

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE ZOOTECNIA



**“EVALUACIÓN DE DILUTORES A BASE DE LECITINA
DE SOYA Y LIPOSOMAS SOBRE LA CRIOPRESERVACIÓN
DE ESPERMATOZOIDES DE TOROS”**

Presentada por:

JOSUÉ AMADOR GÁLVEZ SUASNABAR

Tesis para Optar el Título Profesional de:

INGENIERO ZOOTECNISTA

Lima – Perú

2022

La UNALM es la titular de los derechos patrimoniales de la presente investigación
(Art. 24. Reglamento de Propiedad Intelectual)

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE ZOOTECNIA

**“EVALUACIÓN DE DILUTORES A BASE DE LECITINA
DE SOYA Y LIPOSOMAS SOBRE LA CRIOPRESERVACIÓN
DE ESPERMATOZOIDES DE TOROS”**

Presentada por:

JOSUÉ AMADOR GÁLVEZ SUASNABAR

Tesis para Optar el Título Profesional de:

INGENIERO ZOOTECNISTA

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

Dr. Edwin Mellisho Salas
Presidente

Mg.Sc. Enrique Alvarado Malca
Miembro

Mg.Sc. Segundo Gamarra Carrillo
Miembro

Mg.Sc. Próspero Cabrera Villanueva
Asesor

DEDICATORIA

Este logro va dedicado

A toda mi Familia, mi padre Miguel Galvez, mi madre Isabel Suasnabar, mis hermanas Chabely y Katherine, por la motivación para superarme y lograr mis sueños, ustedes son mi felicidad y mi fuerza para seguir superándome profesionalmente.

AGRADECIMIENTOS

Manifiesto mi profundo agradecimiento a mi maestro y asesor el Ing. Mg.Sc. Próspero Cabrera Villanueva, quién confió en mí para esta investigación y me permitió desarrollarlo en el laboratorio del Banco Nacional de Semen de la Facultad de Zootecnia de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM).

Agradezco al M.V Frank Mego Hermida, por sus sugerencias en la etapa experimental y por brindarme su contribución y conocimiento profesional en el desarrollo de esta investigación.

Un agradecimiento especial a la organización del Banco Nacional de Semen, por el apoyo técnico, logístico y económico en la ejecución de la presente tesis; y a la Universidad Nacional Agraria La Molina, por mi formación académica y profesional en estos años.

Finalmente, agradezco a aquellas personas que de alguna forma contribuyeron a que pueda culminar esta investigación con éxito.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	vi
ABSTRACT	vii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. Semen bovino	3
2.1.1. Membrana espermática	3
2.1.1.1. Composición de la membrana espermática	4
2.2. Criopreservación de semen bovino	5
2.2.1. Dilutores para la congelación	5
2.2.2. Crioprotectores	6
2.2.2.1. Lecitina de soya.....	6
2.2.2.2. Liposomas.....	7
2.2.3. Efectos de la criopreservación sobre el espermatozoide	7
2.3. Evaluación de la calidad seminal	8
2.3.1. Concentración espermática	8
2.3.2. Motilidad y cinética.....	9
2.3.3. Viabilidad.....	10
2.3.4. Test de endosmosis.....	12
III. METODOLOGÍA	13
3.1. Localización	13
3.2. Descripción del recurso animal.....	13
3.3. Colección de semen	14
3.4. Dilutores y procesamiento de semen	14
3.4.1. Dilutor Andromed	15
3.4.2. Dilutor Optixcell.....	15
3.4.3. Envasado del semen en pajillas y descenso de temperatura.	16

3.5. Evaluación de los parámetros seminales post-descongelación	16
3.5.1. Motilidad y cinética espermática	17
3.5.2. Viabilidad	19
3.5.3. Test de Endosmosis	20
3.6. Criopreservación de semen	21
3.7. Análisis estadístico.....	22
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
4.1. MOTILIDAD TOTAL Y PROGRESIVA DE ESPERMATOZOIDES POST- DESCONGELACIÓN.....	23
4.2. PARAMETROS CINETICOS: VCL, VSL Y VAP DE ESPERMATOZOIDES POST-DESCONGELACION.	25
4.3. VIABILIDAD Y FUNCIONABILIDAD DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA ESPERMÁTICA POST-DESCONGELACIÓN.	26
V. CONCLUSIONES	28
VI. RECOMENDACIONES	29
VII. BIBLIOGRAFÍA	30
VIII. ANEXOS	42

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Motilidad y cinética espermática de los espermatozoides post-descongelación. ..23

Tabla 2: Viabilidad y Test de endosmosis de los espermatozoides post-descongelación. ..26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Toros raza Brown Swiss en brete de espera previo a la colecta.	14
Figura 2: Evaluación de motilidad y parámetros cinéticos espermático sistema CASA.	19
Figura 3: Análisis de viabilidad mediante sistema CASA. Espermatozoides azules = Viables / Espermatozoides rojos = No viables	20
Figura 4: Test endosmosis (HOS). Espermatozoides con hinchamiento o enrollamiento del flagelo = endosmosis positiva / Espermatozoide sin hinchamiento o enrollamiento del flagelo = endosmosis negativa.	21
Figura 5: Equipo para criopreservación de pajillas de semen	22

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Resumen del método de diferencia mínima significativa de las 40 colecciones de semen post-descongelación (Aníbal n=10), (Bolt n=10), (Ranger n=10), (San Martín n=10).	43
Anexo 2: Parámetros descriptivos del volumen y concentración espermática del promedio de las 40 colecciones de semen (Aníbal n=10), (Bolt n=10), (Ranger n=10), (San Martín n=10).	44
Anexo 3: Colección de semen a toro de la raza Brown Swiss con vagina artificial modelo IMV.	44
Anexo 4: Dilutores a base de lecitina de soya (Andromed)(A) y a base de liposomas (Optixcell)(B).	45
Anexo 5: Equipo de baño maría seco para la incubación del contenido de pajillas de semen a 37 °C, y su posterior análisis de motilidad, cinemática espermática y viabilidad, mediante el sistema de análisis seminal computarizado (CASA). .	46
Anexo 6: Fijación de los espermatozoides en una lámina porta objetos mediante un frotis, posterior a la incubación para la prueba de endosmosis.	47
Anexo 7: Imagen del Sistema Computarizado de Análisis Seminal (C.A.S.A) software AndroVision	48
Anexo 8: Laboratorio del Banco Nacional de Semen de la UNALM.	49

RESUMEN

El objetivo del estudio fue comparar el efecto de dos dilutores comerciales (basados en lecitina de soya Andromed® y basados en liposomas Optixcell®) sobre las variables de calidad y funcionalidad de los espermatozoides después de la descongelación evaluados mediante análisis de espermatozoides asistido por computadora. Se analizaron un total de 40 eyaculados de cuatro toros de la raza Brown Swiss de 3 a 6 años de edad; los tratamientos fueron: T1, eyaculados diluidos en lecitina de soya; T2, eyaculados diluidos en liposomas. El análisis de la motilidad espermática se obtuvo con ayuda de un sistema computarizado de análisis seminal (CASA); para el estudio de viabilidad espermática se empleó la tinción de fluorescencia Hoeschst 33342/PI, y la evaluación de la funcionalidad de la membrana espermática se realizó a través del test de endosmosis. En la parte estadística, se verificó los supuestos de normalidad (Shapiro-Wilk) y la homogeneidad de varianzas (Test de Levene), posteriormente se realizó el análisis de varianzas (ANVA), y los datos se analizaron con el programa estadístico Statgraphics Centurion. Se determinó que no hubo diferencias estadísticas significativas ($P < 0,05$) en los parámetros de porcentaje de motilidad total (75.20 % y 75.51 %), viabilidad (60.65 % y 60.80 %) y funcionalidad de la membrana espermática (49.05% y 51.48%) para Andromed y Optixcell, respectivamente. Se concluye que los dilutores Andromed y Optixcell presentaron valores aceptables de la calidad seminal post-descongelación, y pueden utilizarse para la criopreservación de semen de toro.

Palabras clave: Eyaculado, espermatozoides, motilidad, viabilidad y cinética espermática.

ABSTRACT

The study was conducted to compare the effect of two commercially available extenders (Andromed®-plant based and Optixcell®-liposome-based) on post-thaw sperm quality and functionality variables evaluated using computer-assisted sperm analysis. A total of 40 ejaculates from four Brown Swiss breed bulls from 3 to 6 years of age were analyzed; the treatments were: T1, ejaculates diluted in soy lecithin; T2, ejaculates diluted in liposomes. Sperm motility analysis was obtained with the help of a computerized semen analysis system (CASA); Hoeschst 33342 / PI fluorescence staining was used for the sperm viability study, and the evaluation of the sperm membrane functionality was performed through the endosmosis test. In the statistical part, the assumptions of normality (Shapiro-Wilk) and the homogeneity of variances (Levene's test) were verified, later the analysis of variances (ANVA) was performed, and the data were analyzed with the statistical program Statgraphics Centurion. It was determined that there were no statistically significant differences ($p > 0.05$) in the parameters of percentage of total motility (75.20% and 75.51%), viability (60.65% and 60.80%) and functionality of the sperm membrane (49.05% and 51.48%) for Andromed and Optixcell, respectively. It is concluded that the dilutors Andromed and Optixcell presented acceptable values of post-thaw semen quality, and can be used for the cryopreservation of bull semen.

Keywords: Ejaculate, sperm, motility, viability and sperm kinetics.

I. INTRODUCCIÓN

La criopreservación de semen es una biotecnología reproductiva elemental que promueve la conservación del espermatozoide por tiempo indefinido, y la alianza con la inseminación artificial ha hecho posible la diseminación de material genético de óptima calidad. Asimismo, la criopreservación ha generado una reducción en los costos de producción al no utilizar reproductores en monta natural, y además disminuir los contagios por enfermedades de transmisión sexual (Hammerstedt et al., 1990; Castelo et al., 2008). Sin embargo, el proceso de criopreservación genera cambios abruptos de temperatura, como el shock de frío y calor, la formación de cristales de hielo y su disolución durante los procedimientos de congelación y descongelación, afectando la integridad de las células espermáticas tanto a nivel extrínseco como intrínseco (Watson, 1999).

Con el propósito de reducir el daño de los espermatozoides producto de la criopreservación en un principio se adicionaba yema de huevo a los dilutores como crioprotector (Crespilho et al., 2012). Pero, debido a riesgos de contaminación bacteriana, la variabilidad de su composición y la dificultad cuando se utiliza técnicas de análisis asistido por computadora, ha hecho que su uso disminuya (Aires et al., 2003; Singh et al., 2012). Una alternativa para reemplazar los componentes de origen animal en los dilutores es la lecitina de soya, componente de origen vegetal que presentan una mezcla de fosfatidilcolina y una serie de ácidos grasos como el ácido esteárico, oleico y palmítico, otorgando estabilidad estructural a las células (Chaudhari et al., 2015). Por otro lado, los dilutores a base de liposomas son una opción más reciente como medios de congelación. Los liposomas contienen una composición y concentración de fosfolípidos óptimas que aseguran la protección celular ante las lesiones criogénicas (Bergeron y Manjunath, 2006). Asimismo, se cree que los liposomas mediante la unión a las membranas de los espermatozoides regulan el intercambio de colesterol y fosfolípidos, protegiéndolos en el proceso de criopreservación (Ropke et al., 2011, Ansari et al., 2016).

Algunos dilutores a base de liposomas se han comparado con los dilutores a base de lecitina de soya para la criopreservación de semen de toros encontrándose diferentes resultados de

calidad seminal, superiores (Murphy, 2018), similar (Lima-Verde, 2017) y más bajo (Miguel-Jimenez, 2020). En este contexto, el objetivo de este estudio fue comparar el efecto de dos dilutores comerciales (basados en lecitina de soja Andromed® y otro basado en liposomas Optixcell®) sobre las variables de calidad y funcionalidad de los espermatozoides después de la descongelación evaluados mediante análisis de esperma asistido por computadora.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Semen bovino

El semen es la suspensión celular líquida que está compuesto por gametos masculinos (espermatozoides) y el plasma seminal. El espermatozoide es una célula haploide, cuya función es fecundar el ovocito. Este se produce en el epitelio germinal de los túbulos seminíferos de los testículos, y está conformada de una cabeza aplanada portadora del núcleo y una cola que se subdivide en los segmentos medio, principal y caudal, siendo este último el elemento esencial para la motilidad celular. El espermatozoide entero está cubierto por la membrana plasmática y el acrosoma, el cual es una estructura de doble pared situada entre la membrana plasmática y la porción anterior de la cabeza del espermatozoide. El plasma seminal representa la porción líquida del semen, y se forma durante la eyaculación. Este plasma es una mezcla de líquidos secretados por las glándulas vesiculares, conductos deferentes y próstata (Hafez, 2000).

2.1.1. Membrana espermática

La estructura de la membrana espermática está compuesta fundamentalmente de lípidos, proteínas y un reducido porcentaje de carbohidratos, presentando diferencias entre las especies biológicas (Ávila-Portillo et al., 2006). Presenta una estructura dinámica que actúa en la identificación y transporte de moléculas, está altamente compartimentada, y en cada compartimiento presenta una composición y organización particular, lo que origina propiedades físicas y funciones singulares (Pérez et al., 2002). Estos compartimientos son fundamentalmente: el núcleo necesario para el almacenamiento estable del ácido desoxirribonucleico (ADN), la cabeza del cual destaca la porción anterior, fundamental para la apropiada activación acrosómica y el segmento posterior indispensable para la unión espermatozoide-ovocito y finalmente la red mitocondrio-flagelar que es importante en el metabolismo y motilidad del espermatozoide, asimismo, el efecto de la crioconservación es distinto en cada uno en los compartimientos (Hammerstedt et al., 1990; Tartaglione y Ritta, 2004).

La calidad seminal se puede estimar mediante pruebas de integridad y funcionalidad de la membrana plasmática espermática; esto es trascendental para el metabolismo espermático y el correcto cambio en las propiedades físicas de la membrana celular, principalmente para la unión entre el espermatozoide y el ovocito (Jeyendran et al., 1984).

2.1.1.1. Composición de la membrana espermática

Los componentes más abundantes de la membrana plasmática son los lípidos (fosfolípidos y colesterol). El empaquetamiento y la localización de estas moléculas determinarán la rigidez de las membranas citoplasmáticas y por consiguiente el transporte de moléculas (Mathews et al., 2003). Asimismo, el perfecto funcionamiento de la membrana espermática y del acrosoma, está relacionado con el buen estado de las estructuras de la cabeza, núcleo y el acrosoma del espermatozoide, pudiendo asegurar el éxito de la fecundación (Palacin et al., 2020)

Las moléculas lipídicas de las membranas celulares tienen la particularidad de ser anfipáticas o anfifílicas, presentando un extremo hidrofílico y el otro hidrófobo. Varias investigaciones han demostrado que existe una diferencia considerable en el perfil lipídico de la membrana plasmática de los espermatozoides, entre distintas especies de mamíferos (Tapia et al., 2012). Flesch y Gadella (2000), mencionan que un promedio estándar de la membrana plasmática contiene aproximadamente un 70 por ciento de fosfolípidos, 25 por ciento de lípidos neutros y un cinco por ciento de glicolípidos.

El colesterol es una molécula anfipática que muestra una orientación similar a la de los fosfolípidos, y presenta múltiples efectos sobre la membrana, que incluyen estabilizar, reducir la permeabilidad e influir en la transición de fase de la membrana. Además, permite las interacciones célula-célula y proporcionar microambientes adecuados (químicos y / o físicos) para las proteínas asociadas a la membrana, e incluso sirve como antioxidante (Crockett, 1998). La relación entre los niveles de colesterol y fosfolípidos determinan la estabilidad y fluidez de la membrana. A medida que la temperatura disminuye, se produce poco movimiento lipídico y la bicapa asume una forma casi cristalina. Un incremento de la proporción de los ácidos grasos saturados (colesterol), aumenta la temperatura de transición sólido-fluido de la membrana, reduciendo la sensibilidad de las membranas de los espermatozoides al daño por enfriamiento (Lehninger et al., 2005).

2.2. Criopreservación de semen bovino

La criopreservación de semen es una importante biotecnología reproductiva, que tiene como objetivo principal prolongar la viabilidad de los espermatozoides de forma ilimitada. Pero, la exposición de los espermatozoides a temperatura ambiente o de refrigeración disminuyen su viabilidad, debido principalmente al agotamiento de las reservas energéticas (Hammersted et al., 1990). Por lo tanto, con el propósito de conservar la viabilidad, es importante que los espermatozoides se encuentren a temperaturas por debajo a $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$, y así detener los procesos metabólicos (Medeiros et al., 2002). Así mismo, el potencial fertilizante de los espermatozoides dependerá de un adecuado proceso de criopreservación, siendo medido a través de la integridad y funcionalidad de las distintas estructuras celulares (Hammersted et al., 1990).

El protocolo de criopreservación comprenden cinco fases: dilución, refrigeración, adición del crioprotector, congelación y descongelación (Watson, 1995). Cada fase del protocolo genera un efecto en la estructura, la función de la membrana y el metabolismo celular (Hammersted et al., 1990). En consecuencia, el espermatozoide podría perder su integridad y funcionalidad en algunas de estas fases (Watson, 2000; Ávila-Portillo et al., 2006). Además, cabe mencionar que el proceso de criopreservación altera la integridad del ADN de los espermatozoides (Waterhouse et al., 2010).

2.2.1. Dilutores para la congelación

El dilutor es una solución acuosa que permite incrementar el volumen del eyaculado, conservando las características vitales de los espermatozoides y manteniendo la fertilidad (Gadea, 2003). Asimismo, debe cumplir ciertos requerimientos vinculados con su pH, capacidad buffer, osmolaridad y fuerza iónica. Además, han de proporcionar una fuente de energía para el espermatozoide, y conservar sus propiedades durante el almacenamiento previo a su uso. También, debe aportar protección a la célula espermática frente a los efectos de refrigeración, congelación y descongelación. Por último, debe inhibir el crecimiento bacteriano (Melrose, 1962; Mann, 1964).

En los últimos años los dilutores no ha experimentado cambios significativos en su composición. Generalmente, los dilutores utilizados para la criopreservación de semen incluyen como principales componentes: agua bidestilada (disolvente), sustancias iónicas y no iónicas (buffer), materiales orgánicos (yema de huevo o leche), agentes crioprotectores

(normalmente glicerol), azúcares simples (fuente de energía y crioprotectores) y antibióticos. (Salisbury et al., 1978; Vishwanath y Shannon, 2000; Barbas y Mascarenhas, 2009).

2.2.2. Crioprotectores

Los crioprotectores tienen la función de proteger a las células espermáticas de las lesiones generadas en el proceso de criopreservación, y en las últimas décadas se han descubierto varios compuestos con propiedades crioprotectoras sobre las células. Asimismo, el grado de penetración en las membranas celulares ha determinado la clasificación de los crioprotectores en agentes penetrantes o no penetrantes (Meryman, 1971).

Algunos crioprotectores penetrantes son: glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), el metanol y algunos polialcoholes (Jones y Martín, 1965; Nagase y Tomizuka, 1968; Salamon, 1968; Wilmut y Polge, 1977). Dentro de estos crioprotectores destaca el glicerol, considerándose el crioprotector universal más utilizado en los espermatozoides de especies mamíferas (Polge et al., 1949). La eficacia de este crioprotector ha sido atribuida a su capacidad de capturar el agua y contribuye a la formación de pequeños cristales de hielo (Medeiros et al., 2002).

Dentro de los crioprotectores no penetrantes tenemos: proteínas, azúcares de elevado peso molecular y polivinilpirrolidona. Estos crioprotectores no penetrantes actúan inhibiendo la formación de grandes cristales de hielo en el interior de las células, a través de la deshidratación celular durante la congelación, y como efecto de su capacidad osmótica. Asimismo, podemos mencionar que la eficiencia de estos crioprotectores se da en congelaciones rápidas. (Nagase y Tomizuka, 1968; Watson, 1990).

2.2.2.1. Lecitina de soya

La lecitina de soya es un complejo de fosfolípidos formado por fosfatidilcolina (FC), fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol, siendo la FC el componente principal de la lecitina con un 98 por ciento (Tamargo et al., 2011; Torres y Duran, 2015).

La inclusión de la lecitina de soya en los dilutores de criopreservación al parecer no tiene efecto citotóxico en las células espermáticas (Fiume, 2001), ni consecuencia desfavorable en la motilidad de los espermatozoides (Hong et al., 1986). Igualmente, Ricker et al., (2006), especificaron el proceso de estabilización de la membrana espermática de equinos, notando la presencia de compuestos lipídicos en la membrana. Además, observaron un efecto protector en la movilidad, viabilidad y fertilidad generada por dos dilutores con lecitina de soya como estabilizador de membrana.

Actualmente existen varios diluyentes comerciales que contienen en su composición la lecitina de soya y que han sido probados en diferentes especies con resultados heterogéneos como el dilutor Biociphos Plus en toro (Muiño, 2008), Andromed en toro (Arbaiza, 2020), el Bioexcell en carnero (Gil et al., 2003) o el Botu-Crio en caballo (Papa et al., 2011).

2.2.2.2. Liposomas

Un liposoma es una vesícula provista del mismo material que una membrana celular. Las membranas regularmente están hechas de fosfolípidos, que son moléculas anfipáticas. En la naturaleza, los fosfolípidos se hallan en membranas estables compuestas de dos capas (Hernández, 2017).

Los liposomas son moléculas insolubles en agua, pero forman dispersiones coloidales. La parte polar o cabeza se ubica de tal forma que encierra el compartimiento acuoso, mientras que las colas se sitúan enfrentadas entre sí, formando una bicapa. La organización de los liposomas depende de la naturaleza química, longitud y grado de saturación de las cadenas hidrocarbonadas presentes, el pH y la carga iónica. Por otro lado, los fosfolípidos son los compuestos más utilizados en la producción de liposomas, la diferencia de éstos depende del grupo que se une al fosfato. Así, se pueden unir aminoalcoholes (fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina), aminoácidos (fosfatidilserina), alcoholes (fosfatidilglicerol) y azúcares (fosfatidilinositol). En general, fosfatidilcolina (lecitina) es el fosfolípido más utilizado en la elaboración de liposomas, debido a que es sencillo obtenerlo a partir de la yema de huevo y de la semilla de soja (Torello et al., 2002).

En la actualidad se han realizado experimentos con el dilutor Optixcell, el cual presenta liposomas en su composición y ha sido probado en distintas especies como en toros (Lima-Verde et al., 2018; Murphy et al., 2018; Miguel-Jimenez et al., 2020) y búfalos (Ropke et al., 2011; Kumar et al., 2015; Naz et al., 2018; Singh et al., 2018).

2.2.3. Efectos de la criopreservación sobre el espermatozoide

Durante la congelación, ocurren varios cambios biofísicos que se presentan dentro de la muestra de semen. Uno de ellos es la formación de cristales de hielo extracelular, como efecto del descenso de temperatura. Asimismo, se incrementa la concentración molar de los solutos en medio extracelular por efecto de los azúcares simples, iones y proteínas. En consecuencia, hay una variación de la presión osmótica provocando la deshidratación de los espermatozoides, debido a que el agua dentro de las células espermáticas es más lenta para formar cristales de hielo, el agua pasa al medio externo (Watson, 2000).

Las lesiones en las células espermáticas suceden especialmente durante el proceso de congelamiento y descongelamiento, viéndose afectadas estructuras como la membrana plasmática, el acrosoma y la mitocondria (Crabo, 2001). Las lesiones en estas estructuras se presentan mayormente entre los -15°C a -60°C de temperatura, descartándose daños espermáticos a la hora del almacenamiento en nitrógeno líquido a -196°C . Además, muestran lesiones de tipo mecánico, químico y osmótico, e incluso la adición del crioprotector causa daños a los espermatozoides (Parks y Graham, 1992).

En consecuencia, los espermatozoides sufren una disminución de viabilidad del 50 al 60 por ciento debido al estrés osmótico y la formación de hielo intracelular durante el congelamiento seminal, provocando cambios en la función y estructura de la célula, y que da como consecuencia la pérdida de motilidad espermática, presentando valores entre 40 a 50 por ciento (White, 1993; Chaveiro et al., 2006; Ramonez, 2013). Asimismo, el proceso de criopreservación ocasiona daño en la estructura de la membrana espermática, permitiendo el aumento de su permeabilidad (Guthrie y Welch, 2005). Además, puede causar una reacción acrosómica prematura, disminuyendo la vida del espermatozoide y su fertilidad; de igual forma altera la integridad del ADN de los espermatozoides (Watson, 1995; Waterhouse et al., 2010).

2.3. Evaluación de la calidad seminal

La evaluación de la calidad seminal o espermiograma es importante en todo centro de inseminación artificial (IA), debido a que nos permiten predecir la capacidad fecundante de las células espermáticas del reproductor. Asimismo, a lo largo de los años se han desarrollado diferentes pruebas in vitro para las muestras de semen como la evaluación de la motilidad, concentración, morfología y la funcionabilidad de la membrana espermática. Actualmente, estas pruebas se pueden realizar mediante sistemas computarizado de análisis seminal (CASA), permitiendo reducir los tiempos de análisis y obteniendo datos más objetivos sobre las características estructurales y funcionales de las células espermáticas (Muiño, 2008).

2.3.1. Concentración espermática

La concentración espermática mide el número de espermatozoides por mililitro de un eyaculado, y esta concentración varía entre 800-2000 millones de espermatozoides/ml en los

toros. Además, los eyaculados presentan diferencias de concentración espermática notorias entre reproductores (Hafez, 2000).

La concentración puede calcularse mediante distintas técnicas como: hemocitómetro (Büker, Thoma, Naubauer), espectrofotometría o citometría de flujo (Woelders, 1990; Olegario et al., 2007). Al principio se utilizaba el hemocitómetro como técnica frecuente en los centros de IA, pero la evaluación de varias muestras de semen demandaba mucho tiempo (Boixo, 1996). Por tal motivo, se utilizó la técnica de espectrofotometría, mediante el uso de un equipo de espectrofotómetro. Esta técnica se basa en la absorción o dispersión de la luz provocada por los espermatozoides en suspensión, y de manera indirecta permite estimar la concentración espermática. En consecuencia, el uso del hemocitómetro se utiliza para evaluar un número reducido de muestras, y para determinar la curva de calibración de espectrofotómetros (Olegario et al., 2007).

Varios centros de IA aseguran que cada dosis seminal presenta como mínimo 10 millones de espermatozoides vivos y con motilidad progresiva, con lo cual garantizan la fertilidad. Sin embargo, en algunos reproductores extraordinarios pueden disminuirse a valores de 5 o 6 millones de espermatozoides vivos por dosis sin afectar su capacidad fecundante (Januskaukas et al., 1996).

2.3.2. Motilidad y cinética

La motilidad es un parámetro necesario para el desplazamiento de los espermatozoides a través del tracto reproductor de la hembra, y así llegar a fecundar el ovocito. Asimismo, la motilidad presenta una correlación positiva con la viabilidad e integridad de la célula espermática. Sin embargo, este parámetro de calidad seminal por sí solo no predice la aptitud fecundante del espermatozoide (Holt y Van Look, 2004; Ormachea et al., 2019)

El análisis de la motilidad espermática se puede evaluar de manera subjetiva, y se define como la valoración visual de la motilidad espermática, siendo el análisis más simple, accesible y económico. Sin embargo, los resultados obtenidos dependen fundamentalmente de la habilidad y experiencia del observador, provocando un error humano involuntario al realizar la evaluación (Graham et al., 1980; Rodríguez-Martínez, 2000). Por otro lado, existe un método indirecto que se basa en el uso de equipos que emplean sistemas computarizados de análisis seminal denominados CASA, permitiendo obtener datos objetivos y repetibles de la motilidad, así como los parámetros cinéticos de los espermatozoides (Davis et al., 1995). Además, permite describir a través del seguimiento del desplazamiento, características del

movimiento flagelar de los espermatozoides asociándolas a su estado funcional (Kastelic y Thundathil, 2008).

Los equipos CASA presenta varias unidades interdependientes como: un microscopio de contraste de fases conectado a una cámara de vídeo, que envía una imagen desde el microscopio a un monitor. Luego, la imagen es enviada desde el monitor a una computadora, donde un analizador digital de imagen captura varias fotografías seriadas de cada campo del microscópico, realizándose en menos de 1 segundo. El software diferencia a los espermatozoides de otras partículas que puedan aparecer en la imagen por su tamaño, y analiza la trayectoria recorrida por cada espermatozoide individual durante esa fracción de segundo (Verstegen et al., 2002).

Amann y Katz, (2004) mencionaron que el análisis del desplazamiento de la cabeza del espermatozoide a través de los sistemas CASA presentan varios parámetros generales; entre estos hallamos el porcentaje de espermatozoides inmóviles, lentos, medios, rápidos y progresivos. Asimismo, otros parámetros precisan la cinética de cada espermatozoide como la velocidad curvilínea (VCL), la velocidad media (VAP) y la velocidad rectilínea (VSL), los índices de linealidad (LIN), rectitud (STR) y de oscilación (WOB), obtenidos de las variables anteriores.

A pesar que los principios básicos utilizados para el análisis de las imágenes digitalizadas son similares en los diferentes sistemas CASA, existen diferencias visibles 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 estos son expresados en los resultados finales. (Davis y Katz, 1993; Davis y Siemers, 1995; Irving, 1995; Krause, 1995; Mortimer, 2000). Por tal motivo, Verstegen et al., (2002) mencionaron que los diferentes sistemas CASA no presentan una estandarización y optimización de los equipos, y de los procedimientos empleados en los análisis, lo cual genera resultados distintos para los mismos parámetros en evaluación. Además, que existen una serie de consideraciones prácticas y biológicas que afectan a los resultados obtenidos con el CASA.

2.3.3. Viabilidad

La membrana plasmática del espermatozoide es importante para la fecundación, una membrana plasmática intacta y funcional es fundamental para que la célula espermática pueda realizar los eventos de capacitación y reacción acrosomal oportuna, y finalmente

penetrar al ovocito. Estos eventos desarrollados simultáneamente determinan la capacidad fecundante de un espermatozoide (Jeyendran et al., 1984; Burks y Saling, 1992)

La evaluación de la viabilidad espermática se puede realizar con el uso de tinciones supra vitales y mediante microscopía óptica convencional. Sin embargo, su uso se encuentra restringido a la evaluación del semen fresco, debido a que el glicerol y otros aditivos utilizados en el proceso de congelación del semen interfieren con la coloración. Los colorantes más usados en la evaluación seminal convencional son el Azul tripan y la Eosina-Nigrosina, permitiendo observar la cabeza del espermatozoide muerto de color azul en el caso del Azul tripan o color rosado en el caso de la Eosina-Nigrosina. El espermatozoide viable con la membrana plasmática íntegra, rechaza el colorante y no presenta coloración (Swanson y Bearden, 1951).

En la actualidad se usan técnicas específicas para valorar la viabilidad espermática que aplican un marcaje fluorescente del ADN, mediante el uso de dos fluorocromos combinados: uno de ellos sólo es capaz de atravesar las membranas plasmáticas dañadas o degeneradas, y por tanto permite identificar a las células muertas o en proceso de degeneración, mientras que el otro es capaz de atravesar membranas celulares intactas, permitiendo identificar la población de células viables (Garner, 1997). Las tinciones más comunes son el SYBR-14 y el ioduro de propidio (PI), rodamina 123, naranja de acridina y Hoescht 33342 (Gillan et al., 2005).

El SYBR-14 suele utilizarse en combinación con PI y de esta forma se pueden distinguir dos poblaciones espermáticas, una de ellas constituida por células muertas o en estado de degeneración, cuyas membranas plasmáticas son permeables al PI, y por tanto emiten fluorescencia roja; y la otra constituida por espermatozoides viables, cuyas membranas intactas son impermeables al PI, pero dejan entrar el SYBR-14, y por tanto emiten fluorescencia verde. Un fluorocromo con un mecanismo similar al del SYBR-14, capaz de identificar espermatozoides vivos, es el Hoechst 33342. Este compuesto también entra en células vivas y se une al ADN espermático, sin embargo, su uso está limitado por la longitud de onda de su espectro de excitación, que está en el rango ultravioleta (Muiño, 2008).

En relación a la valoración de la viabilidad espermática, este ha sido uno de los parámetros seminales más estudiados debido a que juega una función decisiva en la fecundación (Cabrera y Pantoja, 2012), y solo los espermatozoides que son viables podrán realizar la

reacción acrosomal de manera sincronizada con la fase de penetración del ovocito y, como efecto, fusionarse con éste para producir un embrión (Januskauskas et al., 2001).

2.3.4. Test de endosmosis

El test de endosmosis o HOS tiene como objetivo evaluar si una membrana está intacta y es bioquímicamente activa, considerando que el espermatozoide sea móvil y que sea capaz de realizar la fecundación, no así ocurre con el espermatozoide que se encuentra en malas condiciones y que no será capaz de fecundar (Zavos, 1990).

La prueba HOS, fue diseñada para evaluar la función de la membrana del espermatozoide (Jeyendran et al, 1984). Su principio se basa en la observación de las alteraciones morfológicas (aumento de tamaño) en los espermatozoides expuestos a condiciones hipoosmóticas (Correa y Zavos, 1994). La prueba hipoosmótica tiene como principio colocar una muestra de espermatozoides en un medio hipoosmótico produciendo un desequilibrio osmótico entre el medio extracelular e intracelular, generando que la célula compense fisiológicamente circulando agua al medio intracelular y, como consecuencia aumenta su volumen y se observan cambios morfológicos en los flagelos o colas como enrollamiento de los mismos, con la cual se comprueba que la membrana plasmática tiene un actividad funcional normal (Sánchez y Garrido, 2013).

En toros, como en otras especies, se han señalado correlaciones altas y positivas entre el HOS y el porcentaje de espermatozoides vivos, la motilidad espermática, el porcentaje de espermatozoides normales y la fertilidad in vivo e in vitro, tanto del semen fresco como para el semen descongelado (Aisen et al., 2002). El ensayo HOS también puede resultar útil para evaluar el daño de la membrana inducido mediante procedimientos de criopreservación (Zavos, 1990). Así mismo, para realizar la prueba de HOS en bovinos, se ha sugerido el uso de fructosa y citrato de sodio diluido en agua destilada a 100 mOsm/l (Jeyendran et al., 1984; Correa y Zavos, 1994).

III. METODOLOGÍA

3.1. Localización

El presente estudio se realizó en las instalaciones del Banco Nacional de Semen del Programa de Mejoramiento Animal de la Universidad Agraria La Molina (UNALM), ubicado en el distrito de la Molina, Lima, durante los meses de enero, febrero y marzo del 2020. El clima presenta temperaturas mínimas mensuales promedio de 21 °C y máximas de 26 °C, una humedad promedio del 82 por ciento durante los tres meses de evaluación (Senamhi, 2020).

3.2. Descripción del recurso animal

Se trabajó con cuatro toros de la raza Brown Swiss, que tenían edades entre 3 a 6 años de edad; estos se hallaban sujetos a un régimen de colecciones de una vez por semana. Los toros utilizados fueron: Sequion Thunder CD “ANÍBAL” registro genealógico 13998, de seis años de edad; Molinero Cadence Dyanasty “BOLT” registro genealógico 14122, de cinco años de edad; Zech Cadence Atwood “RANGER” registro genealógico 14330, de tres años de edad; Zech Thuunder Atwood “SAN MARTIN”, registro genealógico 14206, de cuatro años de edad.

Los toros estaban albergados en corrales independientes, con piso de concreto y tierra, cercos de madera, dotado de sombras, comedero y bebedero. A todos los animales se les paseó por un tiempo de 60 minutos, el día anterior a la colección. Este paseo es una vez por semana. La alimentación fue a 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.

Por otro lado, los animales cumplieron con las normas de bioseguridad sanitaria del Banco Nacional de Semen UNALM, manifestando resultados negativos para la prueba de Brucelosis bovina, Tuberculosis bovina, Leucosis bovina, Lengua Azul, Diarrea viral bovina (BVD), Rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR) y paratuberculosis bovina; certificado por el



Figura 1: Toros raza Brown Swiss en brete de espera previo a la colecta.

3.3. Colección de semen

Los toros se colectaron una vez por semana, utilizando otro toro chantador como estímulo, fijado a un brete de colección, bajo sombra, y con piso antideslizante. Se realizó un paseo previo a la colección con montas falsas permitiendo una mayor excitación, lo cual permitirá obtener eyaculados de mejor calidad.

Se utilizó una vagina artificial (Marca-IMV), la cual ofrece los medios semejantes de presión y temperatura al de una vagina natural, durante la colección. La temperatura interior de la vagina es ajustada a 38 °C. Por otro lado, los tubos de colección estuvieron adecuadamente rotulados y preservados del medio ambiente con papel aluminio y funda. Se efectuaron un total de 40 colecciones de semen y se obtuvieron 10 eyaculados por toro.

3.4. Dilutores y procesamiento de semen

Se seleccionaron para esto dos dilutores: Andromed® (Tratamiento 1) y Optixcell® (Tratamiento 2).

3.4.1. Dilutor Andromed

Andromed® dilutor elaborado por la empresa Minitube Alemania, a partir de extracto de soya siendo aportante de fosfolípidos. Además, contiene TRIS, ácido cítrico, azúcares, antioxidantes, tampones, glicerina, agua de alta pureza y antibióticos (Tilosina, Gentamicina, Espectinomicina y Lincomicina), no contiene proteínas de origen animal (Minitube, s. f.)

La presentación de 200 ml que tiene el frasco de Andromed® se procedió a preparar siguiendo los protocolos del fabricante, para esto se añadió 800 ml agua bidestilada; a continuación, es depositado en un matraz Erlenmeyer y temperado a 34 °C en baño maría obteniendo finalmente 1 litro de dilutor de trabajo; y se dejó incubando por 10 minutos previo a su utilización.

Conseguido el eyaculado, se efectuó la pre dilución (1:1) adicionando el dilutor en el mismo volumen del semen en el tubo graduado utilizado para la colección y se colocó en el baño maría a 34°C. Se calculó el número de pajillas a conseguir en función a la concentración y volumen del eyaculado por la constante 0.8 que mostraría una tasa esperada del 80% de motilidad y por 0.8 que mostraría una tasa de viabilidad del 80%; esto dividido por el número de espermatozoides por dosis (30 millones).

El dilutor restante se añadió en un solo paso, anteriormente temperado en baño maría a una temperatura de 34°C para impedir el choque térmico de los espermatozoides, posterior a esto se vertió el semen pre diluido lentamente por las paredes del matraz, y se homogeneizó gradualmente, se esperó un tiempo aproximado de 10 minutos a fin de que la solución se estabilice, finalmente se examinó en el microscopio para comprobar la motilidad, siendo este parámetro nuestro control de calidad.

3.4.2. Dilutor Optixcell

Optixcell® dilutor producido por la empresa IMV Technologies Francia, elaborado por la combinación de fosfolípidos preparados artificialmente (imitando las características de la yema de huevo) y organizados en liposomas. Además, contiene carbohidratos, sales minerales, tampón, antioxidantes, glicerol, agua ultrapura, antibióticos (Gentamicina, Tilosina, Espectinomicina y Lincomicina), no contiene proteína de origen animal (IMV Technologies, 2017)

Siguiendo el protocolo de la empresa se procedió a llenar un matraz Erlenmeyer con doble de volumen de un frasco de OptiXcell® (500ml) de agua bidestilada, obteniéndose

finalmente 750 ml de dilutor de trabajo. Para la dilución del volumen total se colocó en baño maría a 34 °C y se dejó incubando por 10 minutos previo a su utilización.

Conseguido el eyaculado, se efectuó la pre dilución (1:1) adicionando el dilutor en la misma proporción del semen en el tubo graduado y se colocó en el baño maría a 34°C. Se estableció el número de pajillas a conseguir en función a la concentración por el volumen espermático del eyaculado por la constante 0.8 que mostraría una tasa esperada del 80% de motilidad y por 0.8 que mostraría una tasa de viabilidad del 80% esto dividido por el número de espermatozoides por dosis (30 millones).

El dilutor restante se añadió en un solo paso, anteriormente temperado en baño maría a una temperatura de 34°C para impedir el choque térmico de los espermatozoides, posterior a esto se vertió el semen pre diluido lentamente por las paredes del matraz, y se homogeneizó gradualmente, se esperó un tiempo aproximado de 10 minutos a fin de que la solución se estabilice, finalmente se examinó en el microscopio para comprobar la motilidad, siendo este parámetro nuestro control de calidad.

3.4.3. Envasado del semen en pajillas y descenso de temperatura.

Se efectuó la identificación de las pajillas (0,5 cc), codificadas con el registro del toro 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.

Posteriormente, se procedió a realizar descenso de la temperatura colocando las pajillas en cubetas con agua a temperatura ambiente, y luego se llevó el semen a refrigeración, descendiendo la temperatura 34 °C para los dilutores Andromed y OptiXcell (temperatura baño María), luego a 20°C (temperatura ambiental del laboratorio) y finalmente a 5°C en refrigeración en un periodo de 20 a 24 horas para su equilibrio y posterior congelación.

3.5. Evaluación de los parámetros seminales post-descongelación

Para determinar la calidad seminal de las dosis procesadas post-descongelación se procedió a realizar las siguientes evaluaciones: motilidad, cinética espermática, viabilidad y la prueba de HOS. Estas evaluaciones determinaran el efecto del proceso de criopreservación, sobre las células espermáticas. Asimismo, determinara si las dosis de las pajillas procesadas son viables para la inseminación artificial.

3.5.1. Motilidad y cinética espermática

La evaluación de la motilidad espermática se ejecutó con un equipo CASA de software (Minitube AndroVision) versión 1.7. Este sistema se compone de un microscopio de fluorescencia (Axio Scope.A2 - Carl Zeiss Microscope Fluoresence) acoplado a una cámara de vídeo digital (Basler A302 fs), esta envía la imagen desde el microscopio a un monitor en tiempo real a través del objetivo de contraste de fases 20x, en donde un analizador digital de imagen captura varios fotogramas seguidos de cada campo. El software diferencia a los espermatozoides de otras partículas que puedan obtenerse en la imagen por su tamaño, y reconoce el desplazamiento del espermatozoide individual, la velocidad de las células, el movimiento rectilíneo, circular o lateral.

Para la evaluación de los parámetros cinéticos se consideró el análisis de tres campos obteniéndose un promedio de estos en los siguientes valores por eyaculado. El sistema admite evaluar la velocidad de los espermatozoides, definidos por Amann y Katz (2004);

- Velocidad curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$): velocidad media medida punto a punto sobre el recorrido de la cabeza espermática. Es la distancia total que la cabeza del espermatozoide cubre en el período de observación y es siempre el mayor de los tres parámetros de velocidad
- Velocidad media (VAP, $\mu\text{m/s}$): velocidad media del recorrido del espermatozoide. Se determina como la distancia que el espermatozoide ha seguido en su trayectoria durante el período de observación. Puede parecer similar a la VSL
- Velocidad rectilínea (VSL, $\mu\text{m/s}$): velocidad media medida en una línea recta desde el principio hasta el final de la trayectoria recorrida. Se determina como la distancia en línea recta entre el primero y el último punto de la trayectoria y da el espacio recorrido en el período de observación. Es siempre el menor de los tres parámetros de velocidad en cualquier espermatozoide.
- Índice de linealidad (LIN, %): estima la proximidad de las trayectorias de las células espermáticas a una línea recta. Se calcula como el cociente entre la velocidad media medida en una línea recta (VSL) y la velocidad media medida punto a punto a lo largo del recorrido (VCL) $\rightarrow (VSL / VCL) \times 100$.
- Índice de rectitud (STR, %): estima la proximidad del recorrido seguido por las células espermáticas a una línea recta y se calcula como cociente entre la velocidad media

medida en una línea recta desde el primer punto hasta el último de la trayectoria recorrida (VSL) y la velocidad media del recorrido del espermatozoide (VAP) $\rightarrow (VSL / VAP) \times 100$.

- Índice de oscilación (WOB, %): estima la relación entre la trayectoria recorrida por el espermatozoide y la oscilación de la cabeza espermática y se calcula como cociente entre la velocidad media del recorrido del espermatozoide (VAP) y la velocidad media medida punto a punto sobre el recorrido de la cabeza espermática (VCL) $\rightarrow (VAP / VCL) \times 100$.
- Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (ALH, $\mu\text{m/s}$): es el desplazamiento medio efectuado por la cabeza del espermatozoide en su trayectoria curvilínea de un lado a otro de la trayectoria media o lineal.
- Frecuencia de batido de la cabeza del espermatozoide (BCF, Hz): Frecuencia con la cual la trayectoria curvilínea atraviesa la línea media en función del tiempo.

Con estos parámetros de velocidad espermática el sistema clasifica la motilidad espermática en las siguientes clases:

- Motilidad Progresiva (MP): espermatozoides porcentaje que presentan movimiento con un índice de rectitud (STR) $\geq 75\%$ dentro de la muestra.
- Motilidad Rápida (MR): espermatozoides móviles con VCL superior al $>80 \mu\text{m/sg}$
- Motilidad Lenta (ML): espermatozoides analizados espermatozoides con VCL menor a $80 \mu\text{m/sg}$, pero superior a $10 \mu\text{m/sg}$
- Motilidad Circular (MC): espermatozoides analizados que presentan un Radio mayor $10.0 \mu\text{m}$, pero menor a $80.0 \mu\text{m}$ y con una rotación $>0.70 \mu\text{m/s}$
- Motilidad Local (MLc): son los espermatozoides analizados con VSL menor a $10.0 \mu\text{m/s}$ y VCL menor a $48.0 \mu\text{m/s}$
- Espermatozoides inmóviles (I): son el porcentaje de espermatozoides que presentan un VCL menor a $24.0 \mu\text{m/s}$ y ALH menor a $1.0 \mu\text{m/s}$.



Figura 2: Evaluación de motilidad y parámetros cinéticos espermático sistema CASA.

3.5.2. Viabilidad

La viabilidad de los espermatozoides se evaluará mediante la integridad de la membrana y se utilizará el kit de fluorescencia Hoechst 33342/PI. Según las especificaciones del protocolo se tomó una alícuota de semen diluido de 35ul y se mezcló con 1.5ul de tinción de Hoechst 33342/PI en un tubo de eppendorf y se incubó por 15 minutos a 38 ° C. Luego se colocó 10ul de la muestra en un portaobjeto para su evaluación utilizando el módulo de análisis de fluorescencia viabilidad espermática del software Andro Visión.

Una vez colocada la muestra se observó con un objetivo de 20x, tomándose tres campos diferentes para contar 400 células espermáticas. El colorante Hoechst 33342 es permeable para las membranas y se adosa específicamente a las regiones A-T del ADN, marcando de azul a todos los espermios. El colorante PI (Yoduro de Propidio) penetra exclusivamente las membranas dañadas, sobreponiéndose al color del ADN azul. Los espermios con membranas dañadas aparecen de rojos. Ambos colorantes son excitados por una longitud de onda de 460 nm. La frecuencia de vivos y muertos se expresó en porcentaje.

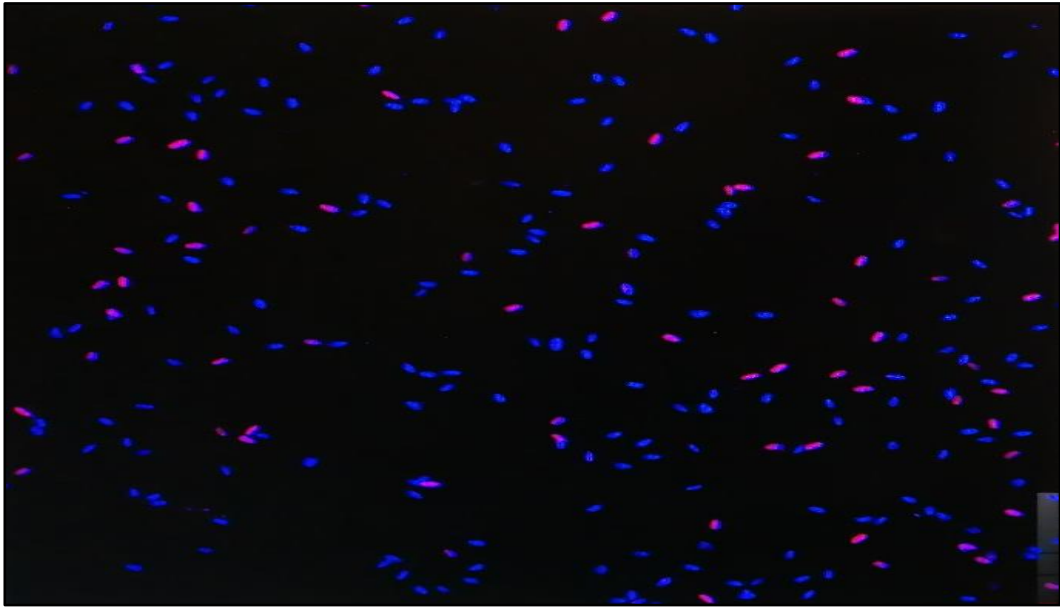


Figura 3: Análisis de viabilidad mediante sistema CASA. Espermatozoides azules = Viables / Espermatozoides rojos = No viables

3.5.3. Test de Endosmosis

El test de Endosmosis (hypoosmotic swelling test, HOS) se realizó mediante una solución hiposmótica de citrato de sodio 100 mOsm/L. (Jeyendran, et al., 1984). Una muestra de 25ul semen diluido será depositada e incubada por 60 minutos en 500ul de solución hiposmótica, finalizado este tiempo se adicionará 200 ul de metanol y 25ul de eosina, y se realizará el frotis en una lámina portaobjetos. Finalmente se contó 200 espermatozoides en un microscopio de contraste de fase a 40x, considerándose positivos los que presentaban la cola enrollada.

Los espermatozoides con membrana plasmática íntegra y con los mecanismos de intercambio de fluidos funcionando correctamente, reaccionaron a la prueba de HOST con un hinchamiento y enrollamiento del flagelo, y se consideró como endósmosis positiva (+). Por otra parte, 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 y Zavos, 1994). Los resultados se expresaron en porcentajes de reacción total de espermatozoides con membrana funcional positiva.

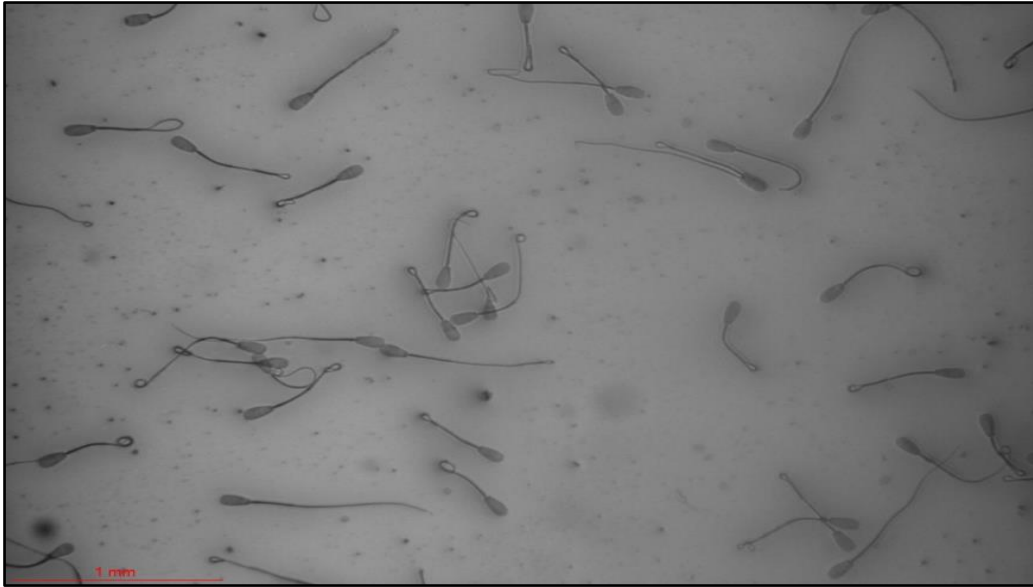


Figura 4: Test endosmosis (HOS). Espermatozoides con hinchamiento o enrollamiento del flagelo = endosmosis positiva / Espermatozoide sin hinchamiento o enrollamiento del flagelo = endosmosis negativa.

3.6. Criopreservación de semen

La congelación de semen se efectuó utilizando un protocolo de congelación lenta progresiva. Se inició el descenso de temperatura de 5°C a 0°C. Cuando el sensor de temperatura alcanza 0°C se enciende el equipo de congelación y se controló de manera manual el descenso constante de temperatura de 20 °C por minuto durante 7 minutos hasta que llegó a – 140 °C luego se abrió la caja de congelamiento y se sumergió las pajillas dentro del nitrógeno líquido a -196°C, se completará con nitrógeno líquido si fuera necesario con la ayuda de una pinza y un goblet grande para que las pajillas queden completamente sumergidas.



Figura 5: Equipo para criopreservación de pajillas de semen

La descongelación se efectuó después de siete días de congeladas las pajillas, se procedió a sacar del tanque de nitrógeno y cuidadosamente se sumergió las pajillas en el termo con agua temperada a 37°C, durante 20 segundos, para luego secarlo y hacer la respectiva evaluación de las muestras descongeladas, se evaluó los parámetros cinéticos de motilidad espermática, viabilidad y test de endosmosis.

3.7. Análisis estadístico

Con el objetivo de evaluar el efecto de dos dilutores a base de lecitina de soya (Andromed®) y liposomas (Optixcell®) sobre la motilidad, la viabilidad, funcionalidad de la membrana y cinética espermática, los datos fueron sometidos la prueba Shapiro-Wilk para determinar la normalidad y al Test de Levene para la homogeneidad de varianzas, demostrando significancia para estas pruebas por tal motivo se realizó un análisis de varianza (ANVA). Para esta evaluación se empleó un Diseño de Bloques Completamente al Azar (DBCA), con dos tratamientos y diez repeticiones, considerando como bloque a los toros. En el análisis de varianza (ANVA) los datos se analizaron con el programa estadístico Statgraphics Centurion. Se consideraron diferencias estadísticas significativas a valores de $P < 0.05$.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se presentarán los resultados de la evaluación de calidad seminal post-descongelación al comparar dos dilutores comerciales basados en lecitina de soja Andromed® y basados en liposomas Optixcell®. Asimismo, se explicará el porqué de las similitudes o diferencias de los resultados al comprar ambos tratamientos en estudio. Además, se presentarán dos tablas con los resultados de motilidad y cinética espermática en la Tabla 1, y viabilidad y funcionalidad de la membrana espermática en la tabla 2.

4.1. MOTILIDAD TOTAL Y PROGRESIVA DE ESPERMATOZOIDES POST-DESCONGELACIÓN.

Tabla 1: Motilidad y cinética espermática de los espermatozoides post-descongelación.

Parámetros	Unid.	N	ANDROMED (T1)	OPTIXCELL (T2)
Motilidad Total	%	40	75.20 ± 8.033 a	75.51 ± 9.348 a
Motilidad Progresiva	%	40	64.27 ± 8.782 a	66.34 ± 10.020 a
Velocidad Curvilínea (VCL)	µm/s	40	101.85 ± 20.310 a	103.30 ± 20.579 a
Velocidad Rectilínea (VSL)	µm/s	40	45.06 ± 9.195 a	43.01 ± 9.544 a
Velocidad Media (VAP)	µm/s	40	54.27 ± 10.511 a	54.24 ± 10.261 a
Índice de Linealidad (LIN)	%	40	44 ± 0.046 a	42 ± 0.048 a
Índice de Rectitud (STR)	%	40	83 ± 0.036 a	80 ± 0.055 a
Índice de Oscilación (WOB)	%	40	54 ± 0.039 a	53 ± 0.031 a

Media ± Error estándar

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

Los resultados de motilidad espermática obtenidos al comparar el efecto de dos dilutores uno a base de lecitina de soja (Andromed®) y otro de liposomas (Optixcell®), mediante sistema CASA post-descongelación se muestra en la Tabla 1. No presentaron diferencia estadística significativa (P<0.05) entre tratamientos para la motilidad total y motilidad progresiva. Los resultados de volumen y concentración espermática se presentan en el Anexo 2.

En los resultados obtenidos para la motilidad total post-descongelación determinó que no existe diferencia significativa (P<0.05) entre los tratamientos T1 y T2. Se hallaron valores

con T1 de 75.20 por ciento y con el T2 de 75.51 por ciento. Dichos resultados concuerdan con Lima-Verde et al. (2018), quienes no encontraron diferencias significativas, hallaron motilidad total de 57.8 por ciento para el dilutor Andromed® y 58.9 por ciento para Optixcell®. Sin embargo, hubo diferencias reportadas por Murphy et al. (2018), reportando motilidad total de 41.93 por ciento y 59 por ciento empleando dilutores Andromed® y Optixcell® respectivamente.

La evaluación de la motilidad progresiva post-descongelamiento determino que no existe diferencia significativa ($P < 0.05$) entre el T1 y T2. Los valores porcentuales para el tratamiento T1 y T2 fueron de 64.27 por ciento y 66.34 por ciento respectivamente. Estos resultados coinciden con Lima-Verde et al. (2018), quienes encontraron motilidad progresiva similares de 53 por ciento para el dilutor Andromed® y 54.3 por ciento para Optixcell®. No obstante, Murphy et al. (2018) evaluando cinco toros de la raza Holstein Friesian reportaron diferencias significativas para la motilidad progresiva de 31.7 por ciento y 45.7, para Andromed® y Optixcell® respectivamente, al igual que Miguel-Jimenez et al. (2020) reportaron diferencias significativas, evaluando ambos dilutores.

Las diferencias entre los hallazgos de las investigaciones mencionados podrían deberse a las técnicas de criopreservación, la concentración de espermatozoides por dosis, la descongelación a la genética, la raza y las prácticas de manejo de los toros que podrían afectar la calidad de los espermatozoides (Anzar et al. 2002; Nichi et al. 2006; Morrell et al. 2018)

Kathiravan et al. (2008) mencionaron que el sistema CASA proporciona información completa y precisa sobre diferentes atributos de la motilidad de los espermatozoides. La cuantificación de la motilidad por el CASA es un indicio de la viabilidad e integridad del espermatozoide, además presenta una correlación de media a baja respecto a la fertilidad in vivo, no obstante, la combinación con otros parámetros más detallados de movimiento flagelar valorados mediante el CASA han sido correlacionados positivamente con la fertilidad en toros (Farrell et al., 1998; Gillan et al., 2008; Shojaei et al., 2012; Oliveira et al., 2013; Nagy et al., 2015).

4.2. PARAMETROS CINETICOS: VCL, VSL Y VAP DE ESPERMATOZOIDES POST-DESCONGELACION.

La evaluación de parámetros cinéticos de la motilidad espermática de las muestras obtenidas post-descongelación no mostraron diferencias estadísticas ($p < 0.05$, Tabla 1). En los resultados obtenidos para la velocidad curvilínea (VCL) post-descongelación no existe diferencia significativa entre los tratamientos T1 y T2. Se hallaron valores con T1 de 101.85 $\mu\text{m/s}$ y con T2 de 103.30 $\mu\text{m/s}$. Murphy et al. (2018), no encontraron diferencias significativas para VCL reportando valores de 143.7 $\mu\text{m/s}$ y 141.8 $\mu\text{m/s}$, con dilutor Andromed® y Optixcell® respectivamente, al igual que Miguel-Jimenez et al. (2020) reportando VCL de 123.5 $\mu\text{m/s}$ para el dilutor Andromed® y 123.5 $\mu\text{m/s}$ para Optixcell®. Algunos autores reportaron valores menores VCL para el dilutor Andromed® de 80.97 $\mu\text{m/s}$ y 75.22 $\mu\text{m/s}$ respectivamente (Ancco, 2017; Arbaiza, 2020).

En el análisis de los resultados de la velocidad rectilínea (VSL) post-descongelamiento, se determinó que no existe diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los tratamientos T1 y T2 (Tabla 1). Esto concuerda con Murphy et al. (2018), quienes no encontraron diferencias significativas para VSL, reportando valores de 55.4 $\mu\text{m/s}$ y 61.1 $\mu\text{m/s}$ para el dilutor Andromed® y Optixcell® respectivamente. Contrariamente a los hallazgos de este estudio se ha reportado diferencias significativas, obteniendo VSL de 48.85 $\mu\text{m/s}$ para el dilutor Andromed® y 42.28 $\mu\text{m/s}$ para Optixcell® (Lima-Verde et al. 2018). Igualmente, Singh et al. (2017) evaluando búfalos encontraron diferencias significativas, y obtuvieron VSL de 56.9 $\mu\text{m/s}$ y 63.5 $\mu\text{m/s}$ para Andromed® y Optixcell® respectivamente.

En cuanto a los valores de la velocidad media (VAP) no existe diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los tratamientos T1 y T2 con 54.27 $\mu\text{m/s}$ y 54.24 $\mu\text{m/s}$ respectivamente. Dichos resultados concuerdan con Miguel-Jimenez et al. (2020) quienes no encontraron diferencias significativas para VAP evaluados en toros Holstein Friesian, reportando valores de 72.7 y 72.6 para Andromed® y Optixcell® respectivamente. Por lo contrario, Lima-Verde et al. (2018) evaluando 12 toros híbridos reportaron diferencias significativas para VCL de 64.49 $\mu\text{m/s}$ y 60.25 $\mu\text{m/s}$ para Andromed® y Optixcell® respectivamente.

La diferencia en los parámetros cinéticos de trabajos similares puede deberse a la variación de la raza, y de los softwares utilizados para obtener los valores cinéticos, ISAS (Ancco, 2017), SpermVision (Lima-Verde et al., 2018), Biovis 2000 (Singh et al. 2018), IVOS-II

(Murphy et al., 2018), Sperm Class Analyzer (Miguel-Jimenez et al., 2020), los cuales presentan distintos discriminantes para su clasificación.

Cabe mencionar que los espermatozoides con velocidades relativamente mayores y movimiento más progresivo pueden considerarse células con mayor capacidad fertilizante (Quintero-Moreno et al., 2003). Al contrario, los espermatozoides con menor velocidad y no progresivos podrían ser indicio de una etapa tardía del deterioro celular y, por lo tanto, no se supondría que tuvieran capacidad fertilizante (Scott, 2000). Además, la cinemática del movimiento espermático posterior al descongelamiento registrados mediante el sistema CASA, tiene una correlación positiva con la fertilidad in vitro e in vivo en bovinos (Hallap et al., 2006; Kathiravan et al., 2008; Ahmed et al., 2016).

4.3. VIABILIDAD Y FUNCIONABILIDAD DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA ESPERMÁTICA POST-DESCONGELACIÓN.

Tabla 2: Viabilidad y Test de endosmosis de los espermatozoides post-descongelación.

Parámetros	Unid.	N	ANDROMED (T1)	OPTIXCELL (T2)
Viabilidad	%	40	60.65 ± 7.671 a	60.80 ± 8.786 a
Test de Endosmosis	%	40	49.05 ± 8.872 a	51.48 ± 8.794 a

Media ± Error estándar

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

Los valores obtenidos para la viabilidad entre los dos tratamientos no mostraron diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$, Tabla 2), siendo el valor para T1 y T2 de 60.65 y 60.80 por ciento respectivamente. Estos resultados concuerdan con Lima-Verde et al. (2018) quienes no hallaron diferencias significativas para la viabilidad, reportando valores de 38.8 por ciento y 48.5 por ciento para el dilutor Andromed® y Optixcell® respectivamente. Asimismo, Miguel-Jimenez et al. (2020) reportaron valores similares para la viabilidad, evaluando los dilutores Andromed® y Optixcell®. Algunos autores en trabajos similares obtuvieron valores de viabilidad para el dilutor Andromed® de 63.47 por ciento y 63.43 por ciento respectivamente (Damas, 2010; Arbaiza, 2020).

Las diferencias en los resultados obtenidos frente a otros estudios podrían ser debido a las razas de toros evaluados, los diferentes protocolos y fluorocromos usados en la evaluación de viabilidad espermática, como el SYBR-14/PI (Lima-Verde et al., 2018; Miguel-Jimenez

et al., 2020), la tinción de eosina-nigrosina (Damas, 2010) y Hoechst 33342/PI (Arbaiza, 2020).

En cuanto a la prueba de endosmosis realizada en la etapa post-descongelamiento no se observa diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los tratamientos T1 y T2 con el 49.05 por ciento y 51.48 por ciento respectivamente (Tabla 2). Los resultados obtenidos a la reacción a la prueba de endosmosis (HOS) para el dilutor Andromed post-descongelamiento son similares al reportado por Damas (2010) quien obtuvo 45.93 por ciento, al igual que Viñan (2017) quien reportó 46.89 por ciento; lo que indica que los resultados obtenidos en esta investigación, están dentro de los rangos reportados por otros investigadores, para la prueba de HOS. La prueba de resistencia osmótica, evalúa la integridad y funcionabilidad de la membrana espermática, permitiendo predecir con bastante confiabilidad la capacidad fértil de un toro, toda vez que se ha encontrado correlaciones altas y positivas con la tasa de fertilidad in vivo (Aisen et al., 2002).

El proceso de criopreservación producto del choque de frío modifica irreversiblemente los fosfolípidos de las membranas de los espermatozoides (Drobnis et al., 1993). Ante este escenario la lecitina de soja componente del dilutor Andromed® probablemente protege a los espermatozoides mediante la sustitución de los fosfolípidos de la membrana del esperma, una reducción del punto de congelación y la prevención de la formación de cristales de hielo intracelulares (Mutalik et al., 2014). Los fosfolípidos y liposomas protegen a los espermatozoides mediante la unión con las membranas o transformando su estructura mediante la regulación del intercambio de colesterol y fosfolípidos, mejorando las tasas de supervivencia de los espermatozoides de toro (Röpke et al., 2011).

Aunque los resultados discutidos anteriormente indican que los dos dilutores presentan el mismo efecto con respecto a la motilidad, parámetros cinéticos, funcionalidad e integridad de la membrana plasmática espermática. Esto podría explicarse debido a que los dilutores a base lecitina de soja (Andromed®) y a base liposomas (Optixcell®) presentan fosfolípidos con igual composición química, presentando mayor porcentaje de fosfatidilcolina en ambos dilutores (Zeron et al., 2002; Torres y Duran, 2015, Miguel-Jimenez et al., 2020). Por tal motivo la protección de la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides tiene el mismo resultado en el proceso de congelación-descongelación por ambos dilutores.

V. CONCLUSIONES

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

1. Se determinó que los espermatozoides criopreservados con dilutores a base de lecitina de soya y liposomas empleando el Sistema CASA, no presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$) al evaluarse la motilidad total, motilidad progresiva y parámetros cinéticos descriptores del movimiento espermático (VCL, VSL Y VAP) post-descongelación.
2. El uso de dilutores a base de lecitina de soya y liposomas protegen a los espermatozoides del proceso de criopreservación, debido a que los valores obtenidos en las pruebas de motilidad y viabilidad se encuentran dentro de los parámetros técnicos recomendados.
3. Los dilutores a base de lecitina de soya y liposomas mantienen el cincuenta por ciento de espermatozoides con funcionalidad de la membrana optima post- descongelación.

VI. RECOMENDACIONES

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

1. Realizar la evaluación del efecto de los dilutores sobre la fertilidad, a través de la inseminación artificial.
2. Aplicar otras pruebas especializadas para evaluar la capacidad fecundante de los espermatozoides post-descongelación.
3. Realizar investigaciones con otros dilutores comerciales con la finalidad de obtener mejores resultados de calidad seminal.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed, H.; Andrabi, S. & Jahan, H. (2016). Semen quality parameters as fertility predictors of water buffalo bull spermatozoa during low-breeding season. *Theriogenology*; 86: 1516–1522. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.05.010>
- Aires, V.A.; Hinsch, K.D. ; Mueller-Schloesser, F. ; Bogner, K. ; Mueller-Schloesser, S. & Hinsch, E. (2003). In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology*, 60(2), 269–279. Doi: [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(02\)01369-9](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(02)01369-9)
- Aisen, E.; Medina, V. & Ventrino, A. (2002). Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology*; 57: 1801-1808. Doi: [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(02\)00653-2](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(02)00653-2)
- Amann, R. & Katz, D. (2004). Andrology Lab Corner: Reflections on CASA after 25 years. *J. Androl*; 25:317-25. Doi: <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2004.tb02793.x>
- Ansari, M.; Rakha, B.; Akhter, S. & Ashiq, M. (2016). OptiXcell improves the postthaw quality and fertility of buffalo bull sperm. *Theriogenology*; 85: 528–532. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.09.035>
- Anzar, M., He, L., Buhr, M.M., Kroetsch, T.G., & Pauls, K.P. (2002). Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. *Biology of Reproduction*, 66, 354–360. Doi: <https://doi.org/10.1095/biolreprod66.2.354>
- Ávila-Portillo, L.; Madero, J.; Lopez, C.; Leon, M.; Acosta, L.; Gomez, C.; Lozano, J. & Reguero, M. (2006). Fundamentos de criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 57(4): 291-300. Doi: <https://doi.org/10.18597/rcog.468>
- Arbaiza, M. (2020). Efecto de la criopreservación en fragmentación del ADN, viabilidad, motilidad y cinética espermática en toros Brown Swiss empleando sistema CASA. (Tesis de maestría, Universidad Nacional Agraria la Molina). Perú. Págs. 77.

- Barbas, J. & Mascarenhas, R. (2009). Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell and tissue banking*; 10(1): 49–62. Doi: <https://doi.org/10.1007/s10561-008-9081-4>
- Bergeron, A. & Manjunath, P. (2006). New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Molecular reproduction and development*; 73(10): 1338–1344. Doi: <https://doi.org/10.1002/mrd.20565>
- Boixo, J.C., (1996). Valoración Laboratorial de la calidad seminal. Correlación con la fertilidad. *Inform. Vet.* pp: 33-37
- Burks, D.J. & Saling, P.M. (1992). Molecular Mechanisms of Fertilization and Activation of Development. *Animal Reproduction Science* 28(1-4): 79-86.
- Cabrera, P. & Pantoja, A. (2012). Viabilidad espermática e integridad del acrosoma en semen congelado de toros nacionales. *Rev. investig. vet. Perú*; 23:192-200. Recuperado de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172012000200009&lng=es&tlng=es.
- Castelo, T.; Frota, T. & Silva, A. (2008). Consideracoes sobre a criopreservacao do semen de caprinos. *Acta Vet Bras*; 2: 67-75. Doi: <https://doi.org/10.21708/avb.2008.2.3.885>
- Chaudhari, D.V., Dharni, A.J., Hadiya, K.K., & Patel, J.A. (2015). Relative efficacy of egg yolk and soya milk-based extenders for cryopreservation (-196°C) of buffalo semen. *Veterinary world*; 8(2): 239–244. Doi: <https://doi.org/10.14202/vetworld.2015.239-244>
- Chaveiro, A.; Machado, L.; Frijters, A.; Engel, B. & Woelders, H. (2006). Improvement of parameters of freezing medium and freezing protocol for bull sperm using two osmotic supports. *Theriogenology*; 65(9): 1875–1890. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.10.017>
- Crabo, B.G. (2001). Physiological aspects of stallion semen cryopreservation. In: *Proc Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*. San Diego, California, USA: AAEP. Recuperado de <https://www.ivis.org/sites/default/files/library/aaep/2001/91010100291.pdf>
- Crespilho, A.M.; Filho, M.F.; Aqua, J.A.; Nichi, M.; Monteiro, G.C.; Avanzi, B.R.; Martins, A. & Papa, F.O. (2012). Comparison of in vitro and in vivo fertilizing potential of

- bovine semen frozen in egg yolk or new lecithin based extenders. *Livestock Science*; 149:1-6. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2012.05.011>
- Crockett, E.L. (1998). Cholesterol function in plasma membranes from ectotherms: membrane-specific roles in adaptation to temperature. *Am Zool* 38: 291– 304.
- Correa, J. & Zavos, P. (1994). The hypoosmotic swelling test: Its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. *Theriogenology*, 42(2): 351–360. Doi: [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(94\)90280-1](https://doi.org/10.1016/0093-691x(94)90280-1)
- Cross, N.; Morales, P.; Overstreet, J. & Hanson, F. (1986). Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. *Gamete Research*; 15:213-226.
- Damas, R. (2010). Evaluación de dos dilutores comerciales en semen congelado de toros en el Banco Nacional. (Tesis de ingeniero zootecnista, Universidad Nacional del Centro del Perú). Peru. Págs. 100.
- Davis, R.O. & 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.
- Davis R.; Drobnis, E. & Overstreet, J. (1995). Application of multivariate discriminate function, cluster, and regression analysis to models of sperm cryodamage. *Fertil Steril*; 63:1051-1057.
- Drobnis, E.; Crowe, L.; Berger, T.; Anchordoguy, T.; Overstreet, J. & Crowe, J. (1993). Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. *J. Exp. Zool.*;15: 432–437.
- Farrell, P.; Presicce, G.; Brockett, C. & Foote, R. (1998). Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology*; 49(4): 871-879. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00036-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00036-3)
- Farstad, W. (1996). Semen cryopreservation in dogs and foxes. *Animal Reproduction Science*; 42: 251–260.

- Fiume, Z. (2001). Final report on the safety assessment of lecithin and hydrogenated lecithin. *Int J Toxicol*, 20: 21-45. Doi: <https://doi.org/10.1080/109158101750300937>
- Flesch, F. & Gadella B. (2000). Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochimica Et Biophysica Acta-Reviews On Biomembranes*; 1469: 197-235. Doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4157\(00\)00018-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4157(00)00018-6)
- Gadea, J. (2003). Review: Semen extenders used in the artificial insemination of swine. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 1. 17-27. 10.5424/sjar/2003012-17.
- Garner, D. (1997). Ancillary tests of bull semen quality. *Bull Infertility. Veterinary clinics of north america: Food Animal Practice*; 13(2): 313-330.
- Graham, E.; Schmehl, M. & Nelson, D. (1980). Problems with laboratory assays. *Proc. 8° NMB. Tech. Conf. Al. Reprod.*; 59-66.
- Gil, J.; Rodriguez-Irazoqui, M.; Lundeheim, N.; Soderquist, L. & Rodriguez-Martinez, H. (2003). Fertility of ram semen in Bioxcell and used for cervical artificial insemination. *Theriogenology*; 59: 1157-1170. Doi: [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(02\)01178-0](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(02)01178-0)
- Gillan, L., Evans, G., & Maxwell, W.M. (2005). Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*, 63(2): 445-457. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.024>
- Gillan, L.; Kroetsch, T.; Maxwell, W. & Evans, G. (2008). Assessment of in vitro sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. *Animal Reproduction Science* 103(3-4): 201-214. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.12.010>
- Guthrie, H.D. & Welch, G.R. (2005). Impact of storage prior to cryopreservation on plasma membrane function and fertility of boar sperm. *Theriogenology*, 63 (2), 396–410. Doi: 10.1016 / j. theriogenology.2004.09.020
- Hafez, E.S.E (2000). *Reproduction in farm animals*. 7th edition, Baltimore/USA. 509 pp. Capitulo 7.
- Hallap, T.; Jaakma, U. & Rodriguez-Martinez, H. (2006). Changes in semen quality in Estonian Holstein AI bulls at 3, 5 and 7 years of age. *Reproduction in Domestic Animals*; 41(3): 214-218. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00682.x>

- Hammerstedt, R.; Graham, J. & Nolan, J. (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J. Androl*, 11(1): 73-88.
- Hernández, A. (2017). El pequeño mundo de los liposomas. *Biol. On-line*; 6 (2). Recuperado de https://revistes.ub.edu/index.php/b_on/article/view/19521.
- Holt, W.V. & Van Look, J.W. (2004). Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory test of semen quality. *Reproduction*. 127, 527-535.
- Hong, C.; Shieh, C.; Wu, P.; Huang, J. & Chiang, B. (1986), Effect of phosphatidylcholine, lysophosphatidylcholine, arachidonic acid and docosahexaenoic acid on the motility of human sperm. *International Journal of Andrology*, 9: 118-122.
- IMV Technologies (2017). Optixcell®. Recuperado de <https://www.imv-technologies.es/producto/optixcell#brochures>.
- Irvine, D.S., (1995). Computer assisted semen analysis system: sperm motility assessment. *Hum. Reprod.* 10, 53-59.
- Kathiravan, P.; Kalatharan, J.; John Edwin, M. & Veerapandian, C. (2008). Computer automated analysis of crossbred bull spermatozoa and its relationship with in vitro fertility in zona-free hamster oocytes. *Animal Reproduction Science*; 104: 9–17. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.01.002>
- Kastelic J.P., & Thundathil, J.C. (2008). Breeding soundness evaluation and semen analysis for predicting bull fertility. *Reproduction in Domestic Animals* 43 Suppl 2: 368-373. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01186.x>
- Krause, W., 1995. The significance of computer-assisted semen analysis (CASA) for diagnosis in andrology and fertility prognosis. *Hum. Reprod.* 10, 60-66.
- Kumar, P.; Saini, M.; Kumar, D.; Balhara, A.; Yadav, S.; Singh, P. & Yadav, P. (2015). Liposome-based semen extender is suitable alternative to egg yolk-based extender for cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Animal reproduction science*; 159: 38–45. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.05.010>
- Jeyendran, R.; Van der Ven, H.; Pérez-Peláez, M.; Crabo, B. & Zaneveld, L. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod Fertil*; 70: 219-228. Doi: <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0700219>

- Januskaukas, A., Söderquist, I., Haard, M.G., Haard, M.Ch., Lundeheim, N. & Rodríguez-Martínez, H., (1996). Influence of sperm number per straw on the postthaw sperm viability and fertility of the Swedish Red and White AI bulls. *Acta vet. Scand.* 37, 461-470
- Januskaukas, A.; Johannisson. A. & Rodríguez-Martínez, H. (2001). Assessment of sperm quality through fluorometry and sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen thawed semen from Swedish AI bulls. *Theriogenology*; 55: 947-961.
- Jhonson, L.; Weitze, K.; Fiser P. & Maxwell, W. (2000). Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci*; 62: 143-172. Doi: [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(01\)00456-3](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00456-3).
- Jones, R. & Martín, I. (1965). Deep freezing ram spermatozoa: the effect of milk, yola-citrate and synthetic diluents containing sugar. *J. Reprod. Fert.*; 10: 413-423.
- Lehninger, A.L.; Nelson, D.L. & Cox, M.M. (2005). *Lehninger: Principios de Bioquímica*. 4. ed. São Paulo: Sarvier. 1120 p
- Lessard, C., Padre, S., Leclerc, P., Bailey, J.L. & Sullivan, R. (2000), Cryopreservation Alters the Levels of the Bull Sperm Surface Protein P25b. *Revista de Andrología*, 21: 700-707. Doi: <http://dx.doi.org/10.1002/j.1939-4640.2000.tb02138.x>
- Lima-Verde, I.; Johannisson, A.; Ntallaris, T.; Al-Essawe, E.; Al-Kass, Z.; Nongbua, T.; Dorea, F.; Lundeheim, N.; Kupisiewicz, K.; Edman, A. & Morrell, J. (2018). Effect of freezing bull semen in two non-egg yolk extenders on post-thaw sperm quality. *Reprod Dom Anim*; 53 (1): 127-136. Doi: <https://doi.org/10.1111/rda.13080>
- Mann, T. (1964). *The biochemystre of semen and of the reproductive male tract*. 2ed. Methuen, London.
- Mathews K.; Van Holde, K. & Ahern, K. (2003). *Bioquímica*. 3ra Edición, Addison Wesley. Madrid/España. 577 pp.
- Medeiros, C.; Forell, F.; Oliveira, A. & Rodrigues, J. (2002). Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*; 57(1): 327-344. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00674-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00674-4)
- Melrose, D.R. (1962). Artificial insemination in cattle. En: *The semen of animals and artificial insemination*. (ed. J.P. Maule). Commonwealth Agricultural Bureau, Farnham Royal, Bucks. England. pp. 1-181.

- Meryman, H. (1971). Cryoprotective agents. *Cryobiology*, 8(2): 173-183.
- Miguel-Jimenez, S., del Alamo, M.M.R., Álvarez-Rodríguez, M., Olegario Hidalgo, C., Peña, A.I., Muiño, R., Rodríguez-Gil, J.E. & Mogas, T. (2020). In vitro assessment of egg yolk-, soya bean lecithin- and liposome-based extenders for cryopreservation of dairy bull semen. *Animal Reproduction Science*; 215. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106315>
- Minitube (s. f.). AndroMed®. Recuperado de <https://www.minitube.com/catalog/es/andromed-p4722/>
- Mortimer, S.T. (2000). CASA practical aspects. *J. Androl.* 21, 515-524.
- Morrell, J.; Valeanu, A.; Lundeheim, N. & Johannisson, A. (2018). Sperm quality in frozen beef and dairy bull semen. *Acta Vet. Scand.* 60: 41-51. Doi: <https://doi.org/10.1186/s13028-018-0396-2>
- Muiño, R. (2008). Evaluación de la motilidad y viabilidad del semen bovino mediante el uso de sistemas CASA y citometría de flujo: identificación de subpoblaciones espermáticas. (Tesis Doctoral, Universidad de Santiago de Compostela). España. Págs. 177. Recuperado de https://minerva.usc.es/xmlui/bitstream/handle/10347/2406/1/9788497509886_content.pdf.
- Mutalik, S.; Salian, S.; Avadhani, K.; Menon, J.; Joshi, H.; Hegde, A. & Adiga, S. (2014). Liposome encapsulated soy lecithin and cholesterol can efficiently replace chicken egg yolk in human semen cryopreservation medium. *Systems Biology Reproductive Medicine*; 60: 183–188.
- Murphy, E.; O'Meara, C.; Eivers, B.; Lonergan, P. & Fair, S. (2018). Comparison of plant- and egg yolk-based semen diluents on in vitro sperm kinematics and in vivo fertility of frozen-thawed bull semen. *Anim Reprod Sci*; 191: 70-75. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.02.010>
- Nagase, H. & Tomizuka, T. (1968). Protective effects of polyols against freezing injury of bull spermatozoa. II. Polyols effects in different freezing methods. VI Intern. Cong. Anim. Reprod. Artf. Insem. París. Vol. 2, 1107-1109.
- Naz, S.; Umair, M. & Iqbal, S. (2018). Comparison of Tris egg yolk-based, Triladyl® and Optixell® extender on post-thaw quality, Kinematics and in vivo fertility of Nili

- Ravi Buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Andrologia*; 50(8): e13063. Doi: <https://doi.org/10.1111/and.13063>
- Nichi, M., Bols, P.E.J., Züge, R.M., Barnabe, V.H., Goovaerts, I.G.F., Barnabe, R.C., & Cortada, C.N.M. (2006). Seasonal variation in semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls raised under tropical conditions. *Theriogenology*, 66, 822–828. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.01.056>
- Ntemka A.; Tsousis G. & Brozos, C. (2016). Breed differences of bull frozen-thawed semen. *Reprod Domest Anim*; 51: 945-52.
- Olegario, C.; Tamargo, C. & Diez, C. (2007). Análisis del semen bovino. Información ganadera, boletín informativo del seriada N°2, 42-43.
- Oliveira, L.; de Arruda, R.; de Andrade, A.; Celeghini, E.; Reeb, P.; Martins, J.; dos Santos, R.; Beletti, M.; Peres, R.; Monteiro, F. & de Lima, V. (2013). Assessment of in vitro sperm characteristics and their importance in the prediction of conception rate in a bovine timed-AI program. *Animal Reproduction Science*; 137(3-4): 145-155. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.01.010>
- Ormachea, E.; Calsin, B. & Zegarra, E. (2019). Cinética y morfometría espermática en semen congelado sexado y convencional de toros Brown Swiss. *Revista De Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 30(1): 500-506. Doi: <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v30i1.14696>
- Palacin, I., Santolaria, P., Alquezar-Baeta, C., Soler, C., Silvestre, MA & Yániz, J. (2020). Relación de la membrana plasmática de los espermatozoides y las integridades acrosómicas con la morfometría de los espermatozoides en *Bos taurus*. *Revista asiática de andrología*; 22 (6): 578–582. Doi: https://doi.org/10.4103/aja.aja_2_20
- Papa, F.; Felício, G.; Melo-Oña, C.; Alvarenga, M.; De Vita, B.; Avanzi, B. & Dell’Aqua, J. (2010). Effect of substituting soybean lecithin for egg yolk in an extender used for the cryopreservation of stallion semen. *Anim. Reprod. Sci.*;121: 71-72.
- Papa, F.; Felício, G.; Melo-Oña, C.; Alvarenga, M.; De Vita, B.; Trinque, C.; Puoli-Filho, J. & Dell’Aqua, J. (2011). Replacing egg yolk with soybean lecithin in the cryopreservation of stallion semen. *Anim Reprod Sci.*; 129 (1-2): 73-77. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.10.006>

- Parks, J. & Graham, J. (1992). Effects of criopreservation procedures on sperm membranes. Obtenido de Department of Animal Science, Cornell University Ithaca, NY 14853 USA.
- Pérez, R.; Grasa, P.; Fernández, M.; Peleato, M.; Cebrián-Pérez, J.; Muiño-Blanco, T. (2002). Seminal plasma proteins reduce protein tyrosine phosphorylation in the plasma membrane of cold-shocked ram spermatozoa. *Mol Reprod Dev*; 61(2): 226-233. Doi: <https://doi.org/10.1002/mrd.1152>
- Polge, C.; Smith, A. & Parkes, A. (1949). Revival of spermatozoa after vitrification and the dehydration at low temperatures. *Nature London*; 164: 666.
- Quintero-Moreno, A.; Miro, J.; Teresa, A. & Rodriguez-Gil, J. (2003). Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology*; 59: 1973–1990.
- Ramonez, J. (2013). Evaluación de dos agentes crioprotectores no permeables y un diluyente comercial (triadyl) en la congelación de semen bovino. (Tesis de Maestría, Universidad de Cuenca).
- Ricker, J.; Linfor, J.; Delfino, W.; Kysar, P.; Sholtz, E.; Tablin, F.; Crowe, J.; Ball, B. & Meyers, S. (2006). Equine sperm membrane phase behavior: the effects of lipid-based cryoprotectants. *Biology Reproduction*; 74(2): 359-365. Doi: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.046185>
- Rodríguez-Martínez, H. (2000). Evaluación del semen congelado: Métodos tradicionales y de actualidad. *Topics in Bull Fertility*. Chenoweth P.J. International Veterinary Information Service. Ithaca, New York. USA.
- Ropke, T.; Oldenhof, H.; Leiding, C.; Sieme, H.; Bollwein, H. & Wolkers, W. (2011). Liposomes for cryopreservation of bovine sperm. *Theriogenology*; 76(8): 1465–1472. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.06.015>
- Salisbury, G.W., Van Demark, N.L. & Lodge, J.R. (1978). Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle. Principles and techniques of freezing spermatozoa.
- Salamon, S. (1968). Deep freezing of ram semen: recovery of spermatozoa after pelleting and comparison with other methods of freezing. *Australian journal of biological sciences*, 21(2), 351–360.

- Sánchez, A. & Garrido, D. (2013). Evaluación de una prueba hipoosmótica simplificada en semen canino fresco y refrigerado. *Revista Científica*; 23(6). Recuperado de <https://produccioncientificaluz.org/index.php/cientifica/article/view/15835>
- Scott, M. (2000). A glimpse at sperm function in vivo: sperm transport and epithelial interaction in the female reproductive tract. *Anim. Reprod. Sci.*; 60: 337–348. Doi: [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(00\)00130-5](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(00)00130-5)
- SENAMHI. (2020). Pronóstico del Tiempo a nivel nacional. Peru. Recuperado de <https://www.senamhi.gob.pe/>
- Shannon, P. & Vishwanath, R. (1995). The effect of optimal and suboptimal concentrations of sperm on the fertility of fresh and frozen bovine semen and a theoretical model to explain the fertility differences. *Anim Reprod Sci.*; 39;1–10.
- Shojaei, H.; Kroetsch, T.; Wilde, R.; Blondin, P.; Kastelic, J. & Thundathil, J. (2012). Moribund sperm in frozen-thawed semen, and sperm motion end points post-thaw and post-swim-up, are related to fertility in Holstein AI bulls. *Theriogenology*; 77(5): 940-951. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.09.026>
- Singh, A., Singh, V., Narwade, B., Mohanty, T. & Atreja, S. (2012), Comparative Quality Assessment of Buffalo (*Bubalus bubalis*) Semen Chilled (5°C) in Egg Yolk- and Soya Milk–Based Extenders. *Reproduction in Domestic Animals*, 47: 596-600. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01928.x>
- Singh, A.; Kumar, A.; Honparkhe, M.; Kaur, S.; Kaur, H.; Ghuman, S. & Brar, P. (2018). Comparison of in vitro and in vivo fertilizing potential of buffalo bull semen frozen in egg yolk-, soya bean lecithin- and liposome-based extenders. *Reprod Dom Anim*; 53: 195-202. Doi: <https://doi.org/10.1111/rda.13092>
- Sutovsky, P., Manandhar, G., Wu, A. & Oko, R., (2003). Interactions of the sperm perinuclear theca with the oocyte: implications for oocyte activation, anti-polyspermy defense and assisted reproduction. *Microsc Res Tech*, 61, p. 362–378. Doi: <https://doi.org/10.1002/jemt.10350>
- Swanson, E. & Bearden, H. (1951). An eosin-nigrosin stain for differentiating live and dead bovine spermatozoa. *Journal of Animal Science* 10(4): 981-987.
- Tamargo, B.; Herrera, L.; Bello, A.; Cuéllar, A.; González, H.; Sierra, G.; Morales, M. & Ortiz, L. (2011). Obtención de fosfolípidos a partir de la lecitina de soya (*Glicine*

- max* L), para usos biomédicos. *Revista Cubana de Química*; 23 (3): 5-14. Recuperado de <https://www.redalyc.org/pdf/4435/443543724001.pdf>
- Tapia, J.; Macias-Garcia, B.; Miro-Moran, A.; Ortega-Ferrusola, C.; Salido, G.; Pena, F. & Aparicio, I. (2012). The membrane of the mammalian spermatozoa: much more than an inert envelope. *Reprod. Domes. Anim.*; 47 (3): 65-75. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02046.x>
- Tartaglione, C.M., & Ritta, M.N. (2004). Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, 62(7), 1245–1252. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.01.012>
- Torello, M.; Viscasillas, A. & Del Pozo, A. (2002). Liposomas (I). Conceptos generales y relación con las estructuras cutáneas. *OFFARM*; 21 (9): 188-190. Recuperado de <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-liposomas-i-conceptos-generales-relacion-13038745>.
- Torres, J. & Durán, S. (2015). Fosfolípidos: propiedades y efectos sobre la salud. *Nutrición Hospitalaria*: 31(1): 76-83. Doi: <https://dx.doi.org/10.3305/nh.2015.31.1.7961>
- Vejarano, O.; Sanabria, D. & Trujillo, A. (2005). Diagnóstico de la capacidad reproductiva de toros en ganaderías de tres municipios del alto magdalena. *rev.mvz cordoba*, 10 (2). Recuperado de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0122-02682005000200007&lng=en&nrm=iso&tlng=es
- Verstegen, J. & Onclin, K. (2002). Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*. 57: 149-179
- Vishwanath, R., & Shannon, P. (2000). Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Animal reproduction science*, 62(1-3), 23–53. Doi: [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(00\)00153-6](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(00)00153-6)
- Waterhouse, K.E., Gjeldnes, A., Tverdal, A., De Angelis, P.M., Farstad, W., Håård, M. & Kommisrud, E. (2010). Alterations of sperm DNA integrity during cryopreservation procedure and in vitro incubation of bull semen. *Animal reproduction science*; 117(1-2): 34–42. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.04.011>

- Watson, P. (1979). The preservation of semen in mammals. In: Oxford Reviews of reproductive biology, Finn, C.A, (ed), Oxford University Press, Oxford; 283-350.
- Watson, P. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function.
- Watson, P. (1999). Cooling of spermatozoa and fertility capacity. *Reproduction in Domestic Animals*, 31, 135–140. Doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0531.1995.tb00016.x>
- Watson, P.F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science* 60:481-492. Doi: [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(00\)00099-3](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(00)00099-3)
- White, I. (1993). Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reprod Fertil Dev* 5: 639-658.
- Wilmut, I. & Polge, C. (1977). The low temperature preservation of boar spermatozoa. I. The motility and morphology of boar spermatozoa frozen and thawed in the presence of permeating protective agents. *Cryobiology*; 14: 471-478.
- Woelders, H. (1990). Overview of *in vitro* methods for evaluation of semen quality. 2th Intl. Conf. Deep Freezing Boar Semen. Beltsville, MD, EEUU. 145-164.
- Zavos, P. (1990). Hypoosmotic swelling test (HOS)/ functional integrity of sperm membrane. *J Ass Reprod Technol Androl*; 2:215-216.
- Zeron, Y; Tomczak, M; Crowe, J, & Arav, A. (2002). The effect of liposomes on thermotropic membrane phase transitions of bovine spermatozoa and oocytes: implications for reducing chilling sensitivity. *Cryobiology*, 45, 143–152. Doi: [https://doi.org/10.1016/s0011-2240\(02\)00123-2](https://doi.org/10.1016/s0011-2240(02)00123-2)

VIII. ANEXOS

Anexo 1: Resumen del método de diferencia mínima significativa de las 40 colecciones de semen post-descongelación (Aníbal n=10), (Bolt n=10), (Ranger n=10), (San Martín n=10).

				<i>Desviación</i>	<i>Error</i>				<i>P<0.05</i>	<i>SIG (*)</i>
<i>VARIABLE</i>	<i>TRAT</i>	<i>N</i>	<i>Promedio</i>	<i>Estándar</i>	<i>Estándar</i>	<i>CV (%)</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>P=.....</i>	<i>NS</i>
MOT TOTAL (%)	ANDROMED	40	75.1925	8.03309	1.27014	10.6834	59.5	89.1	0.8676	NS
	OPTIXCELL	40	75.505	9.34819	1.47808	12.3809	52.8	89		
MOT PRO (%)	ANDROMED	40	64.27	8.78239	1.38862	13.6648	46.6	79.9	0.3266	NS
	OPTIXCELL	40	66.3425	10.0202	1.58433	15.1037	46.6	81.1		
MOT RAP (%)	ANDROMED	40	48.4275	10.0306	1.58598	20.7127	24.2	65.9	0.9005	NS
	OPTIXCELL	40	48.7025	9.80998	1.55109	20.1427	26.7	62.6		
VITAL (%)	ANDROMED	40	60.65	7.67129	1.21294	12.6485	41	76	0.9351	NS
	OPTIXCELL	40	60.8	8.78577	1.38915	14.4503	44	80		
HOS (%)	ANDROMED	40	49.0475	8.87179	1.40275	18.0882	26	67	0.1812	NS
	OPTIXCELL	40	51.4775	8.79413	1.39047	17.0834	32.3	69.8		
VCL (um/s)	ANDROMED	40	101.853	20.3099	3.21128	19.9405	62.5	148.6	0.7427	NS
	OPTIXCELL	40	103.298	20.5791	3.25385	19.9222	59.5	136.2		
VSL (um/s)	ANDROMED	40	45.055	9.19543	1.45392	20.4093	29.5	73.5	0.3169	NS
	OPTIXCELL	40	43.0075	9.54389	1.50902	22.1912	22.9	63.7		
VAP (um/s)	ANDROMED	40	54.265	10.5109	1.66192	19.3696	34.9	84.6	0.9902	NS
	OPTIXCELL	40	54.2375	10.2612	1.62245	18.9191	32.4	75		
ALH (um)	ANDROMED	40	1.19775	0.261696	0.0413777	21.8489	0.75	1.78	0.579	NS
	OPTIXCELL	40	1.22525	0.238263	0.0376727	19.4461	0.69	1.64		
WOB (%)	ANDROMED	40	0.536	0.03934	0.0062203	7.33969	0.47	0.63	0.1542	NS
	OPTIXCELL	40	0.5265	0.031423	0.0049685	5.96837	0.48	0.61		
LIN (%)	ANDROMED	40	0.4435	0.045716	0.0072284	10.3081	0.37	0.56	0.1932	NS
	OPTIXCELL	40	0.42025	0.048117	0.0076081	11.4498	0.33	0.5		
STR (%)	ANDROMED	40	0.8245	0.035802	0.0056608	4.34229	0.71	0.89	0.5361	NS
	OPTIXCELL	40	0.79625	0.054663	0.0086431	6.86517	0.68	0.88		

Anexo 2: Parámetros descriptivos del volumen y concentración espermática del promedio de las 40 colecciones de semen (Aníbal n=10), (Bolt n=10), (Ranger n=10), (San Martín n=10).

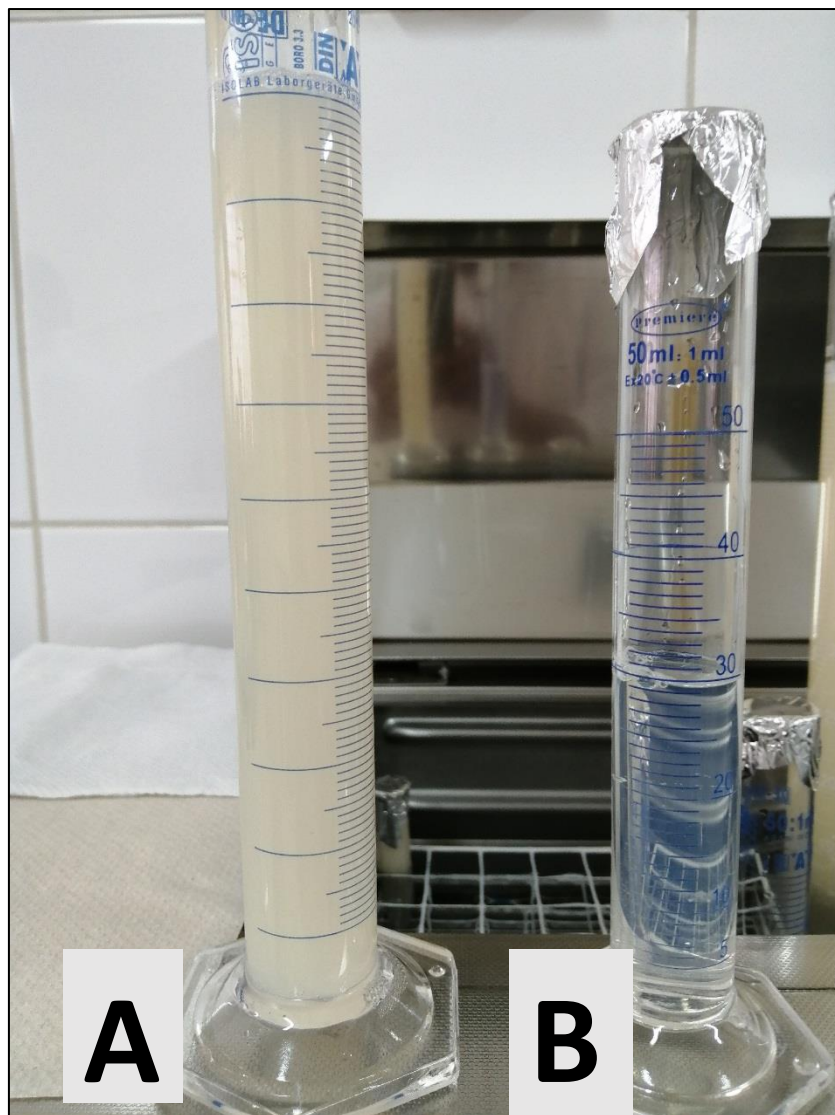
N°	Toro	Observaciones	Volumen (ml)	Concentración (10^6 SPZ/ml)
1	Aníbal	10	7.8 ± 2.98	1090.5 ± 273.82
2	Bolt	10	6.95 ± 2.04	833.3 ± 171.08
3	Ranger	10	4.85 ± 1.8	1671 ± 299.87
4	San Martín	10	10.1 ± 1.74	990.2 ± 249.23
Promedio		40	7.42 ± 2.89	1146.3 ± 405.36

Media \pm Error estándar

Anexo 3: Colección de semen a toro de la raza Brown Swiss con vagina artificial modelo IMV.



Anexo 4: Dilutores a base de lecitina de soya (Andromed)(A) y a base de liposomas (Optixcell)(B).



Anexo 5: Equipo de baño maría seco para la incubación del contenido de pajillas de semen a 37 °C, y su posterior análisis de motilidad, cinemática espermática y viabilidad, mediante el sistema de análisis seminal computarizado (CASA).



Anexo 6: Fijación de los espermatozoides en una lámina porta objetos mediante un frotis, posterior a la incubación para la prueba de endosmosis.



Anexo 7: Imagen del Sistema Computarizado de Análisis Seminal (C.A.S.A) software AndroVision



Anexo 8: Laboratorio del Banco Nacional de Semen de la UNALM.

