 56 | 1 | 5   | NO | CASTRADO |

Fuente: Elaboración Propia.

CC: Condición corporal.

**Tabla 07.** Selección de toros para la recolección de semen y la evaluación respectiva

| Nº | ANIMAL<br>(Toro) | EDAD | CC  | ENFERMEDADES<br>Y PATOLOGIA<br>REPRODUCTIVAS<br>(SI) o (NO) | CIRCUNFERENCIA<br>ESCROTAL |
|----|------------------|------|-----|-------------------------------------------------------------|----------------------------|
| 1  | TORO 02          | 4    | 6   | NO                                                          | 38                         |
| 2  | TORO 13          | 3    | 5.5 | NO                                                          | 36.3                       |
| 3  | TORO 27          | 4    | 5.5 | NO                                                          | 37.4                       |
| 4  | TORO 39          | 4    | 6   | NO                                                          | 38.3                       |
| 5  | TORO 51          | 4    | 5   | NO                                                          | 37.2                       |

Fuente: Elaboración Propia.

CC: Condición corporal.

**Tabla 08.** Volumen eyaculado de semen recolectados de toros (ml) por semana.

| N° | ANIMAL<br>(Toro) | SEMANA |     |     |     |     |
|----|------------------|--------|-----|-----|-----|-----|
|    |                  | I      | II  | III | IV  | V   |
| 1  | TORO 02          | 6.5    | 6.8 | 5.9 | 6.6 | 7.1 |
| 2  | TORO 13          | 5.6    | 5.9 | 6.6 | 6.1 | 6.8 |
| 3  | TORO 27          | 7.8    | 6.7 | 7.3 | 7.6 | 7.6 |
| 4  | TORO 39          | 7.3    | 6.9 | 6.5 | 7.1 | 7.4 |
| 5  | TORO 51          | 5.8    | 6.1 | 5.7 | 6.5 | 6.2 |

Fuente: Elaboración Propia.

I = Primera semana; II = Segunda semana; III = Tercera semana; IV = Cuarta semana; V = Quinta semana.

**Tabla 09.** Evaluación del color del semen recolectados de los toros semanalmente

| N° | ANIMAL<br>(Toro) | SEMANA |    |     |    |    |
|----|------------------|--------|----|-----|----|----|
|    |                  | I      | II | III | IV | V  |
| 1  | TORO 02          | BC     | BC | BC  | BC | BC |
| 2  | TORO 13          | BC     | BA | BC  | BC | BA |
| 3  | TORO 27          | BC     | BC | BC  | BA | BC |
| 4  | TORO 39          | BC     | BC | BC  | BC | BC |
| 5  | TORO 51          | BC     | BC | BC  | BC | BC |

Fuente: Elaboración Propia.

BC: Blanco cremoso. BA: Blanco acuso.

I = Primera semana; II = Segunda semana; III = Tercera semana; IV = Cuarta semana; V = Quinta semana.

**Tabla 10.** Evaluación del pH del semen recolectados de toros semanalmente.

| N° | ANIMAL<br>(Toro) | SEMANAS |     |     |     |     |
|----|------------------|---------|-----|-----|-----|-----|
|    |                  | I       | II  | III | IV  | V   |
| 1  | TORO 02          | 6.5     | 6.6 | 6.2 | 6.4 | 6.6 |
| 2  | TORO 13          | 6.3     | 6.2 | 6.5 | 6.3 | 6.2 |
| 3  | TORO 27          | 6.7     | 6.8 | 6.4 | 6.5 | 6.4 |
| 4  | TORO 39          | 6.4     | 6.3 | 6.7 | 6.8 | 6.3 |
| 5  | TORO 51          | 6.5     | 6.4 | 6.3 | 6.6 | 6.5 |

Fuente: Elaboración Propia.

I = Primera semana; II = Segunda semana; III = Tercera semana; IV = Cuarta semana; V = Quinta semana.

Normal = 6.2 y 6.8 pH de semen.

**Tabla 11.** Motilidad masal de semen (valor descriptivo) recolectados de toros.

| N° | ANIMAL<br>(Toro) | SEMANAS |     |     |    |     |
|----|------------------|---------|-----|-----|----|-----|
|    |                  | I       | II  | III | IV | V   |
| 1  | TORO 02          | 4       | 4   | 3   | 3  | 4   |
| 2  | TORO 13          | 3       | 3   | 3.5 | 3  | 3   |
| 3  | TORO 27          | 3       | 4   | 3   | 4  | 4   |
| 4  | TORO 39          | 4       | 3.5 | 4   | 3  | 3   |
| 5  | TORO 51          | 3       | 4   | 5   | 4  | 2.5 |

Fuente: Elaboración Propia.

I = Primera semana; II = Segunda semana; III = Tercera semana; IV = Cuarta semana; V = Quinta semana.

0 = Sin movimiento; 1 = leve movimiento de cola sin desplazamiento; 2 = leve movimiento de cola con algo de movimiento; 3 = Movimiento progresivo a velocidad lenta; 4 = Movimiento progresivo rápido; 5 = Movimiento progresivo rápido donde es difícil de seguir la célula determinada.

**Tabla 12.** Motilidad individual espermática del semen (%) recolectados de toros semanalmente.

| Nº | ANIMAL<br>(Toro) | SEMANAS |    |     |    |    |
|----|------------------|---------|----|-----|----|----|
|    |                  | I       | II | III | IV | V  |
| 1  | TORO 02          | 78      | 72 | 82  | 77 | 81 |
| 2  | TORO 13          | 68      | 68 | 71  | 72 | 69 |
| 3  | TORO 27          | 75      | 79 | 75  | 71 | 74 |
| 4  | TORO 39          | 79      | 81 | 82  | 76 | 78 |
| 5  | TORO 51          | 79      | 71 | 74  | 73 | 74 |

Fuente: Elaboración Propia.

I = Primera semana; II = Segunda semana; III = Tercera semana; IV = Cuarta semana; V = Quinta semana.

80 – 100 % = Muy buena: espermatozoides presentan movilidad.

60 - 79 % = Buena: espermatozoides presentan movilidad.

40 - 59 % = Regular: espermatozoides presentan movilidad.

< del 40 % = Pobre: de espermatozoides presentan movilidad.

**Tabla 13.** Viabilidad espermática del semen (%) recolectados de toros semanalmente.

| Nº | ANIMAL<br>(Toro) | SEMANAS |    |     |    |    |
|----|------------------|---------|----|-----|----|----|
|    |                  | I       | II | III | IV | V  |
| 1  | TORO 02          | 82      | 78 | 77  | 81 | 88 |
| 2  | TORO 13          | 79      | 78 | 81  | 73 | 75 |
| 3  | TORO 27          | 77      | 81 | 84  | 78 | 81 |
| 4  | TORO 39          | 84      | 83 | 84  | 86 | 86 |
| 5  | TORO 51          | 83      | 82 | 85  | 84 | 83 |

Fuente: Elaboración Propia.

I = Primera semana; II = Segunda semana; III = Tercera semana; IV = Cuarta semana; V = Quinta semana.

**Tabla 14.** Concentración espermática del semen (%) recolectados de toros semanalmente.

| N° | ANIMAL<br>(Toro) | SEMANAS |      |      |      |      |
|----|------------------|---------|------|------|------|------|
|    |                  | I       | II   | III  | IV   | V    |
| 1  | TORO 02          | 1410    | 1050 | 1350 | 1290 | 1560 |
| 2  | TORO 13          | 1210    | 990  | 1010 | 1390 | 930  |
| 3  | TORO 27          | 1380    | 1210 | 1460 | 1120 | 1510 |
| 4  | TORO 39          | 1470    | 1510 | 1180 | 1580 | 1490 |
| 5  | TORO 51          | 1130    | 980  | 1310 | 1180 | 1410 |

Fuente: Elaboración Propia.

I = Primera semana; II = Segunda semana; III = Tercera semana; IV = Cuarta semana; V = Quinta semana.

**Tabla 15.** Viabilidad espermática del semen pos- congelación (%), que fueron congelados de forma mecánica.

| N° | ANIMAL<br>(Toro) | SEMANA |    |     |    |    |
|----|------------------|--------|----|-----|----|----|
|    |                  | I      | II | III | IV | V  |
| 1  | TORO 02          | 63     | 60 | 64  | 62 | 59 |
| 2  | TORO 13          | 58     | 59 | 57  | 59 | 60 |
| 3  | TORO 27          | 60     | 59 | 58  | 62 | 59 |
| 4  | TORO 39          | 64     | 59 | 63  | 64 | 59 |
| 5  | TORO 51          | 58     | 62 | 57  | 59 | 60 |

Fuente: Elaboración Propia.

I = Primera semana; II = Segunda semana; III = Tercera semana; IV = Cuarta semana; V = Quinta semana.

**Tabla 16.** Viabilidad espermática del semen pos congelación (%), que fueron congelados de forma convencional.

| N° | ANIMAL<br>(Toro) | SEMANA |    |     |    |    |
|----|------------------|--------|----|-----|----|----|
|    |                  | I      | II | III | IV | V  |
| 1  | TORO 02          | 57     | 56 | 54  | 62 | 60 |
| 2  | TORO 13          | 55     | 54 | 53  | 56 | 55 |
| 3  | TORO 27          | 59     | 57 | 56  | 54 | 56 |
| 4  | TORO 39          | 57     | 59 | 61  | 60 | 57 |
| 5  | TORO 51          | 58     | 57 | 60  | 54 | 56 |

Fuente: Elaboración Propia.

I = Primera semana; II = Segunda semana; III = Tercera semana; IV = Cuarta semana; V = Quinta semana.

**Tabla 17.** Motilidad individual espermática (%) del semen de toros pos-congelación, que fueron congelados de forma mecánica.

| N° | ANIMAL<br>(Toro) | SEMANAS |    |     |    |    |
|----|------------------|---------|----|-----|----|----|
|    |                  | I       | II | III | IV | V  |
| 1  | TORO 02          | 59      | 56 | 60  | 58 | 61 |
| 2  | TORO 13          | 52      | 51 | 53  | 57 | 55 |
| 3  | TORO 27          | 55      | 60 | 57  | 54 | 55 |
| 4  | TORO 39          | 61      | 64 | 62  | 59 | 63 |
| 5  | TORO 51          | 59      | 53 | 54  | 54 | 56 |

Fuente: Elaboración Propia.

I = Primera semana; II = Segunda semana; III = Tercera semana; IV = Cuarta semana; V = Quinta semana.

**Tabla 18.** Motilidad individual espermática (%) del semen de toros pos-congelación, que fueron congelados de forma convencional.

| N° | ANIMAL<br>(Toro) | SEMANA |    |     |    |    |
|----|------------------|--------|----|-----|----|----|
|    |                  | I      | II | III | IV | V  |
| 1  | TORO 02          | 55     | 56 | 54  | 55 | 51 |
| 2  | TORO 13          | 50     | 55 | 51  | 51 | 52 |
| 3  | TORO 27          | 55     | 51 | 53  | 55 | 57 |
| 4  | TORO 39          | 55     | 57 | 56  | 51 | 55 |
| 5  | TORO 51          | 51     | 52 | 54  | 57 | 52 |

Fuente: Elaboración Propia.

I = Primera semana; II = Segunda semana; III = Tercera semana; IV = Cuarta semana; V = Quinta semana.

**Anexo 04.** Panel Fotográfico de la ejecución del trabajo de investigación.

**Fig. 03.** Centro de Desarrollo Ganadero – CEDEGA, lugar donde se realizó la ejecución del trabajo de investigación.



**Fig. 04.** Desparasitación en toros con albendazol y doramectina.



**Fig. 05.** Selección y evaluación de toros reproductores *Bos indicus*.



**Fig. 06.** Evaluación de la condición corporal y peso de los animales (toros).



**Fig. 07.** Medida de la Circunferencia escrotal y limpieza del prepucio de los toros *Bos indicus* seleccionados antes de la recolección de semen.



**Fig. 08.** Materiales y equipos para la recolección de semen.



**Fig. 09.** Uso del electroeyaculador para la obtención de semen en toros *Bos indicus*.



**Fig. 10.** Recolección de semen a través de un colector comercial.





**Fig. 13.** Evaluación de la motilidad y viabilidad espermática en toros *Bos indicus* antes de la congelación.

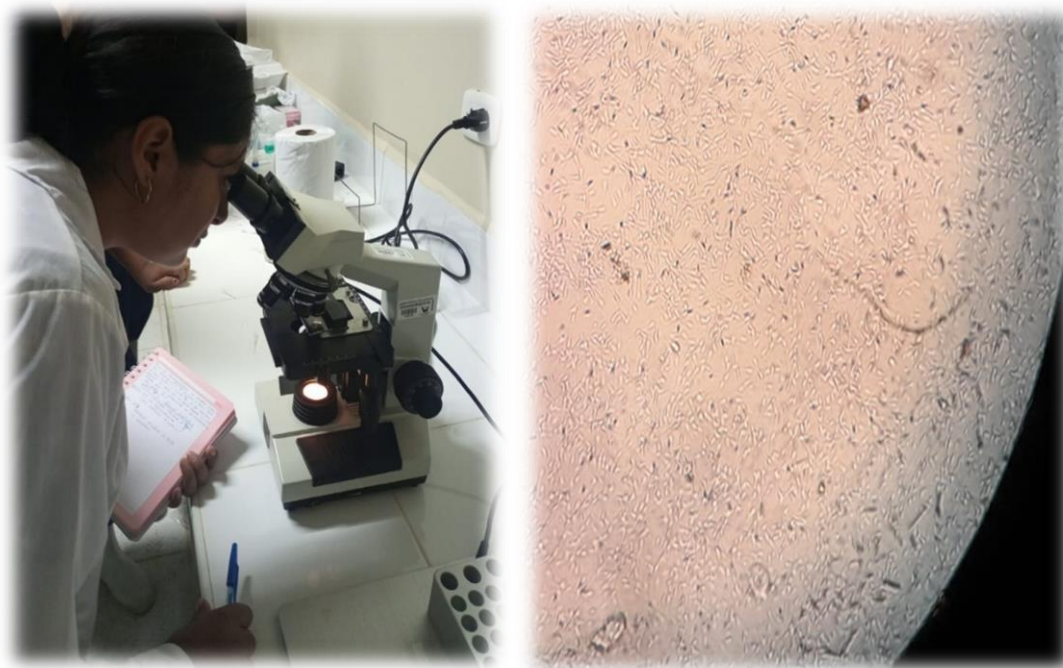


**Fig. 14.** Empajillado de semen de toros *Bos indicus* para su conservación.



**Fig. 15.** Proceso de congelación de semen con el método convencional y automatizado.



**Fig. 16.** Almacenamiento de pajillas en el tanque criogénico para su mantenimiento y conservación.



**Fig. 17.** Proceso de descongelación de semen de toros *Bos indicus*.



**Fig. 18.** Evaluación de la viabilidad y motilidad espermática pos-congelación.

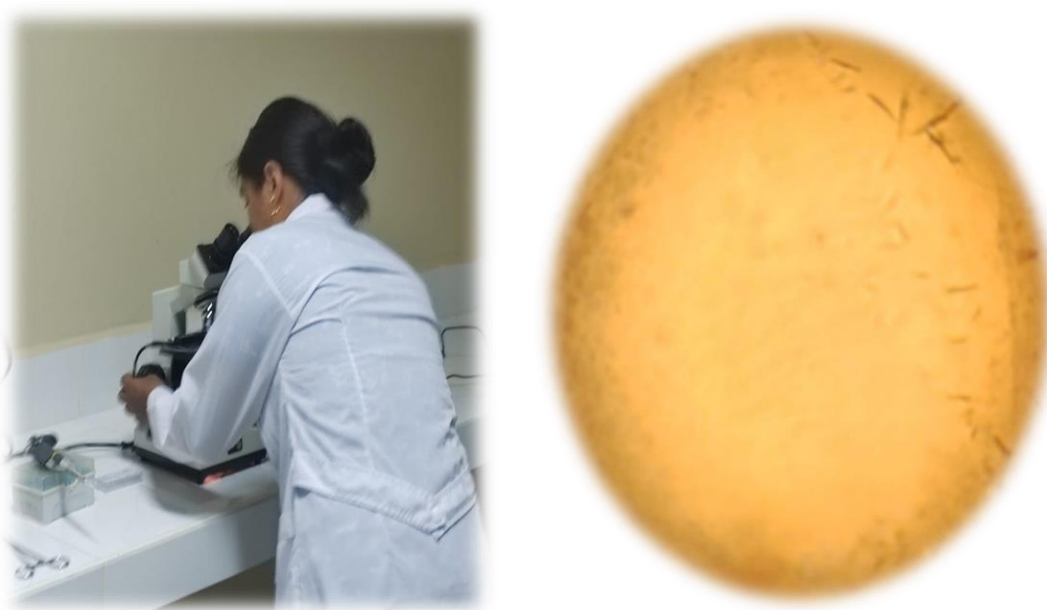


**Fig. 19.** Laboratorio de Biotecnología reproductiva donde se realizó la evaluación del semen juntamente con los asesores, personal encargado y de apoyo

