

**UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE  
APURÍMAC**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

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



**EVALUACIÓN DEL DILUTOR TRIS CON YEMA DE  
HUEVO DE CODORNIZ ANTES Y DESPUÉS DE LA  
CONGELACIÓN DE ESPERMATOZOIDES  
EPIDIDIMARIOS DE TOROS CRIOLLOS  
POSTMORTEM**

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

**ANGEL FRANCO HUAMANÑAHUI DUEÑAS**

**ABANCAY - PERÚ  
2017**



**EVALUACIÓN DEL DILUTOR TRIS CON YEMA DE  
HUEVO DE CODORNIZ ANTES Y DESPUÉS DE LA  
CONGELACIÓN DE ESPERMATOZOIDES  
EPIDIDIMARIOS DE TOROS CRIOLLOS  
POSTMORTEM**

## **DEDICATORIA**

A mi madre, Laura Dueñas Sulca, y mi padre, Francisco Huamanñahui Velazque, porque con su coraje e infinito amor, hicieron que termine mis estudios de pregrado.

Esta meta, la que hoy veo culminada se las debo a ustedes amados míos, por no dejarme decaer en esos momentos de desesperanza.

A mi familia, mis hermanas, por apoyarme siempre.

A mi Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, mi gratitud eterna.

## AGRADECIMIENTO

Quiero manifestar mi sincero agradecimiento a todas las personas que entregaron su valiosa colaboración para la ejecución y finalización de este presente estudio.

A mis padres por su gran apoyo incondicional, por darme fuerzas para seguir adelante a pesar de las adversidades.

Mi más profundo agradecimiento al MC. MVZ. Ulises Sandro Quispe Gutiérrez, por su esfuerzo y dedicación quien, con sus conocimientos, su experiencia, su paciencia y su motivación ha logrado en mí que pueda culminar con éxito el presente estudio; por su rectitud en su profesión como docente, por sus consejos, que ayudan a formar como persona e investigador.

A los jurados evaluadores de la presente tesis MVZ. Victor Raúl Cano Fuentes, MSc. Delmer Zea Gonzales, MVZ. Juan Roberto Sonco Quispe.

A mi hermana Karina Bueno Dueñas, por su apoyo incondicional que me ayudó a sortear todo obstáculo y tropiezo.

A mis profesores, amigos y compañeros que de una o de otra forma colaboraron para la culminación exitosa de mis estudios.

Al Laboratorio de Reproducción Animal, por abrirme sus puertas.

**AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA  
BASTIDAS DE APURÍMAC**

**Dr. Leonardo Adolfo Prado Cárdenas**  
**RECTOR (i)**

**Mag. Mauro Huayapa Huaynacho**  
**VICERRECTOR ACADÉMICO (i)**

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

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

ASESOR



MC. Ulises Sandro Quispe Gutiérrez  
ASESOR

## **JURADO EVALUADOR**



**MVZ. Victor Raúl Cano Fuentes**  
**PRESIDENTE**



**MSc. Delmer Zea Gonzales**  
**PRIMER MIEMBRO**



**MVZ. Juan Roberto Soncco Quispe**  
**SEGUNDO MIEMBRO**

# ÍNDICE

	Pág.
<b>RESUMEN</b>	xiv
<b>ABSTRACT</b>	xv
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>II. MARCO TEÓRICO</b>	3
2.1 Antecedentes de la investigación	3
2.2. Bases teóricas	8
2.2.1. Ganado bovino Criollo	8
2.2.2. El testículo	9
2.2.3 El epidídimo	11
2.2.4 Criopreservación espermática	12
2.2.5 Dilutores del semen	14
2.2.5.1. Componentes de los dilutores	15
2.2.5.2. Dilutor Tris	16
2.2.6. Uso de yema de huevo en la criopreservación espermática	17
2.2.6.1. Yema de huevo de gallina	18
2.2.6.2. Huevo de codorniz	19
2.2.6.3. Comparación de la composición de huevos de gallina y codorniz	20
2.2.7. Fisiología de la membrana plasmática del espermatozoide	22
2.2.8. Evaluación del semen	23
2.2.8.1. Concentración espermática	24
2.2.8.2. Motilidad espermática	25
2.2.8.3. Morfología	26
2.2.8.4. Vitalidad	27
2.2.8.5. Integridad de la membrana plasmática del espermatozoide	27
2.3. Marco conceptual	28
2.3.1. Semen	28
2.3.2. Espermatozoide	29
2.3.3. Espermatozoide epididimario	29
2.3.4. Dilutor	30
2.3.5. Criopreservación	30

<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	31
3.1 Localización	31
3.2. Material biológico	31
3.3. Diseño experimental	32
3.4. Colección de espermatozoides	32
3.5. Evaluación espermática	33
3.5.1. Motilidad espermática	33
3.5.2. Vitalidad espermática	34
3.6. Preparación de dilutores y dilución	34
3.7. Enfriamiento de espermatozoides	35
3.8. Empajillado	35
3.9. Congelación	35
3.10. Descongelación	36
3.11. Análisis estadístico	36
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	37
4.1. Motilidad masal	37
4.2. Motilidad total	40
4.3. Motilidad rectilínea progresiva	43
4.4. Vitalidad	46
<b>V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>	48
<b>VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	50
<b>ANEXOS</b>	57

## ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
<b>Cuadro 1.</b> Composición química del huevo de la gallina.	18
<b>Cuadro 2.</b> Composición proximal de huevos de codorniz (g/100 g de porción comestible).	19
<b>Cuadro 3.</b> Composición de los ácidos grasos el total de lípidos de la yema de huevo de gallina y codorniz.	21
<b>Cuadro 4.</b> Composición general de la yema de huevo de gallina y de codorniz (g / 100 g de yema fresca).	21
<b>Cuadro 5.</b> Repartición de fosfolípidos de yema de huevo de gallina y de codorniz (% de fosfolípidos totales).	22
<b>Cuadro 6.</b> Composición del dilutor Tris – yema de huevo de codorniz (TYHC) o de gallina (TYHG).	35
<b>Cuadro 7.</b> Motilidad masal (media ± desviación estándar) de espermatozoides epididimarios de toros criollos colectados a postmortem con dilutor Tris - yema de huevo de codorniz y gallina en criopreservación.	38
<b>Cuadro 8.</b> Porcentaje de motilidad total (media ± desviación estándar) de espermatozoides epididimarios de toros criollos colectados a postmortem con dilutor Tris – yema de huevo de codorniz y gallina en criopreservación.	40
<b>Cuadro 9.</b> Porcentaje de motilidad rectilínea progresiva (media ± desviación estándar) de espermatozoides epididimarios de toros criollos colectados a postmortem con dilutor Tris – yema de huevo de codorniz y gallina en criopreservación.	44
<b>Cuadro 10.</b> Porcentaje de vitalidad (media ± desviación estándar) de espermatozoides epididimarios de toros criollos colectados a postmortem con dilutor Tris – yema de huevo de codorniz y gallina en criopreservación.	46
<b>Cuadro 11.</b> Análisis de varianza para motilidad masal de espermatozoides epididimarios de toros criollos postmortem.	67
<b>Cuadro 12.</b> Análisis de varianza para motilidad total de espermatozoides epididimarios de toros criollos postmortem.	67
<b>Cuadro 13.</b> Análisis de varianza para motilidad rectilínea progresiva de espermatozoides epididimarios de toros criollos postmortem.	68

**Cuadro 14.** Análisis de varianza para vitalidad de espermatozoides epididimarios de toros criollos postmortem. 68

**Cuadro 15.** Base de datos de las variables de estudio de espermatozoides epididimarios de toros criollos postmortem. 69

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Motilidad masal de espermatozoides epididimarios de toros criollos colectados a postmortem, utilizando dilutor Tris - yema de huevo de codorniz al 15 y 20% (TYHC), Tris - yema de huevo de gallina al 20% (TYHG) antes y después de la congelación.	38
<b>Figura 2.</b> Motilidad total de espermatozoides epididimarios de toros criollos colectados a postmortem, utilizando dilutor Tris - yema de huevo de codorniz al 15 y 20% (TYHC), Tris - yema de huevo de gallina al 20% (TYHG) antes y después de la congelación.	41
<b>Figura 3.</b> Motilidad rectilínea progresiva de espermatozoides epididimarios de toros criollos colectados a posmortem, utilizando dilutor Tris - yema de huevo de codorniz al 15 y 20% (TYHC), Tris - yema de huevo de gallina al 20% (TYHG) antes y después de la congelación.	44
<b>Figura 4.</b> Vitalidad de espermatozoides epididimarios de toros criollos colectados a postmortem, utilizando dilutor Tris - yema de huevo de codorniz al 15 y 20% (TYHC), Tris - yema de huevo de gallina al 20% (TYHG) antes y después de la congelación.	47
<b>Figura 5.</b> Componentes del dilutor (Tris, ácido cítrico, glucosa, penicilina).	62
<b>Figura 6.</b> Adición y mezcla de componentes del dilutor.	62
<b>Figura 7.</b> Aspiración de la yema de huevo de codorniz.	62
<b>Figura 8.</b> Transporte de testículos en caja poliestireno.	63
<b>Figura 9.</b> Colección de espermatozoides del epidídimo.	63
<b>Figura 10.</b> Campo microscópico para evaluación de motilidad masal, escala de 0 a 5.	64
<b>Figura 11.</b> Campo microscópico para evaluación de motilidad total, motilidad rectilínea progresiva del espermatozoide.	64
<b>Figura 12.</b> Campo microscópico para evaluación de vitalidad espermática.	64
<b>Figura 13.</b> Refrigeración de los espermatozoides epididimarios diluidos.	65
<b>Figura 14.</b> Empajillado de los espermatozoides epididimarios.	65

<b>Figura 15.</b> Pajillas con espermatozoides, sobre la parrilla sumergida al nitrógeno líquido.	65
<b>Figura 16.</b> Almacenamiento de espermatozoides epididimarios.	66
<b>Figura 17.</b> Descongelación de espermatozoides epididimarios.	66



## RESUMEN

El objetivo del estudio fue evaluar la motilidad y vitalidad antes y después de la congelación de espermatozoides epididimarios de toros criollos postmortem, diluidos con Tris - yema de huevo de codorniz (YHC). Se distribuyó en tres tratamientos (T), espermatozoides epididimarios diluidos con T1: Tris - YHC 15%; T2: Tris - YHC 20%, T3: Tris - yema de huevo de gallina (YHG) 20%. Se utilizó epididimos ( $n = 30$ ) de toros criollos mayores de 3 años de edad (aproximados por la visualización de los dientes incisivos  $\geq a 6$ ), beneficiados en el Camal Municipal de Abancay, se transportó manteniendo entre 25 a 30 °C alrededor de 60 min. Se colectó espermatozoides de la cola del epididimo, mediante la técnica de flujo retrógrado con 5 mL de dilutor Tris - YHC según los tratamientos, luego alrededor de 15 min de colectado, se evaluó la motilidad masal, motilidad total, motilidad rectilínea progresiva y vitalidad antes y después de la congelación. El análisis de varianza se realizó mediante el procedimiento GLM del SAS para las variables. El dilutor Tris - YHC 15 y 20%, YHG 20% presentan efectos similares ( $P > 0.05$ ) sobre la motilidad masal, motilidad total, motilidad rectilínea progresiva y vitalidad espermática, antes y después de la congelación. Existe diferencia ( $P < 0.05$ ) entre los espermatozoides epididimarios frescos y congelados en la motilidad masal ( $4.0 \pm 0.59$  vs  $2.1 \pm 0.59$ ); motilidad total ( $82.5 \pm 8.78$  vs  $38.9 \pm 9.66\%$ ); motilidad rectilínea progresiva ( $35.1 \pm 6.33$  vs  $16.9 \pm 4.39\%$ ); vitalidad ( $85.8 \pm 2.64$  vs  $54.7 \pm 5.20\%$ ). En conclusión, el dilutor Tris- YHC al 15, 20% y YHG al 20%, tienen efectos similares sobre la congelación de espermatozoides epididimarios de toros criollos postmortem; por lo que, se sugiere que se utilizaría YHC o YHG como componente de dilutor Tris, en criopreservación de espermatozoides epididimarios.

**Palabras clave:** Espermatozoo, criopreservación, bovino, motilidad, vitalidad.

## ABSTRACT

The objective of the study was to evaluate the motility and vitality before and after the freezing of epididymal spermatozoa of postmortem Creole bulls, diluted with Tris - quail egg yolk (YHC). It was distributed in three treatments (T), epididymal spermatozoa diluted with T1: Tris - YHC 15%; T2: Tris - YHC 20%, T3: Tris - chicken egg yolk (YHG) 20%. Were used epididymis ( $n = 30$ ) of Criollo bulls older than 3 years of age, (approximated by the visualization of the incisive teeth  $\geq 6$ ), slaughter in the Camal Municipal of Abancay, transported maintaining between 25 and 30 ° C about 60 min. The spermatozoa were collected from the tail of the epididymis, using retrograde flow technique with 5 mL of Tris - YHC extender according to the treatments, then about 15 min collection, mass motility, evaluated the total motility, progressive rectilinear motility and vitality before and after freezing. Analysis of variance was performed using the SAS GLM procedure for the variables. The extender Tris - YHC 15 and 20%, YHG 20% present similar effects ( $P > 0.05$ ) on mass motility, total motility, progressive rectilinear motility and sperm vitality, before and after freezing. There is difference ( $P < 0.05$ ) between fresh and frozen epididymal spermatozoa in mass motility ( $4.0 \pm 0.59$  vs  $2.1 \pm 0.59$ ); total motility ( $82.5 \pm 8.78$  vs  $38.9 \pm 9.66\%$ ); progressive rectilinear motility ( $35.1 \pm 6.33$  vs.  $16.9 \pm 4.39\%$ ); vitality ( $85.8 \pm 2.64$  vs.  $54.7 \pm 5.20\%$ ). In conclusion, the extender Tris-YHC 15, 20% and YHG 20% have similar effects on the freezing of epididymal spermatozoa of postmortem Creole bulls; therefore, it is suggested that YHC or YHG be used as a component of Tris extender in cryopreservation of epididymal spermatozoa.

**Key words:** Spermatozoa, cryopreservation, bovine, motility, vitality.

## I. INTRODUCCIÓN

La congelación de semen es una biotecnología que promueve la conservación del germoplasma por tiempo indeterminado, se asocia a la inseminación artificial, representa un mecanismo eficiente para la promoción y difusión de material genético de excelente calidad, además la criopreservación reduce costos de alimentación y transporte de los reproductores, reduce las enfermedades sexualmente transmisibles (Castelo, 2008).

La recuperación de espermatozoides de la cola del epididimo puede ser una gran ventaja después de la muerte inesperada de los animales con mérito genético. Este procedimiento es una herramienta importante para la recuperación y el uso del germoplasma después de la muerte (Kaabi *et al.*, 2003). Los espermatozoides obtenidos de la cola del epididimo pueden ser utilizados con gran potencial para la preservación de las células espermáticas en programas de reproducción asistida (Ribeiro-Peres *et al.*, 2014). La criopreservación de los espermatozoides epididimales permite un uso eficiente y económico del material genético porque puede ser Almacenados indefinidamente (Martins *et al.*, 2007).

La motilidad espermática es fundamental para que los espermatozoides alcancen el ambiente uterino y el sitio de la fertilización, es el criterio más importante en la evaluación de las células espermáticas antes y después a la criopreservación (Siqueira *et al.*, 2007). El uso del dilutor Tris evidenció niveles adecuados en la motilidad individual espermática del semen antes y después del congelamiento. El dilutor Tris preserva mejor a los espermatozoides durante el proceso de congelación respecto al dilutor Citrato (Cabrera *et al.*, 2011). Convencionalmente el semen se diluye con Tris yema de huevo de gallina; sin embargo, existen estudios que demuestran que la yema de huevo de codorniz tiene más fosfatidilcolina y menos fosfatidiletanolamina, además posee mejor índice de ácidos grasos poliinsaturados, por lo que la motilidad mejora en el proceso de congelación y descongelación de espermatozoides de burros Poitu (Trimeche *et al.*, 1997). Los ácidos grasos poliinsaturados permiten mayor cobertura al shock térmico y mayor estabilización de la membrana acrosomal. Además, el huevo de codorniz presenta mayor concentración de proteínas y lípidos totales (González, 2011), en comparación al huevo de gallina (Taller, 2008).

Por las consideraciones expuestas, se planteó este estudio con el objetivo de evaluar el efecto del dilutor Tris - yema de huevo de codorniz, sobre la motilidad y vitalidad de espermatozoides epididimarios de toros criollos; para su posible implementación en programas de criopreservación del semen bovino, inseminación artificial o mantener la calidad genética, en beneficio del desarrollo ganadero y económico de la población.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Antecedentes de la investigación

En un estudio, entre otras variables se evaluó las características morfológicas de los espermatozoides epididimarios obtenidos postmortem en el toro de Lidia. Se analizaron 12 pares de testículos de toros lidiados en una plaza de toros, procedentes de doce astados encaste Domecq de dos ganaderías. Una vez llegado el toro al desolladero de la plaza, se extrajeron los testículos y se conservaron a una temperatura de 5 °C, en el laboratorio se diseccionó la cola del epididimo. Se evaluó el volumen, concentración espermática, motilidad, vitalidad, células normales, células anormales y acrosomas normales. La muestra obtenida de cada testículo, fue diluida en una proporción 1 : 2 con un diluyente comercial (Steridyl®). Para las variables, concentración espermática, la motilidad individual, vivos y muertos, morfoanomalias y acrosomas normales, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ganaderías (Saavedra *et al.*, 2012).

Con el propósito de evaluar dos protocolos de lavado retrógrado y desmenuzado del epididimo, para la obtención de espermatozoides de toros post mortem, se determinó

el tiempo de colección de espermatozoides, desde el sacrificio hasta el laboratorio y periodos de almacenamiento en refrigeración, sobre porcentaje de motilidad individual. Se utilizaron testículos de 50 toros en edad reproductiva (Protocolo 1: n = 25; protocolo 2: n = 25); a su vez cada protocolo se subdividió en cinco grupos (2, 4, 8, 10, 24 h). La evaluación de la calidad seminal se realizó en fresco cada 24 h post refrigeración por 5 días; la información obtenida se analizó mediante estadística descriptiva y análisis de varianza. Los resultados obtenidos indican que no hubo diferencia significativa ( $P > 0.05$ ) entre los dos protocolos. A 24 h post refrigeración existe diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) entre los grupos de su respectivo protocolo (Luzón, 2015).

Con el objetivo de determinar la movilidad individual de los espermatozoides epididimarios de toros postmortem obtenidos mediante lavado retrógrado se evaluó los espermatozoides presentes en la cola del epididimo, obtenida del matadero mediante lavado retrógrado de testículos de toros cebú postmortem. Los testículos fueron recolectados al azar. Se evaluó la movilidad individual de los espermatozoides recolectados de las colas epididimarias en los testículos seleccionados. Esta recolección se realizó por lavado retrógrado con Tris – yema - glicerol, a través del conducto deferente. Los resultados indican que la temperatura de transporte no afectó la movilidad espermática epididimaria y que es posible recolectar espermatozoides vivos de la cola del epididimo de toros postmortem (Albers y Barrios, 2006).

En un estudio el objetivo fue comparar métodos de criopreservación convencional y automatizado de espermatozoides colectados de la cola del epididimo de toros post mortem. Fueron utilizados 22 epidídimos, colectados en una planta faenadora. Los espermatozoides fueron colectados con la técnica de flujo retrogrado utilizando medio

diluyente sin crioprotector, fueron analizados la motilidad, vigor, integridad estructural y funcional de la membrana plasmática, viabilidad, actividad mitocondrial e integridad del ADN. Los espermatozoides fueron separados en dos muestras y diluidos en medio con crioprotector (Botubov®II), fueron envasados en pajillas francesas, conteniendo  $50 \times 10^6$  espermatozoides móviles por pajilla. Las pajillas fueron congeladas por los métodos convencional ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , durante 4 h, en nevera doméstica y 20 min por encima de la superficie líquida conteniendo nitrógeno líquido) y automatizado (Cryogen®). Las muestras de espermatozoides frescos presentaron resultados superiores en todos los parámetros realizados comparados con los métodos de congelación convencional y automatizada, con excepción de los parámetros hiposmóticos, donde las muestras de espermatozoides frescos no tuvieron alteraciones significativas comparadas con las muestras de espermatozoides criopreservados por el método convencional. La motilidad media de espermatozoides frescos fue de 74%, y de 29 y 25% con los métodos convencional y automatizada respectivamente. Aunque las técnicas de criopreservación reducen los parámetros de calidad espermática, se mantiene la viabilidad de los espermatozoides, pudiendo ser utilizada para la preservación espermática (Ribeiro-Peres *et al.*, 2014).

Con el objetivo de evaluar los efectos de congelación sobre la viabilidad de los espermatozoides colectados desde el epidídimo de toros. Se han usado 10 pares de epidídimos de un matadero comercial. El semen fue colectado de la cola el epidídimo mediante la técnica de flujo retrógrado y fue evaluado entre otras variables la motilidad, el vigor, la concentración, la morfología de los espermatozoides, la viabilidad, integridad y funcionalidad de la membrana. El semen se diluyó con dilutor comercial (Botubov®), envasado en 0.5 mL pajillas francesas, refrigeradas y congeladas en nitrógeno líquido. A la descongelación el semen fue reevaluado para el

mismo parámetro, con excepción de la concentración de espermatozoides. El número de espermatozoides recuperados del epidídimo fue de  $1712.7 \times 10^9$ . Motilidad y vigor fue  $74.0 \pm 7.0\%$  y  $3.6 \pm 0.7$  para el semen fresco y  $30.0 \pm 8.2\%$  y  $1.3 \pm 0.5$  para el semen congelado. El porcentaje promedio de espermatozoides normales fue  $66.8$  y  $62.7\%$  para semen fresco y congelado, respectivamente. Se concluyó que el cultivo de los espermatozoides de la cola del epidídimo es viable, rápida y eficiente, y puede ser utilizado para preservar el material genético de los animales superiores (Barbosa *et al.*, 2012).

Valverde (2016), en un estudio evaluó la calidad espermática post-descongelación de espermatozoides de la cola del epidídimo de toros de matadero sometidos a dos temperaturas de almacenamiento ( $5$  y  $20$  °C). Se colectó 8 pares de testículos se almacenó herméticamente en bolsas plásticas con Lactato Ringer por 6 h. Los gametos fueron recuperados por flujo retrógrado de la cola del epidídimo, se evaluó la concentración, viabilidad espermática, se procesó ajustando a dosis de  $50 \times 10^6$  espermatozoides / 0.25 mL con el diluyente AndroMed al 20%. Se empajilló, se criopreservó en nitrógeno líquido. Se encontraron mejores resultados de motilidad individual progresiva a la precongelación  $84.2 \pm 1.54$  y  $67.5 \pm 7.04$ , a post - descongelación  $33.4 \pm 2.42$  y  $22.8 \pm 2.81\%$  para  $5$  y  $20$  °C respectivamente. La vitalidad fue  $63.0 \pm 2.6$ ;  $52.9 \pm 3.0\%$  para  $5$  y  $20$  °C respectivamente a postdescongelación.

En un estudio se evaluó la calidad, longevidad y la capacidad del espermatozoide epididimario (EP) para unirse al tejido del oviducto (OE) después del enfriamiento y la criopreservación. Se evaluó el eyaculado (EJ) y el espermatozoide (EP), de siete toros antes, durante y después de la criopreservación, se determinó la motilidad total

(TM), motilidad progresiva (PM) entre otras variables. Después del enfriamiento, el EP mostró una mayor TM, ( $P < 0.05$ ) que EJ. Una reducción de motilidad se produjo en EJ después de enfriamiento, mientras que en el grupo EP esa reducción ocurrió sólo después de la crioconservación. Llegando a la conclusión, que los EP son más resistentes a la refrigeración que EJ, y puede unirse a OE de manera similar (Cunha *et al.*, 2016).

Martins *et al.* (2009), con el objetivo de evaluar el efecto del intervalo entre la muerte del animal y la recuperación de espermatozoides en la congelación y capacidad fertilizante de los espermatozoides de los epidídimos del toro, almacenados durante diferentes periodos de tiempo. Se recolectaron testículos de 25 toros en el matadero 2 h después del sacrificio. En el laboratorio los espermatozoides del epidídimo, se recuperaron y analizaron para evaluar la motilidad. Los epidídimos se almacenaron durante 24 h (G24), 48 h (G48) y 72 h (G72) a 5 °C. Al final de cada periodo de tiempo, los espermatozoides fueron recuperados y criopreservados en Tris - yema de huevo y glicerol. Se tomaron muestras de espermatozoides pre-congelación y post-descongelación. Para evaluar la motilidad total y progresiva. Los resultados mostraron que después de 48 h de almacenamiento hubo una disminución en la motilidad total. La motilidad progresiva no se afectó por ninguno de los periodos de almacenamiento. Por el contrario, todos los parámetros espermáticos, excepto la motilidad progresiva, se redujeron después de la crioconservación.

En un estudio, para diluir semen de llamas y alpacas utilizaron dilutores basados en Tris que parecen ser mejores. Uno de las mejoras en el uso de dilutores ha sido el reemplazo de yema de huevo de gallina por yema de huevo de codorniz. La ventaja es que los glóbulos de grasa son más pequeños, además que la mezcla con el semen es

más rápida que con yema de huevo de gallina. El uso de yema de huevo de codorniz no representa daño alguno a los espermatozoides (Bravo y Alarcon, 2013).

En una investigación para evaluar el comportamiento de dilutores Tris - yema y Citrato - yema en el congelamiento de semen de ovino y la integridad de la membrana espermática del semen congelado en pajillas. Se realizó el estudio, con seis carneros de tres razas. El semen se colectó en vagina artificial, se diluyó con Tris - glucosa - yema de huevo de codorniz (15%) (Tris) o Citrato - glucosa - yema de huevo de codorniz (20%) (Citrato), se almacenó en pajillas de 0.5 mL, y se congeló en nitrógeno líquido. El descongelamiento se realizó a 38 °C por 15 seg. En semen descongelado, la motilidad individual progresiva fue de 62.0 y 56.8%, y Host de  $49.8 \pm 3.9$  y  $41.3 \pm 3.8\%$  para los dilutores Tris y Citrato, respectivamente. Se concluye que Tris presenta un mejor rendimiento que Citrato para la congelación del semen ovino y que la prueba hipoosmótica permitió evidenciar diferencias entre dilutores, carneros y momentos de procesamiento (Cabrera *et al.*, 2011).

## **2.2. BASES TEÓRICAS**

### **2.2.1. Ganado bovino Criollo**

En el Perú existen 5.2 millones de cabezas de ganado bovino, siendo el 27.9% (1.4 millones) ganado de raza y el 63.9% (3.3 millones) ganado Criollo, el cual se encuentra distribuido mayormente en la Sierra, en manos de pequeños y medianos criadores con una crianza de tipo mixto y en forma extensiva, y en menor grado forma semi-intensiva (INEI, 2012). El bovino Criollo en el Perú se origina del ganado vacuno introducido por los españoles a mitad del siglo XVI, habiéndose, mantenido puro con ciertas características según ecosistemas donde se ha adaptado; y en otros casos, con diferentes grados de cruzamiento con las razas Holstein y Brown Swiss. Los bovinos

criollos juegan un rol importante en el ingreso familiar y la seguridad alimentaria de los campesinos de la Sierra peruana. Sin embargo, su baja productividad está produciendo su erosión genética, por cruces mal planificadas con razas exóticas (Aquino *et al.*, 2008). Se caracteriza por tener cualidades favorables para su desarrollo en el trópico. Tienen pelo corto y escaso, su coloración varía desde amarillo al rojo y negro pudiendo tener un poco de blanco en la parte inferior. Su piel es pigmentada usualmente tiene arrugas en la zona del cuello, cara y alrededor de los ojos. Tienen un sistema óseo delgado, y pezuñas resistentes y buena agilidad para andar. La selección natural ocurrida durante años, así como cruces dirigidos por ganaderos hicieron que la denominada raza Criolla se adaptara a las condiciones climáticas locales. Sin embargo, a principio del siglo XX se notó una disminución en la calidad genética de la ganadería y se sugirió el uso de razas introducidas especializadas con mayor productividad (Bethancourt y Bolívar, 2013).

En el Perú además de empadrear las vacas criollas con razas como Holstein y Pardo Suizo, también están utilizando las vacas criollas como vientres de alquiler o hembras receptoras de embriones Pardo Suizo (INIA, 2014). Es importante evitar la reducción de la población de ganado Criollo en el Altiplano, hasta altitudes de 4000 m. A este ganado también se les denomina chuscos, serranos y Criollo de las sierras. Los animales criollos en lugares elevados, tienen alto porcentaje de capas negras o parcialmente negras (Primo, 1992).

### **2.2.2. El testículo**

Los testículos son generalmente de forma ovoide con el eje largo en general dirección dorsoventral. El tamaño de los testículos varía con la edad, raza, y la genética del toro, pero son generalmente 8 a 16 cm de largo y 5 a 10 cm de diámetro (Fayrer-Hosken,

1997). Su peso se estima individualmente en 250 a 300 g y en conjunto unos 500 g, se estima aproximadamente en un 0.09% del peso vivo del animal (Rutter, 2006). El tamaño del testículo del toro es extremadamente importante porque cuanto más grandes los testículos, mayor es la producción de espermatozoides (Fayrer-Hosken, 1997).

Los testículos son dos órganos situados en el exterior de la cavidad abdominal, el izquierdo un poco más bajo, debajo del pene y alojados en las bolsas escrotales o escroto, el escroto tiene la función de mantener los testículos a una temperatura ligeramente inferior a la del cuerpo (5 °C por debajo de la temperatura central corporal), puesto que las células germinales, generadoras de espermatozoides, son muy sensibles a los cambios de temperatura y ligeros incrementos producen esterilidad (Córdova, 2003).

Los testículos están cubiertos por dos capas de peritoneo. La capa más externa es la túnica vaginal. La capa más interna es una cápsula fibroelástica gruesa, la túnica albugínea. Los septos de radiación de la túnica albugínea, que terminan en el testículo del mediastino. Estas radiaciones forman lóbulos que sostienen los túbulos seminíferos. Los túbulos seminíferos forman el volumen de los testículos, son de forma de herradura y ambos extremos terminan en los conductos colectores del rete testis. Este luego transporta los espermatozoides a la cabeza del epididimo. Los túbulos seminíferos están revestidos por células de Sertoli (Fayrer-Hosken, 1997).

Los testículos son los órganos sexuales primarios que tienen como funciones principales la producción de espermatozoides (función exocrina) y la producción de hormonas esteroideas (función endocrina). Ambas funciones se regulan por diferentes controles (Galina y Valencia, 2008). La primera que se refiere a la gametogénesis

regulada por el proceso de espermatogénesis. La segunda en los tubos seminíferos por medio del proceso de la esteroidogénesis en las células de Leydig (Noakes *et al.*, 2001).

### **2.2.3.El epidídimo**

El epidídimo es un tubo complejo y tortuoso que conecta los conductos eferentes al conducto deferente en el tracto reproductivo del macho (Robaire *et al.*, 2006; Dacheux *et al.*, 2016), es una extensión de la túnica albugínea; mide alrededor de 30 a 50 metros de largo en el toro (Sisson, 2001). Está constituido por una serosa, fibras musculares y una membrana basal con un epitelio columnar pseudoestratificado y ciliado. Es un conducto largo y contorneado que está constituido de cabeza que es la porción más ancha, a la cual llegan los conductos eferentes. Los espermatozoides comienzan a madurar aquí (Hafez y Hafez, 2000). Anatómicamente el epidídimo consta de tres partes bien definidas: cabeza, cuerpo y cola (Sisson, 1993; Chenoweth, 1997; König y Liebich, 2005).

El transporte de espermatozoides por el epidídimo requiere de nueve a trece días. La maduración de los espermatozoides ocurre durante el tránsito por el epidídimo, la motilidad aumenta a medida que aquellos entran en el cuerpo de este. El ambiente de las células espermáticas en la cola del epidídimo proporciona factores que favorecen la capacidad fecundante, cuando se encuentran en esta región tiene mayor fecundidad que los del cuerpo epididimario. La cola del epidídimo es la estructura principal de almacenamiento, contiene alrededor del 75% de células espermáticas (Hafez y Hafez, 2000).

La cabeza del epidídimo se encuentra alrededor del 36% de esperma y el cuerpo, alrededor del 18%. La cola del epidídimo tiene la capacidad de almacenar alrededor



de 45 a 70% de los espermatozoides producida diariamente, para permanecer allí hasta que son eyaculados (Camargo, 2006).

El epididimo tiene fundamentalmente dos funciones: la maduración y el almacenamiento espermático. La maduración, o desarrollo progresivo de la capacidad fertilizante de los espermatozoides ocurre en la cabeza y el cuerpo del epididimo (Albers y Barrios, 2006), la maduración de espermatozoides epididimales es el paso final de la diferenciación espermática postgonadal, donde los espermatozoides adquieren madurez funcional se manifiesta por el desarrollo de la capacidad fertilizante y motilidad (Juyena y Stelletta, 2012).

El almacenamiento efectivo de gametos masculinos, donde se preserva la viabilidad de espermatozoides hasta 2 semanas en el caso de toro ocurre en la cola del epididimo; después de la eyaculación, el esperma maduro suspendido en el líquido epididimario se mezcla con las secreciones restantes de tracto reproductivo masculino, en el caso del toro principalmente líquido vesicular seminal, creando semen (Juyena y Stelletta, 2012). Con esta consideración, es importante señalar que se podrían obtener espermatozoides viables provenientes de la cola del epididimo con movilidad y capacidad fertilizante, poco tiempo después de la muerte del animal, que podrían ser procesados y congelados para su posterior uso en inseminación artificial (Albers y Barrios, 2006).

#### **2.2.4. Criopreservación espermática**

La criobiología se refiere a entender los efectos de las temperaturas bajas sobre los sistemas celulares ya que el tiempo biológico es una consecuencia de determinadas reacciones bioquímicas y el frío prolonga el tiempo biológico puesto que enlentece estas reacciones. Sin embargo, este no es un proceso exento de problemas ya que puede

inducir variaciones extremas en las propiedades químicas, térmicas y eléctricas las cuales pueden alterar las membranas celulares, los organelos y la delicada interacción célula-célula inherente en las células y tejidos a criopreservar (Woods *et al.*, 2004).

La criopreservación del semen es el método más eficaz para el almacenamiento a largo plazo de los gametos (Safranski *et al.*, 2011). La conservación en nitrógeno líquido tiene como objetivo fundamental prolongar la viabilidad de los gametos masculinos de forma indefinida, ya que a temperatura ambiente o de refrigeración los espermatozoides degeneran con cierta rapidez, debidos principalmente al agotamiento de las reservas energéticas. La inseminación artificial con semen congelado ha demostrado ser la tecnología reproductiva que más ha contribuido a acelerar el progreso genético de las diferentes especies ganaderas, especialmente del ganado vacuno de aptitud láctea; sin embargo, el éxito de esta tecnología depende de que el semen utilizado mantenga su poder fecundante tras su descongelación. Para conseguir dicho objetivo, en todo protocolo de congelación seminal han de controlarse rigurosamente los sucesivos pasos que constituyen el proceso de criopreservación, y de forma especial aquellos que influyen más directamente sobre la estructura y función de las membranas espermáticas, y sobre el metabolismo celular (Hammerstedt *et al.*, 1990).

Al criopreservar y descongelar espermatozoides, es de importancia considerar las variaciones que existen entre los espermatozoides del eyaculado y los que son extraídos del epididimo, su morfología y funcionalidad. Estas diferencias al momento de la congelación influyen en la estabilidad de la membrana frente al choque térmico y sobre la presión osmótica. Cuando se pretenden congelar y descongelar gametos de un macho, es importante considerar las diferencias que existen entre los

espermatozoides del eyaculado y los que son extraídos del epidídimo, tanto morfológico como funcional; tales diferencias, en el momento de la congelación, pueden influir en la estabilidad de la membrana frente al choque térmico y a la presión osmótica. Por lo tanto, los métodos empleados para criopreservar espermatozoides eyaculados no son convenientes para ser usados con los espermatozoides obtenidos del epidídimo, a menos que sean añadidos componentes similares a los encontrados dentro del epidídimo, en la solución de congelamiento (Hewitt *et al.*, 2001).

#### **2.2.5. Dilutores del semen**

El diluyente es una solución acuosa el cual incrementa el volumen del eyaculado, preservando las características de los espermatozoides y manteniendo el nivel de fertilidad funcionalidad adecuado (Gadea, 2003). Posibilitan el análisis de los espermatozoides acondicionados para la inseminación (Cavestany, 1994). Los diluyentes son amortiguadores usados para mantener la viabilidad del espermatozoide *in vitro* y maximizar el número de hembras inseminadas (Donoghue y Wishart, 2000).

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

Un diluyente debe reunir una serie de propiedades básicas relacionadas con su pH, capacidad tampón, osmolaridad, y fuerza iónica. Además, debe aportar una fuente de



energía, no debe deteriorarse durante el almacenamiento previo a su uso, debe proteger a los espermatozoides durante el enfriamiento, congelación y descongelación, y finalmente, debe ser resistente al crecimiento bacteriano (Muiño, 2008).

Funciones de un diluyente según Curbelo y Rodríguez (2013), se describen:

- Proveer nutrientes a los espermatozoides, como fuente de energía.
- Proteger los espermatozoides contra los efectos dañinos de un enfriado rápido.
- Proveer un buffer para prevenir efectos nocivos de cambios de pH al formarse ácido láctico, resultante del metabolismo de la glucosa por los espermatozoides.
- Mantener una presión osmótica y un balance electrolítico adecuado.
- Inhibir el crecimiento bacteriano.
- Aumentar el volumen de semen de modo que pueda ser utilizado para múltiples inseminaciones.

#### **2.2.5.1. Componentes de los dilutores**

Rossi (2012) menciona que los componentes básicos de los diluyentes utilizados para el congelamiento de semen son esencialmente los mismos que los que se utilizan para almacenar semen en estado líquido, estos diluyentes utilizados para la conservación de semen en la mayoría de las especies domésticas, se encuentran compuestos por las siguientes sustancias:

- Agua bidestilada o ultrapura, como disolvente del resto de los componentes.
- Sustancias iónicas y no iónicas para mantener la osmolaridad y el pH del medio.
- Materiales orgánicos como yema de huevo o leche, que cuentan con capacidad de disminuir o evitar el efecto frente al shock de frío.
- Crioprotectores, siendo el más utilizado el glicerol.

- Azúcares simples como fuente energética, o di y trisacáridos como crioprotectores adicionales.
- Antibióticos para controlar el crecimiento bacteriano.
- Otros aditivos, que pueden ser opcionales, como enzimas, detergentes o aminoácidos que pueden mejorar la fertilidad.

Layek *et al.* (2016) describen que los dilutores convencionalmente para congelar espermatozoide, incluyen: un crioprotector no permeable (leche o productos lácteos, yema de huevo o derivados de yema de huevo, tales como lipoproteínas de baja densidad o fosfolípidos); un crioprotector permable (más comúnmente es glicerol); un tampón orgánico (típicamente Trishydroximetilaminometano); uno o más azúcares como substrato energético u osmótico (glucosa, fructosa, lactosa, rafinosa, sacarosa o trehalosa); solutos para ajustar el pH y osmolaridad (citrato de sodio, ácido cítrico); Y antibióticos (penicilina, estreptomycin).

#### 2.2.5.2. Dilutor Tris

El tris (hidroximetil) aminometano se requiere principalmente para la preparación de tampones a un intervalo fisiológico de 7.3 a 7.5. Los tampones preparados son compatibles con fluidos biológicos. Es importante para los laboratorios como una solución de pH estándar. Tris se ha utilizado como una solución tampón para el ensayo de lactato deshidrogenasa, el procedimiento de hibridación in situ y la extracción de proteínas de las células (Sigma-Aldrich, 2017).

El dilutor Tris (Tris hidroximetil aminometano) es uno de los principales diluyentes utilizados en la criopreservación y refrigeración de semen bovino, ya que al combinar dicha sustancia con yema de huevo y glicerol se favorece notablemente la preservación de los espermatozoides a distintas temperaturas, 5 a - 85 °C. En la actualidad, la

mayoría de los diluyentes utilizados para la criopreservación de material seminal contienen Tris y ácido cítrico como principales sustancias tampón (Rossi, 2012).

El Tris es un tampón orgánico, típicamente Trishydroximetilaminometano (Layek *et al.*, 2016). Es una sustancia orgánica, de aspecto cristalino, su peso molecular es de 121.14 g/L, que posee la particularidad de formar soluciones acuosas y sistemas reguladores de la concentración de iones de hidrógeno. Posee una constante de disociación básica, tal que una solución de 50 mM de Tris corresponde a un pH de 10.4, el cual protege a los espermatozoides de cambios de pH, por este motivo para ser utilizado en la criopreservación de semen requiere estar asociado con el ácido cítrico (Anduaga, 1980).

Propiedades del Tris: ensayo  $\geq 99.8\%$ ; impurezas  $\leq 0.005\%$  insolubles  $\leq 2\%$  de agua; usado entre 7 a 9 pH; pKa (25 °C) 8.1, bp 219-220 °C/10 mmHg(lit.); mp 167-172 °C(lit.); Trazas catiónicas Fe:  $\leq 5$  ppm metales pesados (as Pb):  $\leq 5$  ppm. Sinónimo: 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol, THAM, Tris base, Trometamol. Fórmula lineal  $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$  (Sigma-Aldrich, 2017).

#### **2.2.6. Uso de yema de huevo en la crioconservación espermática**

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

La yema de huevo es un ingrediente comúnmente utilizado para proteger a los espermatozoides contra el choque térmico por frío, además la fracción lipídica de la yema de huevo (lecitina y cefalina) tiene una acción protectora, y la fracción lipoproteica, un efecto conservador (Daza, 1994), ya que preserva la motilidad e integridad de las membranas del acrosoma y mitocondrias del espermatozoide además es un buffer osmótico, se ha notado que la yema de huevo protege durante la congelación, ya que se adhiere a la membrana y la recubre, esta facultad de protección se adjudica a la gran densidad de la fracción de lipoproteínas (Carpio, 2015).

### 2.2.6.1. Yema de huevo de gallina

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

**Cuadro 1.** Composición química del huevo de la gallina.

Componente		Componente	
Agua, g	74.00	Hierro, mg	2.10
Energía, Kilocalorías	158.00	Fósforo, µg	180.00
Proteínas, g	12.10	Zinc, mg	1.44
Hidratos de carbono, g	1.20	Vitamina B1 (Tiamina), mg	0.09
Ácidos grasos saturados, g	3.35	Niacina (Ácido nicotínico), mg	0.10
Ácidos grasos monoinsaturados, g	4.08	Ácido fólico, µg	65.00
Ácidos grasos poliinsaturados, g	1.24	Vitamina B12 (Cianocobalamina), µg	66.00
Colesterol, mg	548.00	Vitamina B6 (Piridoxina), mg	0.12
Fibra dietética, g	0.00	Vitamina C (Ácido ascórbico), mg	0.00
Calcio, mg	56.00	Vitamina A (equivalentes de Retinol), µg	227.00
Magnesio, mg	12.00	Vitamina D3, µg	1.80

Taller (2008).

### 2.2.6.2. Huevo de codorniz

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

**Cuadro 2.** Composición proximal de huevos de codorniz (g/100 g de porción comestible).

Detalle			
	Clara	Yema	Huevo entero
Humedad	86 ± 1.4	51 ± 7.4	69.49 ± 4.0
Proteína (N x 6.68)	11.63 ± 2.6	15.63 ± 1.9	13.63 ± 2.1
Lípidos	n.d.	33.61 ± 2.2	12.59 ± 2.2
Colesterol		1.13 ± 0.2	

González (2011).

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

**Ácidos grasos:** Un total de seis ácidos grasos fueron identificados en el huevo de codorniz los cuales son: mirístico, palmítico, palmitoleico, esteárico, oleico y linoleico. El ácido oleico 18:1 resultó ser el más abundante, correspondiendo a un

44.68 ± 0.88% del total de ácidos grasos, el ácido mirístico, 14:0 se encontró en menor porcentaje y dentro de los ácidos grasos poliinsaturados, el ácido linoleico, 18:2 fue el que se encontró en mayor proporción.

### 2.2.6.3. Comparación de la composición de huevos de gallina y codorniz

Se observó que las composiciones brutas de yema de huevo de gallina y yema de codorniz eran muy similares. Por lo tanto, la proporción de lípidos a proteínas y de triglicéridos a fosfolípidos fueron cercanas. Sin embargo, hubo diferencias significativas de detalle; la partición de los fosfolípidos fue diferente entre la yema de huevo de gallina y la yema de huevo de codorniz; yema de huevo de codorniz contenía más fosfatidilcolina y menos fosfatidiletanolamina que la yema de huevo de gallina. La proporción fosfatidilcolina / fosfatidiletanolamina de la yema de huevo de codorniz fue aproximadamente el doble que la de la yema de huevo de gallina. Los lípidos totales de yema de huevo de codorniz se componen principalmente de ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) de 51.6%, ácidos grasos saturados (SFA) de 34.0 y 14.4% de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA). Los ácidos grasos principales fueron ácido oleico (18: 1), ácido palmitico (16: 0) y ácido linoleico (18: 2 n-6). Los lípidos totales de yema de codorniz contienen significativamente más MUFA y menos PUFA que la yema de huevo de gallina, mientras que las proporciones de SFA eran similares en ambas yemas de huevo. Por ejemplo, los lípidos totales de yema de codorniz contenían entre 1.5 y 2 veces menos ácido linoleico, ácido araquidónico (20: 4 n-6) y ácido docosaheptanoico (22: 6 n-3) y más ácido oleico y ácido palmitoleico 16: 1) que la yema de huevo total (Trimeche *et al.*, 1997).

**Cuadro 3.** Composición de los ácidos grasos del total de lípidos de la yema de huevo de gallina y codorniz.

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

González (2011).

**Cuadro 4.** Composición general de la yema de huevo de gallina y de codorniz (g / 100 g de yema fresca).

	Yema de huevo de gallina (n = 12)	Yema de huevo de codorniz (n = 8)
Proteínas	15.8 ± 0.4	14.2 ± 0.8
Lípidos	32.0 ± 0.4	31.7 ± 0.7
Triglicéridos	21.9 ± 0.3	21.5 ± 0.2
Fosfolípidos	8.8 ± 0.3	9.1 ± 0.2
Colesterol	1.3 ± 0.1	1.1 ± 0.1
Lípidos/proteínas	2.0 ± 0.1	2.2 ± 0.1
Triglicéridos/Fosfolípidos	2.5 ± 0.1	2.4 ± 0.1

Trimeche *et al.* (1997).

**Cuadro 5.** Repartición de fosfolípidos de yema de huevo de gallina y de codorniz (% de fosfolípidos totales).

	Yema de huevo de gallina (n = 12)	Yema de huevo de codorniz (n = 8)
Cardiolipina	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.1
Fosfatidiletanolamina	21.7 ± 0.4	13.7 ± 0.6*
Fosfatidilinositol	0.7 ± 0.1	0.3 ± 0.0*
Fosfatidilserina	0.9 ± 0.1	0.7 ± 0.0
Fosfatidilcolina	76.1 ± 0.4	84.5 ± 0.5*
Esfingomielina	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.0
Fosfatidilcolina/Fosfatidiletanolamina	3.5 ± 0.1	6.2 ± 0.3*

\* En la misma fila, las medias difieren significativamente ( $P \geq 0.05$ ).  
Trimeche *et al.* (1997).

### 2.2.7. Fisiología de la membrana plasmática del espermatozoide

La configuración bilaminar de las cadenas de ácidos grasos de los fosfolípidos, junto con las proteínas integrales y periféricas, conforman una barrera hidrofóbica difícil de atravesar. Los fosfolípidos de la membrana se pueden mover lateralmente en la membrana, por lo que se dice que la membrana es un mosaico fluido. La fluidez de la membrana puede alterarse por varios factores entre ellos temperatura. Al bajar esta se produce un reacomodo de las cadenas de fosfolípidos en forma de paquetes, ya sea en forma bilaminar o hexagonal, formándose con esto regiones cristalinas. Sin embargo, hay regiones en las que todavía existen líquidos, y aquellas proteínas que fueron separadas del bloque cristalino se reagrupan, de forma que se construyen brechas de comunicación en la membrana (Beall, 1983; Parks y Graham, 1992).

Dependiendo del ritmo de enfriamiento, los eventos que suceden son distintos. Cuando el ritmo de congelamiento es rápido (reducción de temperatura mayor a 10 – 20

°C/min) al agua intracelular no le da tiempo de salir, por lo que se forman cristales que, al aumentar el ritmo de congelamiento, se hacen cada vez más pequeños, hasta hacerse imperceptibles aun con el microscopio electrónico. Esto es saludable para la célula mientras permanezca en ese estado. No obstante, esos microcristales son termodinámicamente inestables, por lo que, al ser descongelados, tienden a agruparse (cristalización) y formar cristales más grandes. Que, si son letales para la célula, por lo que la solución es un ritmo de descongelamiento rápido. No se conoce bien la forma como el proceso de recristalización daña a la célula. Se cree que no es físico el daño, es más, se piensa que directamente es inocuo, pero que genera cambios letales en el sistema celular, los que son de carácter letal (Mazur, 1984).

Hay evidencias que indican que cuando aproximadamente el 90% de agua es removida. El 10% restante no es capaz de congelarse a ninguna temperatura, pero ante esta situación, la proporción de hielo extracelular es tan grande que le causa daño a la membrana por su lado externo (Mazur, 1984).

#### **2.2.8. Evaluación del semen**

La evaluación espermática es valorada subjetivamente, por medio de la observación de una muestra de semen a través de un microscopio. Este método es el más simple, rápido y barato de evaluar la motilidad, pero tiene el inconveniente de ser altamente subjetivo (Muiño *et al.*, 2007).

Después de su obtención, para evaluar las características macroscópicas generalmente se coloca en baño María a 30 a 32 °C y se examina el volumen, color y aspecto (Galina y Valencia, 2008). El semen debe tener aspecto opaco y relativamente uniforme, indicativo de alta concentración de células espermáticas. Las muestras translúcidas contienen pocos espermatozoides, la muestra debe estar libre de contaminantes. Los

animales jóvenes y los de menor talla pueden producir menores volúmenes de semen. La elevada frecuencia de eyaculado reduce los niveles de concentración (Hafez y Hafez, 2000).

Se debe hacer un análisis microscópico inicial de la muestra sin diluir para estimar el número de espermatozoides por campo y decidir sobre la dilución a utilizar para la determinación de los parámetros microscópicos. Se utiliza un volumen de semen de 10  $\mu$ L entre lámina y laminilla, a una magnificación de 100X (lente objetivo de 10X y ocular de 10X), que permita la visualización de filamentos de moco y la aglutinación de los espermatozoides. Luego se debe pasar a una magnificación de 400X, como se describe en la tabla 3; por ejemplo, si a una magnitud de 400X se observan entre 40 y 200 espermatozoides por campo, para el recuento se debe diluir la muestra 1:20 (1 parte de semen más 19 partes del diluyente para recuento). La temperatura para evaluar la motilidad y progresión de los espermatozoides idealmente debe ser de 37 °C; sin embargo, se puede hacer entre 20 y 24 °C siempre y cuando sea constante, ya que la temperatura afecta la motilidad de los espermatozoides (Baker, 2007).

#### **2.2.8.1. Concentración espermática**

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

### 2.2.8.2. Motilidad espermática

La motilidad espermática es históricamente, la prueba más común de la calidad del esperma, principalmente debido a la facilidad de evaluación bajo una variedad de condiciones. Biológicamente, la capacidad de un espermatozoide para ser móvil es ciertamente necesario para la fertilidad, pero el tipo y motilidad puede verse afectada por las condiciones (por ejemplo, cambios calientes, fríos, osmóticos) que se determina la prueba. Por lo tanto, la prueba de motilidad espermática debe llevarse a cabo bajo condiciones bien controladas, de modo que los resultados reflejen la calidad inherente del esperma del semental probado y no influencias iatrogénicas (Love, 2016).

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

#### a) Motilidad o movimiento en masa

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

## **b) Motilidad individual progresiva**

La motilidad progresiva es un indicativo de que los espermatozoides son viables, por ende, es una de las principales pruebas que se realizan en las diferentes especies (Squires *et al.*, 2004; Flores, 2005).

La metodología para la observación de la motilidad individual en el microscopio es utilizando aumento de 40X y se debe diluir una gota de semen en citrato de sodio al 2.9%, el cual debe estar a la temperatura de 37 °C para evitar el choque térmico que inmovilizarían a los espermatozoides y/o causaría su muerte, luego se coloca una gota del semen diluido en un portaobjetos precalentado y se pone un cubreobjetos, luego se observa el movimiento del espermatozoide (Hernández, 2012). El movimiento normal del espermatozoide es el que realiza en forma progresiva y en línea recta, encontrándose correlación entre el movimiento rectilíneo y la fertilidad (Rigau *et al.*, 2001; Rodríguez-Martínez, 2007).

### **2.2.8.3. Morfología**

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

La morfología está estrechamente relacionada con la motilidad espermática en forma más directa, y se mide en porcentaje de espermatozoides con defectos de morfología. Se necesita, al menos, un buen porcentaje de espermatozoides móviles y de ellos se

espera que entre 70 a 80% posea morfología normal. Esto quiere decir, que como máximo se acepta 20 a 30% de atipias (Agüero, 2012).

#### **2.2.8.4. Vitalidad**

Esta característica mide el número de espermatozoides vivos y se expresa como el porcentaje de células muertas, una vez dañado, los espermatozoides no son capaces de volver a sellar el plasmalema comprometida, y por lo tanto, no puede mantener esas concentraciones de iones y co-factores esenciales para la supervivencia de los espermatozoides, el desarrollo de la tecnología utilizando tinción fluoróforos de ácidos nucleicos, enzimas intracitoplasmáticas, o potencial de membrana ha proporcionado nuevas herramientas para la evaluación de la funcionalidad de los espermatozoides (Januskauskas y Zilinskas, 2002).

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

#### **2.2.8.5. Integridad de la membrana plasmática del espermatozoide**

La membrana espermática es una estructura heterogénea y dinámica que presenta cinco dominios diferentes: acrosoma, segmento ecuatorial, región post-acrosomal, pieza intermedia y cola, además; participa en el reconocimiento y transporte de moléculas, con funciones específicas que permiten que el espermatozoide adapte su

metabolismo al medio circundante, proporcionándole un sistema molecular para el reconocimiento del oocito (Hammerstedt *et al.*, 1990).

Durante el proceso de criopreservación se produce una disminución aproximada del 50% en la viabilidad espermática, debido principalmente al efecto de la temperatura y la presión osmótica, ocurriendo cambios en la organización morfológica de las células, tales como la permeabilidad, composición lipídica de las membranas espermáticas y en el líquido intracelular (Thomas *et al.*, 1998).

La integridad de la membrana espermática es fundamental para el metabolismo espermático e imprescindible en varios eventos involucrados en la fecundación, como lo son la capacitación, la reacción acrosómica y la fusión con el oocito (Madrid-Bury, 2004; Rota *et al.*, 2000; Watson, 2000), lo cual, garantiza la fertilidad del macho reproductor.

### **2.3. MARCO CONCEPTUAL**

#### **2.3.1. Semen**

Conjunto de espermatozoides y sustancias fluidas que se producen en el aparato genital masculino de los animales y de la especie humana (RAE, 2017).

El semen es el eyaculado que está compuesto de espermatozoides y plasma seminal, los testículos proveen los componentes celulares (espermatozoides) y las glándulas accesorias proveen la mayor parte de la porción líquida (plasma seminal) [Garner y Hafez, 2000].

### 2.3.2. Espermatozoide

Gametos masculinos que se forman en los túbulos seminíferos de los testículos, son células alargadas consistentes, con cabeza aplanada portadora de núcleo y una cola que es el aparato necesario para la motilidad celular (Knobit *et al.*, (1998).

Los espermatozoides (gametos masculinos) forman parte de la suspensión celular líquida llamada semen, Los espermatozoides se forman en los túbulos seminíferos de los testículos. En dichos túbulos se encuentran las células germinales que finalmente se convertirán en los gametos masculinos. Los espermatozoides maduros se dividen según su estructura anatómica en cabeza (conteniendo el núcleo) y cola (permite su motilidad). Contiene un acrosoma, estructura de doble pared, que es una estructura ubicada entre la membrana plasmática (que recubre al espermatozoide) y la porción anterior de la cabeza. Un cuello une la cabeza con la cola (flagelo), la cual a su vez se subdivide en los segmentos medio, principal y caudal (Curbelo y Rodríguez, 2013).

Gameto masculino, destinado a la fecundación del óvulo (RAE, 2017).

### 2.3.3. Espermatozoide epididimario

El epidídimo tiene fundamentalmente dos funciones: la maduración y el almacenamiento espermático. La maduración, o desarrollo progresivo de la capacidad fertilizante de los espermatozoides ocurre en la cabeza y el cuerpo del epidídimo y el almacenamiento ocurre en la cola del epidídimo, con esta consideración, es importante señalar que se podrían obtener espermatozoides viables provenientes de la cola del epidídimo con movilidad y capacidad fertilizante, poco tiempo después de la muerte del animal, que podrían ser procesados y congelados para su posterior uso en inseminación artificial (Albers y Barrios, 2006).

#### **2.3.4. Dilutor**

Solución acuosa que permite aumentar el volumen del eyaculado hasta conseguir las dosis necesarias, preservar las características funcionales de las células espermáticas y mantener el nivel de fertilidad adecuado (Gadea, 2003).

Por diluyente entendemos la solución acuosa que permite aumentar el volumen del eyaculado hasta conseguir las dosis necesarias y preservar las características funcionales de las células espermáticas y mantener el nivel de fertilidad adecuado (Gadea, 2003).

#### **2.3.5. Criopreservación**

La criopreservación es el proceso por el cual células o tejidos son congelados a bajas temperaturas, generalmente a la temperatura de ebullición del nitrógeno líquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ), para disminuir las funciones vitales de una célula u organismo y poder mantenerlo en condiciones de vida suspendida por mucho tiempo (Belascoain *et al.*, 2010).

### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **3.1. Localización**

El estudio se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac, ubicado en Patibamba Baja del distrito y provincia de Abancay del departamento de Apurímac, Perú. Localizado a 13° 38' 30" Latitud Sur y 72° 53' 16" Longitud Oeste, y está a 2320 m de altitud (Google Earth, 2017).

#### **3.2. Material biológico**

Se utilizaron al azar 30 testículos de toros criollos inmediato a postmortem mayores de 3 años de edad (aproximados por la visualización de los dientes incisivos  $\geq 6$ ), beneficiados en el Camal Municipal de Abancay. Los epidídimos fueron extraídos mediante separación del cordón espermático, túnica vaginal y túnica albugínea. Luego se colocó en bolsas plásticas estériles, en una caja con tapa de poliestireno y se

transportó hasta el Laboratorio de Reproducción Animal, a una temperatura entre 20 a 25 °C alrededor de 60 min.

### **3.3. Diseño experimental**

Se formaron tres grupos de tratamiento (T) de dilutores de espermatozoides, T1: Tris – yema de huevo de codorniz al 15% (n = 10); T2: Tris – yema de huevo de codorniz al 20% (n = 10); T3: Tris – yema de huevo de gallina al 20% (n = 10). Las muestras de los espermatozoides epididimarios, se evaluaron antes y después de la congelación.

### **3.4. Colección de espermatozoides**

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

- Para la recuperación de los espermatozoides, de cada testículo se diseccionó la cola del epididimo y el conducto deferente; se retiró la túnica vaginal y los vasos sanguíneos.
- Se localizó la zona media de la cola del epididimo, se realizó un corte transversal anterior al comienzo de la disminución del diámetro epididimal, para obtener los espermatozoides.
- Se introdujo una aguja de 21 G con punta “roma” unida a una jeringa de 5 mL, se colocó el dilutor Tris - yema de huevo según los tratamientos, en el lumen del conducto deferente y se perfundió lentamente. Las paredes del conducto deferente se sujetaron con pinza “mosquito” contra la aguja para evitar la pérdida del dilutor. Luego, se obtuvo lentamente el líquido espermático epididimario por el extremo seccionado de la cola del epididimo, hacia el tubo

cónico de 15 mL, seguidamente se colocó a baño María a 37 °C, de allí se evaluó las características espermáticas descritas como variables de respuesta.

### 3.5. Evaluación espermática

#### 3.5.1. Motilidad espermática

- a) **Motilidad masal:** Se colocó 5  $\mu$ L de espermatozoides colectados del epidídimo sobre la lámina portaobjeto atemperado a 37 °C y se observó con microscopio óptico a 10X, se le dio la valoración subjetiva de 0 a 5 grados considerando 0 cuando hay ausencia de movimiento y 5 cuando existe ondas con movimiento muy rápido y vigoroso.
- b) **Motilidad total:** Para la evaluación de la motilidad total de espermatozoides colectados del epidídimo, se mezcló 5  $\mu$ L de espermatozoide con 10  $\mu$ L de cloruro de sodio a 0.9% a 37 °C en tubos eppendorf de 2 mL, de allí se aspiró 5  $\mu$ L y se colocó sobre la lámina portaobjeto que se encuentra sobre una platina atemperada a 37 °C. Para el conteo de los espermatozoides se utilizó una cámara filmadora, se grabó varios campos microscópicos y luego se realizó el conteo en los videos. La motilidad total, fue considerada el total de espermatozoides móviles expresada en porcentaje, se contabilizó 200 células espermáticas en diferentes campos microscópicos.
- c) **Motilidad rectilínea progresiva:** Se siguió el mismo procedimiento descrito para la motilidad total de espermatozoides. Se refiere a la movilidad espermática con movimientos rectilíneos con una tendencia recta que atraviesa el campo microscópico. Fue expresada en porcentaje.

### 3.5.2. Vitalidad espermática

La vitalidad espermática fue evaluada utilizando la solución de eosina/nigrosina. Se colocó una alícuota de 5  $\mu$ L de solución y la misma cantidad espermática sobre una lámina portaobjeto atemperada a 37 °C, se mezcló y se realizó el frotis, luego de dejó secar al ambiente. Se contó 200 células espermáticas en microscopio óptico a 100X, se consideró espermatozoides muertos aquellos coloreados y fue expresado en porcentaje.

### 3.6. Preparación de dilutores y dilución

Los componentes sólidos del dilutor según Cuadro 5, se pesó en una balanza analítica, se preparó en tubos cónicos de 45 mL 12 h antes de su uso. Se formó dos fracciones A y B, la fracción A contenía el dilutor base más espermatozoides, mientras la fracción B contenía el dilutor más glicerol al 5%. La dilución fue 4 : 1 (4 partes de dilutor y 1 parte de espermatozoides) unidas a una misma temperatura.

Se utilizó yema de huevo de codorniz y de gallina puesta del día. Se separó la yema de la clara del huevo sobre papel toalla, se colocó en tubos cónicos de plástico de 15 mL.

**Cuadro 6.** Composición del dilutor Tris – yema de huevo de codorniz (TYHC) o de gallina (TYHG).

	T1	T2	T3
	TYHC 15%	TYHC 20%	TYHG 20%
Tris (g)	3.630	3.630	3.630
Ácido cítrico (g)	1.990	1.990	1.990
Glucosa (g)	0.500	0.500	0.500
Yema de huevo (mL) *	15	20	20
Glicerol (mL)**	5	5	5
Penicilina (UI)	10000	10000	10000
Agua bidestilada csp (mL)	100	100	100

\* De gallina o codorniz

\*\* Usado para la fracción B del dilutor

### 3.7. Enfriamiento de espermatozoides

Se realizó durante 2 h hasta llegar a 15 °C, luego se colocó a refrigeración a 4.5 °C por 2 h hasta su equilibramiento. Luego se unió las dos fracciones.

### 3.8. Empajillado

Se utilizó pajuelas de 0.25 mL, previamente rotuladas y enfriadas, el llenado de las pajuelas fue por absorción manual, se selló con alcohol polivinílico en su extremo libre, este procedimiento se realizó alrededor de 5 °C dentro de la refrigeradora.

### 3.9. Congelación

Se utilizó una caja de poliestireno con contenido de nitrógeno líquido hasta un nivel de 4 cm. Las pajuelas se colocaron sobre una parrilla de congelamiento a 4 cm del nivel de nitrógeno líquido, por espacio de 15 min. Luego se sumergió las pajuelas al nitrógeno líquido para su congelación.

Las pajuelas fueron colocadas en globets, luego en canes y canastas. Se almacenó en tanque criogénico a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su evaluación posterior.

### 3.10. Descongelación

El descongelamiento se realizó después de 3 días de congelado los espermatozoides, se utilizó un termo de descongelación a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 1 min, luego se evaluó los espermatozoides descongelados.

### 3.11. Análisis estadístico

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

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

Donde:

- $Y_{ij}$  = Representa la variable de respuesta (motilidad masal, motilidad total, motilidad rectilínea progresiva, vitalidad)
- $\mu$  = Es la media general
- $T_i$  = Es el efecto del tratamiento (Tris - yema de huevo de codorniz 15, 20%; Tris - yema de huevo de gallina 20%)
- $E_{ij}$  = Es el error experimental

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

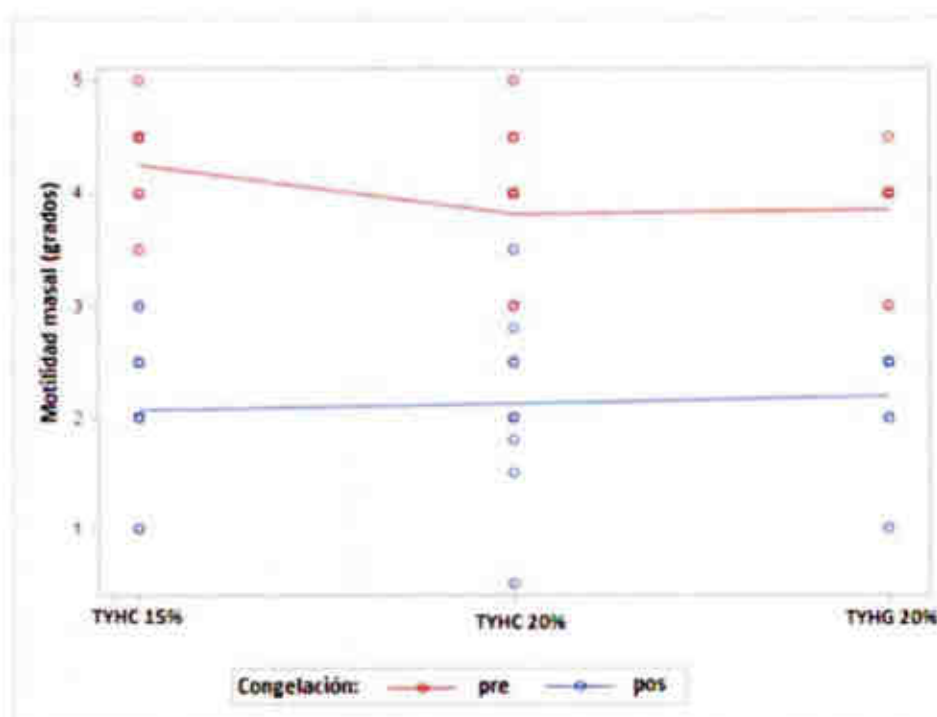
### 4.1. Motilidad masal

Los resultados se muestran en el Cuadro 7. Los tratamientos dilutor Tris - yema de huevo de codorniz al 15 y 20%, Tris – yema de huevo de gallina al 20% no afectan ( $P > 0.05$ ) la motilidad masal de los espermatozoides frescos y congelados. La motilidad masal es diferente ( $P < 0.05$ ) entre espermatozoides epididimarios frescos y congelados (media  $\pm$  desviación estándar;  $4.0 \pm 0.59$  vs  $2.1 \pm 0.59$ ). Entre las variables de estudio tipo de dilutores y espermatozoides frescos y congelados no hubo interacción ( $P > 0.05$ ), Figura 1.

**Cuadro 7.** Motilidad masal (media  $\pm$  desviación estándar) de espermatozoides epididimarios de toros criollos colectados a postmortem con dilutor Tris - yema de huevo de codorniz y gallina en criopreservación.

Yema de huevo	n	Espermatozoides	
		Frescos	Congelados
Codorniz 15 %	10	4.3 $\pm$ 0.51 a	2.1 $\pm$ 0.55 b
Codorniz 20 %	10	3.8 $\pm$ 0.80 a	2.1 $\pm$ 0.74 b
Gallina 20 %	10	3.9 $\pm$ 0.47 a	2.2 $\pm$ 0.48 b

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



**Figura 1.** Motilidad masal de espermatozoides epididimarios de toros criollos colectados a postmortem, utilizando dilutor Tris - yema de huevo de codorniz al 15 y 20% (TYHC), Tris - yema de huevo de gallina al 20% (TYHG) antes y después de la congelación.

Entre los dilutores Tris - yema de huevo del codorniz al 15 o 20%, yema de huevo de gallina al 20%, tienen efectos similares sobre la motilidad masal de espermatozoides epididimarios. El movimiento de los espermatozoides es un indicador de la posibilidad de fertilidad, ambas yemas de huevo preservaron la motilidad espermática. Trimeche *et al.* (1997) demostraron que la yema de huevo, ya sea de gallina o de codorniz, mejora significativamente la supervivencia de los espermatozoides criopreservados de burros Poitou. La cantidad de sus componentes de la yema de huevo de codorniz al 15% sería suficiente para preservar la motilidad espermática, como lo hace la yema de huevo de gallina al 20% con el dilutor Tris. La composición química y lipídica de la yema de huevo codorniz y de gallina son similares (Anton y Gandemer, 1995).

Respecto a la motilidad masal entre espermatozoides frescos y congelados, los resultados de esta investigación son similares a los reportes de Ribeiro-Peres *et al.* (2014) que obtuvieron  $3.5 \pm 0.5$  para espermatozoides frescos,  $2.1 \pm 0.8$  para congelados por método convencional, y  $2.0 \pm 0.6$  por método automatizado; Luzón (2015) encontró 86% de motilidad masal para espermatozoides epididimarios colectados 2 h postmortem. Barbosa *et al.* (2012) reportaron en espermatozoides en fresco  $3.6 \pm 0.7$ , descongelados  $1.3 \pm 0.5$ ; Martins *et al.* (2009) encontraron antes de la congelación  $3.2 \pm 0.5$ , después de la congelación  $2.6 \pm 0.5$  para los espermatozoides provenientes de epididimos refrigerados a 5 °C. Las muestras de espermatozoides frescos presentaron resultados superiores en las motilidades y otros parámetros cuando comparados a los métodos de congelación convencional y automatizado (Ribeiro-Peres *et al.*, 2014).

En la evaluación de la motilidad masal, entre espermatozoides epididimarios antes y después de la congelación, hubo diferencia, posiblemente por el aumento del daño

celular debido a los fenómenos físicos y químicos que se producen durante la congelación del espermatozoide. Sobre las causas que producen el daño espermático por el proceso de la congelación – descongelación, existen varias hipótesis como shock por frío, estrés osmótico, formación de cristales de hielo y daño oxidativo (Watson, 2000).

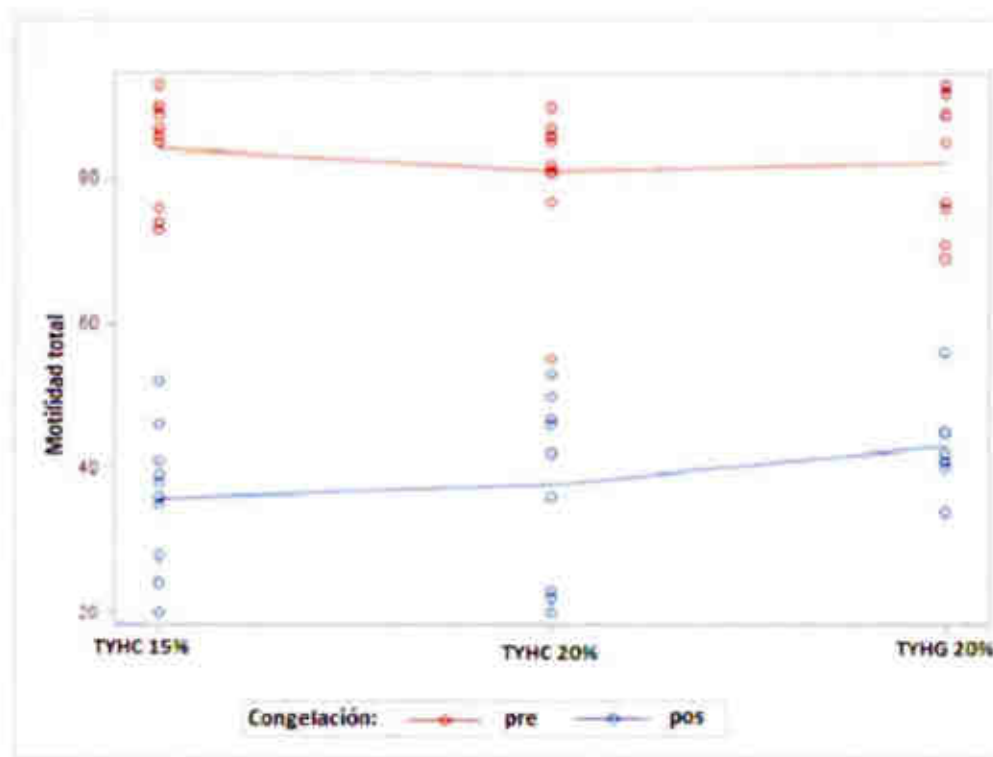
#### 4.2. Motilidad total

La motilidad total de los espermatozoides antes y después de la congelación son similares ( $P > 0.05$ ) al usar los dilutores Tris - yema de huevo de codorniz al 15 y 20%, Tris – yema de huevo de gallina al 20%. Los espermatozoides epididimarios frescos tienen mayor ( $P < 0.05$ ) motilidad que los frescos ( $82.5 \pm 8.78$  vs  $38.9 \pm 9.66\%$ ). En la Figura 2, entre factor de concentraciones de yema de huevo de codorniz 15 y 20%, gallina 20%, y el factor espermatozoides frescos y congelados no hubo interacción ( $P > 0.05$ ).

**Cuadro 8.** Porcentaje de motilidad total (media  $\pm$  desviación estándar) de espermatozoides epididimarios de toros criollos colectados a postmortem con dilutor Tris – yema de huevo de codorniz y gallina en criopreservación.

Yema de huevo	n	Espermatozoides	
		Frescos	Congelados
Codorniz 15 %	10	84.3 $\pm$ 7.27 a	35.9 $\pm$ 9.77 b
Codorniz 20 %	10	81.0 $\pm$ 9.87 a	37.7 $\pm$ 12.93 b
Gallina 20 %	10	82.3 $\pm$ 9.21 a	43.0 $\pm$ 6.28 b

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



**Figura 2.** Motilidad total de espermatozoides epididimarios de toros criollos colectados a postmortem, utilizando dilutor Tris - yema de huevo de codorniz al 15 y 20% (TYHC), Tris - yema de huevo de gallina al 20% (TYHG) antes y después de la congelación.

Estudios sobre motilidad total espermática fueron reportados por Quispe (2015) en semen fresco  $80.06 \pm 11.68$  (0 h de refrigeración a  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ),  $49.26 \pm 15.68$  para semen descongelado; Martins *et al.* (2009) antes de la congelación  $78.1 \pm 10.2\%$  (0 h de refrigeración a  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), después de la congelación  $51.6 \pm 11.6\%$ ; Ribeiro-Peres *et al.* (2014) encontraron para espermatozoides frescos  $74.5 \pm 5.2$ , para congelados  $29.5 \pm 14.9$  (congelación convencional),  $25.5 \pm 12.1$  (congelación automatizada). Luzón (2015) reporta 76% para espermatozoides frescos procedentes de epididimos 2 h post mortem, incluso señala 26% de motilidad hasta 120 h postrefrigeración espermática. Otros estudios por Barbosa *et al.* (2012) reportan motilidades espermáticas en fresco  $74 \pm 7.0$ , congelados  $30.0 \pm 8.2$ ; Saavedra *et al.* (2012) obtuvieron para semen fresco  $51.5 \pm 2.50$  en la ganadería uno, y  $53.17 \pm 3.31$  en la ganadería dos. Los resultados de

este estudio se encuentran dentro de los rangos mencionados, aunque superior al reporte de Albert y Barrios (2006) que encontraron en espermatozoides frescos 34.23 y 26.8, cuya colección fue de epididimos transportados bajo dos diferentes temperaturas 35 y 25 °C respectivamente.

Las variaciones podrían deberse al tiempo de colección de espermatozoides del epididimo, componentes de los dilutores, cantidad de dilutor usado, estado fisiológico del animal entre otros factores. Fiser y Fairfull (1986) mencionan que la adición de yema de huevo al dilutor tiene un efecto benéfico sobre el porcentaje de motilidad, después de un rápido enfriamiento del semen a 10 y 5 °C, las lipoproteínas de baja densidad actúan como crioprotectores, contribuyendo a la protección contra el shock de frío y manteniendo la viabilidad del espermatozoide. Las lipoproteínas de baja densidad como la lecitina, realizan igual acción protectora para los espermatozoides durante el shock térmico severo, aunque las lipoproteínas son superiores durante el enfriamiento y almacenaje en frío (Martínez *et al.*, 2011). La fracción lipídica de la yema de huevo (lecitina y cefalina) tiene una acción protectora, y la fracción lipoproteica, un efecto conservador (Daza, 1994), ya que preserva la motilidad e integridad de las membranas del acrosoma y mitocondrias del espermatozoide además es un buffer osmótico, se ha notado que la yema de huevo protege durante la congelación, ya que se adhiere a la membrana y la recubre, esta facultad de protección se adjudica a la gran densidad de la fracción de lipoproteínas (Carpio, 2015).

El mecanismo preciso por el que la yema de huevo protege los espermatozoides durante la congelación - descongelación aún no está claro. Se sugiere que la yema de huevo protege a los espermatozoides por dos mecanismos: induciendo resistencia al frío y mejorando la supervivencia durante el almacenamiento; el fosfolípido es el

componente responsable de la resistencia al choque de frío, estas lipoproteínas se localizan en la fracción soluble de la yema de huevo y se identifican como lipoproteínas de baja densidad (Watson, 1981). Otros como Graham y Foote (1987) sugieren que los fosfolípidos de la yema de huevo podrían fusionarse con los espermatozoides, reemplazar algunos fosfolípidos, la fosfatidilserina sola o en combinación con fosfatidilcolina, que es el fosfolípido eficaz para proteger los espermatozoides.

La yema de huevo de codorniz tiene más fosfatidilcolina y menos fosfatidiletanolamina, posee mejor índice de ácidos grasos poliinsaturados, por lo que la motilidad espermática mejora en el proceso de congelación y descongelación de espermatozoides de burros Poitu (Trimeche *et al.*, 1997). El efecto de la yema de huevo de codorniz y de la gallina, en este estudio fue similar, entonces ambos preservan los espermatozoides, posiblemente entre otros factores porque los ácidos grasos poliinsaturados permiten mayor cobertura al shock térmico y mayor estabilización de la membrana acrosomal.

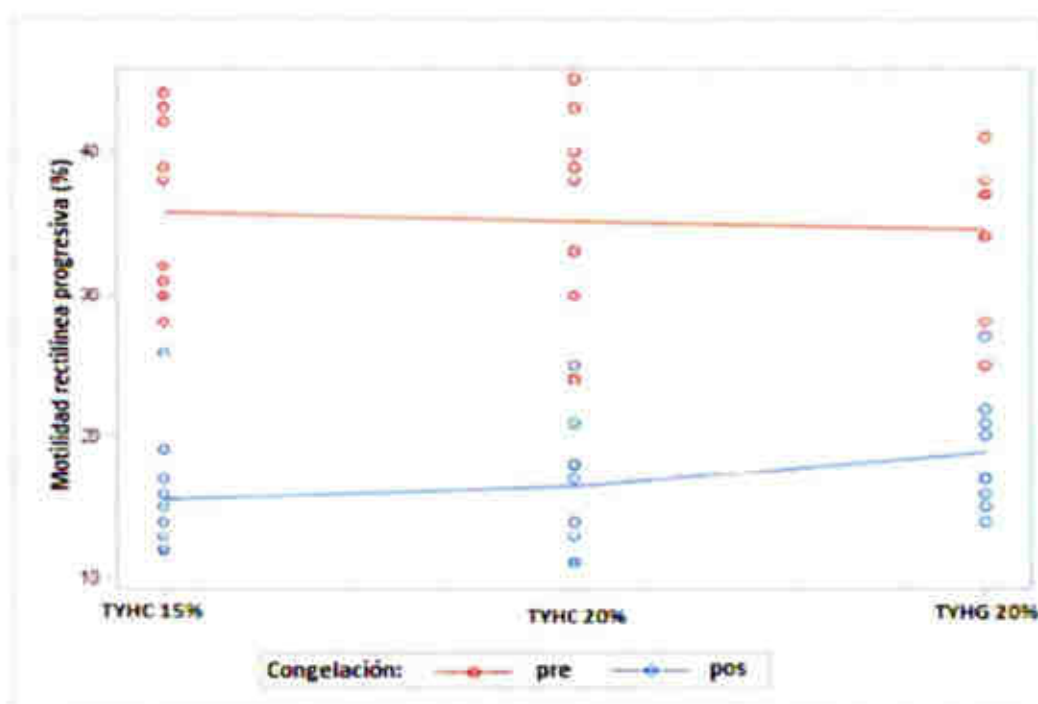
#### **4.3. Motilidad rectilínea progresiva**

Los resultados se observan en el Cuadro 9. Los dilutores Tris - yema de huevo de codorniz al 15 y 20%, Tris - yema de huevo de gallina al 20% actúan similarmente ( $P > 0.05$ ) sobre la motilidad rectilínea progresiva de espermatozoides frescos y congelados. Esta motilidad es diferente ( $P < 0.05$ ) entre espermatozoides frescos y congelados ( $35.1 \pm 6.33$  vs  $16.9 \pm 4.39\%$ ). Entre los factores dilutores y los espermatozoides antes y después de la congelación no presentan interacción ( $P > 0.05$ ) sobre la motilidad rectilínea progresiva, se ve en la Figura 3.

**Cuadro 9.** Porcentaje de motilidad rectilínea progresiva (media  $\pm$  desviación estándar) de espermatozoides epididimarios de toros criollos colectados a postmortem con dilutor Tris – yema de huevo de codorniz y gallina en criopreservación.

Yema de huevo	n	Espermatozoides	
		Frescos	Congelados
Codorniz 15 %	10	35.7 $\pm$ 6.13 a	15.6 $\pm$ 4.35 b
Codorniz 20 %	10	35.1 $\pm$ 7.79 a	16.4 $\pm$ 4.69 b
Gallina 20 %	10	34.6 $\pm$ 5.08 a	18.8 $\pm$ 4.12 b

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



**Figura 3.** Motilidad rectilínea progresiva de espermatozoides epididimarios de toros criollos colectados a postmortem, utilizando dilutor Tris - yema de huevo de codorniz al 15 y 20% (TYHC), Tris - yema de huevo de gallina al 20% (TYHG) antes y después de la congelación.

La motilidad rectilínea progresiva de los espermatozoides frescos y congelados, encontrados en esta investigación, no fue afectado por los dilutores Tris - yema de huevo de codorniz al 15 y 20%, Tris – yema de huevo de gallina al 20%. Similar a la motilidad espermática total, los componentes de ambas yemas de huevo estarían actuando de forma similar, dado que la composición química y lipídica son parecidas; esta afirmación podría ser colaborada por Anton y Gandemer (1995), ellos mencionan, que la composición química y lipídica de la yema de huevo codorniz y de gallina son similares. Sin embargo, Trimeche *et al.* (1997) demostraron que la yema de huevo de codorniz al 2, 10, 15 y 20% tuvo mejor resultado que huevo de gallina sobre la motilidad de espermatozoides a postcongelación de burros Poitou las yemas fueron mezclados con el dilutor medio INRA 82. Ellos observaron que la yema de huevo de codorniz contiene menos ácidos grasos poliinsaturados y más fosfatidilcolina que la yema de huevo de gallina; las diferencias en ácidos grasos poliinsaturados y en fosfolípidos entre yema de huevo de codorniz y de gallina, podría explicar el mejor efecto crioprotector de yema de huevo de codorniz. La cantidad de sus componentes de la yema de huevo de codorniz al 15%, en el presente estudio, sería suficiente para preservar la motilidad espermática, como lo hace la yema de huevo de gallina al 20% con el dilutor Tris.

La motilidad rectilínea progresiva de los espermatozoides encontrados en este estudio para espermatozoides frescos y congelados fueron similares a los obtenidos por Quispe (2015) para semen fresco  $44.76 \pm 10.31$  y  $19.57 \pm 5.18$  en semen congelado, pero fueron inferiores a los reportes de Valverde (2016) quien encontró motilidad individual progresiva de espermatozoides colectados del epididimo transportados a dos temperaturas, para espermatozoides frescos  $84.2 \pm 1.54$  ( $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ),  $67.5 \pm 7.04$  ( $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), a la descongelación  $33.4 \pm 2.4$  ( $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ );  $22.8 \pm 2.81$  ( $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). El medio de transporte de los

epidídimos fue lactato de Ringer a temperatura de 5 y 20 °C, los espermatozoides fueron diluidos con AndroMed® y evaluados con equipo computarizado de análisis de semen; estos factores podrían influir en los valores altos de motilidad. En otro estudio Cunha *et al.* (2016) obtuvo la motilidad en fresco  $57.5 \pm 1.8\%$ , a la postdescongelación  $35.2 \pm 4.1\%$ . Las diferencias encontradas podrían ser explicadas por el tipo de dilutor utilizado, protocolo de dilución, congelación, procedimiento de evaluación espermática, tamaño muestral; además de los efectos de la yema de huevo descrito antes.

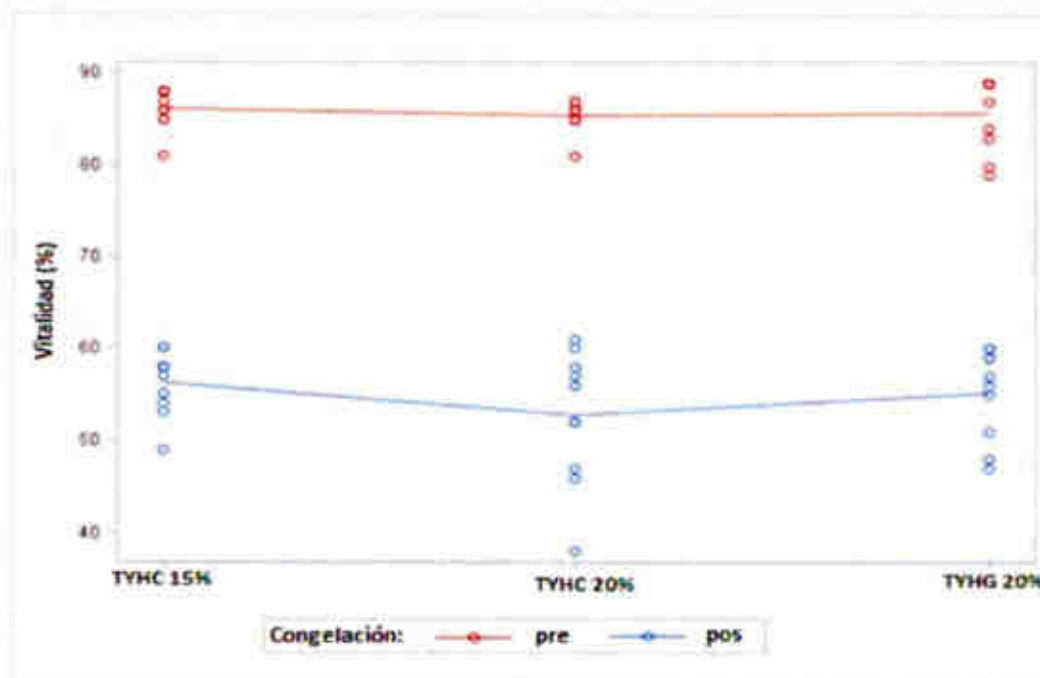
#### 4.4. Vitalidad

Los resultados se ven en el Cuadro 10. La vitalidad de los espermatozoides frescos y congelados son afectados similarmente ( $P > 0.05$ ) al usar dilutores Tris - yema de huevo de codorniz al 15 y 20%, Tris – yema de huevo de gallina al 20%. La vitalidad de los espermatozoides frescos es mayor ( $P < 0.05$ ) que los congelados ( $85.8 \pm 2.64$  vs  $54.7 \pm 5.20\%$ ) independientemente al tipo de dilutor. En la Figura 4, se observa que no hay interacción ( $P > 0.05$ ) entre los factores tipo de dilutor y los espermatozoides frescos y congelados.

**Cuadro 10.** Porcentaje de vitalidad (media  $\pm$  desviación estándar) de espermatozoides epididimarios de toros criollos colectados a postmortem con dilutor Tris – yema de huevo de codorniz y gallina en criopreservación.

Yema de huevo	n	Espermatozoides	
		Frescos	Congelados
Codorniz 15 %	10	86.2 $\pm$ 2.20 a	56.2 $\pm$ 3.46 b
Codorniz 20 %	10	85.4 $\pm$ 1.71 a	52.7 $\pm$ 7.26 b
Gallina 20 %	10	85.8 $\pm$ 3.99 a	55.2 $\pm$ 4.89 b

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



**Figura 4.** Vitalidad de espermatozoides epididimarios de toros criollos colectados a postmortem, utilizando dilutor Tris - yema de huevo de codorniz al 15 y 20% (TYHC), Tris - yema de huevo de gallina al 20% (TYHG) antes y después de la congelación.

Ribeiro-Peres *et al.* (2014) reportan una vitalidad de espermatozoides en fresco,  $69.4 \pm 10.7\%$ ; congelación convencional,  $53.9 \pm 11.8\%$ ; congelación automatizada,  $52.7 \pm 9.0\%$ , estas cifras últimas son similares al presente estudio, también se aproxima el reporte de Valverde (2016), que considera dos temperaturas de almacenamientos (5 y 20 °C) de epididimos a la descongelación, 5 °C:  $63.0 \pm 2.61$  y 20 °C:  $52.9 \pm 2.96\%$ ; Saavedra *et al.* (2012) obtuvieron vitalidad para semen fresco  $77.17 \pm 6.05$  (ganadería 1) y  $77.83 \pm 3.87$  (ganadería 2); Quispe (2015) reportó  $77.88 \pm 6.31$  en semen fresco. Las variaciones podrían ser influenciadas principalmente por los componentes de los dilutores, genética del animal y otros factores.

## V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### a) CONCLUSIONES

En la criopreservación de espermatozoides epididimarios de toros criollos postmortem, los dilutores Tris – yema de huevo de codorniz al 15 y 20%, y de gallina al 20% tienen efectos similares sobre la motilidad masal de los espermatozoides antes y después de la congelación.

Los dilutores Tris – yema de huevo de codorniz al 15 y 20%, y de gallina al 20% tienen efectos similares sobre la motilidad total y motilidad progresiva de espermatozoides epididimarios, antes y después de la criopreservación, de toros criollos postmortem.

La vitalidad de los espermatozoides epididimarios colectados postmortem de toros criollos, antes y después de la congelación, tienen efectos similares al utilizar dilutores Tris – yema de huevo de codorniz al 15 y 20%, y de gallina al 20%.

La yema de huevo de codorniz o de gallina, se puede usar como componente del dilutor Tris, en procesos de criopreservación de espermatozoides epididimarios en toros criollos.

#### **b) RECOMENDACIONES**

Realizar estudios sobre evaluación espermática de epididimios con varias técnicas descritas para uso de semen convencional de toros.

Ampliar la evaluación de uso de yema de huevo de otras aves y en diferentes concentraciones en los dilutores para congelación de espermatozoides y de semen en bovinos.

Colectar espermatozoides del epididimo de diferentes especies con fines de evaluar técnicas de biotecnología reproductivas para preservar especies en extinción o similares.

## VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agüero, G. (2012). *Evaluación de las características seminales de sementales bovinos mediante el Analizador Seminal Computarizado (CASA)*. (Tesis de maestría). Universidad Central de Venezuela. Venezuela.
- Albers, M., y Barrios, D. (2006). Movilidad individual de los espermatozoides epididimarios de toros postmortem obtenidos mediante lavado retrógrado. *Revista Zootecnia Tropical*, 24(3), 267-280.
- Anduaga, J. (1980). *Estudio comparativo de la congelación de semen bovino con el dilutor Tris (hidroximetil-aminometano)*. (Tesis profesional). Universidad Nacional Agraria la Molina. Lima, Perú.
- Anton, M., y Gandemer, G. (1995). Composition, solubility and emulsifying properties of granules fractionated from hen egg yolk. In *European VI Symposium on the quality of Eggs and Egg Products. Zaragoza, Spain* (pp. 25-29).
- Aquino, Y. N., Veli, E. A., Seoane, E. R., Palma, V. R., y Estrada, R. (2008). Variabilidad genética de bovinos criollos de Perú utilizando marcadores microsatélites. *Archivos de zootecnia*, 57(219), 337-340.
- Barbosa, L. M., Kanazawa, M. Y., Peres, A. R., y de Souza, F. F. (2012). Viabilidade do sêmen congelado obtido do epididimo de touros post-mortem. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária* 19 (3), 190-194.
- Baker D. J. (2007). Semen analysis. *Clinical Laboratory Science*, 258-269.
- Beall, P. T. (1983). States of wáter in biological sistema. *Cryobiology*, 20, 324-334

- Belascoain, M. Diaz E., y Hüter S. (2010) Técnicas para la criopreservación de embriones bovinos. Trabajo final para optar al título de especialista en reproducción Bovina. Córdoba, Argentina.
- Bethancourt, H., y Bolívar, T. (2013). Caracterización genética del ganado Criollo Lechero Dominicano utilizando microsatélites. *Revista Agropecuaria y Forestal APF* 2(1), 43-48.
- Bravo, P. W., y Alarcon, V. (2013). Preservación de semen y avances recientes en la inseminación artificial de llamas y alpacas. *Spermova*, 3(2), 158-160.
- Cabrera P., Ayulo, A., y Pantoja, C. (2011). Efecto del dilutor tris y citrato con yema de huevo de cormiz sobre la viabilidad espermática en semen ovino congelado en pajillas. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 22(2), 105-113.
- Camargo, W. F. (2006). Espermatogênese em Bovinos. *Monografia apresentada à disciplina "Seminário em Reprodução animal I" do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Área de Reprodução Animal, Curso de Mestrado, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP – Campus de Botucatu.*
- Carpio, S. V. (2015). Evaluación de dos diluyentes para la crioconservación de semen bovino: Yema de huevo vs leche descremada. (Tesis profesional). Universidad Politécnica Salesiana Sede Cuenca. Cuenca, Ecuador.
- Castelo, T. S., Frota, T. R., y Silva, A. R. (2008). Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. *Acta Veterinaria Brasilica*, 2(3), 67-75.

- Cavestany, D. (1994). *Procesamiento y congelación de semen de toro*. Montevideo: Editorial Santa Catalina.
- Chenoweth, P. (1997). *Clinical reproductive anatomy and physiology of the bull*. En Youngquist R.S. (Ed.) *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. Saunders, pp. 217- 229.
- Córdova A. (2003). *Fisiología Dinámica*. Barcelona: Editorial Masson.
- Cunha, A. T., Carvalho, J. O., Kussano, N. R. Martins, C. F., Mourão, G. B., y Dode, M.A. (2016). Bovine epididymal spermatozoa: Resistance to cryopreservation and binding ability to oviductal cells. *Cryobiology*, 73, 348-355.
- Curbelo, M., y Rodríguez, Z. (2013). *Relevamiento de laboratorios de procesamiento de semen bovino en Uruguay*. (Tesis Doctoral). Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.
- Dacheux, J. L., Dacheux, F., y Druart, X. (2016). Epididymal protein markers and fertility. *Animal Reproduction Science*, 169,76-87.
- Daza, J. (1994). *Inseminación artificial y andrología bovina*. Montería (Córdoba): Editorial Multimpresos.
- Donoghue, A. y Wishart, G. (2000). Storage of poultry semen. *Animal Reproduction Science* 62, 213-232.
- Fayrer-Hosken, R. (1997). Anatomy and physiology of the bull's reproductive system. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 13(2), 195-202.

- Fiser, P. S., y Fairfull, R. W. (1986). The effects of rapid cooling (cold shock) of ram semen, photoperiod, and egg yolk in diluents on the survival of spermatozoa before and after freezing. *Cryobiology*, 23(6), 518-524.
- Flores, H. (2005). *Efecto del enfriado lento hasta -5°C previo a la congelación sobre la estructura y funcionalidad de la membrana plasmática del espermatozoide porcino*. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Autónoma de México. Cuahutitlán Izcalli, México.
- Gadea, J. (2003). Los diluyentes de la inseminación artificial porcina. Revisión. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 1(2), 17-27.
- Galarza, A. (2013). *Eficacia de dos diluyentes: Tris + Lecitina de Soya (Andromed®) y Tris + Yema de Huevo (Triladyl®), en la crioconservación de semen de toro de la raza Jersey en Cuenca – Ecuador*. (Tesis de Maestría). Universidad de Cuenca. Ecuador.
- Galina, C., y Valencia, J. (2008). *Reproducción de animales domésticos* (3ra ed.). Mexico: Editorial Limusa.
- Garner, D.L., y Hafez, E. S. E. (2000). *Reproducción e inseminación artificial en animales*. México: Editorial interamericana McGraw Hill.
- Google Earth, 2017. Recuperado de <https://earth.google.com/web/@-13.64187874,-72.88803149,2295.33450139a,25.22413793d,35y,192.68380799h,0t,0r/data=CkkaVxJRChYweDA6MHg5ZDU0MDk4OG11MmRmZDA3Gd5ab7ajSCvAIYmd2lnVOFLAKiVGYWN1bHRhZCBEZSBNZWRpY2luYQpWZXRlcmluYXJpYSBZ4oCmGAIgAQ>

- González, J. (2011). Evaluación sensorial de huevos de codorniz en conserva y composición nutrimental. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 12(8), 1-10.
- Graham, J. K., & Foote, R. H. (1987). Effect of several lipids, fatty acyl chain length, and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiology*, 24(1), 42-52.
- Hafez, E., y Hafez, B. (2000). *Reproducción e inseminación artificial en animales* (7ma ed.). México: McGraw Hill.
- Hammerstedt, R., Graham, J., y Nolan, J. (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *Journal of Andrology*, 11, 73-88.
- Hernández, A. (2012). *Valoración funcional de semen criopreservado de toros mediante análisis computarizado e integridad de la cromatina espermática*. (Tesis Doctoral). Universidad Central de Venezuela. Venezuela.
- Hewitt, D., Leahy, R., Sheldom, I., y England, G.C. (2001). Cryopreservation of epididymal dog sperm. *Animal Reproduction Science*, 67(1), 101-111.
- Hidalgo, C., Tamargo, C., y Díez, C. (2002). Análisis de semen bovino. *Boletín informativo del SERIDA - 2*, 39-43.
- INEI. Instituto Nacional de Estadística e Informática. (2012). Resultados definitivos IV Censo Nacional Agropecuario 2012.
- INIA. Instituto Nacional de Innovación Agraria (2014). Estación Experimental Agraria Santa Ana – Huancayo. Hoja divulgativa 1.

- Januškauskas, A., y Žilinskas, H. (2002). Bull semen evaluation post-thaw and relation of semen characteristics to bull's fertility. *Veterinarija ir Zootechnika*, 17(39).
- Juyena, N. y Stelletta, C. (2012). Seminal plasma: An essential attribute to spermatozoa. *Journal of Andrology*, 33, 536-551.
- Knobit, E., Neill, J. D., y Adashi, E. Y. (1998). Enciclopedia de reproducción. Volumen 1. Academic press.
- Kaabi, M., Paz, P., Alvarez, M., Anel, E., Boixo, J.C., Rouissi, H., Herraiez, P., y Anel, L. (2003). Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. *Theriogenology*, 60, 1249-1259.
- König, H., y Liebich, H. (2005). *Anatomía de los animales domésticos*. Vol 2: Órganos, sistema circulatorio y sistema nervioso. Madrid: Editorial Médica Panamericana.
- Layek, S. S., Mohanty, T. K., Kumaresan, A., y Parks, J. E. (2016). Cryopreservation of bull semen: evolution from egg yolk based to soybean based extenders. *Animal reproduction science*, 172, 1-9.
- Love, C. (2016). Modern Techniques for Semen Evaluation. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 32, 531-546.
- Luzón, F. (2015). *Estudio de dos métodos de colecta de espermatozoides epididimarios en toros post mortem*. (Tesis profesional). Universidad Nacional de Loja. Ecuador.

- Madrid-Bury, N. (2004). *Relación entre los métodos de valoración seminal in vitro y la fertilidad in vivo del semen descongelado de toros frisonex*. (Tesis Doctoral). Universidad Complutense de Madrid. España.
- Martínez, J., Duverger, O., Díaz, N., Interian, L., y Gonzáles, D. (2011). Efecto de diferentes niveles de yema de huevo en la congelación del semen caprino en un medio liofilizado a base de Tris. *Ciencia y Tecnología Ganadera*, 5(1), 33-38.
- Martins, C., Driessen, K., Melo Costa, P., Carvalho-Neto, J., de Sousa, R., Rumpf, R. y Dode, M. (2009). Recovery, Cryopreservation and Fertilization Potential of Bovine Spermatozoa Obtained from Epididymides Stored at 5 Degrees C by Different Periods of Time. *Animal reproduction science* 116(1-2), 50-57.
- Martins, C., Rumpf, R. Pereira, D. y Dode, M. (2007). Cryopreservation of epididymal bovine spermatozoa from dead animals and its uses in vitro embryo production. *Animal Reproduction Science* 101(3-4), 326-331.
- Mazur, P. (1984). Freezing of living cells: Mechanisms and implications. *American journal of physiology - Cell Physiology*, 247(3), 125-142.
- Mendiola, E. (2002). *Evaluación comparativa nutricional entre los huevos de codorniz japónica (coturnix coturnix) y gallina criolla (gallus gallus) en la primera etapa de postura*. (Tesis profesional). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Perú.
- Muiño, R., Fernández, M., y Peña A. (2006). Parámetros cinéticos en eyaculados bovinos de toro de raza Frisona y Rubia Gallega. *Información Técnica Económica Agraria ITE*, 102(1), 55-66.

- Muiño, R., Tamargo, C., Hidalgo, C., y Peña, A. (2007). Identification of sperm subpopulations with defined motility ~ characteristics in ejaculates from Holstein bulls: effects of cryopreservation and between-bull variation. *Animal Reproduction Science*, 109(1-4), 27-39.
- Muiño, R. (2008). *Evaluación de la motilidad y viabilidad del semen bovino mediante el uso de sistemas CASA y citometría de flujo: Identificación de subpoblaciones espermáticas*. (Tesis de Doctorado). Universidad Santiago de Compostela. España.
- Noakes, D., Parkinson, T., y England G. C. (2001). *Arthur's veterinary reproduction and obstetrics* (8va Ed.). Inglaterra: Saunders.
- Parks, J.E., y Graham, J.K. (1992). Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, 38(2), 209-222
- Primo, A. T. (1992). El ganado bovino Ibérico en las Américas 500 años después. *Archivos de zootecnia*, 41(154), 421-432.
- Quispe, A. E. (2015). *Evaluación de la sobrevivencia y fertilidad in vivo de espermatozoides del epidídimo de toros criollos post mortem*. (Tesis profesional). Universidad Nacional del Altiplano, Puno. Perú.
- RAE. Real Academia Española. (2017). Recuperado de <http://www.rae.es/>
- Ribeiro-Peres, A., Munita-Barbosa, L., Yumi-Kanazawa, M., Mello-Martins, M. I., y Ferreira de Souza, F. (2014). Criopreservación de espermatozoides bovinos extraídos de la cola del epidídimo utilizando los métodos convencional y automatizado. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 46(1), 31-38.

- Rigau, T., Farré, M., Ballester, J., Mogas, T., Peña, A., y Rodríguez-Gil, J. (2001). Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates. *Theriogenology*, 56(5), 801-815.
- Robaire B., Hinton, B. T., y Orgebin-Crist, M. C. (2006). *The epididymis. Pages 1071–1148 in Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. (3rd ed). Amsterdam, the Netherlands: Editorial Elsevier.
- Rodríguez-Martínez, H. (2007). In vitro evaluation of sperm quality related to in vivo function and fertility. *Society for Reproduction and Fertility* (suppl 1) 64, 39-54.
- Rodríguez-Martínez, H. (2013). Semen evaluation techniques and their relationship with fertility. *Animal Reproduction Science*, 10(3), 148-159.
- Rossi, A. (2012). *Efecto de la refrigeración y la adición de trehalosa en los parámetros de viabilidad microscópicos de semen bovino*. (Tesis profesional). Pontificia Universidad Católica. Argentina.
- Rota, A., Penzo, N., Vicenti, L., y Mantovani, R. (2000). Hypoosmotic swelling (HOS) as a screening assay for testing in vitro fertility of bovine spermatozoa. *Theriogenology*. 53(7), 1415-1420.
- Rutter, B. (2006). *Bases para la Evaluación de la aptitud Reproductiva del Toro* (2da ed.). Argentina: Editorial Agro-Vet, págs. 113-135. ISBN 950-9763-42-X
- Saavedra, G. D., Mas, A., Sanes, J. M., Vallejo, P., Matas, C., y Seva, J. I. (2012). Parámetros testiculares y características morfológicas de los espermatozoides

epididimarios obtenidos postmortem en el toro de lidia. *Anales de veterinaria (Murcia)*, 28, 7-13.

Safranski, T.J., Ford, J.J., Rohrer, G.A., y Guthrie, H.D. (2011). Plenary contribution to International Conference on Boar Semen Preservation 2011. Genetic selection for freezability and its controversy with selection for performance. *Reproduction Domestic Animal*. 46 Suppl 2, 31-34.

SAS. (2011). SAS/STAT User's guide. (v 9.4) SAS Publishing, Cary (NC).

Sigma-Aldrich. Tris. Recuperado de <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/252859?lang=en&region=PE>

Siqueira J. B., Guimarães, J. D., Costa, E. P., Henry, M., Torres C.A., y Silva, M.V. (2007). Relação da taxa de gestação com sêmen bovino congelado e testes de avaliação espermática in vivo. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 36(2), 387-395.

Squires, E., Keith, S., y Graham, J. (2004). Evaluation for protective cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 62(6), 1056-1065.

Sisson, S., Grosman J. (1993). *Anatomía de los animales domésticos.*, Tomo I, (5ta Ed.). Mexico: Salvat.

Sisson, S., Grosman J. (2001). *Anatomía de los animales domésticos.* Tomo II, (5ta Ed.) 6ta reimpression. Barcelona: Editorial Masson S.A.,

Taller N. (2008). El huevo como aliado de la nutrición y la salud. *Revista Cubana de Alimentacion y Nutricion*, 18(2 Supl 1), S1-S15.



- Thomas C., Garner D. L., Dejarnette J., y Marshall C. (1998). Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. *Biology of Reproduction*, 58(3), 786-793.
- Trimeche, A., Anton, M., Renard, P., Gandemer, G., y Tainturier, D. (1997). Quail egg yolk: a novel cryoprotectant for freeze preservation of Poitou jacas sperm. *Cryobiology*, 34(4), 385-393.
- Valverde, E. (2016). *Efecto de dos temperaturas de almacenamientos (5 y 20 °C) de epididimos provenientes de toros de matadero sobre la calidad y congelabilidad de espermatozoides*. (Tesis profesional). Universidad de Cuenca. Ecuador.
- Vijaya, K., Ram, B., y Sai, K. (2013). Comparison of different methods for assessing sperm concentration in infertility workup: A review. *International Journal of Medicine and Medical Science*, 5(9), 396-400.
- Watson, P.F. (2000). The causes of reduced fertility with criopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 60-61, 481-492.
- Watson, P. F. (1981). The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 C by egg-yolk lipoprotein. *Journal of reproduction and fertility*, 62(2), 483-492.
- Woods, E. J., Benson, J. D., Agca, Y., y Critser, J. K. (2004). Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology* 48(2), 146-156.

## ANEXOS



**Figura 5.** Componentes del dilutor (Tris, ácido cítrico, glucosa, penicilina).



**Figura 6.** Adición y mezcla de componentes del dilutor.



**Figura 7.** Aspiración de la yema de huevo de codorniz.



**Figura 8.** Transporte de testículos en caja poliestireno.



**Figura 9.** Colección de espermatozoides del epididimo.



**Figura 10.** Campo microscópico para evaluación de motilidad masal, escala de 0 a 5.



**Figura 11.** Campo microscópico para evaluación de motilidad total, motilidad rectilínea progresiva del espermatozoide.



**Figura 12.** Campo microscópico para evaluación de vitalidad espermática.



**Figura 13.** Refrigeración de los espermatozoides epididimarios diluidos.



**Figura 14.** Empajillado de los espermatozoides epididimarios.



**Figura 15.** Pajillas con espermatozoides, sobre la parrilla sumergida al nitrógeno líquido.



**Figura 16.** Almacenamiento de espermatozoides epididimarios.



**Figura 17.** Descongelación de espermatozoides epididimarios.

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

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	65.5284	13.1057	34.6800	<.0001
Dilutor	2	0.2794	0.1397	0.3700	0.6923
Espermatozoo	1	64.1273	64.1273	169.6800	<.0001
Dilutor*Espermatozoo	2	1.1216	0.5608	1.4800	0.234
Error	68	25.6988	0.3779		
Total corregido	73	91.2272			

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

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	27309.8571	5461.9714	60.6500	<.0001
Dilutor	2	149.8497	74.9249	0.8300	0.4411
Espermatozoo	1	26968.9278	26968.9278	299.4600	<.0001
Dilutor*Espermatozoo	2	191.0796	95.5398	1.0600	0.3538
Error	50	4503.0000	90.0600		
Total corregido	55	31812.8571			

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

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	4719.5933	943.9187	31.2300	<.0001
Dilutor	2	11.3210	5.6605	0.1900	0.8298
Espermatozoo	1	4662.8750	4662.8750	154.2600	<.0001
Dilutor*Espermatozoo	2	45.3972	22.6986	0.7500	0.4772
Error	50	1511.3889	30.2278		
Total corregido	55	6230.9821			

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

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Valor	Pr > F
Modelo	14	28663.1131	2047.3652	15.7900	<.0001
Dilutor	2	63.9741	31.9870	0.2500	0.7818
Espermatozoo	4	28169.1311	7042.2828	54.3000	<.0001
Dilutor*Espermatozoo	8	430.0079	53.7510	0.4100	0.9105
Error	128	16599.1667	129.6810		
Total corregido	142	45262.2797			

**Cuadro 15.** Base de datos de las variables del estudio de espermatozoides epididimarios de toros criollos postmortem.

TRATAM	CONGELACIÓN	REPETICIÓN	MOT.MASAL	MOT.RECT.PROG	MOT.TOT	VITAL
15C	pre	1	4.5	.	.	.
15C	pre	2	4.5	.	.	.
15C	pre	3	4.5	.	.	.
15C	pre	4	5.0	.	.	.
15C	pre	5	4.5	30	90	86
15C	pre	6	4.0	38	86	85
15C	pre	7	3.5	43	85	88
15C	pre	8	4.5	42	89	86
15C	pre	9	4.5	31	74	88
15C	pre	10	4.5	30	87	81
15C	pre	11	3.0	44	90	85
15C	pre	12	4.0	28	76	88
15C	pre	13	4.0	32	73	87
15C	pre	14	4.5	39	93	88
20C	pre	1	4.5	.	.	.
20C	pre	2	4.5	.	.	.
20C	pre	3	4.0	.	.	.
20C	pre	4	4.0	.	.	.
20C	pre	5	2.0	40	81	85
20C	pre	6	5.0	30	90	86
20C	pre	7	3.0	43	81	87
20C	pre	8	4.0	38	77	86
20C	pre	9	4.0	45	87	85
20C	pre	10	3.0	.	55	86
20C	pre	11	4.5	24	86	87
20C	pre	12	3.0	39	86	86
20C	pre	13	4.0	24	82	81
20C	pre	14	4.0	33	85	85
20G	pre	1	4.0	28	76	89
20G	pre	2	4.0	34	69	83
20G	pre	3	4.0	25	85	89
20G	pre	4	4.0	37	71	80
20G	pre	5	4.0	34	89	89
20G	pre	6	4.0	.	.	84
20G	pre	7	3.0	38	89	89
20G	pre	8	3.0	37	93	79
20G	pre	9	4.5	37	77	87
20G	pre	10	4.0	41	92	89
20G	pre	11	.	.	.	.
20G	pre	12	.	.	.	.
20G	pre	13	.	.	.	.
20G	pre	14	.	.	.	.
15C	pos	1	2.5	.	.	.
15C	pos	2	2.0	.	.	.
15C	pos	3	2.5	.	.	.
15C	pos	4	2.5	.	.	.
15C	pos	5	1.0	12	28	49
15C	pos	6	2.0	19	38	53
15C	pos	7	1.0	12	36	55
15C	pos	8	2.0	14	24	54
15C	pos	9	2.5	26	46	58
15C	pos	10	2.0	13	41	60
15C	pos	11	2.0	15	52	58
15C	pos	12	3.0	17	20	60
15C	pos	13	2.0	16	35	57
15C	pos	14	2.0	12	39	58
20C	pos	1	2.5	.	.	.
20C	pos	2	2.0	.	.	.
20C	pos	3	.	.	.	.
20C	pos	4	.	.	.	.
20C	pos	5	1.5	18	47	56
20C	pos	6	2.0	11	23	60
20C	pos	7	2.5	17	50	61
20C	pos	8	2.0	11	22	52
20C	pos	9	2.0	13	20	38
20C	pos	10	0.5	.	.	47
20C	pos	11	1.8	14	36	52
20C	pos	12	2.8	21	53	57
20C	pos	13	3.5	18	46	46
20C	pos	14	2.5	25	42	58
20G	pos	1	2.5	17	.	60
20G	pos	2	2.5	21	41	47
20G	pos	3	2.5	17	40	59
20G	pos	4	2.0	27	45	60
20G	pos	5	2.0	22	56	59
20G	pos	6	2.5	16	45	48
20G	pos	7	2.0	20	34	56
20G	pos	8	2.5	15	41	55
20G	pos	9	1.0	.	.	51
20G	pos	10	2.5	14	42	57
20G	pos	11	.	.	.	.
20G	pos	12	.	.	.	.
20G	pos	13	.	.	.	.
20G	pos	14	.	.	.	.

