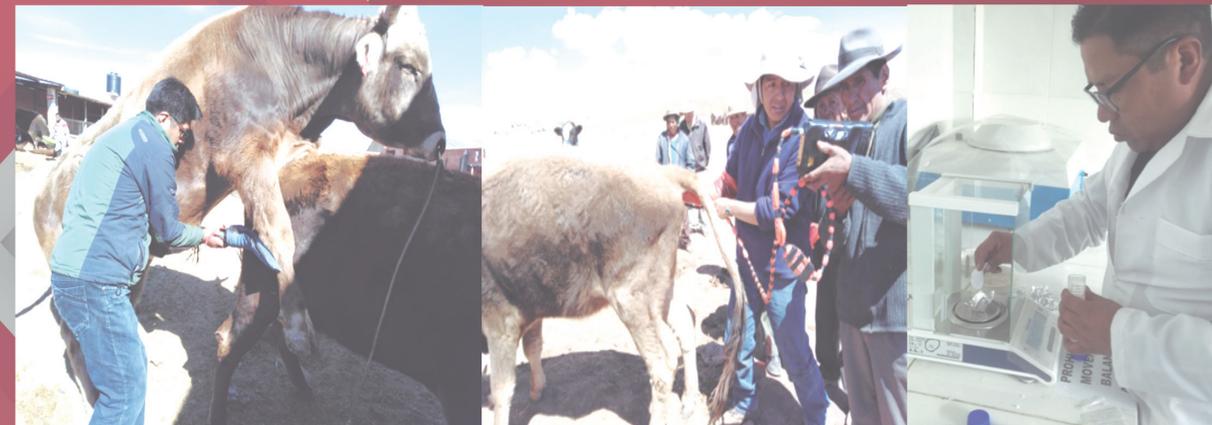


UNIVERSIDAD PÚBLICA DE EL ALTO
VICERRECTORADO
DIRECCIÓN DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIA ANIMAL
CARRERA DE INGENIERÍA EN ZOOTECNIA E INDUSTRIA PECUARIA



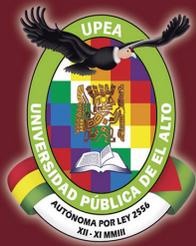
INVESTIGACIÓN DE DILUTORES ALTERNATIVOS EN **INSEMINACIÓN ARTIFICIAL** **CON SEMEN BOVINO** EN SULLKATACA (LAJA)

PROYECTO FINANCIADO CON RECURSOS
DEL IMPUESTO DIRECTO A LOS HIDROCARBUROS
(IDH)



Dirección UPEA: Av. Sucre s/n Zona Villa Esperanza
Teléfono: 2-2840040
Web. <https://upea.bo/>

EL ALTO - BOLIVIA
2021



UNIVERSIDAD PÚBLICA DE EL ALTO
VICERRECTORADO
DIRECCIÓN DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIA ANIMAL
CARRERA DE INGENIERÍA EN ZOOTECNIA E INDUSTRIA PECUARIA

INVESTIGACIÓN DE DILUTORES ALTERNATIVOS EN
**INSEMINACIÓN
ARTIFICIAL**
CON SEMEN BOVINO
EN SULLKATACA (LAJA)

PROYECTO FINANCIADO CON RECURSOS
DEL IMPUESTO DIRECTO A LOS HIDROCARBUROS
(IDH)

EL ALTO - BOLIVIA
2021

UNIVERSIDAD PÚBLICA DE EL ALTO

AUTORIDADES

Dr. Carlos Condori Titirico

RECTOR

Dr. Efraín Chambi Vargas Ph. D.

VICERRECTOR

Dr. Antonio López Andrade Ph. D.

DIRECTOR DE INVESTIGACIÓN CIENCIA Y TECNOLOGÍA

Ing. Laoreano Coronel Quispe

DECANO DE ÁREA

CIENCIAS AGRICOLAS, PECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

M. Sc. Marcelo Paxi Sillo

DIRECTOR CARRERA

INGENIERÍA EN ZOOTECNIA E INDUSTRIA PECUARIA

MVZ. Nelson Centellas Ticona

STRIO. EJECUTIVO DE DOCENTES

INGENIERÍA EN ZOOTECNIA E INDUSTRIA PECUARIA

Ing. Edwin Carita Tarqui

COORDINADOR

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIA ANIMAL

Ing. Richard Max Machicado Gómez

Ing. Guillermo Mara Marca

Ing. Cesar Humberto Quispe Paxipati

EQUIPO DE INVESTIGACIÓN

Ing. Ruben Vera Tola

Ph.D. Ing. Flavio Merlo Maydana

Lic. MVZ. Willy Antonio Villavicencio Yana

COMITÉ DE REVISIÓN TÉCNICA ESPECIALIZADA

Ing. Leddy Teresa Gutiérrez Hualpa

Lic. Lillet Jovana Huanca Ortuño

COMITÉ DE REVISIÓN ESTILO Y FORMA

CONVENIO INTERINSTITUCIONAL

UNIVERSIDAD PÚBLICA DE EL ALTO – SINDICATO AGRARIO DE LA COMUNIDAD SULLKATACA
BAJA - GOB. AUTONOMO MUNICIPAL DE "LAJA"

DERECHOS RESERVADOS: Universidad Pública de El Alto

DEPOSITO LEGAL: 4-1-397-2021 P.O.

**EDITORIAL: INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN – INGENIERÍA EN ZOOTECNIA E INDUSTRIA
PECUARIA**

IMPRENTA: "FLORES Design "

Dirección UPEA: Av. Sucre s/n Zona Villa Esperanza

Teléfono: 2840040

Web: <https://upea.bo/>

Diciembre, 2021

El Alto – Bolivia

*P*RESENTACIÓN

La producción de bovinos en el altiplano boliviano es una actividad que involucra a un gran número de familias, donde la crianza de esta especie es completamente tradicional, en todas las etapas productivas; situación que amerita mejorar las condiciones técnicas y tecnológicas de su crianza.

La elaboración del presente trabajo de investigación nace ante la ausencia de tecnologías orientadas a la reproducción de los bovinos, donde el manejo reproductivo se lleva a cabo de manera rutinaria y tradicional. Asimismo, el empleo técnico no está de la mano del ganadero. El proceso de capacitación y asistencia técnica para mejorar esta especie está completamente ausente, es decir, no existe apoyo técnico de parte del gobierno central, ni departamental y mucho menos de los gobiernos municipales.

Investigaciones orientadas a la reproducción de bovinos en nuestro medio son escasas. Por tanto, el presente trabajo de investigación apoya, con algunos criterios técnicos referentes a la reproducción mediante inseminación artificial a celo o estros sincronizado, el cual es un método reproductivo utilizado de manera intensiva en otros países, pero en nuestro medio no se lo aplica, por lo que se pretende fomentar la crianza de bovinos y ayudar a mejorar los hatos de las familias dedicadas a esta actividad y/o rubro.

La Carrera de Ingeniería en Zootecnia e Industria Pecuaria de la Universidad Pública de El Alto, siempre coadyuva y genera técnicas, tecnologías e innovaciones para apoyar el desarrollo productivo de las diferentes especies domésticas, principalmente, propias de nuestro altiplano.

Ing. Edwin Carita Tarqui
COORDINADOR
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN
EN CIENCIA ANIMAL

Agradecimientos

INSTITUCIONALES

A la Universidad Pública de El Alto (UPEA), por el apoyo económico mediante el financiamiento del Impuesto Directo a los Hidrocarburos (IDH) para la ejecución del presente proyecto de investigación.

A la Dirección de Investigación Ciencia y Tecnología (DICyT) de la Universidad Pública de El Alto, por todo el seguimiento administrativo y financiero en el desarrollo del presente proyecto de investigación.

A la Carrera de Ingeniería en Zootecnia e Industria Pecuaria de la (UPEA) por coadyuvar en la culminación y cierre del proyecto de investigación.

Al Gobierno Autónomo Municipal de Laja del Departamento de La Paz, por el apoyo en la realización del proyecto de investigación.

A la comunidad Sullkataca Baja y comunidades aledañas (Kala Puncu, San Felipe de Sata Totorá, Sacacani, Collpajawa y Guallaqueri) por permitinos ingresar y realizar la presente investigación.

M. Sc © Ing. Richard Max Machicado Gómez
INVESTIGADOR PRINCIPAL
INSTITUTO DE INVESTIGACION EN CIENCIA ANIMAL
INGENIERÍA EN ZOOTECNIA E INDUSTRIA PECUARIA

1 GENERALIDADES DEL PROYECTO	
Introducción	1
1.2 Identificación del problema	1
1.3 Objetivos de la investigación	2
1.3.1 Objetivo general	2
1.3.2 Objetivos específicos	2
1.4 Hipótesis de la investigación	2
1.5 Justificación	2
2 MARCO TEÓRICO	4
2.1 La Ganadería en Bolivia	4
2.2 Introducción del ganado en el altiplano	4
2.3 Características del ganado bovino lechero	5
2.4 La raza Frisona u Holandesa	6
2.5 Vacunos Brown Swiss y sus características	7
2.6 La raza Criolla	8
2.7 Sistemas de producción de vacunos de leche	8
2.8 Control endocrino de la espermatogénesis	9
2.9 Espermatocitogenesis	10
2.10 Mecanismos de protección seminal	11
2.11 Volumen de eyaculado	12
2.12 Color del eyaculado	12
2.13 Aspecto	12
2.14 Olor	13
2.15 Examen microscópico	13
2.15.1 Motilidad espermática	13
2.15.2 Movilidad masal	13
2.15.3 Movilidad individual	14
2.15.4 Concentración espermática	14
2.15.5 Morfología de los espermatozoides	14
2.16 Crioconservación de espermatozoides	14
2.17 Ciclo estral de la vaca	15
2.17.1 Endocrinología del desarrollo folicular	16
2.18 Inseminación artificial en bovinos	16
2.19 Sincronización de estro	16
2.19.1 El uso de PGF2 α .	17
2.19.2 Sincronización de la onda folicular + PGF2 α (Ov-Synch)	17
2.19.3 El uso de progesterona y progestágeno para controlar el estro	17
3 MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.1 Ubicación geográfica	18
3.1.1 Características geográficas de la zona	18
3.1.2 Suelos	19
3.1.3 Cuencas Hidrográficas	19

3.1.4	Temperatura Máxima y Mínima	19
3.1.5	Precipitación pluvial y vegetación	19
3.2	MATERIALES	20
3.2.1	Material biológico	20
3.2.2	Material de campo	20
3.2.3	Insumos, materiales veterinarios y de laboratorio	21
3.2.4	Material de gabinete	21
3.3	MÉTODOS	22
3.3.1	Preparación de los dilutores para congelación de semen	22
3.3.1.1	Pesado y medición de insumos	22
3.3.1.2	Preparación de dilutores	22
3.3.2	Colección de semen mediante la técnica de vagina artificial	22
3.3.2.1	Armado de la vagina artificial	22
3.3.2.2	Traslado de los animales al área de colección de semen	23
3.3.2.3	Colección de semen	23
3.3.3	Evaluación macroscópica del semen	23
3.3.3.1	Color	23
3.3.3.2	Volumen	23
3.3.3.3	pH	23
3.3.4	Evaluación microscópica del semen	24
3.3.4.1	Motilidad espermática	24
3.3.4.2	Vitalidad espermática	24
3.3.5	Incorporación del dilutor	24
3.3.6	Congelación de semen	25
3.3.6.1	Descenso de la temperatura	25
3.3.6.2	Fase de equilibrio	25
3.3.6.3	Identificación de las pajillas	25
3.3.6.4	Empajillado de semen	25
3.3.6.5	Sellado de la pajueta	25
3.3.6.6	Crioconservación	25
3.3.6.7	Almacenamiento en tanque de nitrógeno	26
3.3.7	Selección de hembras para la sincronización de celo	26
3.3.7.1	Identificación de las vacas	26
3.3.7.2	Sincronización de celo	26
3.3.7.3	Inseminación artificial	27
3.3.7.4	Diagnóstico de gestación	27
3.4	Factor de estudio	27
3.5	Variables de respuestas	27
3.6	Diseño de investigación y/o análisis estadísticos	28
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
5	CONCLUSIONES	34
6	RECOMENDACIONES	34
7	BIBLIOGRAFÍA	35

CUADRO 1.

ANVA para motilidad espermática post descongelado a efecto de dilutores agua de coco, leche descremada y combinado_____ 29

CUADRO 2.

Determinación de la vitalidad espermática post descongelado a efecto de dilutores agua de coco, leche descremada y combinado_____ 30

CUADRO 3.

Determinación de la malformación espermática post descongelado a efecto de dilutores agua de coco, leche descremada y combinado_____ 32

CUADRO 4.

Porcentaje de celo y preñez en vacas sincronizadas con dos protocolos e inseminadas con pajuelas congeladas en dilutores alternativos._____ 32



Figura 1. Proceso de espermatogénesis _____	11
Figura 2. Esquema de un espermatozoide maduro _____	12
Figura 3. Mapa Municipio de Laja – Comunidad Sullkataca Baja _____	18
Figura 4. Comparación de medias Tukey para motilidad espermática (%) post descongelado a efecto de dilutores agua de coco, leche descremada y combinado _____	29
Figura 5. Comparación de medias Tukey para vitalidad espermática (%) post descongelado a efecto de dilutores agua de coco, leche descremada y combinado _____	31



Anexo 1.

Colección de semen de toro por vagina artificial, para su evaluación y congelación con dilutores alternativos. 49

Anexo 2.

Semen colectado de toro, para su evaluación y congelación con dilutores alternativos. 50

Anexo 3.

Preparación de dilutor a base de agua de coco para la congelación de semen. 50

Anexo 4.

Preparación de dilutor a base de leche descremada para la congelación de semen. 50

Anexo 5.

Evaluación de semen diluido previa congelación con dilutores alternativos. 51

Anexo 6.

Rotulado de pajillas para la congelación de semen con dilutores alternativos. 51

Anexo 7.

Empajillado de semen para la congelación con dilutores alternativos. 52

Anexo 8.

Sellado de pajuelas con plastilina inerte, para la congelación de semen con dilutores alternativos. 52

Anexo 9.

Congelación de semen en cámara criogénica de vaporización controlada 53

Anexo 10.

Evaluación de motilidad espermática post congelado de semen con dilutores alternativos 53

Anexo 11.

Evaluación de vitalidad espermática post congelado de semen con dilutores alternativos 54

Anexo 12.

Sincronización de celo a vacas en comunidades del municipio de Laja 54

Anexo 13.

Hormonas utilizadas para sincronización de celo a vacas en comunidades del municipio de Laja 55

Anexo 14.

Retiro de dispositivo intravaginal en el proceso de sincronización de celo a vacas en comunidades del municipio de Laja 56

Anexo 15.

Inseminación artificial a vacas con celo sincronizado. 56

Anexo 16.

Inseminación artificial a vacas con celo sincronizado en comunidades del municipio de Laja 57

Anexo 17.

Capacitación a productores sobre la técnica reproductiva de la Inseminación artificial en comunidades del municipio de Laja. 65

R esumen

El presente trabajo de investigación se desarrolló en la comunidad de Sullkatataca Baja y comunidades aledañas (Kala Puncu, San Felipe de Sata Tatora, Sacacani, Collpajawa y Guallaqueri) del municipio de Laja del departamento de La Paz, con el objetivo de evaluar el efecto de los dilutores alternativos en la criopreservación de semen, para la inseminación artificial en el ganado bovino. El semen fue colectado por la técnica de vagina artificial, de un toro de la raza Pardo Suizo de 2 años de edad, los eyaculados fueron evaluados y diluidos a 37 °C en dilutores a base de agua de coco, leche descremada y la combinación de agua de coco y leche descremada. Las diluciones de semen fueron sometidas a un descenso de temperatura gradualmente hasta 5 °C, a razón de 1 °C /2.9 minutos y luego almacenadas en una conservadora portátil (5 ± 2 °C); transcurrido la fase de equilibrio (2 horas). El semen diluido fue empajillado en pajuelas de 0.5 mL y selladas con plastilina, las pajuelas de semen se distribuyeron sobre una rejilla dentro de la cámara criogénica que contiene 1 kilogramo de nitrógeno líquido, sometiéndose a vapores de nitrógeno durante 15 minutos. Para determinar el efecto de los dilutores se utilizó un Diseño Completo al Azar y para la comparación de medias fue por el método Tukey, utilizando el programa SAS 9.4. La motilidad individual y vitalidad espermática post descongelado fue de 40.55^a, 22.22^b y 21.22^b; 41.70^a, 23.17^b y 22.40^b % para agua de coco, combinación de leche descremada más agua de coco y leche descremada respectivamente, siendo el mejor dilutor agua de coco. Se sincronizaron 28 vacas, 14 con el protocolo Ovsynch y 14 con el protocolo CIDR-synch, 10 (71.43%) manifestaron signos de celo correspondiente al protocolo Ovsynch y 13 (92.86%) manifestaron signos de celo correspondientes al protocolo CIDR-synch. Para concluir la inseminación artificial fue a tiempo fijo y la totalidad de las vacas sincronizadas fueron inseminadas. La preñez fue 4 (28.57%) para el protocolo Ovsynch y 8 (57.14%) para el protocolo CIDR-synch. No se evidenció la asociación del porcentaje de celo y la preñez con los protocolos de sincronización de celo utilizados.

A bstract

This research work was developed in the community of Sullkataca Baja and surrounding communities (Kala Puncu, San Felipe de Sata Totora, Sacacani, Collpajawa) of the municipality of Laja in the department of La Paz, with the objective of evaluating the effect of dilutors alternatives in the cryopreservation of semen, for artificial insemination in cattle. The semen was collected by the artificial vagina technique, from a 2-year-old Brown Swiss bull, the ejaculates were evaluated and diluted at 37 ° C in dilutors based on coconut water, skim milk and the combination of coconut water and skim milk. The semen dilutions were subjected to a gradual decrease in temperature to 5 ° C, at a rate of 1 ° C / 2.9 minutes and then stored in a portable conservator (5 ± 2 ° C); after the equilibrium phase (2 hours). The diluted semen was soaked into 0.5 mL straws and sealed with plasticine, the semen straws were distributed on a grid inside the cryogenic chamber containing 1 kilogram of liquid nitrogen, undergoing nitrogen vapors for 15 minutes. To determine the effect of the dilutors, a Complete Random Design was used and for the comparison of means it was by the Tukey method, using the SAS 9.4 program. The individual motility and post-frozen sperm vitality were 40.55^a, 22.22^b and 21.22^b; 41.70^a, 23.17^b and 22.40^b % for coconut water, combination of skim milk plus coconut water and skim milk respectively, being the best dilutor coconut water. 28 cows were synchronized, 14 with the Ovsynch protocol and 14 with the CIDR-synch protocol, 10 (71.43%) showed signs of heat corresponding to the Ovsynch protocol and 13 (92.86%) showed signs of heat corresponding to the CIDR-synch protocol. Artificial insemination was at a fixed time and all of the synchronized cows were inseminated. Pregnancy was 4 (28.57%) for the Ovsynch protocol and 8 (57.14%) for the CIDR-synch protocol. The association of heat percentage and pregnancy with the heat synchronization protocols used was not evidenced

INVESTIGACIÓN DE DILUTORES ALTERNATIVOS EN INSEMINACIÓN ARTIFICIAL CON SEMEN BOVINO EN SULLKATACA (LAJA)

1 GENERALIDADES DEL PROYECTO

1.1 Introducción

La ganadería bovina en la región del altiplano boliviano, principalmente en la provincia Los Andes del departamento de La Paz es de gran importancia para la producción de leche y carne, ya que esta región es parte del cordón lechero del departamento de La Paz.

El aspecto reproductivo en bovinos fue estudiado ampliamente, pero aún presenta deficiencias en el proceso de inseminación artificial. Este método es considerado de alto costo, debido al uso de dilutores comerciales en su procesamiento y el uso de accesorios como ser pajuelas, nitrógeno líquido y otros que son necesarios para la conservación del semen de los toros.

La inseminación artificial en la reproducción de bovinos es uno de los métodos más desarrollados. Sin embargo, aún no es accesible para el ganadero, debido a que en su procesamiento emplea dilutores comerciales que tienen alto costo, aspecto que encarece el precio de las pajuelas, lo que nos obliga a buscar otras alternativas de dilutores naturales y de fácil accesibilidad.

La búsqueda de dilutores alternativos obtenidos a partir de productos locales, como la leche descremada y el agua de coco, son opciones que deben ser evaluadas en el proceso de la crioconservación del semen de los toros.

1.2 Identificación del problema

Los bajos índices reproductivos del ganado bovino en la comunidad de Sullkataca Baja y comunidades aledañas (Kala Puncu, San Felipe de Sata Totorá, Sacacani, Collpajawa y Guallaqueri) influyen a que los productores de leche y carne tengan un sistema de producción ineficiente y por lo tanto generan escasos recursos económicos.

Los índices reproductivos como la baja fertilidad, los prolongados días abiertos, la mortalidad embrionaria, la mortalidad fetal, la infertilidad del toro, etc., son aspectos que afectan directamente al productor, manifestándose en el menor número de crías por vaca por año y por consiguiente menor producción de leche y carne.

La consanguinidad y la mala alimentación son características del manejo tradicional del sistema productivo del rubro bovino, lo que afecta de manera directa en la baja producción de carne y leche, repercutiendo en la mala calidad de vida de muchas familias en las comunidades del municipio de Laja, provincia Los Andes.

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo general

- Evaluar el efecto de los dilutores alternativos en la crioconservación de semen, para la inseminación artificial en ganado bovino en la comunidad de Sullkataca Baja del Municipio de Laja.

1.3.2 Objetivos específicos

- Determinar las características del semen bovino post descongelado utilizando DILUTORES alternativos a base de LECHE DESCREMADA, AGUA DE COCO y su combinación.
- Determinar el porcentaje de preñez utilizando pajuelas de semen bovino crioconservadas en dilutores alternativos a base de LECHE DESCREMADA, AGUA DE COCO y su combinación.
- Determinar el porcentaje de preñez en vacas utilizando diferentes protocolos de sincronización de celo para la inseminación artificial.

1.4 Hipótesis de la investigación

Hipótesis nula:

La aplicación de DILUTORES ALTERNATIVOS en la crioconservación de semen para utilizarlos en INSEMINACIÓN ARTIFICIAL en ganado bovino con DIFERENTES PROTOCOLOS DE SINCRONIZACIÓN DE CELO en la Comunidad Sullkataca Baja, no influyen sobre la motilidad espermática y no incrementa el porcentaje de preñez.

Hipótesis alterna:

La aplicación de DILUTORES ALTERNATIVOS en la crioconservación de semen para utilizarlos en INSEMINACIÓN ARTIFICIAL en ganado bovino con DIFERENTES PROTOCOLOS DE SINCRONIZACIÓN DE CELO en la Comunidad Sullkataca Baja, influyen sobre la motilidad espermática e incrementa el porcentaje de preñez.

1.5 Justificación

El Instituto de Investigación Ciencia Animal de la Carrera de Ingeniería en Zootecnia e Industria Pecuaria, detectó las necesidades de la población Sullkataca Baja, que consiste mejorar la producción y generar alternativas de desarrollo en el mejoramiento genético

de ganado bovino a través de investigaciones que vayan en beneficio de los productores lecheros. El proyecto y su estructura responden a una estrategia para consolidar los esfuerzos realizados con el acercamiento a la comunidad de Sullkatata Baja del municipio de Laja con la carrera de Ingeniería en Zootecnia e Industria Pecuaria, buscando armonizar la inversión del tipo social, a través del componente de adaptación y generación de tecnología.

La inseminación artificial es sin duda la herramienta más antigua y utilizada para lograr el mejoramiento genético en los bovinos. Sin embargo, durante la década del 70, el descubrimiento de las prostaglandinas y su aplicación para controlar el ciclo estral significaron un gran avance en el control reproductivo de los bovinos. Después de algunas investigaciones, se hicieron evidentes las limitaciones de las prostaglandinas para lograr la eficiente sincronización de los celos, para esto se utilizan diferentes protocolos de sincronización de celo con resultados expresados en porcentajes de fertilidad muy variables y estudiados en condiciones ambientales distintas al del altiplano paceño. A esto se añade la necesidad de evaluar distintos **DILUTORES** comerciales y elaborados los cuales se utilizan para la crioconservación de gametos masculinos que determinando su efectividad, costo de elaboración y aplicabilidad, servirá para ofrecer distintas opciones de trabajo en reproducción animal.

En los últimos años, gracias al conocimiento de la fisiología del ciclo estral, así como la incorporación de la ultrasonografía para comprender la dinámica folicular de los bovinos, se han desarrollado tratamientos de sincronización que permiten inseminar artificialmente a las hembras bovinas sin la detección del celo y que se conocen como protocolos de sincronización para inseminación artificial a tiempo fijo. El mismo se realizará mediante parámetros establecidos en reproducción artificial de ganado bovino a la vez difundir los conocimientos obtenidos, buscando fortalecer las prácticas pecuarias, dando como prioridad a la investigación pura y aplicada en contexto con la realidad del pequeño y mediano productor, que va a la par del mejoramiento genético.

Como efecto de lo expuesto, se plantea desarrollar alternativas prácticas en el área de la reproducción asistida en bovinos. Estas deberán ser desarrolladas en la comunidad Sullkatata Baja y comunidades aledañas (Kala Puncu, San Felipe de Sata Totorá, Sacacani, Collpajawa y Gualaqueri) del Municipio de Laja, las mismas que deberán ser socializadas y analizadas con los Productores, Instituto de Investigación de Ciencia Animal y Docentes de la Carrera, contemplando las Líneas de Investigación de la carrera de Ingeniería en Zootecnia e Industria Pecuaria.

La aplicación de **DILUTORES ALTERNATIVOS** como ser la **LECHE DESCREMADA, AGUA DE COCO Y SU COMBINACIÓN**. Es una alternativa que resulta ser muy atractiva para los productores debido a que presenta ciertas ventajas como ser:

- Se puede conseguir la materia prima muy fácilmente en nuestra región.
- Además puede disminuir los costos en la crioconservación de semen.

- Y por último es una propuesta innovadora y de fácil aplicabilidad, sin necesidad de mucha intervención tecnológica.

Y como consecuencia se llegará a obtener:

- Colección y procesamiento del semen de toros locales con excelentes características.
- Aplicación de dilutores en la CRIOCONSERVACIÓN de semen.
- Protocolos de sincronización de celo adecuado a la zona de intervención.
- Inseminación Artificial a celo sincronizado y natural.
- Tasa de preñez confirmada por ultrasonografía.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 La Ganadería en Bolivia

La historia de la introducción de recursos genéticos exóticos comenzó a principios del siglo XX con la introducción de bovinos Holstein de Argentina a la hacienda Pairumani en Cochabamba (MAGDER/UPG, 2001).

La introducción de la raza Holstein de Argentina, al altiplano se remonta al año 1935, indicando como pioneros a los señores José Morón agricultor de Achocalla, Ulrich Kegel de la Hacienda Irpavi, Simón Bedoya de Achachicala, Andrés Trepp de la hacienda Huancapampa (Rojas 1987).

Destacan por su contribución a la agricultura los bovinos de raza criollo que además de aportar leche y carne, aportan fuerza de tracción en los sistemas de producción alto andino. Se estima que para este propósito se utilizan 419.000 bovinos criollos y de ellos el 22% son hembras, la alimentación se basa en el uso de rastrojos de cereales el cual es complementado con forraje verde (MAGDER/UPG, 2001).

2.2 Introducción del ganado en el altiplano

En el Altiplano la historia se remonta a la introducción de los bovinos a Sud América con la llegada de los españoles en 1542. La actual ganadería de leche en el Altiplano, se debe a que muchos ganaderos introdujeron vacas de Cochabamba y del exterior del País. Todo ese capital genético constituye el actual potencial lechero, que ahora es una actividad productiva privada llevada a cabo por pequeños productores, (CEDLA, 1997).

Las vacas fueron introducidas en el Altiplano por las misiones de evangelización españolas que se dirigían desde los puertos (donde el ganado había llegado en barcos) hacia el oriente boliviano y dejaban en el camino algunos animales perdidos. Estos animales tenían un tripla propósito tracción provisión de leche y de carne, SOBOCE (2009).

De España también llegaron forrajes que se adaptaron y naturalizaron en Sudamérica y en Bolivia. Tal es el caso de la cebada, avena y otras gramíneas y leguminosas. Tanto los animales como sus alimentos lograron adaptarse, con el paso del tiempo a las condiciones extremas del altiplano debido a las bajas temperaturas y a la escasez de la humedad, (SOBOCE, 2009).

La raza criolla sufrido mayor degeneración por la consanguinidad también su organismo ha tenido que adaptarse a nuestro clima y tipo de alimentación que es la que actualmente sobrevive, otra raza es la Holstein que es raza es originaria de Holanda, con temperamento manso requiere de mucho cuidado y especial alimentación (Baldivieso, 1992).

La producción lechera es una de las actividades con mayor potencial de crecimiento en el Altiplano Norte. La cercanía a la Cordillera Real y la calidad de los suelos de la denominada Cuenca Lechera (compuesta por las Provincias Omasuyos, Ingavi, Aroma, Los Andes y Murillo), son recursos que si se los aprovecha adecuadamente podrían incrementar de manera significativa la producción de leche y los ingresos de más de 4.000 familias (Baldivieso, 1992).

En el Altiplano se inició seleccionando vacas criollas y toros raza Holando con el fin de aumentar la producción de leche. El avance genético resulto muy lento por que se requería también la contribución del complemento nutricional, de salud, etc.

2.3 Características del ganado bovino lechero

El ganado vacuno pertenece al tipo vertebrados, clase mamíferos, orden artiodáctilos, familia Bovidae, subfamilia bovina género *Bos* y especie *Bos taurus*. Romangosa (1982).

Los bovinos rumian, tienen sus dientes en forma de media luna y poseen un estuche córneo sostenido por clavijas óseas (cavicorneos), las que difieren en las distintas familias y dentro de la especie; según su inserción, pueden clasificarse en distintas razas. Romangosa (1982).

Inchausti (1980), menciona que los animales pertenecientes a la familia bovidae, presentan cuernos de naturaleza ósea, huecos en su base, y protegidos por una vaina de naturaleza cornea, persistente. Tienen la particularidad de carecer de incisivos en el maxilar superior, como así mismo de caninos en el inferior, y presentan en total 8 incisivos. Los metacarpianos y metatarsianos son dobles, unidos en un solo hueso, y terminan en dos dedos (3° y 4°) protegidos por dos pezuñas corneas: por encima del talón penden dos pezuñas rudimentarias adheridas a la piel.

Todas las formas bovinas presentan un aparato digestivo compuesto de cuatro compartimentos: panza o rumen, bonete o redecilla, librilla o libro, y cuajar; este último es el verdadero estomago. Las vértebras coccígeas, muy numerosas, constituyen la base ósea de la cola, que generalmente termina en penacho. Inchausti (1980).

Todo el fisiologismo está orientado por el hombre a través de siglos de selección hacia la producción láctea. Alargamiento en sus formas, gran contenido de cavidad abdominal, sistema venoso y digestivo potente, escasos cúmulos grasos y enérgico metabolismo. Romangosa (1982).

2.4 La raza Frisona u Holandesa

Es la agrupación de ganado vacuno que mayor grado de especialización en la producción lechera. Se ha extendido, por todo el mundo, ello demuestra la preciosa cualidad de aclimatación que es patrimonio de la raza. Existen cuatro agrupaciones étnicas:

El ganado que cuenta con las características de las tres agrupaciones antedichas Romangosa (1982).

Variedad Frisia son típicamente triangulares, vista de costado, la profundidad de su parte posterior es mucho mayor que la anterior, vista de atrás el cuerpo se estrecha hacia delante, formándose un triángulo que tiene por base las puntas del anca y por vértice la cruz que es afilada, conviene que sean animales voluminosos, tanto en largo- lo cual se aprecia por la separación de las costillas- como en ancho, esto sobre todo en la parte posterior. El pecho que generalmente es estrecho, se compensa con su buena altura y longitud de costillar, características que indican un tórax de amplio tamaño. Inchausti (1980).

La Frisona Holandesa, es un animal de capa berrenda en negro. Es originaria hace al menos dos mil años por cruzamientos, en las provincias más septentrionales de Holanda (la frisia Occidental y la Holanda del Norte), de suelo muy fértil, aunque con muy fríos inviernos, durante los cuales se estabula el ganado, el origen real y más próximo de la raza es muy discutido, aunque es desde luego antiguo. Sin embargo, la raza no fue debidamente promocionada en Holanda, hasta el punto que el libro genealógico de la misma fue organizado en Estados Unidos que en su país de origen. Villena (2002).

La vaca frisona, berrenda en negro, es eumétrica, concavilínea (frontal hundido) y longilíneas, con cornamenta en gancho corto o en corona (3 echado). Las variantes europeas son por lo general de aptitud leche- carne, con producciones comprendidas entre 3500 y 4500 litros de leche y del 3.4 al 3.6% de grasa; las variantes americanas y suecas superan los 5000 litros, existiendo ejemplares que llegan a los 8000 litros y más, con porcentajes grasos del 3.1 al 3.5% de grasa, lo que los cataloga en el puesto de honor entre las razas lecheras del mundo. Romangosa (1982).

El ganado Holstein Frisian tiene su origen en Holanda, el color característico de la raza es blanco manchado de negro, en ocasiones con manchas rojas, aunque siempre debe ser blanco el abdomen, la borla de la cola y parte de las extremidades. Las hembras presentan la forma típica triangular, son dóciles y fáciles de manejar. El peso promedio de las hembras adultas es de 600 Kg y de los machos es de 1200 Kg. Koeslag (1982).

La alzada media en las vacas frisonas de Holanda, era a principios de siglo de 1.36 m. hoy es de poco más de 1.30 m. El frison holandés es muy uniforme en cuanto a capa

y conformación siendo animales muy musculosos. La producción media de las vacas frisonas controladas en Holanda es superior a los 5.000 lt por lactación, siendo corrientes producciones de 10.000 a 12.000 lt, a cusa de una continuada selección que ha hecho también aumentar el contenido de grasa, que ha pasado del 3% de media en 1910 hasta cerca del 4% actual. Villena (2002).

En Holanda, desde tiempos inmemoriales, se inscribían preferentemente los animales que demostraban las tres manchas bien definidas: zona anterior, gran manchado central y la región caudal. Los norteamericanos con el sentir practico que les caracteriza, han anulado esta uniformidad, y hoy vemos ejemplares de altísima producción en que los colores blanco y negro, juegan una autentica gama de colocación e importancia. (Romangosa 1982).

2.5 Vacunos Brown Swiss y sus características

Brown Swiss, es la raza de vacunos más antigua de producción lechera; descende de las especies salvaje *Bos frontosus* y *Bos longi frons*. En ruinas de Suiza, se han encontrado restos que se remontan a 400 años a. C., que son parecidos al esqueleto de la vaca Brown Swiss moderna. Es la segunda raza lechera más pesada después de la Holstein Frisian; Inician su producción y alcanzan su máximo nivel productivo con más edad que las otras razas lecheras. El consumo de pastos en las laderas de las montañas ha desarrollado en estos animales una capacidad excelente para el aprovechamiento de pastizales.

Es la raza lechera que más se ha adaptado a las condiciones adversas de nuestra sierra peruana: como la altitud, cambios bruscos de temperatura, gran variabilidad en el régimen pluvial, bajo presión barométrica, escasa tensión de oxígeno, gran concentración de anhídrido carbónico y otros gases, intensidad de radiación ultravioleta, pastos de baja calidad nutritiva y falta de buenos métodos de manejo y crianza donde uno de los mayores problemas en la adaptación es el mal de altura (Rivera, 2006).

Schmidt (1974), menciona que las condiciones climatológicas de origen de la raza Brown Swiss, tiene una configuración montañosa o con grandes variaciones climáticas y la influencia de la altura, que contribuyeron a la obtención de una raza rústica y fuerte que vive fácilmente y produce en medios adversos, cálidos o fríos gracias a su rusticidad y fortaleza del animal.

Mamani et al. (2007), indican que el vacuno Brown Swiss, es una raza cosmopolita; en los Estados Unidos de América y el Canadá lo han seleccionado hacia la producción de leche y existen dos variedades: Pardo claro o cenizo y el pardo oscuro, aunque se puede observar vacunos Brown Swiss con diferentes tonalidades de color, son animales de piel fina y suave, con un halo claro alrededor del hocico, mucosa oscura, cuya talla varía de 1.35 a 1.45 metros.

Los terneros con un peso al nacer de 40 a 45 kg, las vacas pueden pesar de 500 a 600 kg y los toros de 1000 a 1200 kg de peso vivo, tiene un desarrollo lento; la producción de leche con una buena grasa que varía entre 3.5 a 4.5%, con una producción láctea de 8 kg

de leche por día en promedio, pudiendo alcanzar hasta 18 kg en condición del altiplano puneño durante la época lluviosa. Los animales de esta raza son fuertes y rústicos, por lo que resiste zonas de altura; son indeseables las manchas blancas en la capa; producen 6029 kg de leche por campaña (Rivera, 2006).

2.6 La raza Criolla

Rojas (1987), mencionan que el bovino criollo, está distribuido en el Altiplano (altitudes hasta 4000 m.s.n.m), donde los animales son pequeños, las vacas y los toros pesan 295 y 350 Kg respectivamente.

Rojas (1987), indica que el ganado criollo altiplanico pertenece al tipo eumétrico, por ser de talla mediana, con un predominio de pelajes de colores rojizos (colorados), cafés, negros, blancos y combinaciones que dan lugar a colores intermedios son braquicefaleos (diámetro transversal de la cabeza es mayor al diámetro longitudinal), cuernos medianamente desarrollados por delante hacia arriba. En las hembras, el desarrollo de la ubre es mediano, con pezones bien distribuidos y tiene los aplomos bien conformados.

CEDLA. (1997), se refiere al ganado criollo Yacumeño, como un animal con una cabeza mediana, fuerte, un poco cóncava entre los ojos y con cuerno muy desarrollados, delgados, dirigidos hacia fuera, pero muy ligeramente hacia adelante, antes de dirigirse hacia arriba, de color negro en las punta; orejas bastante pequeñas, ojos medianos y un poco prominentes. Poseen un cuerpo largo y peso mediano el macho puede pesar hasta 500 Kg. Presenta miembros medianos de hueso fino bien aplomados, la inserción de la cola se encuentra normalmente a nivel del sacro.

El ganado criollo presenta una capa de pelo fino y lustroso que va de un color bayo a rojizo la gran mayoría presenta manchas negras difusas alrededor de los ojos y las extremidades delanteras. La piel es pigmentada y gruesa. Es una notable característica la arruga alrededor de los ojos. Los cuernos finos, blancos en su nacimiento lateral para luego ir hacia delante y finalmente hacia arriba. (CEDLA, 1997)

El ganado criollo es un biotipo proveniente de la adaptación del ganado vacuno introducido por los españoles hace más de 400 años, a nuestro medio ambiente. Es valioso por su rusticidad, adaptación al medio ambiente, y de varios usos (Carne, leche, tracción) Actualmente se ha desarrollado con cruces de muchas razas como Brown Swiss, Holstein y cebú principalmente. MINAG (2001).

2.7 Sistemas de producción de vacunos de leche

Mamani et al. (2007), sostienen que a nivel nacional se identifican tres sistemas de producción, el sistema extensivo que predomina en la Sierra y Selva, el sistema intensivo que predomina a nivel de la costa y el sistema semi-intensivo que predomina a nivel de los valles interandinos, cuya constitución es extensivo 15% estabulada 47% y mixta 38%.

Sistema extensivo

Se refiere que, las vacas son pastoreadas en pasturas, pueden ser libres o controlados, no se maneja en instalaciones, son de raza criolla en mayoría y otras cruzadas con razas especializadas, los niveles de producción son bajos, existe confinamiento por las noches para el descanso, existe una inversión mínima o casi nula, la producción es directamente relacionado con la presencia de la lluvia y disponibilidad de pastos, climas desfavorables, en altitudes mayores a 2500 metros, muchas veces no hay control reproductivo, productivo, y poco uso de mano de obra (Rojas, 2007).

Sistema mixto

Ocasionalmente se utiliza infraestructura e instalaciones, la alimentación es al pastoreo en pastos cultivados bajo riego o al secano, con suministro de forrajes conservados (ensilado o heno) y concentrado comercial en pequeñas cantidades, las vacas son de doble propósito en consecuencia los niveles de producción son menores al sistema fijo, los gastos de inversión son menores, climas variados, poco control productivo y reproductivo, calidad genética menor que en el sistema fijo, ordeño manual o puede ser mecánico, altitudes variados entre 2500 a 3500 metros sobre el nivel del mar (Mamani et al., 2007).

Sistema estabulado

Las vacas permanecen en confinamiento absoluto, las instalaciones e infraestructuras son adecuadas para una determinada actividad dentro del proceso productivo, se trata de razas especializadas que van en aumento por la alta competitividad y disminución de la población de las razas de doble propósito, la alimentación es en cantidad suficiente y de un alto valor nutritivo (calidad), existe control reproductivo, los niveles de producción son elevados, igualmente los costos por la utilización de maquinaria, medicinas, mano de obra y otros; pueden establecer en altitudes menores a 2000 metros sobre el nivel del mar con climas favorables (Rojas, R. 2007).

2.8 Control endocrino de la espermatogénesis

El periodo previo a la pubertad, donde comienza la espermatogénesis, se caracteriza por estar bajo la influencia de una adecuada producción a nivel del hipotálamo del factor de liberación de las gonadotropinas (GnRH) y la secreción hipofisiaria de FSH (hormona estimulante de células de Sertoli) y LH (hormona estimulante de las células de Leydig), al igual que de esteroides sexuales que se producen en las células de Leydig a nivel gonadal. La liberación continua de LH ocurre entre 10 y 20 minutos aproximadamente de 4 a 8 veces diarias; mientras que las concentraciones de FSH son más bajas pero con unos pulsos de mayor duración que los de LH y con la constante secreción de inhibina a nivel testicular. Las células de Leydig poseen receptores de membrana para LH, y sintetizan y secretan testosterona antes de 30 minutos luego de la liberación de LH. Esta secreción de testosterona es corta, con una duración de entre 20 y 30 minutos. La espermatogénesis se

inicia con la división de células fetales germinales para la producción de espermatogonias, las cuales posteriormente van a dar lugar a distintos tipos de células. El lumen de los túbulos seminíferos se establece aproximadamente entre los 5 y 8 meses de edad del ternero. Ocurre una especie de pico de producción de FSH en esta época, lo cual da lugar a una alta proliferación de células de Sertoli, elongación de los túbulos seminíferos, al igual que incremento en el diámetro de los mismos (Marquez, 2009, p. 259).

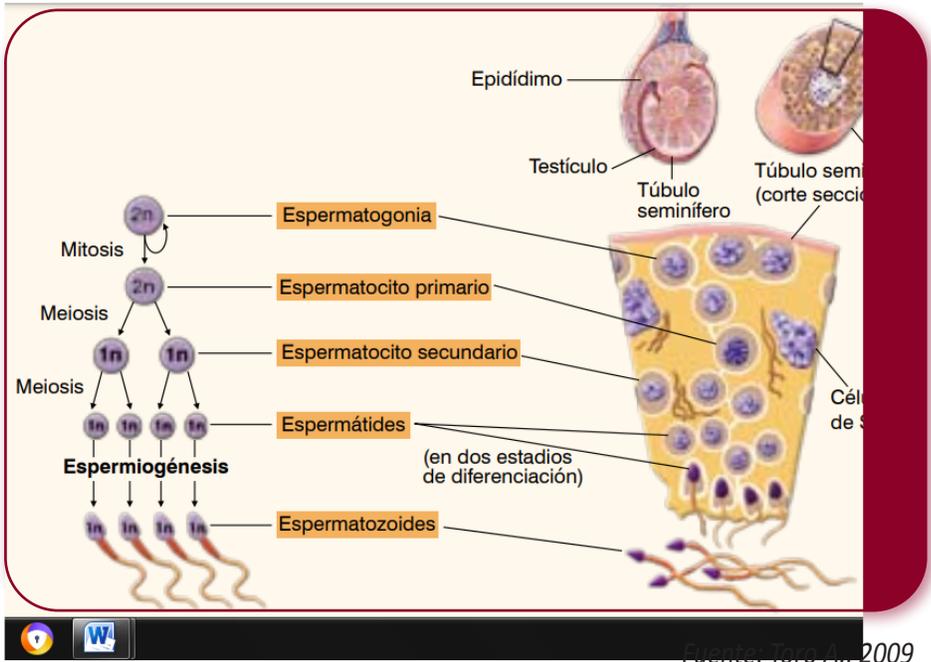
Cuando la mayoría de estas células diferenciadas aparecen por primera vez en el lumen del tubo seminífero, se alcanza la pubertad. En las células germinales en desarrollo existen puentes intercelulares que intercomunican los citoplasmas de estas células, permitiendo que todo un grupo o una cohorte en desarrollo se encuentren interconectados. Los eventos que ocurren durante la espermatogénesis son la espermatocitogénesis y la espermiogénesis (Marquez, 2009, pp. 259-260).

2.9 Espermatocitogénesis

Consiste en una serie de divisiones mitóticas desde espermatogonia A hasta lograr la transformación en espermatogonia B, pasando por una serie de espermatogonias como son A1, A2, A3, A4, espermatogonia I. Esta serie de eventos se encuentran bajo una relevante actividad endocrina por medio de la FSH, que a través del sistema sanguíneo actúa desde la hipófisis encontrando receptores en las células de Sertoli, las cuales son células moldeadoras de las células primordiales hasta formarse como espermatozoides; estas células de Sertoli igualmente requieren de un mecanismo de acción paracrina por medio de la testosterona que proviene de las células intersticiales o de Leydig (Marquez, 2009, p. 260).

Luego se inicia la meiosis, que tiene como uno de sus propósitos la reducción en el número de cromosomas en el gameto para lograr un estado haploide. Los espermatocitos primarios son el resultado de la división mitótica previa ya mencionada de espermatogonias B, e inician una primera profase meiótica, la cual posee 5 estados que se conocen como preleptoteno, leptoteno, zigoteno, paquiteno y diploteno. Cada uno de estos estados corresponde al progreso que se va dando en la síntesis y replicación de DNA. Por ejemplo, la fase de preleptoteno inicia la fase de replicación del DNA con formación de tetrámeros que no se separan y que se fusionan aleatoriamente en diferentes puntos conocidos como quiasmata, dando lugar a un entrecruzamiento de materiales de DNA. Esto hace referencia al cruce de segmentos de un cromosoma a su homólogo cuando se separan las cromátidas. De esta forma, la profase de la primera división meiótica asegura la heterogeneidad genética en cada espermatocito secundario y la espermátide obtenida será única desde el punto de vista genético. Una vez se obtiene el espermatocito primario, lo que ha tomado entre 18 y 19 días y que corresponde a un 30% de la espermatogénesis completa, se forma el espermatocito secundario el cual tiene una duración muy corta, entre 1 y 2 días. Rápidamente el espermatocito secundario realiza su segunda división meiótica, dando lugar a la formación de una espermátide haploide de tipo esférico (Marquez, 2009, p. 260).

Figura 1. Proceso de espermatogénesis

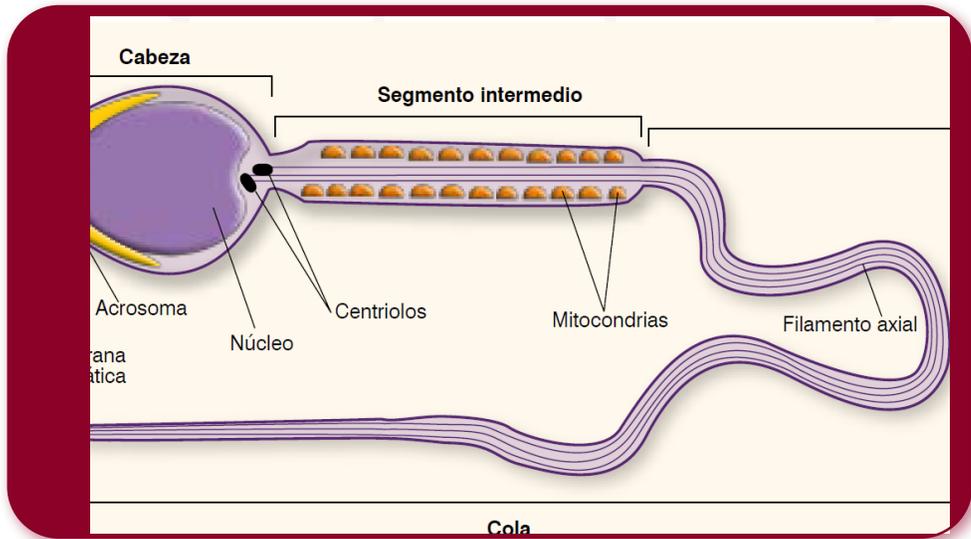


2.10 Mecanismos de protección seminal

Existen diferentes tipos de mecanismos que buscan proteger adecuadamente la calidad tanto de los espermatozoides como del plasma seminal durante los procesos metabólicos naturales que ocurren en el semen tanto en su estado en fresco como criopreservado o posdescongelado. El principal mecanismo que existe busca evitar la formación de ROS (Reactive oxygen species), es decir, un estrés o proceso oxidativo (Peroxidación), durante el cual están involucrados fosfolípidos del espermatozoide, principalmente de la membrana interna del acrosoma, de la pieza media (región mitocondrial) y la cola.

El efecto de ROS y radicales libres se da al activarse la cascada de peroxidación lipídica afectando principalmente ácidos grasos no saturados de la membrana plasmática del espermatozoide causando pérdida de la función espermática y apoptosis celular. Los principales efectos de esta peroxidación lipídica incluyen agotamiento del ATP (Adenosin trifosfato) dando como resultado la pérdida irreversible de la motilidad espermática, una reducción de la fusión oocitoespermatozoide y daño en el DNA (Marquez, 2009, p. 262).

Figura 2. Esquema de un espermatozoide maduro



Fuente: Toro A., 2009

2.11 Volumen de eyaculado

Existen grandes variaciones individuales entre los animales. Los reproductores jóvenes producen de 1-3 cc, los mayores puede producir de 3 años hasta 10 cc, el volumen, también depende de la frecuencia de colección, de la nutrición, el clima y temperaturas ambiental al que están sometidos los toros (Durán F, 2013).

2.12 Color del eyaculado

Ramirez, (2013) describe que el semen del toro varía en las tonalidades de blanco o blanco cremoso, en algunos casos ligeramente amarillento. El color blanco es dominante si el eyaculado contiene una alta concentración de espermatozoides. El color amarillento podría deberse a la presencia de lípidos y carotenos, pero también puede ser debido a la presencia de orina, la cual mata los espermatozoides. A continuación, el mismo autor muestra otros posibles colores del eyaculado:

- El color rosado es debido a la presencia de sangre fresca por lesiones peneales o por administración prolongada de fármacos como la fenotiacina.
- El color café (oscuro) es debido a la presencia de sangre descompuesta como consecuencia de lesiones en alguna parte del canal genital.
- El color azulado por administración de azul de metileno. Las suciedades recogidas durante la monta se precipitan rápidamente, pero puede dar un color grisáceo.

2.13 Aspecto

Existen eyaculados con variaciones entre el cremoso y el acuoso, dependiendo de la

concentración de espermatozoides. Alta concentración espermática determina aspecto cremoso, escasa concentración espermática determina aspecto acuoso (Senger, 2003).

2.14 Olor

Los eyaculados tienen olor característico para cada especie y determinado por el contenido de un lípido, la espermina. Se puede encontrar olores anormales, tales como a orina, excremento y purulentos, generalmente resultado de un mal higiene en el proceso de colección (Durán F, 2013).

2.15 Examen microscópico

Se recomienda que el examen microscópico del semen debe realizarse dentro de los 15 minutos siguientes a la colección del eyaculado, con el objeto de determinar con el mínimo error la motilidad espermática, que puede variar rápidamente por el choque térmico, el pH, la morfología espermática y la presencia de elementos extraños, como células epiteliales, leucocitos, grumos de pus o partículas ajenas al eyaculado (Galina, 2008).

2.15.1 Motilidad espermática

Es la prueba más importante dentro de la calificación de la calidad del eyaculado. Debe realizarse a una temperatura de 35 a 38°C evitando que el semen desde la toma hasta el examen sufra variaciones de más de 4°C, lo cual evita el choque térmico que suele producir alta mortalidad espermática (Durán F, 2013).

2.15.2 Movilidad masal

Para este examen se coloca una gota de semen sobre un portaobjetos a 35 - 38°C y se observa al microscopio usando objetivo de x10.

La motilidad masal se puede clasificar de la siguiente manera:

- **Muy bueno**

80 -100% de los espermatozoides se mueven. Se observan oleadas y remolinos de espermatozoides que se mueven enérgicamente, inclusive en el borde de la gota de semen.

- **Bueno**

60-80% de los espermatozoides se mueven. La formación de olas y remolinos es menos enérgica, los movimientos masales son lentos y se puede ver gran número de espermatozoides muertos (posiblemente quietos) en el borde de la gota de semen.

- **Regular**

30-60% de los espermatozoides se mueve. Pueden verse espermatozoi-

des individualmente moverse con rapidez. Otros espermatozoides muestran solamente movimientos oscilatorios sin avanzar. No hay olas ni remolinos y en el borde de la gota de semen se observa una ancha capa de espermatozoides inmóviles.

- **Malo**

Menos del 30% de los espermatozoides se mueven. Algunos pocos espermatozoides avanzan con energía pero la mayoría lo hace con movimientos lentos y entre una gran capa de espermatozoides inmóviles (Durán F, 2013).

2.15.3 Movilidad individual

Ramirez et al., (2013), menciona que para este examen el semen se diluye en la proporción de 1:10 en solución salina fisiológica o solución de citrato de sodio al 2.9% a 38°C, se observa al microscopio las siguientes características: porcentaje de los espermatozoides que poseen movilidad, grado de movilidad y dirección de los movimientos.

El mismo autor indica que la velocidad media de desplazamiento del espermatozoide a 37°C es en el toro es de 100 a 120 micras por segundo, la movilidad espermática puede ser impedida por la pérdida de un polo eléctrico o cambio en la permeabilidad de estas células ocasionando aglutinación. La movilidad espermática tiene alta correlación con la fertilidad.

2.15.4 Concentración espermática

La concentración de células espermáticas, en el eyaculado varía con la especie, la raza, el individuo, el régimen nutricional, la edad, la actividad sexual y el medio ambiente. Se expresa como el número de células espermáticas por centímetro cúbico de semen (Galina, 2008).

2.15.5 Morfología de los espermatozoides

Un semen de buena calidad contiene siempre un cierto número de espermatozoides anormales que varía del 10 al 12 % en el toro, la presencia de formas anormales no indican que se trate de un semen infértil, puesto que los espermatozoides maduros pueden permanecer almacenados hasta 60 días en el epidídimo sin ser eyaculados y sin perder su fertilidad. Sin embargo, a medida que transcurre el tiempo y el macho permanece en reposo sexual prolongado va aumentando el porcentaje de espermatozoides con cierto grado de degeneración (Durán, 2013).

2.16 Crioconservación de espermatozoides

Los espermatozoides sometidos a crioconservación están sujetos a una serie de alteraciones en su estructura, tales como dilatación y rompimiento a nivel de la membrana, con cambios de permeabilidad en la misma. Hay cambios en la estructura de fosfolípidos y proteínas (siendo clasificados 27 tipos entre la SM40 y la SM391), que traen como

consecuencia una reducción en su motilidad y viabilidad espermáticas. Estos cambios estructurales dan como resultado una prematura capacitación espermática, lo que afectaría la vida media de los espermatozoides y su capacidad fertilizante; existen diversos trabajos que correlacionan la presencia de capacitación espermática prematura en semen descongelado con su capacidad fertilizante. Algunos autores mencionan alteraciones en la cromatina o en la integridad del DNA. Las alteraciones que ocurren durante el sexaje del semen son similares a las descritas en cualquiera de los eventos en que ocurre estrés oxidativo y que ya se explicaron; estos eventos son de gran importancia en biotecnología reproductiva y pueden conllevar deterioro en su calidad. Sin embargo, cuando la calidad del semen es buena, los espermatozoides son capaces de soportar criopreservación, descongelación, ser sometidos a citometría de flujo para el sexaje y, posteriormente, ser recongelados, reportándose después de estos procesos motilidad adecuada e integridad del acrosoma. Hay distintas técnicas de laboratorio que permiten predecir el potencial reproductivo de los toros cuyo semen ha sido criopreservado (Marquez, 2009, p. 269).

2.17 Ciclo estral de la vaca

Según (Atuesta & Gonella Diaza, 2011), el ciclo estral está dividido en las siguientes fases:

Proestro: bajo el efecto de la hormona folículo estimulante (FSH) y probablemente de la hormona lúteotrófica (LH) del lóbulo anterior de la glándula pituitaria, las cuales hacen crecer y madurar el folículo, el ovario aumenta la producción de sus hormonas estrogénicas y algo de progesterona lo cual produce un aumento en el tamaño de la vulva, vagina, útero y oviducto, esta fase de “preparación” dura de 3 a 4 días.

Estro: es el periodo en el cual la hembra acepta sexualmente al macho tiene una duración de 18 horas en promedio pero puede ser variable, este periodo es el más importante para inseminar la vaca o poner al macho, si no se detecta esta fase oportunamente en la vaca es difícil que ocurra la preñez. En el ovario, antes de la ovulación, el folículo de graaf es grande, túrgido y contiene el ovulo que sufre el proceso de maduración, la ovulación ocurre entre 10 y 14 horas después de desaparecer en la vaca los signos externos de celo.

Metaestro: es la fase después de la ovulación, durante la cual, en una vaca no preñada funciona el cuerpo lúteo. La duración del metaestro (5-7 días) depende del tiempo que dure la secreción de la hormona lúteotrófica (LH). Durante el metaestro, la cavidad ovárica donde se encontraba el folículo, empieza a reorganizarse y a crecer en este sitio el cuerpo lúteo evitando el desarrollo de otros evitando la reaparición del celo.

Diestro: tiene una duración de 9 a 12 días antes de empezar una fase de proestro. Durante este periodo, el cuerpo lúteo está completamente desarrollado y tiene una marcada influencia sobre el útero. Si ocurrió la preñez este fenómeno se prolonga a través de toda la gestación y el cuerpo lúteo permanece intacto por todo el periodo. Si la vaca no fue preñada el cuerpo lúteo se regresa, por efecto de la prostaglandina F₂alfa (lúteolisis).

2.17.1 Endocrinología del desarrollo folicular

Las hormonas hipofisarias folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH), son las responsables de la emergencia de las ondas foliculares y la selección de un folículo dominante. Altas concentración plasmática de FSH son responsables de la emergencia de una onda folicular, la que posteriormente es suprimida por productos de los folículos en crecimiento. El folículo que primero adquiere receptores para LH llega a adquirir la condición de “folículo dominante” mientras que los restantes se convierten en “folículos subordinados” que posteriormente sufren atresia. La secreción de progesterona por el cuerpo lúteo suprime la acción de la LH y como consecuencia, hace que el folículo dominante cese en sus funciones metabólicas y que regresione; sin embargo, cuando ocurre la regresión del cuerpo lúteo, permite un incremento de la frecuencia de pulsos de LH y unido a altas concentraciones de estradiol facilita la ovulación (Huanca, 2001).

2.18 Inseminación artificial en bovinos

Martorell, (2000) describe que la aplicación de la inseminación artificial en ganado ofrece las siguientes ventajas de producción y facilita el buen manejo del hato:

- Se incrementa la selección en las crías, mediante la utilización de reproductores, probados con características de alta producción y excelente tipo.
- Control efectivo de enfermedades del aparato reproductor, que pueden ser transmitidas por el toro en monta natural.
- Se evita la compra de toros superiores y el mantenimiento y riesgo de perderlos por enfermedades o accidentes.
- Se evita inseminar muchas vacas en diferentes fincas con semen de un mismo toro sin pensar en distancias geográficas en el transporte del reproductor.
- No se necesita adaptación de los reproductores al medioambiente.
- Evita el desgaste del toro y aumenta la cantidad de servicios por eyaculado.
- Facilita el control reproductivo del hato.
- Se puede cambiar el reproductor en cualquier momento sin costo adicional.

2.19 Sincronización de estro

Roche y Diskin, (2005), mencionan que existen tres enfoques básicos para sincronizar el estro en los bovinos:

- Provocar regresión sincrónica del cuerpo lúteo usando PGF 2α .
- Sincronización de la onda folicular usando luego PGF 2α . cuando un folículo dominante está presente
- Administración de progesterona o progestágeno para regular el tiempo de ovulación.

2.19.1 El uso de PGF2 α .

La PGF2 α es luteolítica desde el día 5 o 6 del ciclo hacia delante pero no tiene efecto sobre la regresión del cuerpo lúteo antes del día 5 ya que éste es refractario. Los eventos endocrinos post aplicación de PGF2 α . son normalmente la declinación inmediata la producción de progesterona (P4) a las 24 horas, aumento gradual de la hormona luteinizante (LH) basal e incremento en la frecuencia de sus pulsos, desarrollo folicular lo que ocasiona un aumento del estradiol, seguido de un pico de LH/FSH que conlleva a la ovulación. Los usos principales de la PGF2 α . para controlar la ovulación son: Vaquillonas de reemplazo, vacas lecheras a partir del sexto día después del celo, vacas con un CL (Roche y Diskin, 2005).

2.19.2 Sincronización de la onda folicular + PGF2 α (Ov-Synch)

Roche y Diskin, (2005) indican, que es posible sincronizar la onda folicular en muchas vacas administrando una inyección de GnRH. Ésta provocará la ovulación en vacas con un FD >1cm de diámetro ocurriendo una onda folicular 1 a 2 días después. Por consiguiente, aquellas vacas que ovulen tendrán un FD activo 7 días después de la inyección de GnRH. las vacas con emergencia o dominancia temprana de la onda folicular no ovularán estando ausente el FD 7 días luego de la inyección de GnRH. Siete días después se aplica PGF2 α para causar la regresión de los CLs nuevos y existentes en todos los animales, lográndose una regresión sincrónica. Debido a que la mayoría de las vacas aunque no todos tendrán también un FD presente en este momento por el efecto variable de la GnRH dependiendo de la etapa de la onda folicular, puede administrarse una segunda inyección de PGF2 α dos días después para inducir una ovulación sincrónica. Lo que permite que todos los animales puedan ser inseminados a tiempo fijo 12 a 15 horas luego de la segunda inyección de GnRH.

2.19.3 El uso de progesterona y progestágeno para controlar el estro

La progesterona/progestágenos son utilizados durante el largo de un ciclo (18 a 21 días) para controlar el estro. Su administración resulta en un control preciso del comienzo del celo pero con tasas de concepción significativamente reducidas debido a las bajas tasas de fertilización y a la mortalidad embrionaria. La baja fertilidad debido a la formación de un FD persistente por el hecho de que los métodos empleados para administrar progesterona/progestágeno no eran capaces de liberar el equivalente de las concentraciones de progesterona de la fase luteal que se requieren para suprimir la frecuencia de los pulsos de LH llevándolo a una pulsación cada 3 a 4 horas. La concentración subluteal de progesterona, 2 ng/ml de dispositivos intravaginales usados, resulta en una elevación de la frecuencia de los pulsos de LH, comienzo prematuro de meiosis en el oocito luego de 8 a 10 días y subsiguientes bajas tasas de preñez a la IA. La máxima duración del tratamiento con progesterona es de 12 días, pero ahora se recomienda, usar tratamientos con duración de 7 a 9 días, siendo necesario usar PGF2 α al finalizar o próximo a la finalización del tratamiento con progesterona/progestágeno para obtener una regresión del CL. Es muy importante asegurar la existencia de un FD saludable con un oocito competente presente al final del tratamiento, siendo recomendable el uso de GnRH o estradiol en el tratamiento con progesterona, para sincronizar la onda folicular al comienzo del mismo (Roche y Diskin, 2005).

- Pajonales amacollados y tholares en pedregales de la Puna Norteña subhúmeda a húmeda, ganadería, agropecuario, con áreas de minería EXPLOTACION DE YACIMIENTOS MINEROS.
- Pajonales amacollados y tolares en pedregales de la Puna Norteña subhúmeda a húmeda, ganadería, agropecuario, con áreas de minería.

3.1.2 Suelos

En la sección municipal de Laja se han encontrado 13 unidades de terreno de acuerdo a la clasificación de ZONISIG

En las serranías (CAICOMA, LLOKOLLOKO, APACHETA) los suelos son superficiales, con alta pedregosidad y afloramientos rocosos, de textura francoarenosa a arcillo-arenosa, son los sectores con erosión hídrica más severa, observándose desde pequeños canales hasta grandes cárcavas. Se clasifican como Leptosoles, Regosoles y Cambisoles.

3.1.3 Cuencas Hidrográficas

Según la delimitación y codificación de las Unidades Hidrográficas (UH) de Bolivia, el Municipio de Laja corresponde a la Unidad Hidrogeográfica (UH) endorreica denominada Cuenca del Altiplano; donde se encuentran las siguientes hidro cuencas:

- Río Vilaque
- Río *Tujsa Jahuira*
- Parte Media Río *Jacha Jahuira*
- Río Caicoma
- Río Catavi
- Río *Guaquira*.

3.1.4 Temperatura Máxima y Mínima

La temperatura promedio anual alcanza los 8.4 °C, con un promedio de máximas de 15.7 °C y un promedio de mínimas de -2,8 °C.

3.1.5 Precipitación pluvial y vegetación

La precipitación promedio anual alcanza los 667 mm., en los meses comprendidos entre noviembre a marzo, si bien las primeras lluvias se registran en septiembre y pueden extenderse hasta abril. El promedio de precipitación máxima anual llega a los 911 mm. y mientras que el promedio mínimo es de 404 mm.

A nivel de municipio la vegetación nativa en su gran mayoría es arbustiva y más que un aprovechamiento en términos de volúmenes, se tiene una extracción selectiva con

finés de uso doméstico (leña). La vegetación existente es rala y se concentra en las zonas de piedemonte y serranía, existiendo especies introducidas principalmente arbóreas adaptadas a los factores geomorfológicos y climatológicos de la región.

En las serranías la vegetación comprende dominante son los pajonales de Chillwa e Ichu sicuya (*Stipa ichu*), arbustos de Añahuaya (*Adesmia miraflorensis*) y Kaylla (*Tetraglochin cristatum*); en las zonas más bajas se encuentran relictos de arbustos, sobre todo de la familia *Baccharis sp.* (Thola, Añawaya). En las cuevas y mesetas, la vegetación con mayor presencia corresponde a pastos del tipo Chillihuas Porkeal y los Chijiales sicuya (*Stipa ichu*), así mismo se encuentran Ichuales, Cebadillares, Ñaccka Tholares, Ichual, Chillihuar Kaillar, Añahuaya (*Adesmia miraflorensis*) y Kaylla (*Tetraglochin cristatum*).

3.2 MATERIALES

3.2.1 Material biológico

Se trabajaron con 28 vacas mestizas (cruces entre razas Criollas, Pardo Suizo, Holstein), con edades que oscilan entre 2 a 6 años, múltiparas con anestro mayor a 3 meses, condición corporal 2 a 2.5 (escala 1 – 5).

Un toro de la raza Pardo Suizo de 2 años de edad con características fenotípicas propias de la raza.

Se utilizaron 35 pajuelas de semen de la raza Pardo Suizo con una motilidad espermática de 40.55% y morfología espermática menor a 10% de anormalidad.

3.2.2 Material de campo

Los materiales involucrados en el proceso de investigación fueron:

- 1 Aplicador de dispositivos intravaginales
- 1 Termo criogénico de semen
- 1 Pistola de inseminación artificial
- 1 Termómetro de mercurio cap. -10 a 130°C.
- 1 Funda de catéter
- 1 Areteador aplicador de caravana
- 1 Corta pajuelas
- 100 Guantes de palpación rectal
- 100 Jeringas de 10 ml
- 100 Agujas hipodérmicas desechables

- 5 kg de algodón
- 1 litro de yodo
- Una caja de guantes quirúrgicos
- 10 rollos de papel secante.
- Un ecógrafo de uso veterinario
- Un Kit de colección de semen bovino.

3.2.3 Insumos, materiales veterinarios y de laboratorio

En la implementación del presente trabajo de investigación se emplearon los siguientes insumos veterinarios y de laboratorio:

- 100 ml de Benzoato de estradiol
- 100 ml de análogo de prostaglandina
- 35 dispositivos intravaginales impregnados con progesterona
- 200 ml de análogo de GnRH (Hormona folículo estimulante de las gonadotropinas)
- 250 ml de minerales (P, Ca, Ze)
- 250 ml de antibiótico (oxitetraciclina)
- 100 ml leche descremada
- 200 ml agua de coco filtrada
- Barras de plastilina
- 200 Pajillas de 0.5 ml
- 20 g de Citrato de sodio
- 50 ml Glicerol
- Cámara criogénica (con incorporador de aire controlable).

3.2.4 Material de gabinete

En la implementación del presente de trabajo de investigación se emplearon los siguientes materiales de gabinete:

- 1 Cámara fotográfica
- Libreta de campo

- Planillas de registro
- Computadora portátil
- Calculadora
- Impresora

3.3 MÉTODOS

3.3.1 Preparación de los dilutores para congelación de semen

Para la preparación de los dilutores se procedió a realizar los siguientes pasos:

3.3.1.1 Pesado y medición de insumos

Los insumos y reactivos para preparar los dilutores (leche descremada, agua de coco, glucosa, fructuosa, glicerol) se pesaron en una balanza de precisión, las mismas se conservaron a 5 °C.

3.3.1.2 Preparación de dilutores

- Para la preparación del dilutor a base de agua de coco se realizó el siguiente procedimiento.

Se filtró agua de coco y refrigeró en un tubo falcón de 50 ml, se hizo una dilución de 5 ml de agua de coco más 5 ml de agua destilada con 5% de citrato de sodio (dilución A), de esta dilución se tomó 9 ml para diluirlo con 1 ml de yema de huevo (dilución B), posteriormente de la dilución B se tomó 9.3 ml al cual se adicionó con 0.7 ml de glicerol (dilución F).

- Para la preparación del dilutor a base de leche descremada se realizó el siguiente procedimiento:

Se realizó una dilución de 10 ml de leche descremada (descremado por flotación de grasa en estado estático de la leche), a este se le adicionó 0.5 ml de glicerol, siendo la dilución final.

- La combinación de agua de coco más leche descremada se realizó, tomando 5 ml de la (dilución F) el cual se adicionó con 5 ml de la dilución final de leche descremada. Los tres dilutores se prepararon el mismo día para la crio conservación de semen.

3.3.2 Colección de semen mediante la técnica de vagina artificial

3.3.2.1 Armado de la vagina artificial

Se procedió al armado de la vagina artificial. Primero se introdujo la funda látex recta

al interior del armazón de la vagina artificial, al mismo tiempo se unió la funda cónica sujeta con el tubo colector, una vez introducidas las dos fundas se procedió a la sujeción de uno de los extremos del armazón con la banda elástica, ya sujeta el extremo del tubo, por el otro extremo se llenó con agua atemperada a 45° C, agregada el agua al armazón de la vagina, se procedió a sujetar el otro extremo con la banda elástica, posteriormente por la válvula de insuflación se llenó con aire y luego se cubrió con una frazadilla para mantener constante la temperatura de la vagina artificial durante la monta.

3.3.2.2 Traslado de los animales al área de colección de semen

Una vaca fue sujeta en el brete de colección de semen, posteriormente el toro fue estimulado para facilitar la monta y colección de semen.

3.3.2.3 Colección de semen

Ya sujeta a la vaca y acomodada en el brete de sujeción y con la vagina artificial armada completamente, se procedió a que el toro realice la monta, previa excitación, para luego realizar la desviación del pene hacia la vagina artificial y realice la eyaculación (2 a 5 segundos), el proceso de colección duró entre 10 a 15 minutos aproximadamente, pasado este tiempo se retiró al macho. Inmediatamente el eyaculado se trasladó hasta el laboratorio para la correspondiente evaluación.

3.3.3 Evaluación macroscópica del semen

3.3.3.1 Color

El color del eyaculado, se evaluó directamente del tubo colector por observación directa, considerando las tonalidades básicas del blanco; blanco lechoso, blanco cremoso y blanco cristalino.

3.3.3.2 Volumen

El volumen del semen del toro se determinó mediante la medición directa en tubos de recolección graduados.

3.3.3.3 pH

La evaluación de pH, se realizó tomando una muestra de 10 µl del eyaculado, con la micro pipeta de 10:100 µL, el cual se depositó en un portaobjeto posteriormente con una tira de papel tornasol (Indicador de pH) se empañó en la muestra del semen. Finalmente, se comparó el color obtenido con los colores que aparecen con la escala cromática impresa en la misma caja que viene el papel tornasol, el rango para verificar si es básico o ácido es entre 5,5 y 9.

3.3.4 Evaluación microscópica del semen

3.3.4.1 Motilidad espermática

Para la evaluación de la motilidad espermática se colocó 10 μL de semen en un portaobjeto atemperado a 37 °C, seguidamente la muestra se cubrió con un cubre objeto atemperado, la lectura se realizó con el lente del objetivo de 40X; contando y valorando los espermatozoides que se mueven de forma rectilínea.

La evaluación se realizó dividiendo el número de espermatozoides en movimiento contado, entre el total de espermatozoides contados en un campo y multiplicado por 100.

$$\% \text{ de motilidad} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de espermatozoides móviles}}{\text{Total espermatozoides contados}} \times 100$$

(Durán F, 2013)

3.3.4.2 Vitalidad espermática

Se tomó una alícuota del eyaculado y se puso sobre un extremo de un portaobjeto atemperado a 37 °C, luego se tomó una pequeña gota de eosina y negrosina el cual se mezcló suavemente con el borde de otro portaobjeto también atemperado, luego se realizó el extendido en forma firme, para que el frotis no tenga un grosor excesivo, se dejó secar en la platina térmica y se procedió a la lectura correspondiente con microscopio a 100x, visualizando teñidos cuando los espermatozoides están muertos y vivo cuando están de color blanco brillante, se determinó el porcentaje de vitalidad con la siguiente fórmula:

3.3.5 Incorporación del dilutor

Posterior a la evaluación de la motilidad de los espermatozoides, estos fueron diluidos en los dilutores correspondientes (leche descremada, agua de coco, agua de coco + leche

$$\% \text{ Vitalidad} = \frac{n}{N} \times 100$$

n= Número de espermatozoides sin teñir

N= Número de espermatozoides contados

(Durán F, 2013)

descremada), la dilución se realizó a una temperatura de 37 °C. en este proceso se realizó una segunda evaluación de la motilidad.

3.3.6 Congelación de semen

3.3.6.1 Descenso de la temperatura

Realizada la evaluación de motilidad de los espermatozoides en los respectivos dilutores, las diluciones de semen fueron sometidas a un descenso de temperatura gradualmente hasta 5 °C a una velocidad de 1 °C /2.9 minutos.

3.3.6.2 Fase de equilibrio

Las diluciones de semen fueron almacenadas en una conservadora portátil (5 ± 2 °C) durante 2 horas, proceso en el que el crio protector va ingresando y protegiendo a la célula espermática, se realizó una agitación lenta cada 30 minutos.

3.3.6.3 Identificación de las pajillas

Se codificó las pajillas con un marcador indeleble, identificándolos por: especie, código del toro, fecha y el dilutor utilizado.

3.3.6.4 Empajillado de semen

Transcurrido el tiempo de equilibrio (2 horas) se prosiguió al empajillado del semen diluido, para esto se utilizó una jeringa modificada boca ancha para el encaje de la pajillas, seguidamente se acopló las pajillas codificadas, subsiguientemente se succionó el semen dejando un espacio de aire de 1cm en la pajilla.

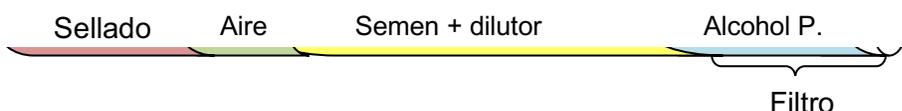
3.3.6.5 Sellado de la pajuela

Cargado la pajilla con semen diluido, se prosiguió con el sellado con plastilina o alcohol polivinílico, posterior al sellado de las pajuelas se los mantuvieron en un refrigerador a una temperatura de 5 °C antes de la congelación.

Cargado del semen de toro en la pajilla

3.3.6.6 Crioconservación

La crioconservación del semen se realizó manualmente, con el método de congelado a



vapor de nitrógeno controlado, en una cámara criogénica desarrollada. Inicialmente se vertió un kg de Nitrógeno líquido en la cámara criogénica que contiene una rejilla, las pajuelas de semen se distribuyeron sobre la rejilla, seguidamente se cerró la cámara criogénica. Los primeros 5 minutos no se generó vapor de nitrógeno, los siguientes 5 minutos se ingresó aire (3 litros/minuto) mediante el sistema de ingreso de la cámara criogénica generándose vapor de nitrógeno, después durante 5 minutos se generó vapor de nitrógeno ingresando aire a razón de 6 litros/minuto. Finalmente, las pajuelas de semen se sumergen en nitrógeno líquido y fueron trasladadas a las canastillas del termo criogénico.

3.3.6.7 Almacenamiento en tanque de nitrógeno

Las pajuelas fueron almacenadas en el tanque de nitrógeno líquido a una temperatura de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta el momento del descongelado para su posterior uso.

3.3.7 Selección de hembras para la sincronización de celo

Para el presente estudio de investigación se seleccionaran 28 vacas de razas mestizas (cruces entre razas Criollas, Pardo Suizo, Holstein) multíparas vacías, con anestro mayor a 3 meses, de una edad aproximada de 3 a 6 años. Todos los animales se sometieron al oscultamiento por palpación rectal del tracto genital. Las vacas fueron seleccionadas en la comunidad Sullkataca Baja y comunidades aledañas: 8 en Sullkataca baja, 5 en San Felipe de Sata Totorá, 6 en Sacacani, 4 en Collpajawa, 3 en Kala Puncu y 2 en Gualaqueri.

3.3.7.1 Identificación de las vacas

Para la identificación de las vacas se utilizó el método del areteado, las caravanas o aretes de plástico se aplicaron con un areteador en el pabellón auricular izquierdo del animal.

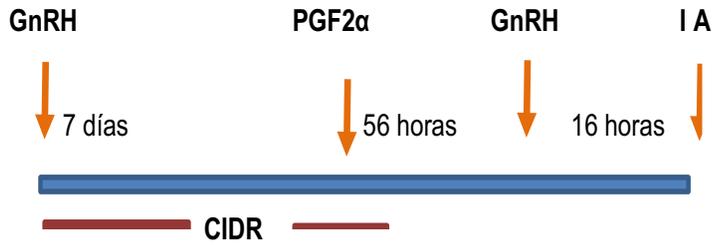
3.3.7.2 Sincronización de celo

Una vez identificado y categorizado los animales en estudio, se distribuyeron en dos grupos aleatorios para la aplicación de los protocolos OVSYNCH y CIDR-SYNCH como de describe a continuación:

Protocolo 1: OVSYNCH



Protocolo 2: CIDR-SYNCH



3.3.7.3 Inseminación artificial

Luego de realizada la sincronización de celo, según el protocolo de sincronización, se procedió a inseminar las vacas, el primer paso fue realizar la descongelando las pajuelas de semen, la cuales están almacenadas en un tanque con nitrógeno líquido. La pajuela se sumergió en agua a 35 °C por 15 segundos, luego se procedió a secar con papel toalla, la pistola de inseminación debe estar previamente atemperada para evitar shock térmico e inmediatamente cargar la pajuela en la pistola, luego se coloca la funda de inseminación, la vaca en celo detectado es inmovilizada, para empezar la deposición de semen descongelado se aplicó un guante de palpación rectal en la mano izquierda, la cual ingresa al recto de la vaca para ubicar el útero y cérvix, con la mano derecha se introdujo la pistola por la vagina hasta atravesar la cérvix y en el cuerpo del útero se depositó la dosis de semen.

3.3.7.4 Diagnóstico de gestación

Transcurrido los 35 días a partir de la inseminación artificial, se procedió a realizar el diagnóstico de gestación por ultrasonografía con un ecógrafo portátil de uso veterinario. Se identificó estructuras uterinas propias de la especie, dentro de ella se visualiza las estructuras placentaria y fetales.

3.4 Factor de estudio

- Se estudiaron los DILUTORES PARA LA CONGELACIÓN DE SEMEN (para el cumplimiento del objetivo específico 1 y 2)
- Se estudiaron los MÉTODOS DE SINCRONIZACIÓN DE CELO (para el cumplimiento del objetivo específico 3)

3.5 Variables de respuestas

Las variables de respuesta que se evaluaron para el primer objetivo específico fueron las siguientes:

- Motilidad espermática

- Vitalidad espermática
- Malformación espermática

La variable de respuesta que se evaluó para el segundo objetivo específico fueron las siguientes:

- % de preñez

La variable de respuesta que se evaluó para el tercer objetivo específico fueron las siguientes:

- % de presencia de celo

3.6 Diseño de investigación y/o análisis estadísticos

Para el primer objetivo específico se utilizó un diseño completamente al azar, con el siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = Una observación (motilidad, vitalidad espermática).

μ = Media general del experimento.

α_i = Efecto de la i -ésima Tratamiento (dilutores)

ε_{ij} = Error del experimento.

El nivel de significancia con la que se trabajó fue $\alpha = 0.05$, a la evidencia de diferencias estadísticas en el análisis de varianza se procedió a realizar la comparación de medias por Tukey. Con el programa estadístico SAS V. 9.4.

Para el segundo y tercer objetivo específico se realizó la prueba estadística a través de la prueba de Chi cuadrado (χ^2); con la siguiente fórmula:

$$\chi^2_{calc} = \sum \frac{(f_o - f_e)^2}{f_e}$$

Dónde:

χ^2 = valor estadístico de ji cuadrada.

f_o = frecuencia observada.

f_e = frecuencia esperada.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Determinación de la motilidad espermática post descongelado a efecto de dilutores agua de coco, leche descremada y combinado.

Cuadro 1. ANVA para motilidad espermática post descongelado a efecto de dilutores

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F-Valor	Pr > F
Dilutores	2	9470.150000	4735.075000	715.91	<.0001**
Error	117	773.85000	6.61410		
Total corregido	119	10244.00000			

** Indica diferencias estadísticas altamente significativas

C.V.: 9.18 %.

El análisis de varianza, indica que existen diferencias estadísticas altamente significativas en la motilidad espermática a efecto de los dilutores (Pr. < 0.05).

El Coeficiente de Variación, 9.18 % indica que los datos obtenidos y analizados son confiables.

Figura 4. Comparación de medias *Tukey* para motilidad espermática (%) post descongelado a efecto de dilutores agua de coco, leche descremada y combinado

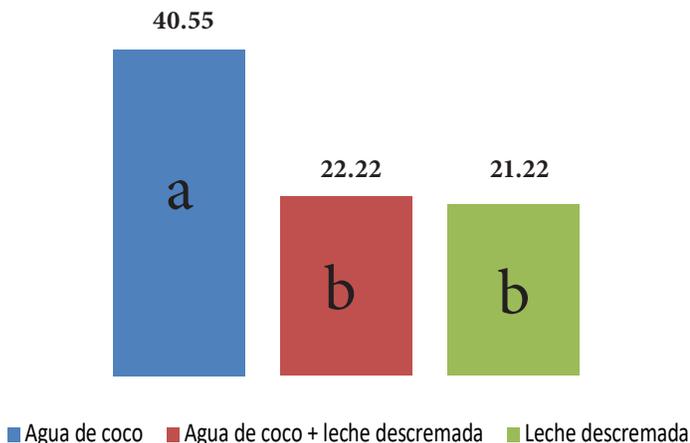


Figura 4, de comparación de medias *Tukey* ($\alpha = 0.05$), muestra que la motilidad espermática post descongelado es estadísticamente diferente y superior con el dilutor Agua de coco (40.55 %) respecto a los demás dilutores; la motilidad espermática post descongelado 22.22 y 21.22 % de los dilutores Agua de coco + leche descremada y Leche descremada son estadísticamente similares e inferiores en comparación a la motilidad espermática con el dilutor Agua de coco.

Parada, Ariza (2019) utilizaron dos tipos de diluyentes, uno a base de agua de coco y el otro comercial Andromed®, congelaron semen de toro raza Gyr x Montbéliarde de 4 años de edad, como resultado obtuvieron que el tratamiento con el diluyente Andromed® obtuvo una mejor respuesta a la crioconservación teniendo en promedio un 57% de motilidad grupal o supervivencia espermática, en cambio el diluyente a base de agua de coco no obtiene resultados satisfactorios con tan solo un 10% en promedio de supervivencia espermática, pero hay que tener en cuenta que el diluyente a base de agua de coco mostro buenos resultados en la fase de refrigeración.

En el presente trabajo de investigación se encontró un 40.55 % de motilidad espermática post descongelado, lo que es superior al reportado por Parada, Ariza (2019), pudiéndose atribuir a la madurez de la fruta (coco), o al manejo inapropiado del semen durante el proceso de dilución, descenso de temperatura y congelación.

4.2 Determinación de la vitalidad espermática post descongelado a efecto de dilutores agua de coco, leche descremada y combinado.

Cuadro 2. Determinación de la vitalidad espermática post descongelado a efecto de dilutores agua de coco, leche descremada y combinado

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F-Valor	Pr > F
Dilutores	2	9550.21667	4775.10833	727.67	<.0001**
Error	117	767.77500	6.56218		
Total corregido	119	10317.99167			

** Indica diferencias estadísticas altamente significativas

C.V.: 8.80 %.

En análisis de varianza, indica que existen diferencias estadísticas altamente significativas de la vitalidad espermática a efecto de los dilutores (Pr. < 0.05).

El Coeficiente de Variación, 8.80 % indica que los datos obtenidos y analizados son confiables.

Figura 5. Comparación de medias *Tukey* para vitalidad espermática (%) post descongelado a efecto de dilutores agua de coco, leche descremada y combinado.

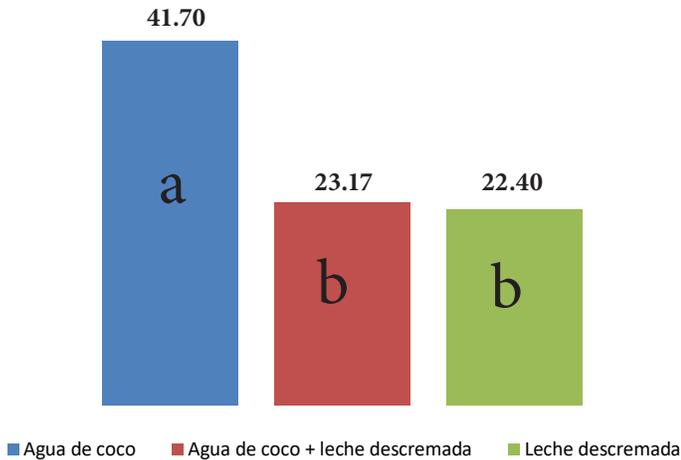


Figura 5, de comparación de medias *Tukey* ($\alpha = 0.05$), muestra que la vitalidad espermática post descongelado es estadísticamente diferente y superior con el dilutor Agua de coco (41.70 %) respecto a los demás dilutores; la vitalidad espermática post descongelado 23.17 y 22.40 % de los dilutores Agua de coco + leche descremada y Leche descremada son estadísticamente similares e inferiores en comparación a la motilidad espermática con el dilutor Agua de coco.

Trigoso, (2017), estudió el “efecto del uso de dos dilutores (agua de coco y leche descremada) para la viabilidad espermática en semen fresco de bovinos”. Los resultados evidenciaron que el uso de dilutores (agua de coco y leche descremada) tuvo un efecto significativo estadísticamente ($p < 0.05$) en la viabilidad espermática del semen fresco de bovinos, lo cual se evidenció diferencia significativa con el testigo. Se concluyó que existe diferencia en los dilutores de agua de coco (69.9%) y leche descremada (67.5) y que con el agua de coco se obtuvieron mejores resultados que con la leche descremada y el Andromed (testigo).

4.3 Determinación de la malformación espermática post descongelado a efecto de dilutores agua de coco, leche descremada y combinado.

Cuadro 3. Determinación de la malformación espermática post descongelado a efecto de dilutores agua de coco, leche descremada y combinado

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Dilutores	2	1.85000000	0.92500000	1.11	0.3322 ^{ns}
Error	117	97.27500000	0.83141026		
Total corregido	119	99.12500000			

^{ns} Muestra diferencias estadísticas no significativas

CV.: 11.57 %.

En análisis de varianza, indica que no existen diferencias estadísticas de la malformación espermática a efecto de los dilutores (Pr. > 0.05).

El Coeficiente de Variación, 11.57 % indica que los datos obtenidos y analizados son confiables.

Agüero, (2012) manifiesta que la morfología está estrechamente relacionada directamente con la motilidad espermática, y se mide en porcentaje de espermatozoides con defectos de morfología. Se necesita, al menos, un buen porcentaje de espermatozoides móviles y de ellos se espera que entre 70 a 80% posean morfología normal. Esto quiere decir, que como máximo se acepta 20 a 30% de atipias (malformaciones espermáticas).

En las evaluaciones espermáticas en el presente trabajo de investigación se evidencia que solo se presentan malformaciones en un 11.57 %, por lo que más del 85 % de los espermatozoides son normales, garantizando su motilidad con el fin de lograr la fecundación del óvulo.

4.4 Determinación del porcentaje de celo y preñez en vacas sincronizadas con dos protocolos e inseminadas con pajuelas congeladas en dilutores alternativos.

Cuadro 4. Porcentaje de celo y preñez en vacas sincronizadas con dos protocolos e inseminadas con pajuelas congeladas en dilutores alternativos.

Protocolo de sincronización	Vacas sincronizadas	Manifestación de celo	% celo	Vacas inseminadas	Vacas preñadas	% preñez
Ovsynch	14	10	71,43 ^a	14	4	28,57 ^a
CIDR-synch	14	13	92,86 ^a	14	8	57,14 ^a
total	28	23	82,14	28	12	42,86

^a Indica la no asociación de las variables al protocolo de sincronización (Ji cuadrado)

De un total de 28 vacas sincronizadas, 14 con el protocolo Ovsynch y 14 con el protocolo CIDR-synch, 10 (71.43%) manifestaron signos de celo correspondiente al protocolo Ovsynch y 13 (92.86%) manifestaron signos de celo correspondientes al protocolo CIDR-synch. Como la inseminación artificial fue a tiempo fijo, la totalidad de las vacas sincronizadas fueron inseminadas. La preñez fue 4 (28.57%) para el protocolo Ovsynch y 8 (57.14%) para el protocolo CIDR-synch, un promedio general de 42.86% de la inseminación artificial en comunidades del municipio de Laja. No existe la asociación (independencia) del porcentaje de celo y la preñez con los protocolos de sincronización de celo utilizados.

Cartagena, (2015) en un trabajo realizado en el Centro Investigación y Producción Chuquibambilla, ubicado a 3.970 msnm. de la Universidad Nacional del Altiplano de Puno Perú, evaluó tres tratamientos de sincronización sobre el desarrollo folicular, cuerpo lúteo y tasa de fertilidad/preñez; utilizó 41 vacas Brown Swiss. En T1 se aplicó el Día 0 dispositivo intravaginal con 1,9 g progesterona + 100 µg GnRH, día 7 se retiró el dispositivo y se administró 25 mg PGF2α + 400UI eCG y a los 60 h se inseminó. En T2 se aplicó día 0 P4 1,9 g + 2 mg benzoato de estradiol (BE) durante 8 días, y se retiró el dispositivo, luego se administró 25 mg PGF2α + 400UI eCG, el día 9 se aplicó 1 mg (BE), a 60 h la inseminación. En T3 día 0 se inyectó 100 µg GnRH, el día 7 se aplica 25 mg PGF2α, a los 9 días se suministró 100 µg GnRH y a los 20 h se inseminó. Con el diagnóstico ecográfico se determinó diámetro foliculo, cuerpo lúteo y el diagnóstico preñez después de 30 días pos inseminación artificial. El diámetro folicular fue T1 14.53 ± 5.28 mm a T2 15.18 ± 6.31 mm y T3 15.00 ± 5.18 mm respectivamente. El cuerpo lúteo de gestación fue de 17.75 ± 4.02 mm, 15.91 ± 2.89 mm y 17.00 ± 1.65 mm continuamente. La tasa de preñez fue 66.67%, 68.75% y 70.00% respectivamente. El protocolo GnRH+PGF2α+GnRH ha permitido un desarrollo adecuado del diámetro folicular, cuerpo lúteo y buena gestación de preñez.

Los resultados del presente trabajo de investigación son inferiores a los reportados por Cartagena (2015), estas diferencias se atribuyen a la condición corporal de las vacas (2, 2.5 en una escala de 1 a 5), dificultando los procesos de mitosis celular adecuadas para garantizar la presencia de folículos en el ovario.

Los porcentajes de la manifestación de celo debido a los protocolos de sincronización de celo en vacas, el mejor fue CIDR-synch, en el cual se utiliza un dispositivo intravaginal impregnado con progesterona, este dispositivo ayuda en la sincronización de celo uniformizando la actividad ovárica. En cambio el protocolo Ovsynch al no incluir el uso de progesterona pierde la capacidad de controlar y uniformizar la actividad ovárica, repercutiendo en la manifestación de celo des uniforme.

5 CONCLUSIONES

El dilutor que muestra la mejor motilidad y vitalidad espermática es Agua de coco, convirtiéndose en una alternativa accesible que muestra gran expectativa para la conservación de espermatozoides. De manera que estas pajuelas puedan utilizarse en procesos de inseminación artificial en las comunidades que se dedican a la producción de ganado lechero.

La leche descremada como dilutor y las combinaciones de esta con agua de coco, muestran una motilidad y vitalidad espermática diferentes e inferiores al dilutor a base de agua de coco.

El porcentaje de celo es similar aplicando los protocolos de sincronización de celo, sin embargo, la preñez aplicando el protocolos de sincronización de celo Ovsynch muestran inferioridad respecto al protocolo CIDR-synch. No existiendo la asociación del porcentaje de celo y preñez a los protocolos de sincronización, siendo estas variables independientes.

6 RECOMENDACIONES

A la conclusión del presente trabajo de investigación se recomienda lo siguiente:

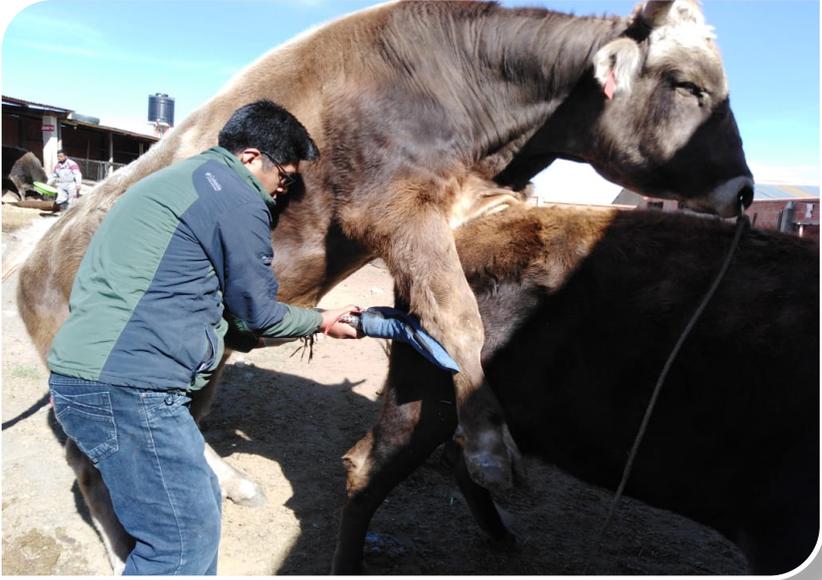
- Realizar evaluaciones del tiempo de equilibrio y diferentes velocidades de congelación espermática, sobre las características microscópicas del espermatozoide de toro.
- Realizar evaluaciones de la combinación del agua de coco con diferentes sales utilizados en la crio conservación de semen de toros.
- Realizar evaluaciones de la combinación del agua de coco con diferentes crioprotectores utilizados en la crio conservación de semen de toros.
- Realizar evaluaciones microbiológicas del semen de toro congelado en agua de coco y sus combinaciones y su efecto en la capacidad fecundante.
- Evaluar el perfil hormonal de progesterona y estrógeno en sangre en vacas sincronizadas con diferentes protocolos de sincronización de celo, para determinar el momento oportuno del servicio.
- Evaluar la condición corporal de las vacas y su efecto sobre la manifestación de celo, porcentaje de preñez, porcentaje de parición, en las diferentes épocas que caracterizan nuestro altiplano boliviano.
- Desarrollar nuevos protocolos de sincronización de celo acorde a las características raciales, características de manejo, características nutricionales y aspectos sanitarios, del ganado bovino presente en el altiplano.

7 BIBLIOGRAFÍA

- Agüero, E. 2012. Evaluación de las Características Seminales de Sementales Bovinos mediante el Analizador Seminal Computarizado (CASA). pp. 9 – 12.
- Atuesta, J. E., & Gonella Diaza, Á. M. (Junio de 2011). Control hormonal del ciclo estral en bovinos y ovinos. *Revisita Sp e i D o m u s*, 7(14). Obtenido de <http://198.46.134.239/index.php/sp/article/view/598/565>.
- Baldivieso F.G. 1992. Ganadería en el Altiplano. La practica Campesina; ediciones TECA, La Paz Bolivia pp. 62 65.
- Cartagena Catacora, J. (2015). Efecto del uso de tres protocolos de sincronización sobre el desarrollo ovárica y la tasa de fertilidad en vacas Brown Swiss (Doctoral dissertation).
- CEDLA PROCADE, UNITAS, 1997, Producción campesina y mercados. La ganadería lechera en el Altiplano, pp 145.
- Durán, F. 2013. Inseminación y transferencia de embriones en animales de granja. Primera edición. Editorial D`vinni S.A. Colombia (pp 26- 31).
- Galina, C. (2008). Reproduccion de Animales Domésticos . México: Limusa.
- Huanca, W. L. 2001. INSEMINACIÓN ARTIFICIAL A TIEMPO FIJO EN VACAS. *Revista de Investigación Veterinaria Perú*, 12(2), 161-163. Perú. Obtenido de <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v12n2/a20v12n2.pdf>.
- Inchausti, D. y Tagle, E. 1980, *Bovinetécnia, Exterior y Razas*, Buenos Aires, Argentina. Ed. Ateneo. 800 p.
- Koeslag, J, 1982, *Manual Técnico Bovinos de leche*. México. Ed Trillas, 110 p.
- MAGDER/UPG (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural). 2001. Situación de los Recursos Zoogenéticos de Bolivia. 1er Informe Unidad de Política Ganadera. La Paz, Bolivia.123 p.
- Mamani, J; Beltrán, P. A.; y Sánchez, J. 2007. Introducción a la zootecnia general. Primera edición. Editorial Universitaria. UNA Puno, Perú.
- Marquez, H. L. 2009. FACTORES QUE AFECTAN LA CALIDAD SEMINAL EN TOROS. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 56(3), 258 - 272. Colombia . Obtenido de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/remevez/article/view/13860/14753>
- Martorell, H. P. 2000. Biotecnología del Transplante y Micomanipulación de Embriones de Bovinos y Camélidos de Los Andes. Perú : A.F.A. Editores Importadores S.A.
- MINAG (Ministerio de Agricultura, Republica del Perú) 2001. Portal Agrario. Principales

- Razas. Consultado el 17 de Diciembre de 2006. Disponible en <http://www.agrobolivia.gov.bo>
- Parada Guerrero, D. O. y Ariza Fernández, R. K. 2019. Efecto de dos diluyentes (agua de coco vs andromed®) en la crioconservación del semen bovino. (Tesis de pregrado). Recuperado de: <http://hdl.handle.net/20.500.12494/14715>.
- Plan Territorial de Desarrollo Integral - PTDI De Laja. PTDI De Laja 2016 - 2020. Servicio Departamental De Autonomías De La Paz SEDALP
- Ramírez-Mella, M., Hernández-Mendo, O., Ramírez-Bribiesca, E. F., Améndola-Massioti, R. D., Crosby-Galván, M.M., Burgueño-Ferreira, J. A. 2013. Effect of vitamin E on milk composition of grazing dairy cows supplemented with microencapsulated conjugated linoleic acid. *Tropical Animal Health and Production*, 45: 1783-1788.
- Ramirez, F. D. 2009. Inseminación y Transferencia de Embriones En Animales De Granja. Colombia : Grupo Latino.
- Rivera, I. R. 2006. Determinación de Curvas de Lactancia del Hato Bovino Criollo Saavedreño en Santa Cruz - Provincia Obispo Santiesteban. Tesis de Grado para obtener el título de MVZ. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Autónoma "Gabriel Rene Moreno", Bolivia.
- Rojas, A. 1987. Principales Características Zoométricas y de Producción del Bovino Criollo Altiplánico. Universidad Mayor de San Simón. Tesis de Grado. Cochabamba, Bolivia. 89p.
- Rojas, R. 2007. Bovinos: Manejo y crianza. Primera edición. Impresión en Puno – Perú.
- Roche, J. F., & Diskin, M. G. 2005. Introducción hormonal de la ovulación y sincronización del celo en bovinos. XXXIII Jornadas Uruguayas de Buiatría.
- Romangosa, J. A. 1982. Manual de Crianza de Vacunos; 5 Ed. Barcelona. Aedos. 438 p
- Senger, P. L. 2003. Pathways to Pregnancy and Parturition. Estados Unidos de America: Current Conceptions, Inc.
- Schimdt, G. 1974. Bases científicas de la producción lechera. Ed. Acribia, Zaragoza, España. 590 pág.
- SOBOCE. 2009. "Ingavi, 2020. Estrategia decenal de desarrollo". Publicación de SOBOCEy el Gobierno Municipal de Viacha. Viacha – Bolivia.
- Toro, A. 2009 Medicina y Laboratorio: Programa de Educación Medica Continua Certificada Universidad de Antioquia, Edimeco.
- Trigoso Yalta, M. J. 2017. Efecto del uso de dos dilutores (agua de coco y leche descremada) para la viabilidad espermática en semen fresco de bovinos.
- Villena, F. E. 2002. Técnico en Ganadería. Ed. Cultural S.A. Madrid – España. v.1. 650p

ANEXOS



Anexo 1. Colección de semen de toro por vagina artificial, para su evaluación y congelación con dilutores alternativos.



Anexo 2. Semen colectado de toro, para su evaluación y congelación con dilutores alternativos.



Anexo 3. Preparación de dilutor a base de agua de coco para la congelación de semen.



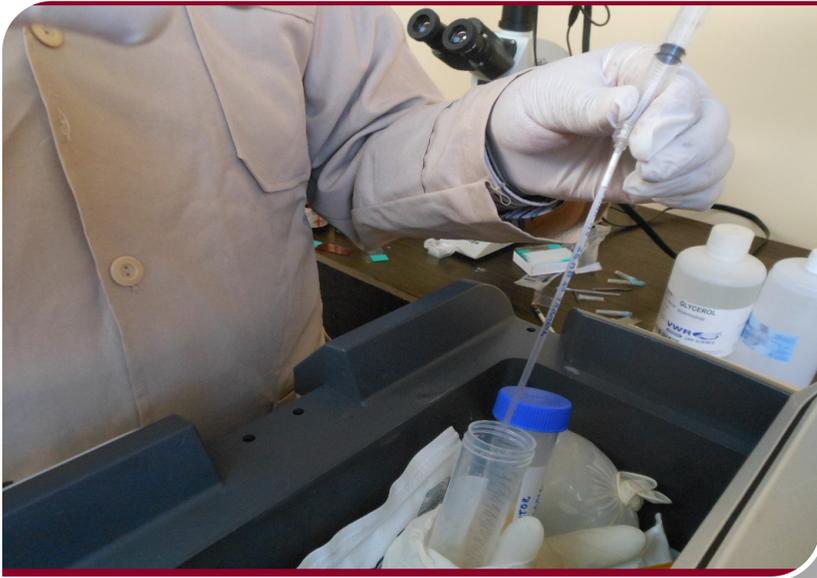
Anexo 4. Preparación de dilutor a base de leche descremada para la congelación de semen.



Anexo 5. Evaluación de semen diluido previa congelación con dilutores alternativos.



Anexo 6. Rotulado de pajillas para la congelación de semen con dilutores alternativos.



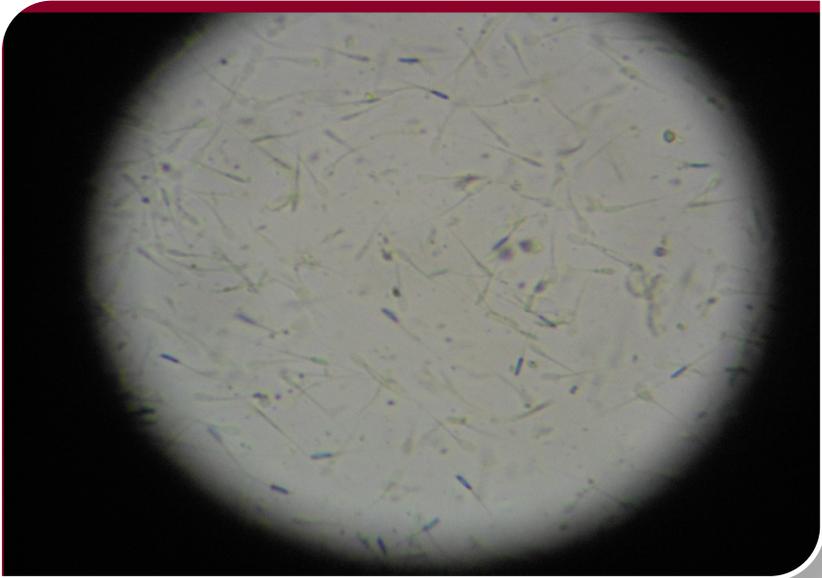
Anexo 7. Empajillado de semen para la congelación con dilutores alternativos.



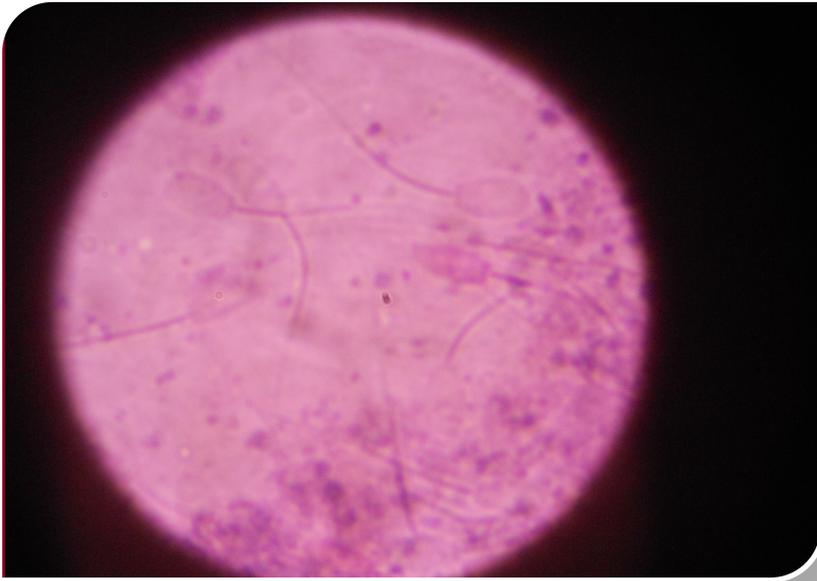
Anexo 8. Sellado de pajuelas con plastilina inerte, para la congelación de semen con dilutores alternativos.



Anexo 9. Congelación de semen en cámara criogénica de vaporización controlada



Anexo 10. Evaluación de motilidad espermática post congelado de semen con dilutores alternativos



Anexo 11. Evaluación de vitalidad espermática post congelado de semen con dilutores alternativos



Anexo 12. Sincronización de celo a vacas en comunidades del municipio de Laja



Anexo 13. Hormonas utilizadas para sincronización de celo a vacas en comunidades del municipio de Laja





Anexo 14. Retiro de dispositivo intravaginal en el proceso de sincronización de celo a vacas en comunidades del municipio de Laja



Anexo 15. Inseminación artificial a vacas con celo sincronizado.



Anexo 16. Inseminación artificial a vacas con celo sincronizado en comunidades del municipio de Laja





Anexo 17. Inseminación artificial a vacas del municipio de Laja



Anexo 18. Beneficiarios del servicio de Inseminación artificial a vacas en comunidades del municipio de Laja















Anexo 19. Capacitación a productores sobre la técnica reproductiva de la Inseminación artificial en comunidades del municipio de Laja.



Anexo 20. EQUIPOS UTILIZADOS EN PROYECTO DE INVESTIGACIÓN DE DILUTORES ALTERNATIVOS EN INSEMINACIÓN ARTIFICIAL CON SEMEN BOVINO EN SULLKATACA (LAJA)



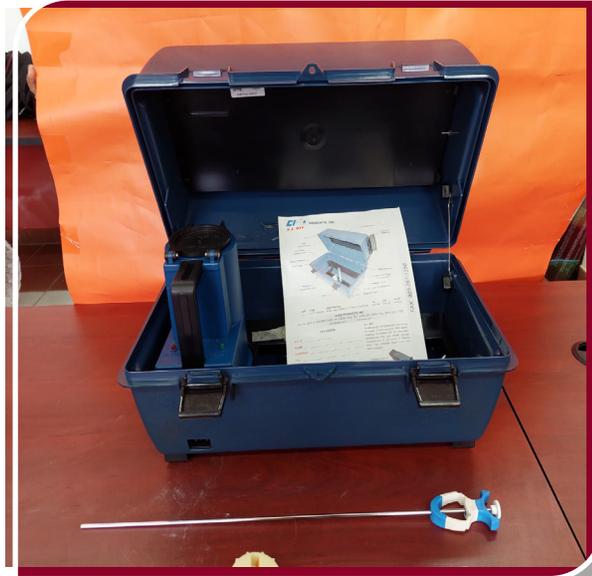
Dispositivos de Sincronización de celo



Equipo de colección de semen bovino



Ecógrafo Portátil



Kit de inseminación artificial para bovinos



Equipo de Laparoscopia



Microscopio Óptico