

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Validación de un protocolo breve de inseminación artificial
bovina**

Carlos Cristopher Pineda Cabrera

Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniero en Biotecnología

Quito, 17 de diciembre de 2021

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

Validación de un protocolo breve de inseminación artificial bovina

Carlos Cristopher Pineda Cabrera

Nombre del profesor, Título académico

Pedro Aponte, PhD.

Quito, 17 de diciembre de 2021

© 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 la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Carlos Cristopher Pineda Cabrera

Código: 00138075

Cédula de identidad: 0706323656

Lugar y fecha: Quito, 17 de diciembre de 2021

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UNPUBLISHED DOCUMENT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

El objetivo del estudio consistió en evaluar la eficacia de un protocolo simplificado de inseminación artificial bovina en comparación con el proceso tradicional, utilizando como parámetros de estudio la integridad del acrosoma y viabilidad del espermatozoide. Se llevaron a cabo simulaciones de los dos tipos de inseminaciones artificiales. La primera consistió en el procedimiento tradicional, mientras que en la otra se eliminó el paso de descongelamiento de las pajuelas en agua. Estos procedimientos se realizaron en 5 vacas Holstein, sin el depósito de los espermatozoides, mediante el uso de pajuelas provenientes de 5 toros de la misma raza. Se usaron 10 pajuelas por cada uno de los machos bovinos. El material espermático fue extraído de las pajuelas y procesado con dos tipos de tinciones, Giemsa y Eosina-Nigrosina, para evaluar los parámetros de integridad del acrosoma y viabilidad del espermatozoide, respectivamente. Los resultados procesados y analizados en el software Minitab, indicaron $P=0.902$ para la integridad del acrosoma, y $P=0.588$ para la viabilidad. Ambos valores, al ser menores que el valor alfa, 0.05, muestran que con un 95% de confianza, los tratamientos evaluados no presentan diferencia estadística con respecto a los parámetros analizados. Por ende, la inseminación artificial simplificada representa un método válido manteniendo tasas comparables de viabilidad e integridad del acrosoma de los espermatozoides.

Palabras clave: inseminación artificial, bovinos, protocolo simplificado, Giemsa, Eosina-negrosina, acrosoma, viabilidad.

ABSTRACT

The objective of the study was to evaluate the efficacy of a simplified bovine artificial insemination protocol compared to the traditional process, using acrosome integrity and sperm viability as study parameters. Simulations of the two types of artificial inseminations were conducted. The first consisted of the traditional procedure, while in the other the thawing step of the straws in water was eliminated. These procedures were performed in 5 Holstein cows, without the sperm deposit, by using straws from 5 bulls of the same breed. Ten straws were used for each bovine male. Sperm material was extracted from straws and processed with two types of stains, Giemsa and Eosin-Nigrosin, to evaluate the parameters of acrosome integrity and sperm viability, respectively. The results processed and analyzed in the Minitab software indicated $P=0.902$ for the integrity of the acrosome, and $P=0.588$ for viability. Both values, being lower than the alpha value, 0.05, show that with 95% confidence, the treatments evaluated do not present statistical difference with respect to the parameters analyzed. Thus, simplified artificial insemination represents a valid method maintaining comparable rates of viability and integrity of sperm acrosomes.

Key words: artificial insemination, cattle, simplified protocol, Giemsa, Eosin-Nigrosin, acrosome, viability.

TABLA DE CONTENIDO

Introducción	10
Métodos	14
Resultados	17
Discusión	21
Conclusiones	23
Referencias bibliográficas	33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Porcentajes de acrosomas positivos de espermatozoides	24
Tabla 2. Análisis de varianza de porcentajes de acrosomas positivos	25
Tabla 3. Porcentajes de viabilidad de espermatozoides.....	25
Tabla 4. Análisis de varianza de porcentajes de viabilidad	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Temperaturas corporales y del ambiente obtenidas.....	28
Figura 2. Resultados de las tinciones Giemsa y Eosina-Nigrosina.....	28
Figura 3. Supuestos de ANOVA de los porcentajes de acrosoma positivo	29
Figura 4. Box-Plot comparativo entre porcentajes de acrosoma positivo.....	29
Figura 5. Supuestos de ANOVA de los porcentajes de viabilidad	30
Figura 6. Box-Plot comparativo entre porcentajes de viabilidad	31

INTRODUCCIÓN

En la historia de la humanidad la domesticación de animales representó el punto de partida para el desarrollo de las civilizaciones. A partir de la crianza de animales, los grupos pequeños de nómadas cazadores se convirtieron en grandes comunidades estratificadas. Uno de los factores más importantes para el inicio del progreso de la humanidad fue la producción de leche y carne, que sirvió de sustento para un número más grande de personas (Naranjo & Ruíz, 2020).

Actualmente los dos alimentos siguen jugando un rol esencial en la dieta humana, por lo que la producción animal es de gran importancia. Aunque la carne y la leche se obtiene de diferentes animales domésticos, los bovinos son su principal fuente. Desde 1961 la producción bovina a nivel mundial ha aumentado más de dos veces, llegando a 68 millones de toneladas por año en 2014 (Ritchie & Roser, 2017), y se plantea que alcance 89 millones de toneladas en 2030 (Pulina et al., 2021).

A nivel mundial, Asia es el continente que más produce carne de res, liderando con aproximadamente 25 millones de toneladas. Sin embargo, América Latina ocupa el segundo lugar con una producción de 15 millones de toneladas del producto cárnico (MLA, 2021). En esta región la ganadería es de vital importancia (Pulina et al., 2021). Por ejemplo, en 2019 la exportación en Brasil tuvo una caída del 2%, la cual fue compensada con la venta de proteína animal, donde la carne de ganado vacuno representó el 59.8% (CEPAL, 2019). En Argentina la producción de cárnicos representa cerca del 30% del PIB en cadena agroalimentaria, del cual el 16% corresponde a la carne bovina (Sigauco & Terré, 2021).

Por otra parte, la leche es el alimento más consumido globalmente, de tal manera que más de 6 mil millones de personas la incluyen en su dieta. Consecuentemente, la producción de leche es alta, de tal manera que en 2020 llegó a 906 millones de toneladas, de la cual la leche de vaca representa el 81%. Asia y Europa lideran la producción con cantidades de más de 350 y 200

millones de toneladas, respectivamente. Mientras tanto América del sur se lleva el cuarto lugar con una producción de 100 millones de toneladas (FAO, 2021). En esta última región, los países en desarrollo se benefician en gran manera de la leche de ganado vacuno ya que contribuyen a la nutrición y seguridad alimentaria de la población (FAO, 2021).

En Ecuador la actividad ganadera es esencial para la economía ya que beneficia al sector rural y proporciona alimentos que forman parte de la canasta básica. La ganadería bovina representa el 1.4% del total que aporta el sector pecuario al producto interno bruto del país, que es un 10.4%. A nivel nacional se reportan 4.10 millones de cabezas de ganado, de las cuales el 43% se destina a la producción de carne que conforman 300 millones de libras por año (Hidalgo et al., 2020). Mientras tanto, cada día se obtienen 6.6 millones de litros de leche proveniente del ganado vacuno que genera fuentes de ingresos para 1.3 millones de ecuatorianos. Entre finales de 2019 e inicios de 2020 se tuvo un incremento del 22% en la producción de la bebida láctea (MAG, 2020).

Debido a la importancia económica y social que representa la producción bovina, no solo a nivel mundial, sino también localmente, se busca la aplicación de técnicas que beneficien la actividad ganadera. Una de ellas es la inseminación artificial, una técnica de reproducción asistida basada en la implantación de semen en el tracto genital de la hembra en el tiempo óptimo para la fecundación (García & Orellana, 2020).

La inseminación artificial fue llevada a cabo por primera vez, de forma documentada, en caninos en el año de 1784, cuya aplicación tuvo éxito. En ganado vacuno se aplicó desde inicios de 1900 alcanzando resultados favorables. A partir de esto, la técnica ha ido mejorando y su uso es extendido de tal manera que en 2017 hubo un incremento del 84% en las ventas de semen bovino (Fontes et al., 2020).

El principal éxito de la inseminación artificial radica en que las tasas de natalidad obtenida a partir de este procedimiento y de forma natural son similares, sin la necesidad de mantener un macho en la granja (Morgan et al., 2020). Adicionalmente, una sola muestra proveniente de la eyaculación del macho puede usarse para fertilizar a varias hembras debido a que la dosis de inseminación es baja (Parkinson & Morrell, 2019).

En un inicio la técnica de reproducción asistida tratada fue implementada con el fin de controlar la diseminación de las enfermedades venéreas tricomoniasis y campilobacteriosis, las cuales fueron erradicadas al aplicar la inseminación artificial, mientras que actualmente el uso tiene el propósito de mejorar genéticamente la progenie. Por otra parte, su implementación puede darse incluso en los países con menos recursos económicos (Parkinson & Morrell, 2019), ya que el costo de llevar a cabo el protocolo de inseminación artificial en bovinos es accesible (Ríos, 2018).

La inseminación artificial en bovinos requiere la previa recolección de espermatozoides de toro almacenados en pajuelas que son criopreservados en un tanque de nitrógeno líquido a -196°C . Durante el proceso de inseminación, se debe descongelar el material espermático y dicho protocolo, en general, consiste en la extracción de pajuelas del tanque, las cuales deben permanecer en agua a $30-35^{\circ}\text{C}$ durante 20 segundos aproximadamente (JICA, 2012) y luego se carga la pistola de inseminación para la introducción del semen en la cavidad uterina de la vaca (Cerón y Ortega, 2009), la cual se encuentra a una temperatura de 38.51°C durante el estro (Roa et al., 2006).

Debido al posible efecto negativo de los cambios de temperatura sobre los espermatozoides, se ha desarrollado un protocolo de inseminación artificial simplificado, en el cual no se realiza el descongelamiento de las pajuelas en agua tibia, sino que se las introduce directamente en la cavidad uterina después de haberlas extraído del tanque de nitrógeno y cargado en la pistola de

inseminación. De esta manera, el objetivo del estudio consiste en evaluar la eficacia de este protocolo simplificado en comparación con el proceso tradicional, utilizando como parámetros de estudio la integridad del acrosoma y viabilidad del espermatozoide.

MÉTODOS

En este estudio se utilizó semen comercial de 5 toros Holstein y 5 vacas, de la misma raza que los toros, destinadas a ser inseminadas simuladamente. Estos bovinos, fueron escogidos al azar en una finca lechera. Los animales fueron mantenidos y los experimentos realizados en una finca lechera de ganadería de altura en Paluguillo, Pichincha, Ecuador. Primero se inspeccionó la salud de los animales, tomando su temperatura rectal con la ayuda de un termómetro de mercurio y se reportaron los datos obtenidos. Para las inseminaciones simuladas se usó el semen de 10 pajuelas por cada uno de los machos. Estas fueron almacenadas en un tanque de nitrógeno líquido a -196°C . De manera aleatoria, se procedió a realizar simulaciones de los dos tipos de inseminación artificial, obviando el paso de depósito de espermatozoides en el tracto uterino de cada hembra, es decir, realizando la maniobra de inseminación sin cortar el extremo de las pajuelas.

La inseminación artificial tradicional (IAT) se realizó en 5 pajuelas por cada toro, llevando a cabo el proceso secuencialmente con cada una de las pajuelas. El tratamiento control consistió en realizar un procedimiento de inseminación correspondiente al standard, para lo cual se extrajo la pajuela del tanque y se la colocó en un contenedor con agua a 40°C durante 30 segundos. Posteriormente se cargó la pajuela en la pistola de inseminación sin cortar la punta, con el fin de no liberar el semen, y se introdujo en la cavidad vaginal hasta alcanzar el nivel del orificio uterino externo, que para cada hembra se encontraba alrededor de los 38°C . En este último paso la pajuela se dejó en el mencionado sitio anatómico por 20 segundos.

La inseminación artificial simplificada (IAS) (tratamiento experimental) se ejecutó con cada pajuela, de la misma manera que para el otro control, pero en este caso se extrajo la pajuela del tanque de nitrógeno líquido y se la cargó directamente en la pistola de inseminación, sin el paso

previo de descongelación en agua a 40°C. Inmediatamente se la introdujo en el tracto uterino de cada hembra, con la misma temperatura reportada en la primera técnica descrita.

El semen de todas las pajuelas fue recolectado en viales inmediatamente después de haber extraído las pajuelas del tracto genital de la hembra. Los viales con el semen de cada pajuela fueron colocados en baño maría a 37°C y las evaluaciones de varios parámetros seminales fueron realizadas lo más rápido posible. Los parámetros evaluados fueron la integridad del acrosoma y viabilidad de los espermatozoides, usando las tinciones Giemsa y Eosina-Nigrosina, para dichos fines, respectivamente.

La tinción Giemsa se realiza para la evaluación de la integridad del acrosoma. Para este procedimiento se realizó un frotis con 5 ul de material seminal, el cual se secó agitando al aire. Una vez seco se colocaron las placas en etanol al 96% como solución fijadora. Luego de 5 minutos se colocaron las placas en una solución de Giemsa al 6% por 12 horas. Los acrosomas íntegros se observaron de color fucsia o púrpura, y bien definidos.

La tinción Eosina-Nigrosina se realizó con la finalidad de evaluar la viabilidad espermática. Para este fin se mezclaron 5 ul de material seminal con 5 ul de eosina y 5 ul de nigrosina en un vial de 0.5 ml. Inmediatamente se realizó un frotis colocando 5 ul de la mezcla encima del portaobjeto hacia el extremo rotulable. Cada frotis fue rápidamente secado con un secador de cabello. Los espermatozoides considerados vivos fueron los no coloreados o transparentes.

Una vez obtenidas las placas, estas fueron enumeradas y organizadas para cada toro y cada tipo de inseminación artificial. Para ambos casos, se usaron las cifras 1.1, 1.2, etc, donde la unidad entera representó al toro y las décimas correspondieron al tipo de inseminación artificial, donde una décima par pertenecía a la inseminación artificial tradicional (IAT) y una décima impar representaba a la inseminación artificial simplificada (IAS). Para facilitar la evaluación y el análisis estadístico se denominó a la IAT como “control”, mientras que la IAS se nombró como

“experimental”. Cabe recalcar que las placas coloreadas con Giemsa se almacenaron en una caja para portaobjetos diferente a la usada para guardar las placas de Eosina-Nigrosina.

Próximamente se realizó el conteo de cada tinción con un procesamiento doble-ciego, usando un microscopio óptico binocular compuesto, marca Carl Zeiss, con un aumento de 40X. Para cada placa se escogieron diferentes campos ópticos al azar y se contaron un mínimo de 200 espermatozoides por cada pajuela. Las cifras obtenidas del conteo se registraron en una Tabla elaborada en el software Excel. Los porcentajes se calcularon usando las fórmulas “ $(\# \text{ Acrosoma positivo} / \text{Total de espermatozoides}) * 100$ ” y “ $(\# \text{ Espermatozoides vivos} / \text{Total de espermatozoides}) * 100$ ”, para evaluar la integridad del acrosoma y la viabilidad, respectivamente.

Para cada tinción se organizaron los resultados de los porcentajes en diferentes tablas en Excel. Los datos obtenidos fueron ingresados al software Minitab donde se seleccionó la opción “Fit General Lineal Model” para llevar a cabo un diseño de bloques. Se evaluaron los residuales en cada caso para comprobar que los datos cumplan con los supuestos del análisis de varianza (ANOVA) y se analizaron los P-value y los gráficos Box-Plot, con el fin de determinar si existía o no diferencia estadística entre los dos tipos de inseminación artificial.

RESULTADOS

El registro de las temperaturas, corporal y cervical obtenidas de las vacas, durante la ejecución de la inseminación artificial simulada evidenció valores entre 35.4°C y 38.7°C, respectivamente. Mientras tanto la temperatura media ambiental estuvo en un promedio de 14°C (Figura #1). Posteriormente al proceso de IA se obtuvieron espermatozoides que fueron analizados en tinciones Giemsa y Eosina-Negrosina.

Los espermatozoides en tinción Giemsa presentaron una coloración púrpura, donde aquellos con el acrosoma íntegro presentaban dicha estructura fuertemente coloreada de lila oscuro. Mientras tanto, los espermatozoides que tenían afectado o dañado el acrosoma, esta estructura tenía un color lila pálido, uniforme o en parches. Por otra parte, los espermatozoides vivos en la tinción Eosina-negrosina eran transparentes o decolorados, a diferencia de los espermatozoides muertos, los cuales presentaban parte o toda su estructura con una tinción rosada oscura y bien marcada (Figura #3).

Después del conteo se obtuvieron los resultados de los porcentajes de espermatozoides para ambos casos: integridad del acrosoma y viabilidad. En los dos se toma en cuenta sólo los espermatozoides con un acrosoma sano o normal y vivos, obtenidos en los dos tipos de inseminación artificial. Tanto en la Tabla #1 como en la Tabla #3 los tratamientos de inseminación artificial tradicional (control) se presentan como números impares en azul, mientras que los tratamientos de inseminación artificial simplificada (experimental) se presentan como números pares en verde.

En la Tabla #1 el valor mínimo del control es de 61.72% y su valor máximo es de 99.11% de acrosomas íntegros. Por otra parte, el tratamiento experimental presenta un valor mínimo de 51.44% y un valor máximo de 99.19% de espermatozoides con acrosoma positivo. En la Tabla #3 el control posee un valor mínimo de 55.25% y un valor máximo de 68.64% de

espermatozoides viables, mientras tanto, el tratamiento experimental tiene un valor mínimo de 55.25% y un valor máximo de 71.57% de espermatozoides vivos.

En el análisis estadístico tanto del porcentaje de espermatozoides con acrosoma positivo como el porcentaje de espermatozoides vivos se reportan los análisis de varianza, el cumplimiento de los supuestos de ANOVA y un Box-Plot comparativo entre los tratamientos. Además, los valores presentados se obtuvieron a partir de una previa transformación Box-Cox de valor óptimo lambda (λ).

Los resultados de los supuestos de ANOVA para los dos parámetros (Figura #3 y Figura #5), determinan un cumplimiento de cada uno de estos. El histograma detalla una tendencia hacia la derecha en ambos casos (Figura #3C y Figura #5C), lo que determina que posiblemente los datos no siguen una distribución normal. Sin embargo, con el test de normalidad esto puede corroborarse. En A de la Figura #3 y la Figura #5, los puntos cercanos a la línea indican que los datos son normales, por lo que se cumple con el supuesto de normalidad.

En B de la Figura #3 y la Figura #5, los puntos presentan una distribución donde no se forma un patrón circular o una forma de corneta de izquierda a derecha, lo cual determinaría que los resultados no tienen una varianza apropiada, pero esto no aplica para ambos casos, por lo que si se da el cumplimiento al supuesto de igualdad de varianzas.

En D de la Figura #3 y Figura #5, el patrón de líneas ascendentes y descendentes conformados por los puntos de los datos no presentan una tendencia hacia arriba o abajo, esto determina que tanto para el parámetro de integridad del acrosoma, como para el de viabilidad del espermatozoide, se cumple con el supuesto de independencia. De esta forma, se interpreta que en ambos parámetros, existe un cumplimiento de los supuestos y, por ende, los resultados y las interpretaciones obtenidas a partir del análisis de varianza, son correctas.

Comenzando por el parámetro de integridad del acrosoma. Se tiene en este caso la hipótesis nula, la cual es que las medias de espermatozoides con acrosoma sano entre los dos tratamientos no difieren entre sí. Por el contrario, la hipótesis alternativa determina que las medias de este parámetro entre los tratamientos son distintas. Además, se establece un nivel de confianza del 95%.

El análisis de varianza de este caso presenta la fuente (Source) de tratamiento (Tto.) con un P-Value de 0.90 (Tabla #2). Por otra parte, la Figura #4 muestra las cajas comparativas entre los tratamientos control y experimental. El tratamiento control posee un rango intercuartil (IQR) de 9.59, un primer cuartil (Q1) de 86.39, una mediana de 93.16 y un tercer cuartil (Q3) de 95.98. El tratamiento experimental tiene un IQR de 5.64, un Q1 de 90.08, una mediana de 93.86, un Q3 de 95.72. Ambos con un total de 25 muestras. Estos datos y las posiciones de las cajas para ambos tratamientos de la Figura #4, establecen que los rangos se superponen lo que explica que no existe diferencia estadística. Por lo tanto, esto indica con un 95% de confianza, que tanto con la inseminación artificial como con la simplificada, se obtendrá la misma eficiencia de espermatozoides con acrosoma sano.

En el caso del factor de viabilidad, se tiene que la hipótesis nula es que las medias de espermatozoides vivos entre los dos tratamientos no difieren entre sí. Mientras tanto, la hipótesis alternativa establece que existe una diferencia entre las medias de espermatozoides vivos entre los dos tratamientos.

Para este segundo caso, el análisis de varianza presenta al factor tratamiento (Tto.) con un P-Value de 0.59 (Tabla #4). En el Boxplot el tratamiento control se muestra con un IQR de 5.82, un Q1 de 58.23, una mediana de 61.15 y un Q3 de 64.05, mientras tanto, el tratamiento experimental se reporta con un IQR de 6.24, un Q1 de 58.59, una mediana de 61.15 y un Q3 64.83 (Figura #6). Esta información junto con las posiciones de las cajas de ambos tratamientos

de la Figura #6, indican una superposición de los rangos, por lo cual tampoco existe diferencia estadística. La interpretación de estos datos indica que con un 95% de confianza, se obtiene la misma eficiencia de espermatozoides vivos, desde el punto de vista estadístico, al aplicar la inseminación artificial tradicional o la simplificada.

DISCUSIÓN

El promedio de la temperatura corporal de las vacas usadas en este estudio fue de 35.4°C, un valor mayor a los reportados en la literatura, los cuales son: 30.5°C (Isola et al., 2020), y un rango entre 31.24°C y 32.62°C (Rifqi & Mayasari, 2020). A pesar de que el promedio reportado en esta investigación es mayor a otros rangos reportados previamente, se determina que las temperaturas de las vacas fueron óptimas debido a que no superaban los 39.5°C, lo cual indica fiebre en estos animales (Lomb et al., 2020). Por otra parte, el haber obtenido un promedio de temperatura mayor, puede explicarse por la forma en la que se midió este factor. Para este trabajo, se empleó un termómetro rectal, con el cual se pueden tener mediciones más fisiológicas que cuando se usan sensores de temperatura a distancia. Por otra parte, la inmovilización del animal, podría generar un cierto grado de hipertermia inducida por estrés (Wang et al., 2021).

Por otra parte, el promedio de las temperaturas cervicales de las cinco vacas fue de 38.7°C. Este valor indica una temperatura normal del cérvix, dado que el rango normal reportado se encuentra entre 36.1°C-39.9°C (López et al., 2021). Además estos valores de temperatura cervical bovino, se obtienen el día que se realiza la inseminación artificial, en el cual la vaca se encuentra en celo (López et al., 2021). Mientras tanto, el promedio de la temperatura ambiental fue de 14.07°C, valor que se encuentra dentro del rango 5°C-25°C de zona termoneutral, en la que las vacas pueden tener una buena salud y performance (Becker et al., 2020). Por tal razón, este último factor no influyó en el estado de las hembras bovinas, que podría alterar las temperaturas propias del animal.

Los análisis realizados por los dos factores, integridad del acrosoma y viabilidad, determinan que la aplicación de la inseminación artificial simplificada o la tradicional presentan la misma

eficiencia, es decir, demuestran valores estadísticos similares de espermatozoides vivos con acrosomas sanos.

No se han encontrado estudios similares donde se simplifique el procedimiento de la inseminación artificial bovina. Sin embargo, existen análisis del efecto de la temperatura sobre la integridad del espermatozoide. En un estudio, se establece que la supervivencia de los espermatozoides es mayor cuando son descongelados en agua a 65, 67 y 70°C por 7 segundos (Lyashenko, 2015). En otra investigación, se determina que los descongelamientos en agua a 37°C por 45 segundos, y a 70°C por 5 segundos, resultan adecuados para mantener la viabilidad del espermatozoide (Yilmaz et al., 2019).

Sin embargo, cabe recalcar que los datos de los estudios fueron obtenidos en condiciones controladas de laboratorio, lo cual resulta complicado replicar en las condiciones de campo, donde la temperatura exterior influye mucho en la temperatura del agua usada para el descongelamiento (Duarte, 2019). Por otra parte, los cambios de temperatura suscitados durante la inseminación artificial pueden dar lugar al colapso de la membrana, encogimiento y desnaturalización de las proteínas del espermatozoide (Zoi et al., 2019). Además, también se ha reportado que las membranas mitocondriales y la estructura del acrosoma son extremadamente sensibles a los procesos de descongelación (Yilmaz et al., 2019), por lo que el control de los cambios de temperatura en un tiempo determinado se debe llevar con mucha precaución. Por tal razón, la técnica de inseminación artificial simplificada asegura, de forma óptima, la integridad de los espermatozoides.

CONCLUSIONES

Con este trabajo se concluye que es posible simplificar el protocolo estándar existente de inseminación artificial. La eliminación de uno de los varios gradientes de temperatura después de la extracción del semen del tanque de N₂ no aumenta la viabilidad ni la integridad de los acrosomas bovinos. Sin embargo, el acortamiento del procedimiento facilita la logística en las operaciones ganaderas con programas de inseminación artificial, sobretodo cuando se manejan poblaciones animales grandes. De esta manera, estamos haciendo un aporte para lograr la tan deseada diseminación de la inseminación artificial en el Ecuador, promoviendo así, la producción de leche y carne, que son alimentos de la canasta básica y representan el ingreso económico de millones de ecuatorianos.

Gracias a este estudio se ha avanzado en el conocimiento del procedimiento de inseminación artificial y sus etapas críticas. En un futuro se sugiere evaluar la motilidad del espermatozoide y la integridad de la membrana (prueba de choque hiposmótico) del espermatozoide, que permita comprender si la técnica de inseminación artificial simplificada genera resultados similares o mejores en cuanto a dichos parámetros, lo cual contribuirá al conocimiento del efecto de los cambios de temperatura en la estructura de los espermatozoides de toro.

TABLAS

Tabla 1

Tabla #1. Porcentajes de acrosomas positivos de espermatozoides de 5 toros después del tratamiento control y experimental

Toro	Tto.	Acrosoma_Pos
1	1.1	77,41
1	1.2	71,17
1	1.3	61,72
1	1.4	56,15
1	1.5	68,28
1	1.6	68,94
1	1.7	78,97
1	1.8	51,44
1	1.9	75,65
1	1.10	67,05
2	2.1	86,87
2	2.2	94,44
2	2.3	95,88
2	2.4	95,89
2	2.5	92,07
2	2.6	97,27
2	2.7	99,11
2	2.8	99,19
2	2.9	97,73
2	2.10	95,56
3	3.1	96,08
3	3.2	94,26
3	3.3	95,83
3	3.4	96,15
3	3.5	93,04
3	3.6	95,51
3	3.7	89,31
3	3.8	96,23
3	3.9	85,91
3	3.10	97,10
4	4.1	96,36
4	4.2	92,35
4	4.3	96,55
4	4.4	95,35
4	4.5	98,15
4	4.6	93,85
4	4.7	93,27

4	4.8	91,00
4	4.9	93,42
4	4.10	93,55
5	5.1	94,78
5	5.2	90,45
5	5.3	93,16
5	5.4	94,77
5	5.5	91,59
5	5.6	91,96
5	5.7	93,84
5	5.8	93,86
5	5.9	88,29
5	5.10	89,72

Tabla 2

Tabla #2. Análisis de varianza de porcentajes de acrosomas positivos entre los dos tratamientos.

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Tto.	1	0,21	0,208	0,02	0,902
Toro	4	3453,29	863,323	63,90	0,000
Error	44	594,46	13,510		
Lack-of-Fit	4	130,91	32,728	2,82	0,037
Pure Error	40	463,55	11,589		
Total	49	4047,96			

Tabla 3

Tabla #3. Porcentajes de viabilidad de espermatozoides de 5 toros después del tratamiento control y experimental

Toro	Tto.	Vivos
1	1.1	61,15
1	1.2	58,59
1	1.3	58,56
1	1.4	61,86
1	1.5	56,14
1	1.6	63,52
1	1.7	57,66
1	1.8	60,43
1	1.9	62,63
1	1.10	55,25
2	2.1	61,86
2	2.2	58,56

2	2.3	55,25
2	2.4	60,43
2	2.5	57,66
2	2.6	56,14
2	2.7	58,59
2	2.8	61,15
2	2.9	62,63
2	2.10	63,52
3	3.1	64,62
3	3.2	58,59
3	3.3	61,24
3	3.4	57,87
3	3.5	65,14
3	3.6	60,12
3	3.7	60,71
3	3.8	64,67
3	3.9	57,89
3	3.10	66,37
4	4.1	60,14
4	4.2	71,01
4	4.3	68,64
4	4.4	64,95
4	4.5	60,26
4	4.6	58,79
4	4.7	60,71
4	4.8	65,12
4	4.9	62,80
4	4.10	71,57
5	5.1	66,18
5	5.2	64,71
5	5.3	66,41
5	5.4	65,73
5	5.5	66,39
5	5.6	60,00
5	5.7	63,49
5	5.8	57,80
5	5.9	55,93
5	5.10	61,27

Tabla 4

Tabla #4. Análisis de varianza de porcentajes de viabilidad entre los dos tratamientos.

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Tto.	1	0,000000	0,000000	0,30	0,588
Toro	4	0,000000	0,000000	3,21	0,021
Error	44	0,000000	0,000000		

Lack- of-Fit	4	0,000000	0,000000	0,58	0,676
Pure Error	40	0,000000	0,000000		
Total	49	0,000000			

FIGURAS

Figura 1

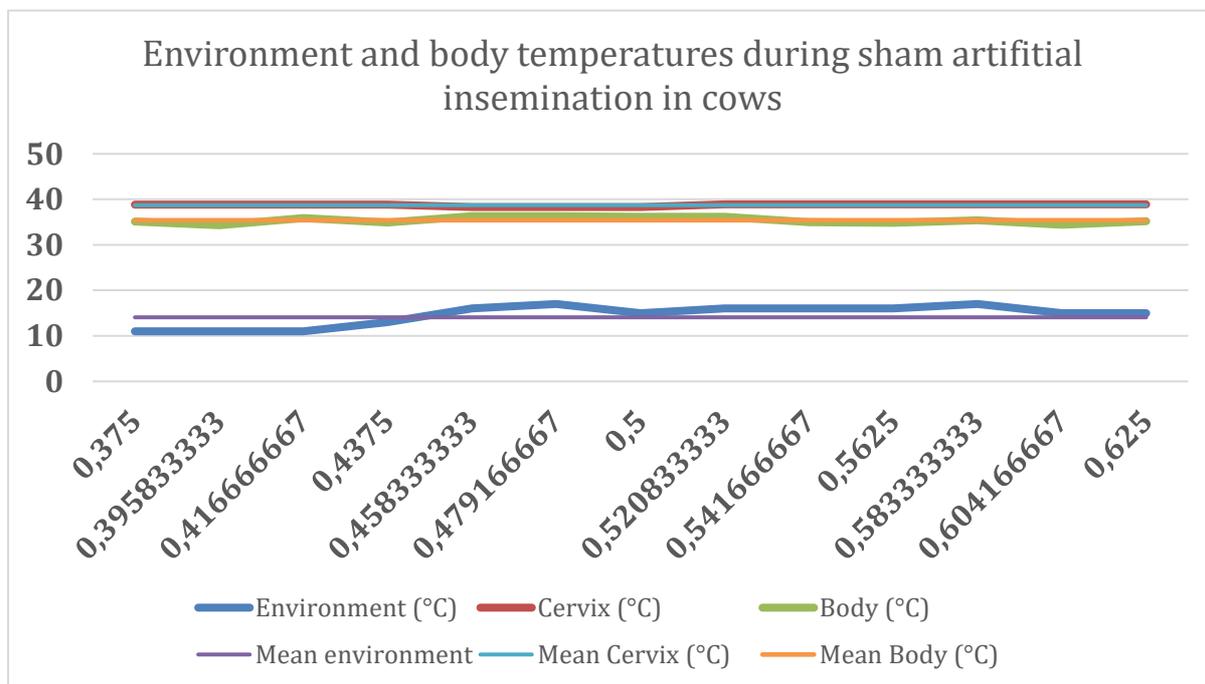


Figura #1. Temperaturas corporales y del ambiente obtenidas al realizar la inseminación artificial en vacas.

Figura 2



Figura #2. Resultados de las tinciones Giemsa y Eosina-Nigrosina. A. Espermatozoides en tinción Giemsa. La flecha verde indica un espermatozoide con un acrosoma normal

(acrosoma positivo). La flecha roja indica un espermatozoide con un acrosoma anormal (acrosoma negativo). **B.** Espermatozoides en tinción Eosina-Negrosina. La flecha verde señala un espermatozoide vivo. La flecha roja señala un espermatozoide muerto.

Figura 3

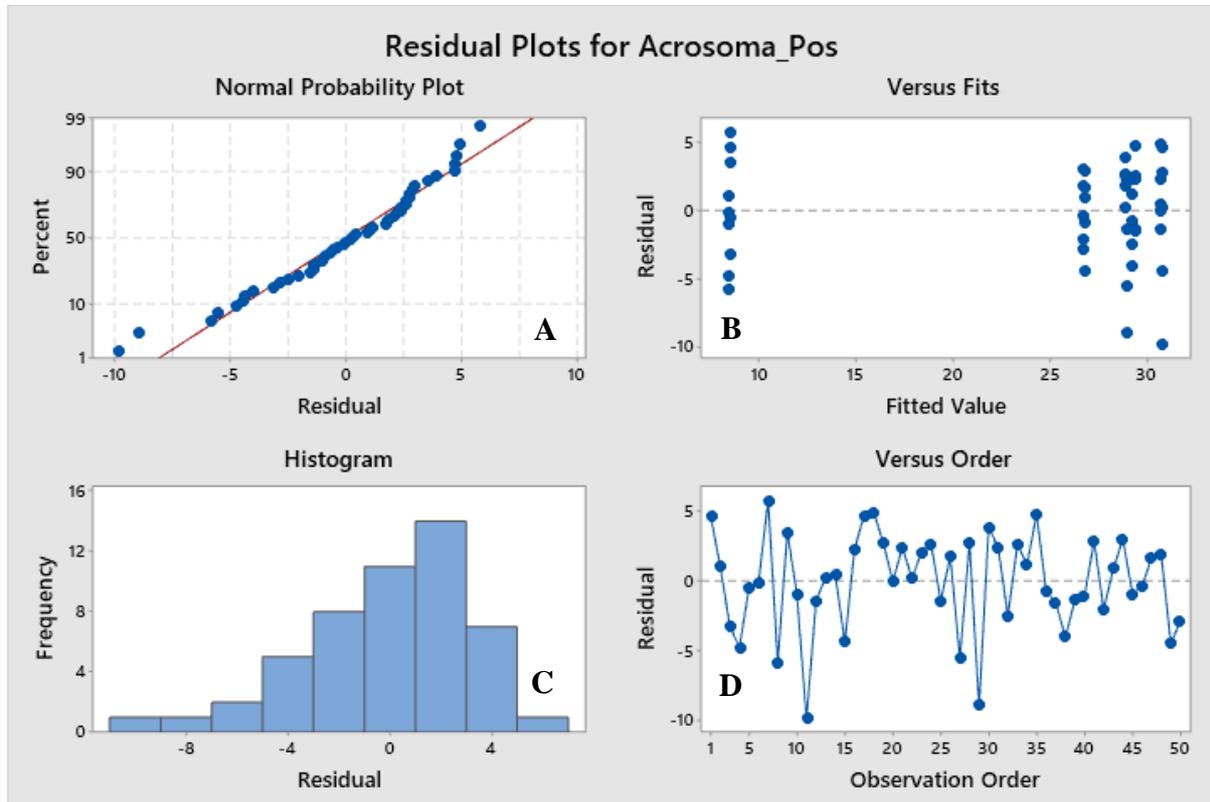


Figura #3. Supuestos de ANOVA de los porcentajes de espermatozoides con acrosoma positivo después de los tratamientos control y experimental.

Figura 4

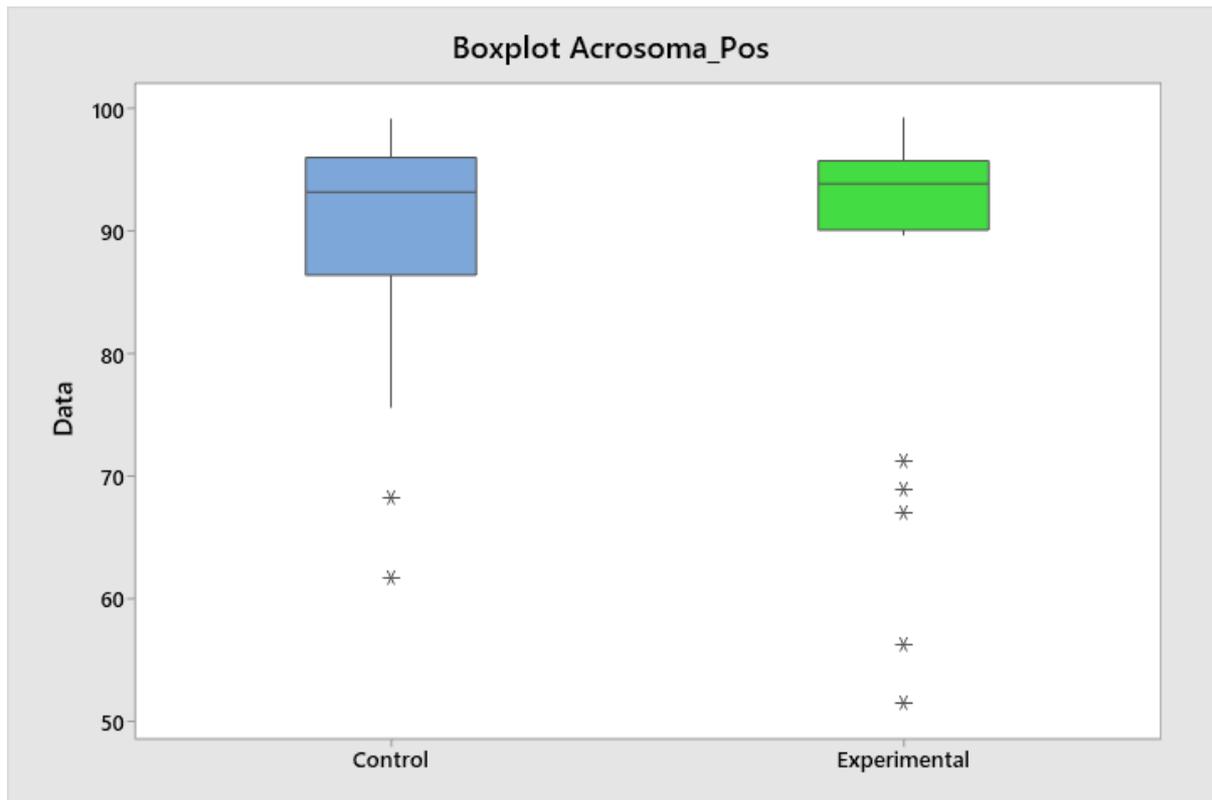


Figura #4. Box-Plot comparativo entre los porcentajes de espermatozoides con acrosoma positivo obtenidos en los tratamientos control y experimental.

Figura 5

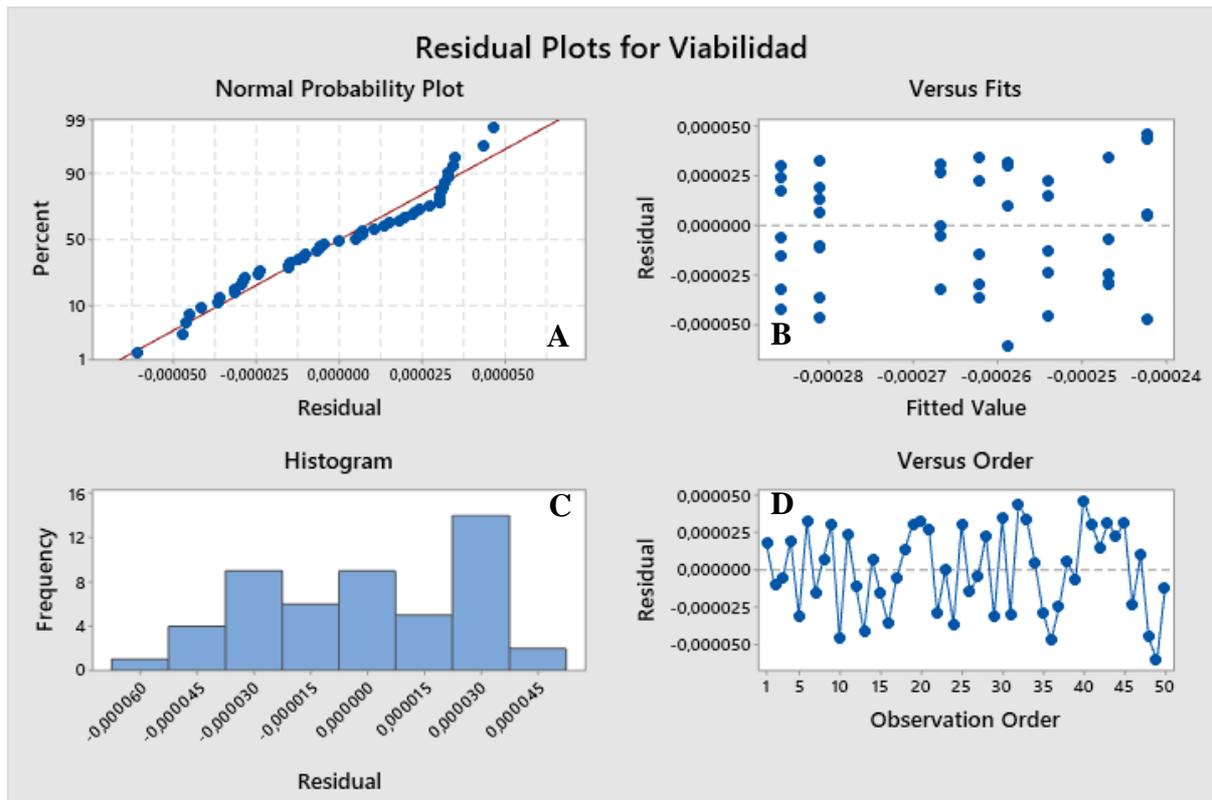


Figura #5. Supuestos de ANOVA de los porcentajes de espermatozoides vivos después de los tratamientos control y experimental.

Figura 6

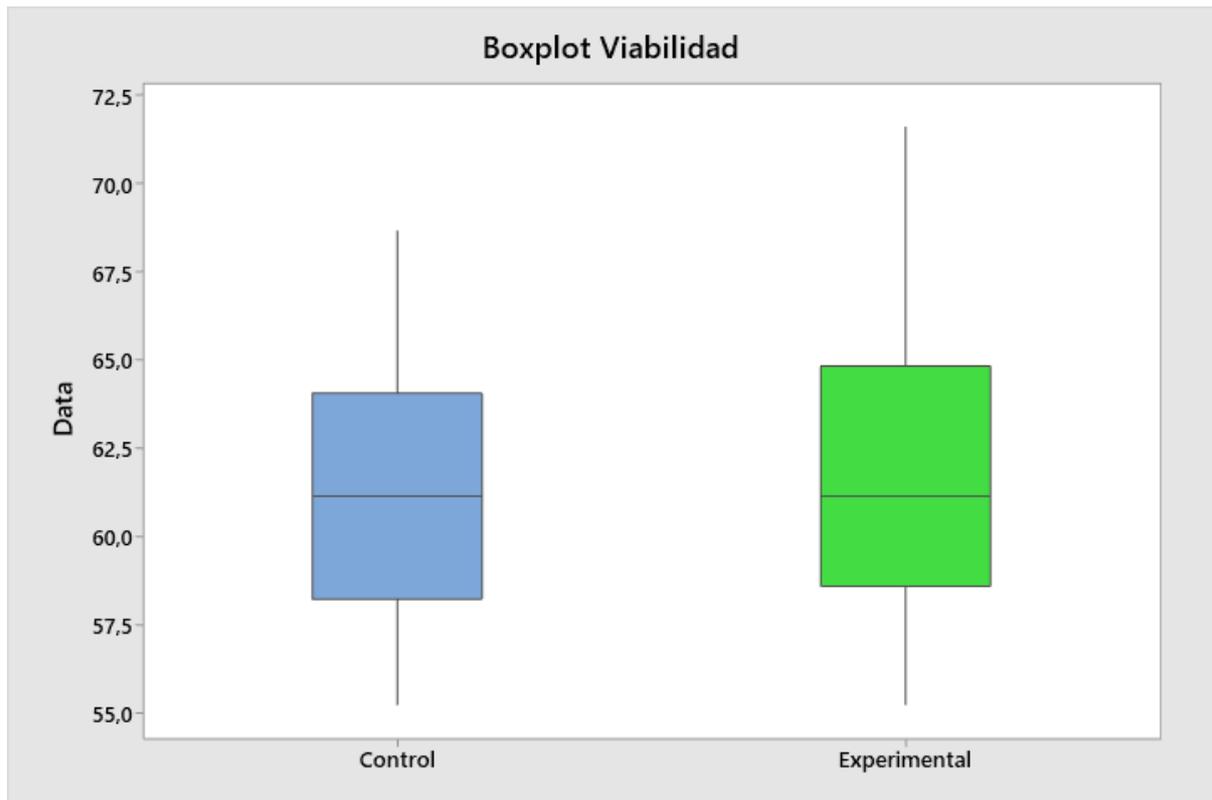


Figura #6. Box-Plot comparativo entre los porcentajes de espermatozoides vivos obtenidos en los tratamientos control y experimental.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Becker, C., Collier, R. & Stone, A. (2020). Invited review: Physiological and behavioral effects of heat stress in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 103(8), 6751-6770.
- CEPAL. (2019). *Balance Preliminar de las Economías de América Latina y el Caribe*. Santiago, Chile: Naciones Unidas.
- Cerón, J. & Ortega, A. (2009). Manuak de inseminación artificial en bovinos. *Universidad Nacional Autónoma de México*. Obtenido el 2 de diciembre de 2021 de https://fmvz.unam.mx/fmvz/principal/archivos/Manuales/50_Inseminacion_artificial.pdf
- FAO. (2021). *Dairy Market Review*. Roma, Italia: FAO.
- FAO. (2021). Gateway to dairy production and products. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. Obtenido el 30 de noviembre de 2021 de <https://www.fao.org/dairy-production-products/production/en/>
- Fontes, P., Oosthuizen, N. & Cliff, G. (2020). Reproductive management of beef cattle en W. Bazer, G. Cliff & G. Wu., *Animal Agriculture: Sustainability, Challenges and Innovations*. Academic Press.
- García, B. & Orellana, E. (2020). *Introducción de la inseminación artificial utilizando sincronización de celo en un hato de ganado de carne* [Tesis de grado]. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano.
- Hidalgo, M., Vargas, O. & Vite, H. Análisis situacional de la actividad ganadera en la parroquia Palmales del cantón Arenillas. *Revista Científica Multidisciplinaria de la Universidad Metropolitana de Ecuador*, 3(2), 125-130.
- Isola, J., Menegazzi, G., Busanello, M., Santos, S., Agner, H. & Sarubbi, J. (2020). Differences in body temperature between black-and-white and red-and-white Holstein cows reared on a hot climate using infrared thermography. *Journal of Thermal Biology*, 94(34).
- JICA. (2012). Manual para inseminador. *Agencia de Cooperación Internacional del Japón*. Obtenido el 2 de diciembre de 2021 de [ww.jica.go.jp/nicaragua/espanol/office/others/c8h0vm000001q4bc-att/19_agriculture08.pdf](http://www.jica.go.jp/nicaragua/espanol/office/others/c8h0vm000001q4bc-att/19_agriculture08.pdf)
- Lomb, J., von Keyserlingk, M. & Weary D. (2020). Behavioral changes associated with fever in transition dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 103(8), 7331-7338.
- López, F., Garcia, I. & Hunter, R. (2021). Cervix-rectum temperature differential at the time of insemination is correlated with the potential for pregnancy in dairy cows. *Journal of Reproduction and Development*, 67(4), 251-255.
- Lyashenko, A. (2015). Effect of different thawing procedures on the quality and fertility of the bull spermatozoa. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 4(1), 17-21.

- MAG. (2020). “Ecuador se nutre de leche” y el sector lácteo se fortalece con apoyo del Gobierno Nacional. *Ministerio de Agricultura y Ganadería*. Obtenido el 30 de noviembre de 2021 de <https://www.agricultura.gob.ec/ecuador-se-nutre-de-leche-y-el-sector-lacteo-se-fortalece-con-apoyo-del-gobierno-nacional/>
- MLA. (2021). Global beef industry and trade report. *Meat & Livestock Australia*. Obtenido el 30 de noviembre de 2021 de <https://www.mla.com.au/globalassets/mla-corporate/prices--markets/documents/os-markets/red-meat-market-snapshots/2021/global-beef-industry-and-trade-report.pdf>
- Morgan, H., Eid, N., Khoshkerdar, A. & Watkins, A. Defining the male contribution to embryo quality and offspring health in assisted reproduction in farm animals. *Animal Reproduction*, 17(3), 1-14.
- Naranjo, J. & Ruiz, Jhon. (2020). Regarding some myths and realities about cattle livestock production. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 21(3), 1-13.
- Parkinson, T. & Morrell J. (2019). Artificial Insemination en D. Noakes, T. Parkinson & G. England, *Veterinary Reproduction and Obstetrics*
- Pulina, G., Acciaro, M., Atzori, A., Battacone, G., Crovetto, G., Mele, M., Pirlo, G. & Rassu, S. Animal board invited review-Beef for future: technologies for a sustainable and profitable beef industry. *Animal*, 15(11), 1-15.
- Rifqi, M. & Mayasari, N. (2020). Physiological characterization through body temperature and respiration frequency of beef cattle in Pangandaran. *Big Data in Agriculture*, 2(2), 63-64.
- Ríos, J. (2018). *Análisis costo-beneficio comparando inseminación artificial a tiempo fijo con inseminación artificial convencional en Hacienda Surrumbay, Colombia* (Tesis de grado). Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano.
- Ritchie, H. & Roser, M. (2017). Meat and Dairy Production. *Our World in Data*. Obtenido el 29 de noviembre de 2021 de <https://ourworldindata.org/meat-production#citation>
- Roa, N., Kamimura, S., Kurataki, H., Hamana, K., Shibata I. & Linares, T. Novel IC Thermometer Placed in the Uterotubal Junction to Measure Bovine Uterine Temperature. Technical Note. *Rev. Cient. (Maracaibo)*, 16(4), 315-324.
- Sigauco, D. & Terré, E. (2021). La importancia de la ganadería para la economía argentina. *Bolsa de Comercio de Rosario*. Obtenido el 30 de noviembre de 2021 de <https://www.bcr.com.ar/es/mercados/investigacion-y-desarrollo/informativo-semanal/noticias-informativo-semanal/la-48>
- Wang, F., Shih, J., Juan, P., Su, Y. & Wang, Y. Non-invasive cattle body temperature measurement using infrared thermography and auxiliary sensors. *Sensors*, 21(2425), 1-16.
- Yilmaz, E., Ak, K. & Baran, A. (2019). Effect of Different Thawing Time and High Temperature on Frozen Thawed Bull Semen Traits. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 18(7), 239-245.

Zoi, A., Moreira, H., Valadao, L. & Moreira, F. (2019). Effect of Fructose on Thawed Bull Semen's Viability Obtained by Post-Mortem Collection. *Biomedical*, 19(3), 14319-14323.