

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

ESCUELA DE POSGRADO

MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN ANIMAL



**“ADICIÓN DE METIL- β -CICLODEXTRINA CARGADA DE
COLESTEROL SOBRE LA CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN
DE TOROS HOLSTEIN FRIESIAN”**

Presentada por:

HUGO PAÚL VIÑÁN DÍAZ

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

**Lima – Perú
2017**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN ANIMAL**

**“ADICIÓN DE METIL- β -CICLODEXTRINA CARGADA DE
COLESTEROL SOBRE LA CRIOPRESERVACIÓN DE
SEMEN DE TOROS HOLSTEIN FRIESIAN”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO
MAGISTER SCIENTIAE**

Presentada por:

HUGO PAÚL VIÑÁN DÍAZ

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

Mg. Sc. Pedro Ciriaco Castañeda
PRESIDENTE

Mg. Sc. Enrique Alvarado Malca
PATROCINADOR

Mg. Sc. Prospero Cabrera Villanueva
MIEMBRO

Mg. Sc. Segundo Gamarra Carrillo
MIEMBRO

DEDICATORIA

Quiero extender mi abrazo sincero y cariñoso, a todos quienes me apoyaron para lograr conseguir una nueva meta en mi vida profesional, que hasta ayer sólo fue un sueño y hoy Dios con su infinita bondad me ha permitido hacerlo realidad.

Nada de esto se hubiera realizado, sin el apoyo incondicional de aquellos quienes, de una u otra manera estuvieron en cada mañana, tarde o noche alentándome y dándome su valioso cariño.

Dejo impregnado en este papel, mi sincero y leal aprecio en esta dedicatoria a mis amados padres:

La Sra. Blanquita Díaz y el distinguido Dr. Hugo Viñan. Ya que ellos con su paciencia, amor y ejemplo de lucha y trabajo han moldeado en mi espíritu la perseverancia que hoy se ve reflejado en este logro obtenido con sacrificio y dedicación.

Al nombrar a Ma. Belén y José Miguel mi alma enternecida escribe...

Para ellos, mis amados hijos, este triunfo que no es para mí si no para ustedes; ya que han sido, son y serán la fuerza que yo necesité, necesito y necesitaré siempre. Y abrazándoles en este párrafo quiero decirles que los amo con cada latido de mi corazón. Ustedes fueron mi faro de luz en momentos de lúgubre tiniebla, y la razón que me permitirá seguir siempre adelante esforzándome por ser ejemplo para ustedes.

Y queda también regado en mi dedicatoria la vital presencia de mis adorados hermanos Diego y Wilson quienes desde la lejanía, con su apoyo moral han dado valor a los gratos e inolvidables momentos que siempre tuve presente y que me permitieron no desmayar en mi propósito.

A ustedes esta dedicatoria.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento:

A la Escuela de Postgrado de la UNALM, por mi formación académica y profesional en estos años.

Al Banco Nacional de Semen de la UNALM, por el apoyo técnico y logístico en la realización de la presente tesis de maestría.

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

Al Mg. Sc. Enrique Alvarado Malca, patrocinador de la tesis y a la PhD. (c) Amalia Gallegos, copatrocinadora, por su valiosa contribución al trabajo, consejos y orientación profesional.

A los miembros del Jurado, Mg. Sc. Pedro Ciriaco Castañeda (Presidente), Mg. Sc. Próspero Cabrera Villanueva (Miembro) y Mg. Sc. Segundo Gamarra Carrillo (Miembro), por los aportes y exigencias hechas al presente trabajo.

Al Mg. Sc. Enrique Paucar, por sus sugerencias en la etapa experimental y por brindarme su aporte y conocimiento profesional.

A mis profesores gracias por su tiempo, por su apoyo, así como por su sabiduría transmitida en el desarrollo de mi formación profesional.

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

A todos mis amigos y compañeros de aula que me han apoyado en la realización de esta investigación, gracias por sus consejos y amistad en esta etapa de mi vida.

RESUMEN

La incorporación de ciclodextrinas cargadas de colesterol (CLC), representa una estrategia para aumentar la resistencia de espermatozoides al proceso de criopreservación, mejorando las tasas de supervivencia espermática y la calidad del semen después de la descongelación con respecto al no tratado. El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto de la adición de ciclodextrina cargada con colesterol sobre la criopreservación de semen de bovino en la raza Holstein Friesian. El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio del Banco Nacional de Semen de la UNALM, utilizando 4 toros Holstein Friesian de 3 a 4 años de edad. Se colectó utilizando vagina artificial un total de 28 eyaculados (7 eyaculados por toro) y se analizó sus características macroscópicas (color, volumen, pH) y microscópicas (motilidad, vitalidad, concentración, integridad y funcionalidad de la membrana espermática). Posteriormente se realizó una pre dilución 1:1 del semen y se dividió en 03 alícuotas para la adición de CLC (T1: 0 mg, T2:1.5 mg. CLC y T3:2 mg de CLC /120 millones de espermatozoides). Se incubó por 15 minutos a 37°C; luego se realizó la dilución final y el inmediato envasado del semen en pajillas 0,5 ml (30×10^6 espermatozoides) realizando el descenso escalonado de temperatura, llegando a -196° C. Se almacenó en tanques de nitrógeno líquido; a los 7 días se procedió a descongelar las pajillas para su evaluación. Se empleó el DBCA con sub muestreos para medir el efecto de la CLC en los diferentes tratamientos. Se determinó que no existió diferencia significativa en la etapa de refrigeración en los diferentes tratamientos. Resultados post-descongelamiento indican una mejora en las diferentes variables estudiadas utilizando CLC, la motilidad total espermática fue de 67.73%, 79.59% y 74.73% con T1, T2 y T3 respectivamente. Vitalidad con T1: 63.26%, T2:75.84% y T3:70.53%. Valores a prueba de HOST en T1, T2 y T3 con el 46.89%, 60.43% y 55.06% respectivamente.

Palabra clave: colesterol, criopreservación, semen, bovino.

ABSTRACT

The incorporation of cholesterol-loaded cyclodextrins (CLC) represents a strategy to increase the sperm resistance to the cryopreservation process, improving the sperm survival rates and the quality of the semen after thawing with respect to the untreated one. The objective of this investigation was to determine the effect of the addition of cyclodextrin loaded with cholesterol on the cryopreservation of bovine semen in the Holstein Friesian breed. The study was carried out in the Laboratory of the National Semen Bank of the UNALM, using 4 Holstein Friesian bulls from 3 to 4 years of age. A total of 28 ejaculates were collected using artificial vagina (7 ejaculated by bull) and their macroscopic (color, volume, pH) and microscopic characteristics (motility, vitality, concentration, integrity and functionality of the spermatic membrane) were analyzed. Subsequently, a 1: 1 pre-dilution of the semen was performed and divided into 03 aliquots for the addition of CLC (T1: 0 mg, T2: 1.5 mg, CLC and T3: 2 mg of CLC / 120 million sperm). It was incubated for 15 minutes at 37 ° C; then the final dilution and immediate packaging of the semen in 0.5 ml straws (30x10⁶ spermatozoa) was carried out, performing the stepped temperature decrease, reaching -196° C. It was stored in tanks of liquid nitrogen; After 7 days, the straws were thawed for evaluation. The DBCA was used with sub sampling to measure the effect of the CLC in the different treatments. It was determined that there was no significant difference in the refrigeration stage in the different treatments. Post-thawing results indicate an improvement in the different variables studied using CLC, the total sperm motility was 67.73%, 79.59% and 74.73% with T1, T2 and T3 respectively. Vitality with T1: 63.26%, T2: 75.84% and T3: 70.53%. HOST tested values in T1, T2 and T3 with 46.89%, 60.43% and 55.06% respectively.

Keyword: cholesterol, cryopreservation, semen, bovine.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivo	2
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. Membrana espermática	3
2.1.1. Composición de la membrana del espermatozoide	3
2.1.2. Composición lipídica	5
2.1.3. Colesterol	5
2.2. Adición de colesterol a las membranas plasmáticas	6
2.3. Ciclodextrina	9
2.4. Criopreservación del espermatozoide	10
2.4.1. Alteraciones morfo-funcionales de los espermatozoides derivados de la criopreservación.	12
2.4.2. Deshidratación celular y shock térmico	14
2.5. Aplicación de sistemas computarizados para la evaluación seminal	15
III. MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.1. Localización	18
3.1.1. Período experimental	18
3.2. Selección de los animales	18
3.3. Materiales	19
3.4. Metodología	20
3.4.1. Colección de semen	20
3.4.2. Evaluación de semen	20
3.4.2.1. Evaluación macroscópica	20
a. Volumen	21
b. Color	21
c. pH	21
3.4.2.2. Evaluación microscópica	22
a. Motilidad espermática	22
b. Concentración espermática	22

c. Evaluación de vitalidad espermática	22
d. Evaluación de morfología espermática	23
e. Evaluación de la funcionalidad de la membrana espermática (HOST)	24
3.4.3. Preparación de la ciclodextrina cargadas con colesterol (CLC)	27
3.4.4. Adición de la ciclodextrina cargada con colesterol (CLC)	27
3.4.5. Dilutor, preparación y dilución del semen	28
a. Dilutor andromed®	28
b. Preparación del dilutor	31
c. Dilución del semen	31
3.4.6. Descenso de temperatura y tiempo de estabilización	32
3.4.7. Criopreservación seminal	33
3.4.8. Descongelado del semen	33
3.4.9. Evaluación del semen post descongelamiento	33
3.5. Tratamientos	33
3.6. Análisis Estadístico	33
3.6.1. Modelo aditivo lineal	34
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
V. CONCLUSIONES	42
VI. RECOMENDACIONES	43
VII. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA	44
VIII. ANEXOS	54

INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Concentración de CLC utilizada en diferentes especies	8
Tabla 2. Efecto del tratamiento del semen con CLC sobre la capacidad fertilizante del semen in vivo	9
Tabla 3. Composición química de la de la solución hipoosmótica 100 mOsm/l	24
Tabla 4. Composición química del medio de lavado	25
Tabla 5. Motilidad total y progresiva, vitalidad, integridad de membrana, morfología y espermios inmóviles semen refrigerado	35
Tabla 6. Motilidad total y progresiva, vitalidad, integridad de membrana, morfología y espermios inmóviles semen post-descongelado	37
Tabla 7. Características macroscópicas del semen puro	54
Tabla 8. Motilidad total y progresiva, vitalidad, integridad de membrana, morfología y espermios inmóviles semen fresco	55

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Modelo de la membrana plasmática de una célula animal	4
Figura 2. Estructura del espermatozoide bovino	4
Figura 3. Estructura química y dimensiones aproximadas de β -ciclodextrina	11
Figura 4. Toros Holstein Friesian utilizados en la investigación	19
Figura 5. Colección de semen con vagina artificial	21
Figura 6. Determinación de motilidad y concentración espermática con el sistema CASA	23
Figura 7. Prueba de vitalidad espermática	24
Figura 8. Reacción a la prueba de HOST	26
Figura 9. Remoción de los cristales de CLC	28
Figura 10. Esquema de metodología a utilizar con CLC	29
Figura 11. Adición de CLC y fase de incubación	30
Figura 12. Dilución final y empajillado	30
Figura 13. Etapa de refrigeración	32

I. INTRODUCCIÓN

Una de las biotecnologías reproductivas más utilizadas en la actualidad es la inseminación artificial, técnica que presenta grandes ventajas en el progreso genético animal, así como su facilidad, bajos costos, control de enfermedades venéreas y la posibilidad de implementación de diferentes programas de cruzamientos. Es necesario tomar en cuenta que la efectividad de esta biotecnología, depende de la calidad seminal, asociado a factores como la capacidad reproductiva del macho, obtención y procesamiento del semen y métodos de criopreservación.

Una pieza clave en el procesamiento seminal lo constituye la criopreservación, que permite el mantenimiento de germoplasma seminal, ovocitos, embriones o tejido gonadal durante tiempo indefinido. En el Perú según el último censo nacional agropecuario de 2012, son 36,982 las unidades agropecuarias que utilizan inseminación artificial como practica de mejoramiento genético; por tanto, el valor de la criopreservación en la reproducción asistida en bovinos y otras especies de interés zootécnico queda claramente evidenciado por el gran número de gametos y embriones que son congelados y transferidos cada año.

Sin embargo, durante la fase de criopreservación se produce una disminución de la calidad seminal con respecto a la del semen fresco o refrigerado, esto debido al shock térmico (cambios osmóticos y formación de hielo celular) que se somete el espermatozoides durante las fases de congelación, causando daños bioquímicos y estructurales, especialmente a nivel de membrana plasmática. Esta membrana es fundamental en el mantenimiento de la viabilidad espermática en el tracto reproductor femenino (capacitación y fertilización del ovocito). Por consiguiente, lesiones en la membrana plasmática durante la criopreservación provocan la pérdida de componentes intracelulares como enzimas metabólicas, reducción de la motilidad, vitalidad espermática y la capacidad fertilizante.

Es posible considerar que el tratamiento con colesterol incorporado a la membrana espermática por medio de ciclodextrinas, disminuya estos daños, ayudando a preservar la

viabilidad del semen post descongelación, mejorando la fluidez y estabilidad de la membrana en bajas temperaturas. En vacunos, Purdy y Graham (2004), observaron diferencias significativas en viabilidad y motilidad entre espermatozoides tratados con ciclodextrinas cargadas de colesterol y sin ellas. Las ciclodextrinas pueden saturarse previamente con colesterol, y van a servir como medio de transporte para incorporarlo a las membranas plasmáticas.

En el Perú, hasta el momento no existen estudios relacionados con el uso de ciclodextrina cargada de colesterol en los protocolos de criopreservación de semen bovino. Por tal razón se hace indispensable evaluar protocolos que incluyan la adición de este componente con el fin de mejorar la calidad espermática del semen utilizado para inseminación artificial, garantizando de esta manera un mayor número de espermatozoides viables, un mayor porcentaje de fertilidad en campo o permitir un número menor de espermatozoides utilizados por pajilla, sin reducir la fertilidad.

Este trabajo tiene como objetivo principal determinar el efecto de la adición de metil- β -ciclodextrina cargada con colesterol sobre la criopreservación de semen de toro de la raza Holstein Friesian, a través de la evaluación de las características seminales pre y post congelación del semen como motilidad total y progresiva, vitalidad, anormalidades morfológicas e integridad y funcionalidad de membrana.

II. REVISION DE LITERATURA

2.1. MEMBRANA ESPERMÁTICA

La membrana espermática se compone básicamente de lípidos, proteínas y un pequeño porcentaje de carbohidratos, dependiendo del tipo de especie celular al que pertenezcan (Avila-Portillo et al., 2006). Es una estructura dinámica que interviene en el reconocimiento y transporte de moléculas, está altamente compartimentada, y en cada compartimiento presenta una composición y organización característica, lo que origina propiedades físicas y funciones distintas (Pérez et al., 2002). Estos compartimientos son principalmente: la red mitocondrio-flagelar que es importante en el metabolismo y motilidad del espermatozoide, el núcleo necesario para el almacenamiento estable del ADN, la cabeza del cual destaca la porción anterior, fundamental para la apropiada activación acrosómica y el segmento posterior imprescindible para la unión espermatozoide-ovocito. Cada compartimiento es susceptible a las variaciones de temperatura y a los daños provocados por la congelación de un modo diferente (Hummersted et al., 1990; Tartaglione, 2004).

La integridad y funcionalidad de la membrana plasmática es utilizada para valorar la viabilidad y calidad seminal, por su interacción celular y metabolismo; sin embargo no es solo importante para efectuar el metabolismo espermático, sino que un correcto cambio en las propiedades físicas de la membrana celular es necesario para que se de la unión entre el espermatozoide y el ovocito (Jeyendran, et al., 1984).

2.1.1. Composición de la membrana del espermatozoide

La composición molecular determina las propiedades biológicas y biofísicas de las membranas celulares. Por tal razón los componentes de la membrana de los espermatozoides son de especial interés por su papel en la fecundación, así como por los cambios físicos que sufre durante la refrigeración y la criopreservación y que determinan su viabilidad (Parks y Lynch, 1992).

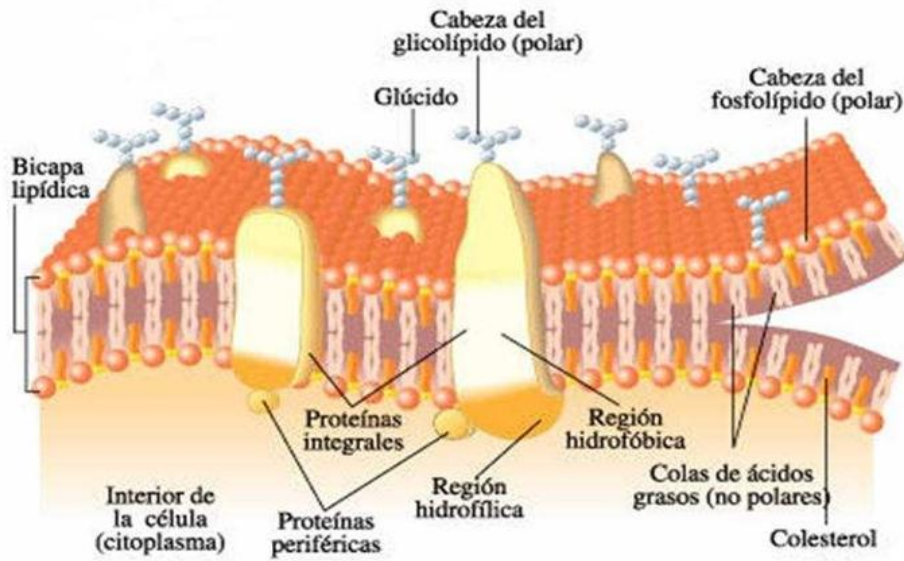


Figura 1. Modelo de la membrana plasmática de una célula animal.

Fuente: modificada de iescarin.educa.aragon.es

La membrana plasmática del espermatozoide es heterogénea y tiene cinco dominios específicos: el acrosoma, el segmento ecuatorial y basal, la pieza intermedia y la cola. Cada una de estas regiones presenta una composición diferente, relacionada con sus funciones fisiológicas (Ladha, 1998).

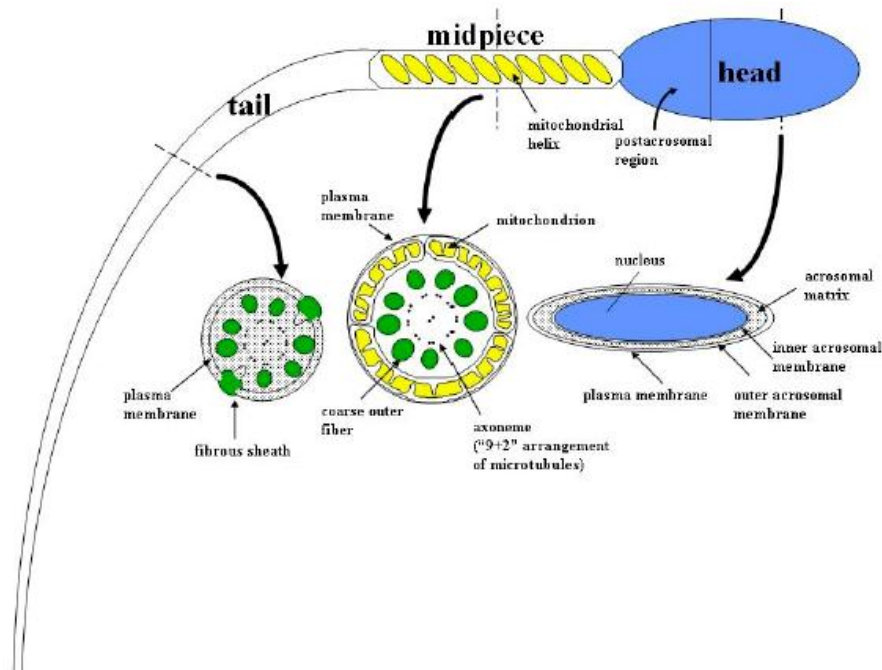


Figura 2. Estructura del espermatozoide bovino.

Fuente: Extraído de Parks, 1997.

2.1.2. Composición lipídica

Los lípidos constituyen aproximadamente el 50 por ciento de la masa de la mayoría de las membranas celulares, con un valor aproximado de cinco millones de moléculas de lípidos por μm^2 de la bicapa lipídica (Flesch y Gadella, 2000).

Las moléculas lipídicas de las membranas celulares tienen la característica de ser anfipáticas o anfifílicas, es decir, tienen un extremo hidrofílico "polar" y el otro hidrófobo "no polar" (Alberts, 1994). Varios estudios sobre la composición lipídica de la membrana plasmática de los espermatozoides de varias especies de mamíferos, han comprobado que existe una diferencia considerable entre distintas especies de mamíferos (Tapia et al., 2012). Se puede considerar, como un promedio estándar que la membrana plasmática contiene aproximadamente un 70 por ciento de fosfolípidos, 25 por ciento de lípidos neutros y un cinco por ciento de glicolípidos (Flesch y Gadella, 2000).

Los principales lípidos que conforman la membrana son fosfolípidos y colesterol; y la relación entre estos componentes difiere ampliamente entre especies. Especies como los humanos y los conejos poseen una relación colesterol/fosfolípidos muy alta. Mientras más alta sea esta relación, la temperatura en la que ocurre la transición de fase disminuye y sí la relación es lo suficientemente alta no ocurre transición de la membrana a estado de gel. Esta es la causa por la cual los espermatozoides de estas especies sufren menores daños de membrana al ser congelados (Darin-Bennett y White, 1977). Los equinos, los bovinos y los porcinos tienen una relación molar colesterol/fosfolípidos de 0.36, 0.45 y 0.26 respectivamente (Parks y Lynch, 1992).

2.1.3. Colesterol

Es el encargado de mantener la fluidez de la membrana plasmática, ya que aumenta la flexibilidad y la estabilidad mecánica de la bicapa. Es una molécula anfipática que presenta una orientación similar a la de los fosfolípidos. El grupo hidroxilo del colesterol se encuentra entre las cabezas de los fosfolípidos (hacia el exterior), mientras que la cadena hidrocarbonada se coloca entre las cadenas apolares (entre las colas de los ácidos grasos "hacia el interior"). Su función principal es la de proporcionar estabilidad a la estructura de ácidos grasos en un amplio rango de temperatura bloqueando los grandes movimientos de los ácidos grasos. A bajas temperaturas previene la compactación de las cadenas

carbonadas de los ácidos grasos ya que impiden que las colas se junten (Darin-Bennett y White, 1977).

El grado de fluidez de la membrana depende de varios factores: la temperatura y la relación entre los niveles de ácidos grasos saturados (colesterol) e insaturados. En temperaturas más bajas, se produce poca el movimiento lipídico y la bicapa asume una forma casi cristalina. Cuanto mayor es la proporción de los ácidos grasos saturados, mayor es la temperatura de transición sólido-fluido de la membrana (Lehninger et al., 2005).

2.2. ADICIÓN DE COLESTEROL A LAS MEMBRANAS PLASMÁTICAS

De acuerdo a varias investigaciones, por una parte, se sabe que el colesterol estabiliza las membranas y disminuye la temperatura a la cual se produce el cambio de fase de los lípidos de fase líquida a gel. Y, por otra parte, los daños que se producen en las membranas son muy similares al estadio de la capacitación (Gillan et al., 1997). Se ha observado que cuando los espermatozoides comienzan este proceso su longevidad se ve disminuida (Curry, 2000), y uno de los primeros pasos en el proceso de capacitación es la pérdida de colesterol de sus membranas. En teoría, si se consiguiera incorporar colesterol a las membranas plasmáticas, se podría alcanzar un mayor ratio colesterol/fosfolípidos y por tanto los espermatozoides descongelados deberían estar menos capacitados, y sus membranas deberían ser más estables (Mocé y Graham, 2006), alcanzando un ratio colesterol/fosfolípidos semejante al de las membranas plasmáticas de especies resistentes al choque térmico (conejo y humano con 0,88 y 0,90 respectivamente). En definitiva, se conseguiría aumentar la longevidad de los espermatozoides.

Para la adición de colesterol a las membranas se pueden usar ciclodextrinas que son oligosacáridos cíclicos que poseen una cara externa hidrofílica y una interna hidrofóbica. Las ciclodextrinas pueden saturarse previamente con colesterol, y van a servir como medio portador para incorporarlo a las membranas plasmáticas. Según las unidades de glucosa que contengan las ciclodextrinas, se pueden clasificar en α , β y γ ciclodextrinas según tengan 6, 7 u 8 unidades de glucosa, respectivamente. Se suelen utilizar derivados de las ciclodextrinas, modificados químicamente mediante la adición de grupos metilo o hidroxipropilo, porque mejoran tanto su solubilidad en agua como su capacidad para disolver compuestos hidrofóbicos (Yancey et al., 1996).

Cuando son adicionadas al semen bovino las ciclodextrinas cargadas con colesterol (CLC) antes de criopreservarlo, se obtienen mayores tasas de espermatozoides móviles y con membranas intactas después de descongelar, comparándolo con el tratamiento control (Amorim et al., 2009; Purdy y Graham, 2004).

Se han observado mejoras en viabilidad y motilidad cuando los espermatozoides de caballos, burros, toros, carneros o cerdos, son tratados con CLC tal y como se expone a continuación. En caballos, se han observado mayores porcentajes de espermatozoides móviles y de espermatozoides con la membrana íntegra, cuando son tratados con metil- β -ciclodextrina saturada de colesterol previamente a la crioconservación (Combes et al., 2000; Moore et al., 2005; Torres et al., 2006). No obstante, Zahn et al. (2002), sólo observaron mejoras en la integridad de la membrana, pero no en motilidad, e incluso al inseminar con el semen tratado, el porcentaje de hembras preñadas fue menor que en el caso de las hembras inseminadas con el semen control.

En burros, Álvarez et al. (2006), observaron diferencias significativas tanto en motilidad como en viabilidad para espermatozoides tratados con metil- β -ciclodextrina saturada de colesterol. En vacunos, Purdy y Graham (2004) observaron diferencias significativas en viabilidad y motilidad entre espermatozoides tratados con ciclodextrinas saturadas de colesterol y sin ellas.

En carneros, se han observado mejoras en la supervivencia a la crioconservación, en los espermatozoides tratados tanto con metil- β -ciclodextrina como con 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina saturadas de colesterol (Morrier et al., 2004; Mocé y Graham, 2006).

En porcinos, se determinó un aumento en el porcentaje de mótiles e integridad de la membrana y del acrosoma en espermatozoides tratados con 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (Zeng y Terada, 2001b) y con metil- β -ciclodextrina saturada de colesterol (Galantino-Homer et al., 2006) observaron mejoras en cuanto a viabilidad en espermatozoides incubados con 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina y colesterol 3-sulfato, e incluso observaron una inhibición de la capacitación.

Los espermatozoides bovinos tratados con colesterol han sido usados para fertilización *in vitro* sin diferencias significativas con respecto a los espermatozoides control, sin embargo los resultados en campo indicaron que el semen tratado con colesterol incrementó las tasas de concepción desde 50% a 59% (Purdy y Graham, 2004).

Numerosos autores ha realizado investigaciones con diferentes dosis de CLC para mejorar los resultados en criopreservación de semen en diferentes especies (tabla 1 y 2).

Tabla 1. Concentración de CLC utilizada en diferentes especies.

Especies	Autores	Concentración/Número de espermatozoides
Bovina	Purdy e Graham (2004a)	1,5 mg/ 120x10 ⁶
	Purdy et al. (2005)	1,5 mg/ 120x10 ⁶
	Mocé e Graham (2006)	2,0 mg/ 120x10 ⁶
	Amorim et al. (2009)	1,5 mg/ 120x10 ⁶
	Moraes et al. (2010)	1,5 mg/ 120x10 ⁶
Equina	Zahnet al. (2002)	0,125Mm
	Moore et al. (2005)	1,5mg/120x10 ⁶
	Spizziriet al. (2010)	1,5mg/ 120x10 ⁶
	Oliveira et al. (2010)	1,5mg/ 120x10 ⁶
	Combeset al. (2010)	0,125 mmolchol/L
Ovino	Mocéet al. (2010)	2mg/ 120x10 ⁶
	Purdyet al. (2010)	2mg/ 120x10 ⁶
	deGraaf et al. (2007)	1,8mg/ 120x10 ⁶
Caprino	Amidi; Farshad; Khor (2010)	1,5mg/240x10 ⁶ + BSA** 2,5%
	Farshadetal.,(2011)	2,25mg/240x10 ⁶
	Koniyali (2009) 1mg/120x10 ⁶	1mg/120x10 ⁶
Suino	Zeng e Terada (2001)	20mM MBC*+ 10mM colesterol/500x10 ⁶
	Tomás et al. (2009)	1,0mg/ 120x10 ⁶
	Tomás et al. (2013)	1,0mg/ 120x10 ⁶

*MBC = metil-β-ciclodextrina.

Fuente: Boscarato y Martins (2014).

Tabla 2. Efecto del tratamiento del semen con CLC sobre la capacidad fertilizante del semen in vivo.

Especies	Dosis/Inseminación artificial	Control	Tratado con CLC
^a Bovina	750 000	50%	59%
^a Bovina	800 x10 ⁶	75%	25%
^b Equina	400x10 ⁶	28,60%	15%
^c Equina	100x10 ⁶	45,30%	41%
^d Ovina	600x10 ⁶	67,70%	55,90%
^e Suína*	600x10 ⁶	65,20%	66,70%

^aPurdy and Graham (2004b); ^bZahn et al. (2002); ^cSpizziri et al. (2010); ^dPurdy et al. (2010); ^eTomás et al. (2013). * IA 37 horas después de la inducción a la ovulación con hCG; **IA 30 horas después de la inducción a la ovulación con hCG. Adaptado de Mocé et al. (2010).

Fuente: Boscarato y Martins (2014).

En un estudio desarrollado por Rajoriyal et al. (2014) en el que se utilizaron un total de 40 eyaculados de 4 búfalos, se obtuvieron resultados para motilidad progresiva con 2 mg de CLC de 77.63 por ciento y con control del 76.13 por ciento en la etapa de refrigeración, mientras que en la etapa de descongelación, se hallaron valores de 66.38 por ciento con 2 mg de CLC, y control del 51.93 por ciento. También se analizó la vitalidad en refrigerado, se obtuvo con control el 80.65 por ciento y con 2 mg de CLC el 81.95 por ciento y en semen descongelado de 74.2 y 72.10 por ciento utilizando 2 mg de CLC y el control del 62.8 por ciento.

2.3. CICLODEXTRINAS

Las ciclodextrinas son compuestos formados por moléculas de azúcar unidas en forma de anillo (oligosacáridos cíclicos). Las ciclodextrinas se producen a partir de almidón por

medio de conversión enzimática. Pueden ser llamadas también cicloamilosas. Se utilizan en alimentos, productos farmacéuticos, sistemas de administración de fármacos y las industrias químicas, así como la agricultura y la ingeniería ambiental.

Usualmente las ciclodextrinas contienen un número de monómeros de glucosa que van de seis a ocho unidades en un anillo, creando una forma de cono. Presentan un exterior hidrofílico que les permite ser solubles en agua y una cavidad interior hidrofóbica que les aporta la capacidad de encapsular compuestos hidrófobos, tales como el colesterol y moléculas orgánicas no polares (figura 3).

Según las unidades de glucosa que forman la ciclodextrina esta se nombra con una letra griega diferente: α -Ciclodextrina de seis moléculas de glucosa, β -Ciclodextrina de siete moléculas de glucosa, γ -Ciclodextrina de ocho moléculas de glucosa y δ -Ciclodextrina de nueve moléculas de glucosa. Obtenida de la degradación enzimática del almidón, el más utilizado como materia prima es el del maíz.

La cavidad interior de las ciclodextrinas es hidrófoba, lo que hace posible que estos compuestos sean capaces de albergar moléculas hidrófobas más pequeñas para formar complejos “anfitrión-huésped“, en los que la molécula huésped queda encapsulada por la ciclodextrina. De esta forma, las ciclodextrinas forman compuestos cristalinos a partir de moléculas orgánicas huésped en estado sólido, líquido e incluso gaseoso. En consecuencia, moléculas insolubles en agua pueden llegar a ser completamente solubles mediante la adición con disoluciones acuosas de ciclodextrina, sin que se produzca modificación química alguna en la molécula huésped, ya que no se origina ningún enlace covalente durante la interacción entre la ciclodextrina y la molécula insoluble en agua (Saenger et al., 1980).

2.4. CRIOPRESERVACIÓN DEL ESPERMATOZOIDE

La crioconservación es una técnica mediante la cual el material genético puede ser mantenido viable por tiempo indefinido. Esta tecnología constituye una herramienta para el establecimiento de bancos de germoplasma, los cuales ayudan a mantener la biodiversidad y asegurar la conservación física de una especie (Cloud et al., 1990; Medina-Robles et al., 2007).

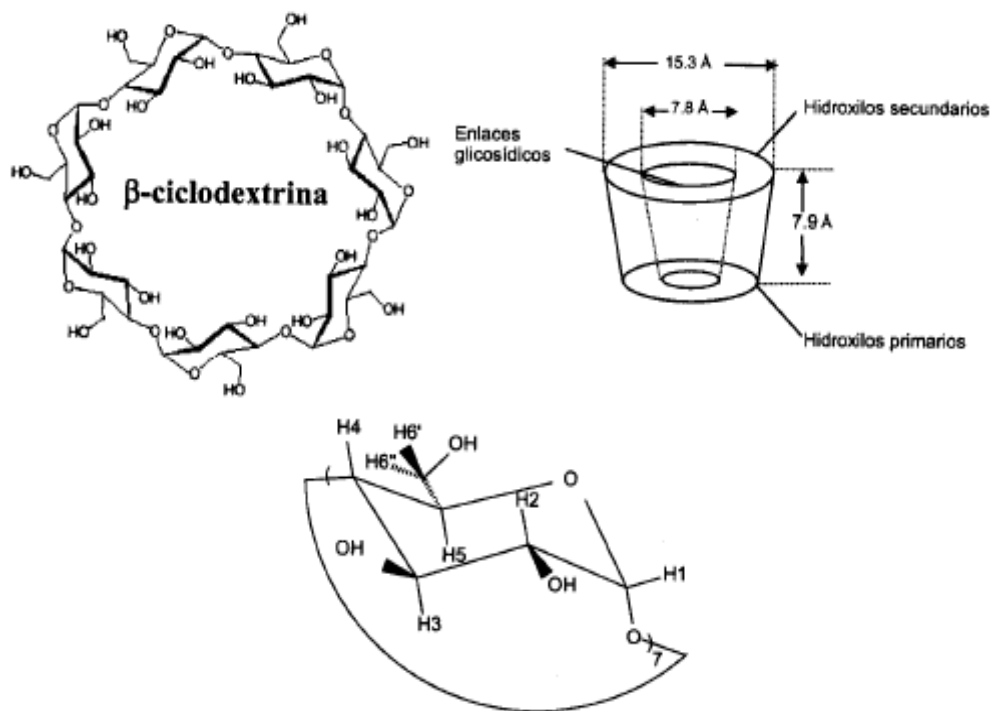


Figura 3. Estructura química y dimensiones aproximadas de β -ciclodextrina.

Fuente: Takahashi, 2013.

La criopreservación tiene como objetivo principal la preservación de la viabilidad y funcionalidad celular por un período prolongado de tiempo. Para lo cual, es necesario mantener el semen a temperaturas inferiores a -130°C , y con esto detener completamente los procesos metabólicos (Medeiros et al., 2002).

Para que el proceso de criopreservación de espermatozoides tenga el éxito deseado, depende del mantenimiento del potencial fertilizante de los espermatozoides, a través de la integridad y funcionalidad de las diferentes estructuras celulares (Hummersted et al., 1990). Los espermatozoides capaces de fecundar el ovocito, deben mantener al menos cuatro características básicas post descongelación, entre ellos el metabolismo para producir energía, la motilidad progresiva, las enzimas acrosómicas importantes para la penetración de los espermatozoides a través de las estructuras que rodean al ovocito (Salomon y Maxwell, 1995), y las proteínas de la membrana plasmática importantes para la supervivencia de los espermatozoides en el tracto reproductor femenino y para su conexión a la membrana del ovocito durante la fecundación (Andrabi, 2009; Trimeche et al., 1999).

La supervivencia a la congelación se da por la interacción de diversos factores entre sí (Boiso, 2001). El proceso de criopreservación incluye cinco etapas: dilución, refrigeración, adición del crioprotector, congelación y descongelación (Watson, 1995). Cada etapa del protocolo ejerce una interacción especial con la estructura, la función de la membrana y con el metabolismo celular (Hummersted et al., 1990); pudiendo el espermatozoide perder su capacidad de funcionar normalmente en cualquiera de estas etapas (Watson, 2000; Avila-Portillo et al., 2006).

Al pensar en criopreservar semen se debe tener claro que el objetivo es mantener los siguientes requerimientos y propiedades de un espermatozoide para poder fertilizar:

- Metabolismo para llevar a cabo la producción de energía para sus funciones.
- Proteínas necesarias para la sobrevivencia dentro del aparato reproductor femenino, y para la adhesión al ovocito en el momento de la fertilización.
- Enzimas acrosomales útiles para la penetración al ovocito.
- Capacidad de movimientos progresivos (Palacios, 1994).

Durante la congelación, varios cambios biofísicos se presentan dentro de la muestra de semen. A medida que la temperatura cae por debajo de la congelación; la muestra sufre un sobre enfriamiento, como la temperatura desciende más allá de sobre enfriamiento, cristales de hielo extracelular se empiezan a formar desde el agua dentro del medio circundante. Esta formación de hielo aumenta la concentración de solutos, tales como azúcares, sales y proteínas. En respuesta a cambio de presión osmótica de nuevo desarrollo y el hecho de que el agua dentro del espermatozoide es más lento para formar cristales de hielo que el agua en el medio que se encuentra, el agua pasa hacia fuera de los espermatozoides, en particular del espermatozoide se vuelve cada vez deshidratado (Watson, 2000).

2.4.1. Alteraciones morfológicas y funcionales de los espermatozoides causados por la criopreservación.

La criopreservación disminuye la viabilidad del espermatozoide 50 a 60 por ciento, y causa varias alteraciones bioquímicas y estructurales que implican distintos compartimentos de la célula espermática, entre ellos la membrana plasmática (Chaveiro et al., 2006). Según González (2004), aproximadamente el 85 por ciento de los espermatozoides bovinos

presentes en una muestra seminal sufre algún tipo de daño durante la congelación o en el procedimiento de descongelado.

En términos generales, los daños que sufre el espermatozoide durante los procesos de criopreservación son principalmente físico-químicos; debido al estrés osmótico que sufre la célula al deshidratarse, la distorsión de la membrana y a la formación de cristales de hielo (Palacios, 1994).

La reducción de la capacidad fecundante se debe básicamente a dos razones: una baja viabilidad posdescongelamiento y un trastorno subletal en una proporción de espermatozoides sobrevivientes. La baja viabilidad se debe a factores como: cambio de temperatura, estrés osmótico, la formación de hielo intracelular y la toxicidad. El cambio de temperatura produce un estrés en la membrana, posiblemente debido a un cambio de fase en los lípidos (Watson, 2000).

Los principales daños celulares causados por la congelación incluyen alteraciones morfológicas como ruptura de la membrana plasmática (principal estructura afectada durante la congelación), degeneración acrosomal y lesiones en las mitocondrias. El daño principal a la membrana se produce a temperaturas de -15°C a -60°C y no durante el almacenamiento de la células en nitrógeno líquido a -195°C (Parks y Graham, 1992). Diferentes daños, de tipo térmico, mecánico, químico y osmótico; incluyendo la adición del crioprotector antes de la congelación, las alteraciones del volumen de la célula, las contracciones y expansiones de la membrana en respuesta a las soluciones hiperosmóticas crioprotectoras, la fase de transición de los fosfolípidos de membrana, la formación extracelular de hielo que resulta en el incremento de los solutos y de ahí una osmolaridad incrementada, llevándolo a la pérdida de agua celular (deshidratación) y la formación intracelular de hielo que llevan a la destrucción del citoesqueleto (Parks y Graham, 1992; Tyler et al., 1996).

Cuando se realiza un enfriamiento lento se induce estrés sobre la membrana del espermatozoide. Este hecho se relaciona con un cambio en la fase lipídica y alteraría el estado funcional de la membrana (Stornelli et al., 2005) porque distintos lípidos que forman parte de la composición de la membrana espermática, van a tener diferentes temperaturas de fase de transición. Cambios de temperatura como enfriamiento rápido del

semen entre 30°C y 0°C induce un estrés a los espermatozoides, el cual es proporcional a la tasa de enfriamiento en este rango de temperaturas (Watson, 1995). Algunos lípidos pasan al estado gel y otros permanecen en estado líquido en un ambiente lipídico no fisiológico lo que origina un cambio en su funcionalidad que conlleva a una alteración de la integridad estructural o en el metabolismo iónico (Woelders, 1997).

La etapa de transición de lípidos fluidos a sólidos se da a una temperatura de 10°C a -16°C alterando las funciones de la membrana provocándole fragilidad durante la deshidratación celular, en el proceso de congelación puede haber pérdida de lípidos, lo cual afectaría la integridad de la membrana plasmática por pérdida de su capacidad de expansión durante la rehidratación al volver a condiciones isotónicas (Seidel, 2006).

Cuando se disminuye la temperatura desde 25° C a 10° C, se reduce en un 60 por ciento la actividad de las bombas dependientes de ATP3 y la difusión facilitada o co-transporte (transporte concomitante de dos moléculas a través de la membrana dependiente a una de ellas ATP3 y/o iones H+); en consecuencia, los procesos de difusión y ósmosis son los que predominan en los momentos de estrés osmótico (Mendoza et al., 2000).

Los lípidos de las membranas, tienen su cambio de estado de líquido a gel (forma rígida), siendo la temperatura de cambio de fase específica para cada una de las variedades de lípidos. De esta manera, conforme se va produciendo el descenso de temperatura se van a ir formando agregados lipídicos de la misma familia, que van a alterar la asociación de los lípidos con las proteínas de membrana. Además, se forman huecos (Amann, 1999) dando lugar a un desequilibrio iónico. Todo esto se provoca una serie de daños celulares durante todo el proceso de crioconservación que termina con una disminución de la fertilidad del semen congelado (Medeiros et al., 2002).

2.4.2. Deshidratación celular y shock térmico.

“Shock térmico” es el término que describe la respuesta de estrés con que responde el espermatozoide a una disminución de temperatura. El daño espermático que resulta de un choque térmico va a depender no solo de la baja de temperatura sino también de la velocidad con que esta ocurra (Amann, 1999). Se ha establecido que cada tipo celular posee una velocidad óptima de congelación que garantiza su supervivencia luego de la

criopreservación, si la velocidad de congelación es demasiado rápida o demasiado lenta el estrés producido por el proceso de criopreservación aumenta (Stornelli *et al*, 2005).

2.5. APLICACIÓN DE SISTEMAS COMPUTARIZADOS PARA LA EVALUACIÓN SEMINAL

Durante los últimos años se han desarrollado nuevos métodos de evaluación seminal, teniendo en cuenta la fisiología espermática con una mayor precisión. Dentro de estos métodos están los sistemas computarizados para la valoración seminal-C.A.S.A. Este análisis computarizado de la motilidad espermática se puede desarrollar en semen refrigerado y descongelado. Al igual que otros parámetros, la motilidad progresiva de un espermatozoide es una característica importante que debe ser evaluada, ya que está directamente correlacionada con la fertilidad (Mortimer, 1997).

Las técnicas tradicionales de evaluación de la motilidad espermática poseen ciertas limitaciones, a pesar de que son económicas, rápidas y prácticas son de carácter subjetivo que implica una gran variación en los laboratorios, y este oscila entre un 30 a un 60 por ciento. Esto puede ser debido a que estas evaluaciones están sujetas a diferentes interpretaciones que dependen en gran medida de la experiencia del operador, ocasionando un error humano involuntario, lo cual juega un papel definitivo en la selección de los reproductores (Rodríguez-Martínez, 2003).

En los últimos años a través del uso del Sistema Computarizado de Análisis Seminal (Computer Assisted Sperm Analysis, C.A.S.A), se ha logrado ser más objetivo en la evaluación seminal, facilitando la obtención de un mayor número de parámetros de evaluación y detecta los cambios súbitos en el movimiento espermático; así como la cinemática de los espermatozoides, lo cual no es posible evaluar ni medir con el método tradicional. A través del sistema C.A.S.A, es más fácil el registro cuantitativo de los datos, ya que estos se almacenan automáticamente dentro del sistema y permite la obtención de los datos desde el ordenador, permitiendo comparar los resultados con los valores estándar, lo que permite la clasificación y posterior elaboración de un pronóstico de fertilidad de los eyaculados o posteriores procesamientos de análisis estadístico para la comparación o determinación de los efectos de algunos tratamientos. Las desventajas del C.A.S.A están relacionadas principalmente con el costo del equipo, la necesidad extrema de validación y

la normalización de las medidas realizadas (Januskauskas et al., 1999; Verstegen et al., 2002; Rodríguez-Martínez, 2003).

El C.A.S.A (Androvision®) para la evaluación de la motilidad y concentración espermática, presenta un módulo que proporciona una evaluación automatizada y clasificada tanto de concentración espermática y de motilidad (Osorio, 2013).

El software identifica automáticamente y mide los parámetros de movimiento de los espermatozoides en campos microscópicos capturados con objetivo 10X y contraste de fase negativa implementando la cámara de recuento Leja®. De igual forma calcula automáticamente la concentración espermática y el porcentaje de espermatozoides clasificados en la muestra, según el tipo de motilidad: espermatozoides con motilidad progresiva y espermatozoides estáticos. Los resultados del análisis incluyen los parámetros de: Velocidad curvilínea (VCL), Velocidad media (VAP), Velocidad rectilínea (VSL), Índice de rectitud (STR), Índice de linealidad (LIN), Índice de oscilación (WOB), Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (ALH) y Frecuencia de batido de la cabeza (BCF). De acuerdo con los protocolos estándar del laboratorio, se requiere un análisis de 500 espermatozoides, lo que normalmente significa un análisis de dos a tres campos de captura. El tiempo de análisis es de un segundo por campo (Bernardi et al., 2011).

No todos los sistemas C.A.S.A son iguales, aunque los principios básicos utilizados para el análisis de las imágenes digitalizadas son similares a los existentes en el mercado, hay diferencias en sus sistemas ópticos, técnicas de captura de imagen y reconocimiento espermático, algoritmos utilizados para la reconstrucción de trayectorias y determinación de las medidas cinéticas, y también en el manejo y análisis de los datos, y consecuentemente, en los resultados finales. (Davis y Katz, 1993; Davis y Siemers, 1995; Irving, 1995; Krause, 1995; Mortimer, 2000; Verstegen y col., 2002).

El sistema C.A.S.A ofrece notables ventajas pero también posee algunos inconvenientes. Uno de los principales es que no existe una estandarización y optimización de los equipos y de los procedimientos empleados en los análisis. Los diferentes laboratorios trabajan con distintos equipos, y las características técnicas difieren de unos a otros, lo cual provoca que los resultados facilitados por los distintos centros para los mismos parámetros sean muy

dispares. Existen una serie de consideraciones prácticas y biológicas que afectan a los resultados obtenidos con el C.A.S.A. (Verstegen et al., 2002)

Verstegen et al. (2002) comprobaron, que los C.A.S.A tienden a sobreestimar la concentración de espermatozoides de la muestra, al realizar la evaluación utilizando muestras de semen de distintas especies animales. Dichos autores atribuyen el error a que, debido a las colisiones espermáticas, el mismo espermatozoide puede ser contabilizado varias veces. Cuanto mayor es la tasa de dilución del semen, los problemas de sobreestimación de la concentración tienden a disminuir puesto que la posibilidad de colisión disminuye.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LOCALIZACION

El presente trabajo de investigación se realizó en las instalaciones del laboratorio del Banco Nacional de Semen de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), ubicado en el distrito de la Molina, Lima-Perú. El clima presenta temperaturas mínimas mensuales promedio de 16.2 °C y máximas de 22.5 °C, una humedad relativa promedio anual de 81 por ciento y una precipitación total anual de 10 mm.

3.1.1. Período Experimental

La investigación se desarrolló entre los meses de octubre de 2016 hasta septiembre del 2017, que corresponde al periodo de elaboración del proyecto hasta la redacción final de la tesis y la fase experimental propiamente dicha se efectuó de enero a julio del 2017.

3.2. SELECCIÓN DE LOS ANIMALES

Se trabajó con cuatro toros jóvenes de raza Holstein Friesian que se encontraron en servicio en el Banco Nacional de Semen, con fertilidad comprobada, los cuales estaban sujetos a un régimen de colecciones de una vez por semana. Estos fueron: Camay Gabor Spirit “NERÓN”, registro genealógico 15347, de cuatro años de edad; Camay Davis Gabor “ROMANO”, registro genealógico 15372, de tres años de edad; Labrador Lazarith Maddox “ARON”, registro genealógico 15384, de cuatro años de edad; y Camay Geneva River “GRIEKO”, registro genealógico 15405, de cuatro años de edad. Se efectuaron un total de 28 colecciones de semen (7 por toro).

Los toros estaban alojados en corrales independientes, con piso de concreto y tierra, cercos de madera, provisto de sombras, comedero y bebedero, y con adecuada iluminación y ventilación. Todos los animales tuvieron un régimen de paseo, una vez por semana por un tiempo de 60 minutos. La alimentación fue en base de maíz chala (*Zea mays*) fresco y picado, suplementado con concentrado (14 por ciento de proteína, 17.5 por ciento de fibra

y 68.5 por ciento de NDT). El forraje se ofreció dos veces al día y el concentrado por las mañanas.



Figura 4. Toros Holstein Friesian utilizados en la investigación.

3.3. MATERIALES

Los materiales utilizados en la colección, procesamiento, empajillado y congelación de semen fueron los siguientes:

- Vagina artificial de vacuno, modelo IMV.
- Tubos de colección graduados de 0,5 ml. a 12 ml.
- Fundas de látex recta y cónica, funda protectora.
- Pajillas de 0,5 ml. modelo IMV®.
- Peines de aspiración modelo IMV®.
- Clips de distribución de pajillas modelo IMV®.
- Barqueta modelo IMV®.
- Soporte de baqueta modelo IMV®.
- Hervidor de agua.
- Refrigeradora.
- Tanque criogénico de almacenamiento de pajillas modelo IMV®.
- Platina eléctrica con temperatura graduable.
- Centrifuga.

- Pipeta de 100 y 200 μl graduable a 10 μl .
- Estufa de esterilización.
- Baño María.
- Cronometro digital.
- Contometro mecánico.
- Bomba de vacio.
- Microscopio de contraste de fases con platina temperada.
- Sistema Computarizado de Análisis Seminal (CASA).
- Cámara de recuento y motilidad Leja®.

3.4. METODOLOGIA

3.4.1. Colección de semen.

Los toros se colectaron una vez por semana, utilizando otro toro como estímulo, fijado en una guillotina, bajo sombra, y con piso adecuado para evitar deslizamientos. Para obtener eyaculados de buena calidad, se dio al toro un paseo previo a la colección; y con falsas montas, esto permite una mayor excitación y facilita la manipulación.

Se utilizó una vagina artificial (modelo IMV-francesa), la misma que brinda las condiciones homogéneas de presión y temperatura durante la colección. La temperatura interior de la vagina es regulada a 40 °C. Los tubos de colección estuvieron debidamente rotulados y protegidos del medio ambiente con papel aluminio y funda.

3.4.2. Evaluación de semen.

3.4.2.1. Evaluación macroscópica.

Una vez colectado el semen, se trasladó inmediatamente al laboratorio (temperatura ambiental de 22°C), con la finalidad de realizar las evaluaciones macroscópicas que a continuación se detallan:



Figura 5. Colección de semen a toro de la raza Holstein Friesian con vagina artificial modelo IMV®.

a. Volumen.

Se determinó mediante observación directa, comparando con la escala graduada del tubo colector y fue expresado en ml. No se consideró las burbujas de aire sobre la superficie del semen.

b. Color.

Se determinó mediante observación directa de las muestras; se consideró una coloración blanco lechoso-cremoso, indicador de buena calidad; El color rojizo indica presencia de sangre, así como los colores grises o marrones indican contaminación o infección, debiéndose en estos casos desechar el eyaculado y proceder a la revisión del macho.

c. pH.

Se empleó un papel indicador de pH (PANPEHA Sigma Aldrich), el cual muestra cambio de coloración a diferentes niveles de pH y cuyo valor varía entre 0 a 14, para que el semen sea considerado óptimo debe tener un pH de siete, es decir neutro.

3.4.2.2. Evaluación microscópica.

La evaluación de las características microscópicas del semen se realizó en diferentes etapas:

- En semen fresco: inmediatamente obtenido se evaluó la motilidad, concentración, morfología, vitalidad y funcionalidad de membrana espermática.
- En semen refrigerado: se evaluó la motilidad, morfología, integridad de membrana y vitalidad espermática a 5°C.
- En semen descongelado: se evaluó la motilidad, morfología, vitalidad e integridad de membrana espermática. El descongelado de las pajillas se realizó a 37°C durante 15 segundos.

a. Motilidad espermática.

Para el análisis de la motilidad se utilizó el sistema C.A.S.A. Para esta evaluación se colocaron tres µl de la muestra de semen sobre una cámara de recuento marca Leja® previamente temperada a 37°C, y se observó con un objetivo de 10X en un microscopio de contraste de fases y se analizó en el módulo de motilidad (Androvisión v.1.2), con una configuración de 25 fotos por segundo, en donde se tomaron 10 fotogramas.

Para una mejor precisión en motilidad espermática este sistema utilizó cámaras desechables de análisis de conteo y motilidad de marca Leja®.

b. Concentración espermática.

Para el análisis de la concentración se utilizó igualmente el sistema C.A.S.A. Se colocó tres µl de la muestra de semen sobre una cámara desechable de análisis de conteo y motilidad (Leja®), y fue observado con un objetivo de 10X de un microscopio de contraste de fases y posterior a esto fue analizado en el módulo de concentración (Androvisión ® v.1.2), en donde se tomaron 10 fotogramas.

c. Evaluación de vitalidad espermática.

La metodología de coloración es la siguiente:

1. Los colorantes deben mantenerse para su uso en las evaluaciones a 30°C (baño maría) para evitar el shock térmico.



Figura 6. Utilización de la cámara desechable de análisis de conteo y motilidad (Leja®) para evaluación de las muestras con el sistema CASA.

2. Luego una gota de semen se colocó sobre un portaobjetos temperado a 37°C. Se agregó una gota del colorante eosina G, se homogenizó la mezcla con un tip y luego se agregó una gota de nigrosina y se mezcló. Pasado un minuto se realizó el frotis.
3. Una vez secado la muestra se observó con un objetivo de 40x. Se tomó cinco campos diferentes para contar 200 células espermáticas con la ayuda de dos contómetros. Los espermatozoides vivos en el momento de la coloración no se tiñeron. Los muertos se observaron de un color rosado. La frecuencia de vivos y muertos se expresó en porcentaje.

d. Evaluación de morfología espermática.

Se realizó con ayuda del microscopio de contraste de fases a un aumento de 40X. previa tinción con eosina-nigrosina. Para la determinación del porcentaje de células anormales se hicieron conteos de 100 células espermáticas de los respectivos tratamientos.

e. Evaluación de la funcionalidad de la membrana espermática (HOST).

Se determinó mediante el test de Endosmosis (hypoosmotic swelling test, HOST) en solución hipoosmótica de citrato de sodio (100 mOsm/L). A continuación se detalla la composición de la solución hipoosmótica y el medio de lavado utilizado en el test de endosmosis.

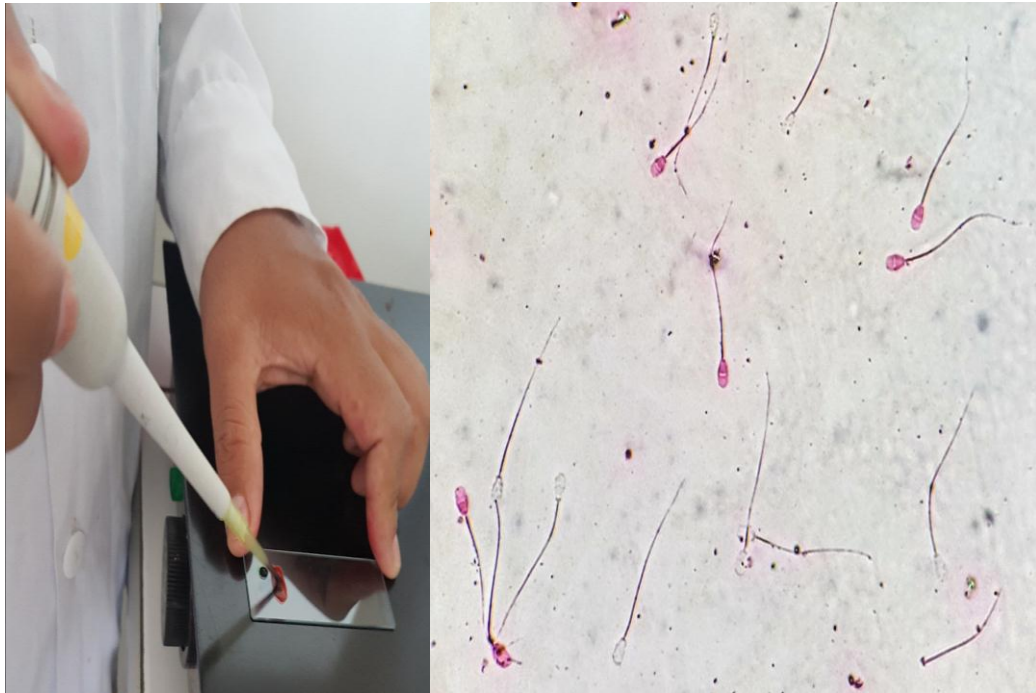


Figura 7. Prueba de vitalidad espermática con eosina y negrosina, únicamente los espermatozoides muertos se tiñen de color rojo.

Tabla 3. Composición química de la de la solución hipoosmótica 100 mOsm/l.

Agente	Unidad	Cantidad
Citrato de sodio dihidratado	gr.	0.08
Fructuosa	gr.	0.025
Agua destilada	ml.	10
Osmolaridad	mOsm/l.	100

FUENTE: Correa et al., 1996.

Tabla 4. Composición química del medio de lavado.

Agente	Unidad	Cantidad
Solución A		
Citrato de sodio dihidratado	g.	0.29
Agua destilada	ml.	10
Total	ml.	10
Solución B		
De la solución A	ml.	9.8
FSB(suero fetal bovino)	ml.	0.2
Total	ml.	10

FUENTE: Correa et al., 1996.

Para evaluar la prueba hipoosmótica HOST se siguió el protocolo, según Correa et al., (1994).

1. Descongelado de la pajilla de semen.
2. El semen refrigerado/descongelado se diluyo en una proporción 1:1 (v/v) usando la solución de lavado (citrato de sodio al 2,9 por ciento con 2 por ciento de suero bovino).
3. Se centrifugo por cinco minutos a 500 rpm, para separar el semen del dilutor, eliminando el sobrenadante con la ayuda de una pipeta (lavado del espermatozoide).
4. Al semen puro obtenido, se le regreso a su volumen original agregándole la solución de lavado.
5. A esta nueva mezcla se le agrego la solución hipoosmótica a 100 mOsm/l., en una proporción de 1:10 (1 semen/10 soluc. HOST)
6. Enseguida se incubó en baño maría a 34°C por 60 minutos. Pasado el tiempo de incubación, se procede a mezclar una gota de la muestra seminal incubada con una gota de glutaraldehido al 2 por ciento para detener la reacción.
7. Finalmente se contó en un microscopio de contraste de fase a 40x, los espermatozoides con reacción positiva, registrándose un total de 200 espermatozoides en un mínimo de 10 campos diferentes.

Se consideró endósmosis positiva (+) a los espermatozoides que reaccionaron a la prueba de HOST con un hinchamiento y enrollamiento del flagelo, indicativo que la membrana plasmática se encuentra íntegra y con los mecanismos de intercambio de fluidos funcionando correctamente. Mientras que se consideró como endósmosis negativa (-) a los espermatozoides con la membrana física o funcionalmente dañada que no experimentaron cambios en la forma del flagelo (Correa et al., 1994).

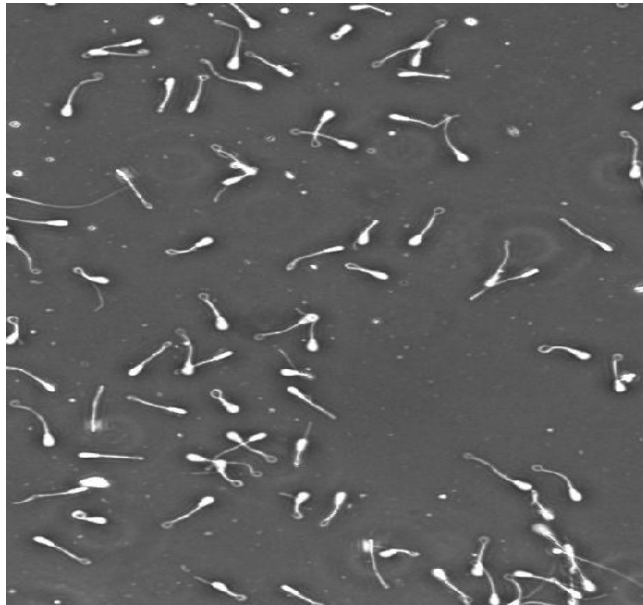


Figura 8. Reacción al HOST con el T1 (1,5 mg de CLC) en semen refrigerado.

Se determinó el valor de integridad de membrana para cada uno de estos conteos. Los valores hallados se promediaron para encontrar el valor de integridad de membrana de una determinada muestra. Los resultados se expresaron en porcentaje de reacción total de espermatozoides con membrana funcional (+).

$$\text{Int. Memb.} = \frac{A}{A+B} \times 100$$

Donde:

Int. Memb.= Integridad de membrana (por ciento).

A = Número de espermatozoides con endósmosis positiva.

B = Número de espermatozoides con endósmosis negativa.

A + B = N° total de espermatozoides contabilizados (200 espermatozoides).

3.4.3. Preparación de la ciclodextrina cargadas con Colesterol (CLC).

La solución de CLC fue preparada según lo descrito por Purdy y Graham (2004). En un tubo de ensayo se disolvió 200 mg de colesterol en 1 ml de cloroformo. En otro tubo de ensayo se diluyó 1 g de metil- β -ciclodextrina en 2 ml de metanol. Se adicionó una alícuota de 450 μ l de la solución de colesterol a la solución de ciclodextrina y se mezcló hasta que la solución estuviera homogénea. En una caja de Petri, se removió el solvente usando una corriente de nitrógeno gaseoso. Los cristales resultantes se dejaron secar por 24 h y luego se pasaron a un recipiente de vidrio y permanecieron almacenados a 22°C hasta su uso (figura 10).

La solución de trabajo CLC se preparó agregando 50mg de CLC a 1ml de medio TALP (tris, ácido cítrico y glucosa). Para la preparación del medio TALP se utilizó 3,027 g. de Tris (375 mM), 1,594 g. de ácido cítrico (124 mM, 1,243 g. de glucosa (41 mM) y 100 ml. de Agua ultrapura.

Todos los ingredientes de los medios fueron diluidos en agua ultrapura, agitados continuamente y preparados en el laboratorio a temperatura ambiente. La osmolaridad final del medio fue de 300 mOsm y el pH final de 7. La osmolaridad fue medida con un osmómetro crioscópico y el pH con un pHmetro. Una vez preparados los medios se introdujeron en tubos de plástico y se congelaron hasta el momento de su uso.

3.4.4. Adición de la ciclodextrina cargada con colesterol (CLC)

En esta etapa la muestra de semen pre diluido 1:1 se dividió en tres alícuotas (T1: 0 mg. CLC, T2: 1,5 mg de CLC y T3: 2 mg de CLC). Se agregó a cada alícuota la fracción requerida, tomando en cuenta la concentración que será de 0 mg de CLC/120 millones de espermatozoides/ml, 1,5 mg de CLC/120 millones de espermatozoides/ml o 2 mg de CLC/120 millones de espermatozoides/ml, según sea el caso. Se incubó por 15 minutos en baño maría a 37°C.

Se agregó el total de diluyente, y se estabilizó las muestras durante 10 minutos en temperatura ambiente; pasado este tiempo se procedió a empajillar y se inició con el descenso de temperatura, para lo cual se llevó al refrigerador, acompañado de un

termómetro de fácil lectura. El semen deberá descender desde 36 °C. a 5 °C. en tres horas aproximadamente.



Figura 9. Remoción de los cristales de CLC utilizados en la solución de trabajo (CLC+MEDIO TALP).

3.4.5. Dilutor, preparación y dilución del semen

a. Dilutor Andromed® (Minitub Germany)

Diluyente comercial para semen, que no contiene componentes de origen animal (tales como yema de huevo). Es un medio altamente transparente que entrega imágenes de semen muy claras bajo el microscopio (Minitube, 2003) (Mendoza, et al., 2000) (Woelders, 1997). AndroMed® contiene fosfolípidos, TRIS, ácido cítrico, azúcares, antioxidantes, tampones, glicerina, agua de alta pureza y antibióticos (Tilosina 5 mg, Gentamicina 25 mg, Espectinomycinina 30 mg, Lincomicina 15,0 mg, todo en 100 ml) (Minitube, 2003) (Ansari, et al., 2011).

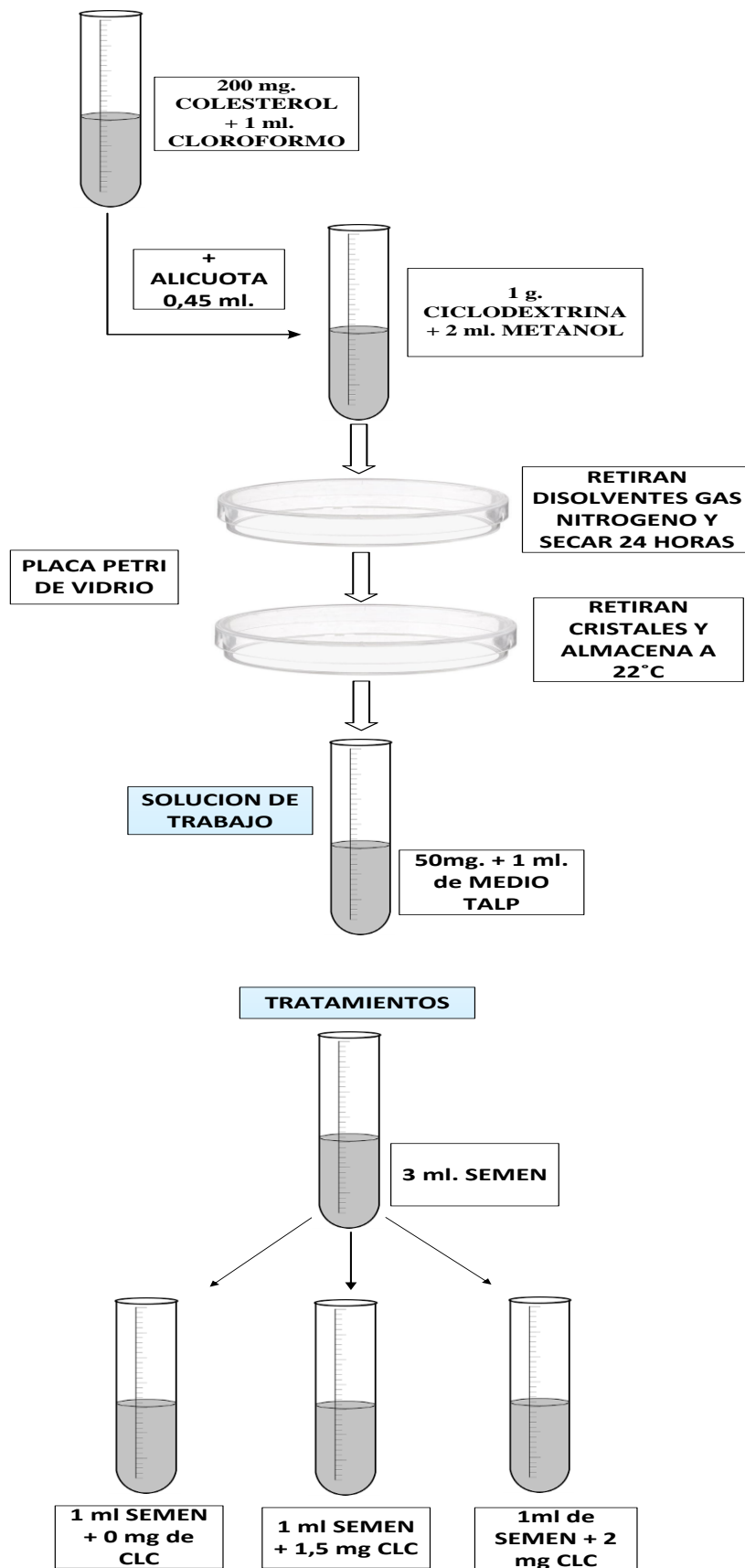


Figura 10. Esquema de metodología a utilizar con CLC.



Figura 11. Adición de CLC a los diferentes tratamientos y fase de incubación a 37° C.



Figura 12. Dilución final previa al empajillado. Las pajillas están clasificadas por color e impresas con información del toro, lote y fecha de colección.

b. Preparación del Dilutor

Previo a la dilución (diez minutos antes) se colocó en baño María a una temperatura de 32.5°C una parte del Dilutor concentrado, y cuatro partes de agua bidestilada, se mezcló y se homogenizó obteniendo el dilutor para ser utilizado en la pre dilución y dilución final de cada eyaculado el cual se realizó en un tubo de ensayo debidamente rotulado con el nombre del toro. Se mezcló 200 ml de AndroMed® con 800 ml de agua bidestilada.

c. Dilución del Semen

Se tomó una alícuota de semen puro (20µl) para la evaluación de motilidad e inmediatamente se procedió a realizar una predilución (1/1) agregando el dilutor en la misma proporción del semen. El dilutor como el semen se colocó en baño maría a 32.5°C para que en el momento de la dilución final tuviera la temperatura semejante a la del testículo. Obteniéndose los resultados de la evaluación del semen puro, se determinó el número de pajillas a obtener en función a la concentración espermática del eyaculado.

Fórmula para calcular dosis de pajillas:

$$\text{N}^\circ \text{Dosis} = \frac{(\text{volumen (cc)} \times \text{Concent esperm(millones/cc)} \times \% \text{motilidad} \times \% \text{esperm. vivos})}{(\text{N}^\circ \text{ de espermatozoides/dosis})}$$

Donde:

- Volumen: volumen del semen colectado/cc.
- Concentración espermática: Concentración espermática en millones/cc.
- % Motilidad: motilidad expresada en porcentajes.
- % Vivos: Numero de espermatozoides vivos, en porcentaje.
- N° de espermatozoides por dosis: 30 millones, para el dilutor Andromed.

Después de la incubación con CLC, la muestra de semen, será diluida hasta obtener una concentración final de 30×10^6 el número de espermatozoides por dosis de semen.

El cálculo de la dilución se determinó por la siguiente fórmula:

$$V_f = \frac{V_i * C_i}{(130 * 10^6)} \quad ; \quad V_t = V_f - V_i$$

Dónde:

V_f : Volumen final de la muestra (en ml).

V_i : Volumen inicial de la muestra (en ml).

C_i : Concentración inicial de la muestra (por 10^6 espermatozoides/ml).

V_t : Volumen total de dilutor a agregar (en ml) a la muestra.

El dilutor se añadió en un solo paso, previamente calentado en baño maría a una temperatura de 37°C , para evitar el choque térmico de los espermatozoides; y será vertido lentamente por las paredes del tubo colector, y homogenizándose suavemente.

Previamente se hizo la identificación de las pajillas (0,5 cc) codificadas con el nombre y registro del toro, cantidad de CLC y fecha de colección. Se utilizaron peines especiales para descargar una pequeña porción del semen diluido y se selló el extremo abierto de las pajillas con alcohol polivinílico.

3.4.6. Descenso de temperatura y tiempo de estabilización

El descenso de la temperatura se realizó colocando las pajillas en cubetas con agua a temperatura ambiente, y luego se llevó el semen a refrigeración, descendiendo la temperatura de 32.5°C (temperatura baño María), luego a 22°C (temperatura ambiental del laboratorio) y finalmente a 5°C en refrigeración en un periodo de 18 a 22 horas para su estabilización y posterior congelación.



Figura 13. Etapa de refrigeración (estabilización) de los diferentes tratamientos a 5°C .

3.4.7. Criopreservación seminal

La congelación del semen se realizó siguiendo el método que usa el Banco Nacional de Semen, utilizando nitrógeno líquido y descendiendo la temperatura de 5°C a -196°C a razón de 20°C por minuto, durante siete minutos, para luego ser sumergido en nitrógeno líquido y almacenado en tanques criogénicos hasta el momento de su evaluación.

3.4.8. Descongelado del semen

La descongelación se realizó después de siete días de congelada la muestra, utilizando para esto una pinza de plástico, se procedió a sacar las pajillas del tanque de nitrógeno, rápida y cuidadosamente sumergiendo las pajillas en el termo que contiene agua a 37°C, durante 30 segundos, para luego secarlas y hacer la respectiva evaluación.

3.4.9. Evaluación del semen post descongelamiento

De las muestras descongeladas, se evaluó la motilidad, morfología, vitalidad y funcionalidad de la membrana espermática.

3.5. TRATAMIENTOS

La muestra de semen puro obtenida fue dividida en 3 tratamientos:

- El tratamiento 1 consistió en colocar en una alícuota de semen una concentración de 0 mg de CLC/120 millones de espermatozoides/ml.
- El tratamiento 2 consistió en colocar en una alícuota de semen una concentración de 1,5 mg de CLC/120 millones de espermatozoides/ml.
- El tratamiento 3 consistió en colocar en una alícuota de semen una concentración de 2 mg de CLC/120 millones de espermatozoides/ml.

3.6. ANALISIS ESTADISTICO

Para la determinación del efecto de las CLC se realizó un análisis de Diseño en Bloques Completamente al Azar con submuestreos. Para la comparación múltiple de medias se aplicó la prueba de Tukey.

3.5.1. Modelo aditivo lineal

$$Y_{ijk} = m + t_i + b_j + e_{ij} + d_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = Es la motilidad de la j-ésima repetición al aplicarse el i-ésimo tratamiento de CLC

m = Media general

t_i = Efecto del i-ésimo tratamiento de CLC

b_j = Efecto del j-ésimo genotipo

e_{ij} = Error experimental

d_{ijk} = Error del muestreo

Además, fue necesario la transformación arcoseno de los porcentajes de motilidad e integridad de membrana, antes de realizar las diferentes pruebas estadísticas.

$$\% \text{Transformado} = \text{Arcoseno} \sqrt{(Y_{ijk}/100)}$$

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. MOTILIDAD TOTAL Y PROGRESIVA, VITALIDAD, INTEGRIDAD DE MEMBRANA, MORFOLOGIA Y ESPERMIOS INMOVILES SEMEN REFRIGERADO

Tabla 5. Efecto de la adición de CLC sobre las características microscópicas de semen refrigerado:

TRATAMIENTO	T 1 0 mg CLC	T2 1,5 mg CLC	T3 2 mg CLC
Motilidad total %	92.65 ± 0.84 a	94.27 ± 0.94 a	93.67 ± 0.99 a
Motilidad progresiva %	89.74 ± 0.91 a	91.16 ± 1.05 a	90.04 ± 1.07 a
Vitalidad %	89.01 ± 0.65 a	90.85 ± 0.67 a	90.15 ± 0.68 a
Host %	84.78 ± 0.67 a	88.14 ± 0.68 a	86.99 ± 0.74 a
Morfología%	5.04 ± 0.17 a	4.57 ± 0.17 a	4.86 ± 0.18 a
Espermios inmóviles %	7.35 ± 0.84 a	5.73 ± 0.94 a	6.33 ± 0.99 a

Media ± Error estándar

Nota: letras desiguales indican diferencias estadísticas significativas (p<0.05)

La evaluación microscópica de las muestras obtenidas en fase de refrigeración (tabla 5) determinan una baja significancia entre los tratamientos en las diferentes variables estudiadas (p<0.05). Estos resultados se pueden relacionar principalmente, a que la adición de ciclodextrina cargadas de colesterol tienen un efecto post-descongelación del semen, con aumento de la criosupervivencia del espermatozoides tratado, basándonos en lo descrito por Moce y Graham (2014).

Según el análisis de varianza, no existe diferencia significativa en la motilidad total entre los tratamientos T1, T2 y T3. Con el T1 fue del 92.65 por ciento, con T2 de 94.27 por ciento y con el T3 de 93.67 por ciento. Estos valores no concuerdan con Gallardo y Vargas (2015), que obtuvieron resultados de 82 por ciento y 67 por ciento, utilizando dilutores andromed y triladyl respectivamente. Bach (2009), registra una motilidad total pre-congelación con valores del control de 67.9 por ciento y con 2 mg de CLC de 67.9 por ciento. Los valores de motilidad son superiores a los obtenidos en semen fresco, y esto se podría deberse a que el esperma tiene un mayor tiempo de estabilización (18 horas) durante la fase de refrigeración.

Se analizó la motilidad progresiva en semen refrigerado y se determinó que no existe diferencia significativa entre los tratamientos T1, T2 y T3. Se hallaron valores con el T1 de 89.74 por ciento, con T2 de 91.16 por ciento y con T3 de 90.04 por ciento. Estos resultados difieren con lo descrito por Rajoriyal et al. (2014), quienes en búfalos encontraron una motilidad progresiva utilizando 2 mg de CLC de 77.63 por ciento y con control del 76.13 por ciento. Madrid-Bury et al. (2005), en cinco toros de doble propósito en condiciones de trópico obtuvo valores de 76.7- 85.5 por ciento. Gallardo y Vargas (2015), utilizando el sistema C.A.S.A obtuvieron el 73 por ciento y 41 por ciento con dilutores andromed y triladyl respectivamente, en toros cruce sahiwal.

En los resultados obtenidos de la prueba de vitalidad espermática no existe diferencia significativa entre los tratamientos T1, T2 y T3. La viabilidad presente en fase de refrigeración fue para el T1 del 89.01 por ciento, T2 del 90.85 por ciento y en el T3 del 90.15 por ciento. Datos similares encontró Ramonez (2013), con un porcentaje de espermatozoides vivos en semen refrigerado del 84,67 por ciento. Rajoriyal et al. (2014), encontraron en el tratamiento control 80.65 por ciento y con 2 mg de CLC el 81.95 por ciento. Espinosa (2012), determino un 78,6 por ciento de vitalidad antes de la congelación. En el análisis de varianza, no existe diferencia significativa en la prueba de endosmosis entre los tratamientos T1 con 84.78 por ciento, con T2 de 88.14 por ciento y con T3 del 86.99 por ciento. Los valores de integridad de membrana citoplasmática fueron homogéneos, similar a 70.2-73.5 por ciento obtenidos de un estudio desarrollado por Madrid-Bury et al. (2005).

El porcentaje de anomalías encontradas en T1, T2 Y T3 fueron de 5.04 por ciento, 4.57 por ciento, y 4.86 por ciento respectivamente, no existiendo diferencias significativas entre tratamientos. Mejía (2017) y Ramonez (2013), determinaron un porcentaje de anomalías del 10,3 y 9,67 por ciento de anomalías en semen refrigerado. Es necesario tomar en cuenta que las anomalías en semen bovino, como las colas enrolladas o los plegamientos de la pieza intermedia, si son abundantes en el eyaculado, pueden comprometer la fertilidad del toro, ya que los espermatozoides defectuosos no poseen una motilidad normal y por tanto no van a poder alcanzar las proximidades del ovocito, basándonos en lo descrito por Nothling y Arndt (1995).

No existieron diferencias significativas entre tratamientos en la variable de espermios inmóviles. Se encontró en el T1 un promedio de 7.35 por ciento, en T2 de 5.73 por ciento y en el T3 de 6.33 por ciento. Estos datos no concuerdan con lo descrito por Gallardo y Vargas (2015), quienes evaluaron el semen en la etapa de pre-congelación utilizando varios dilutores, con andromed obtuvo el 17 por ciento, con bioxcell el 25 por ciento; y triladyl el 32 por ciento de esperma inmóvil.

4.2. MOTILIDAD TOTAL Y PROGRESIVA, VITALIDAD, INTEGRIDAD DE MEMBRANA, MORFOLOGIA Y ESPERMIOS INMOVILES SEMEN POST-DESCONGELACION

Tabla 6. Efecto de la adición de CLC sobre las características microscópicas de semen post-descongelación:

TRATAMIENTO	T1 0 mg CLC	T2 1,5 mg CLC	T3 2 mg CLC
Motilidad total %	67.73 ± 0.7 a	79.59 ± 0.77 b	74.73 ± 0.79 c
Motilidad progresiva %	54.73 ± 0.72 a	63.42 ± 0.83 b	55.83 ± 0.85 a
Vitalidad %	63.26 ± 0.68 a	75.84 ± 0.76 b	70.53 ± 0.87 c
Host %	46.89 ± 0.59 a	60.43 ± 0.6 b	55.06 ± 0.63 c
Morfología%	5.14 ± 0.16 a	4.54 ± 0.15 b	4.75 ± 0.15 b
Espermios inmóviles %	32.27 ± 0.7 a	20.41 ± 0.77 b	25.27 ± 0.79 c

Media ± Error estándar

Nota: letras desiguales indican diferencias estadísticas significativas (p<0.05)

En el análisis de resultados (tabla 6) se pudo determinar que existe diferencia significativa en la motilidad total entre los tratamientos T1, T2 y T3 en semen post-congelación. El tratamiento que tuvo mejores resultados fue el T2 con la adición de 1.5 mg de CLC con 79.59 por ciento de motilidad total, logrando una diferencia porcentual de 11.86 frente al tratamiento T1. Los valores de T1 fueron de 67.73 por ciento, y de T3 de 74.73 por ciento. Esto concuerda con datos obtenidos por Mocé et al. (2014), con una motilidad total de 78,4 por ciento utilizando 2 mg de CLC frente al control con 75,2 por ciento. Otros autores obtuvieron menores porcentajes con el tratamiento de 1,5 mg de CLC: 60 por ciento, 56 por ciento y 54 por ciento respectivamente de motilidad total post-descongelamiento, frente al 42 por ciento, 32 por ciento y 40 por ciento del tratamiento control (Purdy y Graham, 2004a; Moraes et al., 2010; Amorim et al., 2009). Mocé y Graham (2006), no encontraron diferencias significativas entre el control y el tratamiento con 2 mg de CLC obteniendo 58 por ciento de motilidad total.

Estos resultados nos hacen suponer que los tratamientos con CLC en el semen fresco redujeron el daño del espermatozoides producido por los cambios de temperatura durante la criopreservación, debido a una mayor estabilización de la membrana plasmática, producto del ingreso de colesterol a la misma, y que concuerda con algunos autores (Purdy y Graham, 2004a; Moore et al., 2005; Mocé et al. 2010).

La concentración más utilizada en los trabajos revisados se sitúa entre 1 y 2,5 mg por cada 120×10^6 espermatozoides/ml, correlacionándose negativamente con la fertilidad con concentraciones inferiores a 0,5 mg o superiores a 4 mg de CLC (Mocé; Purdy; Graham, 2010).

La evaluación de la motilidad progresiva post-descongelamiento determino que existe diferencia significativa entre el T1 y T2, y entre T2 y T3. Los valores porcentuales para el tratamiento T1, T2 Y T3 fueron de 54.73 por ciento, 63.42 por ciento y 55.83 por ciento respectivamente. Datos similares fueron hallados por Rajoriyal et al. (2014), quienes encontraron una motilidad progresiva de 66.38 por ciento con 2 mg de CLC, y control del 51.93 por ciento. Valores inferiores fueron hallados por Mocé et al. (2014), con una motilidad progresiva de 32 por ciento utilizando 2 mg de CLC, mientras q el control el 34 por ciento. Moce y Graham (2014), encontraron una motilidad progresiva post-congelado de 17 por ciento en el tratamiento control, mientras que con 2 mg y 4 mg de CLC obtuvo el

18 y 6 por ciento respectivamente. Moraes et al. (2010), utilizando 1,5 mg de CLC obtuvo un 16 por ciento de motilidad progresiva frente al 9 por ciento del control. Catena y Cabodevila (1999), manifiestan que el semen de buena calidad recientemente descongelado, generalmente tiene entre un 40 y 50 por ciento de espermatozoides con motilidad progresiva. Awad y Graham (2002), indican que el tratamiento con CLC se obtiene mejora en la recuperación de Espermatozoides viables después de la criopreservación, y mayores porcentajes de espermatozoides progresivamente móviles. De acuerdo a los resultados obtenidos, se deduce que mientras mayor sea la cantidad de CLC por tratamiento, la motilidad total y progresiva va disminuyendo, lo que se vuelve perjudicial, esto podría deberse a que, al saturarse la membrana de colesterol, se ve afectado su normal funcionamiento debido a la poca fluidez, tomando como sustento lo mencionado por Purdy y Graham (2004a).

La viabilidad espermática de las muestras post-descongelado determino que existe diferencia significativa entre los tratamientos T1 con el 63.26 por ciento, T2 con el 75.84 por ciento y T3 con el 70.53 por ciento. Demostrándonos un mayor porcentaje de vitalidad con el T1. Algunos autores mencionan una vitalidad de 74.2 y 72.10 por ciento utilizando 2 mg de CLC y el control del 62.8 por ciento y 58.25 por ciento (Mocé et al., 2014; Rajoriyal et al., 2014). Mocé y Graham (2014), encontraron una viabilidad espermática post-congelado de 38 por ciento en el tratamiento control, mientras que con 2 mg y 4 mg de CLC obtuvo el 61 por ciento y 48 por ciento respectivamente. Bach (2009), obtuvo una viabilidad post descongelado para el control de 48.4 por ciento y con 2 mg de CLC del 50.4 por ciento.

Esta disminución fue, sin embargo, menor a lo reportado por Thomas et al. (1998), quienes afirman que durante el proceso de criopreservación se produce una disminución del 50 por ciento de la viabilidad espermática, debido principalmente al efecto de la temperatura y la presión osmótica, que ocasionan cambios en la permeabilidad, composición lipídica de las membranas espermáticas y en el líquido intracelular. Esto nos hace suponer que los espermatozoides tratados con CLC tienen una mayor tolerancia a la criopreservación, ya que aumentan su ratio colesterol: fosfolípidos, producto del ingreso de colesterol a la membrana, volviéndose resistentes a los efectos de la transición de fase lipídica causado por el shock térmico.

La reacción a la prueba de endosmosis (HOST) realizada en la etapa post-descongelamiento nos indica una diferencia significativa entre los tratamientos T1, T2 y T3 con el 46.89 por ciento, 60.43 por ciento y 55.06 por ciento respectivamente. Valores superiores fueron encontrados por Purdy et al. (2005) con 1.5 mg de CLC del 76 por ciento y control del 60 por ciento. Algunos autores coinciden con los datos obtenidos en la investigación, determinaron una reacción a la prueba de HOST con 1.5 mg de CLC del 55 por ciento y 50 por ciento, y control del 46 por ciento y 30 por ciento respectivamente (Purdy y Graham, 2004a; Amorim et al., 2009). Mocé y Graham (2006), obtuvieron una integridad de membrana con 2 mg de CLC del 62 por ciento y 45 por ciento del control. Moncayo (2016), encontró resultados parecidos, con una reacción al HOST en toros Holstein del 68,67 por ciento y 61,83 por ciento utilizando dilutores triladyl y Andromed respectivamente. Las membranas integras permiten procesos de fertilización, como la capacitación espermática, penetración de los revestimientos del ovocito, unión con la zona pelúcida y fusión de la membrana (Rodríguez, Larsson, & Perstoft, 1997). Al respecto se menciona que las membranas celulares son las estructuras celulares que sufren mayor daño en los procesos de congelación, debido a la pérdida de fluidez de sus componentes lipídicos (Parks y Graham, 1992).

Purdy et al. (2005), demostraron una mayor fluidez de la membrana a temperaturas más bajas para el espermatozoide tratado con CLC que para el espermatozoide no tratado. Estos resultados nos permiten predecir que los espermatozoides tratados con CLC, conservan un alto grado de membrana integra en sus estructuras, disminuyendo el daño celular osmótico, lo que se verá reflejado en un mayor porcentaje de fertilidad, tomando como base lo descrito por Moore et al., 2005.

Se determinó que existe diferencia significativa en la morfología entre los tratamientos T1 y T2, y T1 y T3. El porcentaje de anormalidades presentes en etapa post-descongelado en los tratamientos T1, T2 y T3 fue de 5.14 por ciento, 4.54 por ciento y 4.75 por ciento. Moncayo (2016), encontró en espermatozoides de toros de raza Holstein utilizando los diluyentes Triladyl y Andromed un mayor número de alteraciones morfológicas luego de la congelación con un promedio de 7 y 10,33 por ciento respectivamente. Palacios (2015), observa la presencia de anormalidades del 11 por ciento. Ott (1986), indica que presencia de más del 20 por ciento de anormalidades primarias o más del 30 por ciento de anomalías totales, es suficiente para clasificar a un toro como cuestionable o insatisfactorio para la

reproducción. De los datos obtenidos nos hace suponer que la inclusión de CLC en los tratamientos no tuvo relación directa con el porcentaje de anomalías presentes en el esperma.

En cuanto a esperma inmóvil existe diferencia significativa entre los tratamientos T1, T2 y T3 con 32.27 por ciento, 20.41 por ciento y 25.27 por ciento respectivamente. Valores distintos encontraron Gallardo y Vargas (2015), en la evaluación post-descongelación determino que el porcentaje de inmovilidad utilizando triladyl fue de 61 por ciento, bioxcell con 85 por ciento y andromed con 78 por ciento. Mejía (2017), encontró un porcentaje de inmovilidad del 60,8 por ciento. Este valor de esperma inmóvil se relaciona directamente con el porcentaje de motilidad total obtenida en esta investigación, que demuestra que existe un mayor porcentaje de motilidad espermática con el T2.

V. CONCLUSIONES

Luego de obtenidos los resultados de esta investigación, se pueden realizar las siguientes conclusiones:

Se determinó que la adición de metil- β -ciclodextrina cargada de colesterol antes de la congelación en semen bovino, mejoró todos los parámetros espermáticos evaluados post-descongelación (a excepción de morfología).

En la evaluación post-descongelación se observaron diferencias significativas entre los tratamientos en las variables evaluadas: motilidad total, motilidad progresiva, vitalidad e integridad de membrana, con el tratamiento T2 (1,5 mg de CLC/120 millones de espermatozoides/ml).

En la etapa pre congelación (refrigerado) no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos.

VI. RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos en la investigación, permiten realizar las siguientes recomendaciones:

1. La inclusión de CLC en el protocolo de criopreservación del Banco Nacional de Semen. Se recomienda la concentración de 1,5 mg de CLC/120 millones de espermatozoides/ml, para mejorar las características seminales post-descongelación.
2. Con los resultados obtenidos en la investigación, se analiza la posibilidad que el semen tratado con CLC pueda permitir un número menor de espermatozoides utilizados por dosis inseminante, sin reducir la fertilidad, obteniendo mayor cantidad de pajillas por eyaculado.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ALBERTS B, B.D.L.J. 1994. Membrane Structure in Molecular Biology of the Cell Garland Publishing, New York.

ÁLVAREZ, A; SERRES, C; TORRES, P; CRESPO, F; MATEOS, E; GÓMEZ-CUÉTARA, C. 2006. Effect of Cholesterol-Loaded Cyclodextrin on the Cryopreservation of Donkey Spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. Accepted for publication.

AMANN, R. 1999. Cryopreservation of sperm. *Encyclopedia of Reproduction*, Academic Press volume 1, 773-783.

AMORIM, E.A; GRAHAM, J.K; SPIRIZZI, B; MEYERS, M; TORRES, C.A. 2009. Effect of cholesterol or cholesteryl conjugates on the cryosurvival of bull sperm. *Cryobiology* 58, 210–214.

ANDRABI, S. 2009. Factors affecting the quality of cryopreservation buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa (en línea).

ANSARI, M., BA, R., SM, A., & S., A. 2011. Effect of straw size and thawing time on quality of cryopreserved buffalo (*Bubalus bubalis*) semen (en línea).

ÁVILA-PORTILLO, L.M; MADERO J.I; LOPEZ, C; LEON M.F; ACOSTA L; GOMEZ C; LOZANO, J.M; REGUERO, M.T. 2006. Fundamentos de criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología* 57:291-300.

AWAD, M.M. y GRAHAM, J.K. 2002. Effect of adding cholesterol to bovine spermatozoa on motility parameters and cell viability after cryopreservation, *Cryobiology* 45, 256–257.

BACH, K.D. 2009. "Effects of cholesterol on bovine sperm survival during cooling & freezing". Faculty of the Graduate School of Cornell University. Pag 32.

BERNARDI, S; ALLENDE, R; MAZZEO, R; MONTI, J; MARINI, P. 2011. Evaluación de los cambios ocasionados en espermatozoides bovinos por variaciones en el manejo de las dosis durante su manipulación en inseminación artificial. InVet 13 (2), pp: 25-38.

BOISO, I. 2001. Principios básicos de criobiología. Revista Iberoamericana de Fertilidad. 18, 127 -131.

BOSCARATO, A; MARTINS, L. 2014. Uso de colesterol na criopreservação espermática e fertilidade: uma revisão. Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR, Umuarama, v. 17, n. 2, p. 143-148.

CATENA, M. y CABODEVILA, J. 1999. Evaluación de semen bovino congelado. Fac. de Cs. Veterinarias. Univ. Nac. del Centro de la Prov. de Bs. As. Campus Universitario, (7000) Tandil. Trabajo presentado en el Simposio Internacional de Reproducción Bovina (UNCPBA), Tandil, 6 de agosto de 1999.

COMBES, G. B; VARNER, D; SCHROEDER, F; BURGHARDT, R; BLANCHARD, T. 2000. Effect of cholesterol on the motility and plasma membrane integrity of frozen equine spermatozoa after thawing. Journal of Reproduction and Fertility Supplement 56, 127-132.

CORREA, JR; ZAVOS, P. 1994. The hipoosmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane theriogenology; 42:351-360.

CORREA, J.R; HEERSCHE, G; ZAVOS, P. 1996. Esperm membrane functional integrity and response of frozen-thawed bovine spermatozoa during the hypohosmotic swelling test incubation at varying temperatures. Theriogenology; 47:715-721.

CURRY, M. 2000. Crypreservation of semen from domestic livestock. Reviews of Reproduction 5, 46-52.

CHAVEIRO, A; MACHADO L; FRIJTERS A; ENGEL B; WOELDERS, H. 2006. Improvement of parameters of freezing protocol for bull sperm using two osmolytic supports. *Theriogenology*, 65:1875-1890. Sciences, Uppsala 29p.

CLOUD, J. G; MILLER, W. H; LEVANDUSKI, M. J. 1990. Cryopreservation of sperm as a means to store salmonid germ plasm and to transfer genes from wild to hatchery populations. *The Progressive Fish Culturist*. 52:51-53.

DARIN-BENNETT, A; WHITE, I.G. 1977. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology* 14, 466-470.

DAVIS, R; KATZ, D.F. 1993. Operational standards for CASA instruments. *J. Androl.* 14, 385-394.

DAVIS, R.O; SIEMERS, R.J. 1995. Derivation and reliability of kinematics measures of sperm motion. *Reprod. Fertil Dev.* 7, 857-869.

ESPINOSA VARGAS, W.D. 2012. “Efecto de la adición de un surfactante natural (Aloe Vera) al diluyente triladyl ® para crioconservación de semen bovino en toros reproductores de agso-genes, Quito-pichincha”. Universidad técnica de Cotopaxi. Unidad académica de ciencias agropecuarias y recursos Naturales. Quito-Ecuador. Pag. 82.

FLESCHE, F.M; GADELLA B.M. 2000. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochimica Et Biophysica Acta-Reviews On Biomembranes* 1469, 197-235.

GALANTINO-HOMER H.L; ZENG W.X; MEGEE S.O; DALLMEYER M; VOELKL D; DOBRINSKY I. 2006. Effects of 2-Hidroxipropil- β -Cyclodextrin and Cholesterol on Porcine Sperm Viability and Capacitation Status Following Cold Shock or Incubation. *Molecular Reproduction and Development* 73, 638-650.

GALLARDO BUSTILLOS, J; VARGAS SANDOVAL, C. 2015. “Evaluación de tres diluyentes para criopreservar semen bovino de toros cruce sahiwal (bos taurus) en el

trópico húmedo”. Departamento de ciencias de la vida y la agricultura. Universidad de las Fuerza Armadas. Santo Domingo de los Tsachilas-Ecuador. Pag. 68-70.

GILLAN, L; EVANS, G; MAXWELL, W. 1997. Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development* 9, 481-487.

GONZALES, R.A.F. 2004. Effect of cryopreservation using different freezing techniques and cryoprotectants on sperm parameters and membranes integrity of bovine spermatozoa. Tese. Programa de Pos-Graduação em Medicina Veterinaria, Universidade Sao Paulo. Pirassununga, Sao Paulo. 94p (en línea).

IRVINE, D.S. 1995. Computer assisted semen analysis system: sperm motility assessment. *Hum. Reprod.* 10, 53-59.

HUMMERSTED, R. H; GRAHAM, J. K; y NOLAN, J. P. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive (en línea).

JANUSKAUSKAS, A; GIL, J; SODERQUIST, L; HAARD, M.G; HAARD, M.C; JOHANNISSON, A; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. 1999. Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in Sweden. *Theriogenology* 52, pp.: 641-58.

JEYENDRAN, R; VAN DER V, H; PEREZ-PELAEZ, M; GRABO, B; y ZANEVELD, L. 1984. Desarrollo de un ensayo para evaluar la integridad funcional de la membrana del espermatozoide humano y su relación con otras características del semen. *J. Reprod. Fertil.*, 70, 219-228.

KRAUSE, W.1995. The significance of computer-assisted semen analysis (CASA) for diagnosis in andrology and fertility prognosis. *Hum. Reprod.* 10, 60-66.

LADHA, S. 1998. Lipid heterogeneity and membrane fluidity in a highly polarized cell the mammalian spermatozoon. *J. Membr. Biol.* 165, 1-10.

LEHNINGER, A. L; NELSON, D. L; COX, M. M. 2005. Lehninger: Principios de Bioquímica. 4. ed. São Paulo: Sarvier. 1120 p.

MADRID-BURY, N. 2005. ¿Es posible predecir la fertilidad en los toros?. En: González-Stagnaro C, Soto-Belloso E (eds). Manual de ganadería doble propósito. Maracaibo, Venezuela: Astro Data. p 631-635.

MEDEIROS, CM.; et al. 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better?. Theriogenology. 57, 327-344. Watson PF. 1981. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5°C by egg-yolk lipoprotein. J. Rep Fert. 62: 483-492.

MEDINA, V; SÁNCHEZ, E. & CRUZ, P. 2007. Crioconservación de semen bovino usando un congelador programable (CL-8800) y determinación de su calidad postdescongelación por medio de un sistema de análisis espermático asistido por computador (CASA). ORINOQUIA, 75-86.

MEJÍA GUTIÉRREZ, J.E. 2017. “Evaluación pre y post congelación del semen obtenido con vagina artificial y electroeyaculador en el ganado criollo”. Universidad de Cuenca. Facultad de ciencias agropecuarias. Cuenca-Ecuador. Pag 33.

MENDOZA, J; DULIN, P; y WARRENT, T. 2000. The lower hydrolysis of ATP by the stress protein GroEL is a major factor responsible for the diminished chaperonin activity at low temperature (en línea).

MINITUB. 2003. Diluyente sin yema de huevo para conservación de semen bovino (en línea). (Minitub, Productor).

MOCÉ, E. y GRAHAM, J.K. 2006: Cholesterol-loaded cyclodextrins added to fresh bull ejaculates improve sperm cryosurvival. J Anim Sci 84, 826–833.

MOCÉ, E.; PURDY, P. H.; GRAHAM, J. K. 2010. Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival. Animal Reproduction Science, v. 118, p. 236-247.

MOCE, E; BLANCH, E; TOMAS, C; y GRAHAM, JK. 2010. Use of cholesterol in sperm cryopreservation: present moment and perspectives to future. *Reproduction in Domestic Animals* 45, 57–66.

MOCÉ, E. y GRAHAM, J.K. 2014. Cholesterol-loaded cyclodextrins added to fresh bull ejaculates improve sperm cryosurvival. Department of Biomedical Sciences, Colorado State University. Pag 829-830.

MOCÉ¹, E; TOMÁS, C; BLANCH, E. and GRAHAM², J.K. 2014. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrins on bull and goat sperm processed with fast or slow cryopreservation protocols. Centro de Tecnología Animal – Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias y Department of Biomedical Sciences, Colorado State University, USA. Pag 774-775.

MOORE A.I; SQUIRES E.L; GRAHAM J.K. 2005. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Criobiology*.

MONCAYO PICERNO, S. A. 2016. “Evaluación de la calidad seminal de reproductores Bovinos antes y después del proceso de criopreservación”. Universidad politécnica salesiana. Quito-Ecuador. Pag 48.

MORAES, E.A; GRAHAM, J.K; TORRES, C.A; MEYERS, M; SPIZZIRI, B. 2010. Delivering cholesterol or cholestanol to bull sperm membranes improves cryosurvival. *Anim Reprod* 118, 148–154.

MORRIER, A; THERIAULT, M; CASTONGUAY, F; BAILEY, J.L. 2004. Proceedings of the Society for the Study of Reproduction Meeting. Vancouver, Canada. P 239 Abstr. 636.

MORTIMER, S. 1997. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Human repr. Update*, 3(5): 403-439.

MORTIMER, S.T. 2000. CASA practical aspects. *J. Androl.* 21, 515-524.

NOTHLING, J.O y ARNDT, E.P. 1995. Fertility of two bulls with poor sperm morphology. J. S. Afr. Vet. Assoc. 66 (2), 74-6.

OSORIO, C. 2013. Valoración computarizada de la integridad funcional de la membrana plasmática, motilidad y morfología espermática en semen criopreservado de búfalo. Programa de Maestría en Reproducción Animal. LUZ.Maracaibo. 106p.

OTT, R. (1986). Breeding soundness examination of bulls. En D. Morrow, Current Therapy in Theriogenology. Philadelphia USA: W.B. Saunders comp.

PALACIOS, A. 1994. Aspectos fisiológicos acerca del congelamiento de semen. Vet. Méx. 25 (3).

PALACIOS RAMÍREZ, L.F. 2015. Evaluación de dos diluyentes caseros y un diluyente comercial para crio preservar semen bovino de las razas brown swiss y patua (bos taurus) en el trópico húmedo. Santo domingo – ecuador. Pag 57.

PARKS, J.E. 1997. Hypothermia and mammalian gametes in Reproductive Tissue Banking, A.M. Karow, Critser, J.K., Editor. Academic Press: New York.

PARKS, J. & GRAHAM, J. 1992. Effects of criopreservation procedures on sperm membranes. Obtenido de Department of Animal Science, Cornell University Ithaca, NY 14853 USA.

PARKS, J.E; LYNCH, D.V. 1992. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. Cryobiology 29, 255-266.

PEREZ, R; GRASA, P; FERNANDEZ, M; PELEATO, M; CEBRIAN-PEREZ, J; MUINO-BLANCO, T. 2002. Seminal plasma proteins reduce protein tyrosine phosphorylation in the plasma membrane of cold-shocked ram spermatozoa. Mol Reprod Dev 61, 226-233.

PURDY, P.H; GRAHAM, J.K. 2004. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. *Cryobiology* 48, 36–45.

PURDY, P.H. and GRAHAM, J.K. 2004a. Effect of cholesterol to bull sperm membranes on sperm capacitation, the acrosome reaction, and fertility. *Biol Reprod*, 2004, 71(2): p. 522-7.

PURDY, P.H; FOX, M.H; GRAHAM, J.K. 2005: The fluidity of Chinese hamster ovary cell and bull sperm membranes after cholesterol addition. *Cryobiology* 51, 102–112.

RAJORIYA¹, J; PRASAD¹, J; GHOSH¹, S; SNEHAL, S; RAMTEKE¹, N, BARIK¹, G; DAS¹ Y MEGHA PANDE². 2014. Cholesterol loaded cyclodextrin increases freezability of buffalo bull (*Bubalus bubalis*) spermatozoa by increasing cholesterol to phospholipid ratio. Division of Animal Reproduction, Indian Veterinary Research Institute, Izatnagar, India. Pag 4.

RAMÓNEZ CÁRDENAS, J.C. 2013. “Evaluación de dos agentes crioprotectores no permeables y un diluyente comercial (triladyl) en la Congelación de semen bovino”. Universidad de Cuenca. Facultad de ciencias agropecuarias Centro de postgrado. Cuenca-Ecuador. Pag. 33.

RODRÍGUEZ, H; LARSSON, B. & PERSTOFT, H. 1997. Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. *Reproduction, Fertility and Development*, 297-308.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. 2003. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia. *Reprod Dom Anim* 38, pp.: 312–318.

SAENGER, W. *ANGEW. Chem. Int.*, 19, 344.

SALOMON, S; y MAXWELL, W. 1995. Frozen storage of ram semen. I processing freezing, thawing and fertility after cervical insemination (en línea).

SEIDEL, G. J. 2006. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation.

STORNELLI, M.C; TITTARELLI, C.M; SAVIGNONE, C.A; STORNELLI; M.A. 2005. Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. *Analecta Vet* 25(2): 28-35.

TAKAHASHI, K. 2013. *Chem. Rev.*, 98.

TAPIA, J.A; MACIAS-GARCIA, B; MIRO-MORAN, A; ORTEGA-FERRUSOLA, C; SALIDO, G.M; PENA, F.J; APARICIO, I.M. 2012. The membrane of the mammalian spermatozoa: much more than an inert envelope. *Reprod. Domes. Anim.* 47 Suppl 3, 65-75.

TARTAGLIONE CM, R. M. 2004. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen.

TORRES, P; SERRES, C; GÓMEZ-CUÉTARA, C; SANTIAGO, I; MATEOS, E; ÁLVAREZ, A. 2006. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on motility and plasma membrana integrity of cooled stallion sperm. *Animal Reproduction Science*. Accepted for publication.

TRIMECHE, A; YVON, J; VIDAMENT, M; PALMER, E; y MAGISTRINI, M. 1999. Effects of glutamine, proline, histidine, and betaine on post thaw motility of stallion spermatozoa (en línea).

TYLER, J; KIME, L; COOKE, S; y DRISCOLL, G. 1996. Temperature change in cryo-containers during short exposure to ambient temperatures (en línea).

THOMAS, C.A; GARNER, D.L; DEJARNETTE, J.M; MARSHALL, C.E. 1998. Effect of cryopreservation of bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. *Biol Reprod* 58: 786-793.

VERSTEGEN, J. y ONCLIN, K. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*. 57: 149-179.

WATSON, P. 1995. Recents developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function.

WATSON, P.F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science* 60:481-492.

WOELDERS, H. 1997. Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen (en línea).

YANCEY P.G; RODRIGUEZA W.V; KILSDONK E.P.C; STOUTD G.W; JOHNSON W.J; PHILLIPS M.C; ROTHBLAT G.H. 1996. Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. Demonstration of kinetic pools and mechanism of efflux. *J. Biol. Chem.* 271, 16026-16034.

ZAHN, F; PAPA, F; DELL'AQUA, J. 2002. Colesterol incorporation on equine sperm membrana: effects on post-thaw sperm parameters and fertility. *Theriogenology* 58, 237-240.

ZENG W. X; TERADA T. 2001a. Effect of Methyl-Beta-Cyclodextrin on Cryosurvival of Boar Spermatozoa. *Journal of Andrology* 22, 111-118.

IV CENSO NACIONAL AGROPECUARIO 2012, sistema de consulta de resultados censuales. <http://censos.inei.gob.pe/cenagro/tabulados/>

VIII. ANEXOS

ANEXO 1. CARACTERÍSTICAS MACRO Y MICROSCÓPICAS DE SEMEN FRESCO, PROMEDIOS Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR.

Tabla 7. Características macro y microscópicas de semen fresco, promedios y desviación estándar:

Nº MUESTRAS	TORO	VOLUMEN (ml.)	CONCENTRACIÓN x10 ⁶ espermat/ml	pH	COLOR
7	Aron	8.29 ± 0.68	545.9 ± 162.74	7	BC
7	Grieko	5.43 ± 0.43	500.64 ± 128.19	7	BC
7	Nerón	5.93 ± 0.28	847.16 ± 99.18	7	BC
7	Romano	6.21 ± 0.34	790.12 ± 98.66	7	BC

Media ± Error estándar

ANEXO 2. MOTILIDAD TOTAL Y PROGRESIVA, VITALIDAD, INTEGRIDAD DE MEMBRANA, MORFOLOGIA Y ESPERMIOS INMOVILES SEMEN FRESCO

Tabla 8. Características microscópicas de semen fresco, promedios y desviación estándar:

TORO	ARON	GRIEKO	NERÓN	ROMANO
Motilidad total %	93,2 ± 1,52	90,41 ± 1,94	90,96 ± 1,91	90,56 ± 2,16
Motilidad progresiva %	90,08 ± 1,69	87,45 ± 2,1	87,45 ± 2,02	87,58 ± 2,26
Vitalidad %	92,37 ± 0,33	90,04 ± 1,57	91,96 ± 0,57	88,46 ± 1,38
Host %	89,36 ± 0,53	86,19 ± 1,98	88,99 ± 0,88	85,56 ± 1,14
Morfología%	5 ± 0,31	3,86 ± 0,26	5,14 ± 0,34	5,29 ± 0,18
Espermios inmóviles %	6,8 ± 1,52	9,59 ± 1,94	9,04 ± 1,91	9,44 ± 2,16

Media ± Error estándar

ANEXO 3. ANVA Y PRUEBA DE COMPARACION MULTIPLE DE TUKEY DE MOTILIDAD TOTAL REFRIGERADO

ANVA MOTILIDAD TOTAL REFRIGERADO

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
B	3	0,1596033	0,0532011	29,41	<.0001
T	2	0,046006	0,023003	0,54	0,588 NS
M(B)	24	1,0167096	0,0423629	23,42	<.0001
Error	54	0,0976851	0,001809		
Total corregido	83	1,320004			

Tukey Agrupamiento	Media	N	T
A	94,2693	28	T2
A			
A	93,6654	28	T3
A			
A	92,6454	28	T1

ANEXO 4. ANVA Y PRUEBA DE COMPARACION MULTIPLE DE TUKEY DE MOTILIDAD PROGRESIVA REFRIGERADO

ANVA MOTILIDAD PROGRESIVA REFRIGERADO

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
B	3	0,1243347	0,0414449	27,24	<.0001
T	2	0,0237816	0,0118908	0,34	0,715
M(B)	24	0,8387423	0,0349476	22,97	<.0001
Error	54	0,0821655	0,0015216		
Total corregido	83	1,0690241			

Tukey Agrupamiento	Media	N	T
A	91,1568	28	T2
A			
A	90,0364	28	T3
A			
A	89,7354	28	T1

ANEXO 5. ANVA Y PRUEBA DE COMPARACION MULTIPLE DE TUKEY DE VITALIDAD REFRIGERADO

ANVA VITALIDAD REFRIGERADO

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
B	3	0,0480715	0,0160238	29,41	<.0001
T	2	0,0268621	0,0134311	0,9	0,4193
M(B)	24	0,3576224	0,0149009	27,35	<.0001
Error	54	0,029424	0,0005449		
Total corregido	83	0,4619801			

Tukey Agrupamiento	Media	N	T
A	90,85	28	T2
A			
A	90,1464	28	T3
A			
A	89,0107	28	T1

ANEXO 6. ANVA Y PRUEBA DE COMPARACION MULTIPLE DE TUKEY DE INTEGRIDAD DE MEMBRANA REFRIGERADO

ANVA HOST REFRIGERADO

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
B	3	0,0489221	0,0163074	33,99	<.0001
T	2	0,0673501	0,033675	2,54	0,0995
M(B)	24	0,3176958	0,0132373	27,59	<.0001
Error	54	0,0259109	0,0004798		
Total corregido	83	0,459879			

Tukey Agrupamiento	Media	N	T
A	88,1429	28	T2
A			
A	86,9893	28	T3
A			
A	84,7786	28	T1

ANEXO 7. ANVA Y PRUEBA DE COMPARACION MULTIPLE DE TUKEY DE MORFOLOGIA REFRIGERADO

ANVA MORFOLOGÍA REFRIGERADO

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
B	3	0,00199	0,00066333	34,82	<.0001
T	2	0,0003079	0,00015393	0,94	0,404
M(B)	24	0,0039247	0,00016353	8,58	<.0001
Error	54	0,0010287	0,00001905		
Total corregido	83	0,0072513			

Tukey Agrupamiento	Media	N	T
A	5,0357	28	T1
A			
A	4,8571	28	T3
A			
A	4,5714	28	T2

ANEXO 8. ANVA Y PRUEBA DE COMPARACION MULTIPLE DE TUKEY DE ESPERMIOS INMOVILES REFRIGERADO

ANVA ESPERMIOS INMOVILES REFRIGERADO

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
B	3	0,0279053	0,00930175	46,9	<.0001
T	2	0,0037834	0,00189169	0,28	0,7548
M(B)	24	0,1595308	0,00664712	33,52	<.0001
Error	54	0,0107096	0,00019833		
Total corregido	83	0,201929			

Tukey Agrupamiento	Media	N	T
A	7,3546	28	T1
A			
A	6,3346	28	T3
A			
A	5,7307	28	T2

ANEXO 9. ANVA Y PRUEBA DE COMPARACION MULTIPLE DE TUKEY DE MOTILIDAD TOTAL POST-DESCONGELAMIENTO

ANVA MOTILIDAD TOTAL POST-DESCONGELAMIENTO

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
B	3	0,0273785	0,00912617	8,98	<.0001
T	2	0,4464106	0,22320532	24,84	<.0001**
M(B)	24	0,2156803	0,00898668	8,85	<.0001
Error	54	0,0548618	0,00101596		
Total corregido	83	0,7443313			

Tukey Agrupamiento	Media	N	T
A	79,5854	28	T2
B	74,7268	28	T3
C	67,7318	28	T1

ANEXO 10. ANVA Y PRUEBA DE COMPARACION MULTIPLE DE TUKEY DE MOTILIDAD PROGRESIVA POST-DESCONGELAMIENTO

ANVA MOTILIDAD PROGRESIVA POST-DESCONGELAMIENTO

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
B	3	0,0215099	0,00716998	10,44	<.0001
T	2	0,1953739	0,09768693	14,2	<.0001**
M(B)	24	0,1651357	0,00688065	10,02	<.0001
Error	54	0,0370803	0,00068667		
Total corregido	83	0,4190998			

Tukey Agrupamiento	Media	N	T
A	63,4161	28	T2
B	55,83	28	T3
B	54,7336	28	T1

ANEXO 11. ANVA Y PRUEBA DE COMPARACION MULTIPLE DE TUKEY DE VITALIDAD ESPERMATICA POST-DESCONGELAMIENTO

ANVA VITALIDAD POST-DESCONGELAMIENTO

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
B	3	0,0292646	0,00975486	13,72	<.0001
T	2	0,4415614	0,22078069	25,45	<.0001**
M(B)	24	0,2082287	0,00867619	12,2	<.0001
Error	54	0,0383964	0,00071104		
Total corregido	83	0,717451			

Tukey Agrupamiento	Media	N	T
A	75,8357	28	T2
B	70,5286	28	T3
C	63,2607	28	T1

ANEXO 12. ANVA Y PRUEBA DE COMPARACION MULTIPLE DE TUKEY DE INTEGRIDAD DE MEMBRANA POST-DESCONGELAMIENTO

ANVA HOST POST-DESCONGELAMIENTO					
Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
B	3	0,0120132	0,0040044	10,52	<.0001
T	2	0,3672669	0,1836334	49,54	<.0001**
M(B)	24	0,0889624	0,0037068	9,74	<.0001
Error	54	0,0205566	0,0003807		
Total corregido	83	0,4887991			

Tukey Agrupamiento	Media	N	T
A	60,4286	28	T2
B	55,0643	28	T3
C	46,8893	28	T1

ANEXO 13. ANVA Y PRUEBA DE COMPARACION MULTIPLE DE TUKEY DE MORFOLOGIA POST-DESCONGELAMIENTO

ANVA MORFOLOGÍA POST-DESCONGELAMIENTO

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
B	3	0,0003915	0,00013049	5,54	0,0022
T	2	0,0005323	0,00026614	1,72	0,2004 NS
M(B)	24	0,0037141	0,00015475	6,57	<.0001
Error	54	0,0012723	0,00002356		
Total corregido	83	0,0059102			

Tukey Agrupamiento	Media	N	T
A	5,1429	28	T1
A			
A	4,75	28	T3
A			
A	4,5357	28	T2

ANEXO 14. ANVA Y PRUEBA DE COMPARACION MULTIPLE DE TUKEY DE ESPERMIOS INMOVILES POST-DESCONGELAMIENTO

ANVA ESPERMIOS INMOVILES POST-DESCONGELAMIENTO

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
B	3	0,0130354	0,00434515	9,38	<.0001
T	2	0,2144462	0,10722311	25,62	<.0001**
M(B)	24	0,1004331	0,00418471	9,04	<.0001
Error	54	0,0250077	0,00046311		
Total corregido	83	0,3529225			

Tukey Agrupamiento	Media	N	T
A	32,2682	28	T1
B	25,2732	28	T3
C	20,4146	28	T2