

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias de la Salud

**EVALUACIÓN DEL EFECTO EN LA FERTILIDAD DE LA
INSEMINACIÓN ARTIFICIAL CON SEMEN CONGELADO EN VACAS
HOLSTEIN**

Jeremy Gerardo Córdova Guambo

Medicina Veterinaria

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Médico Veterinario

Quito, 02 de mayo de 2020

Universidad San Francisco de Quito USFQ

Colegio de Ciencias de la Salud

HOJA DE CALIFICACIÓN

DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

**EVALUACIÓN DEL EFECTO EN LA FERTILIDAD DE LA INSEMINACIÓN
ARTIFICIAL CON SEMEN CONGELADO EN VACAS HOLSTEIN**

Jeremy Gerardo Córdova Guambo

Nombre del profesor, Título académico

Rommel Lenín Vinueza Sierra, MVZ

Quito, 02 de mayo de 2020

DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Nombres y apellidos: Jeremy Gerardo Córdova Guambo

Código: 00130122

Cédula de identidad: 0604181180

Lugar y fecha: Quito, 02 de mayo de 2020.

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

Resumen

La inseminación artificial es una técnica utilizada en la producción animal que cumple con la finalidad del mejoramiento genético de los animales. En la literatura se detallan diversos protocolos para realizar esta técnica en donde se describe que antes de introducir el semen en el tracto reproductivo de la hembra debe realizarse un proceso de descongelamiento. En la mayoría de las técnicas descritas este proceso se lo realiza introduciendo la pajuela de semen congelado en un recipiente con agua caliente (varía de 37° a 70° centígrados). En la actualidad existe mucha controversia si en realidad se necesita realizar este descongelamiento. Por este motivo es que el presente trabajo de investigación se diseñó para realizar una comparación del efecto que tiene en la fertilidad la inseminación artificial mediante un protocolo con semen congelado vs un protocolo con semen descongelado. Para esto se seleccionaron 26 vacas Holstein, multíparas que se encontraban entre los días 48 y 52 post parto de dos haciendas particulares localizadas en la serranía ecuatoriana. Se tomaron 13 vacas para ser inseminadas mediante el protocolo de inseminación con descongelamiento de pajuelas (protocolo tradicional); y las 13 vacas restantes se inseminaron con las pajuelas congeladas (protocolo propuesto). La determinación de la fertilidad se realizó mediante un chequeo ginecológico basado en palpación transrectal y ecografía a los 45 días post inseminación. Posteriormente se procedió a realizar una prueba estadística Chi-cuadrado en el software Minitab para una comprobación certera de los resultados. De los animales que fueron inseminados con el protocolo tradicional el 38% quedaron gestantes. Mientras que en el otro grupo de vacas que fueron inseminadas con el protocolo propuesto el porcentaje de gestación fue de 46%. Es decir, no se encontró una diferencia significativa entre ambos grupos ($P=0,691$). Por lo tanto, se concluye que realizar el descongelamiento de semen de forma tradicional o no realizarlo en un protocolo de inseminación artificial no tiene diferencias.

Palabras clave: Inseminación artificial, semen congelado, semen descongelado, índice de fertilidad.

Abstract

Artificial insemination is a technique that has been used in animal production and which fulfills the purpose of genetic improvement of animals. Literature explains several protocols for performing this technique, in which it is described that before introducing the semen into the female's reproductive tract, a thawing process must be performed. In most of the techniques described, this process is carried out by introducing the frozen semen straw into a container with hot water (it may vary from 37 ° to 70 ° centigrade). Nowadays, a strong controversy has been noted about whether this thawing is an essential procedure. For this reason, this research project was designed to compare the effect of artificial insemination on fertility using a protocol with frozen semen vs. a protocol with thawed semen. To carry out this research, 26 Holstein cows were selected from two private farms located in the Ecuadorian highlands. They were multiparous cows within day 48 and 52 of post-partum. 13 cows were taken to be inseminated using the insemination protocol with straw thawing (traditional protocol); and the remaining 13 cows were inseminated with frozen straws (proposed protocol). Fertility determination was performed by a gynecological checkup based on transrectal palpation and ultrasound, 45 days after insemination. Subsequently, a Chi-square test was performed in the Minitab software for an accurate check of the results. Out of the animals that were inseminated with the traditional protocol, 38% got pregnant. On the other hand, the group of cows that was inseminated with the proposed protocol showed a 46% of gestation. That means that no significant differences were found between both groups ($P = 0.691$). Therefore, it is concluded that the insemination protocol with straw thawing (traditional protocol) and the insemination with frozen straws (proposed protocol) showed no differences for the purpose of artificial insemination.

Key words: Artificial insemination, frozen semen, thawed semen, fertility index.

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|----------------------------------|----|
| INTRODUCCIÓN..... | 10 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 12 |
| Selección de animales | 12 |
| Manejo reproductivo | 12 |
| Descongelamiento del semen | 12 |
| Inseminación artificial..... | 13 |
| Diagnóstico de gestación..... | 13 |
| Tabulación de datos | 13 |
| Análisis estadístico..... | 13 |
| RESULTADOS | 14 |
| DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN..... | 15 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 17 |

Índice de tablas

Tabla 1: Resultados de gestación con la pajuela congelada. (Protocolo propuesto)..... 14

Tabla 2: Resultados de gestación con la pajuela descongelada (Protocolo tradicional). 15

Índice de Ilustraciones

Ilustración 1: Datos comparativos de preñez con semen congelado y descongelado en ambas haciendas..... 15

INTRODUCCIÓN

La técnica de inseminación artificial (IA) se utiliza en la producción animal con la finalidad de generar una mejora genética en los animales. En teoría, esta técnica permite extraer el semen de un animal macho reproductor de alta genética, diluirlo y realizar una crioconservación. De esta forma, se brinda la facilidad de transportar el semen al sitio de necesidad para que sea depositado de manera manual en el útero de hembras que se encuentren en celo. El origen de la inseminación artificial no está descrito a plenitud, sin embargo, se conoce que fue tardío ya que en el siglo XVI se detallan procesos de extracción de semen de caballo en un pañuelo, para luego ser introducido en la vagina de una yegua en celo consiguiendo fecundarla (Muriño, et al., 2008). Los datos científicos con respecto a la inseminación artificial en la edad moderna son descritos por primera vez en el año de 1779, en varios escritos del profesor italiano Lázaro Spallanzi, el mismo que logró fecundar una hembra canina para así obtener la primera camada de cachorros en esta especie mediante IA (Ombelet y Van Robays, 2017).

El Shock térmico que se produce al someter al semen a varios cambios de temperatura previo a la inseminación artificial dentro de los protocolos tradicionales, tienden a ocasionar daños en el espermatozoide. La temperatura en la que reside el semen congelado dentro del tanque de nitrógeno es de -190°C , en el momento que sale de este recipiente se genera la primera alteración térmica en la pajuela ya que esta pasa a estar a temperatura ambiental (Álvarez, 2008). Posteriormente, los protocolos tradicionales indican que se debe realizar el descongelamiento del semen en agua caliente (37° a 70°C) por un período determinado de tiempo (15 a 30 segundos), dependiendo de la técnica a utilizar; produciendo un segundo cambio de temperatura en el semen. El tercer cambio térmico se da cuando se expone al semen al ambiente luego de terminar con el proceso de descongelamiento para preparar la pistola de inseminación. Por último, se da un cuarto

cambio cuando se ingresa la pistola cargada con la pajuela en la cavidad vaginal del animal. Pues bien, la temperatura vaginal de las vacas se encuentra entre los 38,5° y 39° C; siendo esta similar a la utilizada para el descongelamiento. Por este motivo, varios autores han sugerido que el descongelamiento del semen se lo puede realizar de manera directa dentro del tracto vaginal del animal (Díaz et ál., 2011; Cabrera y Pantoja, 2012), y de esta manera evitar someter al semen a más cambios de temperatura.

Bernardi *et ál.* (2015), realizaron un estudio en Argentina en donde evaluaron el efecto del descongelamiento de semen (entre otros factores) y su influencia en el porcentaje de preñez de bovinos de leche, también determinaron que los cambios de temperatura a los que se le somete al semen en los protocolos de inseminación tradicionales, específicamente en el descongelamiento del semen son un factor determinante en el porcentaje de preñez de las vacas dentro del estudio. En este trabajo, se indica que hacen falta investigaciones en las cuáles sugieran que el descongelamiento del semen previo a la inseminación inflencie directamente en el índice de fertilidad en vacas lecheras. A raíz de esto se plantea la siguiente pregunta: ¿El descongelamiento del semen antes de la inseminación artificial realmente favorece a la fertilidad de los animales si la comparamos con un protocolo de inseminación con semen sin descongelar?

En la actualidad, se ha incrementado notoriamente la demanda poblacional hacia alimentos de origen animal que tengan calidad e inocuidad. Por lo cual es un reto importante para los productores de este tipo de alimento el desarrollo e implementación de nuevas y eficientes técnicas que eleven los índices de producción. El tamaño de las haciendas, la dificultad para el movimiento de animales, diversas condiciones ambientales, entre otros factores, presentan condiciones limitantes para seguir rigurosamente los protocolos tradicionales descritos para la inseminación artificial (Oses *et ál.*, 2009). Por estos motivos, el presente trabajo tiene como finalidad comparar

el efecto en la fertilidad que posee la inseminación artificial con semen descongelado vs la inseminación artificial con semen congelado en vacas Holstein.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de animales

Para el presente trabajo se escogieron 26 vacas Holstein multíparas de 2 haciendas particulares ubicadas en la región Sierra de Ecuador. Estas vacas se encontraban entre los días 48 y 52 post parto.

Manejo reproductivo

Se realizó una rutina de sincronización para inseminar a todos los animales a tiempo fijo. Esta rutina de sincronización se utiliza de forma regular en ambas haciendas.

La cuál consistió en:

- **Día 0 (7 am):** Colocación de dispositivo de progesterona (Dispocel, DIB o DIR) + administración de 2 ml de Benzoato de estradiol.
- **Día 8 (7 am):** Retiro del dispositivo de progesterona + administración de 2ml de prostaglandina f2 α .
- **Día 9 (7 am):** Administración de 1 ml de Benzoato de estradiol.
- **Día 10 (11 am-1pm):** Inseminación artificial a tiempo fijo más aplicación de GnRH.

Descongelamiento del semen

Se inseminaron 13 vacas mediante el protocolo tradicional utilizado en las haciendas en el que se incluía el descongelamiento de las pajuelas, mientras que 13 vacas se inseminaron obviando el descongelamiento del semen previo a la inseminación.

Para el descongelamiento del semen en ambas haciendas se utilizó el siguiente protocolo:

- Las pajuelas permanecían en refrigeración en el interior de un termo de nitrógeno líquido a una temperatura aproximada de -190°C . Se tomó una pajuela de 0,25 ml con semen congelado, se la extrajo del termo de nitrógeno y se introdujo en un recipiente con agua caliente a una temperatura de $37,7^{\circ}\text{C}$ por un tiempo de 35 segundos.
- Posteriormente se procedió a cargar la pistola usando la pajuela ya descongelada (Witt, 2013).

Para realizar el protocolo de inseminación artificial sin el descongelamiento del semen, se extrajo la pajuela del termo de nitrógeno y se procedió a cargar la pistola.

Inseminación artificial

El Protocolo de inseminación artificial que se utilizó en ambas haciendas es el recto vaginal (Hernández, 2009).

Diagnóstico de gestación

La determinación de la fertilidad se realizó mediante un chequeo ginecológico por palpación rectal y ultrasonografía.

Tabulación de datos

Se procedió a recolectar los datos y tabularlos en el programa informático Excel.

Análisis estadístico

La prueba estadística que se aplicó fue Chi cuadrado en el software estadístico Minitab 2018.

RESULTADOS

De todos los animales que fueron inseminados con el protocolo tradicional utilizado en las haciendas (semen descongelado) el 38% quedó gestante. Mientras que del grupo de animales que se inseminaron con el protocolo propuesto (semen congelado), el 46% quedó gestante. No se encontraron diferencias significativas de los resultados entre ambos grupos ($P=0,691$; Ilustración 1).

Tabla 1: Resultados de gestación con la pajuela congelada. (Protocolo propuesto).

| Número | Tipo de Pajuela | Resultado de gestación |
|--------|-----------------|------------------------|
| 16 | Congelada | NO |
| 24 | Congelada | SI |
| 27 | Congelada | NO |
| 29 | Congelada | SI |
| 36 | Congelada | NO |
| 51 | Congelada | NO |
| 78 | Congelada | SI |
| 102 | Congelada | NO |
| 112 | Congelada | NO |
| 71 | Congelada | SI |
| 12 | Congelada | SI |
| 39 | Congelada | SI |
| 40 | Congelada | NO |

Tabla 2: Resultados de gestación con la pajuela descongelada (Protocolo tradicional).

| Número | Tipo de Pajuela | Resultado de gestación |
|--------|-----------------|------------------------|
| 1 | Descongelada | SI |
| 12 | Descongelada | NO |
| 19 | Descongelada | SI |
| 20 | Descongelada | NO |
| 25 | Descongelada | NO |
| 33 | Descongelada | NO |
| 34 | Descongelada | SI |
| 47 | Descongelada | SI |
| 53 | Descongelada | NO |
| 86 | Descongelada | NO |
| 49 | Descongelada | SI |
| 70 | Descongelada | NO |
| 73 | Descongelada | NO |

Ilustración 1: Datos comparativos de preñez con semen congelado y descongelado en ambas haciendas

| <i>Grupo</i> | <i>n</i> | <i>Gestantes</i> | <i>Porcentaje*</i> |
|---------------------------|----------|------------------|--------------------|
| Semen Congelado | 13 | 6 | 46 |
| Semen Descongelado | 13 | 5 | 38 |

**no se encontró diferencia significativa (P=0.691)*

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

En el presente proyecto de investigación no se encontró una diferencia significativa en la fertilidad de animales que fueron inseminados con semen congelado (protocolo propuesto), al ser comparados con aquellos animales que fueron inseminados con semen descongelado (protocolo tradicional). El resultado del presente estudio guarda semejanza con una publicación anterior (Díaz *et ál.*, 2011), en donde de manera similar no se encontraron diferencias significativas entre animales inseminados con semen descongelado vs semen congelado (57,6% en el primer grupo y 52% en el

segundo grupo; $P=0,68$). Partiendo de estas observaciones se puede pensar que posiblemente no sea necesario descongelar el semen dentro de un protocolo de inseminación artificial.

En varios reportes de investigaciones en donde se evalúa el efecto del estrés calórico y cambio de temperatura en el semen se detalló que estos factores tienden a activar marcadores apoptóticos de los espermatozoides eyaculados y afectar en la espermatogénesis del toro. (Martin *et ál.*, 2007; Ball 2008; Brum *et ál.*, 2008). Por estos motivos, es factible suponer que mientras a más cambios de temperatura sea sometido el semen antes de realizar el proceso de inseminación, existirá una mayor probabilidad de daño estructural. También se puede pensar que al no descongelar el semen previo al depósito dentro del tracto reproductivo de la hembra se puede disminuir esta probabilidad.

En términos generales, en la mayoría de las investigaciones en donde se compara la fertilidad del semen sometido a diferentes cambios de temperatura, indiferentemente si este es protegido, inmovilizado o crio-preservado en gel de alginato para ampliar su viabilidad por al menos 48 horas a condiciones térmicas similares a las fisiológicas en bovinos (Alm-Kristiansen *et ál.*, 2017); o en la inseminación con semen congelado y descongelado en humanos (Wolf *et ál.*, 2001), estas no presentan diferencias significativas, al igual que en el presente trabajo de investigación.

Por lo tanto, se concluye que la fertilidad en vacas Holstein que fueron inseminadas con semen congelado (protocolo propuesto), no difiere con aquellas que fueron inseminadas con semen descongelado (protocolo tradicional).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alm-Kristiansen, A. H., Dalen, G., Klinkenberg, G., Bekk, L., Thorkildsen, L. T., Waterhouse, K. E., Kommisrud, E. (2017) Reproductive performance of immobilized cryopreserved bovine semen used for timed artificial insemination. *Reprod Domest Anim.* 52, 1019-1024.
- Álvarez, J. G. (2008). Preparación del semen para Técnicas de Reproducción Asistida. *ASEBIR*, 10, 28-42.
- Ball, B. A. (2008). Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: impacts on sperm function and preservation in the horse. *Anim. Reprod. Sci.* 107, 257–267.
- Bernardi, S. F., Di Prinzio, M., Maglione, D., Rinaudo, A., & Marini, P. R. (2015). Efecto del protocolo de descongelación de semen sobre el porcentaje de preñez en bovinos lecheros. *Revista veterinaria*, 26(1), 27-32.
- Brum, A. M., Sabeur, K., and Ball, B. A. (2008). Apoptotic-like changes in equine spermatozoa separated by density-gradient centrifugation or after cryopreservation. *Theriogenology* 69, 1041–1055.
- Cabrera, P., & Pantoja, C. (2012). Viabilidad espermática e integridad del acrosoma en semen congelado de toros nacionales. *Revista de Investigaciones Veterinarias*.
- Díaz B. R., Cadena G., Cuadrado S., Garcés V., Vinueza L., Cerón J. C., Vargas J., Granados L. M. Evaluación del efecto en la fertilidad de la inseminación artificial con semen congelado vs semen descongelado en vacas Holstein (Estudio Preliminar). *Memorias del XV Congreso Latinoamericano de Buiatría y XXXIX Jornadas uruguayas de Buiatría: 2011 junio 7-9; Paysandú – Uruguay. Colegio de médicos veterinario de Paysandú 2011.*
- Hernández, J., Ortega, A. (2009). *Manual de Inseminación Artificial en Bovinos*. Facultad de medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Martin, G., Cagnon, N., Sabido, O., Sion, B., Grizard, G., Durand, P., and Levy, R. (2007). Kinetics of occurrence of some features of apoptosis during the cryopreservation process of bovine spermatozoa. *Hum. Reprod.* 22, 380–388.
- Minitab Statistical Software. (2018). State College, Pennsylvania, USA.
- Muiño, R., Fernández, M., Areán, H., Viana, J. L., López, M., Fernández, A. I., & Peña, A. I. (2008). Nuevas tecnologías aplicadas al procesado y evaluación del semen bovino en centros de inseminación artificial.
- Omelet y Van Robays. (2017). Historia de la inseminación artificial: obstáculos e hitos. Noviembre 30, 2018, de Biblioteca Nacional de Medicina de Estados Unidos Sitio web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4498171/>
- Oses, M. V., Teruel, M. T., & Cabodevila, J. A. (2009). Utilización de semen bovino sexado en inseminación artificial, transferencia embrionaria y fertilización in vitro. *Revista Veterinaria*, 20(2), 138-145.
- Witt. A. (2013). *Inseminación Artificial a Tiempo Fijo (IATF): Resultados de Doce Años en un Plantel Angus Colorado de Pedigree*. Angus Notas.

Wolf, D. P., Patton, P. E., Burry, K. A., Kaplan, P. F. (2001). Intrauterine insemination-ready versus conventional semen cryopreservation for donor insemination: a comparison of retrospective results and a prospective, randomized trial. *Fertil Steril.* 76, 181-185.