



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA AGROPECUARIA DE MANABÍ
MANUEL FÉLIX LÓPEZ**

DIRECCIÓN DE CARRERA: PECUARIA

**INFORME DE TRABAJO DE TITULACIÓN
PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE MÉDICO
VETERINARIO**

MODALIDAD: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

TEMA:

**EFFECTO DE DOS DILUYENTES Y TIEMPO DE PERMANENCIA
SOBRE LA VIABILIDAD DEL SEMEN DE BOVINOS MESTIZOS
LECHEROS**

AUTORES:

**GABRIEL ANDRES ANDRADE CASTRO
ROBERTO CARLOS PALMA ANDRADE**

TUTOR:

MV. MARCO ANTONIO ALCÍVAR MARTÍNEZ, Mg. Sc.

CALCETA, JULIO DEL 2020

DERECHOS DE AUTORÍA

Gabriel Andrés Andrade Castro y Roberto Carlos Palma Andrade declaran bajo juramento que el trabajo aquí descrito es de nuestra autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional, y que hemos consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración cedemos los derechos de propiedad intelectual a la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual y su reglamento.



.....
GABRIEL ANDRÉS ANDRADE CASTRO



.....
ROBERTO CARLOS PALMA ANDRADE

CERTIFICACIÓN DE TUTOR

Mg. Marco Antonio Alcívar Martínez, certifica haber tutelado el proyecto EFECTO DE DOS DILUYENTES Y TIEMPO DE PERMANENCIA SOBRE LA VIABILIDAD DEL SEMEN DE BOVINOS MESTIZOS LECHEROS, que ha sido desarrollada por Gabriel Andrés Andrade Castro y Roberto Carlos Palma Andrade, previa a la obtención del título de Médico Veterinario, de acuerdo con el **REGLAMENTO PARA LA ELABORACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria De Manabí Manuel Félix López.



MV. MARCO ANTONIO ALCÍVAR MARTÍNEZ, Mg. Sc.

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

Los suscritos integrantes del tribunal correspondiente, declaran que han **APROBADO** el trabajo de titulación EFECTO DE DOS DILUYENTES Y TIEMPO DE PERMANENCIA SOBRE LA VIABILIDAD DEL SEMEN DE BOVINOS MESTIZOS LECHEROS, que ha sido propuesto, desarrollado y sustentado por Gabriel Andrés Andrade Castro y Roberto Carlos Palma Andrade, previa la obtención del título de Médico Veterinario de acuerdo al **REGLAMENTO PARA LA ELABORACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Feliz López.



.....
DR. JORGE IGNACIO MACÍAS ANDRADE, Mg. Sc.

MIEMBRO



.....
MVZ. GUSTAVO ADOLFO CAMPOZANO MARCILLO, Mg. Sc.

MIEMBRO



.....
DR. ERNESTO ANTONIO HURTADO, PhD.

PRESIDENTE

AGRADECIMIENTO

Un especial agradecimiento a la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí “Manuel Félix López”, la cual me abrió sus puertas y en la que he forjado mis valores personales y mis conocimientos profesionales.

A Dios por concederme la sabiduría y la fortaleza necesaria para seguir adelante, sin desfallecer a pesar de las dificultades y siempre mantener firme en mis propósitos.

A mis padres por ser los pilares fundamentales de mi vida. Gracias por su amor incondicional y por enseñarme que el esfuerzo permite hacer los sueños realidad.

A mis maestros por compartir sus conocimientos.

.....
GABRIEL ANDRÉS ANDRADE CASTRO

AGRADECIMIENTO

En especial a la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí “Manuel Félix López”, la cual me abrió sus puertas y en la que he forjado mis valores personales y mis conocimientos profesionales

A Dios por permitirme este don de existir, a pesar de tantas dificultades y siempre sentirme agradecido por lo poco o mucho que se tenga y cumplir mis sueños.

A mis padres a mis tías hermana y primos por ser los pilares fundamentales de mi vida por su amor incondicional y por enseñarme que la perseverancia nos permite cumplir cada sueño q se proponga.

A mis maestros por compartir sus conocimientos y en especial al Dr. Edison Vélez.

.....
ROBERTO CARLOS PALMA ANDRADE

DEDICATORIA

El presente trabajo se lo dedico a Dios por el amor y misericordia con los que conduce mi camino.

A mi familia por ser mi fuente de motivación y mi puerto seguro.

A mi esposa por estar presente, confiar en mí y apoyarme en todo momento.

A mi hijo Gerónimo por ser la motivación y motor el cual me impulsa a ser cada vez mejor en lo que hago.

Y a todas aquellas personas que de una u otra manera supieron contribuir para el logro de esta meta.

.....
GABRIEL ANDRES ANDRADE CASTRO

DEDICATORIA

En primer lugar, le dedico este trabajo al creador del cielo y la tierra por su amor incondicional q nos guía a cada ser vivo.

A mi madre, a mi padre quien me cuida desde el cielo, mis tías y familias por su amor y ser mi motor de lucha y seguir en todas mis metas, frase célebre de la familia (familia unida esperanza en la vida).

.....
ROBERTO CARLOS PALMA ANDRADE

CONTENIDO GENERAL

	Pág.
CARÁTULA	i
DERECHOS DE AUTORÍA.....	ii
CERTIFICACIÓN DE TUTOR.....	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL	iv
AGRADECIMIENTO	v
AGRADECIMIENTO	vi
DEDICATORIA	vii
DEDICATORIA	viii
CONTENIDO GENERAL	ix
CONTENIDO DE CUADROS	xii
RESUMEN.....	xiii
PALABRAS CLAVE	xiii
ABSTRACT	xiv
KEY WORDS.....	xiv
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES.....	1
1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	1
1.2. JUSTIFICACIÓN.....	3
1.3. OBJETIVOS.....	4
1.3.1. OBJETIVO GENERAL	4
1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
1.4. HIPÓTESIS.....	4
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	5
2.1. EVALUACIÓN DE SEMEN	5
2.1.1. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS	7
2.1.1.1. VOLUMEN	7
2.1.1.2. COLOR	7
2.1.1.3. OLOR.....	8
2.1.1.4. ASPECTO.....	8
2.1.1.5. DENSIDAD MACROSCÓPICA	8
2.1.2. CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS	9

2.1.2.1. MOTILIDAD MASAL	9
2.1.2.2. MOTILIDAD INDIVIDUAL.....	10
2.1.2.3. VITALIDAD	11
2.1.2.4. MORFOLOGÍA.....	11
2.2. FISIOLÓGÍA DEL APARATO REPRODUCTOR DEL TORO	12
2.3. CRITERIOS EN LA SELECCIÓN DEL SEMENTAL.....	13
2.4. DILUCIÓN, EMPAQUETADO, CONGELACIÓN Y ALMACENAMIENTO DEL SEMEN	14
2.4.1. LA DILUCIÓN	14
2.4.2. CONGELACIÓN	15
2.4.3. EL SEMEN REFRIGERADO	16
2.5. EVALUACIÓN Y ALTERACIÓN QUE AFECTAN LA MORFOLOGÍA DEL ACROSOMA.....	17
CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO	19
3.1. UBICACIÓN.....	19
3.2. CONDICIONES CLIMÁTICAS	19
3.3. DURACIÓN.....	19
3.4. FACTORES EN ESTUDIO.....	19
3.5. TRATAMIENTOS.....	19
3.6. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	20
3.7. ADEVA.....	21
3.8. UNIDAD EXPERIMENTAL.....	21
3.9. VARIABLES A MEDIR	21
3.9.1. VARIABLES INDEPENDIENTES	21
3.9.2. VARIABLES DEPENDIENTES	21
3.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	21
3.11. PROCEDIMIENTO	22
3.11.1. SELECCIÓN DE TOROS.....	22
3.11.2. COLECTA DE SEMEN	22
3.11.3. DILUCIÓN DEL SEMEN	23
3.11.4. ENVASADO Y ALMACENAMIENTO DEL SEMEN DILUIDO.....	23
3.11.5. EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS A MEDIR DEL SEMEN	23
3.11.5.1. VITALIDAD ESPERMÁTICA	23
3.11.5.2. MOTILIDAD Y VIABILIDAD DE ESPERMATOZOIDES.....	24

3.11.6. EVALUACIÓN MORFOLÓGICA	24
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
4.1. DETERMINACIÓN DE LA MOTILIDAD, NORMALIDAD Y VITALIDAD DE LOS DILUYENTES (ANDROMED® Y OPTICELL®) DE SEMEN FRESCO Y REFRIGERADO	25
4.2. VALORACIÓN DE LA INTEGRIDAD ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA Y ACROSOMAL DEL SEMEN BOVINO FRESCO.....	29
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	32
5.1. CONCLUSIONES	32
5.2. RECOMENDACIONES	33
BIBLIOGRAFÍA.....	34
ANEXOS	39

CONTENIDO DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 3.1. Condiciones climáticas	19
Cuadro 3.2. Tratamientos	20
Cuadro 3.3. Esquema de ADEVA	21
Cuadro 4.1. Promedios y error estándar de la motilidad (%) de semen fresco y refrigerado de bovinos mestizos.....	25
Cuadro 4.2. Promedios y error estándar de la normalidad (%) de semen fresco y refrigerado de bovinos mestizos.....	26
Cuadro 4.3. Promedios y error estándar de la vitalidad (%) de semen fresco y refrigerado de bovinos mestizos.....	28
Cuadro 4.4. Promedios y error estándar de NAR, DAR Y GCs (%) de semen fresco.....	29

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de dos diluyentes y tiempo de permanencia sobre la viabilidad del semen de bovinos mestizos lecheros. Para ello se colectó semen de tres toros reproductores de raza Gyropar (Gyr x Pardo Suizo) de 36 meses de edad. Los tratamientos se organizaron en un diseño DCA con arreglo factorial (3x2), siendo estos: T1: Toro 1 con Optixcell®; T2: Toro 1 con Andromed®; T3: Toro 2 con Optixcell®; T4: Toro 2 con Andromed®; T5: Toro 3 con Optixcell®; T6: Toro 3 con Andromed®. Las variables a medir fueron: motilidad, normalidad y vitalidad a las 0, 12 y 24 horas, mientras que Borde Apical Normal (NAR), Borde Apical Dañado (DAR), Gota Citoplasmática (GCs) en semen fresco. Los resultados obtenidos fueron: en la motilidad ($p < 0,05$) se destacó la hora 0 en el T1 ($91,25 \pm 2,50$). La normalidad ($p < 0,05$), se obtuvo un mayor promedio a las 0 horas el T1 ($82,50 \pm 6,57$). Mientras que en la vitalidad ($p < 0,05$) el mayor promedio se alcanzó en el T1 ($97,00 \pm 0,82$). Las variables morfológicas presentaron diferencias estadísticas ($p < 0,05$); se destacó en las variables NAR en el T3 ($94,00 \pm 2,58$); DAR el T4 ($8,75 \pm 2,99$) y GCs el T6 ($12,75 \pm 4,43$). Se concluye que la implementación Andromed® y Optixcell® no tiene efectos negativos sobre los parámetros de calidad morfológicos e integridad estructural y funcional de la membrana plasmática y acrosomal del semen.

PALABRAS CLAVE

Andromed®, Optixcell®, Borde Apical Normal (NAR), Borde Apical Dañado (DAR), Gota Citoplasmática (GCs).

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the effect of two diluents and residence time on the viability of semen from crossbred dairy cattle. For this, semen was collected from three breeding bulls of the Gyropar breed (Gyr x Pardo Suizo), 36 months old. The treatments were organized in a DCA design with a factorial arrangement (3x2), these being: T1: Toro 1 with Optixcell®; T2: Bull 1 with Andromed®; T3: Toro 2 with Optixcell®; T4: Toro 2 with Andromed®; T5: Toro 3 with Optixcell®; T6: Toro 3 with Andromed®. The variables to measure were: motility, normality and vitality at 0, 12 and 24 hours, while Normal Apical Edge (NAR), Damaged Apical Edge (DAR), Cytoplasmic Drop (GCs) in fresh semen. The results obtained were: in motility ($p < 0.05$), hour 0 stood out in T1 (91.25 ± 2.50). Normality ($p < 0.05$), a higher average was obtained at 0 hours on T1 (82.50 ± 6.57). While in vitality ($p < 0.05$) the highest average was reached in T1 (97.00 ± 0.82). The morphological variables presented statistical differences ($p < 0.05$); it was highlighted in the NAR variables in T3 (94.00 ± 2.58); GIVE T4 (8.75 ± 2.99) and GCs T6 (12.75 ± 4.43). It is concluded that the Andromed® and Optixcell® implementation does not have negative effects on the morphological quality parameters and the structural and functional integrity of the plasma and acrosomal membrane of the semen.

KEY WORDS

Andromed®, Optixcell®, Normal Apical Edge (NAR), Damaged Apical Edge (DAR), Cytoplasmic Drop (GCs).

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

En el Ecuador se puede evidenciar que un gran sector rural ha sido acondicionado para el desarrollo de la actividad ganadera.

De acuerdo con el INEC (2017) reporta que en el año 2016, la producción ganadera bovina en Ecuador tuvo un incremento cercano al 0,30% en relación a los datos del 2015, donde se observa en la Sierra se encuentra la mayor cantidad de bovinos un 50% aproximadamente del total de vacunos a nivel nacional, luego se encuentra la Costa con 40% y el Oriente con 10%.

Muchas pueden ser las causas que produzcan esta reducción en la tasa anual de crecimiento de esta actividad, no obstante, se identifican como causas principales el error humano debido a la falta de tecnificación de pequeños productores, el cual juega un papel definitivo en el desarrollo de protocolos técnicos que determinen de la calidad seminal de los sementales, debido muchas veces a que la gran mayoría de productores no saben hacer una evaluación de semen bovino de una manera profesional y técnica ya que han aprendido las prácticas del oficio por medio de la enseñanza de sus progenitores (Agüero, 2012).

Campero (2002) afirma que una de las causas principales en el déficit encontrado en los sistemas reproductivos se debe a problemas en el tracto reproductivo de hembras, por lo que se encuentran fallas que bajan el índice de preñez, por lo que se retos de salubridad se convierten en un limitante al momento de querer mejorar las condiciones productivas del hato.

En la actualidad se vienen realizando prácticas que coadyuvan a mejorar la calidad del semen, que redunde en la crioconservación y con esto garantizar un semen bovino para la realización de la técnica de inseminación artificial. De allí surge la necesidad de realizar análisis de explotación física y sanitaria, además de la evaluación básica macroscópica y microscópica del eyaculado, tal como han referido (Moron y Moron, 2015).

Con estos antecedentes se hace necesario conocer los diluyentes que pueden contribuir a la eficiencia del semen, sin que se pierda su viabilidad; por lo que surge la siguiente interrogante:

¿Cuál es el diluyente que garantiza la viabilidad y vitalidad del semen fresco y refrigerado de bovinos mestizos lecheros?

1.2. JUSTIFICACIÓN

La actividad ganadera, es una actividad generalizada y desarrollada en todas las regiones del territorio ecuatoriano, en la actualidad esta actividad económica es considerada como un pilar fundamental en el desarrollo socioeconómico del sector rural, la misma que garantiza la aplicabilidad del concepto de la seguridad alimentaria.

De acuerdo a la FAO (2011), el manejo de los animales, sistemas de alimentación y procesamiento de productos derivados de origen animal, son factores que intervienen de manera directa en la seguridad alimentaria, ya que el adecuado manejo de alimentos, junto al accesible costo de estos hacen que el consumidor pueda compensar las necesidades nutricionales a través de productos de primera, sin repercutir en su salud.

Por otra parte, entre los aspectos fundamentales que afectan la productividad y rentabilidad de pequeños productores a nivel rural se encuentra, el bajo desarrollo técnico relacionado con el cumplimiento de protocolos vinculados con la evaluación de semen bovino el cual tiene como objetivo mejorar la tasa de concepción en vacas, adicionalmente las fallas en la detección de celos del animal y la falta de tecnificación relacionada con la inseminación artificial en pequeños productores.

Esta investigación proporciona importante información relacionada con el porcentaje de variabilidad en la concentración de un eyaculado en toros mestizos lecheros en función de los diferentes métodos de conservación del semen, siendo relevante conocer aspectos como la motilidad la cual es uno de los parámetros de la analítica seminal, cuyos aspectos pueden contribuir al incremento de la productividad de este sector.

De otra parte, es relevante el estudio porque generaría planes en la actividad ganadera para el logro de una mejor productividad.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de dos diluyentes y tiempo de permanencia sobre la viabilidad del semen de bovinos mestizos lecheros.

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar la motilidad, normalidad y vitalidad de los diluyentes (Andromed® y Optixcell®) de semen fresco y refrigerado en los tiempos 0,12 y 24 horas.

Valorar la integridad estructural y funcional de la membrana plasmática y acrosomal del semen fresco bovino.

1.4. HIPÓTESIS

Los diluyentes (Andromed® y Optixcell®) contribuyen la viabilidad y la integridad estructural y funcional de la membrana plasmática y acrosomal del semen bovino mestizos lecheros y por ende la mejora de la calidad del mismo.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1. EVALUACIÓN DE SEMEN

La reproducción del ganado bovino es una de las actividades que tiene un alto valor genético y compone una parte importante en la producción de animales, por ello, al obtener un macho reproductor dentro de ganaderías, es importante tener en consideración el punto de vista reproductivo, productivo y saludable de este, donde debe cumplir con tres requisitos básicos: buena libido, buen estado clínico reproductivo y buena calidad espermática. Las características del semen, es el factor que certificará de la aptitud reproductiva del macho (Morillo *et al.*, 2012).

Para que el semen de bovinos sea considerado viable, las células espermáticas deben de contar con características fecundantes como: motilidad progresiva, morfología normal, metabolismo energético activo, capacidad para desarrollar una motilidad hiperactivada, integridad estructural y funcionalidad de la membrana, integridad de las enzimas asociadas con la fecundación, capacidad de penetración y transferencia óptima del material genético (Hidalgo *et al.*, 2005).

El número de células espermáticas es uno de los factores que intervienen en el proceso de fecundación, cuando sus características reproductivas son idóneas. La concentración de espermatozoides por eyaculado, varía entre reproductores, sin embargo, es importante conocer la carga de células por eyaculado, ya que de esto dependerá el número de dosis para la posterior inseminación a vacas (Hidalgo *et al.*, 2005).

El manejo de retos sanitarios en ganaderías bovinas, puede ser uno de los elementos que pueda afectar la calidad seminal de machos reproductores, al igual que el manejo de muestras, estos factores pueden desencadenar focos infecciosos que alteren la normal reproductividad en el hato. Por esta razón, muchas explotaciones toman correctivos con el manejo sanitario de animales en productividad y en los debidos casos descartarlo bovinos del sistema productivo del cual haga parte, por ello se recomienda reducir los factores que puedan alterar la calidad seminal en toros (Lozano, 2009).

Lozano (2009) afirma que estas la evaluación seminal es una de las técnicas más importantes en la industria porcina, ya que es un punto específico en el proceso de la inseminación artificial, debido a que el material seminal del animal pasa por una serie de evaluación que dará como resultado una buena calidad de semen. La morfología espermática es utilizada como indicador de la habilidad de los espermatozoides para sobrellevar los procesos de congelado y descongelado.

Páez y Corredor (2014) reportan que los estudios de andrología en machos bovinos tienen como objetivo la exploración, e investigación de cualquier aspecto relacionado con la función sexual y reproducción masculina, con el fin de conocer el estado reproductivo de los toros, para lo cual se trabaja con muestras de semen, que por medio de análisis rutinarios de laboratorio, pueden esclarecer la viabilidad y valoración del material; por ello es considerado como un método rápido y económico de evaluar la calidad seminal.

Estos estudios de laboratorio realizados a muestras seminales de toros se realizan a través de análisis rápidos, que consisten en pruebas macroscópicas y microscópicas, donde se evalúan las características de forma subjetiva, las cuales son variadas dependiendo del macho reproductor y la experiencia del ojo clínico que evalúa (Páez y Corredor, 2014).

Lozano (2009) afirma que el trabajo humano cumple con un rol importante en la selección del material seminal adecuado de los sementales, razón por la cual, se hace necesario unificar criterios mediante el uso de equipos computarizados que permitan ser más objetivos en la evaluación seminal, además de brindar mayor número de parámetros de evaluación, tales como: velocidad del espermatozoide, tamaño de la cabeza y del flagelo, entre otros, los cuales no se evalúan de forma rutinaria por lo complicado y laborioso de su valoración, parámetros que de forma directa tipifican un eyaculado, permitiendo conocer la calidad del semen de forma más apropiada, objetiva y repetible.

Agüero (2012) indican, que el análisis microscópico del semen permite la evaluación de la movilidad, la vitalidad, la concentración y la morfología de los espermatozoides, a la vez que se investiga la presencia de células y/o elementos

acompañantes diferentes de espermatozoides, como los leucocitos, células de la progeñe espermática, células inflamatorias, bacterias y cristales.

La evaluación de la motilidad de los espermatozoides es una característica subjetiva al momento de ser evaluada en el semen de sementales. Sin embargo, los resultados de esta variable varía dependiendo el laboratorio donde se realice el análisis. Este examen es asistido por computadora (CASA= Computer Assisted Semen Analysis) la cual colabora con un mayor nivel de confianza en los resultados por su sofisticación en la evaluación de la movilidad (Rodríguez *et al.*, 2016).

2.1.1. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS

Durante el proceso de evaluación macroscópica el semen bovino presenta distintas características, así por ejemplo el volumen, la densidad de espermatozoides, el color y olor (Agüero, 2012).

2.1.1.1. VOLUMEN

El eyaculado de sementales se mide en ml (mililitros), se puede leer a través de tubos recolector graduado. Normalmente dicho valor, para el eyaculado de toros, es de aproximadamente 2 ml en animales jóvenes y en animales adultos \geq a 4 ml, llegando hasta 12 ml (Rodríguez *et al.*, 2016).

Se comprobó mediante observación directa al tubo de ensayo graduado. No se considera las burbujas de aire sobre la superficie del semen (Cabrera y Pantoja, 2012).

2.1.1.2. COLOR

Esta característica se evalúa por medio de la visualización en el laboratorio. El color del eyaculado depende del contenido de riboflavina, siendo normalmente desde blanquecino marfil hasta amarillento. Una coloración rojiza, indica la mezcla con sangre fresca; si el color es pardo, indica la presencia de sangre más vieja (hemolizada), denominándose ambos tipos como hemospermia. Una coloración gris indica contaminación (Cabrera y Pantoja, 2012).

El color idóneo es blanco cremoso a blanco lechoso. El aspecto se determinó por el grado de opacidad, variando de denso cremoso a denso acuoso (Cabrera y Pantoja, 2012).

2.1.1.3. OLOR

Las muestras de semen recolectadas higiénicamente, de toros sanos y fértiles, tienen un débil olor *sui generis* (Páez y Corredor, 2014).

2.1.1.4. ASPECTO

Por aspecto del semen se entiende su consistencia normal y color. El aspecto depende del número de espermatozoides/mm³, de los componentes de secreción de las glándulas accesorias y de eventuales agregados como: sangre, pus, células epiteliales y contaminación externa (Rodríguez *et al.*, 2016).

2.1.1.5. DENSIDAD MACROSCÓPICA

El conocimiento de la fertilidad o de la capacidad fecundante de cada toro es uno de los principales objetivos en la producción de semen bovino. De una cuidadosa valoración de la fertilidad dependerá la utilización futura del material seminal y el grado de aprovechamiento de los eyaculados obtenidos a lo largo de su vida reproductiva. Es decir, las dosis producidas por eyaculado están en función del nº de espermatozoides viables y, en definitiva, de su mayor o menor rentabilidad (Moron y Moron, 2015).

El número de células espermáticas por eyaculado tiene variaciones dependiendo la especie, edad, raza, estado fisiológico del individuo, método de recolección, estado nutricional, frecuencia de la recolección, excitación sexual, época del año y peso vivo del animal y con el volumen total del semen recolectado (Agüero, 2012).

Almela (2014) señala que, en el caso de los bovinos, la densidad macroscópica se clasifica en:

Azoospermico: ausencia de espermatozoides en el eyaculado.

Oligozoospermico: ≤ 200 millones espermatozoides/ml.

Ralo: 200–500 millones espermatozoides/ml.

Semi-denso: 500–800 millones espermatozoides/ml.

Denso: 800 –1500 millones espermatozoides/ml.

Densísimo: \geq 1500 millones espermatozoides/ml.

Es un dato subjetivo que se refiere a la motilidad de la masa como resultado del movimiento conjunto de los espermatozoides. En el eyaculado de los rumiantes, dada su elevada concentración espermática, se puede valorar la motilidad masal, definida como movimientos en ondas y remolinos del total de espermatozoides de la muestra (Curbelo y Rodríguez, 2013).

Hidalgo *et al.* (2005) recalcan que la fertilidad de un toro usado en IA, entre otras razones, dependerá básicamente del número de espermatozoides normales que se utilicen al inseminar.

2.1.2. CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS

Las características microscópicas a evaluar en el semen de bovinos son: motilidad masal, motilidad individual, vitalidad, morfología, concentración espermática.

2.1.2.1. MOTILIDAD MASAL

Por movimiento de masa se entiende, el movimiento en onda de todos los espermatozoides, observado en los eyaculados densos. Para su evaluación se toma una gota del semen a examinar (gota de semen íntegro) con una pipeta, se coloca la gota sobre un portaobjeto a 37°C y se observa en campo claro (aumento 10X), sin colocar el cubreobjeto (Moron y Moron, 2015).

Rosemberger (1981) afirma que el nivel de movilidad en masas se puede representar a través de la siguiente escala::

+++ : Cuando los espermatozoides tienen una actividad muy buena (torbellinos muy activos con ondas de células apreciables).

+ + +: Espermatozoides con buena actividad (torbellinos apreciables, pero con menor intensidad).

+ +: Células espermáticas con una actividad regular (poca presencia de torbellinos de células y con menor frecuencia que la anterior).

+: Deficiencia de actividad en los espermatozoides, sin presencia de torbellinos y sin ninguna intensidad.

- : Las células espermáticas no presentan ninguna actividad, ni movimientos.

2.1.2.2. MOTILIDAD INDIVIDUAL

Las células espermáticas tiene dos partes estructurales que se pueden diferenciar: la cabeza del espermatozoides, que tienen como principal función el guardar la información genética y el mecanismo necesario para la penetración del ovocito, y por otra parte, tenemos la cola del espermatozoide, la cual está encargada de darle la movilidad necesaria a la celular para que esta pueda transportarse. En los mamíferos esta parte de la célula está conformada por varios componentes funcionalmente dependientes (Ávalos *et al.*, 2018).

Existe una variabilidad entre los componentes tanto de forma como de tamaño, según la especie, sin embargo, la estructura de estas es muy similar. La cola del espermatozoide puede dividirse en cuatro porciones anatómicas: el cuello o pieza de unión, la pieza intermedia, la pieza principal, y el segmento o pieza terminal, todas ellas rodeadas por una membrana plasmática común (Intriago y Vargas, 2019).

La motilidad individual de una muestra de semen se expresa como el porcentaje de células móviles bajo un campo microscópico. Esta prueba de la motilidad debe hacerse con la ayuda de un microscopio óptico (aumento 100X) a una temperatura de 37°C. El semen no diluido, está demasiado concentrado como para hacer la determinación exacta de la motilidad individual, por lo cual se diluye con una solución isotónica de NaCl- al 0,9%, para poder observar individualmente a los espermatozoides (Muiño, 2006).

2.1.2.3. VITALIDAD

El procedimiento más habitualmente utilizado para la valoración de la vitalidad son las técnicas de tinción vital que permiten diferenciar los espermatozoides vivos de los muertos debido a la permeabilidad de la membrana plasmática a los colorantes vitales; por lo tanto, aquellas células que presentan una membrana plasmática funcional no permiten el paso del colorante, mientras que si está alterada el colorante penetra en el interior de la célula (Puelles, 2019).

Para realizar el procedimiento se toman 4 µl de la muestra con espermatozoides y se mezclan con 4 µl de solución de eosina al 0,5 % mezclando suavemente y permitiendo la tinción por dos minutos. Se realiza la observación en aumento de 40X en diferentes campos para observar espermatozoides con una coloración rojiza aquellos que hayan perdido la permeabilidad celular y se consideran muertos y por otra parte aquellos sin coloración indicando que conservan la permeabilidad y se consideran como vivos. Se cuentan al menos 100 espermatozoides en total, haciendo la diferencia entre vivos y muertos y de esta manera se determina el porcentaje de vitalidad (Ávalos *et al.*, 2018).

2.1.2.4. MORFOLOGÍA

La morfología está estrechamente relacionada con la motilidad espermática en forma más directa, y se mide en porcentaje de espermatozoides con defectos de morfología. Se necesita, al menos, un buen porcentaje de espermatozoides móviles y de ellos se espera que entre 70 a 80% posea morfología normal (Sánchez y Zamora, 2016).

La morfología se evalúa de la siguiente manera: se coloca una gota de aproximadamente 20 µl de semen diluido sobre un portaobjetos limpio y desengrasado y se coloca una gota de colorante, se realiza el frotis en forma firme y pareja. Luego de esperar, por lo menos 10 min, para el secado del frotis, se coloca en el microscopio y se procede a contar los espermatozoides. Se cuentan 200 espermatozoides por muestra para determinar el porcentaje de espermatozoides normales, el porcentaje de espermatozoides anómalos y de éstos cuales poseen atipias de tipos primarias y secundarias (Hidalgo *et al.*, 2005).

Atendiendo a una clasificación estrictamente morfológica, las anomalías que puedan generarse se clasifican en anomalías en la cabeza, en el tracto intermedio y en la cola. Según el órgano donde pueden haberse generado diferenciamos las anomalías primarias y secundarias (Gómez, 2014).

Benítez *et al.* (2018) afirman con el fin de descartar toros que no son aptos reproductivamente, se realizan análisis de muestras espermáticas, donde se puede hacer una revisión exhaustiva de los animales que continúan realizando su servicio o ser colectados para posteriores inseminaciones. De la misma manera, se realizan exámenes macroscópicos y fisiológicos al animal donde se valora la funcionalidad de los testículos, epidídimos y glándulas accesorias, por lo que siempre deben estar incluidas en las pruebas de evaluación espermática.

2.2. FISIOLÓGÍA DEL APARATO REPRODUCTOR DEL TORO

Cuando se utiliza la inseminación artificial, y se opta por solo adquirir semen, no tiene necesidad de trabajar con los toros, sin embargo, si se cuenta con ellos y se explotan, es muy útil tener un conocimiento general sobre la anatomía de los órganos genitales masculinos (A.B.S., 1986 citado por Pfister, 2007).

Desde el punto de vista embriológico, el aparato reproductor está en estrecha relación con el sistema urinario, considerado bajo una sola unidad con el título de sistema urogenital y está constituido por: testículos, epidídimo, conducto deferente, escroto, cordón espermático, conducto inguinal, glándulas sexuales accesorias, ampollas, vesículas seminales, glándula prostática, glándulas bulbouretrales conocidas como de Cooper, pene, prepucio y músculos de los genitales masculinos, este conjunto cuenta de un riego e inervación propios de los genitales masculinos (Frandsen y Spurgeon, 1995).

A diferencia de la vaca, algunos de los órganos genitales masculinos están colocados en el exterior de la cavidad corporal, y los acontecimientos fisiológicos de estos órganos reproductores, están controlados por un complicado sistema endocrino comandado por estructuras que se encuentran en la base del cerebro (Sisson y Grosman, 1982; Cruz *et al.*, 2003 citado por Pfister, 2007).

En los testículos, se lleva a cabo la espermatogénesis, así como la producción de la testosterona (Frandsen y Spurgeon, 1995).

Pfister (2007) indica que las células espermáticas maduran dentro del epidídimo, que es una estructura formada por conductos enroscados apretadamente y adheridos a los extremos y lados de los testículos. Un conducto mayor, llamado *vos deferens*, o conductos deferentes, conduce el semen del epidídimo a las proximidades del cuello de la vejiga, donde se expande vesículas seminales de aquí otro conducto se une a la uretra que, a través del pene, proporciona un paso comunal para la orina y el semen.

Los espermatozoides son descargados hacia la uretra, como parte del proceso llamado eyaculación. Y a medida que las células espermáticas entran en la uretra durante la eyaculación, hay varias glándulas accesorias que entran en acción (vesículas seminales, próstata, glándulas bulbouretrales) que producen un fluido para protección de los espermatozoides y ambos, el líquido seminal y los espermatozoides, constituyendo lo que se conoce como semen (Trejos, 2009).

Sin embargo, este fluido no es absolutamente necesario para la fecundación si el PH del conducto genital femenino no es demasiado ácido. En condiciones experimentales, los espermatozoides obtenidos del testículo o del epidídimo, mezclados con medios artificiales, pueden lograr la concepción (Gómez, 1997).

Se requieren unos 70 días desde que los espermatozoides comienzan a formarse en los testículos hasta que son finalmente eyaculados (Gil *et al.*, 2007).

2.3. CRITERIOS EN LA SELECCIÓN DEL SEMENTAL

La producción lechera del ganado bovino es producto de una compleja interacción entre la información Genética del animal y el medio de crianza. El control genético de la producción lechera está determinado por un gran número de genes (poligenes) que controlan todo el proceso en sus diferentes niveles. La capacidad de producción lechera, así como toda la herencia genética es transmitida de los padres a los hijos, cada padre aporta un 50%, de la configuración genética del hijo (Campos *et al.*, 2015).

Lo que significa que de padres poco productivos obtendremos hijos poco productivos, de padres excelentes productores obtendremos hijos excelentes y, lo más importante, de una madre poco productiva y de un padre excelente productor obtendremos hijos mejores (mejorados). Este es el objetivo real de la mejora genética, que cada generación sea mejor que la anterior, que los hijos sean mejores que los padres. En otras palabras, obtener ganancia genética en cada generación (Blanco, 2003).

2.4. DILUCIÓN, EMPAQUETADO, CONGELACIÓN Y ALMACENAMIENTO DEL SEMEN

2.4.1. LA DILUCIÓN

De acuerdo a Damas (2010) menciona que los diluyentes espermáticos son sustancias que tienen la capacidad de aumentar el volumen del eyaculado y generar un medio de sobrevivencia, estos protegen a los espermatozoides durante las fases de enfriamiento descongelación y congelación, también proporcionan una especie de tampón que protegen a la célula de cambios brusco de temperatura.

Los diluyentes se clasifican por ser de larga, media y corta duración, pero algunos autores mencionan que el tiempo de conservación es relativo debido a que existen factores que afectan directo a la capacidad de conservación del diluyente (Damas, 2010).

Por otra parte, Giraldo (2007) menciona que eyaculado diluido y envasado en pajillas de 0,50 ml, con concentración de 25×10^6 espermatozoides congelado con nitrógeno con una temperatura de entre $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un minuto y descongeladas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ en termo des congelador, por espacio de 15 segundos, para luego hacer las evaluaciones respectivas, es uno de los procedimientos comúnmente realizados y que el análisis de estos no interfiere con las características espermáticas.

Al lapso de 4 horas post dilución se puede evaluar características seminales propias de las células, donde se muestran los valores en porcentaje de motilidad, vitalidad y otras características de semen diluido, por dilutores y post-descongelamiento en comparación con los dilutores TRILACYL y C-Y, en ese

sentido el dilutor T-G-Y es la mejor opción para prevenir daños en los espermatozoides durante su proceso de criopreservación, lográndose mayores tasas de fertilidad al momento de realizar la inseminación artificial (Ramos *et al.*, 2017).

2.4.2. CONGELACIÓN

La actualización de nuevos métodos de implementación de semen congelado, ha sido uno de los factores que ha masificado el uso de ellos en protocolos de inseminación artificial, dado se puede aprovechar a los machos reproductores y conservar machos de alta calidad genética a través de la congelación de semen; sin embargo, las tasas de concepción al primer servicio son todavía relativamente bajas. El nivel de fecundación se ve relacionado con la capacidad que tiene la célula espermática de fertilizar (Cabrera y Pantoja, 2012).

De acuerdo a la investigación de Campos *et al.* (2015) para lograr un proceso de congelación de semen, se debe adecuar con rejillas o gavetas con agua a una temperatura aproximada de 20 °C y posterior a ello ser introducidos en un congelador a 5 °C por lapso de tiempo de 20 horas. En casos de no alcanzar la temperatura de congelación (5 °C), se recomienda implementar hielo o gel helada para lograr la temperatura adecuada.

Mediante vapores de nitrógeno líquido, se disminuye la temperatura, por un lapso de 7 minutos, donde el semen es introducido a un tanque hasta llegar a -196 °C en tanques de nitrógeno (tanques criogénicos), así lo realiza el Banco Nacional de Semen. Una vez que se vaya a utilizar las pajillas, estas son introducidas en agua con una temperatura de 36 °C, para su posterior descongelación por 22 segundos y luego son secadas con papel toalla (Cabrera y Pantoja, 2012).

Cabe mencionar que el manejo de las muestras o pajillas deben de ser regidas por un estricto nivel de salubridad, ya que la presencia de agentes contaminantes pueden alterar las células espermáticas influyendo en las características microscópicas (motilidad, vitalidad, aglutinación, entre otras).

2.4.3. EL SEMEN REFRIGERADO

Giraldo (2007) afirma que la investigación en el sector reproductivo bovino ha ejercido mucha demanda debido a los exitosos resultados que se han obtenido, la inseminación artificial (IA) es uno de ellos, llegando a convertirse en uno de los métodos biotecnológicos con mayor difusión entre las explotaciones ganaderas.

Esta posee una gran aceptación dentro del sector pecuario debido a al avance genético poblacional y un costo reducido. Sin embargo, uno de los limitantes de esta técnica biotecnológica es la calidad del material seminal dentro del programa de IA, donde debe incluirse el déficit de combate frente a retos sanitarios y la calidad biológica evaluada mediante parámetros como la motilidad y la morfología (Puelles, 2019).

Sin embargo, la baja eficiencia en la detección de celo debido al manejo extensivo que se le presta los hatos de cría, hace que la tasa de preñez por inseminación artificial sea afectada de forma negativa, obligando a productores y profesionales a buscar diferentes alternativas que mejoren los resultados reproductivos, investigaciones sobre la dinámica folicular han permitido que aparezcan nuevos protocolos de sincronización de celo y ovulación, sin embargo los resultados obtenidos en vacas *Bos Indicus* no son los mejores con respecto a vacas *Bos Taurus* (Komański *et al.*, 2015).

La Torre (2001) indica que la utilización de semen refrigerado en un programa de Inseminación Artificial a Tiempo Fijo (IATF), permite mejorar la tasa de preñez, debido al poco estrés sometido y a la larga viabilidad en el tracto reproductivo, que responde de manera satisfactoria a fallas en la sincronía del celo con la ovulación.

La tasa de preñez (TP) lograda en cada ciclo elegible es, en última instancia, quien determinará la distribución de los intervalos entre partos de todas las vacas del hato, la Tasa de Preñez nos indica qué porcentaje de las vacas elegibles que hay en cada ciclo, resultan gestantes durante dicho ciclo. Alto porcentaje de vacas ciclando. No más de 15% de vacas en anestro. Alta eficiencia en la detección de celos. Se busca como meta un 65% mínimo (Cavazos, 2014).

De esta forma, son necesarias más investigaciones en lo que se refiere al uso de semen refrigerado en la IATF, debiendo evaluarse diferentes tipos de diluyentes, a dosis inseminante ideal, así como el tiempo de refrigeración, para que los resultados proporcionen mayores tasas de preñez y así pudiendo demostrar que esta técnica puede ser una excelente opción, eficiente y práctica (Maqueda, 2018). La integridad de la membrana plasmática de las células espermáticas se ve relacionada con el estrés oxidativo de los espermatozoides, este último hace referencia al desgaste que sufre la integridad de todos sus compuestos estructurales y fisiológicos (INITRA, 2014).

La pérdida de las funciones de los espermatozoides, las capacidades fecundantes por la aparición de muchas cantidades de oxígeno podrían afectar estas membranas ocasionando daños como hinchamiento y disrupción de las mismas, cambios en la fluidez, alteración del flujo de calcio y cambios en la actividad enzimática (Cabrera y Pantoja, 2012). La IA depende de múltiples factores, uno de los principales es la calidad seminal, utilizada para estimar la capacidad fecundante (INITRA, 2014).

Ibáñez *et al.* (2016) afirman que se refrigeraron las muestras a 5 °C hasta su uso al día siguiente (12-15 horas de conservación). Los vientres fueron sincronizados con dispositivos intravaginales a base de progesterona. El diagnóstico de gestación se realizó mediante ultrasonografía entre días post IATF. En este trabajo, el porcentaje de preñez obtenido utilizando semen fresco (66,10%) fue mayor que el logrado con el semen congelado/descongelado (55,20%).

La revisión de literatura abordada permitirá tener una visión de manera general y particular con respecto a los diluyentes y tiempos de permanencia y el comportamiento de las células espermáticas en la integridad estructural y funcional de la membrana plasmática y acrosomal.

2.5. EVALUACIÓN Y ALTERACIÓN QUE AFECTAN LA MORFOLOGÍA DEL ACROSOMA

El acrosoma es una vesícula secretora derivada del aparato de Golgi, tiene enzimas proteolíticas como son la acrosina y hialuronidasa están resguardadas por la membrana acrosomal y son las responsables de la digestión de cúmulos

Oophurus y zona pelúcida del Ovocito, esta se encuentra en la cabeza del espermatozoide como un capuchón. La presencia de alteraciones del acrosoma depende del estado de fertilidad que se encuentra el animal, esto hace que la revisión del acrosoma sea más relevante al momento de la evaluación (Intriago y Vargas, 2019).

El daño del acrosoma está relacionado al proceso de fecundación y al proceso de envejecimiento de la célula espermática, cabe recalcar que también se producen dichos daños por el choque térmico donde se expone el material seminal para las distintas evaluaciones (Intriago y Vargas, 2019).

Para la evaluación del acrosoma se considera algunos grupos de alteraciones que pueden influir en el rendimiento de los espermatozoides entre estos 13 tenemos: NAR (Normal Apical Ridge), DAR (Damaged Apical Ridge), MAR (Missing Apical Ridge) Y LAC (Loose Apical Cap). Este criterio de evaluación fue descrito por Osorio *et al.* (2007), siendo el Borde Apical Normal (NAR) que se caracteriza por tener el acrosoma intacto, Borde Apical Dañado (DAR) que presenta un desprendimiento en la parte posterior del borde apical y dejándolo ver como un acrosoma irregular.

Las técnicas que se deben emplear para evaluar la integridad del acrosoma según Gómez (2014) deben de ser exactas y confiables, donde para su valoración deben de ser evaluadas un pequeño número de células donde sean aptas de facilitar la diferenciación entre cada una de las anormalidades que existen. Para realizar esta técnica se maneja un microscopio de contraste 100X con una solución fijadora de glutaraldehído al 2%.

CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO

3.1. UBICACIÓN

La siguiente investigación se realizó en la Hacienda “El Dorado” ubicada en el Cantón El Carmen, Provincia de Manabí en el sitio Agua Sucia, situado geográficamente entre las coordenadas 79° 28’ 45” latitud sur; 99° 98’ 71” longitud oeste y una altitud de 167 msnm.

3.2. CONDICIONES CLIMÁTICAS

Las características climáticas en el sitio Agua Sucia ubicada en el Cantón El Carmen de la Provincia de Manabí son:

Cuadro 3.1. Condiciones climáticas promedios de los últimos cinco años.

Variables	Valor
Precipitación media anual	996,7 mm
Temperatura media anual	25,8 ° C
Humedad relativa anual	82,1 %
Heliofanía	92,7 horas al año
Evaporación media anual	1353.4 mm

Fuente: Weather Spark, (2020).

3.3. DURACIÓN

La presente investigación tuvo una duración de seis meses, con la siguiente distribución: a nivel de campo tres meses y se emplearon tres meses para la tabulación, ordenamiento y preparación del material investigativo.

3.4. FACTORES EN ESTUDIO

Toros (3) de raza Gyropar de 36 meses de edad

Diluyentes (Andromed® y Optixcell®)

3.5. TRATAMIENTOS

Para la evaluación del efecto de los toros utilizados y diluyentes con los tiempos de permanencia (0, 12 y 24 horas), en estos últimos, para conocer la viabilidad

espermática del semen, se realizó de acuerdo con los siguientes tratamientos, donde se obtuvo la siguiente distribución:

Cuadro 3.2. Tratamientos

TRATAMIENTOS	Factor A (Toros)	Factor B (Diluyentes)
T1	Toro 1 de raza Gyropar de 36 meses	Optixcell®
T2	Toro 1 de raza Gyropar de 36 meses	Andromed®
T3	Toro 2 de raza Gyropar de 36 meses	Optixcell®
T4	Toro 2 de raza Gyropar de 36 meses	Andromed®
T5	Toro 3 de raza Gyropar de 36 meses	Optixcell®
T6	Toro 3 de raza Gyropar de 36 meses	Andromed®

3.6. DISEÑO EXPERIMENTAL

El experimento se organizó a través de un Diseño Completamente al Azar con arreglo de tratamientos factorial 3 x 2. Siendo el Factor A los toros (Tres toros de raza Gyropar de 36 meses de edad y promedio de peso vivo de 370 kg) y el Factor B los diluyentes (Andromed® y Optixcell®), generando seis tratamientos, repetidos cuatro veces. Siendo el siguiente modelo estadístico utilizado:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ji} + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = Representa la ij –ésima observación en el i-ésimo nivel del factor A y j-ésimo nivel del factor B

μ = Media general

α_i = Efecto del i-ésimo nivel del factor A (Toros); $i=1, 2$ y 3

β_j = Efecto del j-ésimo nivel del factor B (diluyentes); $j = 1$ y 2

$\alpha\beta_{ij}$ = Efecto de la interacción del i-ésimo nivel del factor A con el j-ésimo nivel del factor B

ε_{ij} = Error Experimental

3.7. ADEVA

Cuadro 3.3. Esquema de ADEVA

Fuente de Variación	Grados de Libertad
Tratamientos	5
Factor A (Toros)	2
Factor B (Diluyentes)	1
Interacción A x B (Toros x Diluyente)	2
Error Experimental	12
Total	17

3.8. UNIDAD EXPERIMENTAL

Se consideró como unidad experimental a cada toro, lo que totalizó 3 unidades observacionales.

3.9. VARIABLES A MEDIR

3.9.1. VARIABLES INDEPENDIENTES

Toros (Tres toros Gyropar de 36 meses de edad)

Diluyentes (Andromed®, Optixcell®)

3.9.2. VARIABLES DEPENDIENTES

Motilidad (%)

Normalidad (%)

Vitalidad (%)

Borde Apical Normal (NAR)

Borde Apical Dañado (DAR)

Gota Citoplasmática (GCs)

3.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La variabilidad de las observaciones en las distintas variables de la investigación se estudiaron a través del análisis de varianza. Previamente se comprobaron los supuestos de homogeneidad de varianza (Test de F) y normalidad de los errores

(Prueba de Shapiro-Wilks). Las variables que no cumplieron con los supuestos antes mencionados, fueron analizadas por la vía no-paramétrica (Kruskal Wallis).

De existir diferencias a nivel de los factores o la interacción se realizará comparaciones de medias de rango múltiples, por medio de la técnica de Tukey al 5%.

Al mismo tiempo, se procedió al análisis descriptivo de las variables: medidas de tendencia central (media) y dispersión (error estándar de la media, coeficiente de variación, valores máximos y mínimos).

Los análisis mencionados anteriormente, se realizaron a través de un software estadístico (InfoStat 2019). Los resultados obtenidos fueron tabulados o graficados de acuerdo al interés de la interpretación que pueda generar y que permita dar cumplimiento a los objetivos trazados.

3.11. PROCEDIMIENTO

3.11.1. SELECCIÓN DE TOROS

Se seleccionaron tres reproductores pertenecientes a la hacienda El Dorado, los cuales cumplían con todos los planes de vacunación y desparasitación que se realizan en dicha ganadería.

Estos reproductores fueron seleccionados de un lote de ocho toros de raza Gyropar (Gyr x Pardo suizo) cuya edad oscilaba entre los 36 meses según los registros del hato, los cuales fueron pesados y medida su circunferencia escrotal; para la selección se les peso y medio la circunferencia escrotal de los que se eligieron los tres mejores del lote, con un peso promedio de 370 kg y una circunferencia escrotal de 38 cm.

3.11.2. COLECTA DE SEMEN

Se recolectaron un total de 12 eyaculados (4 por toro), las cuales se realizaron una vez por semana, mediante el uso de electro eyaculador. El semen se colectó en un tubo cónico de marca Falcón ® con un volumen promedio de 8 cc por animal.

3.11.3. DILUCIÓN DEL SEMEN

Se extrajo una gota de semen con una micro pipeta la cual se ubicó en la cámara de Neubauer y se observó en microscopio con lente de 40x, luego se contabilizaron las células que se encontraban dentro de los cuadros medianos, una vez contado el número de células dentro del cuadro nuestra concentración será de: número de células contabilizadas x 10⁴.

Luego se realizó una de dilución de 1x1, es decir volumen total de eyaculado será igual al del diluyente el cual fue previamente estabilizado en baño María a 34°C.

3.11.4. ENVASADO Y ALMACENAMIENTO DEL SEMEN DILUIDO

Se procedió al llenado de las pajillas de inseminación, en las cuales se colocaron aproximadamente 50 mm de semen diluido por pajilla y se rotulo.

Una vez envasadas las dosis seminales, se almacenaron en la nevera a temperaturas entre 4°C a 5°C.

3.11.5. EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS A MEDIR DEL SEMEN

Las características físicas medidas en las células espermáticas fueron evaluadas a los seis tratamientos cada 0, 12 y 24 horas, se observaron mediante un microscopio de laboratorio, donde se depositó con una micropipeta una gota de muestra seminal sobre un portaobjetos temperado a 37°C, aplicando otra gota de aceite de inmersión y se colocó un cubreobjetos, donde fueron observados con todos los lentes y se obtuvo una mayor apreciación en el lente de 40X.

3.11.5.1. VITALIDAD ESPERMÁTICA

Se determinó la vitalidad, es decir, espermatozoides inmóviles dentro de la muestra. Donde se aplicó dilución de Eosina –Nigrosina posterior a esto se realizó un frotis, una vez seco se llevaba al microscopio; las células que se teñían de color negro, eran los espermatozoides muertos y con anomalías de cola y cabeza. Para obtener el porcentaje se contaban 100 células dispersas en la placa y se utilizaba la siguiente fórmula:

$$\text{Vitalidad} = \text{Espermatozoides Vivos} * N^{\circ} \text{ Celulas contadas (100)}$$

3.11.5.2. MOTILIDAD Y VIABILIDAD DE ESPERMATOZOIDES

Con una micropipeta se tomó una gota de la muestra seminal, se depositó en el portaobjetos y se colocó el cubreobjetos y se llevó a observación al microscopio. Para la característica de motilidad se observaron los movimientos ondulatorios en la masa de la muestra, mientras que para la viabilidad se observaron los movimientos rectilíneos; esto fue expresado en porcentajes. Cabe recalcar que esta característica fue medida por método subjetivo.

3.11.6. EVALUACIÓN MORFOLÓGICA

Para la evaluación de las placas seminales, anteriormente hechas mediante un frotis, se la realizó ubicando una gota de aceite de inmersión en cada una de las placas, donde se evaluó las diferentes anormalidades presentes en los espermatozoides, siendo estas: Borde Apical Normal (NAR), cuando la membrana celular es impermeable para la tinción; Borde Apical Dañado (DAR), donde la membrana celular es permeable para la tinción y Gotas Citoplasmáticas (GCs), se presentan a proximal, medial y distal de la célula.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. DETERMINACIÓN DE LA MOTILIDAD, NORMALIDAD Y VITALIDAD DE LOS DILUYENTES (ANDROMED® Y OPTICELL®) DE SEMEN FRESCO Y REFRIGERADO

Como se puede observar en el cuadro 4.1 existe diferencia estadística ($p < 0,05$) a la hora 0, donde se encontró un mayor promedio en el T1 ($91,25 \pm 2,50$) y en el T6 ($80,00 \pm 4,08$) una menor motilidad; mientras que a las 12 y 24 horas, no se encontró diferencia estadística ($p > 0,05$); siendo un mayor promedio a las 12 horas en el T1 con ($88,67 \pm 5,35$) al igual que a las 24 horas con ($83,50 \pm 2,38$). El mayor promedio obtenido de motilidad podría atribuirse posiblemente a que el semen utilizado a la hora cero fue fresco y sin dilución, lo cual permite observar sus características innatas una vez obtenidos posterior a la colecta.

Cuadro 4.1. Promedios y error estándar de la motilidad (%) de semen fresco y refrigerado de bovinos mestizos.

Tratamientos		% Motilidad		
Factor A (Toros)	Factor B (Diluyente)	0 Horas	12 Horas	24 Horas
Toro 1 de raza Gyropar	Optixcell®	91,25 ($\pm 2,50$) b	88,67 ($\pm 5,35$)	83,50 ($\pm 2,38$)
	Andromed®	83,75 ($\pm 2,50$) a	85,83 ($\pm 7,02$)	76,25 ($\pm 2,50$)
Toro 2 de raza Gyropar	Optixcell®	87,50 ($\pm 6,45$) a b	83,75 ($\pm 6,08$)	78,75 ($\pm 4,79$)
	Andromed®	81,25 ($\pm 2,50$) a	82,92 ($\pm 6,89$)	76,25 ($\pm 2,50$)
Toro 3 de raza Gyropar	Optixcell®	86,25 ($\pm 2,50$) a b	86,67 ($\pm 6,51$)	80,00 ($\pm 4,08$)
	Andromed®	80,00 ($\pm 4,08$) a	80,00 ($\pm 7,39$)	73,75 ($\pm 4,79$)
P-valor		0,0166	0,0580	0,0565

^{a, b} Letras distintas en las filas difieren estadísticamente al 5% (Tukey)

T1: Toro 1 con diluyente Optixcell®; **T2:** Toro 1 diluyente Andromed®; **T3:** Toro 2 con diluyente Optixcell®; **T4:** Toro 2 con diluyente Andromed®; **T5:** Toro 3 con diluyente Optixcell®; **T6:** Toro 3 con diluyente Andromed®; **P-valor:** Valor de probabilidad.

Estos resultados son similares a los obtenidos Anchatuña (2017) quien afirma, que en las características espermáticas de semen bovino la motilidad en pre-congelación de estos oscila entre 80% y 70%; mientras que en post-congelación después de 12 a 24 horas se encuentra en rangos de entre 75% a 60%.

Por otra parte, Filipiak *et al.* (2017) reportan que en su investigación del comportamiento del semen bovino sexado congelado se encuentra cercano al

80% y descongelado en 65%, además expresan que la concentración juega un papel importante, debido a que mientras más elevada sea esta, se observa un mayor porcentaje de motilidad.

Valverde (2016) reporta en su estudio del efecto de dos temperaturas de almacenamientos (5 y 20°C) de epidídimos de toros provenientes de matadero sobre la calidad y congelabilidad de espermatozoides encontró diferencia significativa ($p < 0,05$) entre tratamientos, donde en semen a 5°C obtuvo promedio de $84,20 \pm 1,54$, mientras que a 20°C obtenían un promedio de $67,50 \pm 7,04$, estos resultados podrían verse atribuidos al manejo de las muestras.

Con respecto a la variable normalidad, se puede observar en el cuadro 4.2 que en a las 0 y 12 horas no existe diferencia estadística ($p > 0,05$) entre los tratamientos, donde se obtuvo un mayor promedio a las 0 horas en el T1 con ($82,50 \pm 6,57$) al igual que a las 12 horas con ($81,25 \pm 4,79$). Por otra parte, a las 24 horas se encontró diferencia estadística ($p < 0,05$) entre tratamientos, donde se encontró un mayor promedio en el T1 ($77,50 \pm 2,89$) y en el T6 ($68,75 \pm 2,50$) una menor normalidad. Estos resultados podrían verse relacionados al manejo de las muestras seminales y técnicas de colecta de semen.

Cuadro 4.2. Promedios y error estándar de la normalidad (%) de semen fresco y refrigerado de bovinos mestizos.

TRATAMIENTOS		% Normalidad			
Factor A (Toros)	Factor B (Diluyente)	0 Horas	12 Horas	24 Horas	
Gyropar	Optixcell®	82,50 ($\pm 6,57$)	81,25 ($\pm 4,79$)	77,50 ($\pm 2,89$)	b
	Andromed®	78,33 ($\pm 6,85$)	77,50 ($\pm 2,89$)	72,50 ($\pm 2,89$)	a b
Gyropar	Optixcell®	80,42 ($\pm 75,83$)	78,75 ($\pm 4,79$)	73,75 ($\pm 2,50$)	a b
	Andromed®	75,83 ($\pm 6,34$)	75,00 ($\pm 4,08$)	71,25 ($\pm 2,50$)	a
Gyropar	Optixcell®	76,67 ($\pm 6,85$)	75,00 ($\pm 5,77$)	72,50 ($\pm 5,00$)	a b
	Andromed®	75,00 ($\pm 6,03$)	72,50 ($\pm 2,89$)	68,75 ($\pm 2,50$)	a
P-valor		0,0805	0,1583	0,0467	

^{a, b} Letras distintas en las filas difieren estadísticamente al 5% (Tukey)

T1: Toro 1 con diluyente Optixcell®; **T2:** Toro 1 con diluyente Andromed®; **T3:** Toro 2 con diluyente Optixcell®; **T4:** Toro 2 con diluyente Andromed®; **T5:** Toro 3 con diluyente Optixcell®; **T6:** Toro 3 con diluyente Andromed®; **P-valor:** Valor de probabilidad.

Estos resultados concuerdan con los encontrados por Aguilar (2016) quien en el estudio de la determinación de la fertilidad potencial de toros reproductores *Bos Taurus* mediante la evaluación de parámetros reproductivos encontraron no hubo presencia de diferencia significativa ($p>0,05$) entre tratamientos, además afirma que el porcentaje de normalidad oscila entre 88% al 93%.

Por otra parte, Anchatuña (2017) reporta en estudios realizados sobre el efecto de distintos tiempos de equilibrio sobre la calidad espermática pre y post-congelación de semen bovino de toros reproductores Holstein-Friesian a las 12 horas la calidad del semen bovino en pre-congelación tiene una normalidad promedio de $85,26 \pm 2,57$, mientras que a las 24 horas registra un promedio de $85,52 \pm 2,91$, además menciona que los cambios que sufren las células espermáticas se deben posiblemente al estrés causado por el cambio de temperatura, lo cual ocasionaría un porcentaje bajo de fertilidad.

Galarza (2013) en investigación realizada encontró que la eficacia de dos diluyentes AndroMed® y Triladyl®, en la crioconservación de semen de toro de la raza Jersey no hubo diferencia significativa ($p>0,05$) entre tratamientos, a pesar de esto se obtuvo una mayor normalidad con el diluyente Triladyl® un promedio de 89,81%, mientras que con el AndroMed® se obtuvo un 89,52% en el proceso de descongelación, atribuido posiblemente al manejo de las muestras seminales y técnicas de colecta de semen.

En el cuadro 4.3 se observa que existe diferencia significativa ($p<0,05$) entre tratamientos a la hora 0, donde se encontró un mayor promedio en el T1 ($97,00 \pm 0,82$) y en el T6 ($91,50 \pm 2,38$) en la variable vitalidad; mientras que a las 12 y 24 horas, no se encontró diferencia estadística ($p>0,05$) entre tratamientos estudiados; donde se obtuvo un mayor promedio a las 12 horas en el T1 con ($93,00 \pm 2,45$), mientras que a las 24 horas se destacó el T3 con ($90,00 \pm 3,56$) respectivamente.

Estos resultados podrían verse atribuidos al manejo de las muestras seminales causado posible estrés por el cambio de temperatura, lo cual ocasionaría un porcentaje bajo de fertilidad.

Cuadro 4.3. Promedios y error estándar de la vitalidad (%) de semen fresco y refrigerado de bovinos mestizos.

TRATAMIENTOS		% Vitalidad			
Factor A (Toros)	Factor B (Diluyente)	0 Horas		12 Horas	24 Horas
Gyropar	Optixcell®	97,00 (± 0,82)	b	93,00 (± 2,45)	85,00 (± 4,24)
	Andromed®	94,50 (± 2,08)	a b	88,50 (± 3,11)	83,25 (± 4,43)
Gyropar	Optixcell®	91,75 (± 2,06)	a	87,50 (± 2,89)	90,00 (± 3,56)
	Andromed®	93,50 (± 2,38)	a	89,75 (± 2,06)	82,25 (± 3,30)
Gyropar	Optixcell®	95,00 (± 3,46)	a b	89,50 (± 3,42)	89,25 (± 2,22)
	Andromed®	91,50 (± 2,38)	a	88,75 (± 1,71)	86,75 (± 3,40)
P-valor		0,0344		0,1884	0,0632

^{a, b} Letras distintas en las filas difieren estadísticamente al 5% (Tukey)

T1: Toro 1 de Gyropar con diluyente Optixcell®; **T2:** Toro 1 de con diluyente Andromed®; **T3:** Toro 2 con diluyente Optixcell®; **T4:** Toro 2 con diluyente Andromed®; **T5:** Toro 3 con diluyente Optixcell®; **T6:** Toro 3 de raza

Estos resultados parecidos a los obtenidos por Rubio *et al.* (2009) quienes reportan que en su estudio del efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides de toros, se encontró diferencia estadística ($p < 0,01$), donde en semen fresco se obtuvieron rangos de 91% a 94% con una media de $(92,95 \pm 0,59)$ en la variable vitalidad, mientras que en estado de refrigeración se obtuvo una vitalidad de entre 64% a 80% con una media de $(72,80 \pm 3,81)$.

Así mismo Cabrera y Pantoja (2012) en su investigación de viabilidad espermática e integridad del acrosoma en semen congelado de toros nacionales encontró que, en estudios realizados a los eyaculados de cuatro toros, encontraron que la vitalidad en estos oscila de $81,80 \pm 5,00$ hasta $74,10 \pm 7,60$. El mismo autor mencionado afirma que estas características se encuentran dentro de los parámetros establecidos para toros en actividad reproductiva.

4.2. VALORACIÓN DE LA INTEGRIDAD ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA Y ACROSOMAL DEL SEMEN BOVINO FRESCO

En el cuadro 4.4 se observa que no existe diferencia estadística en los parámetros de Borde Apical Normal (NAR), Borde Apical Dañado (DAR) y Gota Citoplasmática (GCs), hubo una mayor normalidad la variable NAR en el T3 ($94,00 \pm 2,58$); mientras que en el DAR se destacó el T4 ($8,75 \pm 2,99$); por último, se encontró una mayor incidencia de GCs en el T6 con ($12,75 \pm 4,43$).

Estos resultados se podrían atribuir a que la célula espermática no alcanzó un estado de maduración por lo cual se generó dichas anomalías, además, también influyen tanto la alimentación y el manejo animal.

Cuadro 4.4. Promedios y error estándar de NAR, DAR Y GCs (%) de semen fresco.

TRATAMIENTOS		INTEGRIDAD ESTRUCTURAL DE LA MEMBRANA		
Factor A (Toros)	Factor B (Diluyente)	NAR	DAR	GCs
Gyropar	Optixcell®	92,00 ($\pm 2,45$)	3,75 ($\pm 2,06$)	5,50 ($\pm 4,80$)
	Andromed®	90,50 ($\pm 1,73$)	8,00 ($\pm 6,06$)	9,25 ($\pm 3,20$)
Gyropar	Optixcell®	94,00 ($\pm 2,58$)	4,25 ($\pm 2,87$)	8,00 ($\pm 4,24$)
	Andromed®	90,75 ($\pm 2,99$)	8,75 ($\pm 2,99$)	10,25 ($\pm 3,30$)
Gyropar	Optixcell®	93,25 ($\pm 3,20$)	4,75 ($\pm 2,99$)	11,25 ($\pm 4,03$)
	Andromed®	92,00 ($\pm 1,83$)	7,25 ($\pm 3,10$)	12,75 ($\pm 4,43$)
P-valor		0,2410	0,1867	0,3816

T1: Toro 1 con diluyente Optixcell®; **T2:** Toro 1 con diluyente Andromed®; **T3:** Toro 2 con diluyente Optixcell®; **T4:** Toro 2 con diluyente Andromed®; **T5:** Toro 3 con diluyente Optixcell®; **T6:** Toro 3 con diluyente Andromed®; **P-valor:** Valor de probabilidad.

Los promedios obtenidos por Moncayo (2016) son cercanos a los encontrados en esta investigación, donde afirma que los espermatozoides de bovinos de raza Holstein tuvieron una buena respuesta, donde aproximadamente un 90% de las células espermáticas tuvieron un mayor porcentaje de integridad acrosomal (Borde Apical Normal), de la misma manera, en toros de raza Brown Swiss se encontró un porcentaje de NAR de 80%.

Rubio *et al.* (2009) reportan que en el estudio del efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides de toros, se encontró diferencia estadística entre tratamientos ($p < 0,05$) en la variable NAR, donde en semen fresco se obtuvieron rangos de 87% a 90% con una media de $(88,75 \pm 0,81)$, mientras que en estado de refrigeración se obtuvo un porcentaje de borde apical normal de entre 48% a 58% con una media de $(52,20 \pm 3,91)$.

Rubio y Quintero (2008) obtuvieron resultados ligeramente cercanos a los encontrados en esta investigación en su estudio del uso de pruebas de resistencia osmótica para valorar la funcionalidad espermática en toros, donde afirman que los valores de NAR se encontraron entre rangos de 86,40% y 91,90% respectivamente.

Por otra parte, en la variable DAR, estudios realizados por Rubio *et al.* (2009) reporta que los resultados obtenidos para el borde apical dañado se encontró diferencia estadística ($p < 0,05$), donde en semen fresco se obtuvieron rangos de 9% a 11% con una media de $(10,00 \pm 0,81)$; mientras que en estado de refrigeración se obtuvo un porcentaje de borde apical dañado de entre 29% a 41% con una media de $(35,25 \pm 2,87)$.

Cabrera (2012) en la investigación de la viabilidad espermática e integridad del acrosoma en semen congelado de toros nacionales, no obtuvo diferencia estadística ($p > 0,05$) entre tratamientos, sin embargo, los daños a nivel de acrosoma se encontraron en un promedio de 34,50%. Además, afirma que la capacidad fecundante y la actividad funcional de la membrana plasmática se encuentra afectada por los cambios metabólicos que ocurren a su alrededor.

Espinosa (2012) afirma que la presencia de DAR, se debe a los procesos de congelación de esperma, y aduce que tiene una mayor incidencia que otros factores como el manejo, además menciona que en especies ovinas el a nivel del acrosoma celular es mayor que en especies bovinas, lo que causa una disminución de la motilidad espermática en semen crioconservado.

Con respecto a la variable gota citoplasmática los resultados encontrados son ligeramente cercanos a obtenidos por Tamayo (2013) quien en su estudio de la

selección de sementales bovinos en Cuba en futuros sementales Holstein afirma que la presencia de GCs se encuentra en un promedio de $11,00 \pm 5,10$ en épocas lluviosas, mientras que en épocas seca se obtuvieron promedios de $10,20 \pm 4,10$, lo que podría indicar una posible alteración al momento de la manipulación del material espermático.

Restrepo *et al.* (2016) reportan, que en la presencia de gotas citoplasmática es una de los problemas en machos reproductores que se ve afectada por la edad de los reproductores, mientras que en bovinos jóvenes generalmente se encuentran en la pieza media, como gotas citoplasmáticas proximales, pieza intermedia reflejada distalmente y pieza intermedia inclinada.

Quintero (2017) afirma que en evaluaciones a espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo realizados obtuvo que entre el 31,50% a 89,30% de anormales por la presencia de gota citoplasmática, lo que produjo la reducción de la motilidad de las células espermáticas.

Estos resultados permiten ver el efecto de los diluyentes en distintas horas de permanencia y con esto ver los cambios en los parámetros microscópico de las células espermáticas y morfológicas, donde destaca la hora 0 siendo esta en donde el semen tuvo mayores porcentajes en los valores evaluados.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

La implementación Andromed® y Optixcell® como diluyentes de semen bovino fresco y refrigerado no desfavoreció las variables motilidad, normalidad y vitalidad, donde a pesar de tener diferencia estadística tuvieron resultados óptimos según los datos reportados en la literatura revisada para ser implementados en inseminación artificial.

El efecto de los diluyentes comerciales (Andromed® y Optixcell®) en semen bovino fresco y refrigerado no tiene efectos negativos sobre los parámetros de calidad morfológicos e integridad estructural y funcional de la membrana plasmática y acrosomal, lo que permite su implementación en la inseminación artificial, sin anomalías en los rangos obtenidos.

5.2. RECOMENDACIONES

Profundizar en los estudios en diversas direcciones como el uso de diluyentes en diferentes condiciones climáticas (épocas lluviosas y secas), razas y edades bovinas para mejorar parámetros de calidad morfológicos e integridad estructural y funcional de la membrana plasmática y acrosomal del semen.

Realizar más investigaciones sobre el uso de distintos diluyentes, en los sistemas de reproducción bovina con el objetivo de cuantificar la fertilidad y la fecundidad, para de esta manera validar los resultados productivos y reproductivos.

BIBLIOGRAFÍA

- Agropecuaria Laurentina. 2009. Alternativa para mejorar la fertilidad en programas de inseminación artificial a tiempo fijo. (En línea). CO. Consultado 20 de mayo del 2019. Formato HTML Disponible en <http://agropecuariaLaurentina.com/>
- Agüero, G. 2012. Evaluación de las características seminales de sementales bovinos mediante CASA. Tesis Postgrado en Reproducción Animal y Tecnología de la Inseminación Artificial. Universidad Central de Venezuela Facultad de Ciencias Veterinarias, Instituto de Reproducción Animal. Caracas. VZ.
- Aguilar, G. 2016. Determinación de la fertilidad potencial de toros reproductores *Bos Taurus* en la hacienda "El Rosario" mediante la evaluación de parámetros reproductivos. (En línea). Quito, EC. Consultado, 16 de feb. 2020. Formato PDF. Disponible: <http://dspace.udla.edu.ec/>
- Almela, L. 2014. Aportaciones a la Crioconservación de Gametos Masculinos en la Raza Bovina Murciano Levantina. Murcia, ES. Tesis Doctoral. Recongelación de Espermatozoides. Universidad de Murcia. Facultad de Veterinaria.
- Anchatuña, C. 2017. Efecto de distintos tiempos de equilibrio sobre la calidad espermática pre y post-congelación de semen bovino de toros reproductores Holstein-Friesian. (En línea). Quito, EC. Consultado, 16 de feb. 2020. Formato PDF. Disponible: <http://www.dspace.uce.edu.ec/>
- Ariagno, J. y Mormandi, E. 2015. Guía práctica para la evaluación del semen. Buenos Aires, AR. Laboratorio de Fertilidad Masculina, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, p. 29-35.
- Ávalos, A., González, J., Vargas, A. y Herrera, J. 2018. Recolección y manipulación seminal in vitro. México, MX. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. México. p. 7-51.
- Benítez, E., Chamba, H., Sánchez, E., Luzón, F., Sanchez, J. 2018. Evaluación comparativa de dos métodos de recuperación espermática de epidídimos bovinos post-mortem. Mexico, MX. Abanico Vet. 8 (1).
- Blanco, N. 2003. Fisiología productiva y selección del ganado bovino lechero. Instituto de investigación para la producción animal República de Eslovaquia. Revista Mundo Ganadero Año 14, N.- 160, 2003, p. 50 – 53.
- Cabrera, P. y Pantoja, C. 2012. Viabilidad espermática e integridad del acrosoma en semen congelado de toros nacionales. Lima, PE. Rev. Investig. Vet. Perú. 23 (2).

- Campero M. 2002. Pérdidas ocasionadas por las enfermedades venéreas de los bovinos. Rev. Idia, Bs. As., 21(2):1-5. Patología Veterinaria INTA E.E.A Balcarce. P1.
- Campos, R., Garcia, K., Velez, M., Hernandez, E., Molina, R., Sanchez, H., Duran, C., Giraldo, L. 2015. El mejoramiento genético y la producción de leche. La esencia de una realidad de producción animal. CO. Acta Agron. 64 (3): 296-306.
- Cavazos, F. 2014. Producción eficiente de preñeces en hatos lecheros. 12º Congreso Internacional de MVZ especialistas en Bovinos de la Comarca Lagunera. (En línea). MX. Formato Pdf. Consultado 16 de agosto 2018. Disponible en: <http://www.produccion-animal.com.ar/>
- Curbelo, M. y Rodríguez, Z. 2013. Relevamiento de laboratorios de procesamiento de semen bovino en Uruguay. Montevideo, UR. Tesis de grado en Ciencias Veterinarias Orientación: Medicina Veterinaria y Producción Animal. Universidad de la República.
- Damas, R. 2010. Evaluación de dos dilutores comerciales en Semen congelado de toros en el Banco Nacional. Huancayo. PE. Tesis de grado. Facultad de Zootecnia. Universidad Nacional del Centro del Perú.
- Espinosa, W. 2012. Efecto de la adición de un surfactante natural (aloe vera) al diluyente Triladyl® para crioconservación de semen bovino en toros reproductores de Agso-Genes, Quito-Pichincha. (En línea). Quito, EC. Consultado, 16 de feb. 2020. Formato PDF. Disponible: <http://repositorio.utc.edu.ec/>
- FAO (Organización para la Alimentación y la Agricultura). 2011. Una introducción a los conceptos básicos de la seguridad alimentaria. (En línea). Formato Pdf. Consultado, 6 de abr 2019. Disponible en: <http://www.fao.org/>
- Filipiak, Y., Larocca, C., Martinez, M. 2017. Comportamiento del Semen Bovino Sexado Congelado-Descongelado en Fertilización *in vitro* (FIV) Capacitado Mediante BO en dos Concentraciones versus Percoll. Temuco, CL. Int. J. Morphol. 35 (4).
- Frandsen, R. D. y Spurgeon, T. L. 1995. Anatomía y Fisiología de los Animales Domésticos. (5ª ed.) Ed. McGraw-Hill Interamericana Editores S.A. de C.V. División de McGraw-Hill, Inc. © México, D.F. p. 386-430, 432-436.
- Galarza, D. 2013. Eficacia de dos diluyentes: tris + lectina de soya (AndroMed) y tris + yema de huevo (Triladyl), en la crioconservación de semen de toro de la raza Jersey en Cuenca - Ecuador. (En línea). Cuenca, EC. Consultado, 16 de feb. 2020. Formato PDF. Disponible: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/>
- Gil, A., Cardona, W., Cadavid, A. 2007. Muerte embrionaria temprana: ¿Tiene influencia el factor masculino?. ES. Arch. Esp. Urol. 60 (9).

- Giraldo, J. 2007. Una mirada al uso de la inseminación artificial en bovinos. Antioquia, CO. Revista Lasallista de Investigación. 4 (1): 51-57.
- Gómez, G. 2014. Efecto de las gotas citoplasmáticas sobre la capacidad fecundante del espermatozoide en el cerdo. (En línea). CO. Consultado, 16 de feb. 2020. Disponible en: <https://doctoradoagrarias.files.wordpress.com/>
- Gómez, O. 1997. GIFT. Procedimientos y valoraciones éticas. (En línea). Torreón, MX. Consultado, 16 de feb. 2020. Formato PDF. Disponible: <https://www.unav.edu/>
- Guataquira, L. 2019. Evaluación *in vitro* del semen bovino. (En línea). CO. Consultado, 16 de feb. 2020. Formato PDF. Disponible: <https://repository.ucc.edu.co/>
- Hidalgo, O., Tamargo, M. y Díez, C. 2005. Análisis del semen bovino: Revista Tecnología Agroalimentaria. 2ed. p. 39-43.
- Ibañez, F., Lisarrague, C., Callejas S., Cabodevila J. (2016). Inseminación Artificial a Tiempo Fijo: ¿Conviene utilizar semen “fresco” en lugar de congelado?. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Veterinarias; Argentina. (En línea). Formato Pdf. Consultado, 04 de mayo del 2019. Disponible en: <http://www.ridaa.unicen.edu.ar/>
- INEC (Instituto Nacional de Estadística y Censo). 2017. Cabezas de ganado en Ecuador. Publicación SECOM.p.1 (En línea) consultado 06 de abr 2019. Disponible en <http://www.elciudadano.gob.ec/>
- INITRA. 2014. Cuartas Jornadas Internacionales del Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal. Buenos Aires, Argentina. InVet Vol. 16 N° 2. p.p104 – 106. (En línea). Formato Pdf. Consultado 26 de agosto del 2019. Disponible en <http://www.scielo.org.ar/>
- Intriago, J. y Vargas, M. 2019. Efecto de la Coenzima Q10 como antioxidante sobre las características espermáticas del semen fresco porcino. (En línea). Calceta, EC. Consultado, 16 de feb. 2020. Formato PDF. Disponible en: <http://repositorio.espam.edu.ec/>
- Komañski, G., Berisso, R., Rodríguez, G. 2015. Factores que afectan los resultados de la IATF y su impacto económico en rodeos de cría. (En línea). Tandil, AR. Consultado, 16 de feb. 2020. Formato PDF. Disponible: <https://www.ridaa.unicen.edu.ar/>
- La Torre, W. 2001. Métodos de reducción de los días abiertos en bovinos lecheros. Lima, PE. Rev. Investig. Vet. Perú. 12 (2).
- Lozano, H. 2009. Factores que afectan la calidad seminal en toros. Bogota, CO, Clínica de la Reproducción Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Sede Bogotá Universidad Nacional de Colombia. Rev. Med. Vet. Zoot. p. 258-272.

- Maqueda, I. (2018). Conservación del Semen: Diluyentes, Empaque, Temperatura y Transporte. (En línea). Formato HTML. Consultado 20 de julio del 2018. Disponible en <https://www.engormix.com/>
- Moncayo, S. 2016. Evaluación de la calidad seminal de reproductores bovinos antes y después del proceso de criopreservación. (En línea). Quito, EC. Consultado, 16 de feb. 2020. Formato PDF. Disponible: <https://dspace.ups.edu.ec/>
- Morillo, M., Salazar, S. y Castillo, E. 2012. Evaluación del potencial reproductivo del macho bovino. Maracay, VE. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias. p.60.
- Moron, D. y Moron L. (2015). Evaluación de la calidad seminal en toros reproductores en invierno y verano en el departamento del Cesar. (Trabajo Final Para optar al Grado Académico de Especialista en Reproducción Bovina). Universidad Nacional de Córdoba.
- Muiño, R. 2006. Evaluación de la motilidad y viabilidad del semen bovino mediante el uso de sistemas casa y citometría de flujo. Identificación de sub poblaciones espermáticas. Santiago de Compostela, ES. Tesis de grado. Facultad de veterinaria. Universidad de Santiago de Compostela.
- Osorio, R; Giraldo, J; Mesa, H; Gómez, G; Henao, F. 2007. Evaluación de la integridad acrosómica en semen de verraco. Caldas, CO. Vet. Zootec. 1 (1): 41-47.
- Páez, E. y Corredor, E. 2014. Evaluación de la aptitud reproductiva del toro. Boyacá, CO. Ciencia y Agricultura. 11 (2): 49-59.
- Pfister, F., 2007. Principios Básicos en el Uso de la Inseminación Artificial en Ganado Bovino Lechero. Tesis. Mvz. Universidad Michoacana De SanNicolas De Hidalgo. Michoacan. Mx. P8-9-10-19-20-37
- Puelles, O. 2019. Morfología y morfometría del espermatozoide de vicuña (*Vicugna vicugna mensalis*). (En línea). K'Ayra, PE. Consultado, 16 de feb. 2020. Formato PDF. Disponible: <http://repositorio.unsaac.edu.pe/>
- Quintero, J. 2017. Determinación del tiempo de viabilidad espermática y sus características seminales en machos bovinos de las razas *Bos Indicus*. (En línea). Caldas, CO. Consultado, 16 de feb. 2020. Formato PDF. Disponible: repositorio.lasallista.edu.co/
- Ramos, L., Rojas, A. y Martínez, Z. 2017. Efecto de dilutores y tiempos de equilibrio en la criopreservación de semen bovino. La Paz, BO. Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales, La Paz, vol.4, n°2, pág. 63-71.
- Restrepo, G., Varela, E., Usuga, A. 2016. Evaluación de la calidad espermática epididimal en hipopótamos *Hippopotamus amphibius* (*Artiodactyla: Hippopotamidae*) ubicados en el Magdalena Medio, Colombia. Xalapa, MX. Acta Zool. Mex. 32 (2).

- Rodríguez, B., Santana, F., Domínguez, E., Nurquez, B., Reyes, H. 2016. Leucocitos seminales y calidad espermática de hombres en estudio de infertilidad. La Habana, CU. Rev. Cubana Endocrinol. 27 (1).
- Rosenberger, G. 1981. Exploración Clínica de los Bovinos. Primera Edición. Hemisferio Sur. Buenos Aires, AR. p. 281-319.
- Rubio, J. y Quintero, A. 2008. Uso de las pruebas de resistencia osmótica para valorar la funcionalidad espermática en toros. En desarrollo sostenible de la ganadería de Doble Propósito. 617-627.
- Rubio, J., Quintero, A., González, D. 2009. Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides de toros. Maracaibo, VE. Rev. Cient. (Maracaibo). 19 (4).
- Sánchez, A. y Zamora, P. 2016. Efecto del medio hipoosmótico sobre la vitalidad espermática en semen canino. Lima, PE. Rev. Investig. Vet. Perú 27 (2).
- Tamayo, M. 2013. La selección de sementales bovinos en Cuba. 3. Calidad de la producción seminal en futuros sementales Holstein, relación con el desarrollo testicular. Malaga, ES. REDVET (Revista Electrónica Veterinaria. 14 (1): 1-22.
- Trejos, A. 2009. Manejo reproductivo del semental equipo. (En línea). Torreón, MX. Consultado, 16 de feb. 2020. Formato PDF. Disponible: <http://repositorio.uaaan.mx>
- Valverde, E. 2016. Efecto de dos temperaturas de almacenamientos (5 y 20 °C) de epidídimos provenientes de toros de matadero sobre la calidad y congelabilidad de espermatozoides. (En línea). Cuenca, EC. Consultado, 16 de feb. 2020. Formato PDF. Disponible: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/>
- Weather Spark. 2020. Condiciones climáticas del Cantón El Carmen. (En línea). Consultado, 19 de feb. 2020. Disponible en: <https://es.weatherspark.com/>

ANEXOS

Anexo 1-A. Selección de toros reproductores



Anexo 1-B. Selección de toros reproductores



Anexo 2. Limpieza y corte de bellos prepuciales**Anexo 3. Preparación de electro eyaculador antes de la colecta de semen**

Anexo 4-A. Evacuación de heces fecales antes de la introducción del electroeyaculador



Anexo 4-B. Evacuación de heces fecales antes de la introducción del electroeyaculador



Anexo 5-A. Colecta de semen bovino



Anexo 5-B. Colecta de semen bovino



Anexo 6-A. Medición de variables microscópicas**Anexo 6-B. Medición de variables microscópicas**

Anexo 7. Prueba de F para igualdad de varianzas y Test de Shapiro Wilks para normalidad de datos de las variables normalidad, motilidad y vitalidad

Prueba F para igualdad de varianzas

Variable	Grupo(1)	Grupo(2)	n(1)	n(2)	Var(1)	Var(2)	F	p	prueba
MOTILIDAD	{1:1}	{1:2}	12	12	28,61	49,24	0,58	0,3814	Bilateral
MOTILIDAD	{1:1}	{2:1}	12	12	28,61	36,93	0,77	0,6792	Bilateral
MOTILIDAD	{1:1}	{2:2}	12	12	28,61	47,54	0,60	0,4127	Bilateral
MOTILIDAD	{1:1}	{3:1}	12	12	28,61	42,42	0,67	0,5242	Bilateral
MOTILIDAD	{1:1}	{3:2}	12	12	28,61	54,55	0,52	0,2994	Bilateral
MOTILIDAD	{1:2}	{2:1}	12	12	49,24	36,93	1,33	0,6415	Bilateral
MOTILIDAD	{1:2}	{2:2}	12	12	49,24	47,54	1,04	0,9545	Bilateral
MOTILIDAD	{1:2}	{3:1}	12	12	49,24	42,42	1,16	0,8092	Bilateral
MOTILIDAD	{1:2}	{3:2}	12	12	49,24	54,55	0,90	0,8683	Bilateral
MOTILIDAD	{2:1}	{2:2}	12	12	36,93	47,54	0,78	0,6827	Bilateral
MOTILIDAD	{2:1}	{3:1}	12	12	36,93	42,42	0,87	0,8222	Bilateral
MOTILIDAD	{2:1}	{3:2}	12	12	36,93	54,55	0,68	0,5285	Bilateral
MOTILIDAD	{2:2}	{3:1}	12	12	47,54	42,42	1,12	0,8537	Bilateral
MOTILIDAD	{2:2}	{3:2}	12	12	47,54	54,55	0,87	0,8237	Bilateral
MOTILIDAD	{3:1}	{3:2}	12	12	42,42	54,55	0,78	0,6841	Bilateral
NORMALIDAD	{1:1}	{1:2}	12	12	43,18	46,97	0,92	0,8916	Bilateral
NORMALIDAD	{1:1}	{2:1}	12	12	43,18	47,54	0,91	0,8762	Bilateral
NORMALIDAD	{1:1}	{2:2}	12	12	43,18	40,15	1,08	0,9061	Bilateral
NORMALIDAD	{1:1}	{3:1}	12	12	43,18	46,97	0,92	0,8916	Bilateral
NORMALIDAD	{1:1}	{3:2}	12	12	43,18	36,36	1,19	0,7807	Bilateral
NORMALIDAD	{1:2}	{2:1}	12	12	46,97	47,54	0,99	0,9844	Bilateral
NORMALIDAD	{1:2}	{2:2}	12	12	46,97	40,15	1,17	0,7994	Bilateral
NORMALIDAD	{1:2}	{3:1}	12	12	46,97	46,97	1,00	>0,9999	Bilateral
NORMALIDAD	{1:2}	{3:2}	12	12	46,97	36,36	1,29	0,6786	Bilateral
NORMALIDAD	{2:1}	{2:2}	12	12	47,54	40,15	1,18	0,7844	Bilateral
NORMALIDAD	{2:1}	{3:1}	12	12	47,54	46,97	1,01	0,9844	Bilateral
NORMALIDAD	{2:1}	{3:2}	12	12	47,54	36,36	1,31	0,6645	Bilateral
NORMALIDAD	{2:2}	{3:1}	12	12	40,15	46,97	0,85	0,7994	Bilateral
NORMALIDAD	{2:2}	{3:2}	12	12	40,15	36,36	1,10	0,8724	Bilateral
NORMALIDAD	{3:1}	{3:2}	12	12	46,97	36,36	1,29	0,6786	Bilateral
VITALIDAD	{1:1}	{1:2}	12	12	30,18	39,17	0,77	0,6729	Bilateral
VITALIDAD	{1:1}	{2:1}	12	12	30,18	11,72	2,58	0,1318	Bilateral
VITALIDAD	{1:1}	{2:2}	12	12	30,18	27,52	1,10	0,8808	Bilateral
VITALIDAD	{1:1}	{3:1}	12	12	30,18	12,42	2,43	0,1565	Bilateral
VITALIDAD	{1:1}	{3:2}	12	12	30,18	14,81	2,04	0,2533	Bilateral
VITALIDAD	{1:2}	{2:1}	12	12	39,17	11,72	3,34	0,0571	Bilateral
VITALIDAD	{1:2}	{2:2}	12	12	39,17	27,52	1,42	0,5678	Bilateral
VITALIDAD	{1:2}	{3:1}	12	12	39,17	12,42	3,15	0,0695	Bilateral
VITALIDAD	{1:2}	{3:2}	12	12	39,17	14,81	2,65	0,1216	Bilateral
VITALIDAD	{2:1}	{2:2}	12	12	11,72	27,52	0,43	0,1726	Bilateral
VITALIDAD	{2:1}	{3:1}	12	12	11,72	12,42	0,94	0,9246	Bilateral
VITALIDAD	{2:1}	{3:2}	12	12	11,72	14,81	0,79	0,7047	Bilateral
VITALIDAD	{2:2}	{3:1}	12	12	27,52	12,42	2,21	0,2031	Bilateral
VITALIDAD	{2:2}	{3:2}	12	12	27,52	14,81	1,86	0,3190	Bilateral
VITALIDAD	{3:1}	{3:2}	12	12	12,42	14,81	0,84	0,7759	Bilateral

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
MOTILIDAD	72	84,64	6,94	0,90	<0,0001
NORMALIDAD	72	78,13	6,89	0,90	<0,0001
VITALIDAD	72	89,82	4,67	0,94	0,0080

Anexo 8. Prueba no paramétrica de Kruskal Wallis para la variable normalidad

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	TRATAMIENTOS	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Motilidad 1		4	91,25	2,50	90,00	12,66	0,0166
Motilidad 2		4	83,75	2,50	85,00		
Motilidad 3		4	87,50	6,45	87,50		
Motilidad 4		4	81,25	2,50	80,00		
Motilidad 5		4	86,25	2,50	85,00		
Motilidad 6		4	80,00	4,08	80,00		

Trat.	Ranks
6	6,00 A
4	7,00 A
2	11,00 A
5	14,75 A B
3	15,38 A B
1	20,88 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	TRATAMIENTOS	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
MOTILIDAD 1		12	88,67	5,35	87,50	10,26	0,0580
MOTILIDAD 2		12	85,83	7,02	87,50		
MOTILIDAD 3		12	83,75	6,08	85,00		
MOTILIDAD 4		12	82,92	6,89	80,00		
MOTILIDAD 5		12	86,67	6,51	85,00		
MOTILIDAD 6		12	80,00	7,39	80,00		

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	TRATAMIENTOS	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Motilidad 1		4	83,50	2,38	84,50	9,67	0,0565
Motilidad 2		4	76,25	2,50	75,00		
Motilidad 3		4	78,75	4,79	77,50		
Motilidad 4		4	76,25	2,50	75,00		
Motilidad 5		4	80,00	4,08	80,00		
Motilidad 6		4	73,75	4,79	72,50		

Anexo 9. Prueba no paramétrica de Kruskal Wallis para la variable motilidad

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	TRATAMIENTOS	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
NORMALIDAD 1		12	82,50	6,57	80,00	9,30	0,0805
NORMALIDAD 2		12	78,33	6,85	75,00		
NORMALIDAD 3		12	80,42	6,89	77,50		
NORMALIDAD 4		12	75,83	6,34	75,00		
NORMALIDAD 5		12	76,67	6,85	77,50		
NORMALIDAD 6		12	75,00	6,03	75,00		

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	TRATAMIENTOS	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
NORMALIDAD 1		4	81,25	4,79	82,50	7,27	0,1583
NORMALIDAD 2		4	77,50	2,89	77,50		
NORMALIDAD 3		4	78,75	4,79	77,50		
NORMALIDAD 4		4	75,00	4,08	75,00		
NORMALIDAD 5		4	75,00	5,77	75,00		
NORMALIDAD 6		4	72,50	2,89	72,50		

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	TRATAMIENTOS	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
NORMALIDAD 1		4	77,50	2,89	77,50	9,42	0,0467
NORMALIDAD 2		4	72,50	2,89	72,50		
NORMALIDAD 3		4	73,75	2,50	75,00		
NORMALIDAD 4		4	71,25	2,50	70,00		
NORMALIDAD 5		4	72,50	5,00	70,00		
NORMALIDAD 6		4	68,75	2,50	70,00		

Trat. Ranks

6	5,88	A
4	10,00	A
5	11,38	A B
2	12,50	A B
3	15,00	A B
1	20,25	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 10. Prueba no paramétrica de Kruskal Wallis para la variable vitalidad

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	TRATAMIENTOS	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
VITALIDAD 1		4	97,00	0,82	97,00	11,73	0,0344
VITALIDAD 2		4	94,50	2,08	94,50		
VITALIDAD 3		4	91,75	2,06	91,50		
VITALIDAD 4		4	93,50	2,38	94,50		
VITALIDAD 5		4	95,00	3,46	96,00		
VITALIDAD 6		4	91,50	2,38	90,50		

Trat.	Ranks
3	6,75 A
6	7,13 A
4	10,88 A
2	13,63 A B
5	15,75 A B
1	20,88 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	TRATAMIENTOS	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
VITALIDAD 1		4	93,00	2,45	93,50	7,36	0,1884
VITALIDAD 2		4	88,50	3,11	89,50		
VITALIDAD 3		4	87,50	2,89	87,50		
VITALIDAD 4		4	89,75	2,06	90,00		
VITALIDAD 5		4	89,50	3,42	90,00		
VITALIDAD 6		4	88,75	1,71	88,50		

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	TRATAMIENTOS	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
VITALIDAD 1		4	85,00	4,24	85,50	10,26	0,0632
VITALIDAD 2		4	83,25	4,43	83,00		
VITALIDAD 3		4	90,00	3,56	89,00		
VITALIDAD 4		4	82,25	3,30	81,00		
VITALIDAD 5		4	89,25	2,22	89,00		
VITALIDAD 6		4	86,75	3,40	87,50		

Anexo 11. Prueba de F para igualdad de varianzas y Test de Shapiro Wilks para normalidad de datos de las variables NAR, DAR y GCs

Prueba F para igualdad de varianzas

Variable	Grupo(1)	Grupo(2)	n(1)	n(2)	Var(1)	Var(2)	F	p	prueba
NAR	{T1}	{T2}	4	4	6,00	3,00	2,00	0,5836	Bilateral
NAR	{T1}	{T3}	4	4	6,00	6,67	0,90	0,9330	Bilateral
NAR	{T1}	{T4}	4	4	6,00	8,92	0,67	0,7526	Bilateral
NAR	{T1}	{T5}	4	4	6,00	10,25	0,59	0,6708	Bilateral
NAR	{T1}	{T6}	4	4	6,00	3,33	1,80	0,6412	Bilateral
NAR	{T2}	{T3}	4	4	3,00	6,67	0,45	0,5289	Bilateral
NAR	{T2}	{T4}	4	4	3,00	8,92	0,34	0,3949	Bilateral
NAR	{T2}	{T5}	4	4	3,00	10,25	0,29	0,3398	Bilateral
NAR	{T2}	{T6}	4	4	3,00	3,33	0,90	0,9330	Bilateral
NAR	{T3}	{T4}	4	4	6,67	8,92	0,75	0,8168	Bilateral
NAR	{T3}	{T5}	4	4	6,67	10,25	0,65	0,7323	Bilateral
NAR	{T3}	{T6}	4	4	6,67	3,33	2,00	0,5836	Bilateral
NAR	{T4}	{T5}	4	4	8,92	10,25	0,87	0,9115	Bilateral
NAR	{T4}	{T6}	4	4	8,92	3,33	2,68	0,4405	Bilateral
NAR	{T5}	{T6}	4	4	10,25	3,33	3,08	0,3809	Bilateral
DAR	{T1}	{T2}	4	4	4,25	36,67	0,12	0,1101	Bilateral
DAR	{T1}	{T3}	4	4	4,25	8,25	0,52	0,5996	Bilateral
DAR	{T1}	{T4}	4	4	4,25	8,92	0,48	0,5584	Bilateral
DAR	{T1}	{T5}	4	4	4,25	8,92	0,48	0,5584	Bilateral
DAR	{T1}	{T6}	4	4	4,25	9,58	0,44	0,5216	Bilateral
DAR	{T2}	{T3}	4	4	36,67	8,25	4,44	0,2520	Bilateral
DAR	{T2}	{T4}	4	4	36,67	8,92	4,11	0,2759	Bilateral
DAR	{T2}	{T5}	4	4	36,67	8,92	4,11	0,2759	Bilateral
DAR	{T2}	{T6}	4	4	36,67	9,58	3,83	0,2995	Bilateral
DAR	{T3}	{T4}	4	4	8,25	8,92	0,93	0,9506	Bilateral
DAR	{T3}	{T5}	4	4	8,25	8,92	0,93	0,9506	Bilateral
DAR	{T3}	{T6}	4	4	8,25	9,58	0,86	0,9049	Bilateral
DAR	{T4}	{T5}	4	4	8,92	8,92	1,00	>0,9999	Bilateral
DAR	{T4}	{T6}	4	4	8,92	9,58	0,93	0,9541	Bilateral
DAR	{T5}	{T6}	4	4	8,92	9,58	0,93	0,9541	Bilateral
GTS	{T1}	{T2}	4	4	23,00	10,25	2,24	0,5240	Bilateral
GTS	{T1}	{T3}	4	4	23,00	18,00	1,28	0,8451	Bilateral
GTS	{T1}	{T4}	4	4	23,00	10,92	2,11	0,5562	Bilateral
GTS	{T1}	{T5}	4	4	23,00	16,25	1,42	0,7821	Bilateral
GTS	{T1}	{T6}	4	4	23,00	19,58	1,17	0,8980	Bilateral
DAR	{T5}	{T6}	4	4	8,92	9,58	0,93	0,9541	Bilateral
GTS	{T1}	{T2}	4	4	23,00	10,25	2,24	0,5240	Bilateral
GTS	{T1}	{T3}	4	4	23,00	18,00	1,28	0,8451	Bilateral
GTS	{T1}	{T4}	4	4	23,00	10,92	2,11	0,5562	Bilateral
GTS	{T1}	{T5}	4	4	23,00	16,25	1,42	0,7821	Bilateral
GTS	{T1}	{T6}	4	4	23,00	19,58	1,17	0,8980	Bilateral
GTS	{T2}	{T3}	4	4	10,25	18,00	0,57	0,6551	Bilateral
GTS	{T2}	{T4}	4	4	10,25	10,92	0,94	0,9599	Bilateral
GTS	{T2}	{T5}	4	4	10,25	16,25	0,63	0,7142	Bilateral
GTS	{T2}	{T6}	4	4	10,25	19,58	0,52	0,6083	Bilateral
GTS	{T3}	{T4}	4	4	18,00	10,92	1,65	0,6913	Bilateral
GTS	{T3}	{T5}	4	4	18,00	16,25	1,11	0,9350	Bilateral
GTS	{T3}	{T6}	4	4	18,00	19,58	0,92	0,9464	Bilateral
GTS	{T4}	{T5}	4	4	10,92	16,25	0,67	0,7517	Bilateral
GTS	{T4}	{T6}	4	4	10,92	19,58	0,56	0,6431	Bilateral
GTS	{T5}	{T6}	4	4	16,25	19,58	0,83	0,8817	Bilateral

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
NAR	24	92,08	2,57	0,88	0,0209
DAR	24	6,13	3,73	0,92	0,1382
GTS	24	9,50	4,29	0,94	0,4667

Anexo 12. Prueba no paramétrica de Kruskal Wallis para las variables NAR, DAR y GCs

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	TRATAMIENTOS	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
NAR	1	4	92,00	2,45	91,50	6,44	0,2410
NAR	2	4	90,50	1,73	90,00		
NAR	3	4	94,00	2,58	94,00		
NAR	4	4	90,75	2,99	90,00		
NAR	5	4	93,25	3,20	93,50		
NAR	6	4	92,00	1,83	92,00		

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	TRATAMIENTOS	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
DAR	1	4	3,75	2,06	4,00	7,39	0,1867
DAR	2	4	8,00	6,06	5,50		
DAR	3	4	4,25	2,87	3,50		
DAR	4	4	8,75	2,99	9,00		
DAR	5	4	4,75	2,99	4,00		
DAR	6	4	7,25	3,10	8,00		

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	TRATAMIENTOS	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
GTS	1	4	5,50	4,80	5,00	5,23	0,3816
GTS	2	4	9,25	3,20	9,50		
GTS	3	4	8,00	4,24	8,50		
GTS	4	4	10,25	3,30	10,00		
GTS	5	4	11,25	4,03	10,00		
GTS	6	4	12,75	4,43	13,00		