

**UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE
APURÍMAC**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA
VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



**EFFECTO DEL DILUTOR TRIS CON YEMA DE HUEVO DE
CODORNIZ SOBRE CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS
EPIDIDIMARIAS EN REFRIGERACIÓN DE TOROS
CRIOLLOS POST MORTEM**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA**

PLINIO IVAN CCOÑAS VERA

ABANCAY, PERÚ

2017



**EFECTO DEL DILUTOR TRIS CON YEMA DE HUEVO DE
CODORNIZ SOBRE CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS
EPIDIDIMARIAS EN REFRIGERACIÓN DE TOROS
CRIOLLOS POST MORTEM**

ii

DEDICATORIA

A mis padres, hermanos que fueron y siempre serán el pilar de mi vida, no les defraudaré, gracias a su apoyo, consejos, cariño y todos los valores que me inculcaron a lo largo de mi vida hoy puedo cumplir uno de mis sueños y objetivos trazados, sin su apoyo hubiera sido muy difícil.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac, por darme la oportunidad de formar parte de ella.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAMBA, por darme la oportunidad de adquirir nuevos conocimientos a través de los docentes, que se esfuerzan por formar excelentes profesionales.

A mi madre Evangelina Vera Gonzales y a mi padre Saturnino Ccoñas Ramos por su apoyo incondicional, por nunca perder las esperanzas en mí, e inculcarme a ser una mejor persona cada día, a mis hermanos (as) por formar parte de mi vida y compartir conmigo la ilusión de superación.

Al MC. Ulises Sandro Quispe Gutiérrez, por asesorarme para llevar cabo el presente estudio, ya que sin su apoyo, su exigencia, sus consejos no hubiera sido posible realizar esta tesis.

A los MVZ.: Víctor Cano Fuentes, Juan R. Soncco Quispe y Dora Yucra Vargas miembros del Jurado Evaluador de Tesis, por su aporte esencial y participación activa en el desarrollo de esta investigación.

A mis compañeros, amigos y a los estudiantes del curso de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por ayudarme y disponer de su tiempo y contribuir en el desarrollo de la tesis.

A todos mis compañeros de la universidad, por compartir muchas experiencias juntos durante los años universitarios.

AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA

BASTIDAS DE APURÍMAC

Dr. Leonardo Adolfo Prado Cárdenas
RECTOR (i)

Mag. Mauro Huayapa Huaynacho
VICERRECTOR ACADÉMICO (i)

Dr. Wilson John Mollocondo Flores
VICERRECTOR DE INVESTIGACIÓN (i)

MC. Ulises Sandro Quispe Gutiérrez
DECANO (i) DE LA FACULTAD DE
MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA

ASESORES

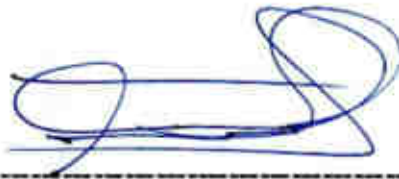


MC. Ulises Sandro Quispe Gutiérrez
ASESOR PRINCIPAL



Dr. Luis Arturo Rodríguez Zamora
ASESOR

JURADO EVALUADOR



MVZ. Víctor Raúl Cano Fuentes
PRESIDENTE



MVZ. Juan Roberto Soncco Quispe
PRIMER MIEMBRO



M.Sc. Dora Yucra Vargas
SEGUNDO MIEMBRO

ÍNDICE

ÍNDICE DE CUADROS	X
ÍNDICE DE FIGURAS	Xi
RESUMEN	xiv
I. INTRODUCCIÓN	16
II. MARCO TEÓRICO	18
2.1 ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN	18
2.2 BASES TEÓRICAS	22
2.2.1 Ganado bovino Criollo	22
2.2.2 Uso de la inseminación artificial en ganado bovino Criollo	23
2.2.3 Producción de espermatozoides	24
2.2.4 Epididimo	24
2.2.5 Espermatozoides epididimarios	25
2.2.6 Refrigeración de semen y espermatozoides	26
2.2.7 Dilutores del semen	27
a) Componentes de los dilutores del semen	28
b) Tipos de dilutores	29
c) Dilutor Tris	30
2.2.8 Uso de yema de huevo	30
a) Huevo de gallina	31
b) Huevo de codorniz	32
c) Comparación de huevos de gallina y codorniz	33
2.2.9 Shock de frio	34
2.2.10 Membrana citoplasmática del espermatozoide	34
2.2.11 Bioquímica del espermatozoide durante la refrigeración	35
2.2.12 Evaluación de semen	36
a) Evaluación macroscópica	36
i. Volumen	36
ii. Color	36
iii. Densidad	36
iv. Motilidad en masa macroscópica	36
v. Ph	37
vi. Cuerpos extraños	37
vii. Schalm Test	37
b) Evaluación microscópica	37

i. Concentración espermática	38
ii. Motilidad espermática	38
iii. Motilidad o movimiento en masa	39
iv. Motilidad total	39
v. Motilidad espermática progresiva	40
vi. Morfología	40
vii. Vitalidad	40
viii. Integridad de la membrana	41
ix. Test hipoosmótico (Host)	41
III. MATERIAL Y MÉTODOS	43
3.1 Localización	43
3.2 Material biológico	43
3.3 Diseño experimental	44
3.4 Colección de espermatozoides	44
3.5 Preparación de dilutores	45
3.6 Refrigeración	46
3.7 Evaluación de los espermatozoides epididimarios	46
3.8 Análisis estadístico	47
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
4.1 Motilidad masal	48
4.2 Motilidad total	50
4.3 Motilidad rectilínea progresiva	52
4.4 Prueba de endosmosis (Host)	55
4.5 Vitalidad	57
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	60
a. Conclusiones	60
b. Recomendaciones	61
REFERENCIA BIBLIOGRAFÍA	62
ANEXO	72

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1	Composición química del huevo de gallina	31
Cuadro 2	Composición proximal de los huevos de codorniz	32
Cuadro 3	Composición de los ácidos grasos, total de lípidos de la yema de huevo	33
Cuadro 4	Análisis comparativo de la composición química del huevo de gallina y codorniz	34
Cuadro 5	Composición del dilutor Tris - yema de huevo de codorniz según los tratamientos, preparación para 25 mL.	45
Cuadro 6	Grado de motilidad masal (media \pm desviación estándar) de espermatozoides epididimarios de toros Criollos colectados a <i>post mortem</i> con dilutor Tris con diferentes concentraciones de huevo de codorniz (YHC) evaluados a diferentes tiempos de refrigeración (TR).	48
Cuadro 7	Porcentaje de motilidad total (media \pm desviación estándar) de espermatozoides epididimarios de toros Criollos colectados a <i>post mortem</i> con dilutor Tris con diferentes concentraciones de yema de huevo de codorniz (YHC) evaluados a diferentes tiempos de refrigeración (TR).	51
Cuadro 8	Porcentaje de motilidad rectilínea progresiva (media \pm desviación estándar) de espermatozoides epididimarios de toros Criollos colectados a <i>post mortem</i> con dilutor TRIS con diferentes concentraciones de yema de huevo de codorniz (YHC) evaluados a diferentes tiempos de refrigeración (TR)	53

Cuadro 9	Porcentaje de respuesta positiva (media \pm desviación estándar) a endosmosis de espermatozoides epididimarios de toros criollos colectados a <i>post mortem</i> con dilutor TRIS con diferentes concentraciones de yema de huevo de codorniz (YHC) evaluados a diferentes tiempos de refrigeración (TR)	55
Cuadro 10	Porcentaje de vitalidad (media \pm desviación estándar) de espermatozoides epididimarios de toros criollos colectados a <i>post mortem</i> con dilutor TRIS con diferentes concentraciones de yema de huevo de codorniz (YHC) evaluados a diferentes tiempos de refrigeración (TR).	58
Cuadro 11	Análisis de varianza para motilidad masal de espermatozoides epididimarios de toros criollos postmortem.	77
Cuadro 12	Análisis de varianza para motilidad total de espermatozoides epididimarios de toros criollos postmortem.	77
Cuadro 13	Análisis de varianza para motilidad rectilinea progresiva de espermatozoides epididimarios de toros criollos postmortem.	77
Cuadro 14	Análisis de varianza para vitalidad de espermatozoides epididimarios de toros criollos postmortem.	78
Cuadro 15	Análisis de varianza para integridad de membrana plasmatica (Host) de espermatozoides epididimarios de toros criollos postmortem.	78

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Interacción entre Tris – yema de huevo de codorniz (10, 15 y 20%) y tiempos de refrigeración (0, 12, 24, 48 y 72 h) sobre la motilidad masal de espermatozoides epididimarios de toros Criollos colectados a <i>post mortem</i> .	49
Figura 2.	Interacción entre Tris – yema de huevo de codorniz (10, 15 y 20%) y tiempos de refrigeración (0, 12, 24, 48 y 72 h) sobre la motilidad individual total de espermatozoides epididimarios de toros Criollos colectados a <i>post mortem</i> .	51
Figura 3.	Interacción entre Tris – yema de huevo de codorniz (10, 15 y 20%) y tiempos de refrigeración (0, 12, 24, 48 y 72 h) sobre la motilidad individual rectilínea progresiva de espermatozoides epididimarios de toros Criollos colectados a <i>post mortem</i> .	53
Figura 4.	Interacción entre Tris – yema de huevo de codorniz (10, 15 y 20%) y tiempos de refrigeración (0, 12, 24, 48 y 72 h) sobre la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides epididimarios de toros Criollos colectados a <i>post mortem</i> .	56
Figura 5.	Interacción entre Tris – yema de huevo de codorniz (10, 15 y 20%) y tiempos de refrigeración (0, 12, 24, 48 y 72 h) sobre la vitalidad de los espermatozoides epididimarios de toros Criollos colectados a <i>post mortem</i> .	58
Figura 6.	Pesado de componentes para la preparación de dilutor Tris	73
Figura 7.	Testículo de toro Criollo diseccionado, para extraer el epididimo	73
Figura 8.	Epididimo, antes de realizar el proceso de lavado retrogrado	73

Figura 9.	Lavado retrógrado del epidídimo para colección de espermatozoides	74
Figura 10.	Refrigeración de muestras a 4.5 °C	74
Figura 11.	Colorantes Eosina y Nigrosina utilizados en la tinción, para determinar la vitalidad de espermatozoides.	74
Figura 12.	Procesamiento de muestras para determinar la integridad de la membrana espermática. (Test de Host)	75
Figura 13.	Proceso de tinción y análisis de muestras de espermatozoides.	75
Figura 14.	Evaluación microscópica de espermatozoides epididimarios	75
Figura 15.	Motilidad masal de espermatozoides epididimarios	76
Figura 16.	Espermatozoides positivos y negativos a la evaluación de vitalidad	76
Figura 17.	Espermatozoides positivos y negativos al Test de Host	76

RESUMEN

El objetivo del estudio fue evaluar la motilidad, vitalidad y la integridad funcional de la membrana plasmática (Host) de espermatozoides epididimarios de toros Criollos post mortem, diluidos con Tris - yema de huevo de codorniz (YHC). Se distribuyó en tres tratamientos, espermatozoides epididimarios diluidos con Tris - YHC a concentraciones de 10, 15 y 20%, cada grupo fue evaluado a 0, 12, 24, 48 y 72 h de refrigeración mantenidos a 4.5 °C. Se utilizó epididimos del camal ($n = 30$), de toros Criollos post mortem mayores de 3 años de edad. Los testículos se separaron inmediatamente beneficiado el animal y se colocaron a caja de poliestireno para su transporte, manteniendo a temperatura entre 25 a 30 °C alrededor de 60 min. Se colectó espermatozoides de la cola del epidídimo, mediante la técnica de flujo retrógrado con 3 mL de dilutor Tris - YHC según los tratamientos, luego alrededor de 15 min de colectado, se evaluó las motilidades, Host y vitalidad. El análisis de varianza se realizó mediante el procedimiento GLM del SAS para todas las variables de respuesta. El dilutor Tris - YHC a los 10, 15 y 20% presentan efectos similares ($P \geq 0.05$) a 0, 12, 24, 48 y 72 h de refrigeración de espermatozoides, sobre la motilidad masal espermática (4.3 ± 0.3 ; 3.3 ± 0.3 ; 2.6 ± 0.7 ; 1.7 ± 0.6 ; 1.3 ± 0.7), motilidad total (81.9 ± 4.9 ; 68.5 ± 8.4 ; 68.5 ± 8.4 ; 44.8 ± 9.0 ; $35.5 \pm 6.6\%$), motilidad rectilínea progresiva (33.1 ± 5.3 ; 22.1 ± 8.3 ; 17.8 ± 5.0 ; 12.9 ± 4.1 ; $7.3 \pm 3.2\%$), integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides (90.9 ± 3.7 ; 79.6 ± 6.9 ; 73.9 ± 9.4 ; 61.5 ± 8.1 ; $51.0 \pm 13.3\%$), y vitalidad (85.6 ± 3.1 ; 77.5 ± 7.8 ; 71.5 ± 10.1 ; 55.0 ± 14.3 ; $47.4 \pm 16.1\%$) respectivamente. Conforme fue mayor el tiempo de refrigeración 0, 12, 24, 48 y 72 h los espermatozoides disminuyen ($p \leq 0.05$) su motilidad masal, motilidad total, motilidad rectilínea progresiva, positividad a la prueba de endósmosis (Host) y vitalidad espermática. En conclusión, que el dilutor Tris - YHC a los 10, 15 y 20% tienen efectos similares sobre la refrigeración de espermatozoides epididimarios de toros Criollos post mortem, por lo que se sugiere el uso YHC en el manejo de espermatozoides con fines reproductivos

Palabras clave: espermatozoide, conservación, bovino, motilidad, vitalidad, endósmosis.

ABSTRACT

The objective of the study was to evaluate the motility, vitality and functional integrity of the plasma membrane (Host) of epididymal spermatozoa of post - mortem cryolus bulls diluted with quail egg tris - yma (YHC). It was distributed in three treatments, epididymal spermatozoa diluted with Tris - YHC at concentrations of 10, 15 and 20%, each group was evaluated at 0, 12, 24, 48 and 72 h refrigeration maintained at 4.5 ° C. Epididymes of the camal (n = 30) were used, from post-mortem Creole bulls older than 3 years of age. The testicles were separated immediately benefiting the animal and placed in a polystyrene box for transportation, keeping temperature between 25 and 30 ° C about 60 min. Spermatozoa were collected from the tail of the epididymis, using the retrograde flow technique with 3 mL of Tris - YHC diluent according to the treatments, then about 15 min of collection, motile, Host and vitality were evaluated. Analysis of variance was performed using the SAS GLM procedure for all response variables. The Tris - YHC diluent at 10, 15 and 20% presented similar effects ($P \geq 0.05$) at 0, 12, 24, 48 and 72 h of sperm cooling, on sperm mass motility (4.3 ± 0.3 , 3.3 ± 0.3 , 2.8 ± 0.7 , 1.7 ± 0.6 , 1.3 ± 0.7), total motility (81.9 ± 4.9 , 68.5 ± 8.4 , 68.5 ± 8.4 , 44.8 ± 9.0 , $35.5 \pm 6.6\%$), progressive rectilinear motility (33.1 ± 5.3 , 22.1 ± 8.3 (90.9 ± 3.7 , 79.6 ± 6.9 , 73.9 ± 9.4 , 61.5 ± 8.1 , $51.0 \pm 13.3\%$), and vitality (85.8 ± 5.0 , 12.9 ± 4.1 , $7.3 \pm 3.2\%$), integrity of the spermatozoa ± 3.1 , 77.5 ± 7.8 , 71.5 ± 10.1 , 55.0 ± 14.3 , $47.4 \pm 16.1\%$), respectively. As the cooling time increased, the spermatozoa decreased ($p \leq 0.05$) their mass motility, total motility, progressive rectilinear motility, positivity to the endosmosis (Host) test and sperm vitality. In conclusion, the Tris - YHC diluent at 10, 15 and 20% have similar effects on the cooling of epididymal spermatozoa of post - mortem Creole bulls, suggesting the use of YHC in the management of spermatozoa for reproductive purposes

Key words: sperm, conservation, bovine, motility, vitality, endosmosis.

I. INTRODUCCIÓN

La conservación de la diversidad genética, requiere el uso de varias biotecnologías reproductivas, como la conservación de los gametos. La recuperación y crioconservación de espermatozoides epididimales puede ser la última oportunidad para la conservación de espermatozoides masculinos con alto valor genético o germoplasma. El uso de la inseminación artificial (IA) como herramienta de mejoramiento genético del ganado, es actualmente la biotecnología reproductiva de mayor uso. El éxito de la IA depende en gran medida del desarrollo de diluyentes adecuados para el semen, los cuales deben incrementar el volumen del eyaculado, proteger a los espermatozoides durante el enfriamiento y prolongar su vida, además el efecto negativo del dilutor sea mínimo sobre la fertilidad (Palomino *et al.*, 2014).

La refrigeración espermática consiste en mantener los espermatozoides a una temperatura de 15 a 20 °C o entre 4 a 5 °C, con la finalidad de evitar la muerte de los espermatozoides y mantener su carácter fecundante (Rossi, 2012). La viabilidad de espermatozoides durante la refrigeración, en bovinos o en cualquier especie, es afectada negativamente por el dilutor de baja calidad, alterando las características espermáticas, la capacidad fecundante disminuye,

la fertilidad es afectada, además, el tiempo de refrigeración se acorta. Por lo que el inseminador tendrá menor oportunidad de éxito de preñez.

Los componentes de los dilutores, en nuestra región de Apurímac, son escasos y los costos son altos, la disponibilidad de los dilutores comerciales es limitada. Estos aspectos, entre otros, reducen el uso de la IA con semen local de bovinos adaptados. Convencionalmente el semen se diluye con Tris más yema de huevo de gallina; sin embargo, hay posibilidad de usar yema de huevo de codorniz, porque respecto al de la gallina, tiene más fosfatidilcolina y menos fosfatidiletanolamina, posee mejor índice de ácidos grasos poliinsaturados, características que mejoró la motilidad en la criopreservación de espermatozoides de burros (Trimeché *et al.*, 1997). Los ácidos grasos poliinsaturados permiten mayor cobertura al shock térmico y mayor estabilización de la membrana acrosomal, Además, el huevo de codorniz presenta mayor concentración de proteínas y lípidos totales (González, 2011), en comparación al huevo de gallina (Santana, 2008), por las consideraciones mencionadas, se realizó este estudio con el objetivo de evaluar las características espermáticas epididimarias de toros Criollos post mortem, diluidos con Tris más yema de huevo de codorniz en diferentes concentraciones y tiempos de refrigeración.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de la investigación

Con el objetivo de evaluar la viabilidad *in vitro* del semen bovino diluido y refrigerado a 5 a 7 °C, mediante monitoreo dinámico de parámetros microscópicos a través del tiempo (0, 6, 12, 24, 48 y 72 h). Se buscó comparar la viabilidad *in vitro* del semen diluido y refrigerado con y sin el agregado de trehalosa. Se buscó determinar momentos óptimos para inseminar con semen refrigerado. En cada tiempo de monitoreo se evaluó motilidad masal (MM), motilidad individual progresiva (MIP) y porcentaje de espermatozoides vivos (% vivos). Los resultados obtenidos marcaron tendencias similares para todos los parámetros evaluados (MM, MIP, % vivos). Se obtuvieron valores más bajos para el tratamiento con trehalosa, siendo inferior a los otros dos tratamientos en todos los momentos analizados. A su vez, el tratamiento control y el refrigerado, reflejaron resultados similares hasta las 24 h, y entre las 24 y 72 h mantuvo mejores resultados el tratamiento refrigerado, mientras los parámetros analizados en el tratamiento control disminuyeron de manera abrupta (Rossi, 2012).

En un estudio en el Banco Nacional de Semen de la Universidad Nacional la Molina, usaron seis carneros de tres razas. El semen se diluyó con Tris - glucosa - yema de huevo

de codorniz (Tris) o Citrato - glucosa - yema de huevo (Citrato), se almacenó en pajillas de 0.5 mL, y se congeló en nitrógeno líquido. En semen refrigerado, la motilidad individual progresiva, en semen diluido con Tris fue 82.3% y con Citrato de 79.2%, y los valores de la integridad de membrana (HOST) fueron de 78.0 ± 4.4 con Tris y $73.2 \pm 5.8\%$ con Citrato. Se concluye que Tris presenta un mejor rendimiento que Citrato para la congelación del semen ovino y que la prueba hipoosmótica permitió evidenciar diferencias entre dilutores, careros y momentos de procesamiento (Cabrera *et al.*, 2011).

En la preservación de espermatozoides de llamas y alpacas utilizaron el dilutor Tris-yema de codorniz, el mismo que fue apropiado, incluso sin el uso de enzimas fue positivo (Bravo y Alarcon, 2013).

En un estudio utilizaron 25 toros cruzados, recogieron testículos del matadero 2 h después del sacrificio. Del epididimo fueron recuperados y analizados la morfología y motilidad progresiva de los espermatozoides. Los epididimos-testiculares contralaterales se almacenaron a 5 °C para 0 (n = 6) 24 (n = 6), 48 (n = 6) y 72 h (n = 7). Al final de cada periodo de almacenamiento, los espermatozoides fueron recuperados y evaluados la motilidad total y progresiva, la concentración, la integridad del acrosoma e integridad de la membrana. Luego, los espermatozoides de todos los tratamientos fueron criopreservados en Tris-yema de huevo y glicerol (Martins *et al.*, 2009).

Se evaluó parámetros testiculares y características morfológicas de los espermatozoides epididimarios obtenidos post mortem en el toro de lidia, teniendo en cuenta la edad, el peso del animal, la circunferencia escrotal, peso y longitud testicular, y sus variables espermáticas. Se analizaron 12 pares de testículos de toros lidiados en una plaza de toros,

procedentes de doce astados, encaste Domecq de dos ganaderías. En laboratorio se realizó el pesaje y medición de cada testículo, se diseccionó la cola del epidídimo para conseguir la muestra. Se midió volumen, concentración espermática, motilidad. Con la tinción de eosina nigrosina se valoraron espermatozoides vivos y muertos, células normales, células anormales y acrosomas normales. La muestra obtenida de cada testículo, fue diluida en una proporción 1:2 con un diluyente comercial (Steridyl®), ambos atemperados a 37 °C, antes de realizar las tinciones y las extensiones. Para las demás variables evaluadas, concentración espermática, la motilidad individual, vivos y muertos, morfoanomalías y acrosomas normales, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$). En general, se encontró diferencias estadísticas significativas entre ganaderías y no tuvo efecto el testículo (Saavedra *et al.*, 2012).

Con la finalidad de determinar la movilidad individual de los espermatozoides epididimarios de toros post mortem obtenidos mediante lavado retrógrado se evaluó los espermatozoides de la cola del epidídimo, obtenida del matadero mediante lavado retrógrado de testículos de toros cebú post mortem. Los testículos fueron recolectados al azar ($n = 90$) y transportados bajo dos diferentes temperaturas, siguiendo dos diferentes protocolos: Protocolo 1 (T: 35 °C) y Protocolo 2 (T: 25 °C), durante el periodo abril a julio de 2003. Se evaluó la movilidad individual de los espermatozoides recolectados de las colas epididimarias. La recolección se realizó por lavado retrógrado con Tris-yema-glicerol, a través del conducto deferente. Para cada Protocolo se hicieron dos lecturas de la movilidad individual espermática, con intervalo de 1 h entre cada lectura. Los resultados obtenidos indican que no hubo diferencia significativa ($P > 0.05$) entre los dos protocolos en la movilidad individual. Se concluye que la temperatura de transporte no afectó la movilidad

espermática epididimaria y que es posible recolectar espermatozoides vivos de la cola del epididimo de toros post mortem (Albers y Barrios, 2006).

De manera similar con el objetivo es determinar la sobrevivencia in vitro y la fertilidad in vivo de espermatozoides recuperados de la cola del epididimo de toros criollos post mortem. Se colectó 18 pares de testiculos de toros criollos adultos del camal Municipal de El Collao-Ilave, inmediatamente después del sacrificio de los mismos. Una vez transportado al laboratorio cada par de testiculos fueron almacenados en refrigeración a 5°C de forma aleatorio durante 0 (n = 6), 12 (n = 6) y 24 (n = 6) h. Al final de cada periodo los espermatozoides de la cola del epididimo fueron colectados y evaluados antes de la congelación y después de la descongelación en motilidad total, motilidad progresiva, test hiposmótico e integridad de acrosoma. Los espermatozoides fueron congelados con dilutor Tris-yema de huevo (10%) - glicerol (7%) en pajillas de 0.25 mL con 30×10^6 espermatozoides motiles/pajilla. La prueba de fertilidad in vivo se realizó en 13 vacas Brown Swiss del CIP Chuquibambilla. Los resultados obtenidos en los periodos de refrigeración a 5 °C en 0, 12 y 24 h antes de la congelación y después de la descongelación fueron en motilidad total: 80.06 ± 11.68 , 74.43 ± 10.78 , $70.25 \pm 14.47\%$ ($p > 0.05$) y 49.26 ± 15.68 , 26.41 ± 6.82 , $24.92 \pm 4.89\%$ ($p \leq 0.05$); en motilidad progresiva: 44.76 ± 10.31 , 37.41 ± 12.20 , $30.97 \pm 9.75\%$ ($p > 0.05$) y 19.57 ± 5.18 , 12.55 ± 4.25 , $11.19 \pm 2.72\%$ ($p \leq 0.05$); en test hiposmótico: 69.72 ± 7.20 , 67.87 ± 4.46 , $60.31 \pm 7.91\%$ ($p > 0.05$) y 53.21 ± 5.53 , 31.99 ± 6.87 , $27.47 \pm 4.86\%$ ($p \leq 0.05$); en integridad de acrosoma: 62.18 ± 7.66 , 64.83 ± 3.69 , $59.51 \pm 7.13\%$ ($p > 0.05$) y de 48.33 ± 4.45 , 28.90 ± 7.25 , $23.87 \pm 6.95\%$ ($p \leq 0.05$), respectivamente. En conclusión, se encontró que las características espermáticas evaluadas se preservaron antes de la congelación pero fueron afectados por efecto del

periodo de refrigeración a la descongelación y por efecto del proceso de la congelación y los espermatozoides congelados-descongelados tienen habilidad de fertilizar. Por lo tanto, los espermatozoides de la cola epididimo de toros *post mortem* son congelables y pueden aplicarse en técnicas reproductivas asistidas (Quispe, 2015).

En una investigación refrigeraron semen canino, se evaluó y comparó el efecto de la leche descremada con (LY) y sin yema de huevo (Le) como diluyente seminal, sobre espermatozoides. Los resultados arrojados luego de 6 días de refrigeración demostraron que LY y Le mantuvieron los parámetros de espermatozoides vivos, endosmosis positiva, osmolaridad y pH similares a un diluyente comercial ampliamente utilizado en la especie. Además, la LY tampoco difirió en la motilidad total y progresiva y el porcentaje de acrosomas normales en relación al diluyente comercial. Los espermatozoides diluidos en dicho diluyente, mantenidos por 24 h a 4°C mostraron tener la misma eficacia que el semen fresco (Díaz, 2015). También se menciona que la adición de yema de huevo a la leche descremada mejora la viabilidad de los espermatozoides durante el almacenamiento en la refrigeración (Maxwell y Salamon, 1993).

2.2 BASES TEÓRICAS

2.2.1 Ganado bovino Criollo

El ganado bovino denominado Criollo en América Latina, se originó a partir de diversas razas bovinas *Bos taurus* provenientes de la Península Ibérica y de las Islas Canarias que llegaron a América durante la conquista española y en la época colonial (Florio, 2008). La selección natural ocurrida durante años, así como cruces dirigidos por ganaderos hicieron que la denominada raza Criolla se adaptara a las condiciones climáticas locales

(Bethancourt y Bolívar, 2013). En el Perú, además de cruzar las vacas Criollas con razas como Holstein y Pardo Suizo, también están utilizando las vacas Criollas como vientres de alquiler o hembras receptoras de embriones Pardo Suizo (INIA, 2014). A los bovinos criollos se les denomina Chuscos, Serranos y Criollo de las Sierras. Los animales Criollos en lugares de mayor altitud, tienen alto porcentaje de capas negras o parcialmente negras (Primo, 1992).

La productividad del ganado Criollo es considerada baja. Es que además de producir en condiciones muy difíciles, no se lo ha sometido a un mejoramiento genético, sistemático y de largo plazo. Sin embargo, este ganado tiene algunas ventajas, como la eficiencia de conversión alimenticia, mayor prolificidad y longevidad, menor susceptibilidad a enfermar. Cuando se consideran estos factores, su productividad compite ventajosamente con la de las razas introducidas, bajo condiciones de montaña. Además de la ventaja comparativa adaptada a la altura, si se la sometiera a un proceso de selección masal bien hecho, el vacuno criollo podría convertirse en un potente instrumento para impulsar el desarrollo rural de la Sierra del Perú (Lozada, 2008).

2.2.2 Uso de la inseminación artificial en ganado bovino Criollo

En el ganado Criollo el uso de inseminación artificial es muy limitado y sólo se observa en productores importantes o en comunidades donde algunas ONG'S o empresas mineras tratan de implementar programas de mejoramiento genético, en la Sierra donde predomina el ganado Criollo, la gran mayoría de productores utiliza la monta natural como medio de reproducción, mayormente seleccionando un reproductor dentro de su propio hato, no

siendo ésta una garantía de mejoramiento y de sanidad, ya que son pocos los productores en este ámbito que llevan un control sobre la genética de sus animales (Eslava, 2014).

En algunas zonas se realizan cruces del ganado Criollo con Brown Swiss, gracias a la inseminación artificial para el mejoramiento ganadero y como consecuencia se ha visto un incremento de la producción lechera, siendo en promedio de 10 a 15 L/día por animal (Núñez *et al.*, 2012).

2.2.3 Producción de espermatozoides

La producción de espermatozoides o la espermatogénesis es la suma de las divisiones mitóticas y meióticas de células espermáticas precursoras, que ocurren dentro del túbulo seminífero y resultan en la formación de los espermatozoides (Barrios, 2002).

La espermatogénesis consiste en el conjunto de acontecimientos que conducen a la formación de espermatozoides a partir de células germinales no diferenciadas y diploides. Su finalidad es producir gametos. Se pasa de células redondeadas a flageladas, las espermatogonias permanecen en estado latente en los testículos durante el periodo fetal y es durante la pubertad cuando comienzan a madurar (Mesa, 2012). La espermatogénesis tiene lugar en el compartimiento tubular que representa alrededor del 60 a 80% del volumen total del testículo. El compartimiento tubular contiene las células germinales y dos diferentes tipos de células somáticas, las peritubulares y las células de Sertoli. Estas células están localizadas en la membrana basal y se extienden hacia el lumen de los túbulos seminíferos; ellas representan entre el 35 y 40% del volumen del epitelio germinal y coordinan la espermatogénesis topográfica y funcionalmente (Vera, 2001).

2.2.4 Epidídimo

El epidídimo no es sólo un conducto para los espermatozoides, también proporciona un ambiente especial para que maduren y adquirir capacidad fecundante, el epidídimo se compone de cabeza, cuerpo y cola. En los dos primeros se producen el transporte y maduración de los espermatozoides. La cola sirve para reservar los espermatozoides. El paso de los espermatozoides a través del epidídimo dura unos 10 días en el ganado, la cabeza del epidídimo se encuentra alrededor del 36% de esperma y el cuerpo, alrededor del 18%. La cola del epidídimo tiene la capacidad de almacenar alrededor de 45 a 70% de los espermatozoides producida diariamente, para permanecer allí hasta que son eyaculados (Camargo, 2006) En la cola del epidídimo es el sitio donde los espermatozoides maduros se almacenan durante varios días o semanas en una condición viable y fértil antes de la eyaculación (Cooper, 2007).

2.2.5 Espermatozoides epididimarios

El epidídimo tiene fundamentalmente dos funciones: la maduración y el almacenamiento espermático (Mortimer, 1997). La maduración, o desarrollo progresivo de la capacidad fertilizante de los espermatozoides ocurre en la cabeza y el cuerpo del epidídimo y el almacenamiento ocurre en la cola del epidídimo, se podrían obtener espermatozoides viables provenientes de la cola del epidídimo con movilidad y capacidad fertilizante, poco tiempo después de la muerte del animal, que podrían ser procesados y congelados para su posterior uso en IA (Albers y Barrios, 2006). Estos espermatozoides adquieren la capacidad de volverse móviles durante la maduración epididimal, y se piensa que los eventos de fosforilación y desfosforilación en las proteínas del flagelo del esperma juegan un papel en estos cambios de motilidad (Tash y Bracho, 1994).

Los espermatozoides, a través del pasaje por los conductos eferentes y el epidídimo adquieren la habilidad de tener movimiento y progresivo lineal y la capacidad de fertilizar, durante este proceso en la célula espermática ocurren cambios funcionales, bioquímicos y morfológicos, también ocurre la reabsorción e intercambio de fluidos, especialmente en la cabeza del epidídimo ocurre la reabsorción de solutos y fluidos, en el cuerpo del epidídimo la maduración espermática, y en la cola del epidídimo el almacenamiento de los espermatozoides fértiles (Barrios, 2002). Se ha demostrado que espermatozoides recuperados de epidídimo son viables, incluso cuando se le mantiene a temperatura ambiente hasta por 24 h, lo cual indica que incluso podrían ser utilizados en la inseminación artificial (Papa *et al.*, 2015).

2.2.6 Refrigeración de semen y espermatozoides

Para la inseminación artificial el semen de un macho mejorado puede ser utilizado en forma fresca, refrigerada o congelada (Mesa, 2012). La refrigeración de los espermatozoides permite preservar los espermatozoides por un tiempo corto, presenta ventajas como: es sencillo el protocolo de refrigeración, permite transporte de las muestras entre distancias considerables, técnica de inseminación artificial simple y porcentajes de preñez superiores que los obtenidos con semen congelado (Pinto *et al.*, 1999). La refrigeración del semen puede ser entre 15 a 20 °C o entre 4 a 5 °C. La mayor ventaja del semen refrigerado, motivo por el cual esta tecnología se encuentra en utilización cada vez en más países (Rossi, 2012).

La refrigeración del semen a 5 °C reduce el metabolismo de los espermatozoides con el subsiguiente ahorro de reservas energéticas, siempre y cuando se proteja a las células contra

las bajas temperaturas mediante la adición de compuestos orgánicos como la leche descremada o la yema de huevo, que aumentan la resistencia de la membrana a los cambios de permeabilidad e impiden que los espermatozoides acumulen calcio al alterarse el sistema de intercambio de la membrana (Palomino *et al.*, 2007).

2.2.7 Dilutores del semen

Por diluyente se entiende la solución acuosa que permite aumentar el volumen del eyaculado hasta conseguir las dosis necesarias, preservar las características funcionales de las células espermáticas y mantener el nivel de fertilidad adecuado (Rueda, 2011). El empleo de estos medios conservadores (diluyentes) permite prolongar la viabilidad de la célula espermática, rentabilizar los eyaculados obtenidos y conservar las dosis por un periodo prolongado de tiempo (Palomino *et al.*, 2007).

Estos diluyentes empleados en la conservación de espermatozoides, deben ser isotónicos con el plasma seminal (320 mOsm/kg) cuando es utilizado en refrigeración, e hiperosmótico (400 mOsm/kg) en congelación; debe poseer un pH próximo a 7 y capacidad tampón con el fin de mantener el pH en la neutralidad, compensando la producción de ácido láctico durante la congelación, contener moléculas que protejan a los espermatozoides frente al frío; poseer una fuente de energía siendo la glucosa y la fructosa las más utilizadas; estar libres de bacterias y contaminación, para lo cual se utilizan antibióticos en su composición (Galarza, 2013).

Un diluyente debe reunir una serie de propiedades básicas relacionadas con su pH, capacidad tampón, osmolaridad, y fuerza iónica. Además, debe aportar una fuente de energía, no debe deteriorarse durante el almacenamiento previo a su uso, debe proteger a

los espermatozoides durante el enfriamiento, congelación y descongelación, debe ser resistente al crecimiento bacteriano (Muiño, 2008); no deben deteriorarse durante el almacenamiento previo a su uso y sobre todo deben proporcionar a la célula espermática protección frente a efectos de baja temperatura (Palomino *et al.*, 2007).

Sobre las características de los diluyentes Cortés (2003) menciona que deben ser:

- Ser isotónico con el plasma seminal (320 mOsm/kg) cuando es utilizado en refrigeración.
- Poseer un pH próximo a 7 y capacidad tampón con el fin de mantener el pH en la neutralidad, compensando la producción de ácido láctico durante la congelación.
- Contener moléculas que protejan a los espermatozoides frente al frío, clasificadas en función de su capacidad de penetrar la membrana plasmática en: sustancias crioprotectoras penetrantes y no penetrantes.
- Contener en su constitución una fuente de energía, siendo la glucosa y fructosa las más utilizadas.
- Estar libre de bacterias y contaminación, para lo cual se utilizan antibióticos en su formulación.
- Aumentar el volumen substancialmente con el fin de poder realizar múltiples servicios por medio de la inseminación artificial.

a) Componentes de los dilutores del semen

Rossi (2012) menciona que los componentes básicos de los diluyentes utilizados para el congelamiento de semen son esencialmente los mismos que los que se utilizan para

almacenar semen en estado líquido, estos diluyentes utilizados para la conservación de semen en la mayoría de las especies domésticas, se encuentran compuestos por las siguientes sustancias.

- Agua bidestilada o ultrapura, como disolvente del resto de los componentes.
- Sustancias iónicas y no iónicas para mantener la osmolaridad y el pH del medio.
- Materiales orgánicos como yema de huevo o leche, que cuentan con capacidad de disminuir o evitar el efecto frente al shock de frío.
- Crioprotectores, siendo el más utilizado el glicerol.
- Azúcares. Simples como fuente energética, o di y trisacáridos como crioprotectores adicionales.
- Antibióticos para controlar el crecimiento bacteriano.
- Otros aditivos, que pueden ser opcionales, como enzimas, detergentes o aminoácidos que pueden mejorar la fertilidad.

b) Tipos de dilutores

Los diluyentes seminales se han clasificado en dos grandes grupos: los de conservación a corto plazo (1 a 3 d) y aquellos que tienen como objetivo la conservación de semen a largo plazo (más de 4 d) entre 12 y 20 °C (Hidalgo, 2013).

Ávila-Portillo *et al.* (2006), clasifica a los dilutores en agentes penetrantes (glicerol, dimetilsulfoxido, propanediol), que son bajos en peso molecular y permeable a través de la membrana celular; también en agentes no penetrantes (sacarosa, glucosa, dextrosa y dextrano) que son de alto peso molecular, efectivas a velocidades altas de congelación,

promueven la rápida deshidratación celular y suelen usarse asociados a los agentes penetrantes utilizándose diversos dilutores para la conservación de semen tales como; yema de huevo + citrato + glucosa, Tris + yema de huevo y PBS + yema de huevo + suero fetal, obteniendo sobrevivencia espermática variable (Pérez *et al.*, 2014).

c) Dilutor Tris

El dilutor Tris (Tris hidroximetil aminometano) es uno de los principales diluyentes utilizados en la criopreservación y refrigeración de semen bovino, ya que al combinar dicha sustancia con yema de huevo y glicerol se favorece notablemente la preservación de los espermatozoides a distintas temperaturas 5 o -85 °C. En la actualidad, la mayoría de los diluyentes utilizados para la criopreservación de material seminal contienen Tris y ácido cítrico como principales sustancias tampón (Rossi, 2012).

2.2.8 Uso de yema de huevo

La yema de huevo es utilizada en los medios de conservación del semen por el efecto protector que ejercen las lipoproteínas de baja densidad y la lecitina fundamentalmente contra el shock provocado durante el enfriamiento (periodo de equilibrio) previo al proceso de congelación. Tanto las lipoproteínas de baja densidad como la lecitina, realizan igual acción protectora para los nemaspermios durante el shock térmico severo, aunque las lipoproteínas son superiores durante el enfriamiento y almacenaje en frío (Martínez *et al.* 2011).

La yema de huevo es un ingrediente comúnmente utilizado para la conservación de semen ya que preserva la motilidad e integridad de las membranas del acrosoma y mitocondrias del espermatozoide además es un buffer osmótico, también se ha notado que la yema de

huevo protege durante la congelación, ya que se adhiere a la membrana y la recubre, esta facultad de protección se adjudica a la gran densidad de la fracción de lipoproteínas (Carpio, 2015) La adición de la yema de huevo al diluyente tiene un efecto benéfico sobre el porcentaje de motilidad, particularmente luego de un rápido enfriamiento del semen a 10 y 5 ° C, ya que las lipoproteínas de baja densidad actúan como crioprotectores contribuyendo con dos factores: uno de los cuales protege contra el shock de frío (factor de resistencia) y un segundo que mantiene una viabilidad (factor de conservación) [Galarza, 2013]. La fracción de lipoproteínas de baja densidad está establecida como el componente activo, pero hay poca información sobre la naturaleza de su interacción con la membrana de la célula espermática (Watson, 1981).

a) Huevo de gallina

El huevo de gallina consiste de 57% de clara, 32% de yema y 12% de cascara (Mendiola, 2002).

Cuadro 1. Composición química del huevo de gallina

Componente	Componente	Componente	Componente
Agua, g	74.0	Hierro, mg	2.10
Energía, Kilocalorías	158.0	Fósforo, µg	180.00
Proteínas, g	12.10	Zinc, mg	1.44
Hidratos de carbono, g	1.20	Vitamina B1 (Tiamina), mg	0.09
Ácidos grasos saturados, g	3.35	Niacina (Ácido nicotínico), mg	0.10
Ácidos grasos monoinsaturados, g	4.08	Ácido fólico, µg	65.00
Ácidos grasos poliinsaturados, g	1.24	Vitamina B12 (Cianocobalamina), µg	66.00
Colesterol, mg	548	Vitamina B6 (Piridoxina), mg	0.12
Fibra dietética, g	0	Vitamina C (Ácido ascórbico), mg	0
Calcio, mg	56.00	Vitamina A (equivalentes de Retinol), µg	227.00
Magnesio, mg	12.00	Vitamina D3, µg	1.80

Tablas de valor nutritivo de los alimentos. INNSZ Instituto Nacional de Nutrición "Salvador Zubiarán". Ciudad México: 1996, citado por Santana (2008).

b) Huevo de codorniz

La estructura del huevo de codorniz es la siguiente: yema (42.3%), clara (46.1%), membranas (1.4%), y cáscara (10.2%). En la yema se encuentran las principales vitaminas, lípidos y minerales del huevo y por ello es la parte nutricionalmente más valiosa. Su contenido en agua es de aproximadamente el 50%. El huevo de codorniz tiene una concentración mayor ($P < 0.05$) de proteínas, extracto etéreo y calcio en los huevos de codorniz que en los de gallina, de la misma manera la concentración de ácidos grasos omega 3 del tipo ácido eicosapentaenoico (EPA) en los huevos de codorniz es tres veces mayor que en los huevos de gallina (Mendiola, 2002).

Cuadro 2. Composición proximal de los huevos de codorniz

	g/100g de porción comestible		
	Clara	Yema	Huevo entero
Humedad	86 ± 1.4	51 ± 7.4	69.49 ± 4.0
Proteína (N x 6.68)	11.63 ± 2.6	15.63 ± 1.9	13.63 ± 2.1
Lípidos	N.D.	33.61 ± 2.2	12.59 ± 2.2
Colesterol		1.13 ± 0.2	

González (2011).

- **Minerales:** la composición mineral del huevo de codorniz está representado por calcio (0.08%), fósforo (0.22%), cloro (0.13%), potasio (0.14%), sodio (0.13%), azufre (0.19%), hierro (0.031%), manganeso (0.33%), cobre (1.86%), yodo (0.09%) y magnesio (0.04%) (Mendiola, 2002).

- **Ácidos grasos:** Un total de seis ácidos grasos fueron identificados en el huevo de codorniz los cuales son: mirístico, palmítico, palmitoleico, esteárico, oleico y linoleico. El ácido oleico 18:1 resultó ser el más abundante, correspondiendo a un $44.68\% \pm 0.88$ del total de ácidos grasos, el ácido mirístico, 14:0 se encontró en menor porcentaje y dentro de los ácidos grasos poliinsaturados, el ácido linoleico, 18:2 fue el que se encontró en mayor proporción.

Cuadro 3. Composición de los ácidos grasos, total de lípidos de la yema de huevo

Ácido graso	Porcentaje total de ácidos grasos	
	Codorniz	Gallina
Mirístico (14:0)	0.75 ± 0.11	0.36 ± 0.07
Palmitico (16:0)	28.04 ± 0.26	27.40 ± 1.19
Palmitoleico (16:1)	5.91 ± 0.55	4.00 ± 0.49
Esteárico (18:0)	8.71 ± 0.49	9.05 ± 1.38
Oleico (18:1)	44.68 ± 0.88	43.01 ± 1.80
Linoleico (18:2)	11.91 ± 1.34	15.62 ± 0.86

González (2011).

c) Comparación de la composición de huevos de gallina y codorniz

Los contenidos de colesterol y perfil de ácidos grasos de huevos de gallina y codorniz, son los que habitualmente se consumen o comercializan. La composición proximal se determina utilizando las técnicas especificadas por la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales y para colesterol y ácidos grasos se utiliza cromatografía en fase gaseosa, previa extracción de los lípidos por técnica de Folch modificada (Closa *et al.*, 1999).

Cuadro 4. Análisis comparativo de la composición química del huevo de gallina y codorniz

	g/100 g de porción comestible	
	Gallina	Codorniz
Agua	75.30	74.40
Proteína	12.50	13.10
Lípidos totales	10.00	11.10
Cenizas	0.94	1.11
Fosforo (mg)	178.00	226.00
Sodio (mg)	126.00	141.00
Potasio (mg)	121.00	132.00
Calcio (mg)	49.00	64.00
Magnesio (mg)	10.00	12.50

ESHA, 1997. Citado por Pérez (2004).

2.2.9 Shock de frío

Es bien conocido que el enfriamiento rápido del semen induce un estrés letal en algunas células, el cual es proporcional a la tasa de enfriamiento. Es así que el enfriamiento debe ser realizado cuidadosamente, este fenómeno es conocido como shock de frío y puede apreciarse durante el enfriamiento de espermatozoides de cualquier especie (Watson, 1981). Sin embargo, un lento enfriamiento induce estrés sobre la membrana del espermatozoide, este hecho se relacionaría con un cambio de fase lipídica y alterando el estado funcional de la membrana espermática (Stormellil *et al.*, 2005).

2.2.10 Membrana citoplasmática del espermatozoide

La membrana consta de una bicapa lipídica compuesta por diferentes tipos de fosfolípidos, proteínas integrales y colesterol. Cada una de las especies de fosfolípidos presenta una temperatura de transición de fase diferente (Blanch, 2007). La integridad de la membrana plasmática y acrosomal reflejan la viabilidad espermática, y el proceso de refrigeración y/o

crio preservación podría afectar estas membranas ocasionando daños como hinchamiento y disrupción de las mismas, cambios en la fluidez, alteración del flujo de calcio y cambios en la actividad enzimática que pueden inducir una capacitación espermática anticipada, viéndose afectada la fertilidad (Cabrera y Pantoja, 2012).

2.2.11 Bioquímica del espermatozoide durante la refrigeración

Estudios demuestran que la fracción de lipoproteínas de baja densidad (LDL) de la yema de huevo se une a las proteínas del plasma seminal (BSP4) que se encuentra de 35 a 50 mg/mL, y se dice que esta interacción juega un rol importante en la protección del espermatozoide. En la eyaculación, las proteínas BSP4 se unen en los fosfolípidos de la membrana espermática, esta unión se produce de forma rápida, específica, saturable y estable, y se mantiene durante la congelación y la descongelación y mejora la capacidad espermática inducidos por las lipoproteínas de alta densidad y heparina, estimulando el movimiento o salida de colesterol y fosfolípidos de la membrana espermática. Pero si el eyaculado no es diluido entonces los espermatozoides son expuestos a altas concentraciones de BSP4 y hay un continuo movimiento de lípidos que puede ser perjudicial para la membrana espermática provocando su desestabilización (Bergeron *et al.*, 2004).

Cuando la membrana del espermatozoide es sometida a un descenso de temperatura, se produce un cambio de fase de los fosfolípidos de fase líquida-cristalina a fase de gel y las cadenas de ácidos grasos que los componen se convierten en rígidas y paralelas. Se forman dominios de gel a medida que las diferentes familias de fosfolípidos llegan a su temperatura de transición de fase (mientras los fosfolípidos de otras familias siguen en fase líquida), de

manera que se rompen las asociaciones normales de los fosfolípidos (entre ellos y con las proteínas de membrana) y el resultado final es una agrupación de lípidos por familias, una redistribución de las proteínas, y una mayor rigidez de membrana (Blanch, 2007).

2.2.12 Evaluación del semen

a) Evaluación macroscópica

Gómez y Migliorisi (2017) consideran la evaluación macroscópica del semen como la primera evaluación a realizar, que consta de los siguientes pasos:

Volumen: Se observa directamente sobre el tubo graduado, teniendo en cuenta que un toro mayor de 2 años debe tener un eyaculado de no menos de 4 mL. El volumen puede variar entre 2 y 12 mL.

Color: Se consideran normales los colores que van del blanco al amarillento, siendo patológicos, los colores rosado, amarronado y verdoso.

Densidad: La densidad del semen varía desde un semen acuoso, lechoso, lechoso-cremoso, hasta un cremoso, estando directamente relacionada con la concentración.

MB = Cremoso, espeso 750.000 esp/mm³

B = Lechoso, 400 a 750.000 esp/mm³

R = Leche aguachenta, 250 a 400.000 esp/mm³

P = Traslucido, menos de 250.000 esp/mm³

Motilidad en masa macroscópica: Según Angelino (2009) se evalúa observando el tubo de recolección y detectando la presencia o no de movimiento masal o de remolinos. Se considera como positiva o negativa dando una valoración de 0 a 5

- Muy bueno MB (5) = movimientos masivos muy marcados raidos.

- Bueno B (4) = movimiento en masa aparente, pero moderados.
- Regular R (3) = ondas en movimiento apenas apreciable.
- Pobre (P) (2) = movimientos débiles apenas apreciables
- Muy pobre (MP) (1) = no hay ondas, semen sin movimiento.

Las otras evaluaciones macroscópicas descritas por Gómez y Migliorisi (2017), son:

pH: Se evalúa extrayendo una gota de semen del tubo y colocándola sobre una tira indicadora de pH. Se considera un pH normal, entre 6.2 y 6.8.

Cuerpos extraños: Se evalúa observando el fondo del tubo para detectar la presencia de algún cuerpo extraño, se considera como positivo o negativo.

Schalm Test: Se realiza para detectar la presencia de leucocitos, pero sólo en casos que se sospeche la presencia de los mismos. No se hace de rutina en cada evaluación.

b) Evaluación microscópica

Dentro de la evaluación microscópica se analizan los siguientes parámetros.

Concentración espermática

La concentración o número de espermatozoides son una variable contundente en relación con la fertilidad (Rodríguez y Martínez, 2013; Zrimsek, 2011). El método inicial utilizado en la mayoría de los centros es estimar la concentración de espermatozoides por un recuento mediante la técnica hemocitométrica o por una determinación espectrofotométrica de la turbidez de una dilución medido de una muestra de semen (Vijaya *et al.*, 2013).

El método hemocitométrico se realiza con la utilización de la cámara de Neubauer, el cual es un portaobjetos que tiene dos zonas ligeramente deprimidas y que en el fondo de las cuales se ha marcado una rejilla con 5 cuadros principales: A, B, C, D y E. El cuadro

central, E, se subdivide en 25 cuadros menores. Los 4 cuadrados más pequeños de las esquinas se denominan E1, E2, E3, E4, mientras que el central es E5. Cuando se cuenta se incluyen todos los espermatozoides contenidos dentro de los cuadros elegidos y los que crucen las líneas superior y derecha del cuadro. El cuadro principal E tiene 1 mm de largo y 1 mm de ancho, y el espesor de líquido comprendido entre la cubierta y el hemocitómetro es de 0.1 mm. Por lo tanto, su factor de multiplicación del cuadro principal es de 104, o 10000. Si se cuentan todos los espermatozoides contenidos en dicho cuadrado y el número se multiplica por el factor anterior (10000), se obtiene el número de espermatozoides por mililitro de la solución aplicada al hemocitómetro. Si este número a su vez se multiplica por el factor de dilución espermática (10, 20, 100, 200, etc.) se obtendrá la concentración de espermatozoides en la muestra original de semen. A partir de esta información, el número total de espermatozoides en el semen se calcula multiplicando la concentración espermática por el volumen del eyaculado (Cisneros, 2011).

Motilidad espermática

La motilidad es uno de los muchos requisitos que ha de reunir un espermatozoide para ser capaz de fecundar un ovocito, sin embargo, ha sido y todavía es el parámetro más utilizado para valorar la calidad de un eyaculado o de una dosis de semen refrigerado o congelado, para la migración espermática a través del tracto genital de la hembra ocurra normalmente, y sobre todo para el establecimiento de un reservorio espermático en el oviducto, los espermatozoides han tener movimiento activo; pero además, la motilidad es también una manifestación de integridad estructural y de competencia funcional del espermatozoide (Muiño *et al.*, 2006).

Motilidad o movimiento en masa

La motilidad del esperma se calcula mediante la evaluación del porcentaje de espermatozoides en una muestra de eyaculado que tienen movimiento progresivo (Perry 2008). Se observa de la siguiente manera, se coloca 5 mm de diámetro sobre un portaobjetos precalentado y se observa el movimiento en masa de los espermatozoides, usando microscopio de campo claro, el diafragma de campo cerrado y con una magnificación de 40X, los factores que influyen en el movimiento en masa de los espermatozoides son la concentración, el porcentaje de células con movimiento progresivo y la velocidad/vigor del movimiento de los espermatozoides, si uno o más de estos factores se encuentran comprometidos el movimiento en masa se reducirá (Angelino, 2009).

Normalmente la motilidad masal se valora de forma subjetiva en una escala de 0 a 5, con una puntuación de 5 cuando se observan oleadas o remolinos con movimiento rápido y vigoroso, y de 0 cuando no se observa movimiento en ondas. Tras la dilución del eyaculado fresco, o tras la descongelación de dosis de semen congelado, se estima el porcentaje de espermatozoides individuales que están en movimiento y el tipo de movimiento que realizan progresivos o no progresivos (Muiño, 2008).

Motilidad total

La motilidad total es uno de los parámetros más importantes del análisis seminal el cual se realiza mediante la valoración visual subjetiva de los espermatozoides móviles y la calidad de su movimiento a una temperatura 37 ° C a 40 X, para lo cual se contarán 200 células expresándolas en porcentaje todas los espermatozoides que presenten movimientos (Mellisho, 2010).

Motilidad individual progresiva

Se coloca un volumen de 5 a 7 μL de semen sobre un portaobjetos nuevo y precalentado creando una gota de aproximadamente 3 a 5 mm de diámetro, que luego se cubre con una laminilla cubreobjetos, la muestra se observa con microscopía de fase y con aumento de 200 – 400x determinando el porcentaje de células espermáticas con movimiento progresivo lineal. Si el semen está muy concentrado, la muestra puede diluirse con una solución amortiguadora o diluyente de semen antes de colocar al cubreobjetos (Angelino, 2009).

Morfología

El análisis morfológico de los espermatozoides es uno de los principales componentes de la evaluación de las características de una muestra seminal. La valoración de la morfología del espermatozoide se basa en la relación directa que haya entre la proporción de espermatozoides anormales en el eyaculado, el tipo de defecto morfológico y su relación con la fertilidad *in vivo* de los toros (Hidalgo *et al.*, 2002).

La morfología está estrechamente relacionada con la motilidad espermática en forma más directa, y se mide en porcentaje de espermatozoides con defectos de morfología. Se necesita, al menos, un buen porcentaje de espermatozoides móviles y de ellos se espera que entre 70 a 80% posea morfología normal. Esto quiere decir, que como máximo se acepta 20 a 30% de atipias (Aguero, 2012).

Vitalidad

Esta característica mide el número de espermatozoides vivos y se expresa como el porcentaje de células muertas, una vez dañado, los espermatozoides no son capaces de volver a sellar el plasmalema comprometida, y por lo tanto, no puede mantener esas

concentraciones de iones y co-factores esenciales para la supervivencia de los espermatozoides. El desarrollo de la tecnología ha proporcionado nuevas herramientas para la evaluación de la funcionalidad de los espermatozoides (Januskauskas y Zilinskas, 2002).

Para medir la vitalidad de una muestra de semen, se utilizan colorantes vitales, tales como el colorante eosina-nigrosina, con el cual los espermatozoides muertos serán teñidos de color rojo o en rosa, mientras que los vivos quedan sin teñir, esto debido a que el colorante, cuando existe daño a nivel de la membrana celular, como en la célula espermática muerta, es capaz de atravesarla y colorearla; aquellos espermatozoides que se observan en la lámina sin teñirse, son aquellos espermatozoides que poseen una membrana celular intacta y no permeable al paso del colorante (Aguero, 2012).

Integridad de la membrana espermática

La integridad de la membrana espermática ha sido uno de los parámetros más estudiados, por su papel clave en la función espermática. De hecho, el estado de la membrana espermática marca la integridad morfológica y funcional de la célula. La evaluación morfológica se realiza usando la óptica de contraste diferencial de interferencia, la óptica de contraste de fase o las tinciones supravitales como el verde rápido/eosina, la eosina/azul de anilina, el azul tripan/giemsa o el amarillo de naftol/eritrosina (Mellisho, 2010).

Test hipoosmótico (Host)

El Host, es un método que se basa en la capacidad de las membranas para permitir el paso del agua con el fin de establecer el equilibrio entre el compartimento de fluido dentro del espermatozoide y los alrededores externos (Drevious, 1972). Se sugirió que la capacidad de los espermatozoides de hincharse en presencia de medio hipo-osmótico refleja el transporte

de agua normal través de la membrana de esperma, que es un signo de integridad de la membrana normal y la actividad funcional (Januskauskas y Zilinskas, 2002).

El Host en toros puede realizarse sometiendo una muestra de 10 μ L de semen a un medio hiposmótico (100 ó 150 mOsm/ L) durante 30 minutos y en un baño maria termoestable a 37 °C. Transcurrido este tiempo, se inmovilizan los espermatozoides con glutaraldehido y sobre una lámina portaobjeto se observa la muestra fijada, utilizando un microscopio de contraste de fases con el objetivo de 40X. Se cuentan los espermatozoides hasta un total de 100, observando la reacción positiva de los mismos Mediante flagelos doblados o enrollados (Rubio-Guillen y Quintero-Moreno, 2008).

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Localización

El presente experimento fue realizado en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac, ubicado en Patibamba Baja del distrito y provincia de Abancay del departamento de Apurímac, Perú. Está localizado a 13°38'31.40" Latitud Sur y 72°53'17.03" Longitud Oeste, y está a 2180 m de altitud (Google Earth, 2017).

3.2 Material biológico

Se utilizaron al azar 30 epididimos de toros criollos mayores de 3 años de edad (identificados mediante dentición, más de 6 incisivos), beneficiados en el Camal Municipal de Abancay. Una vez beneficiado los animales inmediatamente los testículos fueron extraídos mediante separación el cordón espermático, túnica vaginal y túnica albugínea. Luego se colocó en bolsas plásticas estériles, en una caja con tapa de poliestireno y se transportó hasta el Laboratorio de Reproducción Animal, a una temperatura entre 25 a 30 °C alrededor de 60 min.

3.3 Diseño experimental

Se formaron tres grupos de tratamiento (T) de dilutores de espermatozoides, T1: Tris – yema de huevo de codorniz al 10% (n = 10); T2: Tris – yema de huevo de codorniz al 15% (n = 10); T3: Tris – yema de huevo de codorniz al 20% (n = 10). Las muestras de cada tratamiento de espermatozoides epididimarios, se evaluaron a 0, 12, 24, 48 y 72 h de refrigeración a 4.5 °C.

3.4 Colección de espermatozoides

Los espermatozoides epididimarios se colectaron mediante la técnica de lavado por flujo retrógrado, que consiste en los siguientes procesos:

- a. Mediante la utilización de implementos y técnicas asépticas se diseccionaron los vasos deferentes y la cola del epidídimo, se removió la túnica serosa testicular y los vasos sanguíneos con bisturi y tijera recta.
- b. Una vez removida la túnica serosa testicular y ubicado el conducto deferente se inyectó 3 mL de dilutor Tris - yema de huevo de codorniz al 10, 15 y 20% según los tratamientos.
- c. Se introdujo una aguja de 21 G con punta “roma” con jeringa hipodérmica de 10 mL con 3 mL de diluyente Tris - yema de huevo de codorniz 10, 15 y 20% según los tratamientos, en el lumen del conducto deferente y se perfundió lentamente. Las paredes del conducto deferente se sujetaron con una pinza “mosquito” contra la aguja para evitar la pérdida del líquido de lavado. A continuación, se obtuvo lentamente el líquido espermático epididimario por el extremo cortado al extremo

distal de la cola del epidídimo, luego se colocó el tubo cónico de 15 mL donde se obtuvo la muestra, inmediatamente se llevó a baño María a 37 °C.

3.5 Preparación de dilutores

Los dilutores se prepararon individualmente para los tres tratamientos, utilizando los siguientes componentes según Cuadro 5.

Cuadro 5. Composición del dilutor Tris - yema de huevo de codorniz según los tratamientos, preparación para 25 mL.

	T1	T2	T3
	10%	15%	20%
Tris (g)	0.9075	0.9075	0.9075
Glucosa (g)	0.1250	0.1250	0.1250
Ácido cítrico (g)	0.4975	0.4975	0.4975
Yema de huevo de codorniz	1.25 mL	2.5 mL	5 mL
Penicilina	10000 UI	10000 UI	10000 UI
Agua bidestilada	23.75 mL	22.5 mL	20 mL

3.6 Refrigeración

Las muestras contenidas en tubos cónicos de plástico según los tratamientos se colocaron a refrigeración a 4.5 °C, desde allí se tomaron muestras para la evaluación espermática a los diferentes tiempos 0, 12, 24, 48 y 72 h de refrigeración post colección de espermatozoides epididimarios.

3.7 Evaluación de los espermatozoides epididimarios

a) Motilidad espermática

i. Motilidad masal

La evaluación de motilidad masal es subjetiva, se le dio la valoración de 0 a 5; considerando 0, a la ausencia de movimiento y 5 a ondas con movimiento muy rápido y vigoroso. Se colocó 5 μ L de espermatozoides colectados del epidídimo sobre el portaobjeto atemperado a 37 °C y se observó con microscopio óptico a 10X.

ii. Motilidad individual total

Se consideró el total de espermatozoides mótiles o móviles expresada en porcentaje. Para la evaluación esta evaluación de motilidad, 5 μ l de espermatozoides colectados del epidídimo fue depositada sobre una lámina portaobjetos previamente calentada y diluida en 45 μ L de cloruro de sodio en tubos Eppendorf, de esa dilución se aspiró y se colocó a la lámina portaobjeto, luego fue recubierta por un cubreobjetos y se observó en un microscopio a 40X.

iii. Motilidad rectilínea progresiva

Se consideró a la motilidad de espermatozoides con movimientos rectilíneos y progresivos que atraviesan el campo microscópico observado. El procedimiento para la evaluación fue el mismo que para motilidad individual total. Fue expresada en porcentajes.

b) Vitalidad espermática

La viabilidad espermática fue evaluada utilizando una solución de eosina/nigrosina. Se colocó una alícuota de 5 μ L de eosina, nigrosina y espermatozoides. Se observaron 200

células espermáticas en microscopio óptico a 100X, se consideró espermios muertos aquellos coloreados.

c) Integridad funcional de la membrana citoplasmática

La prueba de Host se realizó utilizando 0.9 mL de solución hiposmótica y 0,1 mL de espermatozoides diluidos y luego se agregó 0.1 mL de formaldehído al 4%. Se contaron 200 células espermáticas por microscopía a 1000 x. La positividad a la prueba de endósmosis se consideró cuando las células espermáticas presentaron edema, evidenciado por enrollamiento de la cola. Los espermatozoides se sometieron a la prueba de endósmosis (hiposmótica - Host), incubados por 30 min a 37 °C en solución citrato de sodio más fructosa (100 mOsm/ L).

3.8 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa SAS v 9.4. Las variables de respuesta al principio se comprobaron la normalidad y homogeneidad de varianzas mediante la prueba Shapiro-Wilk a través del procedimiento UNIVARIATE, luego se utilizó el procedimiento GLM (modelo lineal general) con datos desbalanceados para realizar el análisis de varianza bajo el diseño completamente al azar, determinando la significancia ($P \leq 0.05$) entre grupos, cuyo modelo fue:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

Dónde:

Y_{ij} = Es variable de respuesta (motilidad masal, motilidad individual total, motilidad individual rectilínea progresiva, integridad de funcional de la membrana citoplasmática y vitalidad).

μ = Es la media general

T_i = El efecto del tratamiento (Tris - yema de huevo de codorniz al 10, 15 y 20%)

e_{ij} = Es el error experimental.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Motilidad masal

La motilidad masal se muestra en el Cuadro 6. El dilutor Tris - yema de huevo de codorniz (TYHC) al 10, 15 y 20% en los diferentes tiempos 0, 12, 24, 48 y 72 h de refrigeración de espermatozoides, presenta efectos similares ($P \geq 0.05$) sobre la motilidad masal espermática. Conforme el tiempo de refrigeración es mayor, la motilidad masal se reduce ($P \leq 0.05$). En la Figura 1. Se observa, entre la dosis de TYHC y el tiempo de refrigeración de espermatozoides no hubo interacción ($P \geq 0.05$).

Cuadro 6. Grado de motilidad masal (media \pm desviación estándar) de espermatozoides epididimarios de toros Criollos colectados a post mortem con dilutor Tris con diferentes concentraciones de huevo de codorniz (YHC) evaluados a diferentes tiempos de refrigeración (TR).

YHC (%)	n	TR (h)				
		0	12	24	48	72
10	10	4.4 \pm 0.26a	3.3 \pm 0.33b	2.4 \pm 0.45c	1.6 \pm 0.36d	1.2 \pm 0.64e
15	10	4.3 \pm 0.36a	3.4 \pm 0.34b	2.7 \pm 0.68c	2.0 \pm 0.65d	1.7 \pm 0.75e
20	10	4.3 \pm 0.37a	3.1 \pm 0.32b	2.6 \pm 0.91c	1.6 \pm 0.65d	1.0 \pm 0.73e

Letras distintas dentro de la misma fila, expresan diferencias ($P \leq 0.05$)

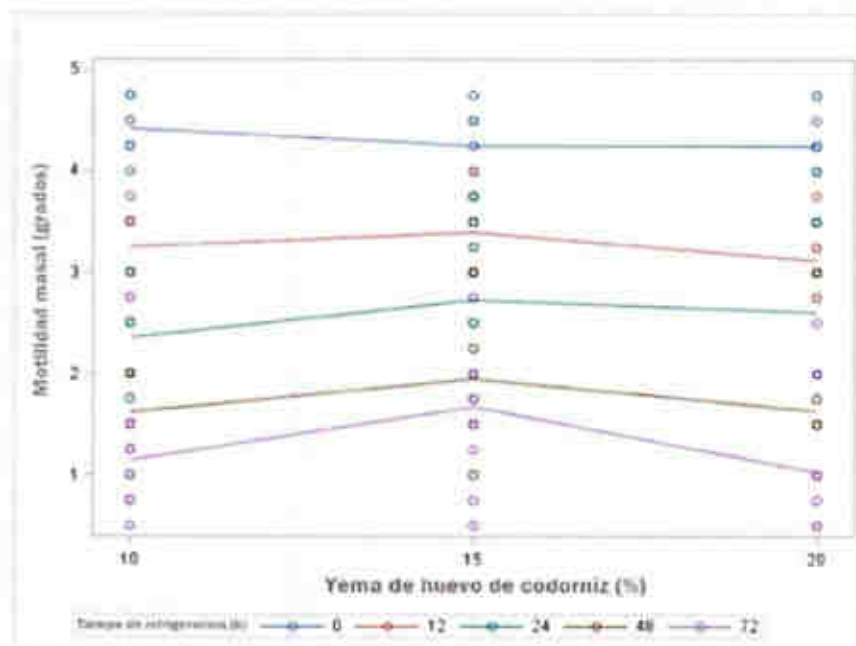


Figura 1. Interacción entre Tris – yema de huevo de codorniz (10, 15 y 20%) y tiempos de refrigeración (0, 12, 24, 48 y 72 h) sobre la motilidad masal de espermatozoides epididimarios de toros criollos colectados a post mortem.

Luciano *et al.* (2012) encontró un vigor (0 a 5) promedio de 3.6 ± 0.7 , Ribeiro-Peres *et al.* (2014) 3.5 ± 0.5 , en espermatozoides frescos colectados con dilutor Tris – yema de huevo sin crioprotector desde epididimos de toros post mortem ; valores que son inferiores al resultado de este estudio que se encontró 4.3 ± 0.3 en espermatozoides antes de la refrigeración. Considerando las horas de refrigeración 0, 12, 24 h post colección de espermatozoides epididimarios de este estudio, los valores de motilidad masal son similares 84, 46, 40% a 2, 10 y 24 h de espermatozoides recuperados del epididimo de toros post mortem obtenido por Luzón (2015).

En otro estudio Bertol *et al.*, (2013) muestra valores medios de vigor de espermatozoides recolectados de la cola del epididimo de 5 ± 0 ; 5 ± 0 ; 4.5 ± 1 ; 4.7 ± 0.5 ; 4 ± 0 para 6, 12,

18, 24, 30 h post orquiectomía de toros, el primer valor es similar al resultado del presente estudio, los siguientes valores son diferentes porque se refrigeró los espermatozoides diluidos, mientras en el otro caso estuvieron contenidos dentro del epidídimo junto al testículo orquiectomizado. La motilidad masal es subjetiva, otros denominan como actividad masal que se estima mediante una valoración subjetiva del movimiento masivo de los espermatozoides con un rango de 0 a 5, según Evans *et al.* (1990).

4.2 Motilidad total

En el Cuadro 7. Se muestran los resultados de la motilidad total de espermatozoides epididimarios colectados post mortem. Las tres concentraciones 10, 15 y 20% del dilutor TYHC en distintos tiempos de refrigeración 0, 12, 24, 48 y 72 h tienen efectos similares ($P \geq 0.05$). Según las horas de refrigeración que transcurre, la motilidad total de espermatozoides es diferente y disminuye ($P \leq 0.05$). Entre las concentraciones del dilutor TYHC versus horas de refrigeración no hay interacción ($P \geq 0.05$), se observa en la Figura 2.

Cuadro 7. Porcentaje de motilidad total de espermatozoides epididimarios de toros Criollos (media \pm desviación estándar) colectados a post mortem con dilutor Tris con diferentes concentraciones de yema de huevo de codorniz (YHC) evaluados a diferentes tiempos de refrigeración (TR).

YHC (%)	n	TR (h)				
		0	12	24	48	72
10	10	81.1 \pm 6.47 a	71.2 \pm 7.00 b	65.1 \pm 9.35 c	42.1 \pm 10.65 d	33.6 \pm 7.18 e
15	10	82.0 \pm 2.21 a	73.5 \pm 9.97 b	72.6 \pm 4.93 c	48.1 \pm 8.01 d	37.2 \pm 6.44 e
20	10	82.6 \pm 6.08 a	72.3 \pm 8.06 b	67.8 \pm 10.83 c	44.1 \pm 8.29 d	35.9 \pm 6.15 e

Letras distintas dentro de la misma fila, expresan diferencias ($P \leq 0.05$).

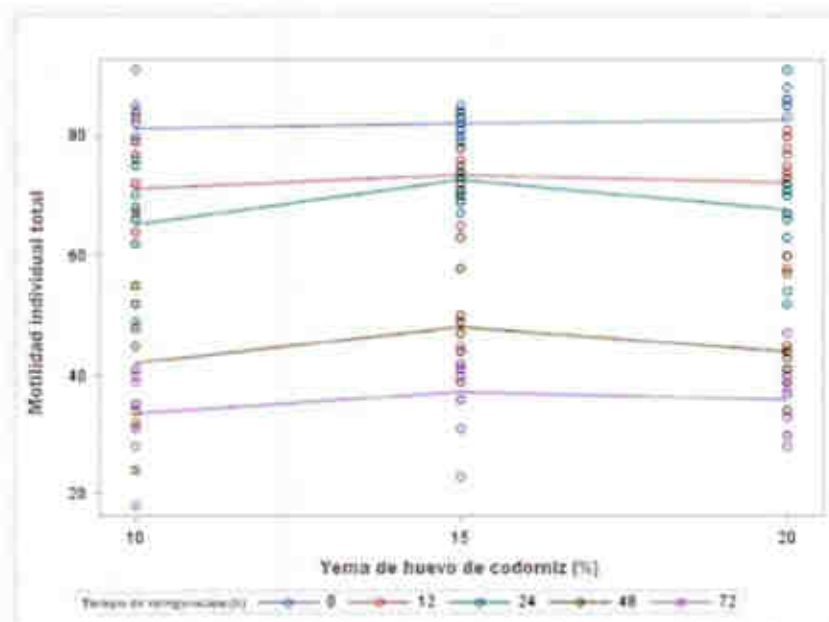


Figura 2. Interacción entre Tris – yema de huevo de codorniz (10, 15 y 20%) y tiempos de refrigeración (0, 12, 24, 48 y 72 h) sobre la motilidad total de espermatozoides epididimarios de toros Criollos colectados a post mortem.

La motilidad total de espermatozoides epididimarios de toros post mortem encontrado en este estudio $81.9 \pm 4.9\%$ a 0 h de refrigeración es similar al reporte de Cunha *et al.* (2016) quienes encontraron $87.5 \pm 1.3\%$. Otros resultados señalan porcentajes de 74.5 ± 5.2 (Ribeiro-Peres *et al.*, 2014); 55.12 ± 4.23 (Papa *et al.*, 2015); 74 ± 7.0 (Luciano *et al.*, 2012). En otro reporte Bertol *et al.* (2013) muestran valores medios de 67.5 ± 11.9 ; 66.25 ± 7.5 ; 67.5 ± 2.8 ; 58.75 ± 8.5 ; 41.25 ± 7.5 para 6, 12, 18, 24, 30 h post orquiectomía de toros.

A las 24 h la motilidad total en este estudio fue 65.1 ± 9.35 , 72.6 ± 4.93 , 67.8 ± 10.83 para 10, 15 y 20% DYHC, siendo estos resultados similares al reporte de Luzón (2015), 69 % a 24 h de refrigeración con dilutor comercial AndroMed, en otros tiempos de refrigeración los resultados varían 57, 46, 37, 26% para 48, 72, 96, 120 h de refrigeración de espermatozoides obtenido mediante lavado retrógrado considerando 2 h post mortem.

Las variaciones de los resultados de otros estudios probablemente sean por tipo de dilutor diferente, tiempo de obtención de espermatozoides epididimarios, genética del animal entre otros. Según Fernández-Santos *et al.* (2009), los epididimos tienen condiciones adecuadas para prolongar la supervivencia del espermatozoide, porque la cola del epididimo proporciona el ambiente óptimo para el almacenamiento del gameto.

4.3 Motilidad rectilínea progresiva

Los resultados de la motilidad rectilínea progresiva se detallan en el Cuadro 8, donde a las 24 y 48 h de refrigeración espermática, en el tratamiento de concentración al 15% del dilutor TYHC, los espermatozoides presentan mayor ($P \leq 0.05$) motilidad rectilínea progresiva; a las 0, 48 y 72 h de refrigeración espermática las motilidades son similares (P

≥ 0.05) entre las tres concentraciones de YHC. Entre las variables de respuesta, concentración del dilutor TYHC y el tiempo de refrigeración espermática, no hubo interacción ($P \geq 0.05$) para la motilidad rectilínea progresiva (Figura 3).

Cuadro 8. Porcentaje de motilidad rectilínea progresiva (media \pm desviación estándar) de espermatozoides epididimarios de toros criollos colectados a post mortem con dilutor TRIS con diferentes concentraciones de yema de huevo de codorniz (YHC) evaluados a diferentes tiempos de refrigeración (TR)

YHC (%)	n	TR (h)				
		0	12	24	48	72
10	10	34.8 \pm 3.19 a	20.2 \pm 10.44 b	14.1 \pm 3.59 c	11.0 \pm 2.45 d	5.9 \pm 3.86 e
15	10	32.8 \pm 4.18 a	24.6 \pm 6.43 b	21.5 \pm 5.23 c	15.3 \pm 5.79 d	8.7 \pm 3.33 e
20	10	31.8 \pm 8.64 a	21.4 \pm 7.94 b	17.7 \pm 6.09 c	12.4 \pm 3.95 d	7.3 \pm 2.55 e

Letras distintas dentro de la misma fila, expresan diferencias ($P < 0.05$).

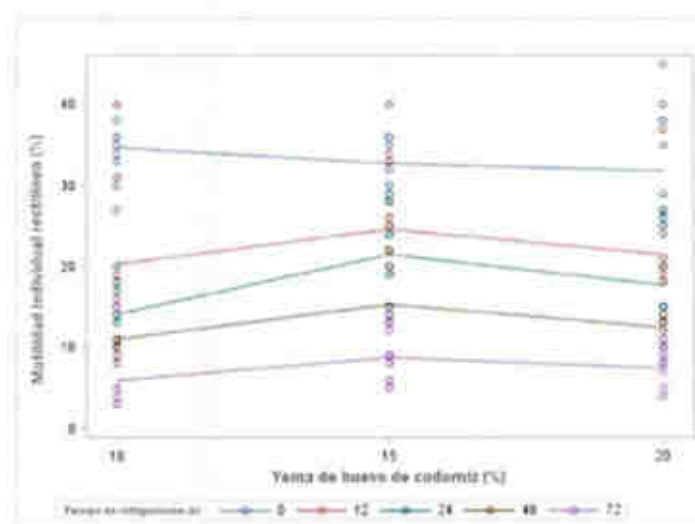


Figura 3. Interacción entre Tris – yema de huevo de codorniz (10, 15 y 20%) y tiempos de refrigeración (0, 12, 24, 48 y 72 h) sobre la motilidad rectilínea progresiva de espermatozoides epididimarios de toros criollos colectados a post mortem.

La motilidad rectilínea progresiva de espermatozoides encontrados en esta investigación fue menor al reporte de Quispe (2015), quien encontró 44.76 ± 10.31 , 37.41 ± 12.20 , $30.97 \pm 9.75\%$ para 0, 12, 24 h de refrigeración, esta superioridad podría ser debida por la técnica de colección fundamentalmente, además cada complejo escroto – testículos - epidídimos fueron almacenados aleatoriamente durante 0, 12 y 24 h a 5 °C, luego colectó los espermatozoides cortando el borde libre de la cola del epidídimo, los cortes se dejaron caer 2 a 3 gotas de contenido epididimal en un tubo de ensayo de 15 mL que contenía 2 mL de dilutor Tris - yema de huevo precalentado a 35°C.

Valverde (2016) reporta 84.2 ± 1.54 , $67.5 \pm 7.04\%$ de motilidad rectilínea progresiva espermática, para los epidídimos transportados a 5 y 20 °C desde el matadero al laboratorio, además usó dilutor AndroMed®, que tiene entre sus componentes a lecitina de soya, el tipo de dilutor y la temperatura de transporte del epidídimo (siendo mejor a 5 °C) podrían ser los factores que favorecerían la motilidad alta comparada con el presente estudio donde se transportó temperatura ambiente (25 a 30 °C) y se utilizó Tris con yema de huevo de codorniz.

Cunha *et al.* (2016) encontraron 57.5 ± 1.8 en espermatozoides frescos, 46.1 ± 3.5 en refrigerados por 4 h a 4 °C, procedentes de testículos orquiectomizados y mantenidos a 5 °C por 2 h, la colección de espermatozoide fue mediante corte de la cola del epidídimo, utilizaron como dilutor Tris-citrato-yema de huevo - glicerol, además los testículos fueron procedentes de machos seleccionados con una motilidad espermática $\geq 70\%$ y mínimo de 70% espermatozoides normales. Los valores son mayores comparados con la presente investigación, la razón fundamental sería que se utilizó machos seleccionados.

4.4 Prueba de endósmosis (Host)

Los resultados de positividad a endósmosis se muestran en el Cuadro 9. El efecto de las concentraciones 10, 15 y 20% del dilutor TYHC sobre la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides epididimarios son similares ($P \geq 0.05$) en cada hora 0, 12, 24, 48 y 72 h de refrigeración de espermatozoides. En las diferentes concentraciones del dilutor TYHC, el tiempo de refrigeración de espermatozoides influye ($P \leq 0.05$) en la integridad de la membrana espermática. En la Figura 4, se observa que entre las concentraciones y horas de refrigeración no hubo efecto de interacción ($P \geq 0.05$) sobre la positividad a la prueba de Host.

Cuadro 9. Porcentaje de respuesta positiva (media \pm desviación estándar) a endosmosis de espermatozoides epididimarios de toros criollos colectados a *post mortem* con dilutor TRIS con diferentes concentraciones de yema de huevo de codorniz (YHC) evaluados a diferentes tiempos de refrigeración (TR)

YHC (%)	N	TR (h)				
		0	12	24	48	72
10	10	88.5 \pm 4.04 a	78.1 \pm 7.51 b	76.2 \pm 10.11 c	60.9 \pm 4.64 d	47.6 \pm 9.36 e
15	10	90.8 \pm 3.87 a	82.3 \pm 6.45 b	73.6 \pm 8.32 c	61.4 \pm 9.97 d	54.4 \pm 13.90 e
20	10	93.5 \pm 3.11 a	78.6 \pm 6.70 b	72.0 \pm 9.85 c	62.3 \pm 10.01 d	50.9 \pm 16.71 e

Letras distintas dentro de la misma fila, expresan diferencias ($P \leq 0.05$).

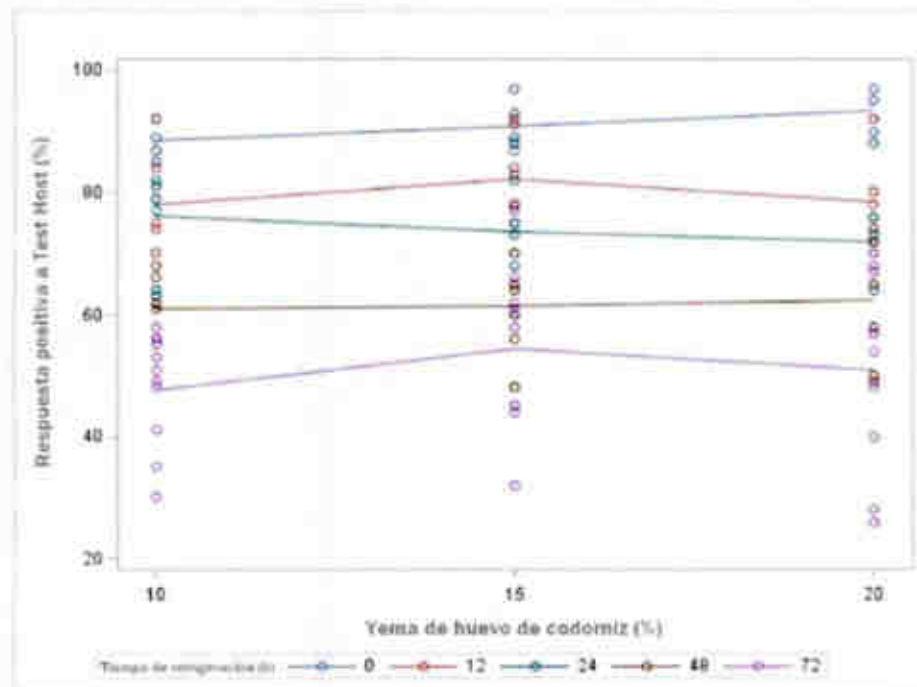


Figura 4. Interacción entre Tris – yema de huevo de codorniz (10, 15 y 20%) y tiempos de refrigeración (0, 12, 24, 48 y 72 h) sobre la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides epididimarios de toros Criollos colectados a post mortem.

Quispe (2015), reporta 69.72 ± 7.20 , 67.87 ± 4.46 , $60.31 \pm 7.9\%$ para 0, 12, 24 h de refrigeración de espermatozoides del epidídimo positivos a la prueba de Host, datos que son menores al presente estudio, la explicación podría ser principalmente debido al manejo del epidídimo, que fueron almacenados cada complejo escroto – testículos - epididimos durante 0, 12 y 24 h a 5°C , para luego coleccionar los espermatozoides, otro factor que podría afectar es el tipo de dilutor que en el caso usó Tris - yema de huevo.

Similarmente Ribeiro - Peres *et al.* (2014) encuentran $69.7 \pm 9.2\%$ al utilizar como medio diluyente a base de Tris yema de huevo, sin crioprotector, cuyos epididimos fueron

transportados desde el camal al laboratorio mantenidos a una temperatura de 37 °C por 10 minutos.

Por otro lado, Luciano *et al.* (2012) que utilizaron sondas fluorescentes para determinar la integridad funcional de la membrana reportan $77.4 \pm 10.2\%$. Estos resultados son inferiores al reporte que se encontró en el presente estudio. En todos los casos, los espermatozoides fueron colectados de epididimos de toros post mortem. El tipo de dilutor fundamentalmente sería la causa de las diferencias.

4.5 Vitalidad

La vitalidad de los espermatozoides refrigerados se detalla en el Cuadro 10. Las concentraciones de 10, 15 y 20% del dilutor TYHC no influyen ($P \geq 0.05$) en la vitalidad de espermatozoides epididimarios en los diferentes tiempos de refrigeración espermática 0, 12, 24, 48 y 72 h. La cantidad de espermatozoides vivos se reduce ($P \leq 0.05$) conforme transcurre el tiempo de refrigeración. Entra la concentración del dilutor TYHC y las horas de refrigeración no hubo interacción ($P \geq 0.05$), se muestra en la Figura 5.

Cuadro 10. Porcentaje de vitalidad (media \pm desviación estándar) de espermatozoides epididimarios de toros criollos colectados a post mortem con dilutor Tris con diferentes concentraciones de yema de huevo de codorniz (YHC) evaluados a diferentes tiempos de refrigeración (TR).

YHC (%)	N	TR (h)				
		0	12	24	48	72
10	10	85.6 \pm 3.06 a	79.6 \pm 6.59 ab	72.3 \pm 9.70 b	54.7 \pm 12.53 c	44.2 \pm 7.85 d
15	10	85.1 \pm 4.07 a	77.1 \pm 7.14 ab	72.1 \pm 9.65 b	59.2 \pm 15.12 c	51.2 \pm 20.47 d
20	10	86.2 \pm 2.04 a	75.8 \pm 9.64 ab	70.0 \pm 10.95 b	51.0 \pm 15.21 c	46.8 \pm 20.05 d

Letras distintas dentro de la misma fila, expresan diferencias ($P \leq 0.05$).

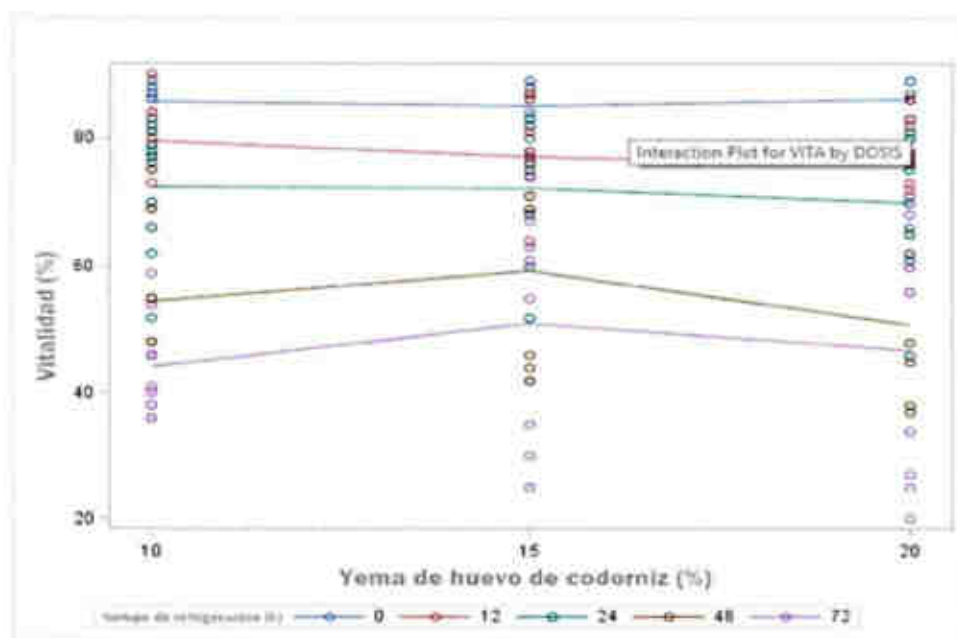


Figura 5. Interacción entre Tris – yema de huevo de codorniz (10, 15 y 20%) y tiempos de refrigeración (0, 12, 24, 48 y 72 h) sobre la vitalidad de los espermatozoides epididimarios de toros criollos colectados a post mortem.

Los porcentajes encontrados en este estudio son mayores a los resultados de Saavedra *et al.* (2012) 77.17 ± 6.05 (ganadería 1), $77.83 \pm 3.87\%$ (ganadería 2); Luciano *et al.* (2012) $70.3 \pm 9.5\%$; Ribeiro - Peres *et al.* (2014) 69.4 ± 10.7 ; y son similares considerando la hora cero al comparar con Luzón (2015) 86, 76, 63, 51, 34% para 2, 4, 8, 10, 24 h post mortem del toro.

Las diferencias encontradas entre las otras investigaciones, posiblemente obedecen a los componentes de los dilutores, condiciones de toma de muestra, transporte entre los factores más importantes.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

a) CONCLUSIONES

- El dilutor Tris - yema de huevo de codorniz 10, 15 y 20% a 0, 12, 24, 48 y 72 h de refrigeración, tienen efectos similares sobre la motilidad masal, motilidad total y motilidad rectilínea progresiva de los espermatozoides epididimarios de toros Criollos post mortem.
- La integridad funcional de la membrana plasmática de los espermatozoides epididimarios de toros criollos post mortem, no fue afectada por el dilutor Tris - yema de huevo de codorniz 10, 15 y 20% en la refrigeración a 0, 12, 24, 48 y 72 h post colección.
- La vitalidad de los espermatozoides epididimarios de toros criollos post mortem presentan similitud al utilizar dilutor Tris - yema de huevo de codorniz al 10, 15 y 20% durante la refrigeración a 0, 12, 24, 48 y 72 h.
- La motilidad masal, motilidad total y motilidad rectilínea progresiva, integridad funcional de la membrana plasmática, vitalidad de los espermatozoides epididimarios son menores ($P \leq 0.05$) conforme pasa el tiempo de refrigeración 0, 12, 24, 48 y 72 h.

- Se concluye, que se puede utilizar como sugerencia el dilutor Tris - yema de huevo de codorniz en cualquiera de las concentraciones 10, 15 o 20%, en la refrigeración de espermatozoides epididimarios de toros criollos post mortem con fines de usar tecnologías reproductivas.

b) RECOMENDACIONES

- Mantener a los animales a utilizar en posteriores trabajos de investigación, en las mismas condiciones de abstinencia sexual, estrés, entre otros factores que pudieran alterar los resultados de los análisis a realizar sobre características espermáticas epididimarias.
- Realizar estudios comparativos con Tris – yema de huevo a diferentes concentraciones de otras aves.
- Evaluar la fertilidad, utilizando inseminación con espermatozoides epididimarios refrigerados.
- Complementar las evaluaciones espermáticas epididimarias con diferentes técnicas incluyendo las computarizadas.
- Realizar estudios con semen eyaculado, con la finalidad de encontrar mejores resultados para la preservación de semen en estado de refrigeración.
- Evaluar el uso de yema de huevo de codorniz como uno de los componentes del dilutor Tris o similares, en la criopreservación de espermatozoides.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguero, G. (2012). Evaluación de las Características Seminales de Sementales Bovinos mediante el Analizador Seminal Computarizado (CASA). *Tesis de Posgrado. Universidad Central de Venezuela.*
- Albers, M., & Barrios, D. R. (2006). Movilidad individual de los espermatozoides epididimarios de toros *post mortem* obtenidos mediante lavado retrógrado. *Zootecnia Tropical*, 24(3), 267-280.
- Angelino, J. N. (2009). Manual de evaluación de Semen en bovinos. *Trabajo práctico educativo. Universidad Veracruzana.*
- Ávila-Portillo, L. M., Madero, J.I., López, C., León, M. F., Acosta, L., Gómez, C., Delgado, L.G., Gómez, C., Lozano, J.M., Reguero, M.T. (2006). Fundamentos de Criopreservación, *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 57(4), 291-300.
- Barrios, D. (2002). Evaluación de la calidad y capacidad fecundante de espermatozoides de la cola del epididimo de toros post-mortem. *Memorias XI congreso venezolano de producción e industria animal. ULA – Trujillo.*
- Bergeron, A., Marie-Hélène C., Brindle, Y., & y Manjunath, P. (2004). Low-Density Lipoprotein Fraction from Hen's Egg Yolk Decreases the Binding of the Major Proteins of Bovine Seminal Plasma to Sperm and Prevents Lipid Efflux from the Sperm Membrane. *Biology of Reproduction*, 70, 708-717.

- Bertol, M. A. F., Weiss, R. R., Thomaz-Soccol, V., Kozicki, L. E., Fujita, A. S., Abreu, R. A. D., & Green, K. T. (2013). Viability of bull spermatozoa collected from the epididymis stored at 18-20 °C. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 56(5), 777-783.
- Bethancourt, H. & Bolívar, T. (2013). Caracterización genética del ganado Criollo Lechero Dominicano utilizando microsatélites. *Revista Agropecuaria y Forestal APF* 2(1), 43-48.
- Blanch, E. (2007). Modificación de la membrana de los espermatozoides de verraco para mejorar su supervivencia a la criopreservación. *Universidad Politécnica de Valencia*.
- Bravo, P. W., & Alarcon, V. (2013). Preservación de semen y avances recientes en la inseminación artificial de llamas y alpacas. *Spermova*, 3(2), 158-160.
- Cabrera, P., Ayulo, A., & Pantoja, C. (2011). Efecto del dilutor Tris y citrato con yema de huevo de cordorniz sobre la viabilidad espermática en Semen ovino congelado en Pajillas. *Revista de Investigación Veterinaria del Perú*, 22(2), 105-113.
- Cabrera, P., Pantoja, C. (2012). Viabilidad espermática e integridad del acrosoma en semen congelado de toros nacionales, *Revista de Investigación Veterinaria del Perú*, 23(2), 192-200.
- Camargo, W. F. (2006). Espermatoogênese em Bovinos. *monografia apresentada à disciplina "Seminário em Reprodução animal I" do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Área de Reprodução Animal, Curso de Mestrado, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP – Campus de Botucatu.*

- Carpio, S. V. (2015). Evaluación de dos diluyentes para la criopreservación de semen bovino: Yema de huevo vs leche descremada. *Tesis de licenciatura. Universidad Politécnica Salesiana Sede Cuenca.*
- Cisneros, J. L. (2011). Desarrollo de un método para la determinación rápida de la concentración espermática en eyaculados de bovino, ovino y cerdo. *Tesis de licenciatura, Universidad Veracruzana.*
- Closa, S. J., Marchesich, C., Cabrera, M., Morales, J. C. (1999). Composición de huevos de gallina y codorniz. *Arch. latinoam. Nutr.*, 49(2), 181-185.
- Cooper T.G. (2007). Sperm maturation in the epididymis: *a new look at an old problem*, *Asian J Androl*, 9(4): 533–539.
- Cortés S. (2003). Efecto de la conservación sobre la fisiología espermática de semen caprino, *Tesis de grado, Universidad Complutense de Madrid.*
- Cunha, A. T. M., Carvalho, J. O., Kussano, N. R., Martins, C. F., Mourão, G. B., & Dode, M. A. N. (2016). Bovine epididymal spermatozoa: Resistance to cryopreservation and binding ability to oviductal cells. *Cryobiology*, 73(3), 348-355.
- Díaz, J. D. (2015). Desarrollo de Diluyentes de Baja Complejidad y Costo Para la Preservación a Corto y Mediano Plazo de Semen Canino. *Universidad Nacional de la Plata Facultad de Ciencias Veterinarias*, 95.
- Drevius, L. O. (1972). Bull Spermatozoa as Osmometers. *Journal of Reproduction and Fertility*, (28), 29 - 39.
- ESHA. 1997. Genesis for windows. databases. ESHA, *research*. salem

- Eslava, P. (2014) "Impacto económico y social del uso de semen sexado nacional en la ganadería bovina del Perú" *Universidad Nacional Agraria la Molina, Facultad de Zootecnia, pag 18, Lima – Perú.*
- Evans G, Maxwell WMC. 1990. Inseminación artificial de ovejas y cabras. Zaragoza: *Ed Acribia. 204 p.*
- Fernández-Santos, M. R., Martínez-Pastor, F., Matias, D., Domínguez-Rebolledo, A. E., Estes, M. C., Montoro, V., & Garde, J. J. (2009). Effects of long-term chilled storage of red deer epididymides on DNA integrity and motility of thawed spermatozoa. *Animal reproduction science, 111(1)*, 93-104.
- Florio, J. (2008). Uso de los bovinos Criollos en cruzamientos con otras razas bovinas en América Latina, con énfasis en Ganadería Doble Propósito. *Sección de libro Desarrollo Sostenible de la Ganadería de Doble Propósito* (p. 116-126).
- Galarza, A. (2013). Eficacia de dos diluyentes: Tris + Lecitina de Soya (Andromed®) y Tris + Yema de Huevo (Triladyl ®), en la crioconservación de semen de toro de la raza Jersey en Cuenca – Ecuador. *Tesis de Maestría. Universidad de Cuenca.*
- Gómez, M., Migliorisi, L. (2017). Protocolo para la evaluación de semen en rumiantes. *Sitio Argentino de Producción Animal. Disponible en: http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/cria_toros/48-valoracionandrologicobovino.pdf*
- González, J. F. (2011). Evaluación sensorial de huevos de codorniz en conserva y composición nutrimental. *Revista Electrónica de Veterinaria, 12(8)*, 1-10.
- Google Earth, 2017. Accesado el 1 de agosto 2017. Disponible en: <https://earth.google.com/web/@-13.64187874,->

72.88803149,2295.33450139a,25.22413793d,35y,192.68380799h,0t,0r/data=C1kaV
xJRChYweDA6MHg5ZDU0MDk4OGI1MmRmZDA3Gd5ab7ajSCvAIYmd2InVO
FLAKiVGYWN1bHRhZCBEZSBNZWRpY2luYQpWZXRIcmluYXJpYSBZ4oC
mGAIgAQ

Hidalgo, C. O., Tamargo, C., & Diez, C. (2002). Análisis de semen bovino. *Boletín informativo del SERIDA - N° 2*, 39-43.

Hidalgo, D. M. (2013). Fisiología celular y calidad seminal durante la conservación del semen porcino refrigerado. *Tesis doctoral. Universidad de Extremadura*.

INIA. Instituto Nacional de Innovación Agraria (2014). Estación Experimental Agraria Santa Ana – Huancayo. *Hoja divulgativa N° 1*.

Januškauskas, A., & Žilinskas, H. (2002). Bull semen evaluation post-thaw and relation of semen characteristics to bull's fertility. *Veterinarija ir Zootechnika*, 17 (39).

Lozada, C. (2008). El vacuno Criollo Peruano de montaña y el mal de altura..

Luciano, B. M., Kanazawa, M. Y., Peres, A. R., & de Souza, F. F. (2012). Viabilidade do sêmen congelado obtido do epidídimo de touros post-mortem. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, 19(3), 190-194.

Luzón, F. E. (2015). Estudio de dos métodos de colecta de espermatozoides epididimarios en toros *post mortem*. (Bachelor's thesis, Loja: Universidad Nacional de Loja).

Martínez, J., Duverger, O., Díaz, N., Interian, L., & Gonzáles, D. (2011). Efecto de diferentes niveles de yema de huevo en la congelación del semen caprino en un medio liofilizado a base de Tris. *Ciencia y Tecnología Ganadera*, 5(1), 33-38.

- Martins, C. F., Driessen, K., Costa, P. M., Carvalho-Neto, J. O., De Sousa, R. V., Rumpf, R., & Dode, M. N. (2009). Recovery, cryopreservation and fertilization potential of bovine spermatozoa obtained from epididymides stored at 5 C by different periods of time. *Animal reproduction science*, 116(1), 50-57.
- Maxwell, W., & Salamon, S. (1993). Liquid storage of ram semen. *Reprod Fertil Dev*.
- Mellisho, E. (2010). Manual de laboratorio de Reproducción Animal. *Universidad Agraria La Molina. Lima, Perú*.
- Mendiola, E. M. (2002). Evaluación comparativa nutricional entre los huevos de codorniz japónica(coturnix coturnix) y gallina criolla (gallus gallus)en la primera etapa de postura. Tesis de Licenciatura. *Universidad Nacional Mayor de San Marcos*.
- Mesa O. A. (2012). Motilidad individual y viabilidad de espermatozoides caprinos a diferentes temperaturas de mantenimiento en semen diluido. *Tesis para obtener el título de Médico Veterinario Zootecnista. Universidad Veracruzana*.
- Mortimer S. T. (1997). A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Human Reproduction Update*, 3(5), 403–439.
- Muiño, R., Fernandez, M., Peña A. I. (2006). Parámetros cinéticos en eyaculados bovinos de toro de raza Frisona y Rubia Gallega. *Información Técnica Económica Agraria ITE*, 102(1), 55-66.
- 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 de Doctorado. Universidad Santiago de Compostela*.

- Núñez, E., Yaranga, R., & Zubieta, R. (2012). Antecedentes generales de la ganadería en el valle del Mantaro, instituto Geofísico del Perú, Volumen 2 Manejo de riesgos de desastres ante eventos meteorológicos extremos en el valle del Mantaro.
- Palomino, J., Cervantes, M., Rodríguez, A., Cisneros, F., Huanca, W. (2007). Efecto de dos dilutores y tiempos de refrigeración sobre la motilidad individual de semen refrigerado de caprinos. *Sitio Argentino de Producción Animal*.
- Palomino, L., Camacho, J., Huanca, W., & Falcón, N. (2014). Conservación de semen caprino en los dilutores citrato-yema y leche-descremada yema. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 12(1), 1-7.
- Papa, P., Papa, F., Oliveira, L., Guasti, P., Castilho, C., Giometti, I. (2015). Different extenders in the cryopreservation of bovine epididymal spermatozoa Patricia. *Journal Animal Reproduction Science*, 161, 58-63.
- Pérez M. G., Quintano J., Perez U. H. (2014). Sobrevivencia espermática en refrigeración a 5 °C recuperados del conducto deferente de alpaca en tres dilutores con dos protectores de membrana. *SPERMOVA*, 4(2), 153-158.
- Pérez, R. (2004). Caracterización fisicoquímica y funcional de la clara deshidratada de huevo de codorniz. *Tesis para optar el título de ingeniero en alimentos. Universidad tecnológica de la mixteca*.
- Perry G. (2008). Reproductive fertility in herd bulls. *Animal and Range Sciences*.
- Pinto, C.; Paccamonti, D.L.; Eilts, B.E. (1999). Fertility in bitches artificially inseminated with extended, chilled semen. *Theriogenology*, 52, 609-616.

- Primo, A. T. (1992). El ganado bovino Iberico en las Americas 500 años después. *Archivos de zootecnia*, 41(154), 421-432.
- Quispe Quispe, A. E. (2015). Evaluación de la sobrevivencia y fertilidad in vivo de espermatozoides del epididimo de toros criollos *POST MORTEM*. *Tesis profesional. UNA, Puno*.
- Ribeiro-Peres, A., Munita-Barbosa, L., Yumi-Kanazawa, M., Mello-Martins, M. I., & Ferreira de Souza, F. (2014). Criopreservación de espermatozoides bovinos extraídos de la cola del epididimo utilizando los métodos convencional y automatizado. *Archivos de medicina veterinaria*, 46(1), 31-38.
- Rodriguez-Martínez, H. (2013). Semen evaluation techniques and their relationship with fertility. *Animal Reproduction Science*, 10(3), 148-159.
- Rossi, A. (2012). Efecto de la refrigeración y la adición de trehalosa en los parámetros de viabilidad microscópicos de semen bovino. *Tesis de licenciatura. Pontificia Universidad Católica Argentina*.
- Rueda, M. (2011). Diluyentes para la conservación de semen porcino. *Revista Computadorizada de Producción Porcina*, 18(1), 19-28.
- Rubio-Guillen J., & Quintero-Moreno A. (2008). Uso de las pruebas de resistencia osmótica para valorar la funcionalidad espermática en toros. En, Desarrollo sostenible de la ganadería de doble propósito. (págs. 618 - 625).
- Saavedra, G. D., Mas, A., Sanes, J. M., Vallejo, P., Matas, C., & Seva, J.I. (2012). Parámetros testiculares y características morfológicas de los espermatozoides epididimarios obtenidos postmortem en el toro de lidia. *AN VET (Murcia)*, 28, 7-13.

- Santana, S. (2008). El huevo como aliado de la nutrición y la salud. *Rev Cubana Aliment Nutr* 18(2): 1-15.
- SAS. (2011). SAS/STAT User's guide. (Release 9.3) SAS Publishing, Cary (NC).
- Stornelli, M.C., Tittarelli, C.M., Savignone, C.A., Stornelli, M.A. (2005). Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. *Analecta Veterinaria* 25(2): 28-35
- Tash, J.S., & Bracho, G.E., (1994). Regulation of sperm motility: emerging evidence for a major role for protein phosphatases. *Journal of Andrology*, 15(6), 505-509.
- Trimeche, A., Anton, M., Renard, P., Gandemer, G. & Tainturier, D. (1997). Quail egg yolk: a novel cryoprotectant for freeze preservation of Poitou jacks sperm. *Cryobiology*, 34, 385-393.
- Valverde Peralta, E. E. (2016). Efecto de dos temperaturas de almacenamientos (5 y 20 C) de epididimos provenientes de toros de matadero sobre la calidad y congelabilidad de espermatozoides (*Master's thesis*).
- Vera, O. (2001). Evaluación seminal comparativa Pre y Postcongelación en machos bovinos.
- Vijaya, K., Ram, B. & Sai, K. (2013). Comparison of different methods for assessing sperm concentration in infertility workup: A review. *International Journal of Medicine and Medical Science*, 5(9), 396-400.
- Watson, P. F. (1981). The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5°C by egg-yolk lipoprotein. *Journals of reproduction & fertility*, 62, 483-492.

Zrimšek, P. (2011). Evaluation of a New Method and Diagnostic Test in Semen Analysis.

Clinic for Reproduction and Horses, *Veterinary Faculty, University of Ljubljana, Slovenia.*

ANEXOS



Figura 6. Pesado de componentes para la preparación de dilutor Tris



Figura 7. Testículo de toro Criollo diseccionado, para extraer el epidídimo



Figura 8. Epidídimo de toro extraído, antes de realizar el lavado retrogrado



Figura 9. Lavado retrógrado del epididimo para colección de espermatozoides



Figura 10. Refrigeración de muestras a 4.5 °C



Figura 11. Colorantes Eosina y Nigrosina utilizados en la tinción, para determinar la vitalidad de espermatozoides.



Figura 12. Procesamiento de muestras para determinar la integridad de la membrana espermática. (Test de Host)



Figura 13. Proceso de tinción y análisis de muestras de espermatozoides.



Figura 14. Evaluación microscópica de espermatozoides epididimarios



Figura 15. Motilidad masal de espermatozoides epididimarios



Figura 16. Espermatozoides positivos y negativos a la evaluación de vitalidad



Figura 17. Espermatozoides positivos y negativos al Test de Host

Cuadro 11. Análisis de varianza para motilidad masal de espermatozoides epididimarios de toros criollos postmortem.

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Valor	Pr > F
Modelo	14	175,3179	12,5227	40,8000	<.0001
Dilutor	2	1,7160	0,8580	2,8000	0,0647
Tiempo	4	171,5295	42,8824	139,7100	<.0001
Dilutor*tiempo	8	2,0724	0,2591	0,8400	0,5657
Error	132	40,5146	0,3069		
Total corregido	146	215,8325			

Cuadro 12. Análisis de varianza para motilidad total de espermatozoides epididimarios de toros criollos postmortem.

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Valor	Pr > F
Modelo	14	44595,2291	3185,3735	57,7200	<.0001
Dilutor	2	476,4068	238,2034	4,3200	0,0153
Tiempo	4	43956,9707	10989,2427	199,1400	<.0001
Dilutor*tiempo	8	161,8516	20,2315	0,3700	0,9364
Error	130	7173,7778	55,1829		
Total corregido	144	51769,0069			

Cuadro 13. Análisis de varianza para motilidad rectilinea progresiva de espermatozoides epididimarios de toros criollos postmortem.

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Valor	Pr > F
Modelo	14	11213,2262	800,9447	24,9100	<.0001
Dilutor	2	254,0637	127,0319	3,9500	0,0217
Tiempo	4	10726,6146	2681,6536	83,3900	<.0001
Dilutor*tiempo	8	232,5479	29,0685	0,9000	0,5155
Error	126	4051,7667	32,1569		
Total corregido	140	15264,9929			

Cuadro 14. Análisis de varianza para vitalidad de espermatozoides epididimarios de toros criollos postmortem.

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Valor	Pr > F
Modelo	14	27455,97553	1961,14111	14,14	<.0001
Dilutor	2	65,90808	32,95404	0,24	0,7889
Tiempo	4	26958,40238	6739,6006	48,59	<.0001
Dilutor*tiempo	8	431,66507	53,95813	0,39	0,9249
Error	131	18170,08611	138,70295		
Total corregido	145	45626,06164			

Cuadro 15. Análisis de varianza para integridad de membrana plasmática (Host) de espermatozoides epididimarios de toros criollos postmortem.

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Valor	Pr > F
Modelo	14	21008,70129	1500,62152	16,23	<.0001
Dilutor	2	270,36852	135,18426	1,46	0,2366
Tiempo	4	20401,53664	5100,38416	55,18	<.0001
Dilutor*tiempo	8	336,79614	42,09952	0,46	0,8843
Error	99	9150,7373	92,43169		
Total corregido	113	30159,4386			