

UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURÍMAC
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



“Evaluación de tres dilutores sobre características espermáticas antes y después de la congelación de semen bovino Holstein”

TESIS

PRESENTADO POR:

SILMA QUISPE PALOMINO

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

ABANCAY - PERÚ

2019



UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURÍMAC
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA



Tesis

“Evaluación de tres dilutores sobre características espermáticas antes y después de la congelación de semen bovino Holstein”


Presentada por Bach. **SILMA QUISPE PALOMINO**, para optar el Título de: Médico Veterinario y Zootecnista

Sustentada y aprobada el 29 de octubre del 2019 ante el jurado:

Presidente:


MVZ. Víctor Raúl Cano Fuentes


Primer miembro:


MSc. Delmer Zea Gonzales

Segundo miembro:


MVZ. Juan Roberto Soncco Quispe

Asesor:


Dr. Ulises Sandro Quispe Gutiérrez

Agradecimientos

A mi familia, por no dejarme caer durante la ejecución de esta investigación e incentivar me a cumplir mi meta.

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

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y sus docentes, por brindarme los conocimientos en las aulas y laboratorio, durante mi formación profesional.

A mi asesor Dr. Ulises Sandro Quispe Gutiérrez, por compartir sus conocimientos, guiarme y ayudarme en la elaboración de esta de investigación.

Al Jurado Evaluador de esta tesis MVZ. Víctor Raúl Cano Fuentes, MSc. Delmer Zea Gonzales, MVZ. Juan Roberto Soncco Quispe, quienes revisaron y contribuyeron en la redacción.



Dedicatoria

A mis padres quienes me brindaron la educación, para poder lograr mis sueños, por motivarme en los momentos difíciles, quienes son el motivo para superarme cada día en la vida.

A mis hermanas Yudy y Fany que fueron el apoyo constante para cumplir cada una de mis metas.



ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
RESUMEN	2
ABSTRACT	3
CAPÍTULO I	4
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	4
1.1 Descripción del problema.....	4
1.2 Enunciados	5
a) Enunciado general	5
b) Enunciados específicos.....	5
1.3 Objetivos.....	5
1.4 Justificación	6
1.5 Delimitación	7
CAPÍTULO II	8
MARCO TEÓRICO	8
2.1 Antecedentes.....	8
2.2 Marco referencial.....	10
2.2.1 Inseminación artificial	10
2.2.2 Método de la vagina artificial.....	11
2.2.3 Fisiología de la reproducción	12
2.2.4 Desarrollo de los testículos.....	14
2.2.5 Colección del semen bovino.....	15
2.2.6 Características macroscópicas y microscópicas del semen	15
2.2.7 Función de los diluyentes en la criopreservación del semen bovino.....	19
2.2.8 Dilutores utilizados en la congelación del semen.....	21
2.2.9 Diluyentes para la congelación del semen.....	23
2.2.10 Congelación del semen.....	25
2.2.11 Descongelación del semen.....	25
2.3 Definición de términos	26
CAPÍTULO III	27
DISEÑO METODOLÓGICO	27

3.1 Definición de variables.....	27
3.2 Operacionalización de variables.....	28
3.3 Hipótesis de la investigación.....	28
3.4 Tipo y diseño de la investigación.....	29
3.5 Población y muestra.....	29
3.5.1 Población.....	29
3.5.2 Muestra.....	29
3.6 Procedimiento de la investigación.....	30
3.6.1 Localización.....	30
3.6.2 Animales y diseño experimental.....	30
3.6.3 Preparación de dilutores.....	30
3.6.4 Colección del semen.....	32
3.6.5 Evaluación del semen.....	32
3.6.6 Enfriamiento del semen.....	34
3.6.7 Empajillado.....	34
3.6.8 Congelamiento del semen.....	34
3.6.9 Descongelación del semen.....	35
3.6.10 Análisis estadístico.....	35
3.7 Material de la investigación.....	35
CAPÍTULO IV.....	37
4.1. Motilidad total.....	37
4.2 Motilidad progresiva rectilínea.....	38
4.3 Vitalidad.....	39
4.4 Integridad funcional de la membrana plasmática (HOST).....	41
CAPÍTULO V.....	43
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	43
5.1 Conclusiones.....	43
5.2 Recomendaciones.....	43
Referencias bibliográficas.....	44
Anexos.....	51



ÍNDICE CUADROS

Cuadro 1. Variables e indicadores de la investigación.	28
Cuadro 2. Composición del dilutor Tris – yema de huevo de gallina.....	31
Cuadro 3. Composición del dilutor Triladyl – yema de huevo	31
Cuadro 4. Composición del dilutor AndroMed.....	32
Cuadro 5. Composición de la solución hiposmótica (HOST).....	34
Cuadro 6. Porcentaje de motilidad total de espermatozoides de toro Holstein (media \pm desviación estándar) diluidos con Tris-yema de huevo, Triladyl – yema de huevo y AndroMed, evaluados antes y después de la congelación.....	37
Cuadro 7. Porcentaje de motilidad progresiva rectilínea de espermatozoides de bovino Holstein (media \pm desviación estándar) diluidos con Tris-yema de huevo, Triladyl – yema de huevo y AndroMed, evaluados antes y después de la congelación....	39
Cuadro 8. Porcentaje de vitalidad de espermatozoides de bovino Holstein (media \pm desviación estándar) diluidos con Tris-yema de huevo, Triladyl – yema de huevo y AndroMed, evaluados antes y después de la congelación.....	40
Cuadro 9. Porcentaje de espermatozoides positivos a la prueba de endosmosis (HOST) en espermatozoides de bovino Holstein (media \pm desviación estándar) diluidos con Tris-yema de huevo, Triladyl y AndroMed, evaluados antes y después de la congelación.....	41
Cuadro 10. Base de datos de la investigación.	52

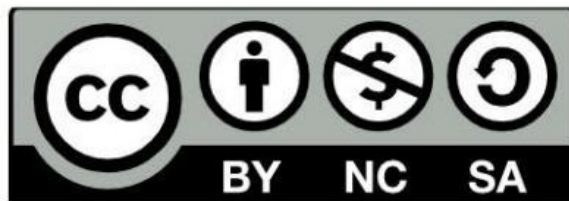


ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Preparación del dilutor AndroMed y Triladyl – yema de huevo.	54
Figura 2. Materiales utilizados para la colección del semen.	54
Figura 3. Colección del semen.	55
Figura 4. Evaluación de las características espermáticas.	55
Figura 5. Descongelación de pajuela.	56
Figura 6. Evaluación de la vitalidad espermática.	56
Figura 7. Evaluación de integridad funcional de la membrana citoplasmática (HOST) del espermatozoide.....	57

“Evaluación de tres dilutores sobre características espermáticas antes y después de la congelación de semen bovino Holstein”

Esta publicación está bajo Licencia Creative Commons



INTRODUCCIÓN

Para considerar un toro como apto reproductivamente, se debe asumir que es un animal clínicamente sano, debe cumplir con tres requisitos básicos: a) buena libido, b) buen estado clínico reproductivo y c) buena calidad espermática. La evaluación del semen es importante para la certificación de la aptitud reproductiva en un toro (1).

La inseminación artificial (IA) ha demostrado ser la herramienta más propicia para la mejora genética de los animales, especialmente en la industria bovina (2). La IA es una técnica que permite el mejor uso del material genético de los machos, desde el punto de vista productivo, representa una posibilidad para aumentar la eficiencia en la producción de las especies domésticas (3).

La criopreservación, tiene como propósito garantizar la supervivencia de los espermatozoides; sin embargo, también ocasiona daños irreversibles a la membrana plasmática y acrosomal del espermatozoide que pueden causar muerte celular e infertilidad (4); puede ocurrir pérdida de espermatozoides viables alrededor de 50 a 60%, aun en los mejores sistemas de congelamiento espermático (3). En la preservación de la vida celular a temperaturas inferiores a 0 °C, se produce un cambio físico del estado líquido al estado sólido, cuyo objetivo básico es evitar daños de la formación de cristales de “hielo intracelular” (5). El diluyente permite aumentar el volumen del eyaculado hasta lograr las dosis necesarias y preservar las características funcionales de las células espermáticas (6). La finalidad de diluir el semen es añadir sustancias nutritivas (azúcares), protectoras (yema de huevo, glicerol) y amortiguadoras (evitan cambios de pH), incrementar la vida media de los espermatozoides, una vez fuera del organismo (7).

La calidad seminal en toros puede verse afectada por diferentes causas, a partir del banco de germoplasma, el cual puede tener problemas de calidad los cuales no necesariamente estén relacionados al proceso de criopreservación. Los factores que pueden llegar a afectar la calidad seminal en toros son variados; se debe tener en cuenta que estos pueden afectar el plasma seminal y/o los espermatozoides (8). Existen estudios sobre uso de dilutores comerciales en bovinos; sin embargo, hay necesidad de evaluar los dilutores que existen en el mercado, por tal razón se planteó este estudio.

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar las características espermáticas del bovino Holstein antes y después de la congelación, utilizando dilutores Triladyl – yema de huevo, Tris- yema de huevo y AndroMed. Se utilizó un toro de dos años de edad, el semen colectado se sometió a tres tratamientos (T): T1: Tris - yema de huevo; T2: Triladyl – yema de huevo; T3: AndroMed, cada uno con 10 repeticiones antes y después de la congelación. La colección del semen fue dos veces por semana, mediante vagina artificial, se transportó a 37 °C, luego se mantuvo a la misma temperatura en el laboratorio. Se evaluó las características espermáticas: Motilidad total (MT), motilidad progresiva rectilínea (MPR), vitalidad espermática (VE) y prueba de endósmosis (HOST). La MT, MPR, VE y HOST, entre los T1 (78.0 ± 4.9 ; 58.6 ± 4.8 ; 84.5 ± 3.5 ; 82.1 ± 3.9); T2 (80.7 ± 4.9 ; 60.7 ± 2.9 ; 85.8 ± 4.6 ; 83.0 ± 4.7) y T3 (76.7 ± 4.9 ; 57.5 ± 3.6 ; 82.5 ± 4.7 ; 79.0 ± 4.7) fueron similares ($P > 0.05$) antes de la congelación del semen, mientras a la post descongelación el T2 (41.8 ± 3.6 ; 26.8 ± 2.2 ; 59.8 ± 3.4 ; 53.8 ± 3.3) presentó mayor ($P \leq 0.05$) MT, MPR, VE y HOST respecto a los T1 (39.7 ± 1.9 ; 25.6 ± 1.7 ; 57.7 ± 2.9 ; 51.5 ± 2.2) y T3 (39.9 ± 2.3 ; 23.3 ± 1.6 ; 48.4 ± 3.0 ; 44.4 ± 2.8) sobre las características espermáticas. Se concluye, que el dilutor Triladyl – yema de huevo preserva mejor las características espermáticas del semen bovino, post descongelación del semen, en comparación con el Triladyl – yema de huevo o AndroMed.

Palabras clave: Extensor, espermatozoides, semen, criopreservación.

ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate the sperm characteristics of the Holstein cattle before and after freezing, using extensors Triladyl - egg yolk, Tris - Egg yolk and AndroMed. A two year old bull was used, the collected semen was subjected to three treatments (T): T1: Tris - egg yolk; T2: Triladyl - egg yolk; T3: AndroMed, each with 10 repetitions before and after freezing. The semen collection was twice a week, using artificial vagina, it was transported at 37 °C, then kept at the same temperature in the laboratory. The sperm characteristics were evaluated: Total motility (TM), progressive rectilinear motility (PRM), sperm vitality (SV) and endosmosis test (HOST). TM, PRM, SV and HOST, between T1 (78.0 ± 4.9 ; 58.6 ± 4.8 ; 84.5 ± 3.5 ; 82.1 ± 3.9); T2 (80.7 ± 4.9 ; 60.7 ± 2.9 ; 85.8 ± 4.6 ; 83.0 ± 4.7) and T3 (76.7 ± 4.9 ; 57.5 ± 3.6 ; 82.5 ± 4.7 ; 79.0 ± 4.7) were similar ($P > 0.05$) before freezing of the semen, while after thawing the T2 (41.8 ± 3.6 ; 26.8 ± 2.2 ; 59.8 ± 3.4 ; 53.8 ± 3.3) presented higher ($P \leq 0.05$) TM, PRM, SV and HOST compared to the T1 (39.7 ± 1.9 ; 25.6 ± 1.7 ; 57.7 ± 2.9 ; 51.5 ± 2.2) and T3 (39.9 ± 2.3 ; 23.3 ± 1.6 ; 48.4 ± 3.0 ; 44.4 ± 2.8) on sperm characteristics. In conclusion, that the Triladyl - egg yolk dilutor better preserves the sperm characteristics of Holstein bovine semen, after defrosting semen, compared to Triladyl - egg yolk or AndroMed.

Keywords: Extender, sperm, semen, cryopreservation.



CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Descripción del problema

La inseminación artificial es un procedimiento biotecnológico reproductivo, que implica la maximización de la capacidad reproductiva de los toros como reproductores de élite y fue demostrado ampliamente su aporte al mejoramiento genético del ganado bovino productor de leche en diferentes partes del mundo, actualmente su uso se incrementa. Sin embargo, existen algunos factores que atentan contra el éxito de la técnica, entre las que resaltan calidad de semen, que está relacionada con la capacidad reproductiva del macho, manejo del semen, el procesamiento y conservación (9).

Los resultados obtenidos luego de la inseminación artificial con semen congelado son múltiples, debido a diversos factores que afectan principalmente a la integridad de las membranas del espermatozoide, uno de los más importantes está relacionado con los tipos de diluyentes, estos afectan principalmente al sistema de las membranas celulares, causando alteraciones ultraestructurales, bioquímicas y funcionales en una proporción significativa de la célula espermática del macho (5). El proceso de congelación y descongelación induce cambios en la membrana plasmática de los espermatozoides, además pueden existir alteraciones morfológicas, que pueden influir en la capacidad fertilizante (3). Alrededor de 40 a 50% de la población no sobrevive a la crioconservación, afectándose la viabilidad espermática (10).

La estructura y composición de las membranas plasmáticas determinan los principales cambios celulares que se obtienen durante los procesos de criopreservación de semen; el cambio brusco de temperatura afecta la difusión y ósmosis a través de las membranas y cada célula tiene su propio perfil biofísico el cual interactúa con diferentes criopreservantes celulares (11). La motilidad espermática y vitalidad post congelación se puede ver afectada con el uso de los diferentes diluyentes de origen sintético (a base de lecitina de soya) y diluyentes orgánicos (yema de huevo), y otros factores (12).

1.2 Enunciados

a) Enunciado general

¿Cuál es el efecto de los dilutores Tris - yema de huevo, Triladyl – yema de huevo y AndroMed en los espermatozoides antes y después de la congelación de semen de bovino Holstein?

b) Enunciados específicos

- ¿Cuál de los tres dilutores Tris – yema de huevo, Triladyl – yema de huevo y AndroMed mantiene mejor la motilidad total de espermatozoides y la motilidad progresiva rectilínea de espermatozoides antes y después de la congelación de semen de bovino Holstein?
- ¿Cuál de los dilutores Tris – yema de huevo, Triladyl – yema de huevo y AndroMed conserva mejor la vitalidad de espermatozoides antes y después de la congelación de semen de bovino Holstein?
- ¿Cuál de los dilutores Tris – yema de huevo, Triladyl – yema de huevo y AndroMed mantiene mejor la integridad funcional de la membrana citoplasmática de espermatozoides antes y después de la congelación de semen de bovino Holstein?

1.3 Objetivos

a) General

Evaluar las características espermáticas diluidos con Tris – yema de huevo, Triladyl – yema de huevo y AndroMed, antes y después de la congelación de semen de bovino Holstein.

b) Específicos

- Determinar la motilidad total y la motilidad progresiva rectilínea de espermatozoides diluidos con Tris – yema de huevo, Triladyl – yema de huevo y AndroMed, antes y después de la congelación de semen de bovino Holstein.
- Observar la vitalidad espermática diluidos con Tris – yema de huevo, Triladyl – yema de huevo y AndroMed, antes y después de la congelación de semen de bovino Holstein.

- Examinar la integridad funcional de la membrana citoplasmática de espermatozoides diluidos con Tris – yema de huevo, Triladyl – yema de huevo y AndroMed, antes y después de la congelación de semen de bovino Holstein.

1.4 Justificación

La inseminación artificial es la biotecnología que se encarga de la aplicación de semen en el tracto genital de una hembra en el momento efectivo para la fecundación. Un crecimiento fenomenal de la IA en bovinos lecheros, ocurrió en los años 40 en los Estados Unidos. La inseminación artificial es utilizada para dispersar rápidamente genes de alto valor dentro de la población, con el fin de mejorar la calidad genética de los hatos (13). Las ventajas con la inseminación artificial son mejoramiento genético, conservación prolongada del semen, de un solo eyaculado se obtiene un número de pajillas, prevención y control de enfermedades (14).

La criopreservación del semen para la inseminación artificial ha servido como un instrumento para la amplia difusión del material genético de los animales de alta producción, para la cual, es necesario que el material fecundante de los machos sea sometido a tecnologías eficientes (15). Los espermatozoides puestos a criopreservación sufren varias alteraciones estructurales, como dilatación y ruptura de la membrana, los que ocasionan alteración de la permeabilidad de la membrana (8). Cada célula debe ser congelado previo a un estudio y teniendo conociendo del perfil biofísico, se obtiene mediante ensayos de permeabilidad y volumen osmóticamente inactivo con diferentes criopreservantes (crioprotectores penetrantes y no penetrantes) el mejor protocolo de criopreservación será con el que se trabaje (11).

Los dilutores son soluciones acuosas responsables de incrementar el volumen de eyaculado, preservar la viabilidad de los espermatozoides, proporcionan una fuente propicia de nutrientes, un ambiente que mantenga la temperatura de los espermatozoides, electrolitos para mantener una adecuada presión osmótica, sustancias buffer que protejan el semen contra cambios extremos de pH, y antibióticos que inhiban el crecimiento bacteriano. El plasma seminal por sí solo no permite que haya una conservación duradera del semen. Por lo tanto, se le debe añadir un medio adecuado con el fin de prolongar su vida media y mantener su habilidad de fertilización (16). La motilidad y vitalidad espermática después de la

descongelación de semen puede verse afectada por el uso de los diferentes diluyentes (17). Evaluar dilutores comerciales permitiría identificar cuál de ellos es mejor para conservar las características espermáticas del semen del toro, de tal forma se use en la inseminación artificial.

1.5 Delimitación

La investigación se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, ubicado en Patibamba Baja del distrito y provincia de Abancay, Apurímac, Perú. Las unidades de investigación fueron muestras de semen bovino. el presente estudio involucra la evaluación de tres dilutores en la criopreservación del semen bovino antes y después de la congelación. la alimentación del animal principalmente fue con maralfalfa (*Pennisetum sp*), grama (*Cynodon dactylon*), higerilla silvestre (*Ricinus communis*) y alfalfa (*Medicago sativa*).

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes

Se evaluaron dos clases de diluyentes comerciales diluyente a base de soya (Andromed) para la criopreservación de semen bovino, se comparó a este con el Triladyl. Se utilizaron 18 muestras de eyaculado, las cuales se dividieron en dos partes, cada una de las cuales se diluyó con cada uno de los diluyentes, una vez diluido se congeló las muestras, utilizando tres tiempos de equilibrio. Aproximadamente 15 días después de su congelación, se descongelaron dos dosis de cada eyaculado y se evaluaron la motilidad espermática a los 0, 30, 60 y 90 min posdescongelado, dejando el semen en baño María durante este tiempo a 37 °C. El diluyente triladyl tuvo un efecto significativo sobre la motilidad posdescongelado que el Andromed ($p < 0.05$). Para ambos diluyentes el mejor tiempo de equilibrio fue de 8 a 9 h. En conclusión el Triladyl resultó mejor, aunque el Andromed también resultó aceptable (18).

Por otro lado, otro estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de dos diluyentes: TRIS + Lecitina de soya (AndroMed) y TRIS + yema de huevo (Triladyl), sobre tres tiempos de equilibrio a 4 °C (2, 4 y 7 horas) en refrigeración antes de la congelación y luego evaluar los porcentajes de motilidad individual progresiva, vitalidad espermática y anomalías postdescongelación. Se utilizó el semen de un toro de raza Jersey, colectado en una vagina artificial. La motilidad individual progresiva postdescongelado con el diluyente AndroMed (41.81%), y Triladyl (40.65%) se comportaron en igual forma ($P > 0.05$), pero se encontraron diferencias significativas en los tiempos de equilibrio, siendo el porcentaje más alto de 2 horas (43.53%), comparado con las 5 horas (41.25%) y 7 horas (38.91%). En vitalidad espermática se obtuvo porcentajes más altos con Triladyl (51.73%), que con AndroMed [48.96%] (12).

Con el fin de evaluar las diferencias entre tres diluyentes Triladyl, Tris y Citrato de sodio para la criopreservación de semen bovino, se utilizaron 5 sementales de raza Charoláis. Se agregó glicerol, penicilina, sulfato de estreptomicina y yema de huevo fresco a dos de los dilutores (Tris, Citrato de sodio), en caso del Triladyl se adicionaron agua bidestilada, una parte de yema de huevo fresco y una parte del contenido comercial. En los resultados obtenidos el diluyente Triladyl es el que marca diferencia significativa en relación al Citrato

de sodio y al Tris; la motilidad total fue 65% - 80%, vitalidad 81.5% antes de la congelación en semen fresco; después de la congelación la motilidad total a los 2 días fue de 40%, a los 5 días 30%, a los 86 días 35% en caso del Triladyl; en caso del dilutor Tris a los 2 días motilidad total 20%, 5 días 10%, a los 86 días 30% (19).

Asimismo, otro estudio tuvo como objetivo evaluar la eficiencia de dos diluyentes Triladyl y yema de huevo citrato (EYC) y Andromed evaluados a diferentes tiempos de análisis en semen fresco y congelado/descongelado. Se utilizó semen de las razas Brown swiss y Patua (*Bos taurus*), colectados con vagina artificial, diluido y envasado en pajuelas de 0.5 mL. Se evaluó la motilidad total, viabilidad espermática, morfología espermática y funcionalidad de membrana precongelación y postcongelación. En conclusión, los tres diluyentes utilizados muestran diferencias significativas en cuanto al tiempo de análisis, luego de la extracción descongelamiento del semen bovino. En semen fresco una motilidad total Andromed 89%, EYC 90%, Triladyl 88%; motilidad progresiva Andromed 82%, EYC 80%, Triladyl 78%; después de la congelación del semen, los resultados para la motilidad progresiva fueron para Andromed 25%, Triladyl 10%, EYC 5%, motilidad total Andromed 33%, Triladyl 19%, EYC 11%, para los espermatozoides con membrana plasmática íntegra, los resultados son Andromed 28%, Triladyl 14% y EYC 11% (20).

De la misma manera, con la finalidad de analizar el efecto de dos dilutores comerciales (Bioxcell y AndroMed) sobre la viabilidad espermática postrefrigerado y postdescongelado, a través de observaciones de motilidad, vitalidad y prueba de Host, habiéndose empleado 5 toros (2 Holstein y 3 Brown Swis). A la evaluación de motilidad individual progresiva en semen al postrefrigerado, con el dilutor Bioxcell se obtuvo $85.6 \pm 2.32\%$; AndroMed $86.5 \pm 2.24\%$, que a la prueba de comparaciones de medias se encontró diferencias significativas ($P < 0.05$), mientras al postcongelado con Bioxcell $63.7 \pm 1.85\%$; AndroMed $65.0 \pm 2.05\%$. La vitalidad con el dilutor Bioxcell se obtuvo $77.3 \pm 4.31\%$ de espermatozoides vivos y con AndroMed $78.8 \pm 4.52\%$, encontrándose diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$), entre dilutores y con la prueba hipo osmótica (Test de Host), que permitió evidenciar espermatozoides con membrana intacta y osmóticamente activa, al postrefrigerado con el dilutor Bioxcell se obtuvo $66.0 \pm 4.98\%$ y con AndroMed $67.90 \pm 5.40\%$ de espermatozoides que reaccionaron positivamente al test de Host, se encontró diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$), mientras al postcongelado con Bioxcell se obtuvo $43.4 \pm 3.29\%$ y

con AndroMed $45.9 \pm 3.61\%$, se encontró diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) entre dilutores (9).

En una investigación, se evaluó el efecto de dos dilutores en la conservación de la integridad de la membrana plasmática en semen refrigerado y congelado de toros. Se utilizó semen refrigerado y congelado de 06 toros en 10 ocasiones por animal de tres razas diferentes Brown Swiss, Holstein y Simmental, diluidos con dos dilutores AndroMed® y Steridyl®. La motilidad postdescongelada con el dilutor AndroMed® fue $60.6 \pm 7.23\%$ y con Steridyl® $57.2 \pm 9.20\%$ se encontró diferencias estadísticas significativa ($P < 0.05$). Los porcentajes de espermatozoides vivos en semen postdescongelado entre dilutores AndroMed® y Steridyl® con promedios $60.8 \pm 9.15\%$ y 61.3 ± 9.49 respectivamente (21).

Sin embargo, en otro estudio se evaluó las características de los diluyentes Andromed, Bioxcell que contienen proteína vegetal (soya) y Triladyl proteína animal (yema de huevo) mismos que se encuentran en el mercado para criopreservar semen bovino. Para el análisis se utilizaron tres eyaculados diferentes de toros Sahiwal, las características seminales que se evaluaron fueron: pH, volumen, color, cuerpos extraños, concentración, viabilidad, morfología, funcionalidad de membrana y motilidad. El análisis mostró un efecto significativo de los diluyentes en las características seminales del semen congelado/descongelado. Las características seminales postdescongelación fue motilidad progresiva Triladyl 22%, Andromed 16%, Bioxcell 13%; vitalidad espermática 37%, 19%, 16%; motilidad total 39%, 21% y 14%; la motilidad progresiva en precongelación Andromed con 73%, Bioxcell 68% no presentan diferencias, mientras que Triladyl es diferente a ellos con 41%; motilidad total antes de la congelación Andromed 82%, Bioxcell 75%, Triladyl 67%. El Triladyl fue mejor que Andromed y Bioxcell ya que en este se encontró una mayor cantidad de célula espermáticas vivas y con mayor motilidad después de la congelación, concluyendo que el mejor tratamiento empleado en esta investigación y bajo estas condiciones fue el diluyente que tenía proteína animal (22).

2.2 Marco referencial

2.2.1 Inseminación artificial

El resultado de la IA es la consecuencia de una serie de eventos. Se inseminan hembras fértiles, con una condición corporal adecuada, el programa de IA resultará exitoso si se

cuenta con un sistema de detección de celos eficiente, si se utiliza semen de buena calidad (23).

2.2.2 Método de la vagina artificial

La vagina artificial para bovinos es un tubo cilíndrico de plástico rígido y resistente, de 35-40 centímetros de largo, con 7 centímetros de diámetro, recubierto internamente por una goma que se doble sobre los extremos del cilindro formando una cámara que se llena con agua caliente a temperatura de 45-46 °C y aire, con la finalidad de proporcionar el estímulo apropiado de temperatura y presión, obteniéndose de esta manera la eyaculación del semental (24).

Para simular la monta se puede utilizar una vaca, un macho o un maniquí. El método más efectivo para estimular al toro, consiste en permitir al semental montar sobre el señuelo y desviar el pene tomando con la palma de la mano. La monta falsa en el bovino aumenta la calidad del semen en cuanto a volumen, concentración espermática y motilidad (25).

Para realizar la colección, tanto el animal y la vagina artificial, deben ser previamente preparados, un operador diestro se coloca del lado derecho del toro, al momento del intento de monta desvía el pene tomando prepucio con la mano izquierda hacia el lado derecho impidiendo todo contacto con la monta. Con la mano derecha, sosteniendo la vagina artificial, se coloca el extremo lubricado por delante del pene, y como respuesta al estímulo (presión y temperatura) semejante a la vagina de la vaca en celo, el toro penetra la vagina en toda su extensión, realizando lo que se conoce como golpe de riñón (24).

La vagina artificial es solamente un tubo que en el momento de la eyaculación permite el paso del pene; el semen se deposita en el cono de látex y el tubo graduado. Cuando la vagina artificial es muy larga o el empuje final del toro fue insuficiente, el eyaculado permanece en la vagina, lo cual lo inhabilita por la alta temperatura. En el toro y otros rumiantes, la temperatura de la vagina es el estímulo más importante para la eyaculación (3).

2.2.3 Fisiología de la reproducción

2.2.3.1 Espermatogénesis

Durante el desarrollo embrionario, las células especializadas llamadas células germinales primordiales emigran desde la región del saco vitelino del embrión hacia las gónadas no diferenciadas. Después de llegar a la gónada fetal, las células primordiales se dividen varias veces, formando gonocitos (26).

Tiene lugar en el testículo, que al mismo tiempo realiza una función hormonal. La espermatogénesis tiene lugar en las paredes del túbulo seminífero, va desde la periferia hacia a la luz (27).

En la espermatogénesis se distinguen las siguientes fases:

2.2.3.1.1 Fase de multiplicación

Esta multiplicación se realiza por mitosis normales, se acelera a partir de la pubertad, no cesará hasta la muerte del animal. Las células resultantes son diploides, contienen $2n$ cromosomas (n del padre y n de la madre). Poco antes de la pubertad los gonocitos sufren una primera diferenciación y se convierten en espermatogonias, no todas las espermatogonias de los túbulos seminíferos se encuentran en la misma fase, sino que se reconoce un ciclo del epitelio seminal a lo largo del cual las espermatogonias que tapizan una determinada área del túbulo seminífero pasan por hasta catorce fases (12 en los bóvidos). Este ciclo representa aproximadamente la cuarta parte denominado ciclo espermatogénico, el tiempo que tarda una espermatogonia en espermatozoide es de 45 días en el toro (27). Comprende varias divisiones mitóticas, comenzando desde espermatogonia A hasta espermatogonia B (8).

2.2.3.1.2 Fase de crecimiento

Tras la última división mitótica, la espermatogonia aumenta de tamaño y se convierte en espermatozocito de I orden. Para ello, pasa primero por la fase S (síntesis de histonas y del ADN), a la que sigue el período G₂ (crecimiento posterior a la replicación del ADN) (27).

2.2.3.1.3 Fase de maduración

El espermatocito de I orden, todavía diploide, completa la primera división de la meiosis, da lugar a dos células hijas, haploides, denominadas espermatocitos de II orden, estas células son bien distintas entre sí, una de ellas será portadora del cromosoma X y la otra del Y. Tras una interfase muy corta, se inicia la segunda división meiótica, profase muy breve, metafase, anafase y telofase, en todas idénticas a una mitosis. Las células resultantes se denominan espermátides, con un núcleo poco teñido, en el que destaca un voluminoso nucléolo. Cada espermatocito de I orden da lugar a 4 espermátides (27).

2.2.3.1.4 Fase de transformación

Conjunto de modificaciones que experimenta la espermátide hasta que se convierte en un espermatozoide. Como sabemos, la espermátide tiene un núcleo claro, nucléolos bien manifiestos (27).

Núcleo: Se alarga, se aplanan y disminuye progresivamente de volumen, en algunos casos las proteínas asociadas al ADN, son reemplazadas por las protaminas (27).

Aparato de Golgi: Se desplaza hacia el futuro polo anterior del núcleo y se aplica contra él, elaborando una serie de gránulos hasta formar el gránulo acrosómico, denso y muy rico en enzimas hidrolíticos. El gránulo acrosómico aparece rodeado de un material menos denso en el interior de una vesícula acrosómica, la cual se aplanan para aplicarse sobre los dos tercios anteriores del núcleo. En este momento se denomina capuchón cefálico o acrosoma (27).

Centriolos: Se desplazan hacia a la periferia de la célula, del lado opuesto al aparato de Golgi. Uno de ellos (centriolo distal), da origen a las formaciones filamentosas del flagelo; el otro (centriolo proximal), se acerca al polo posterior del núcleo y se aplica contra él, arrastrando en su emigración al centriolo distal y al flagelo (27).

Cuerpo cromatoide: Se acerca a los centriolos y forma un anillo alrededor del origen del flagelo. Se denomina anillo de Jensen y sólo persiste en algunas especies (27).

Mitocondria: Se agrupan a nivel del polo posterior del núcleo y se van uniendo a sus extremos, para formar una hilera, que se enrolla alrededor de la primera parte del flagelo, lo que será la pieza intermedia del espermatozoide (27).

Ácido desoxirribonucleico (ARN): Se hace cada vez más escaso y termina por desaparecer, de forma que el espermatozoide no contiene nada de ARN (27).

2.2.3.1.5 Fase de liberación o espermiación

La espermiación ocurre tras la ruptura del puente citoplasmático entre cada espermátide y su cuerpo residual. Los restos del citoplasma de las espermátides son retenidos por las células de sertoli y serán digeridos y reutilizados por ellas (27).

Es la transformación final de espermátides en espermatozoides y estas son liberadas en la luz del túbulo seminífero. En el núcleo, los gránulos de cromatina experimentan condensación progresiva, mientras las proteínas transicionales son reemplazadas por protaminas que se transforman en un fino material homogéneo que llena de materia uniforme todo el núcleo espermático. Por medio de la formación del cuerpo residual se completa la maduración final, y las espermátides alargadas están listas para ser liberadas como espermatozoides (26).

2.2.4 Desarrollo de los testículos

Los embriones con un cromosoma Y suelen desarrollar los testículos. El gen SRY del TDF (factor determinante del testículo) del brazo corto del cromosoma Y actúa como el interruptor que dirige la transformación de la gónada indiferenciada en un testículo. Hacia la octava semana, las células de Leydig, secretan hormonas androgénicas, testosterona y androstenodiona. Los túbulos seminíferos se mantienen sólidos (es decir, sin luz) hasta la pubertad. Las células de Sertoli constituyen casi todo el epitelio seminífero del testículo fetal, posteriormente se aplanan y forman el mesotelio en la superficie externa del testículo adulto. La rete testis se transforma en conductillos eferentes, los cuales se conectan al conducto mesonéfrico, que da lugar al conducto del epidídimo (28).

El desarrollo de la gónada masculina tiene lugar en la región medular de la cresta gonadal. Los cordones gonadales se organizan para formar los túbulos seminíferos que alcanzan su desarrollo en la vida posnatal. En el testículo definitivo las células

germinales se convierten en espermatogonias, localizadas en la pared de los túbulos seminíferos asociados a las células de Sertoli las cuales juntamente con las células de Leydig, producen andrógenos y otras secreciones características de la gónada masculina (29).

2.2.5 Colección del semen bovino

La colecta seminal es una técnica que se emplea para evaluar la capacidad reproductiva de los sementales, el control rutinario de la calidad del semen, el diagnóstico de la infertilidad y por su puesto la inseminación artificial ya sea con semen fresco, refrigerado o congelado (30). La recolección de semen se realiza por el método de la vagina artificial o por el método de la electroeyaculación. El método de la vagina artificial requiere de la utilización de un animal para la monta (macho o hembra) o un maniquí; cuyo método simula una monta natural y permite la obtención de una muestra de semen de excelente calidad. La colección de una buena muestra se obtiene de la estimulación previa del semental, para lo cual se recomienda una secuencia de falsas montas y períodos de restricción, antes de coleccionar el eyaculado (24). La desventaja de usar una vaca consiste en que el toro podría llegar a cubrirla en un descuido del operador. Antes de coleccionar el semen deberán tomarse en cuenta dos aspectos importantes: la higiene y el estímulo del semental, nunca se debe tomar con la mano la mucosa del pene, para evitar inhibir la eyaculación. La monta falsa aumenta la calidad del semen en cuanto a volumen, concentración espermática y movilidad (7).

Estudios en la raza Holstein sugieren una frecuencia de recolección de dos eyaculados dos veces por semana para reproductores de 3 años con 8 meses; la colección de semen es muy importancia, una alta frecuencia de extracciones puede afectar la concentración espermática y la madurez de los espermatozoides, mientras una baja frecuencia de colección puede afectar la motilidad espermática y su vitalidad (24).

2.2.6 Características macroscópicas y microscópicas del semen

Una vez que el semen recolectado llega al laboratorio, este se debe colocar en baño María, a una temperatura de 37 °C para comenzar con su evaluación (26).

2.2.6.1 Características macroscópicas

La evaluación macroscópica del semen debe incluir los parámetros siguientes:

a) Volumen

Se registra el volumen de colección, con el uso de una pipeta graduada y se registra su volumen (26).

Las variaciones de volumen pueden ser afectadas según la condición del animal en toros jóvenes como adultos. Los animales jóvenes a un inicio de la madurez sexual el volumen del semen puede variar de 1 a 3 mL, 4-8 mL después de alcanzar la madurez sexual (15).

b) Color

Normalmente el semen es de color blanco y la densidad de dicha muestra se relaciona directamente con la concentración de espermatozoides. El color y aspecto más cremosos indica una mayor concentración, mientras de un aspecto lechoso, claro y transparente indica menor concentración espermática, como es el caso de aquellos animales con oligospermia o azospermia (24). Los colores normales van del blanco al amarillento, siendo patológicos, los colores rosado, amarronado y verdoso (1).

c) Olor

Las muestras de semen recolectadas higiénicamente de reproductores sanos y fértiles tienen un olor característico catalogado como sui generis, un olor débil aromático similar como a la yema de huevo (24).

d) Aspecto

Se entiende por aspecto del semen a la presentación luego de su colección, este puede ser: limpio, homogéneo, grumoso, sucio (26).

2.2.6.2 Características microscópicas

La evaluación microscópica debe incluir los elementos siguientes:

a) Motilidad total

La motilidad individual en una muestra de semen se expresa como el porcentaje (%) de células móviles bajo un campo microscópico (24). La motilidad se estima inmediatamente después de descongelar. Se compara la motilidad antes y después de la

criopreservación para evaluar el efecto de la criopreservación sobre la supervivencia (26).

La motilidad espermática es un valor fundamental para la conclusión de la calidad de un eyaculado (15). La motilidad es uno de los parámetros más importantes de la analítica seminal, es el porcentaje de espermatozoides móviles, así como el tipo de movimiento que presenta la población espermática.

La motilidad es uno de los parámetros más importantes del análisis seminal. Existen diversas técnicas de estudio de motilidad, pero la más utilizada y a la vez la más simple es la valoración visual subjetiva del porcentaje de espermatozoides móviles y la calidad de su movimiento (31).

b) Movimiento progresivo

Un espermatozoide de motilidad progresiva es aquel que se mueve de un punto a otro en una línea más o menos recta. (24). Consiste en determinar la proporción de espermatozoides que muestran un movimiento progresivo y lineal. Para su evaluación, se coloca una gota pequeña de semen sobre un portaobjetos previamente calentado a 39 °C, a continuación, se fija con un cubreobjetos y se observa al microscopio (objetivo 40x). El porcentaje de células con movimiento progresivo se calcula subjetivamente; una buena muestra debe tener 70% de motilidad (7).

Es el movimiento cefálico rectilíneo (hacia adelante) de los espermatozoides. Puede ser determinado en forma subjetiva, en microscopio de contraste de fases, observando una pequeña gota de semen colocada sobre una platina térmica o en un portaobjetos precalentado a 38 °C (32).

c) Vitalidad

Existe un conjunto de técnicas que permiten una coloración selectiva entre espermatozoides vivos y muertos, esto como consecuencia de los cambios bioquímicos que se producen tras la muerte del espermatozoide (acción cromacitológica); el fundamento de esta técnica es el siguiente: el colorante penetra la membrana de los espermatozoides muertos, dejando sin teñir los que se encontraban vivos al momento de realizar la tinción (24). Mediante la determinación del número de espermatozoides vivos y muertos es posible predecir la calidad de un eyaculado. Un eyaculado que

presenta más de 30% de espermatozoides muertos, difícilmente servirá para ser procesado y congelado (15).

La rotura de la membrana plasmática está claramente asociada con la pérdida de viabilidad celular, pero una membrana plasmática intacta siempre indica que la célula sea viable. El procesamiento del semen, incluida su criopreservación, es “estresante” para el espermatozoide y afecta, primeramente, a sus membranas. Los daños que pueden producirse en éstas pueden ser modificaciones en su organización, permeabilidad y composición lipídica (2).

Los espermatozoides vivos presentarán una coloración clara o no se dejan colorear, mientras que los muertos tendrán una coloración rosa-ceniza, debiéndose considerar los espermatozoides parcialmente coloreados como muertos (15). El parámetro que evalúa la vitalidad de los espermatozoides es útil para saber si los espermatozoides inmóviles están vivos o muertos (33).

La Eosina-Nigrosina es adecuada para el examen de la vitalidad, dado que la fórmula es isosmótica con semen. La célula espermática con la membrana intacta no se tiñe con eosina mientras la muerta que posee membrana celular dañada absorbe el colorante rojo. La Nigrosina se utiliza como tinción de fondo para contrastar las células vivas sin teñir, blancas (34).

d) Integridad de la membrana

El test de endósmosis (HOST) se fundamenta en las modificaciones producidas en la cola (hinchamiento o “swelling”), los espermatozoides son incubados en un medio hiposmótico durante un breve período, los cambios se observan en la cola (35).

La hinchazón de los espermatozoides frente a una solución hiposmótica se evidencia por el arrollamiento de la cola. Este proceso solo se observa solo en aquellas células que mantienen íntegra su membrana plasmática, y se debe a un flujo de agua que origina una expansión de las membranas (5).

Para medir este parámetro se usó la prueba Hiposmótica o de endosmosis positiva que consistió en someter a los espermatozoides en una solución hiposmótica, se observó el porcentaje de flagelos enrollados en microscopio (32).

La integridad funcional positiva de la membrana citoplasmática de espermatozoides es cuando, se observa el espermio en medio hiposmótico, se torciona helicoidalmente (36). Debido al desequilibrio osmótico en el medio extracelular e intracelular, el espermatozoide ingresando agua al medio intracelular, en consecuencia, la célula espermática presenta mayor volumen (37).

2.2.7 Función de los diluyentes en la criopreservación del semen bovino

2.2.7.1 Crioprotectores

Los criopreservantes son sustancias hidrosolubles y de baja toxicidad, que reducen el punto eutéctico de una solución dada, (punto en el cual una composición dada de A y B solidifica como un elemento puro), el descenso del punto eutéctico implica que se alcanzará una concentración dada de solutos a una temperatura menor, de forma que la célula estará más deshidratada y el gradiente osmótico al que estará sometido será menor (11).

El proceso de criopreservación implica los pasos de reducción de la temperatura, deshidratación celular, congelación y descongelación. Los espermatozoides no están adaptados para soportar bajas temperaturas; por lo tanto, la criopreservación de estas células ocurre a expensas de la viabilidad celular y la función normal. El daño celular de diferentes grados de severidad es inducido por distintos mecanismos en cada una de las fases de crioconservación, y el estado funcional de las células congeladas y descongeladas es el resultado de las lesiones acumuladas durante el proceso de congelación (38).

2.2.7.2 Daños por la criopreservación

Se reconoce que el semen criopreservado de mamíferos tiene una fertilidad disminuida en comparación con el semen fresco. La reducción se debe tanto a una menor viabilidad después de la descongelación como a una disfunción subletal en una proporción de la subpoblación sobreviviente. Las razones de la pérdida de fertilidad son varias. Los factores que afectan la proporción de sobrevivientes, por ejemplo, la susceptibilidad al choque frío, la velocidad de enfriamiento, la composición del diluyente y el estrés osmótico y los factores que influyen el estado funcional de los

sobrevivientes, por ejemplo, la estabilidad de la membrana, el daño oxidativo, la integridad del receptor de la membrana, la estructura nuclear (10).

Los parámetros iniciales de evaluación del semen congelado son: volumen de la dosis (el volumen aceptable es de 0.25 mL), motilidad espermática progresiva posdescongelamiento (mínimo de 30) (3).

2.2.7.3 Enfriamiento y choque frío

Los efectos del choque por frío en otras funciones celulares, como la pérdida de selectividad en la permeabilidad de la membrana, se pueden observar como tinción intracelular con tintes que no son permeables a la membrana plasmática intacta. Ultraestructural, el shock por frío se manifiesta más claramente por una interrupción de las membranas acrosómicas. Una disminución de la temperatura provoca una transición de fase termotrópica en los fosfolípidos de la membrana de una fase cristalina líquida a un gel, dando como resultado una estructura de membrana más rígida (ordenada). Las temperaturas de transición de fase específicas para los diferentes fosfolípidos en la membrana dan como resultado una migración lateral con el reordenamiento de los componentes de la membrana y las separaciones de la fase lipídica dentro del plano de la membrana. La migración lateral puede crear microdominios de lípidos que no forman una bicapa y puede modificar las proteínas que rodean los entornos. Al descongelarse, estas alteraciones predisponen a las membranas de aplicación para fusionarse y afectar la actividad de la proteína, lo que lleva a una permeabilidad general de la membrana alterada al agua y los solutos. La actividad metabólica restante de la célula espermática conduce a la muerte debido al proceso de envejecimiento intrínseco. Para detener los procesos metabólicos, las células deben enfriarse por debajo de $-13\text{ }^{\circ}\text{C}$, en donde las reacciones químicas impulsadas térmicamente no se producen (38).

2.2.7.4 Agentes crioprotectores permeables

Son aquellas sustancias de bajo peso molecular y por consiguiente permeables a través de la membrana celular, los más utilizados son: el glicerol, el dimetilsulfoxido y propanediol (11).

El glicerol se usa universalmente como agente crioprotector para congelar, se añade después del de enfriarlo a 5 °C (26). Se adiciona al diluyente un crioprotector (glicerol) y el semen así diluido permanecerá de 2 a 6 horas a esta temperatura el cual será el tiempo de equilibrio (7).

2.2.7.5 Agentes crioprotectores no permeables

Sustancias con un peso molecular alto, efectivas a velocidades altas de congelación, son importantes por ejercer su acción crioprotectora promoviendo una rápida deshidratación celular y se usan normalmente asociados a los agentes penetrantes. Los más utilizados son: sacarosa, glucosa, dextrosa y dextrans. Dichos compuestos por lo general son polímeros que forman puentes de hidrógeno con el agua, reduciendo así la actividad de agua a una magnitud mucho mayor que la que se predeciría por su concentración molar. La adición del criopreservante genera estrés osmótico sobre las células porque aumenta la osmolaridad del medio. Las células en un inicio se deshidratan para compensar la fuerza osmótica inducida por la presencia de los agentes crioprotectores y después se hidrata (11).

2.2.8 Dilutores utilizados en la congelación del semen

Se han utilizado diferentes soluciones como dilutores o extensores del semen, la mayoría son variaciones de unas cuantas fórmulas principales, casi todos los diluyentes para preservar semen o congelarlo tienen yema de huevo o leche descremada o bien una combinación de esos dos ingredientes básicos (26). Existen gran cantidad de diluyentes, desde los químicos, constituidos por soluciones salinas isotónicas, hasta aquellos que contienen sustancias orgánicas como la yema de huevo, leche o agua de coco (3).

La yema de huevo preserva la motilidad y las membranas plasmáticas y acrosómica. Actúa también como amortiguador osmótico, permitiendo una mayor tolerancia de los espermatozoides a las soluciones hipo e hiperosmóticas. La protección que ejerce durante la congelación se debe a la adhesión a la membrana plasmática, especialmente dada por la fracción lipoproteína de baja densidad (5).

Los constituyentes de un buen diluyente para la preservación y crioconservación de semen deben reunir las características siguientes: Proteger a los espermatozoides

contra el efecto dañino del enfriamiento rápido, con ese fin son utilizados la yema de huevo o la leche para proteger al espermatozoide del choque frío, especialmente, en el paso del eyaculado de la temperatura corporal a 5 °C en el proceso de congelación, también estas sustancias orgánicas tienen nutrientes, los cuales son utilizados por los espermatozoides. Inhibir el crecimiento bacteriano, para ello se utiliza antibióticos, como Lincospectin, Penicilina o Estreptomina. Proteger a las células espermáticas durante la congelación, en este caso se utiliza glicerol el cual desplaza el agua de la célula espermática impidiendo la formación de cristales de hielo (26).

2.2.8.1 Dilución

El proceso de dilución del semen, el diluyente y los frascos de dilución deben estar a una temperatura de 37 °C (26).

Los espermatozoides sobreviven fuera del organismo solo un tiempo breve. Los diluyentes son sustancias que se agregan al eyaculado para conservar su metabolismo, viabilidad y fertilidad (3).

Existen diferentes tipos de diluyentes que permiten mantener la viabilidad espermática, dependiendo del tiempo que se requiera conservar: los de corto, mediano y largo plazo (7).

Dilución a corto plazo

Solución de citrato de sodio al 2.9%

Penicilina G sódica (1000 UI/ mL)

Sulfato de estreptomina (5 mg/mL)

Agregar a esta solución 20% de yema de huevo.

Dilución a largo plazo (congelación de semen)

Tris (hidroximetilamino metano) = 36.05g

Ácido cítrico = 20.24 g

Fructosa = 14.88 g

Penicilina G sódica (1000 UI/ mL) = 1.000.000 UI

Sulfato de estreptomina (5 mg/mL) = 500.000 UI

Agua tridestilada = 1000 mL agregar a esta solución 20% de yema de huevo.

2.2.8.2 Equilibración (estabilización)

Es el proceso que consiste en mantener a 5 °C por un período de tres a seis horas para acondicionar los espermatozoides a la congelación posterior, durante este período se procede a efectuar la identificación, llenado y sellado de las pajuelas (26).

2.2.8.3 Congelación horizontal

Consiste en realizar la congelación de las pajuelas de semen colocadas en la rampa de congelación en los vapores del nitrógeno líquido, por un tiempo de 10 minutos. A una temperatura aproximada de 110 °C (26).

2.2.8.4 Protocolo de congelamiento de semen bovino a nivel de campo

La preparación del diluyente: primero debe prepararse una solución madre del diluyente tris-yema de huevo. Esta solución madre puede ser almacenada en refrigeración por un periodo hasta de 30 días (3).

2.2.9 Diluyentes para la congelación del semen

Básicamente son los mismos que se mencionaron: Citrato de sodio-yema de huevo, Tris - yema de huevo, leche y fórmulas comerciales a las que se agrega glicerol (3).

2.2.9.1 AndroMed

AndroMed es un concentrado estéril para la preparación de un diluyente libre de yema de huevo para eyaculados bovinos. Es apropiado para la congelación del semen y para la conservación de semen en fresco. Para la preparación del diluyente se adicionan 800 mL de agua destilada estéril al contenido de un frasco de AndroMed (200 mL), a una temperatura de 30 a 35 °C. También es posible preparar volúmenes menores, manteniendo la proporción [1 parte de concentrado más 4 partes de agua] (39).

AndroMed contiene fosfolípidos, TRIS, ácido cítrico, azúcares, antioxidantes, tampones, glicerina, agua de altísima pureza y antibióticos, de acuerdo a la Directiva de CE 88/407 (Tilosina, Gentamicina, Espectinomicina, Lincomicina). Sus beneficios son, no contiene ingredientes de origen animal, sin riesgo de contaminación microbiológica, fácil preparación (40).

Diluyente que no necesita adicionar yema de huevo. Sintético, sin componentes de origen animal, sin riesgo de contaminación microbiológica, con altas tasas de fertilidad. También se utiliza para semen caprino y ovino; indicado en la preservación de semen fresco entre 5 a 10 °C, debido a que su composición estandarizada lo hace apto para el análisis mediante software (41).

2.2.9.2 Triladyl

Triladyl es un concentrado estéril para la preparación de un diluyente con yema de huevo para la congelación de semen de bovino en un solo paso. Triladyl también puede usarse para la congelación de semen de ovino, caprino, ciervo, etc. Este diluyente de semen de bovino está compuesto de “TRIS, ácido cítrico, azúcar, tampones, glicerina, antibióticos (Tilosina 5.7 mg, Gentamicina 28.6 mg, Espectinomicina 34.3 mg, Lincomicina 17.2 mg) agua de extrema pureza. Cada frasco contiene 250 g de solución para 1250 g de diluyente listo para su utilización (42).

Diluyente que necesita adicionar yema de huevo. Medio clásico para la producción de semen bovino. Se utiliza con buenos resultados en diluciones con baja concentración espermática (menos de 10 millones de espermios/dosis), como también para la dilución de eyaculados con baja concentración celular (41).

2.2.9.3 Dilutor Tris

TRIS (Hidroximetil amino metano). Es un tampón biológico, cuya función es mantener el pH de la solución constante (7 a 8 pH). Se prepara a pH 8.0. El peso molecular del TRIS es 121.14 gr. / g. mol (43).

Se utilizó un diluyente a base de Tris y yema de huevo de gallina, dividido en dos fracciones A y B. Luego de su preparación, la fracción A (sin glicerol) fue colocada en baño María a 36 °C; mientras la fracción B contiene el glicerol (44).

El Tris por su capacidad amortiguadora, osmótica y el ser de baja toxicidad, aun en altas concentraciones, es empleado en la criopreservación de semen, neutralizar los residuos del metabolismo espermático, principalmente del ácido láctico (45).

2.2.10 Congelación del semen

Las pajillas suelen congelarse en vapor de nitrógeno y almacenarse a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. El congelamiento demasiado rápido puede causar choque térmico y formación de hielo intracelular. Si se realiza lentamente, las concentraciones de sal aumentan a medida que el agua se congela. Este incremento en la presión osmótica durante un periodo prolongado de congelamiento puede dañar las proteínas y lipoproteínas de las células espermáticas y el acrosoma. La rapidez de congelamiento influye en la formación de cristales de hielo, y esto debe tenerse presente al elegir tal rapidez (26).

La congelación del semen debe hacerse primeramente en vapor de nitrógeno líquido, manteniendo las pajillas por veinte minutos horizontalmente sobre una rampa localizada a cuatro centímetros por encima del nivel de nitrógeno. Después de este tiempo, las pajillas deben ser sumergidos directamente en el nitrógeno líquido, distribuidos en los vasos criogénicos y almacenarlas hasta su utilización (15).

2.2.11 Descongelación del semen

Conviene recordar siempre que los recipientes para nitrógeno líquido son termos y por lo tanto deben ser tratados como tal, aunque la mayoría de los termos para nitrógeno líquido están construidos de acero inoxidable o aluminio, cualquier golpe o caída puede ocasionar que se rompa la soldadura y que se pierda de ese modo el vacío. Esto causa una pérdida rápida del nitrógeno y un termo así no se puede usar a menos que sea reemplazado (46).

Se debe tener cuidado para evitar la muerte del espermatozoide al momento del descongelamiento; pueden ser mejores temperaturas más altas ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$) en el caso de pajillas, pero esto suele depender del diluyente. La supervivencia después de descongelamiento de los espermatozoides es influida por rapidez de congelamiento y de descongelación y concentración del glicerol (26).

2.3 Definición de términos (marco conceptual)

Semen bovino

El semen es la suspensión celular líquida que contienen los gametos masculinos (espermatozoides) y las secreciones de los órganos accesorios del aparato reproductor masculino [del macho] (26).

Espermatozoide

Los espermatozoides son células alargadas conformadas de una cabeza aplanada portadora del núcleo y una cola necesario para la motilidad celular (26).

El espermatozoide es una célula altamente especializada, constituida por tres segmentos: a) Cabeza, la cual contiene el ADN, responsable del material genético masculino en la fecundación; b) Pieza intermedia, que contiene mitocondrias importantes para la producción de energía; y c) Cola, importante para la motilidad espermática (3).

Semen congelado

Cuando el semen se congela y conserva a baja temperatura (-196 °C), deteniéndose las reacciones metabólicas de los espermatozoides. Esto permite que el material seminal pueda conservarse durante largos periodos. En el proceso de congelación de semen reduce la motilidad y rompe las membranas de los espermatozoides (5).

Dilutor

El dilutor se define como el elemento que contiene las sustancias necesarias para mantener o incrementar la viabilidad espermática (47).

CAPÍTULO III

DISEÑO METODOLÓGICO

3.1 Definición de variables

Variables independientes

- Tris: Compuesto orgánico conocido como Tris (hidroximetil aminometano), sustancia altamente soluble en agua, en particular se utiliza para preparar disoluciones de tampón.
- Triladyl: Concentrado estéril para la preparación de un diluyente con yema de huevo.
- AndroMed: Diluyente sin componentes de origen animal, sin riesgo de contaminación microbiológica.

Variables dependientes

- Motilidad total: Movilidad individual del total de espermatozoides vivos.
- Motilidad progresiva rectilínea: Movilidad de los espermatozoides que se desplazan con orientación lineal tratando de mantener una dirección.
- Vitalidad espermática: Número de espermatozoides vivos, que reaccionan a la tinción eosina- nigrosina.
- Integridad de la membrana plasmática: Reacción del espermatozoide a la solución hiposmótica, se evidencia por el enrollamiento de la cola.

3.2 Operacionalización de variables

Cuadro 1. Variables e indicadores de la investigación.

Variables	Indicador	Índice
Independiente		
Tris – yema de huevo, Triladyl – yema de huevo, AndroMed	Cantidad de dilutor agregado al semen.	Relación de dilutor agregado al semen.
Dependiente		
Motilidad total	Porcentaje de espermatozoides móviles.	Movilidad de espermatozoides sobre el total de espermatozoides observados.
Motilidad progresiva rectilínea	Porcentaje de espermatozoides con movimiento rectilíneo progresivo.	Movilidad de espermatozoides sobre el total de espermatozoides contados.
Vitalidad	Número de espermatozoides vivos.	Espermatozoides vivos sobre el total de espermatozoides contados.
Integridad de la membrana plasmática	Número de espermatozoides positivos a la prueba de HOST.	Espermatozoides positivos a la prueba de HOST sobre el total de espermatozoides contados.

3.3 Hipótesis de la investigación

Hipótesis general

El dilutor Triladyl – yema de huevo es mejor que Tris –yema de huevo y AndroMed, en conservar las características espermáticas del bovino Holstein antes y después de la congelación.

Hipótesis específicas

- El dilutor Triladyl – yema de huevo mejora la motilidad total y la motilidad progresiva rectilínea de espermatozoides obtenidos del bovino Holstein antes y después de la congelación.
- El dilutor Triladyl – yema de huevo mantiene mejor la vitalidad de los espermatozoides de bovino Holstein antes y después de la congelación.
- El dilutor Triladyl – yema de huevo mejora la integridad funcional de la membrana citoplasmática de los espermatozoides de bovino Holstein antes y después de la congelación.

3.4 Tipo y diseño de la investigación

La presente investigación es de tipo experimental, consiste en someter a un objeto o grupo de individuos, a determinadas condiciones, estímulos o tratamiento (variable independiente), para observar los efectos o reacciones que se producen [variable dependiente] (48).

El diseño experimental es aquel según el cual el investigador manipula una variable experimental no comprobada, bajo condiciones estrictamente controladas. El investigador domina las condiciones bajo las cuales realiza el experimento y modifica sus variables independientes para obtener los resultados (49).

El diseño de investigación se detalla más adelante.

3.5 Población y muestra

3.5.1 Población

Se utilizó semen de un bovino Holstein de dos años de edad, perteneciente a un productor privado. El animal fue instalado en el Centro Experimental de Pachachaca de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac.

3.5.2 Muestra

El método y tamaño muestral fue por conveniencia. Se utilizó 10 colecciones de semen obtenidos con vagina artificial.

3.6 Procedimiento de la investigación

3.6.1 Localización

El experimento se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, ubicado en Patibamba Baja, distrito y provincia de Abancay del departamento de Apurímac, está localizado a 13° 38' 31. 40" Latitud Sur y 72° 53' 17. 03" Longitud Oeste, a 2180 m de altitud (50).

3.6.2 Animales y diseño experimental

Se utilizó un bovino de raza Holstein de dos años de edad clínicamente sano, alimentado principalmente con maralfalfa (*Pennisetum sp*), grama (*Cynodon dactylon*), higuerilla silvestre (*Ricinus communis*), alfalfa (*Medicago sativa*); el manejo del animal fue evitando estresar. Se formaron tres grupos de tratamiento (T), distribuidos en T1: Tris -yema de huevo; T2: Triladyl- yema de huevo; T3: AndroMed. Se colectó 10 muestras de semen, cada una se destinó se dividió para cada tratamiento, luego se evaluó la motilidad total, motilidad progresiva rectilínea, vitalidad e integridad de la membrana plasmática, antes y después de la congelación del semen.

3.6.3 Preparación de dilutores

Los ingredientes antes de su preparación fueron pesados en una balanza analítica, cada dilutor Tris y prueba de HOST (Cuadro 2, y 5).

El dilutor Tris - yema de huevo se preparó en un tubo cónico de 45 mL 12 h antes de su uso, formándose dos fracciones A y B, la fracción A contenía el dilutor base más semen, mientras la fracción B contenía el dilutor más glicerol al 5%, dicha dilución fue 4:1 es decir 4 partes de dilutor y una parte de semen a 37 °C.

Cuadro 2. Composición del dilutor Tris – yema de huevo de gallina

Componentes	Cantidad
Tris	0.36 g
Ácido cítrico	0.19 g
Glucosa	0.05 g
Penicilina	100 000 UI
Yema de huevo de gallina	2 mL
Agua destilada	8 mL

Cuadro 3. Composición del dilutor Triladyl – yema de huevo

Componentes	Cantidad
TRIS	0.5 mL
Ácido cítrico	
Azúcar	
Tampones	
Glicerina	
Antibióticos	
Agua de extrema pureza	
100 ml del diluyente preparado contienen (unidades activas)	5.7 mg
Tilosina	28.6 mg
Gentamicina	34.3 mg
Espectinomicina	17.2 mg
Lincomicina	0.5 mL
Yema de huevo de gallina	1.5 mL
Agua destilada	

Cuadro 4. Composición del dilutor AndroMed

Componentes	Cantidad
Fosfolípidos	0.5 mL
TRIS	
Ácido cítrico	
Azúcares	
Antioxidantes	
Tampones	
Glicerina	
Agua de altísima pureza	
Antibióticos	
Tilosina	
Gentamicina	
Espectinomomicina	
Lincomicina	
Agua destilada	2 mL

3.6.4 Colección del semen

La etapa pre experimental consistió en la construcción de un brete, el traslado y la adaptación del semental al Centro Experimental, el periodo de entrenamiento y acostumbamiento a la vagina artificial fue alrededor de dos meses.

La etapa experimental consistió en la colección de semen dos veces por semana con intervalo de 8 a 9 horas, utilizando una vaca para simular la falsa monta. Antes de cada colección, se realizó el lavado y secado del prepucio, para evitar la contaminación del semen al momento de la colección. Se usó la vagina artificial que cuenta con un tubo rígido de goma con válvula, cono tubular de látex con extremos enrollados, cono de colección de látex y tubo de colección. Se añadió agua a 42 °C y aire a presión.

3.6.5 Evaluación del semen

El semen fue rotulado y transportado desde el lugar de colección hasta el laboratorio en un termo a 37 °C.

3.6.5.1 Evaluación macroscópica del semen

a) Color

Mediante la observación visual el color del semen, blanco lechoso en todas sus extracciones.

b) Volumen

El volumen se midió en el mismo tubo de colección, el mínimo fue 5 mL llegando a extraer un máximo 7.5 mL.

3.6.5.2 Evaluación microscópica del espermatozoide

a) Motilidad total

La evaluación de la motilidad total espermática consistió en el conteo del total de espermatozoides vivos. Se mezcló 5 uL de semen con 10 uL de suero fisiológico al 0.9%, en viales de 2 mL, homogenizada la muestra luego se aspiró 0.5 uL, se colocó una gota de semen sobre un portaobjetos previamente calentado a 37 °C, a continuación, se cubrió con cubreobjetos y se observó al microscopio (objetivo 40x). Para el conteo de los espermatozoides se utilizó una Tablet para poder grabar 4 diferentes campos microscópicos, realizando el conteo en los videos. La motilidad total, fue considerada cuando los espermatozoides tenían cualquier movimiento, la cual se expresó en porcentaje.

b) Motilidad progresiva rectilínea

Se siguió el mismo procedimiento que la motilidad total. Con la diferencia de que en la motilidad progresiva rectilínea se observó movimientos con tendencia recta que atraviesa el campo microscópico.

c) Vitalidad espermática

La cantidad de espermatozoides vivos y muertos, se obtuvo utilizando la tinción Eosina al 5% y Nigrosina al 10%, donde se emplearon dos gotas de Eosina y una gota de Nigrosina en dos gotas de semen, homogenizando suavemente. Sobre la lámina portaobjetos mantenida a 37 °C se realizó el frotis y se dejó secar al ambiente.

Luego, se observó en el microscopio óptico a un aumento de 100X, se contó 200 células espermáticas considerando muertas aquellas coloreadas y vivas aquellas que no absorbieron el colorante.

d) Evaluación de la funcionalidad de la membrana espermática

En el Cuadro 5, se muestra la composición química y cantidad de solución hiposmótica.

Se preparó la solución de HOST 0.9 mL, a una temperatura de 37 °C, a la cual se agregó 0.1 mL de semen diluido con los dilutores correspondientes (Tris – yema de huevo, Triladyl- yema de huevo y AndroMed) manteniéndose por 45 minutos, luego, se añadió 0.1 mL de formaldehído al 4%. Se contó 200 células espermáticas por microscopía a 100X, considerando positivo a las células espermáticas que presentaron enrollamiento a nivel de la cola.

Cuadro 5. Composición de la solución hiposmótica (HOST)

Componentes	Cantidad
Citrato de sodio	0.04 g
Fructosa	0.09 g
Agua destilada	10 mL

3.6.6 Enfriamiento del semen

Se colocó a refrigeración por cuatro horas a 4.5 °C, envueltas con algodón y colocadas en un recipiente hasta su equilibramiento. Luego se unió las dos fracciones A y B en el dilutor Tris.

3.6.7 Empajillado

Se utilizó pajuelas de 0.25 mL, rotuladas y enfriadas. El llenado de las pajuelas fue manualmente, se selló con alcohol polivinílico en el extremo libre para quedar sellada y ser impermeable.

3.6.8 Congelamiento del semen

El congelamiento se realizó en una caja de poliestireno, con contenido de nitrógeno líquido a cuatro cm. Se colocó una rejilla con área ligeramente menor que la caja, para colocar las pajuelas previamente secadas con papel toalla a una altura de cuatro cm del nivel nitrógeno líquido, después de 15 minutos se sumergió las pajuelas al nitrógeno líquido para su congelación, las pajuelas son colocadas en globets, porta globets y finalmente en las

canastillas para ser almacenadas en el tanque criogénico a una temperatura de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta su descongelación.

3.6.9 Descongelación del semen

La descongelación se realizó después de cuatro días, a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, por un minuto, una vez descongelada se procedió a realizar la evaluación microscópica siguiendo el mismo procedimiento que se menciona antes de la congelación.

3.6.10 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa del sistema de análisis estadístico (SAS) v 9.4. Las variables de respuesta al principio se comprobaron la normalidad mediante la prueba Shapiro-Wilk que fue a través del procedimiento UNIVARIATE, luego se transformaron los datos a arcoseno. Luego, se realizó el análisis de varianza mediante el Modelo Lineal General bajo diseño completamente al azar. La comparación de medias se realizó con la prueba de Tukey determinando la significancia ($P \leq 0.05$) entre grupos.

3.7 Material de la investigación

Materiales biológicos

Un toro Holstein

Una vaca Criolla

Semen del toro

Huevo fresco de gallina

Materiales de campo

Vagina artificial

Funda cónica

Funda recta

Liga o tiras de jebe

Tubo de colecta

Termómetro

Materiales de laboratorio

Cubre y portaobjetos

Gradillas

Tubos cónicos de plástico de 15 y 45 mL

Pajuela

Agua bidestilada

Solución fisiológica 0.9%

Frascos

Alcohol polivinilico en polvo

Alcohol 70°

Cámara de Newbahuer

Equipos

Baño María

Tanque criogénico

Refrigerador

Microscopio

Balanza analítica

Platina térmica para microscopio

Dilutores

Tris - yema de huevo (Tris, glucosa, ácido cítrico)

Triladyl – yema de huevo

AndroMed

Reactivos

Eosina 5%

Nigrosina 10%

Formol 4%

Glicerol

Solución hiposmótica

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1. Motilidad total

Los resultados de la motilidad total de espermatozoides, antes y después de la congelación del semen de toro, se muestra en el Cuadro 6. Esta motilidad, entre los dilutores Tris – yema de huevo, Triladyl – yema de huevo y AndroMed antes de la congelación fueron similares ($P > 0.05$). El dilutor Triladyl – yema de huevo presentó mayor ($P \leq 0.05$) motilidad total que los dilutores Tris – yema de huevo y AndroMed, después de la congelación del semen bovino.

Cuadro 6. Porcentaje de motilidad total de espermatozoides de toro Holstein (media \pm desviación estándar) diluidos con Tris-yema de huevo, Triladyl – yema de huevo y AndroMed, evaluados antes y después de la congelación.

	Dilutores		
	Tris-YH	Triladyl-YH	AndroMed
Semen fresco	78.0 \pm 4.9 ^a	80.7 \pm 4.9 ^a	76.7 \pm 4.9 ^a
Semen post congelado	39.7 \pm 1.9 ^a	41.8 \pm 3.6 ^b	76.7 \pm 4.9 ^a

^{ab} Valores con superíndices diferentes dentro de la fila expresan diferencia ($P \leq 0.05$).

YH= yema de huevo.

Los resultados sobre motilidad total espermática, encontrados en el presente estudio defieren con los reportes de Palacios (20) quien encontró para AndroMed 89%, Triladyl – yema de huevo 88%, Gallardo *et al.* (22) encontraron con AndroMed 82%, y Triladyl – yema de huevo 67%, ambos señalan mejor resultado para AndroMed, posiblemente debido a su facilidad de conteo espermático por no contener partículas de yema de huevo, en comparación con el dilutor Triladyl – yema de huevo. Así mismo, Cruz (19) reporta 70% con el dilutor Triladyl – yema de huevo y Tris.- yema de huevo; González *et al.* (51) con Tris – yema de huevo 79.5% \pm 6.43; por otro lado, Ramón (52) encontró 83% de motilidad total en semen fresco.

Los resultados del presente experimento, presentan mayor motilidad total con el dilutor Triladyl – yema de huevo respecto a los dilutores Tris- yema de huevo y AndroMed en semen post descongelado. Siendo similares estos resultados de motilidad total con los

reportes de Gallardo *et al.* (22) quienes manifiestan que el dilutor Triladyl – yema de huevo resulta mejor después de la congelación con un 39%; Ramónéz (52) con Triladyl – yema de huevo, 46.50%; Carballo *et al.*(18) con Triladyl – yema de huevo, 40.7%; Cruz (19) utilizando Triladyl – yema de huevo, 40%; Palacios (20) con AndroMed, 33%; Gamal *et al.* (53) reportaron con Tris – yema de huevo, 41%; Stradaioli *et al.* (54) con Tris – yema de huevo, 41.8%.

Thun *et al.* (55) después de considerar varios factores, como la preparación de los dilutores, la temperatura del medio ambiente, concluye que los dilutores a base a yema de huevo presentan mejor calidad de semen y mayor fertilidad a la hora de la inseminación. Asimismo, se encontró valores superiores a los resultados del presente estudio, Mejía (56) reporta en caso de AndroMed 39.7%; Murphy *et al.* (57) indican para AndroMed 41.9%; también González *et al.* (51) mencionan con Tris – yema de huevo 68.5%. El dilutor a base de lecitina de soja, a la observación en microscopio, es menos viscosa en comparación a dilutores que contienen yema de huevo (58). Sin embargo, se encontró valores inferiores que los reportes del presente estudio, esto posiblemente se deba a que utilizaron para la evaluación seminal el sistema CASA (análisis de semen asistido por computadora). Palacios (20) encontró con el dilutor Triladyl – yema de huevo 19%, indica que dicho resultado se debió a que las partículas de yema de huevo dificultaron la observación. Gallardo *et al.*(22) con AndroMed reportaron 21%; Carballo *et al.* (18) encontraron con AndroMed 28%; además, mencionan que es más fácil trabajar con el dilutor AndroMed, debido a que permite una mayor visibilidad en el microscopio, también la preparación es fácil al no poseer ingredientes de origen animal. Mientras Cruz (19) encontró 37% utilizando Triladyl- yema de huevo, a su vez con Tris – yema de huevo 20%. Molinia (59) menciona que la motilidad después de la congelación se reduce en un 40 a 50%. La utilización del dilutor Tris es ampliamente utilizado; sin embargo, su uso implica riesgo higiénico y escasa visibilidad en el examen microscópico (60).

4.2 Motilidad progresiva rectilínea

Los resultados de la motilidad progresiva rectilínea se muestran en el Cuadro 7. No hay diferencia significativa ($P > 0.05$) de la motilidad progresiva rectilínea entre los dilutores Tris – yema de huevo, Triladyl – yema de huevo y AndroMed antes de la congelación. Hay diferencia ($P \leq 0.05$) de motilidad progresiva rectilínea con el dilutor Triladyl – yema de

huevo, seguido de Tris – yema de huevo y AndroMed después de la congelación del semen bovino.

Cuadro 7. Porcentaje de motilidad progresiva rectilínea de espermatozoides de bovino Holstein (media \pm desviación estándar) diluidos con Tris-yema de huevo, Triladyl – yema de huevo y AndroMed, evaluados antes y después de la congelación.

	Dilutores		
	Tris-YH	Triladyl-YH	AndroMed
Semen fresco	58.6 \pm 4.8 ^a	60.7 \pm 2.9 ^a	57.5 \pm 3.6 ^a
Semen post congelado	25.6 \pm 1.7 ^a	26.8 \pm 2.2 ^b	23.3 \pm 1.6 ^a

^{ab} Superíndices diferentes dentro de la fila expresan diferencia ($P \leq 0.05$), YH= yema de huevo.

La motilidad progresiva rectilínea en esta investigación antes de la congelación no presentó diferencia significativa entre los dilutores. Gallardo *et al.* (22) reportan resultados para AndroMed 73%, Triladyl – yema de huevo 41%, Palacios (20) para AndroMed 82% y Triladyl – yema de huevo 78%, González *et al.* (51) con Tris – yema de huevo encontraron 74.5%, estos resultados son superiores a los encontrados en el presente estudio, esta diferencia probablemente se atribuya a factores de la evaluación espermática y otros.

En la evaluación de la motilidad progresiva rectilínea después de la congelación se muestran valores diferentes entre Triladyl – yema de huevo, Tris - yema de huevo y AndroMed, estas diferencias concuerdan con lo señalado por Gallardo *et al.* (22) Triladyl 22% y AndroMed 16% aunque los valores son inferiores. Mejía (56) encontró valores superiores, AndroMed 29.3% en toros criollos analizados con el sistema CASA, mientras con el microscopio convencional 46.3%. Por otro lado, Palacios (20) encontró con AndroMed 25%, Triladyl – yema de huevo 10% analizados por el sistema CASA, indica que resultó complicado el trabajo con el dilutor Triladyl – yema de huevo por la presencia de partículas de yema de huevo. González *et al.* (51) con dilutor Tris – yema de huevo 67.5% reportaron resultados superiores.

4.3 Vitalidad

Los resultados de vitalidad de espermatozoides antes y después de la congelación se muestran en el Cuadro 8. No hubo diferencia ($P > 0.05$) en el porcentaje de vitalidad, entre los dilutores Tris – yema de huevo, Triladyl y AndroMed antes de la congelación del semen.

Existe diferencia significativa ($P \leq 0.05$) en la vitalidad con el dilutor Triladyl – yema de huevo seguido de Tris – yema de huevo y AndroMed post congelación del semen.

Cuadro 8. Porcentaje de vitalidad de espermatozoides de bovino Holstein (media \pm desviación estándar) diluidos con Tris-yema de huevo, Triladyl – yema de huevo y AndroMed, evaluados antes y después de la congelación.

	Dilutores		
	Tris-YH	Triladyl-YH	AndroMed
Semen fresco	84.5 \pm 3.5 ^a	85.8 \pm 4.6 ^a	82.5 \pm 4.7 ^a
Semen post congelado	57.7 \pm 2.9 ^a	59.8 \pm 3.4 ^b	48.4 \pm 3.0 ^a

^{ab} Superíndices diferentes dentro de la fila expresan diferencia ($P \leq 0.05$), YH= yema de huevo.

Damas (9) reportó la vitalidad espermática en bovinos Holstein 84.53%, Ramónéz (52) menciona 84.67% antes de la congelación, López *et al.* (46) indican 82.6% , los valores reportados son similares a los que se encontraron en este estudio con semen fresco.

El análisis de vitalidad espermática en la evaluación después de la congelación demostró que Triladyl – yema de huevo presentó mejores características del crioprotector, seguido por Tris- yema de huevo y AndroMed, posiblemente el Triladyl – yema de huevo es el dilutor que mejores condiciones de crioprotección brinda al momento de la congelación y descongelación de la pajueta. Ramónéz (52) reporta resultados similares, con Triladyl – yema de huevo 51.8%. López *et al.* (46) con Triladyl – yema de huevo 59.3%. Mejía (56) con AndroMed 53.8% en toros criollos. Los dilutores a base de yema de huevo da como resultado una mayor supervivencia y longevidad espermática (61). Los crioprotectores más utilizados en la congelación del semen de toro son glicerol más yema de huevo, los cuales se encargan de proteger a los espermatozoides durante el proceso de congelación (62). Sin embargo, otros estudios reportan valores superiores como González *et al.* (51) con dilutor Tris – yema de huevo 74.2%, Damas (9) reporta con AndroMed 63.47%. Por otro lado, también se encontraron resultados inferiores, reportados por Gallardo *et al.* (22) donde señalan con Triladyl – yema de huevo 37%, AndroMed 19%, el uso de productos de origen animal, como la yema de huevo, utilizados en la congelación de semen conlleva un riesgo de contaminación microbiológica y puede ser motivo de preocupación por la posible

transmisión de patógenos (63), esto posiblemente influya para los resultados inferiores reportados en caso del dilutor Triladyl – yema de huevo. La composición del extensor, la temperatura, el protocolo de congelación, la congelación individual afecta la viabilidad de los espermatozoides (64).

4.4 Integridad funcional de la membrana plasmática (HOST)

Los resultados de la integridad funcional de la membrana plasmática del espermatozoide se muestran en el Cuadro 9. No hay diferencia ($P > 0.05$) en el porcentaje de endósmosis espermática, entre los dilutores Tris – yema de huevo, Triladyl y AndroMed, antes de la congelación de semen. El dilutor Triladyl presentó mayor ($P \leq 0.05$) porcentaje de integridad funcional de la membrana plasmática que los dilutores Tris – yema de huevo y AndroMed después de la congelación del semen bovino Holstein.

Cuadro 9. Porcentaje de espermatozoides positivos a la prueba de endosmosis (HOST) en espermatozoides de bovino Holstein (media \pm desviación estándar) diluidos con Tris-yema de huevo, Triladyl y AndroMed, evaluados antes y después de la congelación.

	Dilutores		
	Tris-YH	Triladyl-YH	AndroMed
Semen fresco	82.1 \pm 3.9 ^a	83.0 \pm 4.7 ^a	79.0 \pm 4.7 ^a
Semen post congelado	51.5 \pm 2.2 ^a	53.8 \pm 3.3 ^b	44.4 \pm 2.8 ^a

^{ab} Superíndices diferentes dentro de la fila expresan diferencia ($P \leq 0.05$), YH= yema de huevo.

Frecuentemente la evaluación de endósmosis se realiza con semen fresco. Damas (9) encontró valores de endósmosis en semen fresco en bovinos Holstein 80.44%; López *et al.* (46) 77.9%, dichos resultados son semejantes a los encontrados en el presente estudio.

La respuesta de los espermatozoides a la endósmosis positiva, luego de la congelación, el dilutor Triladyl –yema de huevo fue mejor, seguido por Tris – yema de huevo, AndroMed, resultado similar fue reportado por Damas (9) para AndroMed 45.93%. La diferencia entre los dilutores se debe porque tanto Triladyl – yema de huevo y Tris – yema de huevo contienen yema de huevo, el cual es un crioprotector que preserva mejor las características espermáticas (5). Mientras López *et al.* (46) con Triladyl – yema de huevo 60%, González *et al.* (51) con Tris – yema de huevo 64%, que son superiores a los encontrados en el

presente estudio. Otros reportes, como de Vergara *et al.* (65) menciona 38.28% con dilutor Triladyl – yema de huevo.



CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- La motilidad total y motilidad progresiva rectilínea espermática del toro Holstein, después de la congelación, resultaron mejores con el dilutor Triladyl –yema de huevo en comparación con Tris – yema de huevo y AndroMed.
- La vitalidad espermática, post descongelación del semen del toro Holstein, fue mejor con el diluyente Triladyl – yema de huevo en contraste con el dilutor Tris- yema de huevo y AndroMed.
- La funcionalidad de la membrana plasmática espermática, post congelación de semen del toro Holstein, fue mejor con el diluyente Triladyl – yema de huevo que con el dilutor Tris- yema de huevo y AndroMed.
- La motilidad total, motilidad progresiva rectilínea, vitalidad y la prueba de permeabilidad de la membrana plasmática del espermatozoide, evaluados con semen fresco del toro, fueron similares.

5.2 Recomendaciones

- Evaluar el uso de yema de huevo fresco puesta del día a diferentes concentraciones, en los dilutores Triladyl – yema de huevo y Tris – yema de huevo en la criopreservación de semen bovino.
- Probar diferentes concentraciones de preparación del diluyente Triladyl – yema de huevo y Tris – yema de huevo en la evaluación de características espermáticas.
- Evaluar la capacidad fecundante del semen después de la congelación, en los programas de inseminación artificial bovina.

Referencias bibliográficas

1. Gómez V, Migliorisi A L. Protocolo para la evaluación de semen en rumiantes. Sitio Argentino Prod Anim [Internet]. 2002;1–9. Available from: http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/cria_toros/49-ProtocoloEvalSemen.pdf.
2. Olegario C, Tamargo C, Diez C. Análisis del semen bovino [Internet]. Boletín informativo del SERIDA. 2005. p. 39–43. Available from: <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2794872&orden=181848&info=link>.
3. Galina C, Valencia J. Reproducción de animales domésticos. 3a ed. LIMUSA, editor. México; 2008.
4. Rubio JL, Quintero AA, Gonzáles DM. Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática en espermatozoides de toro. Rev Científica [Internet]. 2009 [cited 2018 Nov 7];19, N° 4,. Available from: <http://www.redalyc.org/html/959/95911613010/>.
5. Aisen EG. Reproducción ovina y caprina. Inter-médica, editor. Buenos Aires - Argentina; 2004.
6. Hernández C. Tipos de diluyentes en la inseminación artificial [Internet]. Engormix. 2012. Available from: <https://es.slideshare.net/kibaultor/tipos-de-diluyentes-en-la-inseminacion-artificial>.
7. Rangel LE, Alarcón MA, Galina C, Balcazar JA, Porras AI, Valencia J, et al. Manual de prácticas de reproducción animal. In: Porras AI, Rosa M. Páramo, editors. 1a ed. 2009.
8. Lozano H. Factores que afectan la calidad seminal en toros. Rev Medica Vet Zootec [Internet]. 2009 [cited 2018 Nov 30];59(1):258–72. Available from: <http://bdigital.unal.edu.co/18118/1/13860-41306-1-PB.pdf>.
9. Damas RE. Evaluación de dos dilutores comerciales en semen congelado de toros en el Banco Nacional [Internet]. Universidad Nacional del Centro del Perú; 2010 [cited 2018 Nov 12]. Available from: <http://repositorio.uncp.edu.pe/bitstream/handle/UNCP/2895/DamasHuaman.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
10. Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Anim Reprod Sci



- [Internet]. 2000 [cited 2018 Nov 28];60–61:481–92. Available from: www.elsevier.com/locate/ranireprosci.
11. Ávila LM, Madero JI, López C, León MF, Acosta L, Gómez C, et al. Fundamentos de Criopreservación. *Rev Colomb Obstet Ginecol*. 2006;57:291–300.
 12. Galarza A. 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. Universidad de Cuenca; 2013.
 13. Giraldo Giraldo J. Una mirada al uso de la inseminación artificial en bovinos. *Rev Lasallista Investig*. 2007;4(1):51–7.
 14. Robson C, Aguilar D, López S, Calvi M, Cerlser R, Flores F, et al. Inseminacion Artificial. 2004;530. Available from: http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/inseminacion_artificial/188-Inseminacion_2004.pdf
 15. Vale WG. Avances biotecnológicos en reproducción de búfalos. *Tecnología*. 2011;24:89–104.
 16. Maqueda L. Conservación de la calidad del Semen: Diluyentes, Empaque, Temperatura y Transporte [Internet]. Engormix. 2004. p. 8. Available from: <https://www.engormix.com/porcicultura/articulos/conservacion-semen-diluyentes-empaque-temperatura-y-transporte-t25879.htm>.
 17. Galarza DA, Serpa VG, Torres CS. Comparación de dos medios para congelar semen de toro y la influencia de tres tiempos de equilibración en la calidad post-descongelación [Internet]. 2015 [cited 2018 Nov 30]. Available from: [http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/23817/1/Actas_Producción Animal_20.pdf](http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/23817/1/Actas_Producción_Animal_20.pdf).
 18. Carballo DM, Canseco R, García R, Montiel F. Comparación de dos diluyentes comerciales para criopreservar semen de bovino bajo condiciones de campo en el trópico húmedo. In: *Avances en la Investigación Agrícola, Pecuaria, Forestal y Acuícola en el Trópico Mexicano 2009*. 1a ed. 2009. p. 361.
 19. Cruz D. Estudio comparativo de 3 diluyentes (Tris, Citrato de sodio y Triladyl) en el procesamiento de semen bovino [Internet]. Universidad Autónoma Agraria “Antonio

- Narro”; 2014 [cited 2018 Nov 12]. Available from: [http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/3781/T20276 Cruz Solis%2C Diego TESIS.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/3781/T20276_Cruz_Solis%2C_Diego_TESIS.pdf?sequence=1&isAllowed=y).
20. Palacios LF. Evaluación de dos diluyentes caseros y un diluyente comercial para criopreservar semen bovino de las razas Brown swiss y pauta (*Bos taurus*) en el trópico húmedo. [Internet]. Universidad de las Fuerzas Armadas; 2015 [cited 2018 Nov 12]. Available from: <http://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/21000/10230/T-ESPE-002713.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
 21. Romero A. Efecto de dos dilutores en la conservación de la integridad de la membrana plasmática en semen refrigerado y congelado de toros del Banco Nacional de Semen [Internet]. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco; 2016 [cited 2018 Nov 12]. Available from: <http://repositorio.unsaac.edu.pe/bitstream/handle/UNSAAC/1768/253T20160629.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
 22. Gallardo JO, Vargas CA. Evaluación de tres diluyentes para criopreservar semen de bovino de toros cruce Sahiwal (*Bos taurus*) en el trópico húmedo [Internet]. Universidad de la Fuerzas Armadas; 2015 [cited 2018 Nov 13]. Available from: <http://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/21000/9589/T-ESPE-002711.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
 23. Catena M, Cabodevila J, Taurus I. Evaluación de semen bovino congelado. Sitio Argentino Prod Anim [Internet]. 1999 [cited 2018 Nov 27]; Available from: www.produccion-animal.com.ar.
 24. Morillo M, Salazar S, Castillo E. Evaluación del potencial reproductivo del macho bovino [Internet]. 2012 [cited 2018 Nov 7]. 63 p. Available from: <https://es.calameo.com/read/004500310f999b934c680>.
 25. Arieta R de J, Figueroa JA, Menchaca J. Métodos de Extracción de Semen Bovino. REDVET Rev Electrónica Vet. 2014;15 N° 05(ISSN 1695-7504).
 26. Hafez E, Hafez B. Reproducción e Inseminación Artificial. 7ma ed. Mc Graw Hill, editor. 2002. 519 p.

27. Climent S, Sarasa M, Domínguez L, Muniesa P, Terrado J. Manual de anatomía y embriología de los animales domésticos. Acribia S.A., editor. Zaragoza- España; 1998.
28. Moore K. Embriología clínica. 7ma ed. A. EES, editor. Madrid - España; 2007.
29. Noden D, Lahunta A de. Embriología de los animales domésticos. ACRIBIA, editor. España; 1990.
30. Betancourt LA, Bernal JL. Comparación del efecto de los porcentajes de inclusión de proteína en el diluyente de Triladyl sobre la motilidad individual y vitalidad espermática en el semen bovino criopreservado [Internet]. Universidad de Cundinamarca; 2017 [cited 2018 Nov 9]. Available from: <http://repositorio.ucundinamarca.edu.co:8080/xmlui/handle/123456789/859>.
31. Mellisho E. Evaluación de calidad seminal. 2010.
32. Muñoz SB. Congelación de semen de Pudú (*pudu pudu*): Efecto de los diluyentes Tris y leche SB sobre semen diluido. Universidad Austral de Chile; 2008.
33. Toro AI. Espermograma. Med Lab. 2009;15.
34. Tello ER. Efecto del diluyente sobre la viabilidad espermática para la conservación de semen a diferentes temperaturas en caninos. Universidad Tecnica de Ambato; 2015.
35. Campi S, González L, Blasi C, Suhevic J, Bonet S, Cisale H. Comparación entre distintos tiempos de lectura en el test de endósmosis.
36. Vazquez JM, Martinez EA, Martinez P, Garcia-Artiga C, Roca J. Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analysing the sperm membrane. Theriogenology. 1997 Mar;47(4):913–22.
37. Ducci M, Gazzano A, Villani C, Cela V, Artini PG, Martelli F, et al. Membrane integrity evaluation in rabbit spermatozoa. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2002 Apr 10;102(1):53–6.
38. Medeiros CMO, Forell F, Oliveira ATD, Rodrigues JL. Current status of sperm cryopreservation: Why isn't it better? Theriogenology [Internet]. 2002 Jan [cited 2018 Nov 28];57(1):327–44. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X01006744>.

39. Minitube. Manual AndroMed. 2005.
40. Minitube. AndroMed ® Diluyente sin yema de huevo para Semen Bovino. 2010.
41. Copyright Anditecnica. ANDITECNICA (Andina de tecnologías) [Internet]. 2019. Available from: <https://www.anditecnica.com/bovino.html>.
42. Minitube. Manual Triladyl ® Diluyente de Semen Bovino. 2012.
43. Mosquera RV. Marcadores moleculares y la extracción de ADN molecular Markers and the DNA extraction. Faacultad Ciencias Agropecu. 2005;3(1):14–8.
44. Medina VM, Sanchez E, Velasco YM, Cruz PE. Crioconservación de semen bovino usando un congelador programable (CL-8800) y determinación de su calidad postdescongelación por medio de un sistema de análisis espermático asistido. Rev Orinoquia [Internet]. 2007;11(1):75–86. Available from: <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/896/89611108.pdf>.
45. Salamon S, Maxwell WMC. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. Anim Reprod Sci. 1995;38(1–2):1–36.
46. López NC, Rivera DE. Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática en espermatozoides de toro [Internet]. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano Honduras; 2015 [cited 2018 Nov 7]. Available from: <https://bdigital.zamorano.edu/handle/11036/4596>.
47. Illera M. Reproducción de los animales domésticos. Editorial Aedos, editor. España; 1994.
48. Arias FG. El Proyecto de Investigación. Introducción a la metodología científica [Internet]. 6ta ed. Episteme, editor. 2006. Available from: <http://es.scribd.com/doc/58350075/PRESENTACION-FIDIAS-G-ARIAS>.
49. Palella S, Martins F. Metodología de la investigación cuantitativa [Internet]. 3a ed. FEDUPEL, editor. 2012. Available from: <https://metodologiaecs.wordpress.com/2015/09/06/metodologia-de-la-investigacion-cuantitativa-3ra-ed-2012-santa-palella-stracuzzi-y-feliberto-martins-pestana-2/>.
50. Google E. Google Earth [Internet] [Internet]. Internet. 2019. Available from:

[https://earth.google.com/web/@-](https://earth.google.com/web/@-72.88803149,2295.33450139a,25.22413793d,35y,192.68380799h,0t,0r/data=ClkaVxJR) 13.64187874,-
72.88803149,2295.33450139a,25.22413793d,35y,192.68380799h,0t,0r/data=ClkaVxJR

51. González AK, Pallares JD. Eficiencia comparativa entre dos diluyentes para la criopreservación de semen en toros Brahmán en el departamento de Antioquia. Universidad de la Salle; 2013.
52. Ramón JC. Evaluación de dos agentes crioprotectores no permeables y un diluyente comercial (Triladyl) en la congelación de semen bovino. Universidad de Cuenca; 2013.
53. El-Sisy GA, El-Nattat WS, El-Sheshtawy RI, Abo El-Maaty AM. Substitution of egg yolk with different concentrations of soybean lecithin in tris-based extender during bulls' semen preservability. *Asian Pacific J Reprod* [Internet]. 2016 Nov 1 [cited 2018 Nov 9];5(6):514–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2305050016301816>.
54. Stradaioli G, Noro T, Sylla L, Monaci M. Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: Comparison between two extenders. *Theriogenology* [Internet]. 2007 Apr [cited 2018 Dec 2];67(7):1249–55. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X07000325>.
55. Thun R, Hurtado M, Janett F. Comparison of Biociphos-Plus® and TRIS-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. *Theriogenology* [Internet]. 2002 Feb [cited 2018 Nov 9];57(3):1087–94. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X0100704X>.
56. Mejía JE. Evaluación pre y post congelación del semen obtenido con vagina artificial y electroeyaculador en el ganado criollo. 2014;1–135.
57. Murphy EM, O'Meara C, Eivers B, Lonergan P, Fair S. Comparison of plant- and egg yolk-based semen diluents on in vitro sperm kinematics and in vivo fertility of frozen-thawed bull semen. *Anim Reprod Sci* [Internet]. 2018 Apr [cited 2018 Dec 2];191:70–5. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432018300174>.
58. Aires VA, Hinsch K-D, Mueller-Schloesser F, Bogner K, Mueller-Schloesser S, Hinsch E. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology* [Internet]. 2003 Jul [cited 2018

- Nov 9];60(2):269–79. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X02013699>.
59. Molinia FC, Evans G, Maxwell WMC. Incorporation of penetrating cryoprotectants in diluents for pellet-freezing ram spermatozoa. *Theriogenology*. 1994;42(5):849–58.
60. Singh A, Singh V, Narwade B, Mohanty T, Atreja S. Comparative Quality Assessment of Buffalo (*Bubalus bubalis*) Semen Chilled (5°C) in Egg Yolk- and Soya Milk-Based Extenders. *Reprod Domest Anim* [Internet]. 2011 Aug [cited 2019 Sep 20];47(4):596–600. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1439-0531.2011.01928.x>.
61. Muiño R, Fernández M, Peña A. Post-thaw Survival and Longevity of Bull Spermatozoa Frozen with an Egg Yolk-based or Two Egg Yolk-free Extenders after an Equilibration Period of 18 h. *Reprod Domest Anim* [Internet]. 2007 Jun [cited 2019 Sep 20];42(3):305–11. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1439-0531.2006.00784.x>.
62. Phillips PH, Lardy HA. A Yolk-Buffer Pabulum for the Preservation of Bull Semen. *J Dairy Sci* [Internet]. 1940 May [cited 2019 Sep 20];23(5):399–404. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030240955412>.
63. Papa F o., Felício GB, Melo CM, Alvarenga MA, Vita B de, Avanzi BR. Effect of substituting soybean lecithin for egg yolk in an extender used for the cryopreservation of stallion semen. *Anim Reprod Sci* [Internet]. 2010 Jan [cited 2019 Sep 20];121(1–2):171–2. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432010001946>.
64. Amirat L, Anton M, Tainturier D, Chatagnon G, Battut I, Courtens JL. Modifications of bull spermatozoa induced by three extenders: Biociphos, low density lipoprotein and Triladyl, before, during and after freezing and thawing. *Reproduction* [Internet]. 2005 Apr [cited 2019 Sep 19];129(4):535–43. Available from: <https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/129/4/1290535.xml>.
65. Vergara S, Germán CG, Cortez C, Gallegos J, Ruiz VM, Cadena S. Evaluación de un dilutor elaborado con jugo de Opuntia Sp., en la criopreservación de semen bovino. *Agroproductividad* [Internet]. 2016 [cited 2018 Dec 2];10:82–6. Available from: www.colpos.mx.

Anexos



Cuadro 10. Base de datos de la investigación.

Dilutor	Colección	Congelación	Motilidad progresiva rectilínea	Motilidad total	Integridad funcional de la membrana plasmática	Vitalidad
Tris	1	antes	55.1	80.5	82.5	84.1
Triladyl	1	antes	62.5	85.3	87.5	88.6
AndroMed	1	antes	59.8	84.2	85.8	88.1
Tris	2	antes	52.5	74.4	77.3	81.2
Triladyl	2	antes	63.8	89.9	91.9	93.7
AndroMed	2	antes	57.3	76.4	78.4	81.9
Tris	3	antes	60.5	79.2	85.8	88.2
Triladyl	3	antes	56.2	76.8	82.2	85.6
AndroMed	3	antes	55.8	74.2	76.9	80.4
Tris	4	antes	63.8	82.2	83.2	85.9
Triladyl	4	antes	59.3	75.6	75.9	79.9
AndroMed	4	antes	57.6	72.7	74.3	77.6
Tris	5	antes	66.4	84.2	86.3	87.6
Triladyl	5	antes	61.5	81.6	84.5	85.5
AndroMed	5	antes	56.6	75.4	78.8	82.8
Tris	6	antes	61.4	83.9	84.3	87.7
Triladyl	6	antes	65.2	84.2	85.9	90.4
AndroMed	6	antes	50.6	69.3	70.6	74.4
Tris	7	antes	56.2	73.7	82.3	85.3
Triladyl	7	antes	58.6	77.8	78.5	81.3
AndroMed	7	antes	58.6	73.1	79.6	83.6
Tris	8	antes	62.1	79.1	84.7	86.4
Triladyl	8	antes	63.1	79.2	80.7	83.6
AndroMed	8	antes	57.3	76.4	78.9	80.3
Tris	9	antes	53.5	70.7	81.5	82.3
Triladyl	9	antes	57.4	74.2	79.3	80.8
AndroMed	9	antes	62.3	85.2	87.8	90.4
Tris	10	antes	54.5	72.1	73.4	77.1
Triladyl	10	antes	59.6	82.3	83.7	88.9
AndroMed	10	antes	59.3	79.2	81.3	85.7
Tris	1	después	23.9	37.4	49.4	55.6
Triladyl	1	después	27.6	41.3	54.3	60.3
AndroMed	1	después	21.7	30.2	40.4	44.6
Tris	2	después	26.8	42.2	54.2	60.4

Triladyl	2	después	24.3	38.1	51.1	57.1
AndroMed	2	después	20.8	31.6	41.8	46.0
Tris	3	después	25.5	38.4	50.4	56.6
Triladyl	3	después	28.8	45.3	55.3	61.3
AndroMed	3	después	23.6	36.7	46.9	51.1
Tris	4	después	24.6	41.1	53.1	59.3
Triladyl	4	después	24.1	36.8	49.8	55.8
AndroMed	4	después	22.9	32.5	42.7	43.9
Tris	5	después	22.8	39.9	51.9	60.1
Triladyl	5	después	30.5	45.6	58.6	64.6
AndroMed	5	después	25.7	35.3	45.5	49.7
Tris	6	después	27.6	37.7	47.7	51.9
Triladyl	6	después	29.1	46.7	59.7	65.7
AndroMed	6	después	24.2	36.2	44.4	50.6
Tris	7	después	26.3	41.3	53.3	58.5
Triladyl	7	después	25.6	41.7	54.7	60.7
AndroMed	7	después	24.5	33.8	44.5	48.2
Tris	8	después	28.2	39.2	51.2	57.4
Triladyl	8	después	25.6	37.3	50.3	55.3
AndroMed	8	después	22.2	32.1	42.3	46.5
Tris	9	después	26.5	42.8	54.8	62.2
Triladyl	9	después	24.9	39.5	52.5	59.5
AndroMed	9	después	22.1	34.4	46.6	51.8
Tris	10	después	24.1	37.8	49.8	55.8
Triladyl	10	después	28.1	38.9	51.9	57.9
AndroMed	10	después	25.7	36.9	49.1	52.3



Figura 1. Preparación del dilutor AndroMed y Triladyl – yema de huevo.



Figura 2. Materiales utilizados para la colección del semen.



Figura 3. Colección del semen.



Figura 4. Evaluación de las características espermáticas.



Figura 5. Descongelación de pajuela.

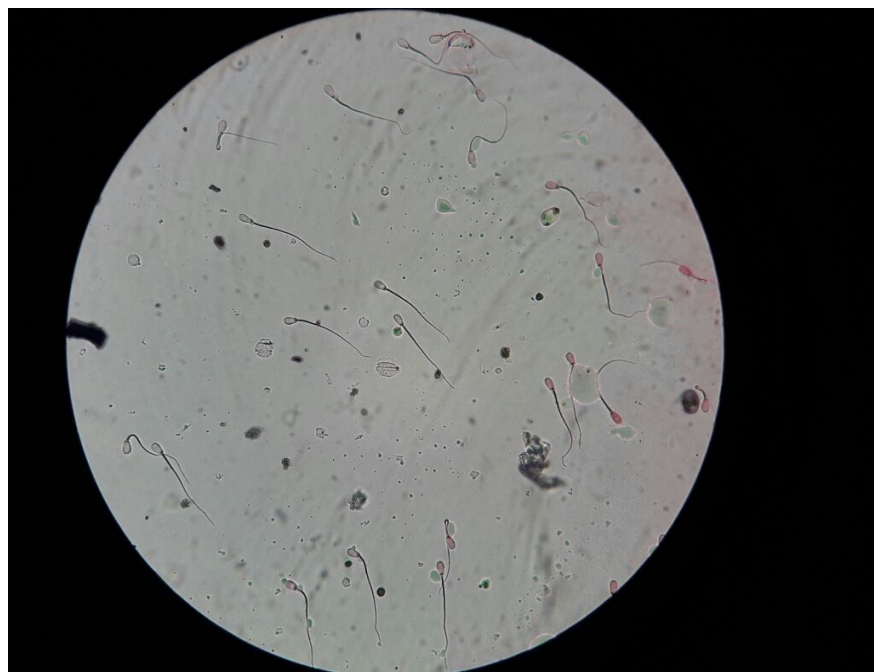


Figura 6. Evaluación de la vitalidad espermática.

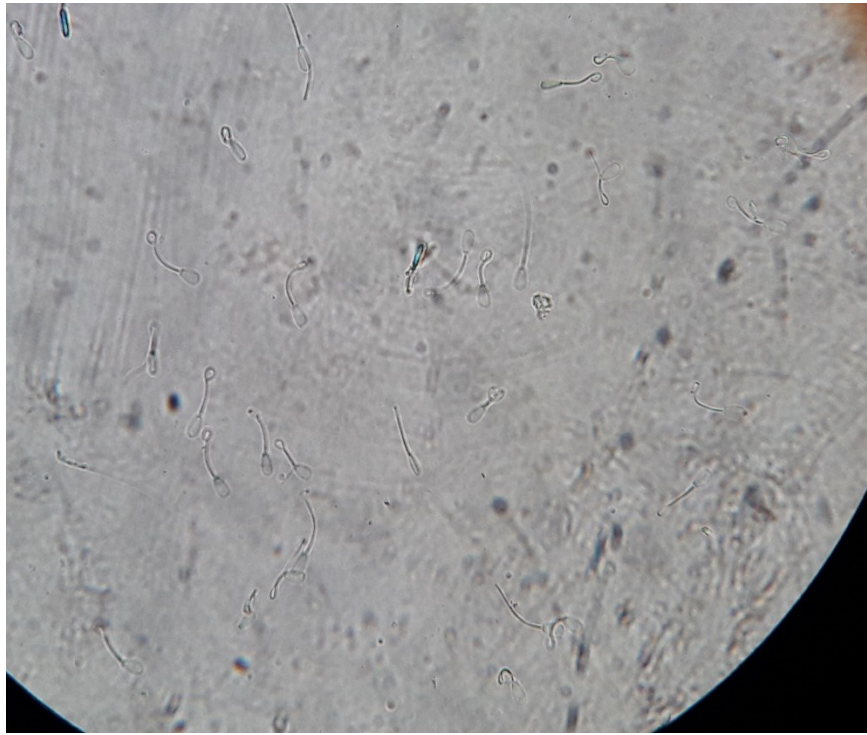


Figura 7. Evaluación de integridad funcional de la membrana citoplasmática (HOST) del espermatozoide.