

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

ESCUELA DE POSGRADO

MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN ANIMAL



**“FERTILIDAD DE SEMEN CONGELADO DE TOROS
NACIONALES HOLSTEIN USANDO LOS DILUTORES
LECHE-YEMA, TRIS-YEMA Y TRILADYL”**

Presentada por:

CÉSAR PASCUAL SUÁREZ SUÁREZ

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAGISTER SCIENTIAE
EN PRODUCCIÓN ANIMAL**

**Lima – Perú
2015**

DEDICATORIA

A MI SEÑORA ESPOSA, POR SU AMOR, COMPRENSIÓN Y EJEMPLO DE EMPRENDIMIENTO PROFESIONAL Y MADRE.

A MIS HIJOS, POR SER ELLOS LA RAZÓN DE MI VIDA, MI ESPERANZA Y MOTIVACIÓN DE SUPERACIÓN.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darnos la vida, a la Virgen de Chapi, por ser ejemplo de madre que fortalece nuestra fe.

A la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, mi alma Mater y a sus Autoridades liderado por el Ex Rector, Dr. Juan Manuel Guillen Benavides, por haberme brindado la posibilidad de seguir estudios de Maestría y haber concluido la presente tesis.

A CONCYTEC, por el apoyo económico que hizo posible el financiamiento de mis estudios de maestría a través de una beca completa.

A mi esposa e hijos, por darme la oportunidad de superación profesional.

A mis padres políticos Benedicta Quispe y Pedro Paucar por su aprecio y apoyo moral a mi formación profesional.

Al Mg.Sc. Próspero Cabrera Villanueva, patrocinador de la tesis, por su valiosa contribución al trabajo, consejos y orientación profesional.

A los miembros del Jurado, Mg.Sc. Marcial Cumpa Gavidia (Presidente), Mg.Sc. Próspero Cabrera Villanueva (Patrocinador), Mg.Sc. Enrique Alvarado Malca (Miembro) y Dr. Jorge Aliaga Gutiérrez (Miembro), por los aportes y exigencias hechas al presente trabajo.

A los docentes de la Universidad Agraria La Molina por sus sabios conocimientos impartidos en la aulas y laboratorios, por ser buenos maestros y mejores amigos.

A los docentes y alumnos de la Escuela de Agronomía de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa por ser fuente permanente de superación profesional.

A los trabajadores del Banco Nacional de Semen, quienes me apoyaron en todo momento en la realización del presente trabajo de investigación.

A mis amigos trabajadores del Módulo de Majes de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, por haber compartido conmigo sus experiencias y conocimientos.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Planteamiento del problema	1
1.2. Objetivos	2
1.3. Justificación	3
II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. Proceso histórico de la dilución y conservación del semen	4
2.2. Trayectoria de la inseminación artificial, dilución y conservación de semen en el Perú	5
2.3. Dilución y uso del semen	6
2.3.1. Dilución	7
2.3.2. Uso de semen diluido refrigerado	10
2.4. Tasa de dilución y congelación espermática	13
2.5. Uso de semen congelado	15
2.6. Métodos de congelación	16
2.6.1 Nieve carbónica y alcohol	16
2.6.2 Método nitrógeno líquido	16
2.6.3 Método Plantas criógenas automáticas	17
2.7. Respuestas de motilidad, fertilidad y número de servicios por preñez, con semen congelado	17
2.7.1. Respuesta de motilidad	17
2.7.2. Respuesta de fertilidad	18
2.8. Factores que contribuyen a las fallas de fertilización en vacunos	19
2.8.1. Factores que afectan la fertilidad en la hembra	20
2.8.2. Factores que afectan la fertilidad en el macho	27
III. MATERIALES Y MÉTODOS	32
3.1. Localización	32
3.2. De los sementales, materiales y dilutores	32
3.2.1. Sementales	32
3.2.2. Materiales	33

3.2.3. Dilutores	33
3.3. Procedimiento de colección y evaluación seminal	33
3.3.1. Colección de semen	33
3.3.2. Evaluación del semen	34
3.4. Dilutores, proceso de preparación y dilución	37
3.4.1. Dilutor Leche – Yema	37
3.4.2. Dilutor Tris – Yema	39
3.4.3. Dilutor Triladyl	40
3.5. Procedimiento de envasado, ambientación y congelación	41
3.5.1. Envasado	41
3.5.2. Ambientación	42
3.5.3. Congelación	42
3.6. Procedimiento de inseminación artificial y evaluación de la fertilidad	43
3.6.1. Inseminaciones	43
3.6.2. Colección de datos	43
3.7. Índices y fórmulas usadas para el cálculo de parámetros reproductivos	44
3.8. Análisis estadístico	45
3.8.1. Fase de laboratorio	45
3.8.2. Fase de campo	46
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
4.1. Motilidad espermática en semen puro, diluido y congelado	47
4.2. Motilidad espermática y porcentaje de fertilidad	51
4.3. Porcentaje de preñez según dilutor usado en total de vacas servidas	54
4.3.1. Número de servicios por preñez en total de vacas servidas	55
4.3.2. Porcentaje de preñez en total de vacas servidas	56
4.4. Número de servicios y porcentaje de preñez en vaquillonas	56
4.4.1. Número de servicios por preñez	56
4.4.2. Porcentaje de preñez	57
V. CONCLUSIONES	59
VI. RECOMENDACIONES	60
VII. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA	61
VIII. ANEXOS	68

INDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Porcentajes promedio de motilidad espermática en las diferentes fases de procesamiento y congelación del semen.	48
Cuadro 2. Disminución de la motilidad espermática en las fases del proceso de congelación.	48
Cuadro 3. Análisis de variancia para semen diluido glicerinado “Fase I”.	49
Cuadro 4. Análisis de variancia para semen refrigerado en ambientación “Fase II”.	50
Cuadro 5. Análisis de variancia para semen diluido congelado.	51
Cuadro 6. Motilidad espermática y porcentajes de fertilidad en vacas según dilutor utilizado.	53
Cuadro 7. Número de servicios y porcentaje de preñez en total de servicios efectuados, según dilutor utilizado.	55
Cuadro 8. Porcentaje de fertilidad y número de servicios por preñez en grupos de vaquillonas, vacas de uno a tres partos y vacas de cuatro a más partos.	58

FERTILIDAD DE SEMEN CONGELADO DE TOROS NACIONALES HOLSTEIN USANDO LOS DILUTORES “TRIS-YEMA, LECHE-YEMA Y TRILADYL”.

RESUMEN

En el Banco Nacional de Semen de la Universidad Nacional Agraria La Molina, se llevó a cabo un experimento con la finalidad de evaluar la eficacia de tres dilutores (Tris-yema, Leche-yema y Triladyl) en muestras de semen de dos toros jóvenes y determinar su influencia sobre la motilidad espermática en las diferentes fases del procesamiento y congelación del semen; así como determinar el efecto del semen congelado sobre la fertilidad en vacas y vaquillonas para primer servicio en campo. Los eyaculados provenientes fueron de un total de 24 colecciones por el método de la vagina artificial realizándose evaluaciones macroscópicas y microscópicas de la calidad del semen, siendo la concentración espermática promedio del semen puro de 1,324'625,000 de espermatozoides por centímetro cúbico. La tasa de dilución de 1:18 y la concentración espermática en semen diluido de 30 millones de espermatozoides por dosis (pajillas) de 0.5cc. Las muestras fueron colectadas y procesadas en el Laboratorio del Banco Nacional de Semen de la Universidad Agraria La Molina, comprendidos entre Enero a Marzo de 1998.

En el proceso de congelación se realizaron controles de la motilidad espermática en las tres fases, luego del glicerinado (I) después del equilibrio (II), y finalmente post-congelado descongelado (III), por medio de un Microscopio. El semen diluido fue llenado en pajillas identificadas de 0.5cc de capacidad, selladas con alcohol polivinílico, llevadas a ambientación por 18 horas y congeladas en Nitrógeno líquido. El análisis de varianza mostró que los tres dilutores conservaron homogéneamente la misma proporción de la motilidad en las tres fases, sobre todo en la fase congelación-descongelación que provocó el descenso más marcado de la motilidad siendo la misma de: 64.16 %, 66.22 % y 66.66 % respectivamente.

Las dosis en una concentración de treinta millones de espermatozoides por pajilla de semen congelado, fueron distribuidas por servicios al azar en vaquillonas y vacas de primer servicio sin problemas reproductivos y con un buen manejo técnico en los hatos ganaderos de las secciones A, B y C de la Irrigación de Majes (Arequipa). La inseminación

fue entre mayo a diciembre de 1998, para evaluar la fertilidad en campo. Se realizó ciento treinta y seis (136) inseminaciones entre vaquillonas, vacas de uno, dos, tres, cuatro y más partos para primeros servicios; luego de los 60 días post servicio se efectuó el diagnóstico de preñez por el método de palpación rectal profundo; se evaluaron comparativamente las tasas de preñez obtenidas con el semen diluido en Tris-yema, Leche-yema y Triladyl, respectivamente. Todas las comparaciones entre los dilutores usados, fueron hechas en base a porcentaje de preñez y analizadas mediante pruebas de Chi (χ^2) Cuadrado. No se encontró diferencias estadísticas significativas ($P>0.05$) entre los dilutores para el porcentaje de preñez al primer servicio. Siendo el número de servicios por preñez (primeros servicios) para el semen diluido en Tris-yema, Leche-yema y Triladyl de: 1.38, 1.51 y 1.21; respectivamente y el porcentaje de preñez fue de: 72.3 %, 65.9 % y 82.2 % respectivamente.

Se efectuó un estudio de correlación entre el porcentaje de supervivencia post congelación–descongelación y el porcentaje de fertilidad en campo, se encontró una correlación muy baja no significativa ($r=0.26$). Finalmente se realizó el Análisis Estadístico de los porcentajes de fertilidad de 86,67 % y 66.87 % para vaquillonas y vacas a primer servicio, demostró una diferencia estadística significativa ($p\leq 0.05$) de los promedios de fertilidad alcanzados por las vaquillonas sobre los de las vacas de uno a mas partos.

Palabras claves: Dilutores, semen, motilidad, fertilidad

FERTILITY OF FROZEN SEMEN USING NATIONAL HOLSTEIN BULLS DILUTERS “TRIS-YEMA, MILK-YEMA AND TRILADYL”.

ABSTRACT

In the National Sperm Bank of the Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), an experiment was carried out to evaluate the effectiveness of three diluters (Tris-yema, Milk-yema and Triladyl) in semen samples from two young bulls and determine their influence on sperm motility, in different stages of processing and freezing, as well as to determine the effect of frozen semen on fertility in cows and heifers for first field service semen.

One hundred and thirty six (136) inseminations between heifers, cows of one, two, three, four or more deliveries for first services were performed, then 60 days after service pregnancy diagnosis by rectal palpation method deep was made; rates are comparatively evaluated pregnancy obtained with semen diluted in Tris-yema- Milk- yema and Triladyl respectively. All comparisons between diluters used were made based on pregnancy rate and analyzed using Chi (χ^2) Square. No statistically significant differences ($P > 0.05$) between diluters for pregnancy rate to first service were found. As the number of services per pregnancy (first serve) for semen diluted in Tris - yema, Milk - yema and Triladyl: 1.38, 1.51 and 1.21 , respectively , and the pregnancy rate was: 72.3 % , 65.9 % and 82.2% respectively.

Finally, Statistical analysis of the percentages of 86.67 % fertility and 66.87 % for heifers and cows at first service, showed a statistically significant difference ($p < = 0.05$) of average fertility achieved by heifers was performed on cows from one to more births.

Keywords: extender, semen, motility, fertility

I. INTRODUCCIÓN

La Inseminación Artificial es una técnica empleada con éxito en la producción ganadera, la misma que contribuye de forma rápida, efectiva y económica al progreso de la ganadería lechera del país; lo que constituyó una razón fundamental de realizar investigaciones sobre esta materia, en el Banco Nacional de Semen y fué sin duda la de mejorar las condiciones crioconservantes del semen congelado, que permitan diluir y conservar en condiciones óptimas el poder fecundante de los espermatozoides por tiempo prolongado, lo cual en vacunos es una realidad.

Los elementos de mayor importancia en la elaboración de la dosis son el dilutor del semen, por su contenido de nutrientes y agentes crio-protectores, así como el procesamiento mismo del semen durante la congelación, porque de ellos depende en gran medida la viabilidad espermática, que permitirá alcanzar una mayor tasa de fertilidad.

La investigación se realizó en dos etapas. La primera de laboratorio, que consistió en la preparación de la dosis según dilutor empleado, mediante el procedimiento de colección, dilución y congelación y fueron realizadas en las instalaciones del Banco Nacional de Semen de la Universidad Agraria La Molina, ubicado en el Distrito de la Molina del departamento de Lima; y la segunda etapa de campo para pruebas de fertilidad, fueron realizadas en vaquillonas y vacas de la raza Holstein de ganaderos de la Irrigación de Majes, provincia de Caylloma, región Arequipa, teniendo como objetivo evaluar la eficacia de tres dilutores, sobre la motilidad espermática en las diferentes fases del procesamiento y congelación del semen, determinando su respuesta sobre la fertilidad en campo.

1.1 PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA

La Región Arequipa representa la primera cuenca lechera del país con el mayor número de

pequeños ganaderos que producen el mayor volumen de leche a nivel nacional, seguida de Cajamarca y Lima, las mismas que presentan bajos rendimientos de leche, debido a una limitada mejora genética, por desconocimiento del uso de semen congelado de toros jóvenes con pruebas de habilidad transmisora positivas, probada o estimada, (HTPE+) para leche, y de la calidad en la elaboración de la dosis.

Es necesario efectuar un estudio que permita que la difusión del material espermático de alta calidad genética, elaborado en el Banco Nacional de Semen, alcance niveles de eficacia que se traduzca en elevadas tasas de concepción, el manejo adecuado de las diferentes variables que intervienen en el proceso de congelación del semen; desde la elaboración misma de las soluciones dilutoras, la manipulación del semen diluido, hasta su transporte en forma de dosis para su óptima siembra en el aparato genital de la hembra.

Pregunta de investigación:

¿Es necesario efectuar un estudio de las nuevas fórmulas de soluciones dilutoras comerciales para semen de toro, y probar su eficacia sobre la congelación de semen y su fertilidad en campo?

1.2 OBJETIVOS

Los objetivos planteados para el desarrollo del presente trabajo de investigación fueron:

- Evaluar la eficacia de dilutores Tris-yema, Leche-yema y Triladyl-yema, sobre la motilidad espermática en las diferentes fases del procesamiento y congelación del semen.
- Determinar la respuesta del uso de tres dilutores de semen congelado sobre la fertilidad en vacas y vaquillonas.

1.3 JUSTIFICACIÓN

En el Perú el año 1945 se crea el servicio de Inseminación artificial en el Perú y se inicia las primeras inseminaciones en ganado vacuno, usándose el dilutor Yema-Fosfato preservándose en forma refrigerada por varios días. A partir de 1950, el servicio se hace extensivo al campo variándose la fórmula del dilutor a Yema-Citrato, en el Banco de semen, la cual facilitó mucho la visibilidad de los espermatozoides en el microscopio. (Cunliffe, 1990). En 1977, se introduce un cambio que facilitó mucho la congelación, el “Dilutor Tris”, el cual permite realizar la adición del dilutor glicerinado a medio ambiente, eliminando el trabajo de la cámara fría. (Flores M., et al., 1982).

Dentro de las labores propias del Banco Nacional de Semen, se ha venido utilizando por varios años el dilutor Tris-yema; sin embargo en el mercado internacional, existen actualmente nuevas fórmulas de dilutores comerciales para semen de toro, que es necesario probar su eficacia sobre la congelación de semen y su fertilidad en campo, lo que justificó plenamente la realización del presente trabajo de investigación, contribuyendo con este estudio al desarrollo de la inseminación artificial que es una de las actividades principales de forma rápida, efectiva y económica en que se basa el progreso de la ganadería lechera del país.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 PROCESO HISTÓRICO DE LA DILUCIÓN Y CONSERVACIÓN DE SEMEN

El semen se diluye por razones técnicas y biológicas, ampliando su volumen, de tal manera que permita la distribución de la dosis con una determinada concentración espermática, conservando su capacidad fecundante a lo largo de todas las fases del procedimiento de congelación, e inseminación artificial.

Hoffman, 1905, experimentó con leche fresca e Ivanov, 1913, formuló medios dilutores isotónicos con soluciones electrolíticas (ClNa, ClK, etc). Wolf, 1920, señala la importancia de añadir tampones al dilutor. Phillips, 1939, formuló el dilutor Yema-Fosfato, logrando supervivencias de las células espermáticas durante 180 horas, a 4–10°C. Salisbury, 1942, da a conocer el dilutor Yema-Citrato, el cual mostró ventajas evidentes sobre el Yema-Fosfato; si bien sufrió en 1956 algunas modificaciones, es este el dilutor más usado actualmente. Mirkhaylov, 1949, utiliza leche hervida, refrigerada y filtrada con gran éxito. Es así que en 1955, tras el descubrimiento de la adición de antibióticos y sulfas, queda resuelto el problema de la dilución del esperma (Pérez y Pérez, 1985).

La conservación del semen a bajísimas temperaturas a constituido sin duda uno de los adelantos más importantes en la técnica de la inseminación artificial. En los estudios sobre este procedimiento, Pérez y Pérez (1985), cita a Spallanzani, 1776, haber realizado observaciones sobre el efecto de la nieve en espermatozoides de padrillos equinos. El descubrimiento de nuevos medios para conseguir bajísimas temperaturas, decidió a muchos científicos, investigar la conservación en frío de células y tejidos.

Durante los inicios del siglo XX, los medios estuvieron disponibles para congelar semen a temperaturas mucho más bajas, usando refrigeración, o gases artificialmente solidificados o licuados. Ivanov, 1907, encontró que algunos espermatozoides del caballo conservaban,

un movimiento vibratorio débil después de congelación a -15°C , pero no hubo células móviles en el semen congelado, enfriado a -100°C . Sin embargo, Jahnel, 1938 demostró que el semen humano podía ser congelado en hielo seco (-79°C) nitrógeno líquido (-196°C) a temperaturas del helio líquido (-296°C); los espermatozoides permanecieron móviles aún después de 45 días del almacenamiento congelado (Salamón et. al., 1990).

En enero de 1951, se reportó el primer ternero nacido de semen congelado en Inglaterra por D.L. Stewart, utilizando procedimientos que comprendían la adición de glicerina al diluyente descrito por A.V. Smith y Chris Polge, 1950. En 1952, Polge y Rowson de la Universidad de Cambridge habían avanzado en la técnica de congelación del semen y se fecundaron 30 vacas con su sistema; estos investigadores iniciaron el uso de glicerina en el dilutor para luego congelar el esperma a -79°C . Se hicieron pruebas para congelar el semen con hielo seco, oxígeno líquido y nitrógeno líquido, resultando el nitrógeno líquido el más adecuado para la conservación del semen por largo tiempo (Walton, 1984; Pérez y Pérez, 1985; Hafez, 1989).

En 1956, Union Carbide trabajando conjuntamente con American Breeder Service (ABS), inventó un recipiente termostato para trasladar el semen de una finca a otra con duración de dos semanas. En un principio, se usaron casi exclusivamente ampollas de vidrio para congelar el semen, posteriormente CASSOU, desarrolló la pajilla de cloruro de polivinilo con todas las ventajas que ello implicó: mayor facilidad de manejo, mayor capacidad de almacenamiento, mayores condiciones sanitarias, mayores tasas de concepción, etc, (Hafez, 1989).

2.2 TRAYECTORIA DE LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL, DILUCIÓN Y CONSERVACIÓN DE SEMEN EN EL PERÚ

En 1943, el Dr. Mackenzie, realizó las primeras inseminaciones en ganado ovino en el Perú, en la hacienda LAIVE (Huancayo). El servicio de Inseminación artificial en el Perú fue creado en el año 1945, el mismo que se implementó con 4 toretes de la raza Holstein importados de Canadá. En 1946, se hicieron las primeras inseminaciones en ganado

vacuno, usándose el dilutor Yema – Fosfato preservándose en forma refrigerada por varios días, éste dilutor era la mezcla en partes iguales de yema de huevo con una solución de fosfatos de sodio y potasio. Este método satisfacía bien si las distancias eran cortas, si se tenía una densidad de vacas no muy alta (FAO, 1978).

En 1948, en la cuenca de Cajamarca, se inició el servicio de inseminación artificial con el uso de semen fresco refrigerado. En 1949, se da inicio en forma oficial la inseminación artificial en Arequipa, con tres sementales de la granja Carnation de U.S.A., importados por GLORIA S.A. A partir de 1950, el servicio se hace extensivo a la campiña (Gloria, 1986), en ese mismo año se varía la fórmula del dilutor a Yema-Citrato en el Banco de semen, usando sólo 20 por ciento de yema de huevo, la cual facilitó mucho la visibilidad de los espermatozoides en el microscopio.

El Ministerio de Agricultura en 1953, introduce la técnica de congelación de semen en el Perú, con la visita del Dr. Christopher Polge, de nacionalidad Inglesa (Cunliffe, 1990). Los primeros ensayos se hicieron con hielo seco y sal, pero la gran cantidad requerida y otros múltiples problemas originaron que se dejara de lado. Su trascendencia no fue mayor, así mientras 13369 vacas se inseminaron con semen fresco, en la cuenca de Lima en ese año sólo 270 vacas lo fueron con semen congelado.

En 1977, se introduce un cambio que facilitó mucho la congelación, el “Dilutor Tris”, el cual permite realizar la adición del dilutor glicerinado a medio ambiente, eliminando el trabajo de la cámara fría. En 1982, se termina la construcción de las oficinas y laboratorios del Banco Nacional de Semen, el nuevo laboratorio sumamente moderno, se implementó con equipos CASSOU & SON, de la firma francesa Instruments the Medecine Veterinaire, lo que significó la introducción de la pajilla francesa, método que reactivó tremendamente el servicio (Flores M., et al., 1982).

2.3 DILUCIÓN Y USO DEL SEMEN

El esperma eyaculado no sobrevive por períodos largos a no ser que se le agreguen ciertas sustancias, al conjunto de los cuales se les llama dilutor, éstos deben ser preparados en

forma aséptica, con sustancias puras y equipos limpios para excluir materiales tóxicos al ambiente espermático. Según Hafez (1989), las características de un buen dilutor deben ser:

- Proveer nutrientes.
- Dar protección contra los efectos dañinos del enfriamiento.
- Acción buffer.
- Mantener la presión osmótica y balance electrolítico.
- Inhibir el crecimiento bacterial.
- Aumentar el volumen del semen.
- Proteger las células espermáticas en el congelamiento.

El semen se conserva fluido o congelado. Pudiendo ser fluido a temperatura ambiente (18-25°C). Cada método tiene diferentes dilutores según los requerimientos ya sea para semen fluido, a medio ambiente, semen fluido refrigerado (no llevan glicerina), o para semen congelado que lleva el crioprotector glicerina.

2.3.1 Dilución

La dilución del semen se realiza por dos razones: a) Razones técnicas, por la mayor capacidad de uso de machos valiosos y para incrementar un número relativamente más grande de hembras que sería esperado por monta natural; y b) Razones biológicas, porque los dilutores apropiados proveen nutrientes para los espermatozoides, soluciones buffer que impiden cambios en pH, proveen un medio isotónico, y adicionalmente contrarrestan el shock del frío cuando se refrigera y congela el semen (Salamon et. al., 1990; Alvarado et. al., 1997).

Los criterios fundamentales en la evolución de los dilutores desde las primeras investigaciones, estuvieron referidas al tiempo de mantención y al grado de la motilidad espermática, relacionando estas características con la capacidad fecundante de los espermatozoides. Se ha determinado la alta correlación entre ambos parámetros, utilizándose como un buen índice de la calidad del semen, la motilidad obtenida, en el

semen conservado a medio ambiente o a temperaturas inferiores (Desjardins y Hafs, 1962).

En la actualidad en el mercado se encuentran una gran variedad de soluciones dilutoras para congelar semen de bovino y con buenos resultados, dentro de los cuales mencionaremos los siguientes:

a. Dilutor leche - yema de huevo

Se han ensayado como diluyentes del semen de toro, la leche completa líquida, desnatada, la crema y varias leches en polvo reconstituidas. Por lo general la mayoría de dilutores de Yema de huevo-citrato y leche, dieron los mismos resultados de fertilidad. Sin embargo la fertilidad del semen declinaba cuando se le mantenía a 5°C, la supervivencia de los espermatozoides se mejoró con la adición de glicerina, sin embargo no mejoró la fertilidad. El diluyente más sencillo y satisfactorio preparado con leche-yema de huevo, es el preparado con leche desnatada fresca o en polvo calentada (9-10 por ciento sólidos), con adición de 5 a 10 por ciento de yema fresca (Salisbury, et. al., 1982).

Jacquet y Cassou, reportados por Pérez y Pérez (1985), fueron los primeros en sustentar las bases prácticas de esta metodología, con el fin de conjugar las propiedades de la yema de huevo muy beneficiosas, con las de la leche en la conservación del espermatozoides, obteniendo un porcentaje de fecundidad superior al conseguido por el disolvente Citrato-yema; desarrollaron los productos Eiciphos y Leiciphos, integrados por leche en polvo descremada y sales minerales; no obstante los resultados se mejoraron cuando la leche descremada era adicionada con un 10% de yema de huevo.

Originalmente la preparación del dilutor correspondía a: 68.5 gr de glucosa anhidra, 1.5 gr. de tartrato potásico, 0.08 gr. de ácido tartárico sódico, todo ello para un volumen de 1,000 ml., llamado diluyente MILANOV, que se mezclaba en la proporción de 1/1 con leche estéril concentrada, Jillella, (1982).

b. Dilutor Tris-yema

El dilutor seminal Tris, debe su nombre al compuesto Trimetilol amino metano o "TRIS" hidroximetil amino metano de fórmula $C_4H_{11}NO_3$ y peso molecular de 121.4; sustancia de naturaleza orgánica, aspecto cristalino y cuya principal característica consiste en su capacidad de formar en soluciones acuosas sistemas buffer o reguladoras de la concentración de iones hidrógeno (ó pH). Posee una constante de disociación básica (PKV), tal que una solución 0.05 M de Tris, corresponde a un pH de 10.4, es por ello que a efecto de ser utilizado en mantener viabilidad espermática, requiere estar asociado en solución con el ácido cítrico.

Los primeros estudios de la aplicación del Tris como componente principal de una solución dilutora del esperma bovino, reportaron una sobrevivencia inaceptable de los espermatozoides diluidos en una solución no definida de Tris. La efectividad en mantener la supervivencia espermática del diluyente Tris fue revelada posteriormente por Bomstein y Steberl (1959), quienes encontraron que con el dilutor se prolongaba el periodo de actividad cinética (motilidad) a temperatura ambiente.

Comparando la conservación de distintas células vivas en diversos solventes orgánicos a temperatura ambiente, Nahas (1961), reportó un nivel de superioridad respecto a otros dilutores a base de fosfatos, así como nula toxicidad en los mismos con un dilutor conteniendo Tris. El efecto de la adición de Tris a otros dilutores espermáticos para bovino, se reveló positivo en la conservación de la viabilidad de los espermatozoides; así : Bartlett y Vandemark (1961), indicaron que la adición de una solución 0.0125 M de Tris al dilutor Illinois Variable Temperatura, mejoró la vitalidad espermática cuando fueron procesadas a una temperatura de 26°C. Paufler, et.al. (1970), añadieron Tris como tampon a un medio Cornell University Extender elevándose en 3.1 el porcentaje de concepciones respecto de un dilutor Spermazol-Leche, recomendándose dicho agregado especialmente para preservar semen no congelado de baja motilidad.

Para el semen sometido a congelamiento, la composición del dilutor según investigaciones de Davis (1963), confirmadas luego por Steinbach y Foote (1964), fueron las siguientes

para 100 cc de dilutor total (2 fracciones).

Tris.....2.44gr.
Acido Cítrico1.35gr.
Glicerina6.4 %
Yema de huevo 20%

Posteriormente Foote (1970), añadió a la solución anterior con mejoría de la motilidad espermática 0.99 gr. de D(-) fructosa así como los antibióticos:

Dihidro estreptomicina 50mg.
Penicilina G sódica 50mg.

c. Dilutor Triladyl-yema

El dilutor Triladyl concentrado en su presentación comercial de 250 cc, contiene todos los elementos necesarios para una buena congelación de semen bovino, ovino y caprino; 36.05 gr. de Hidroximetil-amino-etanol, 20.24 gr. de ácido cítrico, 14.88 gr. de fructosa, 1 millón de unidades internacionales de penicilina G-Na, 1 gr. de sulfato de Dihidro-estreptomicina y 6 por ciento de glicerol. Por adición de agua bidestilada en un 60 por ciento y yema de huevo en 20 por ciento, con 20 por ciento de Triladyl concentrado, se obtiene un diluyente listo para ser usado en la congelación de semen de bovino (Pérez y Pérez, 1985).

Triladyl es un moderno diluyoconservador para la congelación del eyaculado de bovino, cuya fórmula pertenece a un dilutor Tris (hidroximetil amino etanol). Triladyl concentrado es la forma de presentación comercial del diluyente Tris, que viene listo para mezclarse en partes proporcionales de agua bidestilada y yema de huevo a temperatura ambiente de 30°C, una vez calculado el volumen en el que debe ser diluído el semen, lo que facilita el trabajo de laboratorio (Salisbury, et. al., 1982).

2.3.2 Uso de semen diluido refrigerado

El semen se conserva fluido o congelado. Pudiendo ser fluido a temperatura ambiente (18

a 25°C), ó fluido refrigerado (4 a 5°C). Cada método tiene dilutores apropiados segun los requerimientos.

a. Dilutores para semen fluido a medio ambiente

Partiendo de las tasas de supervivencia de los espermatozoides en el epidídimo y en el tracto genital de la hembra, está claro que las células espermáticas puedan sobrevivir a la temperatura orgánica durante importantes periodos de tiempo. En un principio se usó soluciones salinas y azucaradas sin buenos resultados, ya que si bien eran isotónicas, sólo contribuyeron notablemente en el metabolismo de los espermatozoides, prolongando la motilidad y la vida fértil de los mismos. En promedio el semen a temperatura ambiente se mantiene 7 días. Se busca imitar las condiciones que permitan a los espermatozoides vivir en el epidídimo.

Entre los dilutores más usados en semen fluido, tenemos:

- **Dilutores en base a CO₂**. Illinois Variable Temperatura (IVT), Extender University Cornell (CUE) y CU-16, en un principio se desarrolló con buen resultado el IVT el cual requiere gasificación con CO₂, también el CUE que contiene glicina y no requiere de aporte externo de CO₂ y finalmente el CU-16 que es una modificación de la anterior. La temperatura óptima para conservación de los espermatozoides con el CUE es de 20°C. Asi mismo se usaron combinaciones de Leche y Yema de huevo, como por ejemplo el “Laiciphos”, consistente en Leche en polvo más 10 por ciento de yema (Salisbury, et. al., 1982).

- **Caprogen**. Se compone de citrato de sodio, glucosa, glicina, glicerol, ácido caproico, agentes antibacteriales y 2 por ciento de yema de huevo por volumen; este dilutor se gasifica con nitrógeno antes de mezclarlo con el semen (Salisbury, et. al., 1982). Este dilutor trabaja óptimamente entre 18 y 24°C, la tasa de yema se ha reducido a 2 por ciento, lo cual parece disminuir el número de espermatozoides requeridos por inseminación. El caprogen contiene catalasa para descomponer el H₂ O₂ que se forma como producto del metabolismo de los espermatozoides. Dicha adición aumenta la fertilidad en 1 a 2 por

ciento. Además se puede usar como líquido de dilución para resuspender los espermatozoides congelados.

- **Agua de coco. (CEM).** El diluyente de agua de coco, se ha usado también a temperatura ambiente. La fertilidad obtenida es alta durante los primeros 4 días, manteniéndose de 15 a 25°C. En resumen, los diluyentes que dan buen resultado a temperatura ambiente, se caracterizan generalmente por una solución tampon equilibrada, bajo contenido de yema de huevo, catalasa y una combinación de antibióticos (Salisbury, et. al., 1982).

b. Uso de dilutores para semen fluido refrigerado

Los primeros medios utilizados para diluir el semen fueron principalmente las soluciones salinas o azucaradas ideadas para aumentar el volumen del semen para su empleo inmediato mas bien que como conservadores de él. Cuando se descubrieron los valores de la yema de huevo, se presentó un diluyente que disminuía la actividad metabólica de los espermatozoides y prolongaba su fertilidad, si se conserva a 5°C.

Entre los principales dilutores tenemos:

- **En base a yema de huevo.** En 1939, Phillips, mencionado por Perez y Perez 1985, descubrió que al adicionar un tampón fosfato a la yema de huevo se conservaba la fertilidad y motilidad del semen refrigerado “Dilutor Fosfato”. Salisbury, 1982, encontró que la adición de citrato de sodio a la yema de huevo, mantenía la viabilidad de los espermatozoides al adicionarse en igual cantidad; siendo la fertilidad la misma. Se elaboraron diluyentes complejos en base a Yema de huevo-Tampon-Citrato, adicionados con glicina y CO₂ con efectos beneficiosos. Entre ellos el IVT, CUE, CU-16, CUE G, Caprogen y otros. Finalmente se formuló el Tris-Yema de Huevo; pudiéndose este dilutor combinar con yema de huevo para obtener dilutores adecuados para temperaturas que varían desde 25°C a -196°C. Existen otros que llevan incorporada Yema de huevo como en Japón el “Neoseminan “y el “Spermasol” en Alemania.

- **Dilutores en base a leche.** Los dilutores de semen integrados a base de leche son medios

isotónicos que contienen muchos componentes favorables al mantenimiento de la viabilidad de los espermatozoides y fue usado grandemente por investigadores anteriores para la extensión del semen de toro, tanto para semen fresco o almacenado refrigerado. También a sido adaptado para congelación de semen de ovino, principalmente en la forma reconstituída, combinada con arabinosa, fructosa o yema de huevo. Para la dilución del semen de toro se puede utilizar leche completa, líquida, desnatada, la crema y varias leches en polvo reconstituídas, con los mismos resultados de fertilidad que los dilutores Yema-Citrato. Sin embargo, la fertilidad del semen en leche, declinaba cuando se le mantenía a 5°C, la supervivencia espermática se mejoró con la adición de glicina, sin embargo no mejoró la fertilidad (Salamon, et. al., 1990).

Un reporte del Dr. Chupin y M. Thibier (1993), con un estudio sobre la utilización de la inseminación artificial en vacunos en la mayoría de países ganaderos a nivel mundial, hacen ver el uso de semen fresco y congelado en vacunos de leche, de carne y cruzados; siendo los países que producen y usan semen fresco los siguientes : Francia 10 000 dosis, Holanda 212 000 dosis, Albania 446 900 dosis, Rumania 590 000 dosis, Rusia 139 670 dosis y Nueva Zelanda 1 444 000 dosis (año 1991), cantidades que representan el 2.3 por ciento de la producción mundial, frente a la producción y uso del semen congelado que representó el 97.7 por ciento para ese mismo año .

2.4 TASA DE DILUCIÓN Y CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA

El suceso de la congelación depende de un grado notable de la tasa de dilución del semen. Originalmente el semen fue diluído para proteger los espermatozoides durante el enfriamiento, congelación y descongelación, pero la tasa de dilución fué frecuentemente cambiada por razones técnicas tales como el incremento en el número de hembras, las cuales podrían ser inseminadas con cada eyaculación o para estandarizar el número de espermatozoides en cada dosis de semen congelado-descongelado. Igualmente, conocer un nivel de concentración espermática con un número óptimo de espermatozoides antes de la congelación, nos permite obtener un buen porcentaje de supervivencia espermática, que luego del descongelado, asegure una buena fecundidad.

Bratton et.al. (1957), compararon resultados de supervivencia espermática en semen congelado y no congelado y no encontraron diferencias con respecto a la fertilidad. La concentración del semen no congelado fue de 10 millones de espermatozoides móviles por mililitro, y la del congelado fluctuó entre 8 y 14 millones de espermatozoides móviles por mililitro.

Hay que tener en cuenta que durante el proceso de congelación mueren la tercera parte de los espermatozoides, así como una cantidad considerable en el momento de la descongelación; por lo tanto debe calcularse la concentración de espermatozoides vivos muy por encima de los valores señalados para conseguir que después de los referidos accidentes, aquéllos lleguen en suficiente cantidad de espermatozoides fecundantes. En consecuencia se recomienda en algunos casos volúmenes para inseminar que contengan como mínimo 20 millones de células viables en el momento de calcular la dilución. A tal efecto de aplicarse la siguiente fórmula para hallar el número de dosis:

$$N = \frac{v \times c \times d \times e}{h}$$

N = N° de dosis a preparar

v = Volumen del eyaculado

c = Concentración de espermatozoides del eyaculado

d = Motilidad en porcentaje

e = Porcentaje de espermatozoides vivos.

h = Concentración de espermatozoides que debe llevar la dosis

Para hallar el volumen necesario del dilutor, se debe multiplicar el número de dosis (N) por el volumen o capacidad a envasar en pajillas de 0.5 cc; la cantidad resultante será el volumen del semen diluido. De este volumen total se resta el volumen del semen puro y obtendremos el volumen del diluyente o dilutor que se necesita para preparar la dilución total, que se distribuirá en el número de pajillas calculadas. (Pérez y Pérez, 1985).

Eapen (1962), recomienda que, para obtener una mejor supervivencia y motilidad, se debe

seleccionar un semen de alta calidad, y que para la conservación a bajas temperaturas, la concentración de semen diluído no sea menor a 10 millones de espermatozoides móviles por mililitro. Menciona Hann (1968), comparando varias concentraciones concluye que, la dosis de semen a utilizar debe tener un número mínimo de 10 a 15 millones de espermatozoides móviles por mililitro para garantizar una buena fertilidad.

Pickett, et. al. (1978), comparando niveles de concentración de 20 y 30 millones de espermatozoides móviles por mililitro congelados en nitrógeno líquido, encontraron que los resultados de fertilidad fueron estadísticamente no significativos y las correlaciones no fueron de suficiente tamaño como para predecir la fertilidad con las características del semen obtenido. En análisis comparativos la motilidad de espermatozoides después de la descongelación fue mejor para tasas de dilución de 4 a 8 veces, que para 4 a 16 veces. Un incremento en la dilución de 2 a 6 veces, mejoró la recuperación post-descongelamiento, pero las tasas de parición decrecieron cuando las tasas de dilución fueron incrementadas de 3 a 5 veces o de 5 a 11 veces. (Salamon, et.al., 1990).

2.5 USO DCE SEMEN CONGELADO

Con el descubrimiento de Polge et.al. (1949), mencionado por Hafez, 1989 de los efectos protectores de la glicerina en el congelamiento, se inició el uso del semen congelado con gran énfasis. Los componentes básicos de los dilutores para congelación son: Agua bidestilada, como solvente de los componentes seminales y del diluyente; Sustancias Tampones del pH del medio; Sustancias orgánicas que protegen contra el shock de frío (leche, yema de huevo); Agentes crioprotectores (glicerina, dimetil sulfóxido); Fuentes de energía (azúcares simples); Antibióticos que controlan el crecimiento bacteriano. (Salisbury, et. al., 1982).

Un estudio de la situación actual de la inseminación artificial en vacunos de los países desarrollados publicado por el Dr. Chupin y M. Thibier, (1993), reportan que el número total en los países industrializados, excluída la ex URSS, a disminuído de 50 748 000 en 1980 a 44 234 000 en 1991 (-12.9 %). Este retroceso se observa en las hembras lecheras y de doble propósito (-7 942 000), mientras que el número de inseminaciones en la raza de

carne va en aumento (+1 427 000). La Unión Europea (U.E), ocupa el primer lugar en cuanto a número total de inseminaciones (20 144 000) seguida de América del Norte (11 058 000), Europa Oriental (5 820 000) y los países de Europa Occidental no pertenecientes a la U.E. (3 161 000). En Europa Oriental, el número de inseminaciones ha disminuído en todos los tipos de hembras debido al descenso del número de cabezas de ganado vacuno. La cobertura de la inseminación artificial oscila entre 7.4 por ciento en Sudafrica y Australia y más del 90 por ciento en Bulgaria, Hungría y Noruega. La cobertura media de la inseminación artificial en todo el mundo es del 64 y 7.8 por ciento respectivamente en las razas lecheras y de carne.

Dentro del país, el Banco Nacional de Semen en sus primeros 15 años de trabajo, produjo mas de 250 000 dosis de semen congelado de los mejores toros nacionales de las razas Holstein y Brow Swiss, los cuales fueron usados por los más representativos establos ganaderos de Lima y provincias (Agronoticias, 1997).

2.6 MÉTODOS DE CONGELACIÓN

La congelación del semen puede llevarse a cabo por los siguientes métodos:

2.6.1 Nieve carbónica y alcohol. “Método de Rowson y Polge”

Constituye el método clásico que podríamos llamar de congelación del semen a pesar de haberse descubierto y puesto en práctica hace más de una década. Se basa en material seminal previamente disuelto y adicionado con glicerol al que se sitúa a la temperatura de 5 grados centígrados (5°C) para reducir luego a ritmo variable, mediante la adición de trozos de nieve carbónica, al medio líquido que baña las ampollas de esperma, hasta la temperatura -79°C.

2.6.2 Método “Nitrógeno Líquido”

El método de congelación de semen mediante nitrógeno líquido, tiene su fundamento, en

unos casos, en establecer una corriente de nitrógeno atomizado mediante un ventilador que actúa a gran velocidad, de este modo se crea una corriente de aire frío que circula en forma continua enfriando el material seminal a través de las ampollas, pajillas o recipientes en que se halle el material seminal. Esta técnica requiere un perfecto control del ritmo de enfriamiento en que radica la mayor dificultad de la operación.

2.6.3 Método “Plantas Criógenas Automáticas”

El método de las plantas criógenas automáticas, constituye sin duda, las instalaciones mas perfectas recomendables en la actualidad para la congelación del esperma. Se basan en vaporizar el nitrógeno y hacerlo circular en un recipiente especial donde se hallan dispuestas las dosis de esperma a congelar.

2.7 RESPUESTAS DE MOTILIDAD, FERTILIDAD Y NÚMERO DE SERVICIOS POR PREÑEZ CON SEMEN CONGELADO

2.7.1 Respuestas de motilidad

Estudios llevados a cabo por Foote, R. (1970), refiere haber hallado una mejor conservación de la motilidad del semen diluido en Tris, no correspondiendo dicha superioridad, sin embargo, a una mayor fertilidad expresada en porcentaje de no retornos. En el análisis respectivo entre el dilutor Citrato-yema, y Tris, no mostró diferencia significativa en las fases de dilución, glicerinado y equilibramiento seminales, pero sí en la conservación de la motilidad espermática luego del proceso de congelación, indica en el análisis estadístico una diferencia significativa ($P < = 0,05$) favorable al tratamiento con dilutor Tris sobre Citrato-yema (Anduaga, 1980). Así mismo encontró que la mayor proporción de muerte zoospérmica debido a la fase de congelación-descongelación, correspondía al dilutor Yema-Citrato (59.3 %), sobre el Tris (46.6 %).

2.7.2 Respuestas de fertilidad

Picket, et.al., 1960, comparando los dilutores Citrato-yema-glicerina, y Leche descremada-glicerina, encontraron que no hubo diferencia estadística en el porcentaje de concepciones entre los dos dilutores. Duarte y Rodriguez, (1964), dentro de las condiciones en las que se realizó el estudio del efecto de los dilutores Leche homogenizada y Citrato-yema sobre la fertilidad, no hubo diferencia estadística significativa entre estos, pudiendo recomendarse la utilización de cualquiera de ellos. Concluyen que la fertilidad es influenciada por los animales y no por el dilutor que se utilice, bien sea leche homogenizada o citrato-yema.

Los resultados de fertilidad del Tris y del CUE (Cornell University Extender), fueron iguales en un primer ensayo. En otro ensayo de campo con mas de 40,000 inseminaciones dió 73 % de no retorno a 60-90 días para el CUE y 73.4 % para el Tris, confirmando así la equivalencia de ambos diluyentes (Salisbury, et.al., 1982).

Dugaryn (1966), reportó que en muestras sometidas a liofilización, el añadido de Tris elevó el índice de fertilidad (no retornos en 60-90 días), del esperma diluído previamente en Citrato-yema-glicerina. Chimpén, (1980), que trabajó con semen congelado nacional e importado en doce establos de la cuenca lechera de Lima, encontró diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) en los porcentajes de preñez al primer servicio entre vaquillonas y vacas, siendo superior la preñez en vaquillonas dentro de cada uno de los niveles de fertilidad (alto, medio, bajo). El semen nacional tuvo un comportamiento superior de preñez al primer servicio con 64.9 por ciento frente al 61.9 por ciento del importado, respectivamente. Mellisho, (1997), en un estudio en tres establos de la cuenca lechera de Lima (Santa Juana, Piamonte y Milkito), que usan semen congelado importado y nacional, encontró porcentajes de preñez en vaquillas y vacas de 63 y 58.1; 64.6 y 31.6; 35.9 y 32.3 por ciento respectivamente. Siendo las tasas de preñez a diferente número de servicios en vacas y vaquillonas que no muestran una diferencia marcada entre la tasa de preñez mensual a primer, segundo y tercer servicio o mas.

Estudios realizados por Kindliman (1997) en Lima, Parreño (1991) en Arequipa, Castro y

Bernal (1996) en Lambayeque, reportan porcentajes de fertilidad en vacas de 42.8 por ciento, 46.49 por ciento y 49.13 por ciento. Investigadores de otros países como: Docmeq et.al. (1995), reporta 34 por ciento de fertilidad en vacas de la raza Holstein en Estados Unidos, Baucells (1995) en España, encuentra 37 por ciento de fertilidad en vacas de la misma raza. Vishwanath et. al. (1996), trabajaron con 11 toros en Nueva Zelanda, para semen líquido y congelado diluido en Caprogen, con una concentración espermática de 2.5 millones de espermatozoides por mililitro por dosis para semen líquido y de 20 millones de espermatozoides por mililitro por dosis para semen congelado, con porcentajes de fertilidad (% NRR) de 69.9 y 41.5 % y cuando estas concentraciones se disminuyeron a 0.5 millones de espermatozoides por mililitro por dosis en semen líquido y de 5 millones de espermatozoides por mililitro por dosis en semen congelado, la fertilidad decayó en 7 % en semen líquido y de 7.9 % en semen congelado.

Los porcentajes de preñez en vaquillonas son marcadamente superior a las de las vacas, reportados por Altamirano (1977) y Salas (1983) en Lima, Parreño (1991) en Arequipa, Castro Bernal (1996) en Lambayeque, con 73.2 %, 52.04 %, 69.32 % y 62.5 % respectivamente, y un porcentaje de fertilidad a primer servicio en vaquillonas de 68.25 %, reportado por Parreño (1991) en Arequipa. Los porcentajes de fertilidad para vaquillonas reportados de otros países, son superiores a los de las vacas; la Asociación Israelí Criadores de Ganado (1986), encontró 65 % de efectividad para el primer servicio en Israel, y en Estados Unidos Graves et. al., (1991), encontró 67.4 % para todos los servicios

2.8 FACTORES QUE CONTRIBUYEN A LAS FALLAS DE FERTILIZACIÓN EN VACUNOS

La Inseminación Artificial se utiliza en animales selectos e incluso para cruzar especies diferentes. Esta técnica representa importante factor desde el punto de vista de la Sanidad Animal, porque con ella se elimina el peligro de la transmisión de enfermedades, obteniendo alta fertilidad, en muchos casos mejor que por monta natural; sin embargo, el método de crianza y manejo de los machos y hembras, la técnica de colección, el manipuleo del semen y los métodos de inseminación deben ser practicados por expertos para obtener buenos resultados (Lake, 1983; Hafez, 1993).

El índice de fertilización del ganado lechero, clínicamente normal es muy alto (96 %), cuando se utiliza adecuadamente un semen de alta calidad, pero este índice disminuye drásticamente cuando se usa semen de toros de baja fertilidad. Es importante indicar que el más mínimo incremento dentro de la eficiencia reproductiva de los machos, reduce significativamente los costos de producción. Las causas de la ineficacia reproductiva, incluyen defectos anatómicos y genéticos, factores fisiológicos, patológicos y de manejo, lo que constituye factores limitantes en la producción bovina. Contribuyen a la fallas de fertilización tanto el macho como la hembra (Bath et.al., 1986; Hafez, 1993).

2.8.1 Factores que afectan la fertilidad en la hembra

a. Alimentación

La alimentación es un factor clave en el éxito de la producción lechera, ocupando un lugar altamente prioritario (Konermann, 1974; Hutjens, 1975). Un mal programa de alimentación en hembras jóvenes y adultas puede resultar en:

- Baja eficiencia reproductiva
- Baja producción de leche
- Desórdenes metabólicos
- Mayor susceptibilidad a enfermedades
- Crecimiento lento

Las causas nutricionales de baja eficiencia reproductiva pueden deberse a:

1. Deficiente aporte de principios inmediatos (Energía, proteína y grasa).
2. Deficiencia de vitaminas.
3. Deficiencia de minerales.

Varios autores han indicado los requerimientos de cada uno de los principios nutritivos anteriormente mencionados para lograr una reproducción eficiente y los síntomas y problemas que se presentan cuando hay deficiencia y/o carencia de uno o varios de estos nutrientes en la alimentación de ganado lechero (Hafs y Boyd, 1973; Schmidt y Van Vleck, 1974; Cole y Cupps, 1977 Bath, et.al. 1986; Davis, 1988; Stevenson, 1995g).

Según Hafs y Boyd, (1973), Bath et.al. (1986), no hay requerimientos de nutrientes específicos para la reproducción, sino que la reproducción requiere la mayoría de los mismos nutrientes que son necesarios para otros procesos del cuerpo como crecimiento, producción de leche, etc.

b. Manejo reproductivo

El manejo de la reproducción es otro de los factores importantes para lograr alcanzar una buena eficiencia reproductiva, una atención estricta a las prácticas de manejo reproductivo es necesaria para eliminar los factores negativos, dentro del manejo reproductivo, se debe tener en cuenta:

-Detección de celo. Es uno de los factores de mayor influencia para que un Programa de Inseminación Artificial tenga resultados exitosos. Es muy grande la repercusión que tiene la falta en detección de celos, ya que trae como consecuencia un mayor número de días vacíos en comparación con otros factores y es la razón número uno para una baja eficiencia reproductiva (Herrick, 1975; Jarrett, 1975; Mac Dowell, 1975; Shaffer, 1975; Becerrill y Polanco, 1982; Davis, 1963; Hafez, 1989). Una ayuda para facilitar la detección de celo, es llevar Registros reproductivos para lograr buenos resultados, así como la observación constante y detenida del mayor número de vacas que muestran celo (Mientras más observaciones, mayor será el número de animales detectados), porque algunas vacas presentan signos de celo muy débiles y/o silenciosos que pueden pasar desapercibidos (Cole y Ronning, 1974; Hafs, 1989; Orrillo, 1996).

- Momento de la inseminación. Diversos autores dan reglas prácticas, para que los ganaderos realicen la Inseminación Artificial en el momento más adecuado, porque la ovulación en ganado vacuno es diferente que en otras especies; la misma que se produce en promedio doce horas después de haber terminado el celo; necesitando el espermatozoide seis horas en el tracto reproductivo de la vaca para poder desarrollar su capacidad fecundante; por lo que es muy importante hacer la inseminación en el momento más adecuado (Shaffer, 1975; Alvarado, et.al., 1997).

-Intervalo parto - primer servicio. Existen varios factores que influyen la prolongación del intervalo entre el parto y el primer servicio, siendo los más comunes las infecciones en el tracto reproductivo, partos dobles, cuerpo lúteo persistente, partos distócicos, etc; todos estos factores hacen que el intervalo sea mayor a los 60 días después del parto para poder servir a la vaca nuevamente (Cole y Ronning, 1974; Bath et.al., 1986; Stevenson, 1995 f).

-Revisión ginecológica oportuna. La revisión ginecológica, es una práctica de manejo importante porque ayuda a identificar tanto a las vacas preñadas como a las vacas que habiendo sido inseminadas, no han repetido celo, pero por alguna razón no han quedado preñadas. La detección de preñez se debe hacer a los 60 días del último servicio efectuado por un profesional calificado, teniendo cuidado para evitar el aborto. La oportuna detección de animales con cuerpo lúteo persistente o falsa preñez, ayuda a la pronta corrección de estos problemas e incrementa la eficiencia reproductiva. (Schmidt y Van Vleck, 1974).

c. Sanidad

Este es uno de los pilares de la fertilidad de un establo lechero, la buena salud es necesaria para el ternero, vaquillona y vaca; solamente los animales sanos alcanzan su máximo crecimiento, dan el máximo número de terneros, producen la máxima cantidad de leche y manifiestan su máxima capacidad genética. Los trastornos de la fertilidad por causas sanitarias, se pueden deber a una enfermedad específica que afecta a los órganos reproductivos y enfermedades que afectan la reproducción, porque afecta la salud y eficiencia de todo animal (Asdell, 1968; Hafez, 1989; Martinez, 1995).

- Alteraciones pos-parto. Este es uno de los puntos más descuidados en los hatos ganaderos lecheros y que tiene gran repercusión en la fertilidad. Debido al parto, el tracto reproductivo de la vaca queda totalmente congestionado y es un medio ideal para que los microorganismos invadan, esto se complica cuando hay retención de placenta o alguna parte del tracto reproductivo ha sufrido algún desgarro. Siendo las alteraciones más comunes, las infecciones uterinas y retenciones de placenta que prolongan el proceso de involución del útero (Cole y Cupps, 1977).

d. Enfermedades diversas

Casi la totalidad de los agentes infecciosos que ejercen una influencia apreciable sobre los animales, pueden interferir en cierto grado el ciclo de la reproducción. En el ganado vacuno esto varía desde las infecciones del aparato reproductor hasta trastornos nutritivos, tales como diarrea o efectos directos de los patógenos como la putrefacción de las pezuñas. Las infestaciones intensas pueden retrasar o impedir la aparición del estro como puede suceder con la anaplasmosis y otras enfermedades. Desde hace muchos años los ganaderos, saben que enfermedades como la brucelosis, metritis, vibriosis, tricomoniasis, leptospirosis, etc, que afectan el aparato reproductor, reducen la fertilidad o crean esterilidad temporal, e incluso permanente (Mc Dowell, 1975).

e. Clima y medio ambiente

Muchos autores concuerdan con el hecho de que los meses de verano son los que tienen más baja fertilidad en comparación con otras estaciones (Cole y Ronning, 1974). La alta temperatura es el factor que más afecta a la reproducción en los animales, porque produce cambios en el sistema hormonal, disminuyendo la secreción de gonadotropinas, esto conduce a una producción deficiente de estrógenos; la secreción de progesterona en el cuerpo lúteo es insuficiente para mantener la gestación, además la involución del útero se retrasa principalmente por la deficiencia hormonal.

Estudios realizados en Lima por Orrillo (1996), reporta resultados de porcentajes de preñez en vaquillas de 65.1% y 69.2% durante el verano e invierno respectivamente, y para vacas lactantes de 27% en verano y 45.7% en invierno. Así mismo encontró que la distribución de presentación de celos en vaquillas fue de 48.7 % en verano y 51.3 % en invierno y en vacas de 33.8 % en verano y 61.2 % en invierno. Salas (1983), encuentra una correlación negativa de la estación sobre la fertilidad y el número de servicios por concepción en vaquillas. Por lo general las características del medio ambiente que rodea al animal, como la temperatura, horas luz, humedad, vientos, altitud, etc., influyen decisivamente sobre la salud y fertilidad del ganado bovino lechero (De Alba, 1964).

f. Edad de los animales

El efecto de la edad sobre la reproducción no es importante, si es que los otros factores (especialmente alimentación y manejo), están optimizados. El criterio que se sigue actualmente para servir a una vaquillona no es la edad; sino el peso y la talla que debe alcanzar a temprana edad, para realizar el primer servicio; siendo necesario haber optimizado un buen manejo y alimentación, de lo contrario su crecimiento se retrasará y por lo tanto la fecha de su primer servicio.

Si a una vaquilla se le sirve a temprana edad (16-18 meses) y se le cubre todos los requerimientos, no habrá detención del crecimiento y su parto será normal, su producción durante la primera lactación será menor que las servidas a mayor edad sin embargo su producción de por vida (total campañas) será mayor (De Alba, 1964). Varios trabajos realizados, demuestran que la fertilidad disminuye conforme va aumentando la edad y a partir del quinto parto, el descenso de la fertilidad es más marcado (Pinillos, 1965; Spalding et.al., 1975; Chimpen, 1980; Hafez, 1989).

g. Influencia de la producción de leche

Se han hecho muchos estudios sobre la influencia de la producción de leche en la fertilidad del ganado lechero, pero que todavía no aclara totalmente este tema. Los mecanismos fisiológicos que intervienen en la reproducción y en la lactación están íntimamente ligados, cabe esperar que se produzcan ciertas interrelaciones, especialmente si se considera que la reproducción es el primer indicador de la lactación (Salisbury y Demarck, 1982).

En vacas que tienen altas producciones después del parto su fisiología está avocada a la producción de leche y la reproducción pasa a un segundo plano. Se ha demostrado que el estrés de la lactación en vacas altamente productoras, se manifiesta en problemas reproductivos; después del parto tardan en presentar celo, hay presencia de ovarios quísticos, celos silenciosos, etc ; esto hace que las vacas tengan un mayor número de servicios por preñez, un mayor intervalo entre el parto y el primer servicio y por lo tanto el intervalo entre partos es mayor (Hafs y Boyd, 1973; Cole y Ronning, 1974; Mc Dowell, 1975; Cole y Cupps, 1977; Chimpen, 1980; Bath et. al., 1986).

h. Factores de orden fisiológico

Cuando la reproducción no es normal y el animal no padece enfermedad infecciosa ni tiene alguna anomalía anatómica, la afección se clasifica como trastorno funcional. En la vaca el mal funcionamiento del ovario, determina una reducción de la fertilidad. Algunas veces exhiben la anomalía llamada linfomanía, esto se debe a ovarios quísticos, o falla en la ruptura del folículo y desprendimiento del óvulo en el momento de la ovulación. La persistencia del cuerpo amarillo en el ovario de vacas no preñadas, determina la ausencia de celo (Hafez, 1989).

Las principales causas de la baja fertilidad debido a fallas fisiológicas, según Salisbury y Demarck (1982), son:

- Falla en la ovulación
- Imposibilidad del encuentro entre el espermatozoide y el óvulo después de la ovulación.
- Falla en la fecundación.
- Falla en la implantación.
- Aborto.

i. Factores de orden genético

Se plantea el problema de saber si hay alguna posibilidad de mejorar la eficiencia reproductiva por medio de la selección; se han efectuado numerosas investigaciones para determinar índices de herencias de algunos parámetros de fertilidad del ganado lechero, pero en todos los casos es muy baja y en algunos es cero, esto es verdadero para medidas de la fertilidad como número de servicios por preñez, número de días del primer servicio a la concepción, tasa de no retorno, regularidad del estro, intervalo entre partos.

West, (1995), reporta porcentajes de concepciones promedio en hatos de control de producción de 66 por ciento y la producción de leche promedio de 4 600 kg.; para 1985 el promedio fué de 7,300 Kg. de leche y el porcentaje de concepciones fue de solo 51 %. Demostrando como la tasa de concepción declina a medida que aumenta la producción de leche.

Existe una gran cantidad de anormalidades de tipo anatómico y aún de tipo fisiológico que afectan la fertilidad y cuya transmisión es altamente heredable, es decir, que el origen de estas anormalidades es genético, tales como la enfermedad de las vaquillonas blancas, hipoplasia testicular, apertura de los cuernos uterinos directamente de la vagina, terneros bulldog, columna vertebral corta, enanismo, etc, (Johansson y Rendel, 1974; Mc Dowell, 1975; Hafez, 1989).

j. Inseminador y manejo del semen

Es necesario que cada establo tenga una o dos personas responsables de la inseminación de vacas, éstas deben ser bien entrenadas para así poder aumentar o mantener en un buen nivel la eficiencia reproductiva. La experiencia y habilidad de los inseminadores es muy importante para obtener una buena fertilidad en el hato ganadero.

Es necesario que la persona encargada tenga responsabilidad del manejo de los tanques de almacenamiento de semen. Si baja el nitrógeno del nivel mínimo el semen que está en el tanque, sufre un desequilibrio y baja la motilidad, pero si se evapora el contenido de nitrógeno, del tanque se pierden todas las dosis almacenadas. La forma de sacar y descongelar el semen, también influye en su viabilidad y motilidad, lo que repercute en el número de servicios por preñez, debiéndose evitar la exposición de las dosis que no se van a usar aún a temperaturas superiores a -80°C . Vivanco, (1976), a descrito la metodología de manejo de la dosis de semen congelado en sus diversas formas de presentación.

En última instancia si en todo el proceso no se han cometido errores depende únicamente del buen manejo del semen, la experiencia y habilidad de los inseminadores para obtener una buena fertilidad en el ganado bovino lechero. La forma de sacar y descongelar el semen, también influye en su viabilidad y motilidad, lo que repercute en el número de servicios por preñez (Vivanco, 1978).

2.8.2 Factores que afectan la fertilidad en el macho

a. Edad y raza

En primer lugar, como factor de éxito, se debe tener en cuenta los relacionados con el semental. Por lo que respecta al toro, de acuerdo con los trabajos realizados hasta el momento, puede considerarse la edad, régimen alimenticio e higiénico, constituyen los principales motivos de éxito en la inseminación artificial. La edad recomendable es de uno a tres años (animales jóvenes), si bien hasta los doce o trece años se puede utilizar los toros porque mantienen capacidad fecundante pero por debajo de los valores de los más jóvenes por el límite de edad (Pérez y Pérez, 1985).

No cabe duda que el toro probado y considerado como mejorador, la edad de aprovechamiento espermático se prolonga al máximo dentro de la edad de uno a tres años alcanzando su mejor producción. Además de la edad, en el toro influyen factores raciales, de modo que los resultados de la inseminación artificial siempre deben referirse a la raza.

Según Madden, en la Hampshire Cattle Breeding Society Ltd. mencionado por Pérez y Pérez (1985), refleja el comportamiento fecundante de los toros en razas lecheras; Jersey, semen congelado 58 % y fresco 67 %; Holandes congelado 63 % y fresco 65 %; Airshire, congelado 56 % y fresco 63 %; observaciones que demuestran la influencia de la raza en la capacidad fecundante y la relación existente entre el método de congelación del espermatozoides y el rendimiento fecundante del mismo. Hoy en día está totalmente admitido que el espermatozoides congelado ofrece menos posibilidades fecundantes que el espermatozoides fresco. En muchos casos la capacidad fecundante del material seminal no depende del propio dilutor, sino de las condiciones de conservación y transporte del mismo.

b. Alimentación

En cuanto al régimen alimenticio a que están sometidos los sementales, según Casida, mencionado por Pérez y Pérez, (1985) en su comunicación presentado en el III Congreso Internacional de la reproducción, celebrado en Cambridge, en 1956, indica que la

alimentación influye en los animales de parto múltiple no sólo en el tamaño de camada, sino en la capacidad fecundante de un determinado semental ; y el gran número de fallas fecundantes en la Inseminación Artificial del toro observadas en ciertas épocas del año son consecuencia de ciertas deficiencias nutritivas de los sementales, relacionados particularmente con avitaminosis.

Warkani, mencionado por Perez y Perez, (1985), insiste en que las deficiencias nutritivas en los sementales se reflejan, no sólo en alteraciones en su capacidad fecundante y resistencia zoospérmica a la conservación, dilución, etc; sino como determinantes de perturbaciones en el desarrollo embrionario, que puedan traducirse en malformaciones, muerte del embrión.

c. Aclimatación

Se refiere a la influencia que los cambios de ambiente, temperatura, luminosidad, etc., determinan sobre los sementales, de tal modo que cuando tienen lugar estos cambios bruscos, la función sexual sufre los efectos. En general la ambientación de los sementales se acompaña de una crisis en el rendimiento sexual y fecundante. En relación a las influencias climatológicas sobre la producción espermática y rendimiento fecundante en los toros, L. Valerani, reportado por Pérez y Pérez (1985), con datos recogidos en el Centro “Tori de Milan”, observó variaciones en el rendimiento fecundante de los toros en el curso de varios años, de tal modo que se descubrieron variaciones estacionales cuyo descenso se acentuaba en los meses más cálidos (julio, agosto), por otra parte se descubrieron toros muy sensibles a las variaciones de temperatura que modificaban los rendimientos eyaculatorios y fecundantes.

Casady, M. Myers y Lergates, en Carolina del Norte, mencionado por Pérez y Pérez (1985), analizaron los efectos de la temperatura sobre el rendimiento sexual del toro: sometieron a sementales de 24 a 34 meses de edad a variaciones de temperatura de 21°C a 37°C, otros de 19 a 28 meses de edad fueron sometidos a variaciones térmicas de 11°C a 21°C y otros animales a variaciones de temperatura de 11°C a 30°C; concluyendo que las variaciones de temperatura apenas llegaron a modificar el volumen del eyaculado, pero las

temperaturas próximas a 30°C trajeron como consecuencia alteraciones en la motilidad espermática y por lo tanto de la capacidad fecundante.

El índice de concepción para semen recogido de toros durante los meses cálidos de verano e inseminado a continuación en vacas durante todo el año, es sustancialmente más bajo en comparación con el recogido durante las estaciones frías (Bath et. al., 1986).

d. Régimen sexual

El régimen sexual se refiere a la regulación de cópulas o recogidas del esperma cuando se trata de animales destinados a inseminación artificial. Pérez y Pérez, 1985, reporta investigaciones sobre la regulación racional del régimen sexual; es tan importante que Cembrowicz admite que el mayor número de fracasos fecundantes en inseminación artificial, se deben a una irregular utilización de los sementales. En general en los grandes centros de monta (Instituto L.Spallanzani), se ha llegado a la conclusión de que la máxima capacidad fecundante se obtiene en toros sometidos a una o dos recogidas por semana cuando se trata de recolección mediante vagina artificial, ya que por el contrario, la obtención de esperma por electro eyaculación y por el método del masaje de las ampollas de Henle, todavía limita más el rendimiento espermático, obligando a mayores intervalos o periodos de descanso entre las recogidas. En animales jóvenes y de excelente estado de carnes, puede pensarse en recogidas seguidas durante tres días, para descansar el cuarto, ya que en tales circunstancias de acuerdo a las observaciones de Bonadonna, los sementales pueden caer en el vicio de anonismo (Pérez y Pérez, 1985).

e. Alojamiento

Es preciso tener en cuenta el alojamiento de los sementales, ya que requieren determinadas condiciones capaces de influir en su rendimiento sexual y eyaculatorio. Los toros deben mantenerse en boxes a ser posible de cama suelta, la amplitud debe ser lo suficiente para que les permita ciertos ejercicios. Es preferible que los animales dispongan de visibilidad limitada para evitar excitaciones inútiles, si bien conviene que se encuentren en un ambiente en que los ruidos, olor y mujidos emitidos puedan constituir motivos de

excitación interesantes al rendimiento eyaculatorio. Los alojamientos deben disponer de un sistema adecuado para la evacuación de excrementos, líquidos y sobre todo, han de disponer de cama abundante, seca y mullida para evitar traumatismos y proporcionar la mayor eficacia al descanso del animal. Son necesarios largos periodos de descanso sexual para tener gran repercusión en el rendimiento sexual. Los animales asustados y fatigados, en general, no son capaces de mantener un rendimiento normal fecundante (Pérez y Pérez, 1985).

f. Régimen de ejercicios

En términos generales, se admite que los sementales para que lleven a cabo con normalidad la función procreativa, es preciso esten sometidos a un régimen de ejercicio adecuado. La vida sedentaria que en realidad significa la explotación industrial de las especies domésticas no es nada recomendable para la función sexual, hasta el extremo de que un elevado porcentaje de falta de fecundidad en toros de raza de carne, se debe en esencia a la falta de ejercicios y estímulo de la función sexual. El engrasamiento es el mayor peligro para los sementales, actuando directamente sobre los testículos, interferencia termoreguladora del epitelio germinal y, en otros casos, son los acúmulos de grasa los que constituyen una dificultad mecánica para la cópula.

Prahu y Ghua, en la India, en el año de 1953 estudiando el comportamiento sexual de los toros, en que inexplicablemente disminuía la fertilidad eyaculatoria, comprobaron que el ejercicio era capaz de restituir el normal rendimiento fecundante y sexual de los animales, de tal modo que la máxima eficacia se obtuvo mediante ejercicio diario de hora y media a dos horas en todos los toros. Es muy recomendable el sistema por Bonadonna de pasear a días alternos que precisamente coinciden con los días en que no se practican recogidas en los sementales (Pérez y Pérez, 1985).

g. Otros factores

Existen ciertas influencias de índole muy diversa capaces de modificar el rendimiento eyaculatorio de los sementales. En tal sentido, Bonadonna, ha demostrado que en

sementales de razas lecheras, la capacidad sexual y eyaculatoria es en general más elevada que en razas de producción cárnica. Las condiciones de manejo por parte del personal encargado, teniendo en cuenta la gran sensibilidad de los sementales; se ha observado que los malos tratos pueden llegar a crear reflejos inhibitorios de tal intensidad que resulten capaces de anular el estímulo sexual de los sementales cuando aquéllos llegan a las salas de recogida. Otro de los factores es la posibilidad de que padezcan el vicio de onanismo, esta pérdida de material eyaculatorio extemporáneas, hacen disminuir el rendimiento de los sementales (Bath et. al., 1986).

III. MATERIALES Y METODOS

3.1. LOCALIZACIÓN

El presente trabajo de investigación, en la etapa experimental de pruebas de motilidad se realizó en el Laboratorio del Servicio de Reproducción Animal (Banco de Semen), del Programa de mejoramiento animal de la Universidad Nacional Agraria La Molina, entre los meses de enero a marzo de 1998, y la etapa experimental de pruebas de fertilidad en campo en los establos ganaderos de las secciones A, B y C de la Irrigación de Majes, distrito de Lluta, Provincia de Caylloma y Departamento de Arequipa, entre abril y diciembre de 1998.

3.2 DE LOS SEMENTALES, MATERIALES Y DILUTORES

3.2.1 Sementales

Se trabajó con dos toros jóvenes de raza Holstein Pedigree que se encontraron de servicio en el Banco Nacional de Semen, mediante convenio. Uno de ellos de nombre *Camay Clear Roebuck "Huandoy"*, registro genealógico 10060 de propiedad de la Sociedad Agropecuaria Camay-Establo Santa Juana, de 3.5 años de edad, cuya habilidad transmisora estimada, (HPTE: pasando a + 586 lb. de leche); y el segundo semental de nombre *Milkito Lottery F.F. "Samoa"*, registro genealógico 9977 de propiedad de Agraria El Escorial de 4 años de edad, de habilidad transmisora estimada, (HPTE: pasando a + 915 lb. de leche); de los cuales se efectuaron un total de 24 colecciones de semen.

Las concentraciones espermáticas del semen puro fueron $1\,278 \times 10^6$ y $1\,371 \times 10^6$ espermatozoides para el toro Huandoy y Samoa; y para el semen diluido se usó 30 millones de espermatozoides por dosis de 0.5 cc. Las hembras inseminadas y evaluadas fueron 136 de la raza Holstein (PPC y Pedigree), y se consideraron vaquillas en edad y peso para el primer servicio y vacas de 1, 2, 3, 4 a más partos.

3.2.2 Materiales

Los materiales utilizados fueron los siguientes:

- Material Básico de Laboratorio.
- Material estándar para congelación de semen.
- Material y equipo básicos para inseminación artificial en campo.

3.2.3 Dilutores

Los dilutores utilizados fueron los siguientes:

- Leche - yema de huevo
- Tris - yema de huevo
- Triladyl

3.3 PROCEDIMIENTO DE COLECCIÓN Y EVALUACIÓN SEMINAL

3.3.1 Colección de semen

La metodología de colección y evaluación seminal fué la misma para cada una de las muestras de semen de los toros empleados con los diferentes dilutores. La colección de semen se realizó por el método de la vagina artificial que es más usual, natural y adecuado. Método que emplea el Banco Nacional de Semen, donde los toros son colectados una vez por semana, los días jueves. Dos saltos con intervalos de 10 a 15 minutos entre el primero y el segundo. Cada toro tiene su vagina artificial individual.

Los días jueves de cada semana, bien temprano por las mañanas, se cojen y amarran los toros sementales para aplicarles un rasqueteo y aseo correspondiente del prepucio, con abundante agua limpia, luego se seca bien.

El brete de monta se encuentra ubicado muy cerca del laboratorio, rodeado de árboles que

le dan sombra, que evitan que los rayos solares dañen los espermatozoides. El piso es de grass (pasto verde), que evita en lo posible la presencia de polvo que puede contaminar el semen. En el brete de monta se coloca otro toro de contextura fuerte, que no está en servicio, permitiéndole una buena sujeción al ser montado y un buen apoyo al semental que realiza la monta y seguridad para la persona que colecta.

Se prepara la vagina artificial que consta de un armazón grueso de caucho, que lleva una funda de látex en el interior del armazón doblado y asegurado a los extremos de éste. Un cono de látex es colocado en el extremo del armazón y al final de dicho cono se adapta un frasco de vidrio esterilizado de color ámbar, el cual sirvió para recoger el semen. El espacio entre el armazón y la funda se le llenó con agua caliente a una temperatura entre 42 a 45°C. Una vez asegurado el toro en el brete, se saca del box al toro semental al que se le efectuará la colección, dándole varias vueltas antes de colectarlo con el fin de excitarlo al máximo, y así de esta forma obtener un semen de mayor volumen y mejor calidad.

La persona que va a colectar se coloca al lado derecho del animal en su parte media, en el momento en que el toro monta con el pene erecto, éste se lo desvía en forma suave cogiéndolo por el prepucio y coloca la vagina delante del glande, en la misma dirección que el pene; espera que el toro realice el salto, luego se retira con la vagina en una mano y con la otra protege y tapa el frasco recolector y espera el segundo salto o de lo contrario el frasco conteniendo el semen es llevado al laboratorio para realizar la evaluación seminal correspondiente.

3.3.2 Evaluación del semen

Una vez colectado el semen, fue examinado con la finalidad de determinar su calidad y se realizaron evaluaciones macroscópicas (aspecto, color, volumen, pH) y microscópicas (concentración y anormalidades), de la siguiente manera:

Aspecto. El aspecto del semen colectado a los toros fué un líquido denso cremoso. Que varió entre términos de fluidez y homogeneidad.

Color. El color del semen fue blanco cremoso.

Volumen. Se determinó utilizando tubos de centrifuga graduados previamente esterilizados, la cantidad promedio por colección fue de 8 cc.

pH. Las mediciones de pH se realizaron en semen puro, este se determinó después de colectado el semen usando para ello cinta de papel reactivo, que se basa en el cambio de color de los mismos.

Motilidad espermática. Se hizo la evaluación en semen puro y diluido.

La evaluación del semen puro se efectuó inmediatamente después de la recogida del semen; de la siguiente manera: Se extrajo una gota de semen con una bagueta y se colocó en una lámina portaobjeto, la misma que fué colocada en el microscopio óptico previamente calentado a una temperatura entre 37.5 y 40°C, para que los espermatozoides desarrollen al máximo su motilidad, observado a cien aumentos. Luego se coloca una laminilla cubre objeto sobre la gota, con el objeto de que la observación de la motilidad se realice en un mismo espesor. Con la ayuda del microscopio se determinó el porcentaje de motilidad de acuerdo a la siguiente tabla:

% Obsevación 80

El porcentaje de 80 % de motilidad considera asumiendo como máximo un 20 % de espermatozoides muertos. Se observa en el campo movimiento de nube y motilidad progresiva de los espermatozoides. Avanzan hacia adelante.

60- El movimiento de nube no es definido; pero siempre existe la motilidad progresiva.

40-50 No existe movimiento de nube; pero sí la motilidad progresiva.

20-30 Aquí solo existe movimiento ondulatorio de los espermatozoides.

01-10 El movimiento ondulatorio es de mucha menor intensidad, hay gran cantidad de espermatozoides muertos.

0 Todos los espermatozoides muertos.

La evaluación del semen diluido, se observó en cuatro oportunidades la primera se realizó inmediatamente después de aplicado el dilutor I, la segunda después de la aplicación del dilutor II, la tercera después de la post ambientación y finalmente la cuarta después de la congelación de la siguiente manera:

Se extrajo una gota de semen diluido y se colocó en una lámina porta objetos previamente temperada entre 37.5 y 40°C. Se colocó una laminilla cubre objetos sobre la gota de semen, observándose varios campos microscópicos la observación de motilidad de la primera dilución hasta pos ambientación (refrigeración) que es de 80 % de espermatozoides móviles y la observación de la motilidad pos-congelación debe ser igual o superior a 60 %, siendo esta motilidad necesariamente observada para llevar las dosis a tanque de almacenamiento.

Concentración espermática. Se determinó mediante el método de cuenta celular directa, (hemocitómetro), el cual consta de una micropipeta y cámara de Neubauer; el procedimiento es el siguiente:

Con la micropipeta de dilución, se absorbe el semen puro hasta la marca 0.5cc. Luego se absorbe agua bidestilada hasta enrasar la marca 101cc, y de esta manera se obtuvo una dilución de 1:200. El agua bidestilada mata los espermatozoides, cuya inmovilidad se desea para realizar la cuenta. Esta dilución se agita en la pipeta durante dos minutos, siguiendo su eje transversal; así se logró la dispersión uniforme de las células en el líquido. Se desecharon las tres primeras gotas de la mezcla. Se colocó una gota en cada uno de los campos de la cámara de Neubauer; dispositivo empleado para la determinación de la concentración. Se esperó cinco minutos antes de efectuar el recuento. Los campos de esta cámara poseen marcaciones que subdividen su volumen en 25 subunidades, las que, a su vez, están subdivididas en 16 pequeños cuadrados.

Con el menor aumento del microscopio (10 x) se ubicó la cámara de Neubauer que tiene 25 cuadrados, luego pasando al mayor aumento (40x) se localizó individualmente las cinco subunidades en el campo de la cámara, y valiéndose de un contómetro de mano se contó los espermatozoides presentes en cada campo, para la cual nos ceñimos por las siguientes

reglas: Se tomo en consideración los espermatozoides presentes en las 5 subunidades. Se consideró solamente las cabezas presentes en las dobles rayas del lado superior, y lado izquierdo de la subunidad. El resultado de la cuenta de espermatozoides presentes en los dos campos, se dividió entre dos, multiplicándose este cociente por la cifra 10 000; para obtener así la concentración espermática por mm^3 , de semen mediante la siguiente ecuación:

$$N^{\circ} \text{ espermatozoides contados } \times 10\,000 = \text{Concentración espermática}/\text{mm}^3$$

3.4 DILUTORES, PROCESO DE PREPARACIÓN Y DILUCIÓN

Los dilutores se prepararon en el Laboratorio del Banco Nacional de Semen, de la Universidad Agraria La Molina, un día antes de la colección y conservados en refrigeración.

3.4.1 Dilutor leche-yema (100cc)

a. Preparación

En el presente trabajo se utilizó la leche UHT Drinky Milky, que tiene la propiedad de conservarse mejor, ya que es un producto estéril y a diferencia de otras formas de leche, se puede utilizar directamente como diluyente y sólo precisa abrir cada día un nuevo envase de leche UHT. Se pesan separadamente 1.250gr., de fructosa y 0.03034gr., de penicilina G sódica y 0.50gr., de estreptomicina. Luego se añade leche UHT hasta enrasar a 100 cc, disolviendo suavemente con una bagueta de vidrio; esto constituye la solución madre. A partir de esta solución madre, se preparan dos soluciones diferentes, para lo cual se hace lo siguiente:

1. Se prepara 43.5 cc de solución madre en una probeta y luego se añade 5 cc de yema de huevo y 1.5 cc de glicerina (Solución I) y se agita bien haciendo movimientos de bagueta de adentro hacia afuera, hasta lograr una solución homogénea.

2. Se toma 39.5 cc de solución madre añadir 5 cc de yema de huevo y 5.5 cc de glicerina (Solución II).

b. Dilución del semen

En un matraz de vidrio (erlenmeyer), se colocó semen de cada toro, luego se le agregó la primera fracción del dilutor 1 en forma lenta y cuidadosa; ambos líquidos se mantuvieron a 30°C. Se puso en refrigeración (4-5°C), la mezcla por 6 horas, al cabo de las cuales (dentro del refrigerador), se procedió a añadir la fracción glicerinada del dilutor II con una pipeta conservada a la misma temperatura del dilutor. Este proceso se hizo en tercios cada 15 minutos mediante gotas continuas, por las paredes del frasco a fin de evitar el shock térmico.

Solución Madre

Ingredientes	(gr)
Fructosa	1.250
Penicilina G-sódica	0.03034
Estreptomina	0.050
Leche UHT (enrasar)	100 cc

Dilutores:	<u>I</u>	<u>II</u>
Solución Madre	43.5cc	39.5 cc
Yema de huevo	5 cc	5 cc
Glicerina	1.5 cc	5.5 cc
Total volumen	50 cc	50 cc

Luego de observar el efecto de la glicerina (la motilidad se mantuvo), se procedió rápidamente con las operaciones de llenado en pajilla de 0.5 cc conservadas dentro del refrigerador entre 4 a 5°C; luego de las operaciones del llenado (bomba aspiradora al vacío) y sellado con alcohol polivinílico en polvo, las pajillas fueron colocadas en un recipiente con agua fría. A fin de lograr el equilibrio de los espermatozoides, con la glicerina, se mantuvo durante 18 horas las pajillas dentro del refrigerador a 4-5°C. Se

chequeó algunas pajillas observando la motilidad; procediéndose en caso satisfactorio a realizar el congelamiento, siguiendo el método usado por el Banco Nacional de Semen.

3.4.2 Dilutor tris-yema

a. Preparación

Para preparar este dilutor se pesan 3.605 gr. de Tris (hidroximetil amino metano), 2.025 gr. de ácido cítrico y 1.488 gr. de fructuosa; a esto se le adiciona 67.2 mg. de hidroestreptomicina y 67200 U.I. de penicilina, luego enrasar a 100cc con agua bidestilada y mezclar agitando suavemente con una varilla de vidrio o bagueta, a esta disolución se le llama *Solución Madre*

A partir de esta disolución se preparan las soluciones I y II, de la siguiente manera.

Solución Madre

Tris	3.605 (gr)
Acido cítrico	2.025 (gr)
Fructosa	1.488 (gr)
Penicilina G-sódica	0.04077 (gr)
D-Estreptomicina	0.0672 (gr)
Agua bidestilada	100 (cc)

Dilutores:	<u>I</u>	<u>II</u>
Solución Madre	67.2cc	67.2 cc
Yema de huevo	20 cc	20 cc
A B D.	12.8cc	_____
Glicerina	_____	12.8 cc
Total (volumen)	100cc	100cc

b. Dilución

Se utilizó el método convencional del Banco Nacional de Semen para lo cual los dilutores y el semen se mantienen a temperatura de 30°C, en baño maria, se coloca el semen de cada toro en un matraz erlenmeyer y se le añade el dilutor I, haciendo discurrir lentamente por las paredes del matraz; post dilución con solución I; luego la solución II se divide en tres partes; cada una de las cuales se añade cada 15 minutos. Una vez terminada la adición se vuelve a observar la motilidad al microscopio. Si ésta es buena, se procede al envasado del semen en pajillas de 0.5 cc de capacidad, las cuales tienen la identificación del toro; se sellan las pajillas y luego pasan a ambientación (refrigeración) a 5°C por 18 horas.

3.4.3 Dilutor triladyl

a. Preparación

Es un dilutor que viene preparado comercialmente en forma concentrada y es distribuido en el Mercado por la firma MERCK (Alemania). La composición comercial es la siguiente: 3.05 gr. de Tris (hidroximetil amino metanol), 2.024 gr. de ácido cítrico, 1.488 gr. de fructosa, 1 000 U.I. de penicilina G-Na, 1.00 gr. de sulfato de dihidroestreptomicina y 6.0 cc de glicerol.

Composición concentrada

Tris	3.05	(gr)
Ácido cítrico	2.024	(gr)
Fructosa	1.488	(gr)
Penicilina G-Na	0.0607	(gr)
Sulfato de dihidroestreptomicina	0.1	(gr)
Glicerol	6	(%)

b. Dilución

La metodología de dilución, con el dilutor Triladyl, fue la siguiente: Para realizar la dilución, se tomó 20cc del dilutor Triladyl concentrado con una pipeta, se mezcló en 60cc

de agua bidestilada contenidos en una probeta de 100cc de capacidad. Se disolvió con una bagueta de vidrio dando vueltas en círculos; luego se agregó 20cc de yema de huevo y con la bagueta de vidrio se realizó una mezcla homogénea sin producir burbujas. El volumen del dilutor Triladyl (20cc) a usar se obtuvo mediante el cálculo del volumen y concentración espermática del semen y número de espermatozoides de 30 millones por pajilla de 0.5cc.

La dilución se realizó a temperatura ambiente de 30°C, colocando el semen de cada toro en un matraz erlenmeyer y se le añadió el dilutor Triladyl haciendo discurrir lentamente por las paredes del matraz. Se coge con la mano el matraz que contiene el semen y el dilutor y se le hace girar el contenido dando vueltas para alcanzar una mejor mezcla. Finalmente se puede realizar la observación de la motilidad al Microscopio, para efectuar el llenado y llevarlo a ambientación a 5°C en el refrigerador por 18 horas.

Dilución

Triladyl	20cc
Yema de huevo	20cc
Agua bidestilada	60cc
Total volumen	100cc

3.5 PROCEDIMIENTO DE ENVASADO, AMBIENTACIÓN Y CONGELACIÓN

3.5.1 Envasado

Este procedimiento se usó en forma general para cada muestra tratada con los diferentes dilutores. Se toma un clip que contiene 15 pajillas identificadas con el número de registro genealógico, nombre y raza del toro. En un recipiente especial de plástico descartable estéril, se colocó el semen diluido, para ser llenado mediante una bomba de aspiración conectada a un dispositivo que tiene 15 salidas o pequeños tubos que se conectan a las pajillas sostenidas al clip; al manipular la bomba de vacío permite el rápido llenado de las pajillas, y luego por el extremo opuesto se introduce un peine para crear un espacio (burbuja de aire) que permita el sellado de las mismas con polvo de alcohol polivinílico, el cual al contacto con el semen se vuelve gel impermeable; luego el grupo de pajillas se

coloca en una bandeja con agua , lo cual completa el sellado de las pajillas y se lleva a refrigeración a 4 - 5°C por 18 horas.

3.5.2 Ambientación

La ambientación de las pajillas de semen se realizó a 4-5°C en un refrigerador, donde fueron colocadas en cubetas con agua durante 18 horas, efectuándose de esta manera el equilibrio con la glicerina. Pasado este período se volvió a analizar la motilidad, esta no fué menor de 71.25 %. Todas las pajillas cumplieron este requisito y estuvieron listas para la congelación.

3.5.3 Congelación

Al día siguiente de haber efectuado la dilución, se retiran las pajillas del agua contenidas en las cubetas del refrigerador que estuvieron en la etapa de ambientación por 18 horas, se las coje con la mano (un puñado), sacudiéndolas para eliminar el agua, enseguida se procede a secarlas bien con una toalla de tela de algodón o papel toalla.

En una caja térmica (tecnopor) de 60cm de largo por 40cm de ancho y 40cm de alto, se vierte unos 3 - 4kg., de nitrógeno líquido, en una rejilla especialmente adaptada se colocan esparcidas las pajillas bien secas. La rejilla conteniendo las pajillas se coloca en la parte superior de la caja de tecnopor que emana vapores de nitrógeno líquido. En este momento se da inicio a la congelación de las pajillas de semen, para ello con un aparato que es sensor de temperatura, controlador cronometrado o un reloj pulsera con cronómetro se controla la disminución de la temperatura introduciendo poco a poco la rejilla con las pajillas de semen hacia el nitrógeno; la temperatura debe bajar 20°C por cada minuto, de modo que en 7 minutos se hizo bajar la temperatura a -140°C, una vez alcanzada esta temperatura se sumergen las pajillas en el nitrógeno líquido a -196°C.

En la base de la caja de congelación (tecnopor), se coloca una resistencia que se conecta al fluido eléctrico (electricidad), al momento de la congelación, que mediante un interruptor hace que la resistencia se encienda lo que permite mayor evaporación de nitrógeno que

sirve para aumentar la velocidad de congelación de las pajillas. Se analiza nuevamente la motilidad descongelando una dosis en agua tibia a 40°C. El mínimo de motilidad espermática progresiva que se aceptó fue de 60 %. Las dosis que cumplieron con este requisito se almacenaron en un tanque de nitrógeno a -196°C para su evaluación y uso posterior.

3.6 PROCEDIMIENTO DE INSEMINACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA FERTILIDAD

3.6.1 Inseminaciones

Se diseñaron tarjetas de identificación y registros reproductivos y sanitarios. Las visitas e inseminaciones se efectuaron, de acuerdo al inicio del celo de las vaquillonas y vacas, todos los días (mañana, tarde y noche), utilizando el método de palpación rectal o cervical profundo, de la siguiente manera:

Primeramente se identificó al animal mediante su registro reproductivo para conocer la fecha de su último parto, número de partos, fecha del último servicio, hora de inicio del celo, etc. Seguidamente se hizo una revisión para comprobar que el animal esté realmente en celo presentando la vulva hinchada de color rojizo y con abundante secreción cristalina, procediendo a realizar la inseminación. Culminado el procedimiento de inseminación, se procedió al llenado de registros en los que se indicó la fecha del servicio (mes, día y año), identificación de la vaca (número de arete, collar, nombre), número de código del toro, número de recolección, tratamiento, etc.

3.6.2 Colección de datos

Los datos fueron obtenidos de los establos ganaderos seleccionados por un buen manejo técnico reproductivo, comprendidos en las zonas A, B y C de la Irrigación de Majes, y tomados de las tarjetas individuales de vaquillonas para el servicio y vacas de primer servicio post-parto, que fueron inseminadas con el semen diluido, en Tris, Leche y Triladyl. Estos datos extraídos de los registros y tarjetas individuales de las vacas y

vaquillonas, comprendidas entre los servicios efectuados desde mayo hasta Noviembre de 1998, hizo un total de 136 servicios efectuados.

La información colectada fué la siguiente:

- Número de identificación de cada vaca.
- Fecha y hora de inicio de celo.
- Fecha y número de servicio.
- Fecha del último parto.
- Tratamiento de semen usado en cada servicio.
- Número de partos.
- Dias vacíos.
- Fecha del diagnóstico de preñez.
- Resultado del servicio (preñada o vacía).
- Abortos.

3.7 INDICES Y FÓRMULAS USADAS PARA EL CÁLCULO DE PARÁMETROS REPRODUCTIVOS

Los índices reproductivos tomados en cuenta para la ejecución del presente trabajo de Investigación fueron:

- Porcentaje de preñez al primer servicio.
- Porcentaje total de preñez.
- Número total de servicios por preñez.
- Porcentaje de abortos.

Siendo el cálculo del valor numérico de cada uno de los índices anteriormente mencionados, por las siguientes fórmulas generales:

$$\mathbf{1. \text{ Porcentaje de preñez al 1}^{\text{er}} \text{ Servicio}} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ preñeces logradas}}{\text{N}^{\circ} \text{ de servicios efectuados}} \times 100$$

$$2. \text{ Número de Servicios/preñez} = \frac{\text{N}^\circ \text{ servicios efectuados}}{\text{N}^\circ \text{ preñeces logradas}}$$

$$3. \text{ Porcentaje de preñez acumulada} = \frac{\text{N}^\circ \text{ preñeces logradas}}{\text{Servicios efectuados}} \times 100$$

$$4. \text{ Porcentaje de Abortos} = \frac{\text{N}^\circ \text{ abortos}}{\text{N}^\circ \text{ preñeces logradas}} \times 100$$

3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

3.8.1 Fase de laboratorio

Se realizó un análisis de regresión simple para conocer el grado de dependencia entre las variables, motilidad inicial (x) y motilidad pos-congelación (y). Para los parámetros de evaluación seminal se utilizó el Diseño completamente al azar con Arreglo Factorial 3 x 2, donde los factores de variación fueron 3 dilutores y 2 toros empleados; la información fué obtenida de 6 congelaciones por toro. Se aplicó la prueba de comprobación de medias de Duncan y los resultados porcentuales de motilidad, para el análisis de varianza, fueron sujetos a una transformación angular Arco seno ($Y = \arcsen \sqrt{y_{ix}/100}$). El procedimiento utilizado es descrito por Montgomery Douglas, (1996).

Siendo el modelo aditivo lineal:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + A*B_{ij} + e_{ijk}$$

Factor **A**, con tres variables

Factor **B**, con dos variables

En donde:

A = Diferentes dilutores, siendo éstos: leche, tris y Triladyl.

B = Diferentes toros, siendo los toros: Huandoy (1) y Samoa (2).

Y_{ijk} = Observación cualquiera del experimento, donde:

i = 1, 2, 3 Variables de A

j = 1,2. Variables de B

k = 1, 2, ... Número de repeticiones.

μ = Efecto de la media

A_i = Efecto del factor A en el nivel i

B_j = Efecto del factor B en el nivel j.

A*B_{ij} = Efecto conjunto de los factores A, B en los niveles i j.

E_{ijk} = Término de error correspondiente a la observación de Yijk.

3.8.2 Fase de campo

Para determinar los porcentajes de preñez en campo, se realizaron comparaciones en base a los índices reproductivos y así evaluar el nivel fecundante, del semen diluído en Tris, Leche y Triladyl; Se hicieron pruebas de Chi cuadrado (χ^2), para análisis de significación. Para determinar si existen diferencias entre medias de dilutores. (Montgomery, Douglas, 1996).

Se determinaron también las respectivas ecuaciones de regresión para motilidad final de cada dilutor, así como la correlación lineal para ver el grado de asociación entre las variables “porcentaje de motilidad post congelación” y “porcentaje de fertilidad obtenida por cada dilutor”.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. MOTILIDAD ESPERMÁTICA EN SEMEN PURO, DILUIDO Y CONGELADO

El promedio de la motilidad del semen puro (previo a la dilución), fue de 78.75 por ciento, para las muestras a diluirse con Tris-Yema, Leche-Yema y Triladyl-Yema, respectivamente.

La motilidad, luego de la glicerización, dilución I + II, en los dilutores Tris-yema y Leche-yema; y una sola dilución con Triladyl-yema; en fase I, se redujo a 72.7, 74.16 y 73.75 por ciento; respectivamente.

Luego de los periodos de equilibrio (ambientación; Fase II), la motilidad descendió a 71.25, 71.46 y 73.12 por ciento; respectivamente.

La congelación-descongelación (Fase III), provocó el descenso más marcado de la motilidad en los tres tratamientos, siendo la misma de 64.16, 66.25 y 66.66 por ciento; respectivamente.

Los resultados encontrados indican una similitud en la performance de los tres dilutores, en las dos primeras fases de dilución de la solución glicerizada (glicerización), y en la etapa de equilibrio del semen (ambientación), así la cifra de motilidad espermática halladas en cada una de las dos etapas (Cuadro 1 y 2), no muestran diferencias entre tratamientos mayores a 1.46 por ciento en fase I y de 1.88 por ciento en fase II, respectivamente.

Cuadro 1. Porcentajes promedio de motilidad espermática en las diferentes fases de procesamiento y congelación del semen.

Dilutores	Semen Puro. %	Post. Glicerinado %	Post. Equilibrio %	Post. Congelado %
Tris - Yema	78.75	72.70	71.25	64.16
Leche – Yema	78.75	74.16	71.46	66.25
Triladyl – Yema	78.75	73.75	73.125	66.66

Cuadro 2. Disminución de la motilidad espermática en las fases del proceso de congelación.

Motilidad	Dilutores	Semen Puro	Post-Glicerinado	Post-Equilibrio	Post-Congelación
Motilidad Espermática	Tris-Yema	78.75	72.70	71.25	64.16
	Leche-Yema	78.75	74.16	71.46	66.25
	Triladyl-Yema	78.75	73.75	73.125	66.66
Disminución de la Motilidad Espermática	Tris-Yema		6.05	1.45	7.09
	Leche-Yema		4.59	2.70	5.21
	Triladyl-Yema		5.00	0.63	6.47
Distribución de la Motilidad.	Tris-Yema		32.66	7.83	38.27
	Leche-Yema		28.92	17.01	32.82
	Triladyl-Yema		32.54	4.10	42.11

Total (78.75 %).

Al análisis de variancia (Cuadro 3 y 4), no existe diferencia significativa entre las motilidades mostradas en las fases de dilución y post ambientación; con valores encontrados de: 72.77, 74.16 y 73.75 por ciento y de 71.25, 71.46 y 73.12 por ciento, para tris-yema, leche-yema y triladyl-yema, respectivamente; éstos resultados son similares a

los encontrados por Anduaga (1980), que al análisis respectivo entre los dilutores Tris y Yema Citrato de sodio, no encontró diferencia significativa en las fases de dilución, glicerinado y equilibrio seminales, con los valores de: 75.5 y 73.8; 69.5 y 69.2; 65.5 y 64.5 por ciento; para tris y citrato; lo cual no coincide con lo encontrado por Duarte y Rodriguez (1964), que hallaron una diferencia altamente significativa en lo que se refiere a la motilidad en las tres primeras fases de la congelación del dilutor citrato-yema sobre el dilutor leche homogenizada, con valores de motilidad de: 90.4, 79.5 y 56.6 por ciento para citrato-yema, y de 90.8, 82.2 y 62.5 por ciento para leche homogenizada.

Cuadro 3. Análisis de Variancia para semen diluido glicerinado “Fase I”

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	F. Calculada	Significación
Tratamiento	5	1.34	0.26	N.S.
A	2	2.8	0.55	N.S.
B	1	0.08	0.016	N.S.
A X B	2	0.51	0.101	N.S.
Error	30	5.136 *		
Total	35	4,594		

(*) Análisis basado sobre la transformación de los porcentajes a arco seno.

N.S. : No significativo.

En la Tercera Fase (Fase de congelación-descongelación III), los porcentajes de supervivencia espermática (conservación de la motilidad respecto de la motilidad inicial), fueron de 66.16, 66.25 y 66.66 por ciento respectivamente en los dilutores Tris-Yema, Leche-Yema y Triladyl-Yema, no siendo significativa la diferencia (Cuadro 5). Esto corrobora los resultados hallados por Duarte y Rodriguez (1964), que no encontraron diferencias en los valores de motilidad comparando los dilutores Tris-Yema, Yema-Citrato y Leche homogeneizada, en muestras congeladas en ampollas.

Los análisis de regresión para cada dilutor, mostraron una relación directa entre los valores de motilidad inicial (X) y motilidad post congelamiento (Y), (Fase III), pudiéndose

considerar las ecuaciones de regresión obtenidas, un carácter lineal entre ambos estadíos del semen, durante el procesamiento, aplicable a los altos valores de motilidad inicial (75 a 80%), con las que fueron en la práctica realizados los experimentos. Las ecuaciones (1), (2) y (3), corresponden a los dilutores Tris-Yema, Leche-Yema y Triladyl-Yema respectivamente.

$$(1) Y = 0.667 X + 11.66$$

$$(2) Y = 1.222 X - 29.98$$

$$(3) Y = 1.778 X - 73.35$$

Cuadro 4. Análisis de Variancia para semen refrigerado en ambientación “Fase II”

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	F. Calculada	Significación
Tratamiento	5	2.329	0.438	N.S.
A	2	5.241	0.99	N.S.
B	1	0.30	0.057	N.S.
A X B	2	0.428	0.08	N.S.
Error	30	5.31 *		
Total	35			

(*) Análisis basados sobre la transformación de los porcentajes a arco seno.

N.S. : No significativo.

De las anteriores ecuaciones se deduce que para los rangos anteriormente mencionados, una influencia adicional en uno por ciento (1%) en la motilidad inicial significa en la motilidad post congelamiento, diferencias similares en los dilutores Tris-Yema, Leche-Yema y Triladyl-Yema: 0.667 por ciento, 1.22 por ciento y 1.78 por ciento respectivamente.

Esta similar efectividad en la mantención de la viabilidad espermática en el proceso de congelación, se debe en alta medida a la calidad buffer del ingrediente Tris hidroximetil amino metano, que contiene los dilutores Tris-Yema y Triladyl-Yema, lo que permite

conservar eficazmente el equilibrio interno de la solución, especialmente a nivel de electrolitos libres, según referencias de Nahas (1961), y de igual manera se comporta el dilutor Leche-Yema (cierta capacidad tampon), debido a la proteína de la leche (caseína), que proviene de la misma especie, que es la más parecida a la del semen, no la afecta mayormente y es la sustancia responsable en la prevención del choque por frío y sus niveles óptimos oscilan de 1 a 8 por ciento.

Cuadro 5. Análisis de variancia para semen diluido congelado

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	F. Calculada	Significaciòn
Tratamiento	5	3.99	0.59	N.S.
A	2	8.12	1.21	N.S.
B	1	0.26	0,038	N.S.
A X B	2	1.74	0.26	N.S.
Error	30	6.69 *		
Total	35			

(*) Analisis basado sobre la transformaciòn de los porcentajes arco seno

N.S. : No Significativo.

Los efectos beneficiosos de la yema de huevo (en un volumen de 20 %), en los tres dilutores, protegen contra el shock del frío y no altera el comportamiento de los espermatozoides; así como la alta concentración de espermatozoides por dosis. Lo que es corroborado por Salisbury et. al. (1982), Hafes (1989), quienes reportan que Tris y Triladyl se comportan como sustancias buffer; así como la leche tiene cierta capacidad tampòn.

4.2. MOTILIDAD ESPERMÁTICA Y PORCENTAJE DE FERTILIDAD

En el Cuadro 6, se muestran los porcentajes de motilidad espermática y porcentaje de fertilidad, según dilutor utilizado. Se puede observar una primera columna en la que se

considera los tres dilutores (Tris-Yema, Leche-Yema y Triladyl-Yema), luego se consignan los porcentajes de motilidad espermática, considerando las siguientes fases del proceso de congelación: Post glicerinado, equilibrio y post congelación. El semen colectado puro, fue tomado con un promedio de 78.75 por ciento de motilidad inicial.

El comportamiento de la disminución de la motilidad espermática durante el proceso de congelación, muestra en términos generales una tendencia de disminución acentuada, entre el semen puro y el post glicerinado una baja de 6.05, 4.59 y 5.0 por ciento; menor entre el post glicerinado y antes de congelar (equilibrio) 1.45, 2.7 y 0.63 por ciento; y luego de la congelación se produce la más acentuada disminución de 7.09, 5.21 y 6.47 por ciento; para los tratamientos Tris-Yema, Leche-Yema y Triladyl-Yema, respectivamente.

Existen variaciones no muy marcadas entre los dilutores, debiéndose destacar la homogeneidad y superioridad en el comportamiento de la motilidad espermática de los tres dilutores en mención. Se tomo en cuenta, que el porcentaje de disminución de la motilidad espermática, durante el proceso de manipuleo y congelación del semen, es el resultado entre la motilidad tomada como inicial (semen puro), y la obtenida después de la congelación. Siendo estos valores de 14.59, 12.5 y 12.10 por ciento, para Tris-Yema, Leche-Yema y Triladyl-Yema, respectivamente.

Al relacionar la baja significativa de motilidad que se observa en la fase post glicerinado o antes de la congelación (equilibrio), de 6.05, 4.59 y 5.0 por ciento se puede deber quizá a dos hechos principales. El primero está relacionado al agregado del dilutor glicerinado, que produce una redilución del semen, a la vez, que una serie de recambios de la célula espermática con el medio que lo rodea.

Cuadro 6. Motilidad espermática y porcentajes de fertilidad en vacas según dilutor utilizado

Dilutores	Semen Puro	Post. Glicerinado	Post. Equilibrio	Post. Congelación	Número de Inseminaciones	Número de Preñeces	Porcentaje De Fertilidad
Tris-yema	78.75	72.70	71.25	64.16	47	34	72.3 a
Leche-yema	78.75	74.16	71.46	66.25	44	29	65.9 a
Triladyl-yema	78.75	73.75	73.125	66.66	45	37	82.2 a

* Promedio con letras iguales no muestran diferencias estadísticamente significativas ($p>0,05$).

También existe la posibilidad que al aplicar la parte del dilutor que contiene glicerina no se realice en forma apropiada lo que produciría cierto shock en los espermatozoides; lo que concuerda con Duarte y Rodriguez (1964), que encontraron una baja del 4.8 por ciento y 11.7 por ciento de motilidades espermática en la fase post glicerinado con los dilutores Leche homogeneizada y Citrato de sodio, y Anduaga (1980), que no encontró diferencia significativa en la fase de glicerinado con Citrato de sodio y Tris, en Lima.

La acentuada diferencia de motilidad espermática en la fase de post congelación de 7.09, 5.21 y 6.47 por ciento, sucede en forma lógica por el efecto de la congelación y descongelación del semen. En esta etapa origina un cambio brusco en los espermatozoides, tanto, en lo que se refiere al fuerte shock al descender la temperatura al congelar y la brusca subida de la misma, al descongelar. Hecho que produce un efecto selectivo de espermatozoides que logran ser los más resistentes y sobreviven a estos cambios, resultados que concuerdan con Duarte y Rodriguez (1964), que encontraron una baja de la motilidad luego de la congelación de 21.4 por ciento trabajando con Leche Homogeneizada y Citrato de Sodio; y con el trabajo de Anduaga, (1980) que encontró el 14.1 por ciento y 25 por ciento de muerte zoospérmica en la fase de congelación para los dilutores Tris y Citrato de Sodio.

Para poder estudiar el comportamiento de los dilutores, con respecto a la fertilidad del

semen, fue necesario tomar en cuenta una serie de aspectos mencionados por Eapen (1962), Braton et. al. (1978), Pickett et.al. (1978), Vivanco (1978), Pérez y Pérez (1985), Davis (1988), Hafes (1989), Martinez (1995), Stevenson (1995f), Orrillo (1996), como: tasa de dilución de 1:18, concentración espermática de 30 millones de espermatozoides por dosis o pajilla de inseminación, vacas y vaquillonas sin problemas reproductivos para primer servicio, técnico experimentado, manejo adecuado del material y equipo, etc.; lo que hace suponer que muchos espermatozoides, sobrevivan al manipuleo hasta la congelación, descongelación y servicio, reteniendo una alta capacidad fertilizante y que no esté relacionada con la motilidad de la muestra.

Finalmente se realizó un estudio de correlación simple entre porcentaje de supervivencia espermática, al finalizar la congelación y el porcentaje de fertilidad. No se encontró significación, por ser una cifra muy baja ($r = 0,26$). Lo que demuestra, que la motilidad, en el caso del semen congelado, no tiene tanta importancia en la fertilidad, cosa que si guarda mayor correlación en el caso del semen refrigerado, lo cual podría coincidir con Duarte y Rodriguez (1964), no encontraron valores de significación en el estudio de correlación entre cifras de pérdida de porcentajes de motilidad en semen congelado y porcentajes de preñez obtenido, con el dilutor Leche homogeneizada y Citrato de sodio; y Desjardins y Hafs (1962), que reportan una alta correlación entre la motilidad de semen conservado a medio ambiente con la capacidad fecundante.

4.3. PORCENTAJE DE PREÑEZ, SEGÚN DILUTOR UTILIZADO EN TOTAL DE VACAS SERVIDAS

En el Cuadro 7, se muestran el número de servicios por preñez y los porcentajes de preñez en cada uno de los tratamientos considerados en el presente estudio. Al realizar la prueba de Chi cuadrado (χ^2) para determinar la existencia de homogeneidad entre los tratamientos en base a los porcentajes de preñez al primer servicio, no se encontró diferencias estadísticas significativas ($p > 0.05$), entre ellos, es decir, los porcentajes de preñez de los tratamientos Tris-Yema, Leche-Yema y Triladyl-Yema, son similares u homogéneos estadísticamente. A pesar de darse un mayor porcentaje de preñez de 16.32 por ciento del tratamiento Triladyl-Yema, sobre el tratamiento Leche-Yema y de 9.88 por ciento que el tratamiento Tris-Yema respectivamente.

Cuadro 7. Número de servicios y porcentaje de preñez, en total de servicios efectuados según dilutor utilizado.

Dilutores	Total servicios efectuados	Número de servicios no Efectivos	Número de Preñeces	Número de servicios por preñez	Porcentaje de preñez	Significación
Tris-yema	47	13	34	1.38	72.34	N.S.
Leche-yema	44	15	29	1.51	65.9	N.S.
Triladyl-yema	45	08	37	1.21	82.2	N.S.

N.S. : No Significativo ($p>0,05$).

4.3.1 Número de servicios por preñez en total de vacas servidas

El número de servicios por preñez fue de 1.38, 1.51 y 1.21 para Tris- yema, Leche- yema y Triladyl - yema, considerados buenos dentro de la clasificación que hace De Alba (1964), referida en el cuadro anterior (Cuadro 7). Estos resultados son menores a Kindliman (1977) de 2.54 en Lima, Chimpén (1980) de 1.61 y 1.53 trabajando con semen importado y nacional en Lima, Parreño (1991) de 2.04 en Arequipa, Castro y Bernal (1996) de 2.51 en Lambayeque, y 2.53, 2.25 y 2.32 encontrados por Mellisho (1997), en la Cuenca de Lima. Así mismo el número de servicios por preñes es menor a los encontrados por investigadores de otros países como los de: La Asociación Israelí Criadores de Ganado (1986) con 2.51 en Israel, Harwood (1991) de 2.3 en la Universidad Wisconsin E.E. U.U. y Baucells (1995) de 3.1 en España.

4.3.2 Porcentaje de preñez en total de vacas servidas

El porcentaje de preñez encontrado, el más alto corresponde al dilutor Triladyl - yema y los menores a los dilutores Tris - yema y Leche - yema, con 82.22 por ciento, 72.34 por ciento y 65.9 por ciento, respectivamente. Resultados que se consideran buenos dentro del nivel alto en la clasificación que hace De Alba (1964), mostrados en el Cuadro 7. Estos resultados son mayores a los encontrados por Kindliman (1977) en Lima, Parreño (1991)

en Arequipa, Castro y Bernal en Lambayeque, con 42.80 por ciento, 46.49 por ciento y 49.13 por ciento, respectivamente; y mayores a los encontrados por Mellisho (1997) con 31.59 por ciento, 35.94 por ciento y 32.34 por ciento en vacas de tres establos en la Cuenca Lechera de Lima; así mismo mayores a 64.97 por ciento y 61.98 por ciento reportados por Chimpen (1980), que trabajó con semen nacional e importado en doce establos de Lima.

Estos resultados también son superiores a los reportados por investigadores de otros países como: Docmeq et. al. (1995), reporta 34 por ciento de fertilidad en vacas Holstein en Estados Unidos, Baucells (1995) con 37 por ciento de fertilidad en vacas en España, Vishwanath et. al. (1996) de 69.9 y 41.5 por ciento con semen refrigerado y congelado en Nueva Zelanda.

Se encontró un alto nivel de fertilidad, dentro del cual no existe diferencia significativa ($P > 0.05$), a favor de ninguno de los tres tratamientos (Tris-Yema, Leche-Yema y Triladyl-Yema), lo que quiere decir que los dilutores tienen comportamiento similar u homogéneo como sustancia biológica y que los hatos lecheros de los ganaderos de la Irrigación de Majes se encuentran en un nivel alto de manejo reproductivo, y tienen mucho cuidado en el manejo del semen.

4.4 NÚMERO DE SERVICIOS Y PORCENTAJE DE PREÑEZ EN VAQUILLONAS

4.4.1 Número de servicios por preñez

Según el Cuadro 8, el número de servicios por preñez para el semen usado en vaquillonas fue: 1.15 que es menor al reportado por Kindliman (1977) con 1.5 en Lima, Chimpen (1980) con 1.45 y 1.38 con semen importado y nacional en Lima, Salas (1983) con 1.93 en Lima UNALM, Parreño (1991) con 1.44 en Arequipa, Castro y Bernal (1996) con 1.60 en Lambayeque y Mellisho (1997) en Lima en tres establos con 1.54, 1.72 y 1.55 servicios por preñez. Menor a los reportados de otros países como los obtenidos por La Asociación Israelí Criadores de Ganado (1986) de 1,66 en Israel y Simert et. al. (1991) de 2.11 en Estados Unidos.

Existe una diferencia significativa ($P < 0.05$), de los promedios de fertilidad alcanzados por las vaquillonas y vacas de uno a tres partos, sobre las vacas de cuatro a más partos. Lo que nos demuestra, la baja fertilidad alcanzada por los animales de cuatro a más partos debido a problemas reproductivos de diferente índole que son sujetas las vacas adultas. Considerándose estos porcentajes como buenos dentro del más alto nivel para vaquillonas y vacas de uno a tres partos; y para vacas de cuatro a más partos es considerado como malo en el nivel bajo en la clasificación que hace de Alba, (1964).

4.4.2. Porcentaje de preñez

Se analizó el comportamiento del nivel de fertilidad en base al porcentaje de preñez al primer servicio, de acuerdo a lo mostrado en el Cuadro 8.

Las vaquillonas presentaron porcentajes de preñez superiores a las vacas, con 86.67 por ciento (vacas 77.5 y 56.25 %), este resultado es superior con lo reportado por Chimpén (1980) con 68.89 por ciento y 72.30 por ciento con semen importado y nacional, que reporta que las vaquillonas son más fértiles que las vacas, en Lima; superior a 63.09 58.10 y 64.57 por ciento reportado por Mellisho (1997) en Lima, superior a lo mostrado por Parreño (1991) con 69.3 por ciento en Arequipa y Salas (1983) con 52.04 por ciento en vaquillas en el establo de la Universidad Nacional Agraria La Molina. Así mismo son superiores a los encontrados por Investigadores extranjeros, como los reportados por La Asociación Israelí, Criadores de Ganado (1986) con 65 por ciento de efectividad para el primer servicio en Israel y en E.E. U.U. Graves et. al. (1991), encuentro 67 por ciento para todos los servicios.

Cuadro 8. Porcentaje de fertilidad y número de servicios por preñez en grupos de vaquillonas, vacas de uno a tres partos y vacas de cuatro a más partos

Número de partos	Número de preñez	Número de servicios que no preñaron	Total de servicios efectuados	Número de servicios por preñez	Porcentaje de preñez	Significación Porcentaje preñez
Vaquillonas	13	02	15	1.15	86.67	a
Vacas de 1ª 3 Partos.	69	20	89	1.29	77.5	a
Vacas de 4 a más Partos	18	14	32	1.78	56.25	b

(a, b) : Diferentes letras muestra que existe diferencia significativa estadísticamente(p >0.05).

Una probable causa en la diferencia de fertilidad entre vaquillonas y vacas (de uno a más partos), se podría deber al estado del tracto reproductivo de vaquillonas y a su fisiología reproductiva (Asdell, 1968; Cole y Cups, 1977; Hafes, 1989; Martinez, 1995; Stevenson, 1995 f). A diferencia de las vaquillonas, las vacas como ya han parido el tracto reproductivo se encuentra contaminado y a partir de la primera lactación la fisiología reproductiva se altera con la mayoría de edad del animal o mayor número de partos; a pesar de que el semen congelado (Nacional), en promedio tiene treinta millones de espermatozoides por dosis (Vivanco, 1978), lo que le da un buen margen de seguridad en hatos lecheros donde el manejo del semen no es eficiente.

V. CONCLUSIONES

El análisis respectivo entre los tres dilutores no mostró diferencia significativa en las fases de glicerinado, equilibrio y post-congelamiento en la conservación de la motilidad espermática.

La disminución de la motilidad espermática en la fase de congelación-descongelación provocó el descenso más marcado de la motilidad en los tres dilutores, correspondiendo el 64.16 %, 66.25 % y 66.66 %, para tris-yema, leche-yema y triladyl-yema; porcentajes de motilidad en semen congelado que se encuentran por encima (60 %) del porcentaje técnico recomendado.

El porcentaje de preñez de 72.34 65.9 y 82.22 % encontrado usando semen diluido en Tris-yema, Leche-yema y Triladyl-yema, fue estadísticamente no significativo, teniendo un comportamiento similar los tres dilutores para los primeros servicios dentro de un alto nivel de fertilidad., observándose sin embargo una ligera ventaja del dilutor Triladyl-yema sobre Tris-yema y una ventaja mayor sobre el dilutor Leche-yema respectivamente.

Dentro de las condiciones en que se realizó el estudio el efecto de los dilutores sobre la fertilidad no hubo diferencias estadísticas significativas entre estos pudiéndose recomendar la utilización de cualquiera de ellos.

El estudio de correlación entre cifras de pérdida de porcentaje de motilidad, al finalizar el proceso de congelación y el porcentaje de fertilidad, no se encontraron valores de significación. Lo que demuestra que la pérdida de porcentajes de motilidad en el semen congelado no está asociada positivamente a la fertilidad.

La fertilidad no es influenciada por el dilutor que se utilice, bien sea Tris-yema, Leche-yema o Triladyl-yema respectivamente.

VI. RECOMENDACIONES

Con el propósito de lograr una mayor eficiencia de los procedimientos congelatorios y por lo tanto alcanzar las mas elevadas tasas de fertilidad del semen de bovino, nos permitimos en base a los resultados obtenidos en el presente estudio, recomendar:

- Profundizar en el estudio del Tris, Triladyl comparándolos principalmente con dilutores a base de Leche como Laiciphos, Biociphos y otros de amplia difusión a nivel mundial, para evaluar la eficiencia de los mismos en relación a su efecto sobre la congelación del semen y su fertilidad en campo.
- Analizar el efecto en la resistencia y viabilidad espermática de factores como: glicerización, duración y forma del equilibrio, tecnica de congelación aplicable a los más modernos métodos de almacenaje (pajillas), y evaluar posibles interrelaciones con otros factores como individuo, motilidad inicial, índice de fertilidad, etc., para nuestro medio.
- Siendo buena la fertilidad obtenida con el semen congelado Nacional (toros jóvenes) dentro del más alto nivel de primeros servicios, el Ministerio de Agricultura deberá estimular el uso de semen nacional en el país, utilizando tecnología de punta, a través del Banco Nacional de Semen de la Universidad Nacional Agraria La Molina, para asegurar un normal abastecimiento de semen de alto valor genético y de buena fertilidad.

VII. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

AGRO NOTICIAS. 1997. Revista para el desarrollo del agro. "Aportes del Banco de Semen", Edición N° 210, Junio. Lima Perú

Anduaga, M.J. 1980. Estudio comparativo de la Congelación de Semen de bovino, con el dilutor Yema-Citrato vs. El dilutor Tris. Tesis: Ing.Zoot. UNALM-Lima Perú.

Altamirano A.; Carmen E. 1977. Eficiencia Reproductiva de las vaquillas del Establo de la Universidad Agraria La Molina, durante el periodo 1966-1975. Tesis UNALM-Lima. 104 pp.

Alvarado E., Cabrera P.; Mellisho E. 1997. Manual de Inseminación artificial en Vacunos. Programa de Mejoramiento Animal. Facultad de zootecnia. UNALM. Lima Perú.

Asdell, S.A. 1968. Cattle fertility and sterility. II Edición I. EA, Churchill Ltd. Londres 276 p.

Asociación Israelí de Criadores de Ganado. 1986. Milk and Butterfat Recording Annual. Report on Productivity and Reproduction. Israel Catle Breeder's Association. Israel Holstein Herd Book. 18 pp.

Bath D.L., Dickinson F.N; Tucker H.A; Appleman R.D. 1986. Ganado lechero: Principios prácticos, problemas y beneficios, I Edición. Editorial Interamericana S.A. México.

Bartlett, R.P.; y Vandemarx N.L. 1961. Effect of tris (hidroximetil amino methano) on spermatozoan livability. J. Animal Sci., 20: 965.

Baucells, R.J. 1995. Análisis de índices reproductivos en producción lechera. Revista Frisona Española Jul/Ago, 1995. Pág. 76-79.

Bean, B.H.; Pickett; B.W.; Marting, R.C. 1963. Influence of freezing Methods. Extender and storage temperaturas on motility and PH frozen bovine semen. J.Dairy Sci. 46:145.

Becerril, P. 1982. Reproducción Ovina. Curso de Post Grado; la detección de estros en bovinos. De la Universidad Autónoma de Chapingo México (UACH) Centro Experimental de Chuquibambilla Universidad Nacional Técnica del Altiplano. Puno - Perú

Bomsteim, R.A.; Steberl, E.A. 1959. Preservation of washed spermatozozos in synthetic medium at room temperature. Exptl. Cell Research, 18:217.

Bratton, R.L.; Flod, J.; Foote, R.L.H.; Earden, S. 1957. Fertility of bovine spermatozozos stored at - 79°C for one week, and for soventeen weeks.

Castro, H.R.; Bernal, R.S. 1996. Evaluación Reproductiva de un hato de vacas Holstein importadas en Lambayeque. Reunión Científica de Asociación Peruana de Producción Animal 4 al 9 de Nov. 1996 Cusco-Perú.

Cole, H.H.; Cupps, P.T. 1977. Reproduction in domestic animals, III Edición Academia Press, WEW YORK 665P.

Cole, H.H.; Ronning, M. 1974. Animal agriculture. I Edición. W.H. Freeman and Co. San Francisco. 788 p.

Cunliffe Seoane, D. 1990. Análisis de la producción y distribución del semen Nacional. Su uso e impacto entre 1982-1986. Tesis Ing. Zoot.UNALM Lima- Perú.

Chimpen, 1980. Estudio comparativo de la fertilidad del semen congelado nacional e

importado en doce establos de la cuenca de lechera de Lima. Tesis Ing. Zoot. UNALM Lima-Perú.

Chupin, D.; Thibier, M. 1993. Survey of the present status of the use of artificial insemination in developed countries. World Animal Review. Junio 1993. Pp. 58-68.

Davis, R.F. 1963. La Vaca Lechera. Su cuidado y explotación 1ra. edición. Limusa Wiley México. 334 p.

De Alba, A.J. 1964. Reproducción y genética animal. 1ra. ed. IICA de la O.E.A. Turrialba. Costa Rica 446 p.

Desjardins, C.; Hafs, H.D. 1962. Motility and Fertility during post- thawing storage of bovine spermatozoos frozen concentrated, thawed and re - extended. J. Dairy Sci. 45: 1242 - 1247.

Domecq, J.J.; Nebel, R.L.; Macgilliard.; Pasquino, A.T. 1991. Expert System for Evaluation of Reproductive and Management. J. Dairy Sci. 74:3446.

Duarte, C.; Rodríguez, C. 1964. Estudio comparativo entre los dilutores Leche Homogeneizada y citrato - yema sobre la congelación y fertilidad del semen del toro. Tesis Ing. Zootec. U.N.A. La Molina, Lima – Perú.

Dugarin, N. 1966. A synthetic medium for diluting bull semen. Mezhdunar. Sel. -Khoz. Zh., 10, (1) 86-87. A.B.A. , 34 N° 2979.

Eapen, K.J. 1962. Effect of Egg-Yolk Levels and Rate of Freezing on Survival of Bovine Spermatozoa After Storage at - 79°C. an. Breed abst. 30: 497.

FAO. 1978. Artificial Insemination and Breeding Development Programme. Mision to Perú dr.w.ferguson dr. m. perez, mr haki- hokkoma.

Flores, M, A.; Pallete, A.; Vivanco, W.; Chavez, C.J.; Vaccaro, R.; Almeyda, J.; Calderón, J.; Cárdenas, H. 1982. Banco Nacional de Semen. Notas Ganaderas. Año 7 Nx 36. Junio. PMA-UNALM.

Foot, R.H. 1970. Influence of extender. Extension rate and glycerolating technique on fertility of frozen bull semen. J.Dairy Sci. 53: 1478-1482.

Gloria. 1986. Boletín Técnico de GLORIA S.A. "El Poronguito". Abril.

Graves, W. M.; Dowlen, H.H.; Kless, G.A.; Riley, T.L. 1991. Evaluation of Uterine Body and Bilateral Uterine Horn Insemination Techniques. J. Dairy Sci. 74:3454.

Hann, R. 1968. On the dilution rate of bull semen defrosted in liquid nitrogen. Abstract in animal Breeding 35: 79.

Harwood, E.D.; Jenson, E.L.; Wieckert, D.A.; Clayton, M.K. 1991. Milk Yield Variation Concurrent with conception. J. Dairy Sci. 74. 2172.

Hafs, H.; Boyd, L.J. 1973. Dairy cattle fertility and sterility. Hoard's Dairyman. Fort Atkinson; Wisconsin U.S.A.

Hafez, E.S.E. 1989. Reproducción e Inseminación Artificial. V Edic. Editorial Interamericana. México.

Hafez, E.S.E. 1993. Reproduction in farm animals. VI Edición Editorial. LEA y FEBIGER. Filadelfia. U.S.A.

Herrick, J.B. 1975. Fertility and nutrition in Dairy cattle A.I. Digest. Vol.24: N° 11.

Hutjens, M. 1975. Nutrition and reproductive efficiency in dairy cattle. A.I. Digest. Vol. 23 N° 6.

Jarret, A. 1975. Make your best cowman responsible for heat detection. Hoard's Dairyman April 25 pag. 535.

Jillella, D. 1982. Reproducción Bovino. Curso Post Grado. Manual UNTA-PUNO PERU.

Johanson, J.; RENDEL, J. 1974. Genética y mejora animal. I Edic. Organismos. La Habana-Cuba. 567 p.

Kindliman, A.R. 1977. Diagnóstico de la eficiencia reproductiva del Ganado Vacuno lechero de la Universidad Nacional Agraria. La Molina, durante el periodo 1966-1975. Tesis UNALM-Lima. 97 pp.

Konermann, H. 1974. Problemas de fertilidad en la cría de Ganado Vacuno, causas y posibilidades de lucha. Noticias Médico-Veterinarias Bayer N° 1.

Lake, P.E. 1983. Factors affecting the fertility level, with special reference to artificial insemination. World's Poultry science Journal Vol. 39. Junio N° 2.

Martinez, A. 1995. La monta en el calor es una manifestación de vacas sanas y acompañadas. Hoard's Dairyman en Español. Febrero. Pág. 158.

Mellisho, E. 1997. Parámetros reproductivos en vacas lecheras de tres establos de la Cuenca de Lima. Tesis UNALM-Lima. Pp. 138.

MC Dowell, R.E. 1975. Bases biológicas de la producción animal en zonas tropicales. I Edición. Acribia-Zaragoza-España. 692 p.

Mongomery, D.C. 1996. Diseño y análisis de experimentos. III Edición en español. Editorial. Iberoamericana. S.A. México.

Nahas, G.G. 1961. In vitro and In vivo effects of animal buffers. Ann. N.Y. Acad. Sci.; 93: (2) 333.

Orillo, H.G. 1996. Frecuencia de Detección de celo y su influencia en la fertilidad de un hato lechero durante el verano e invierno en la Costa Central. Tesis UNALM-Lima.

Pachaeco, O. 1964. Estudio comparativo del efecto de los dilutores Citrato de Sodio-Yema de huevo y Leche Homogeneizada, sobre la congelación de semen de bovino en nitrógeno líquido. Tesis Ing.Agrónomo UNALM. Lima Perú.

Parreño, R.J. 1991. Evaluación del manejo reproductivo del Establo Lechero “La Esperanza”, Santa Rita de Siguan, Arequipa. Durante el periodo 1979- julio de 1982. Tesis UNALM. 221 pp.

Paufler, S.; Zapfe, R. 1970. Fertilizing ability of bull semen followings rage after dilution with the Gottingen Fresh Semen Diluent. *Zuchthygiene*, 5, 73-78 A.B.A. 38, N° 3657.

Perez y Perez, F. 1985. Inseminación Artificial y Transplante de Embriones. Editorial. Científico Barcelona.

Pickett, B.W.; Beerndtson, W.E. 1978. Principles and techniques of freezing spermatozoa. In: G.W. Salisbury, N.L. Van Demark, and J.R. Lodge (Ed.) *Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle*. Pp 494- 554. W.H. Freeman and Co., San Francisco, CA.

Pickett, W.A.;Cowan, A.K.; Fowler, Gosslee, D.G.A. 1960. Comparison of Motility and Fertility of bull Semen extended in Egg Yolk-Citrate-Glyverol and Skim Milk-Egg Yolk-Ghyerol. *A.I. Digest VIII* : 6

Pinillos, R. 1965. Estudio de la eficiencia reproductiva de las vacas en el valle de Lima. Tesis Bach. Universidad Mayor de San Marcos, Lima – Perú.

Salas Infantas, D. 1983. Eficiencia reproductiva del Establo de la Universidad Agraria. Durante el periodo 1976-1981. Tesis UNALM-Lima. 153 pp.

Salisbury, G.W.; DEMARK, N.L.; Lodge, J.R. 1982. Fisiología de la Reproducción e Inseminación Artificial de los bovinos. III Edición. Acribia Zaragoza- España 832 p.

Salamon, S.; Evans, G.; Maxwell, W.M.C; 1990. Inseminación Artificial de ovejas y cabras. Edit. Acribia S.A. Zaragoza-España.

Schmidt, G.H.; VAN VLECK, L.D. 1974. Principles of dairy science. I Edic. W.F. Freeman and Co. San Francisco 558p.

Shaffer, H.E. 1975. Accurate detection of heat and proper timing of service. A.I. Digest vol. 23: N° 10.

Simert, N.A.; Wilcox, C.J.; Thatcher, W.W.; Martin, F.G. 1991. Prepartum and Peripartum Reproductive Performance of Dairy Heifers Freshing at Young Ages . J. Dairy Sci. 74: 1724.

Spalding, R.W.; Everett, R.W.; Foote, R.H. 1975. Fertility in new york artificial inseminated. Holstein in Dairy herd improvement. J. Dairy science Volumen. 38: pag. 718-723.

Steinbach, J.; FOOTE, R.H. 1964. Post thaw survival of bovine spermatozoa frozen by different methods in buffered yolk and skim milk extenders J. Dairy Sci. 47: 909-915.

Stevenson, J. 1995 h. Reduzca las pérdidas reproductivas en su hato. Hoard's Dairyman en Español, Marzo de 1995. Pág. 222

Stevenson, J. 1995 g. ¿Hay un momento óptimo para detectar estros?. Hoard's Dairyman en Español, Abril de 1995. Pág.378.

Stevenson, J. 1995 f. Empiece con la matriz sana usando prostaglandinas. Hoard's Dairyman en Español, Setiembre de 1995. Pág. 877.

Varner, H.A.; Majeskie, J.L. 1988. Interpreting Indexes of Reproductive efficiency. National Cooperative Dairy Herd Improvement Program. DHIA-USA. 8 pp.

Vishwanath, C.J.P.; Shannon, P. 1996. Sperm numbers, semen age and fertility in fresh and frozen bovine semen. The proceedings of the New Zeland Society of Animal Production Vol:56 Conferencia Universidad Waikato.

Vivanco, W. 1976. Algunas apreciaciones sobre el uso de semen congelado en sus diversas formas de presentación. U.N.A. La Molina, Lima-Peru.

Vivanco, W. 1978. Curso de Inseminacion Artificial U.N.A. La Molina. Lima-Peru.

Walton, 1984. ABS. Manual de Inseminación Artificial. Segunda Edición.

West, J. 1995. Calificación corporal permite dar seguimiento a la nutrición y salud del hato. Hoard's Dairyman en Español, setiembre de 1995. Pág 860.

VIII. ANEXOS

VIII. ANEXOS

Anexo I. Porcentajes de motilidad en las tres fases del proceso de congelación

Número de Colecciones	Fase Glicerinado	Fase Glicerinado	Fase Glicerinado	Fase Equilibrio	Fase Equilibrio	Fase Equilibrio	Fase Congelación	Fase Congelación	Fase Congelación
	Tris-yema	Leche-yema	Triladyl-yema	Tris-yema	Leche-yema	Triladyl-yema	Tris-yema	Leche-yema	Triladyl-yema
1	70	70	70	65	70	70	60	65	60
2	70	70	70	70	65	70	65	60	60
3	72.5	75	77.5	70	70	75	60	65	70
4	70	72.5	75	70	72.5	75	65	70	70
5	77.5	77.5	75	75	75	75	65	70	70
6	77.5	77.5	75	75	75	75	65	70	70
7	70	75	70	70	70	65	65	60	60
8	70	70	70	70	65	70	60	60	60
9	70	70	75	70	70	75	65	65	70
10	70	77.5	75	70	75	75	65	70	70
11	77.5	77.5	77.5	75	75	77.5	65	70	70
12	77.5	77.5	75	75	75	75	70	70	70

Datos originales sin corregir

Anexo II. Efecto de los dilutores sobre la motilidad en post-congelación

Observaciones	Factor “ A “	Factor “ B “	Repetición	Respuesta
1	1	1	1	50.77
2	1	1	2	53.73
3	1	1	3	50.77
4	1	1	4	53.73
5	1	1	5	53.73
6	1	1	6	53.73
7	2	1	1	53.73
8	2	1	2	50.77
9	2	1	3	53.73
10	2	1	4	56.79
11	2	1	5	56.79
12	2	1	6	56.79
13	3	1	1	50.77
14	3	1	2	50.77
15	3	1	3	56.79
16	3	1	4	56.79
17	3	1	5	56.79
18	3	1	6	56.79
19	1	2	1	53.73
20	1	2	2	50.77
21	1	2	3	53.73
22	1	2	4	53.73
23	1	2	5	53.73
24	1	2	6	56.79
25	2	2	1	50.77
26	2	2	2	50.77
27	2	2	3	53.73
28	2	2	4	56.79
29	2	2	5	56.79
30	2	2	6	56.79
31	3	2	1	50.77
32	3	2	2	50.77
33	3	2	3	56.79
34	3	2	4	56.79
35	3	2	5	56.79
36	3	2	6	56.79

Clases, Niveles, Valores, Toros= 2, Repeticiones=6, Fases=3; Dilutores 3 1=Tris, 2=Leche, 3=Triladyl N° Observaciones=36

Anexo III. Resultados del diagnóstico de preñez a los 60 días post-servicio según dilutor

Huandoy-tris	Huandoy-leche	Huandoy-triladyl	Samoa-tris	Samoa-leche	Samoa-triladyl
+	+	+	+	+	-
+	-	+	-	-	-
-	+	+	+	-	-
+	+	+	+	+	+
+	+	-	-	-	+
+	+	+	+	+	+
+	+	+	-	+	+
+	-	+	+	-	+
-	+	+	+	-	+
-	+	+	-	-	+
+	+	+	+	+	+
+	+	-	+	-	+
-	-	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+
+	-	+	+	-	+
+	+	+	+	+	+
-	+	-	+	+	+
+	+	+	-	+	-
+	+	+	+	-	-
+	+	+	+	-	+
+	-	+	+	+	+
-	-	-	+	+	+
Total: 22 +=16 - =06	Total: 22 +=17 - =05	Total: 21 +=18 - =03	Total: 25 +=18 - =07	Total: 22 +=12 - =10	Total: 24 +=19 - =05

Total: 136 servicios + :100 - :36

Anexo IV. Fertilidad en vaquillonas y vacas según número de partos

Número de partos	Total servicios Efectuados	Número de Preñez	Porcentaje de fertilidad
Vaquillonas (cero partos)	15	13	86.67 a
De primer parto	23	17	73.91 a
De segundo parto	40	32	80 a
De tercer parto	26	20	76.92 a
De cuatro a más partos	32	18	56.25 b

(a,b) : Diferentes letras muestran que existe diferencia significativa estadísticamente ($p < 0.05$)

Anexo V. Guía para la clasificación de la eficiencia reproductiva en un estable

Rubro	Buena	Regular	Malo
Número de servicios por preñez	1.5	1.8	2.0
Intervalo entre partos (días)	350 – 380	381 – 410	411 o más
Fertilidad de los primeros servicios	55% o más	54 – 44%	< de 44%
Fertilidad de los segundos servicios	75% o más	74 – 65%	< de 64%
Intervalo entre partos y concepción (días)	50 – 99	100 – 130	+ de 130
Abortos	de menos 3%	3.1 – 6%	6.1 – 11%

Publicado por DE ALVA (1964)

Principales índices reproductivos clasificados de acuerdo al valor de cada uno de ellos

Anexo VI. Análisis Económico según dilutor utilizado en el proceso de congelación

ANALISIS ECONOMICO	TRIS - YEMA	LECHE - YEMA	TRILADYL - YEMA
Costo Variable (CV)	45 371.44	44 710.16	45 975.16
Costo Fijo (CF)	2 325.54	2 292.48	2 355.73
Costo Total (CT=CV + CF)	48 836.42	48 142.08	49 470.33
Rendimiento Total (RT)	14 927.00	14 927.00	14 927.00
Costo por Unidad (por pajilla)	2.36	2.25	2.45
Precio por pajilla	5.00	5.00	5.00
Ingreso Total (IT)	74 635.00	74 635.00	74 635.00
Ingreso Neto (IN = IT - CT)	25 798.58	26 492.92	25 164.67
Margen Bruto (MB = IT - CV)	29 263.56	29 924.84	28 659.84
Rentabilidad Bruta (RB = IN/CV)	0.57	0.59	0.55
Rentabilidad Neta (RN = IN/CT)	0.53	0.55	0.51

Anexo VII. Pérdidas económicas según dilutor en función al porcentaje de fertilidad

DILUTORES	% de Fertilidad	Intervalo entre partos (meses)	Pérdida / vaca / día (soles)	Pérdida/número de servicios no efectivos	Total de Pérdidas por 21 días
Triladyl-yema	82.2	12 - 13	10	80	1 680
Tris-yema	72.3	12 - 13	10	130	2 730
Leche-yema	65.9	12 - 13	10	150	3 150

Anexo VIII. Análisis Económico sobre la fertilidad del semen congelado según dilutor

Análisis Económico	Triladyl-yema	Tris-yema	Leche-yema
Costo Total	1 350.00	1 410.00	1 320.00
Rendimiento	37.00	34.00	29.00
Valor unitario por preñez	210.00	210.00	210.00
Valor Bruto de la producción	7 770.00	7 140.00	6 090.00
Utilidad	6 420.00	5 730.00	4 770.00
Rentabilidad Neta	4.8 %	4.0 %	3.6 %
% de Ganancia:	+ 34.6 %	+ 20 %	-
	+12 %	-	