



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA



**EVALUACIÓN DE DOS DILUTORES COMERCIALES EN LA
CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN DE TORO BROWN SWISS**

TESIS

PRESENTADA POR:

ELVIS JANO AVILES MENDOZA

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

PUNO - PERÚ

2023



Reporte de similitud

NOMBRE DEL TRABAJO

EVALUACIÓN DE DOS DILUTORES COMERCIALES EN LA CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN DE TORO BROWN SWISS

AUTOR

ELVIS JANO AVILES MENDOZA

RECuento DE PALABRAS

18509 Words

RECuento DE CARACTERES

104927 Characters

RECuento DE PÁGINAS

91 Pages

TAMAÑO DEL ARCHIVO

8.1MB

FECHA DE ENTREGA

Oct 20, 2023 8:00 AM EST

FECHA DEL INFORME

Oct 20, 2023 8:02 AM EST

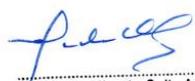
● 8% de similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base de datos

- 8% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 1% Base de datos de trabajos entregados
- 0% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Crossref

● Excluir del Reporte de Similitud

- Material bibliográfico
- Material citado
- Bloques de texto excluidos manualmente
- Material citado
- Coincidencia baja (menos de 20 palabras)


Dr. Pedro Ubaldo Coila Añasco
CMVP:2842


Mg. Sc. NUBIA LILIA CATAFORA FLORES
CMVP: 5032
UNA - PUNO

Resumen



DEDICATORIA

Dedicado a mis padres, hermanos, primos, abuelos, tíos, familiares, amigos y todas las personas que de alguna u otra manera me ayudaron y me ayudan a ser mejor en el largo porvenir de la vida.

Elvis Jano Aviles Mendoza.



AGRADECIMIENTOS

Mi sincero agradecimiento:

A mi Alma Mater Universidad Nacional del Altiplano por mi formación académico-profesional y a la plana docente de la gloriosa Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por las enseñanzas y vivencias compartidas, y haber sido como un segundo hogar a lo largo de mi trajinar.

Al Mg.Sc. Henry Ivan Gonzales Carpio y al establo las Mercedes del distrito de Mañazo, por su apoyo y a su vez brindarnos las facilidades necesarias para realizar esta investigación.

Al M.V.Z Carlos Washington Bustamante Quispe, por su apoyo incondicional en la elaboración de este presente trabajo.

Agradecimiento y estima especial a mi director de tesis M.Sc. Nubia Lilia Catacora Flores, por su apoyo, su tiempo y paciencia. Gracias por impartir sus conocimientos sabios.

A mis jurados, Dr. Ciriaco Teodoro Zuñiga Zúñiga, M.Sc. Jose Ivan Quiñones Garcia, M.Sc. Uri Harold Pérez Guerra. Por sus acertadas sugerencias para mejorar y finalizar mi trabajo de investigación.

A mis queridos padres, hermanos, y Wendy por el apoyo emocional y su esfuerzo, para que logre concluir esta etapa de mi vida.

A todos mis grandes amigos y personas que fui conociendo a lo largo de la vida, que me ayudaron siempre y me ayudan a ser mejor cada día, reflejando el accionar realizado en aras de un porvenir y un mundo mejor, mi gratitud a todos ustedes.

Elvis Jano Aviles Mendoza.



ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

RESUMEN 12

ABSTRACT..... 13

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN..... 16

1.1.1 Objetivo general 16

1.1.2 Objetivos específicos..... 17

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 CRIOPRESERVACIÓN 18

2.2 CRIOPROTECTORES 19

2.2.1 Agentes crio-protectores permeables 20

2.2.2 Agentes crio-protectores no permeables 20

2.2.2.1 Lectina de soya 21

2.2.2.2 Liposomas..... 22

2.3 MEDIOS DE DILUCIÓN 22

2.3.1 Yema de huevo 24

2.3.2 Extracto de soya (lecitina de soya)..... 25



2.4 PRINCIPALES DILUTORES USADOS PARA LA CRIOPRESERVACIÓN	
DE SEMEN BOVINO	26
2.4.1 Dilutor sintético comercial AndroMed.....	26
2.4.2 Dilutor sintético comercial OptiXcell	26
2.4.3 Similitudes y diferencias entre dilutores OptiXcell y AndroMed	27
2.4.4 Triladyl	29
2.4.5 Dilutor Tris	29
2.5 COLECCIÓN DE SEMEN BOVINO.....	30
2.6 CARACTERÍSTICAS SEMINALES DE TOROS.....	30
2.6.1 Características macroscópicas del semen bovino.....	30
2.6.1.1 Volumen	31
2.6.1.2 Color	32
2.6.1.3 Olor.....	32
2.6.1.4 Aspecto	32
2.6.1.5 PH.....	33
2.6.2 Características microscópicas del semen bovino	33
2.6.2.1 Motilidad individual	34
2.6.2.2 Vitalidad	34
2.6.2.3 Integridad de membrana (HOST).....	35
2.6.2.4 Concentración.....	36

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LUGAR DE ESTUDIO	37
3.2 TIPO DE ESTUDIO	37
3.3 ANIMALES Y TAMAÑO DE MUESTRA	37



3.3.1 Muestras seminales.....	38
3.4 DISEÑO EXPERIMENTAL	39
3.4.1 Variables en estudio	40
3.5 METODOLOGÍA	41
3.5.1 Colección de semen.....	41
3.5.2 Vagina artificial	41
3.5.3 La colección.....	42
3.5.4 Dilutores y procesamiento de semen	42
3.5.4.1 Preparación de los dilutores.....	42
3.5.4.2 Predilución.....	44
3.5.4.3 Dilución final.....	44
3.5.4.4 Rotulado de pajuelas.....	45
3.5.4.5 Envasado del semen en pajuelas.....	45
3.5.4.6 Descenso de la temperatura y fase de equilibrio	45
3.5.4.7 Criopreservación.....	45
3.5.4.7 Descongelación.....	46
3.6 EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS MACROSCOPICAS	46
3.6.1 Volumen	46
3.6.2 Color	47
3.7 EVALUACIÓN MICROSCÓPICA DEL ESPERMATOZOIDE	47
3.7.1 Concentración.....	47
3.7.2 Motilidad total	48
3.7.3 Motilidad total	49
3.7.4 Vitalidad espermática	49
3.7.5 Evaluación del Test Hipoosmotico (Host).....	50



3.8 ANALISIS ESTADÍSTICO 51

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**4.1 CARACTERÍSTICAS SEMINALES MACROSCÓPICAS A LA COLECCIÓN
..... 52**

4.1.1 Volumen seminal de toros reproductores según edad a la colección 52

4.1.2 Color de semen de toros reproductores a la colección 53

**4.2 CARACTERÍSTICAS SEMINALES MICROSCÓPICAS A LA PRE-
DILUCIÓN CON 2 DILUTORES COMERCIALES (ANDROMED Y
OPTIXCELL) 54**

**4.3 CARACTERÍSTICAS SEMINALES MICROSCÓPICAS A LA POST-
DESCONGELACIÓN CON 2 DILUTORES COMERCIALES (ANDROMED
Y OPTIXCELL) 58**

V. CONCLUSIONES..... 66

VI. RECOMENDACIONES 67

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 68

ANEXOS..... 80

Área: Reproducción animal

Tema: Evaluación de dilutores para criopreservación

FECHA DE SUSTENTACIÓN: 20 de octubre de 2023



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Composición química de dilutores AndroMed y OptiXcell.	27
Tabla 2.	Número de colecciones para cada dilutor comercial.	39
Tabla 3.	Volumen seminal de toros reproductores según edad a la colección (promedio).....	52
Tabla 4.	Características seminales de semen pre-diluido con dilutor AndroMed y Optixcell (promedio \pm desviación estándar).	54
Tabla 5.	Características seminales post-descongelación con el dilutor AndroMed y Optixcell (promedio \pm desviación estándar).	58
Tabla 6.	Características macroscópicas a la colección.....	85
Tabla 7.	Parámetros seminales a la predilución con el dilutor AndroMed y OptiXcell	85
Tabla 8.	Parámetros seminales a la post-descongelación con el dilutor AndroMed y OptiXcell.....	86
Tabla 9.	Estadística descriptiva del volumen seminal según el toro.....	87
Tabla 10.	One-way ANOVA para volumen seminal según edad del toro.	87
Tabla 11.	Prueba Post-Hoc de Tukey para volumen seminal según edad de toro.	87
Tabla 12.	Estadística descriptiva de los parámetros microscópicos a la pre- dilución según el tipo de dilutor AndroMed (T1) y OptiXcell(T2).	88
Tabla 13.	Prueba -t para muestras independientes de las características microscópicas según el tipo de dilutor a la pre- dilución.....	88
Tabla 14.	Estadística descriptiva de los parámetros microscópicos a la post- descongelación según el tipo de dilutor AndroMed (T1) y OptiXcell(T2)..	89
Tabla 15.	Prueba -t para muestras independientes de las características microscópicas según el tipo de dilutor a la post-descongelación.	89



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Diseño experimental.....	40
Figura 2.	Corrales de descanso de los toros donadores de semen.	81
Figura 3.	Preparación y armado de vagina artificial.	81
Figura 4.	Traslado e higienización de toros donadores de semen.....	81
Figura 5.	Pre- estimulación y monta falsa a los toros donadores.....	82
Figura 6.	Colección de semen bovino.....	82
Figura 7.	Dilutores comerciales AndroMed y OptiXcell.....	82
Figura 8.	Volumen de semen post colección.	83
Figura 9.	Control de volumen eyaculado, pre dilución y dilución final.	83
Figura 10.	Estabilización y refrigeración de pajillas de semen.	84
Figura 11.	Proceso de crioconservación de semen.	84
Figura 12.	Almacenamiento y conservación de pajillas de semen bovino.	85



ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

ADN	: Acido desoxiribonucleico
ARN	: Ácido ribonucleico
ATP	: Adenin tri fosfato
CASA	: Sistema computarizado análisis seminal
CPAs	: Crioprotectores
DCA	: Diseño completamente al azar
HDC	: Lipoproteinas de alta densidad
IA	: Inseminación artificial
IMV	: Instrumento de medicina veterinaria
IPIA	: Integridad de membrana acrosomal
MOsm	: Miliosmoles
MPR	: Motilidad progresiva rectilinea
MT	: Motilidad total
N₂	: Nitrógeno molecular
PROG	: Motilidad progresiva
RA	: Reacción acrosomal
ROS	: Especies reactivas de oxigeno
SENASA	: Servicio nacional sanidad agraria
SENAMHI	: Servicio nacional de metereologia e hidrología
T1	: Tratamiento
T2	: Tratamiento
YH	: Yema de huevo



RESUMEN

En nuestra región no existen datos de evaluación espermática antes y después de la criopreservación del semen de toros Brown Swiss utilizando dilutores comerciales. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de dos dilutores comerciales sobre las características espermáticas de toros Brown Swiss, antes y después de la criopreservación. Se realizó en el establo Las Mercedes, distrito de Mañazo, región Puno. El trabajo de evaluación microscópica de las características seminales se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional del Altiplano-Puno. Se realizaron 12 colecciones de semen de 3 toros Brown Swiss mediante el uso de la vagina artificial. Se evaluaron las características macroscópicas de semen fresco como: volumen y color. Además, se evaluaron las características microscópicas a la pre y post-descongelación con los dos dilutores comerciales (AndroMed y OptiXcell) como: motilidad total, motilidad progresiva, vitalidad espermática e integridad de membrana (test de Host). Para el análisis estadístico, se utilizó la prueba de comprobación de medias de T de student, para la determinar el efecto de los dilutores sobre la motilidad total, motilidad progresiva, vitalidad espermática e integridad de membrana (HOST), antes y después de la criopreservación del semen. Los resultados de motilidad total, motilidad progresiva, vitalidad e integridad de membrana del semen a la pre-dilución con el dilutor AndroMed fueron: 91.6%, 80.6%, 92.8% y 84.7%, respectivamente y con el dilutor OptiXcell se obtuvo 88.5%, 75.1%, 88.6% y 81.0%, respectivamente. Mientras que, a la post-descongelación, la motilidad total, motilidad progresiva, vitalidad e integridad de membrana con el dilutor AndroMed fue de 60.7%, 38.0%, 61.8 % y 54.0 %, respectivamente y con el dilutor OptiXcell fue de 59.0 %, 36.8%, 59.5% y 54.6%, respectivamente. Se concluye en que ambos dilutores comerciales mantienen las características seminales adecuadamente.

Palabras clave: AndroMed, criopreservación, semen, Optixcell.



ABSTRACT

In our region, there are no data on sperm evaluation before and after cryopreservation of semen from Brown Swiss bulls using commercial dilutors. The objective of this work was to determine the effect of two commercial dilutors on the sperm characteristics of Brown Swiss bulls, before and after cryopreservation. It was carried out in Las Mercedes stable, district of Mañazo, Puno region. The microscopic evaluation of semen characteristics was carried out at the Laboratory of Animal Reproduction of the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Husbandry of the Universidad Nacional del Altiplano-Puno. Twelve semen collections were made from 3 Brown Swiss bulls using the artificial vagina. Macroscopic characteristics of fresh semen such as volume and color were evaluated. In addition, microscopic characteristics were evaluated pre- and post-thawing with the two commercial dilutors (AndroMed and OptiXcell) such as: total motility, progressive motility, sperm vitality and membrane integrity (Host test). For statistical analysis, the Students t-test was used to determine the effect of the dilutors on total motility, progressive motility, sperm vitality and membrane integrity (HOST) before and after semen cryopreservation. The results of total motility, progressive motility, sperm vitality and membrane integrity at pre-dilution with the AndroMed dilutor were 91.6%, 80.6%, 92.8% and 84.7%, respectively, and with the OptiXcell dilutor 88.5%, 75.1%, 88.6% and 81.0%, respectively. While post-thawing, total motility, progressive motility, vitality and membrane integrity with the AndroMed dilutor were 60.7%, 38.0%, 61.8% and 54.0%, respectively, and with the OptiXcell dilutor were 59.0%, 36.8%, 59.5% and 54.6%, respectively. It is concluded that both commercial dilutors maintain the seminal characteristics adequately.

Keywords: Andromed, cryopreservation, semen, Optixcell.



CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La población de bovinos es la fuente principal de producción y alimentación en el altiplano de puno. Por ello surge la necesidad de evaluar la eficiencia reproductiva de los toros adaptados a condiciones de altura. Y el empleo de las biotecnologías aplicadas a la reproducción animal hacen posible el incremento de los índices productivos y reproductivos en la crianza de ganado bovino en condiciones de altura (Sari, 2017).

La inseminación artificial (IA) es la técnica más aplicada para facilitar la utilización y distribución extensiva de semen de toros genéticamente seleccionados (Jimenez et al., 2020). Mientras que la criopreservación de semen es una importante biotecnología reproductiva, permitió la manipulación de los gametos buscando promover la conservación de los gametos masculinos por tiempo indefinido. Esta biotecnología al asociarse con la inseminación artificial, representa un mecanismo eficiente para la difusión de material genético de excelente calidad. La criopreservación de semen proporciona una economía para el productor, al reducir los costos de alimentación y transporte de los reproductores, así como los riesgos de transmisión de enfermedades sexualmente transmisibles (Castelo et al., 2008). Los resultados obtenidos luego de la inseminación artificial con semen congelado son muy variables, de ahí la necesidad de desarrollar técnicas de criopreservación más eficaces, dilutores más adecuados y mejores metodologías para evaluar el espermatozoide criopreservado, con el objetivo de mejorar la viabilidad, motilidad y fertilidad del semen criopreservado (Huaman, 2010; Suarez, 2015).

Todo el proceso de criopreservación de semen bovino incluye etapas como: la colección de semen; donde es importante realizar un examen físico de los reproductores



para determinar la salud, la técnica más empleada es la de la vagina artificial ya que simula perfectamente las condiciones de la copula; la segunda etapa es la evaluación del semen colectado para posteriormente añadir el dilutor que contiene el crioprotector (Nuñez & Rubio, 2015). Existen distintos tipos de crioprotectores dentro de ellos se tiene a los crioprotectores permeables o penetrantes de la membrana plasmática; los crioprotectores no permeables o no penetran la membrana plasmática; y finalmente el envasado en las pajillas para su posterior criopreservación en nitrógeno líquido N₂ (Nuñez & Rubio, 2015). Sin embargo, durante el proceso de criopreservación de semen suceden eventos que tienen implicaciones perjudiciales para la función de los espermatozoides y por lo tanto para la fertilidad (Ugur et al., 2019). Los procesos de congelación y descongelación pueden provocar cambios ultraestructurales en los espermatozoides, particularmente en la membrana plasmática y las membranas acrosómicas externas, función mitocondrial alterada y reducción de la motilidad (Layek et al., 2016). Además, la crioconservación puede dar lugar a un mayor estrés oxidativo en los espermatozoides debido a la peroxidación de los lípidos de la membrana durante el proceso de congelación, lo que conduce a la producción de oxidantes como especies reactivas de oxígeno (ROS), mayores cantidades de fragmentación del ADN y alteración del plasma (Layek et al., 2016).

Es por ello que para el procesamiento de semen, se utilizan dilutores seminales que permiten aumentar el volumen del eyaculado y preservar las características funcionales de las células espermáticas, además contienen diversos insumos como glucosa para fuente de energía, yema de huevo para proteger del choque térmico, amortiguadores para mantener el pH cercano a neutro, antibióticos o combinaciones de antibióticos para evitar la proliferación de microorganismos, todo a una presión osmótica



aproximada a 300 mOsm, equivalente a la del semen (Hezavehei, Sharafi, & Kouchesfahani, 2018).

La alternativa con que se cuenta para reemplazar los componentes de origen animal en los dilutores es la lecitina de soya, componente de origen vegetal que presentan una mezcla de fosfatidilcolina y ácidos grasos como el ácido esteárico, oleico y palmítico, brindándole estabilidad estructural a los espermatozoides (Chaudhari et al., 2015). Mientras que los dilutores a base de liposomas son otra opción como medio de criopreservación. Los liposomas contienen una composición y concentración de fosfolípidos óptimas que aseguran la protección de los espermatozoides ante las lesiones de la criopreservación (Bergeron & Manjunath, 2006).

La reducción de la fertilidad asociada al semen congelado es atribuida en gran parte a la alteración de la estructura y función de las membranas espermáticas (membrana plasmática, la membrana acrosomal, así como la membrana mitocondrial) durante los procesos de criopreservación y descongelación (Páez-Barón & Corredor-Camargo, 2014). En nuestro país existe el uso creciente de la IA, especialmente en zonas ganaderas emergentes como la región Puno, donde hay demanda de pajillas de semen de toros donadores de semen. Es por ello que se realizan estudios con la finalidad de evaluar la influencia de dilutores comerciales en las características seminales de toros Brown Swiss lo que justificó plenamente la realización del trabajo de investigación.

1.1 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

1.1.1 Objetivo general

- Evaluar dos dilutores comerciales en la criopreservación de semen de toros Brown Swiss.



1.1.2 Objetivos específicos

- Evaluar las características macroscópicas seminales en toros Brown Swiss.
- Evaluar el efecto de los dilutores comerciales sobre las características microscópicas en la pre-dilución de semen de toros Brown Swiss.
- Evaluar el efecto de los dilutores comerciales sobre las características microscópicas en la post-descongelación de semen de toros Brown Swiss.



CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 CRIOPRESERVACIÓN

Los principios básicos de la criopreservación del semen son la suspensión del metabolismo y el mantenimiento de las características de los espermatozoides durante un período de tiempo prolongado (Amann & Pickett, 1987). El proceso de criopreservación requiere que los espermatozoides sean sometidos a una refrigeración moderada y controlada, con el objetivo de preservar la función de estas células, que es la fecundación del ovocito (Holt, 2000). El control en la reducción de la temperatura reduce la posibilidad de pérdida de viabilidad celular, al reducir la formación de cristales de hielo en el interior del espermatozoide (Kumar et al., 2003). alrededor del 50% de los espermatozoides de las muestras normales se lesionaban durante las etapas de criopreservación (Suarez, 2001). Por lo tanto, es necesario utilizar un mayor número de espermatozoides para la inseminación con semen congelado en comparación con las muestras de semen fresco. Las principales lesiones celulares relacionadas con el choque de frío se producen entre los 15° y los 5°C (Stornelli et al., 2005; Watson, 2000), lo que provoca una disminución significativa de la motilidad y la actividad metabólica de los espermatozoides (Blackshaw & Salisbury, 1957). El término choque térmico define un conjunto de alteraciones que se producen en el organismo de los mamíferos espermatozoides de mamíferos sometidos a un rápido enfriamiento de la temperatura corporal (± 38 °C) a temperaturas cercanas a los 5 °C, lo que resulta en la disminución de la motilidad de los espermatozoides, así como en cambios en la bioquímica y funcionamiento de estos gametos (Watson, 2000).



2.2 CRIOPROTECTORES

Uno de los pasos más importantes para el éxito de la criopreservación de los espermatozoides es la elección del crioprotector que se va a utilizar (Hinsch et al., 1997), que es necesario para evitar la formación de cristales de hielo intracelulares y reducir el daño de la membrana durante y después de la congelación (Amirat et al., 2004). Así, no dañan la estructura y la fisiología de los espermatozoides (Medeiros et al., 2002), parámetros necesarios para el mantenimiento de la fertilidad (Thun et al., 2002). (Polge et al., 1949), descubrieron el efecto crioprotector del glicerol. Esta importante observación hizo posible que los espermatozoides pudieran ser congelados y almacenados durante mucho tiempo (Holt, 2000). Después de este descubrimiento se desarrollaron y probaron muchos otros crioprotectores (Curry, 2000).

Varios estudios han probado la eficacia del glicerol en diferentes (Hammerstedt et al., 1990; Watson, 1995). Se clasifica como un crioprotector penetrante, que promueve una protección intracelular, debido a los enlaces de hidrógeno con las moléculas de agua, creando así un entorno menos dañino para las células (Dalimata & Graham, 1997). Ha sido el crioprotector penetrante más utilizado en el procesamiento de semen bovino (Alonso et al., 2004; Medeiros et al., 2002; Vishwanath & Shannon, 2000), con concentraciones alrededor de 0,25 M (2,25%) a 1 M (9%). la última concentración ha sido tóxica para espermatozoides (Fahy, 1986), causando daños en la membrana y la motilidad (Medeiros et al., 2002).

Otros crioprotectores penetrantes utilizados en medios diluyentes para la congelación de semen en animales domésticos congelación del semen en los animales domésticos son: los alcoholes, el etanol, el etilenglicol, el metanol y el polietilenglicol (Leeuw et al., 1993). las amidas, incluyendo la acetamida, la formamida, la lactamida y



el dimetilsulfóxido (DMSO) (Snoeck, 2003). Sin embargo, para la supervivencia de los espermatozoides en el proceso de criopreservación, también es necesario el uso de crioprotectores no penetrantes, que promuevan un medio hipertónico que induzca la salida de agua de las células provocando su deshidratación, es decir, que actúen en el medio extracelular, reduciendo así la posibilidad de formación de cristales de hielo. Están representados por moléculas de alto peso molecular como los azúcares, las lipoproteínas de la yema de huevo y las proteínas de la leche (Amann & Pickett, 1987).

2.2.1 Agentes crio-protectores permeables

Los agentes crio-protectores permeables son sustancias de bajo peso molecular y por ello pueden ingresar a la célula a través de la membrana plasmática. Estos agentes al ingresar a la célula, evitan los efectos nocivos de la deshidratación excesiva causada por la congelación lenta. Asimismo, los crio-protectores que atraviesan la membrana plasmática reemplazan el volumen de agua que sale al medio extracelular. Consecuentemente, los crio-protectores también mantienen el volumen celular, evitando el colapso de los espermatozoides por una deshidratación excesiva (Medeiros et al., 2002). Los más utilizados son glicerol, etilenglicol, dimetilsulfóxido y propanediol (Boiso, 2001). Los agentes crio-protectores penetrantes, dependiendo de su concentración, pueden ser tóxicos para los espermatozoides, induciendo alteraciones en la membrana plasmática y disminuyendo la movilidad espermática (Medeiros et al., 2002).

2.2.2 Agentes crio-protectores no permeables

Los agentes crio-protectores no permeables son sustancias de alto peso molecular que ejercen su acción crio-protectora por inducción osmótica debido a la



rápida deshidratación celular, provocando una disminución del contenido hídrico intracelular, evitando la formación de cristales de hielo en la célula crio-preservada (Medeiros et al., 2002). También aumentan la viscosidad del medio extracelular a bajas temperaturas. Por lo tanto, reducen la formación de cristales de hielo (De Leeuw et al., 1991). Además, se ha encontrado que los azúcares interactúan con la membrana plasmática al formar puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de los azúcares con los grupos fosfato de los fosfolípidos de membrana. Al reemplazar el agua alrededor de los fosfolípidos, previenen el daño a la membrana durante la deshidratación celular (De Leeuw et al., 1991). Estos agentes suelen usarse en asociación con los agentes penetrantes. Los más utilizados son: sacarosa, glucosa, dextrosa, polivinil-pirrolidona, dextrano, polietilenglicol.

2.2.2.1 Lecitina de soya

La lecitina de soya son complejo de fosfolípidos constituido por fosfatidilcolina (FC), fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol, siendo la FC el componente principal de la lecitina con un 98 % (García & Agüero, 2015; Tamargo & Cuellar Cuellar, 2011). La lecitina de soya en los diferentes dilutores comerciales para la criopreservación de semen no tiene efecto citotóxico en las células espermáticas (Fiume, 2001), ni efectos negativos sobre la motilidad de los espermatozoides (Hong et al., 1986). En los procesos de estabilización de la membrana espermática de semen equinos, notando la presencia de compuestos lipídicos en la membrana plasmática de los espermatozoides. Además, observaron un efecto protector en la motilidad, viabilidad y fertilidad generada por dos dilutores con lecitina de soya como estabilizador de membrana plasmática (Ricker et al., 2006).



2.2.2.2 Liposomas

Liposoma es una vesícula provista del mismo material que una membrana celular. Las membranas regularmente están hechas de fosfolípidos, que son moléculas anfipáticas (Galvez, 2017). En la naturaleza, los fosfolípidos se hallan en membranas estables compuestas de dos capas (Hernández, 2017). Los liposomas tienden a formar dispersiones coloideas a pesar de ser insolubles en agua. La región polar se encarga de cerrar el compartimento acuoso por otro lado, la región apolar se enfrenta entre formando una bicapa. Toda la organización de los liposomas se debe a la naturaleza química, longitud, grado de saturación de las cadenas hidrocarbonadas presentes, pH y la carga iónica. Los liposomas en su mayor proporción están compuestos por fosfolípidos, la diferencia se basa en la unión del grupo al fosfato. De esa manera pudiendo unirse aminoalcoholes (fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina), aminoácidos (fosfatidilserina), alcoholes (fosfatidilglicerol) y azúcares (fosfatidilinositol). La lecitina es el fosfolípido más utilizado en la elaboración de liposomas, por la facilidad con la que se obtiene a partir de la yema de huevo y de la semilla de soya (Torrelló et al., 2015). Uno de los dilutores que presenta liposomas en su composición es OptiXcell, el cual se empleó en diferentes especies como en toros (Lima-Verde et al., 2018; Miguel-Jimenez et al., 2020; Murphy et al., 2018) y búfalos (Kumar et al., 2015; Naz et al., 2018; Röpke et al., 2011).

2.3 MEDIOS DE DILUCIÓN

Los espermatozoides no sobreviven mucho tiempo en el semen fresco natural, aunque se conserve en temperaturas más bajas. Por esta razón, se añaden diluyentes para mejorar o mantener el medio que rodea a los espermatozoides, proporcionando un



suplemento de energía y protección contra productos del metabolismo y a los cambios de temperatura, un diluyente deseable debe proporcionar:

- Energía y nutrientes al semen almacenado.
- Proporcionar una acción amortiguadora para compensar los cambios de pH causados por la formación de ácido láctico.
- Proporcionar protección contra el enfriamiento rápido y el choque térmico.
- Mantener una presión osmótica y un equilibrio electrolítico óptimo para el medio.
- Inhibir el crecimiento de microorganismos, incluidos los patológicos.
- Aumentar el volumen del eyaculado inicial para que pueda ser utilizado en muchos animales, (Concannon, 1989; Herman et al., 1994; Vishwanath & Shannon, 2000).

La interacción entre el medio diluyente y los espermatozoides representa un factor crucial para la conservación de la integridad y la capacidad de los espermatozoides fecundación (Manjunath et al., 2002) , donde la preparación y composición del medio diluyente puede interferir en la calidad del semen criopreservado (De-Leeuw et al., 2000; Snoeck et al., 2007). Durante décadas varios investigadores han probado diferentes diluyentes en la criopreservación de semen bovino (Amirat et al., 2004; Becker et al., 1977; Muiño, 2007; Pace & Graham, 1974). pequeños rumiantes (Fukui et al., 2008; J. Gil et al., 2003).

Sin embargo, los diluyentes compuestos por diferentes sustancias protegen los espermatozoides de forma diferente entre las distintas especies e individuos de la misma



especie (Holt, 2000). Uno de los aditivos más estudiados y evaluados en los diluyentes son los crioprotectores. El glicerol, la lipoproteína de baja densidad (LDL) de la yema de huevo y la leche se utilizan habitualmente para la criopreservación del semen bovino (Muiño et al., 2007).

2.3.1 Yema de huevo

La yema de huevo es uno de los principales crioprotectores no penetrantes y se utiliza ampliamente en asociación o no con otros componentes (Amirat et al., 2004). Su principal beneficio es el de proporcionar un LDL fracción que evita la pérdida de fosfolípidos de la membrana, aumentando así la tolerancia al choque térmico y al proceso de congelación. El glicerol y la yema de huevo actúan de forma sinérgica, protegiendo la membrana celular, (Amirat et al., 2004; Bergeron et al., 2004; Holt, 2000; Moussa et al., 2002; Pace & Graham, 1974; Thun et al., 2002; Vishwanath & Shannon, 2000). Los diluyentes utilizados para la criopreservación de espermatozoides bovinos suelen contener alrededor de un 20% de yema de huevo, (Amirat et al., 2004; Hinsch et al., 1997; Snoeck et al., 2007). A pesar de sus efectos beneficiosos, la yema de huevo presenta algunos inconvenientes como la posibilidad de contaminación con la consiguiente producción de endotoxinas capaces de dañar la capacidad de fecundación del esperma (Aires, 2003; De-Leeuw et al., 2000; Pagl et al., 2006; Thun et al., 2002). Además, la yema de huevo es difícil de estandarizar (Wall & Foote, 1999). Contiene sustancias que pueden inhibir la actividad mitocondrial de los espermatozoides disminuyendo su motilidad (Pace & Graham, 1974) y hormonas esteroides que pueden disminuir la capacidad de fecundación de los espermatozoides (Muiño et al., 2007). También puede interferir en el análisis microscópico del semen debido a la presencia de glóbulos de grasa (Vishwanath &



Shannon, 2000). Una de las alternativas sería la pasteurización de la yema de huevo (De-Leeuw et al., 2000). su separación y el uso de la fracción crioprotectora, la LDL (Amirat et al., 2004) o el uso de diluyentes químicamente definidos compuestos por productos de origen vegetal (Hinsch et al., 1997). Se han hecho varios intentos de sustituir la yema de huevo por una componentes definidos y estables (Amirat et al., 2004; Muiño et al., 2007; Vishwanath & Shannon, 2000) como el extracto de soja (Aires, 2003). Aunque una gran cantidad de diluyentes libres de productos animales son productos de origen animal están disponibles comercialmente (Hinsch et al., 1997), la yema de huevo se sigue utilizando ampliamente como crioprotector (Muiño et al., 2007).

2.3.2 Extracto de soya (lecitina de soya)

Dos de los primeros diluyentes disponibles, consistentes en sustancias de son Biociphos Plus® (IMV®, L'Aigle, Francia) y Andromed® (Minitub®, Tiefenbach, Alemania). Se componen de extracto de soja y ya han sido probados por varios grupos de investigadores (Muiño et al., 2007) donde se ha comprobado la viabilidad de su uso para la congelación de esperma (Aires, 2003; L. J. Gil, 1999; Hinsch et al., 1997; Janett et al., 2005). Sin embargo, otros investigadores no han encontrado resultados positivos con respecto a la crioprotección del esperma con el uso de diluyentes libres de proteínas animales (De-Leeuw et al., 2000; Fukui et al., 2008; Herold et al., 2006; Muiño et al., 2007; Nöthling et al., 2007).



2.4 PRINCIPALES DILUTORES USADOS PARA LA CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN BOVINO

Los espermatozoides no pueden soportar largos tiempos de vida debido a los efectos del medio externo después de la eyaculación del animal, estos pueden ser por el contacto de oxígeno, aumento de la hipertonicidad del medio, falta de humedad, aumento de excreciones celulares entre otros. Sin embargo, la adición de esta sustancia llamada dilutor tiene la capacidad de extender el tiempo de vida de los espermatozoides en fresco, refrigerado y congelado (Cabrera, 2017).

2.4.1 Dilutor sintético comercial AndroMed

Es apropiado para la preservación de semen fresco a +5°C hasta +10°C. En la investigación celular, AndroMed es recomendable cuando se utilizan los espermatozoides como modelo, debido a que su composición estandarizada lo hace apto para el análisis computacionalmente asistido (CASA – computer assisted semen analysis) de semen. También utilizado exitosamente con semen de otras especies, especialmente ovina y caprina. Tiene como componentes fosfolípidos, TRIS, ácido cítrico, azúcares, antioxidantes, tampones, glicerina, agua de altísima pureza y antibióticos (Cabrera, 2017; Minitube, 2021).

2.4.2 Dilutor sintético comercial OptiXcell

Medio para semen bovino congelado o fresco, no contiene proteína animal. Contiene tecnología avanzado con liposomas que se obtienen a través de un proceso complejo y contienen la combinación protectora perfecta de fosfolípidos protectores para la membrana de los espermatozoides. Las vesículas de fosfolípidos que forman los liposomas, son elaboradas en base al perfil de las fracciones activas de la yema de huevo, al contrario de lo que sucede con la proteína animal, no son vectores de

agentes infecciosos. Alta bioseguridad, medio transparentes, optimiza el semen fresco, mayor movilidad post descongelamiento, caducidad amplia y preparación inmediata (Cabrera, 2017; Technologies, 2020).

2.4.3 Similitudes y diferencias entre dilutores OptiXcell y AndroMed

Los avances tecnológicos enfocados en el análisis seminal de diferentes especies, nos ha llevado a la creación y desarrollo de reactivos que puedan ofrecer a los espermatozoides una mejor conservación de su calidad y características naturales tanto para refrigeración y congelación. La búsqueda de la conservación de la genética abrió las puertas a laboratorios de todo el mundo a que expongan al mercado una serie de dilutores que brinden estas características; entre ellos se tienen: Tris yema, Citrato yema, Triladyl, Bioxcell, Andromed, Optixcell, etc. Para nuestra investigación nos centraremos en los dilutores AndroMed y Optixcell (Cabrera, 2017). A continuación, se muestra similitudes y diferencias en sus composiciones:

Tabla 1. Composición química de dilutores AndroMed y OptiXcell.

Dilutor	Andromend (minitube)	optixcell (IMV)
Origen	Alemania	Francia
Proteína Animal	No	No
Lecitina De Soya	Si	No
Liposomas	No	Si
Tampón	Si	Si
Glicerina	Si	Si
Tris	Si	No especifica
Fosfolípidos	Si	Si
Antioxidantes	Si	Si
Color	Amarillo Canario	Beige Transparente
Autorización UE 88/407	SI	SI
Penicilina	No	Si
Lincomicina	Si	Si
Espectinomicina	Si	Si
Estreptomicina	No	Si



Gentamicina	Si	No
Tilosina	Si	No
Claridad De Observación CASA	Turbio	Transparente

Fuente: (Cabrera, 2017)

Encontramos mucha similitud en sus composiciones, sin embargo, la presencia de Liposomas o componentes de origen vegetal como la Lecitina puedan hacer grandes diferencias en la disminución de las lesiones que se producen en los procesos de criopreservación (Cabrera, 2017). Como nos menciona Gao y Critser (2000) las lesiones que se producen en procesos de criopreservación como la disminución o nula viabilidad de los espermatozoides por daño a nivel de la membrana citoplasmática. Tanto el dilutor AndroMed y OptiXcell tienen mecanismos de criopreservación diferente. Como lo menciona Minitube, (2021) indica que las lecitinas se encuentran en un 10 % en la soya, y este componente es parte de la yema de huevo (Aires et al., 2003), Technologies, (2020) indica que los liposomas o vesículas de fosfolípidos la cual presenta un perfil de lípidos capaces de adherirse con mayor facilidad a la membrana citoplasmática.

Los dilutores en mención tienen la presencia y ausencia de antibióticos como la Penicilina, Estreptomicina, Gentamicina y Tilosina. La penicilina y estreptomicina son antibióticos que se emplean con mayor frecuencia, pero últimamente se puso en duda su efectividad, pero, Trujillo, L. E; Rivera, (2002) demostró que no hay diferencia sobre la calidad del semen de toros, utilizando dos grupos antibióticos; comparó el uso de Penicilina + Estreptomicina, versus Lincomicina + Gentamicina + Tilosina + Espectinomicina.



2.4.4 Triladyl

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

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

2.4.5 Dilutor Tris

TRIS (Hidroximetil amino metano). Es un tampón biológico, cuya función es mantener el pH de la solución constante (7 a 8 pH). Se prepara a pH 8.0. El peso molecular del TRIS es 121.14 gr. / g. mol. Se utilizó un diluyente a base de Tris y yema de huevo de gallina, dividido en dos fracciones A y B. Luego de su preparación, la fracción A (sin glicerol) fue colocada en baño María a 36 °C; mientras la fracción B contiene el glicerol, El Tris por su capacidad amortiguadora, osmótica y el ser de baja toxicidad, aun en altas concentraciones, es empleado en la criopreservación de semen, neutralizar los residuos del metabolismo espermático, principalmente del ácido láctico (Ramírez et al., 2019).



2.5 COLECCIÓN DE SEMEN BOVINO

La recolección de semen se realiza por el método de la vagina artificial o por el método de la electroeyaculación. El método de la vagina artificial requiere de la utilización de un animal para la monta (macho o hembra) o un maniquí; cuyo método simula una monta natural y permite la obtención de una muestra de semen de excelente calidad (Allende & Arisnabarreta, 2021).

La colección de una buena muestra se obtiene de la estimulación previa del semental, para lo cual se recomienda una secuencia de falsas montas y períodos de restricción, antes de colectar el eyaculado. La desventaja de usar una vaca consiste en que el toro podría llegar a cubrirla en un descuido del operador. Antes de colectar el semen deberán tomarse en cuenta dos aspectos importantes: la higiene y el estímulo del semental, nunca se debe tomar con la mano la mucosa del pene, para evitar inhibir la eyaculación. La monta falsa aumenta la calidad del semen en cuanto a volumen, concentración espermática y movilidad (Damas, 2010; Páez & Corredor, 2014).

2.6 CARACTERÍSTICAS SEMINALES DE TOROS

2.6.1 Características macroscópicas del semen bovino

Se percibe mediante observación directa del eyaculado colectado y se expresa en mililitros; puede estar entre 2 ml por eyaculado en animales jóvenes y entre 4 y 12 ml en animales adultos. Se registra el volumen de colección, con el uso de una pipeta graduada (Páez & Corredor, 2014).

Las variaciones de volumen pueden ser afectadas según la condición del animal en toros jóvenes como adultos. Los animales jóvenes a un inicio de la madurez



sexual el volumen del semen puede variar de 1 a 3 ml, 4-8 ml, después de alcanzar la madurez sexual. Es conveniente estimarlo en base al peso. Eyaculaciones frecuentes reducen el volumen promedio y cuando eyacula consecutivamente dos veces, el segundo eyaculado suele tener un menor volumen. Asimismo, a medida que pasan los años se nota cierto aumento en el volumen de eyaculado, encontrándose el toro a los 5 años en su máxima plenitud (Allende & Arisnabarreta, 2021; Crespo & Quintero, 2014).

Las características macroscópicas que se evalúan de manera general en el semen de los bovinos son: olor, color y volumen. Algunos exámenes también evalúan el aspecto y la densidad macroscópica del semen (Páez & Corredor, 2014).

2.6.1.1 Volumen

Se percibe mediante observación directa del eyaculado colectado y se expresa en mililitros; puede estar entre 2 ml por eyaculado en animales jóvenes y entre 4 y 12 ml en animales adultos. Se registra el volumen de colección, con el uso de una pipeta graduada (Páez & Corredor, 2014).

Las variaciones de volumen pueden ser afectadas según la condición del animal en toros jóvenes como adultos. Los animales jóvenes a un inicio de la madurez sexual el volumen del semen puede variar de 1 a 3 ml, 4-8 ml, después de alcanzar la madurez sexual. Es conveniente estimarlo en base al peso. Eyaculaciones frecuentes reducen el volumen promedio y cuando eyacula consecutivamente dos veces, el segundo eyaculado suele tener un menor volumen. Asimismo, a medida que pasan los años se nota cierto aumento en el



volumen de eyaculado, encontrándose el toro a los 5 años en su máxima plenitud (Allende & Arisnabarreta, 2021; Crespo & Quintero, 2014).

2.6.1.2 Color

Se percibe mediante observación directa del eyaculado colectado. El color del eyaculado depende del contenido de riboflavina, y varía de acuerdo con la concentración espermática; puede ir desde un líquido blanquecino claro hasta un líquido lechoso oscuro (Páez & Corredor, 2014).

Normalmente el semen es de color blanco y la densidad de dicha muestra se relaciona directamente con la concentración de espermatozoides. El color y aspecto más cremosos indica una mayor concentración, mientras de un aspecto lechoso, claro y transparente indica menor concentración espermática, como es el caso de aquellos animales con oligospermia o azoospermia. Los colores normales van del blanco al amarillento, siendo patológicos, los colores rosado, amarronado y verdoso (Crespo & Quintero, 2014).

2.6.1.3 Olor

Es característico de la especie, no debe tener mal olor, si lo presenta puede ser indicativo de algún proceso infeccioso (Páez & Corredor, 2014). Las muestras de semen recolectadas higiénicamente de reproductores sanos y fértiles tienen un olor característico catalogado como sui géneris, un olor débil aromático similar como a la yema de huevo (Crespo & Quintero, 2014).

2.6.1.4 Aspecto

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



semen debe ser opaco y uniforme, indicando la alta concentración de espermatozoides. La muestra debe ser limpia, sin pelos, suciedad y otros contaminantes. Existen algunos toros que secretan semen amarillo debido al pigmento riboflavina, que es inocuo y no debe confundirse con la orina, la cual presenta un olor típico (Crespo & Quintero, 2014; Páez & Corredor, 2014).

2.6.1.5 PH

Al igual que la densidad, no es un parámetro que se controle rutinariamente en el trabajo del laboratorio. Al examen del eyaculado, el semen normal muestra un pH levemente ácido. Los valores están entre 6,5 - 6,9, con una media de 6,75. Es importante conocer estos valores en la confección de las diferentes fórmulas de diluyentes existentes y que son utilizados, en el trabajo de procesado del semen, en la dilución del mismo y previo a su preparación para su posterior proceso de criopreservación (Allende & Arisnabarreta, 2021).

En el Banco Nacional de Semen – UNALM, utilizando toros de razas Holstein, Brown Swiss y Simmental, de 2.5 a 6 años de edad, de un total de 142 eyaculados se determinó un pH promedio de 7.03 (Damas, 2010).

2.6.2 Características microscópicas del semen bovino

Las características microscópicas que se evalúan en el semen de bovinos son: motilidad masal, motilidad individual, morfología, viabilidad y concentración espermática (Páez & Corredor, 2014).

La motilidad es uno de los parámetros más importantes en la evaluación de una muestra de semen, existen diversos métodos para evaluar la motilidad, algunos computarizados, otros de tipo subjetivo, que buscan evaluar el porcentaje de



espermatozoides móviles, así como el tipo de movimiento que presenta la media de una población espermática (Crespo & Quintero, 2014).

2.6.2.1 Motilidad individual

Se determina colocando una pequeña gota de semen sobre una placa portaobjetos a 37 °C, y sobre ella se coloca una placa cubreobjetos; se observa al microscopio, en aumento de 40X. La motilidad individual mide el porcentaje de espermatozoides que presentan un movimiento rectilíneo y continuo; el valor se expresa en porcentaje; el valor mínimo aceptado para una muestra es de 50%. El porcentaje de células con movimiento progresivo se calcula subjetivamente; una buena muestra debe tener 70% de motilidad (Páez & Corredor, 2014).

Es el movimiento cefálico rectilíneo (hacia adelante) de los espermatozoides. Puede ser determinado en forma subjetiva, en microscopio de contraste de fases, observando una pequeña gota de semen colocada sobre una platina térmica o en un portaobjetos precalentado a 37 °C (Crespo & Quintero, 2014).

2.6.2.2 Vitalidad

Existe un conjunto de técnicas que permiten una coloración selectiva entre espermatozoides vivos y muertos, esto como consecuencia de los cambios bioquímicos que se producen tras la muerte del espermatozoide (acción cromacitológica); el fundamento de esta técnica es el siguiente: el colorante penetra la membrana de los espermatozoides muertos, dejando sin teñir los que se encontraban vivos al momento de realizar la tinción. Mediante la determinación del número de espermatozoides vivos y muertos es posible predecir la calidad de un eyaculado. Un eyaculado que presenta más de 30% de



espermatozoides muertos, difícilmente servirá para ser procesado y congelado (Páez & Corredor, 2014).

La rotura de la membrana plasmática está claramente asociada con la pérdida de viabilidad celular, pero una membrana plasmática intacta siempre indica que la célula sea viable. El procesamiento del semen, incluida su criopreservación, es “estresante” para el espermatozoide y afecta, primeramente, a sus membranas. Los daños que pueden producirse en éstas pueden ser modificaciones en su organización, permeabilidad y composición lipídica (Crespo & Quintero, 2014).

Los espermatozoides vivos presentarán una coloración clara o no se dejan colorear, mientras que los muertos tendrán una coloración rosa-ceniza, debiéndose considerar los espermatozoides parcialmente coloreados como muertos. El parámetro que evalúa la vitalidad de los espermatozoides es útil para saber si los espermatozoides inmóviles están vivos o muertos (Páez & Corredor, 2014).

La Eosina-Nigrosina es adecuada para el examen de la vitalidad, dado que la fórmula es isoosmótica con semen. La célula espermática con la membrana intacta no se tiñe con eosina mientras la muerta que posee membrana celular dañada absorbe el colorante rojo. La Nigrosina se utiliza como tinción de fondo para contrastar las células vivas sin teñir, blancas (Crespo & Quintero, 2014).

2.6.2.3 Integridad de membrana (HOST)

El test de endósmosis (HOST) se fundamenta en las modificaciones producidas en la cola (hinchamiento o “swelling”), los espermatozoides son incubados en un medio Hipoosmótico durante un breve período; la hinchazón de



los espermatozoides frente a una solución Hipoosmótica se evidencia por el arrollamiento de la cola. Este proceso solo se observa solo en aquellas células que mantienen íntegra su membrana plasmática, y se debe a un flujo de agua que origina una expansión de las membranas (Páez & Corredor, 2014).

La integridad funcional positiva de la membrana citoplasmática de espermatozoides es cuando, se observa el espermio en medio Hipoosmótico, se torciona helicoidalmente. Debido al desequilibrio osmótico en el medio extracelular e intracelular, el espermatozoide ingresando agua al medio intracelular, en consecuencia, la célula espermática presenta mayor volumen (Crespo & Quintero, 2014).

2.6.2.4 Concentración

La concentración es un parámetro importante en la evaluación espermática, ya que existe una elevada correlación significativa entre el número de espermatozoides inseminados y la fertilidad del toro. En este punto se debe señalar que existe gran variabilidad en la concentración de un eyaculado a otro, y de un toro a otro, siendo importante conocer el número de espermatozoides por eyaculado, ya que de este parámetro depende el número de hembras por inseminar (Páez & Corredor, 2014).

Existen diversos métodos para medir la concentración espermática; algunos de estos métodos son: la espectrofotometría, la colorimetría, la citometría de flujo y el uso de cámaras de recuento celular, como las de Bürker, Neubauer o Thoma. Uno de los métodos más utilizados en el mundo es el de la cámara de Neubauer, denominado también Hemocitómetro (Hezavehei, Sharafi, Kouchesfahani, et al., 2018).



CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LUGAR DE ESTUDIO

El trabajo de investigación se realizó en dos etapas: de campo y laboratorio. La colección se realizó en campo, en el establo Las Mercedes, ubicado en el distrito de Mañazo - departamento de Puno - Perú, ubicado a una altura de 3926 m.s.n.m., latitud sur $15^{\circ} 48' 4.3''$ S 15 a 44 km de la ciudad de Puno (SENAMHI, 2022).

El análisis laboratorial se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, el cual se encuentra ubicado en la Universidad Nacional del Altiplano-Puno, la ubicación geográfica es de $15^{\circ}49'53''$ latitud sur y longitud oeste $70^{\circ}01'55''$ a 3824 m.s.n.m. (SENAMHI, 2022).

3.2 TIPO DE ESTUDIO

El trabajo de investigación es de tipo experimental, ya que se empleó variables independientes (dilutores comerciales) con el fin de establecer relación causa-efecto de la calidad espermática de toros. Fue de carácter prospectivo y corte longitudinal, ya que los análisis se realizaron en función del tiempo transcurrido (Müggenburg & Pérez, 2007).

3.3 ANIMALES Y TAMAÑO DE MUESTRA

Se realizó el muestreo por conveniencia de 3 toros reproductores Brown Swiss de 3, 4 y 5 años, los cuales estuvieron en un régimen de colección de una vez por semana mediante la técnica de vagina artificial. Los toros donadores de semen estuvieron inscritos en el Registro Nacional de Toros Donadores de Semen, con certificados zoonosanitarios



vigentes emitidos por el SENASA – Perú, los toros que se emplearon para la colección de semen fueron:

- Toro 1: San Antonio Kingpin Wonderment Impala con registro genealógico N°3115 con 4 años de edad al momento de la fase de colección.
- Toro 2: Sequion Goliath Surge Luther con registro genealógico N°14668, con 3 años de edad al momento de la fase de colección.
- Toro 3: Carter Clear Parker con registro genealógico N°2330, con 5 años de edad al momento de la fase de colección.

Los toros fueron manejados en condiciones iguales, criados en un sistema semi-intensivo estuvieron albergados en corrales individuales, con piso de tierra, cercos de concreto, dotados de sombra, comedero y bebedero. La alimentación fue a base de heno de alfalfa; heno de avena y suplementado con concentrado y agua ad-libitum.

3.3.1 Muestras seminales

La colección de semen se realizó en 3 toros mediante la técnica de vagina artificial, en la cual se realizó un total de 24 colecciones y por cada dilutor un total de 12, donde el tratamiento 1 (T1): Fue el dilutor AndroMed y el tratamiento 2 (T2) el dilutor OptiXcell. La distribución de la colección de cada toro se realizó según la Tabla 2.

Tabla 2. Número de colecciones para cada dilutor comercial.

Nombre del toro	DILUTORES		
	edad/años	AndroMed	Optixcell
IMPALA	4	4	4
LUTHER	3	4	4
PARKER	5	4	4
N.º de Colecciones total por dilutor		12	12

El tipo de muestreo fue no probabilístico, donde se tomaron criterios de inclusión de los eyaculados las siguientes características:

- Motilidad total: mayor igual a 80%, en semen fresco.
- Motilidad progresiva: mayor igual a 60% en semen fresco.

Mientras que los criterios de exclusión para los eyaculados fueron:

- Muestras seminales con presencia de contaminantes como orina, sangre y heces.

3.4 DISEÑO EXPERIMENTAL

El estudio se desarrolló según el diseño experimental, para lo cual se realizaron 100 observaciones como mínimo para la evaluación de la calidad seminal al momento de la colección (37 °C), y al post- descongelamiento para cada tratamiento (AndroMed y Optixcell) respectivamente, evaluando la Motilidad total, Motilidad progresiva, vitalidad e integridad de membrana (Test Hipoosmótico).

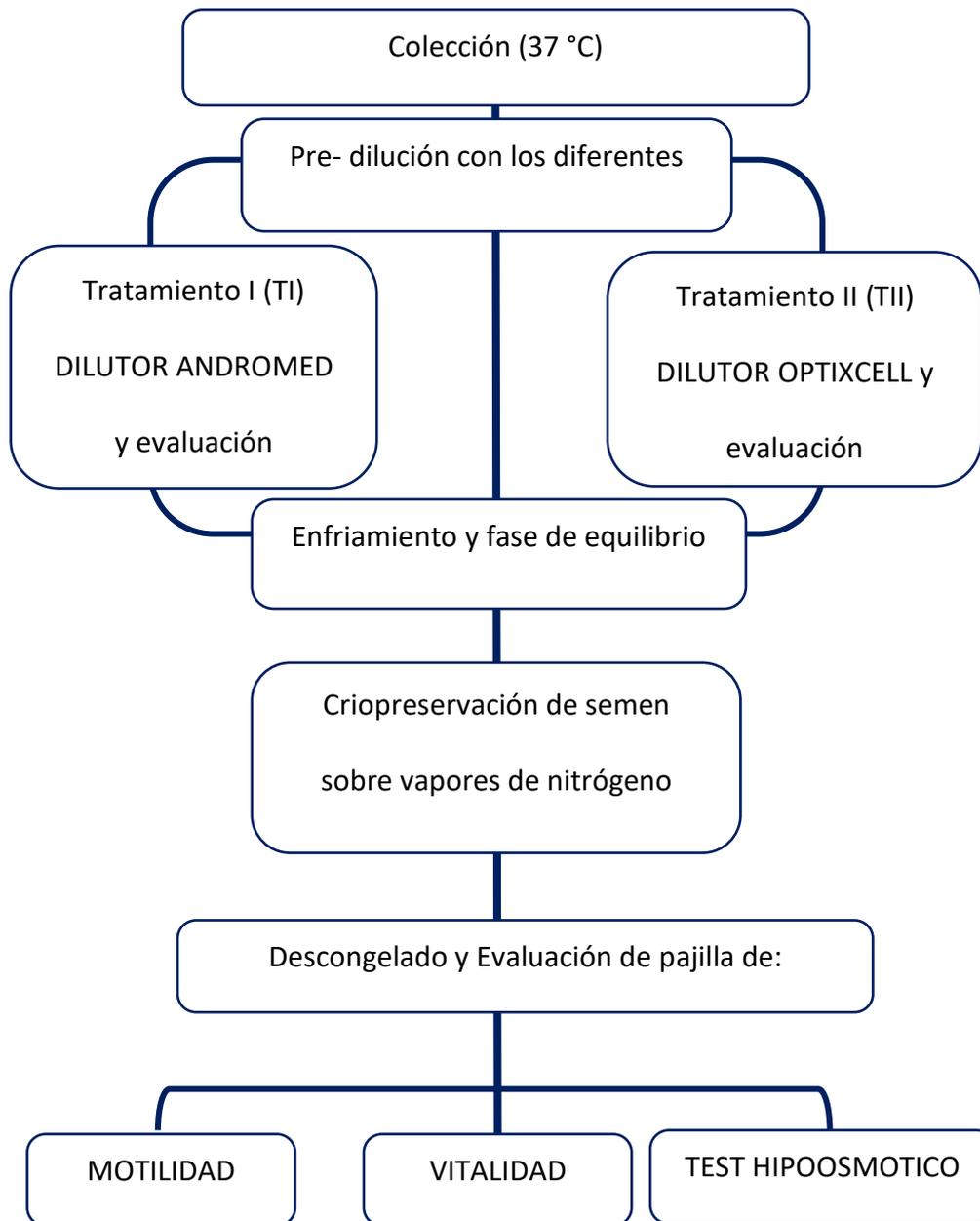


Figura 1. Diseño experimental.

3.4.1 Variables en estudio

Variables independientes:

- Dilutores comerciales: AndroMed T1 y Optixcell T2.

Variables dependientes:

- Volumen seminal



- Concentración espermática
- Motilidad total
- Motilidad progresiva
- Vitalidad espermática
- Integridad de membrana (Test Hipoosmótico)

3.5 METODOLOGÍA

3.5.1 Colección de semen

Antes del proceso de colección se hizo limpieza del cuerpo de los toros para eliminar cualquier rastro de materia fecal y pelos muertos. Finalmente se limpió el prepucio de los toros con agua destilada y se secó con papel toalla para evitar cualquier tipo de contaminación con las muestras seminales.

El semen se colectó mediante el método de la vagina artificial (IMV Modelo 005417, Francia) el mismo que brinda condiciones homogéneas de presión, temperatura y humedad a los toros durante la colección.

Se tuvo especial cuidado en la limpieza de los tubos de colección, todo el proceso de colección se realizó por un mismo personal a partir de las 9-10am, con una frecuencia de colección de 1 vez por semana.

3.5.2 Vagina artificial

Un día antes de cada proceso de colección seminal, se lavó y desinfectó todas las partes de la vagina artificial para posteriormente dejarlas en una estufa esterilizadora a una temperatura de 50°C durante 6 horas.



Se introdujo en el tubo una funda recta de látex de un extremo hacia el otro extremo y en ambos extremos se selló con ligas, para posteriormente llenar con agua a 48°C por la válvula, y en el extremo opuesto a la válvula se colocó una funda cónica con un tubo colector de 15ml el cual estuvo en todo momento con una funda protectora para impedir que el tubo y la muestra seminal este en contacto con los rayos solares.

3.5.3 La colección

- Previo al armado de la vagina artificial, en el brete de sujeción se colocó un toro como soporte con la finalidad de que el toro a coleccionar realice la monta.
- Para la colección se realizaron 3 saltos de los cuales, las 2 primeras fueron saltos falsos con el fin de mejorar la concentración y motilidad espermática (Palacios, 2015), y en la última monta fue donde se realizó la colección seminal, para lo cual el operador desde la vaina prepucial desvió el pene con dirección hacia la vagina artificial.

3.5.4 Dilutores y procesamiento de semen

Las muestras de semen fueron diluidas con dos tipos de dilutores, Optixcell de origen francés y el AndroMed de origen alemán y se utilizó la misma metodología de preparación y dilución para ambos dilutores.

3.5.4.1 Preparación de los dilutores

AndroMed:



La preparación del dilutor se realizó según las indicaciones del fabricante, En una proporción de 1:4. (Mendoza, 2015; Minitube, 2021).

- Todo el procedimiento se realizó en baño maría a una temperatura de 32°C. Donde se colocó un frasco de 15 mL con el dilutor AndroMed y en un Erlenmeyer se colocó agua bidestilada; los tubos se mantuvieron en baño maría por un tiempo de 10 minutos.
- Se agregó el dilutor al Erlenmeyer con agua bidestilada para luego homogenizar la mezcla durante 1 minuto luego dejar por 7 minutos en baño maría, el Erlenmeyer con la preparación del dilutor a 32°C, Seguidamente se homogenizó y se dejó enfriar a temperatura ambiente.

Optixcell:

La preparación del dilutor se realizó según las indicaciones del fabricante, en una proporción de 1:4 (Galvez, 2017; Technologies, 2020).

- El procedimiento se realizó en baño de maría a una temperatura de 32°C. colocando un frasco de 15 mL con el dilutor OptiXcell y en un Erlenmeyer se colocó agua bidestilada; los tubos se mantuvieron en baño de maría durante un tiempo de 10 minutos.
- Se agregó el dilutor al Erlenmeyer con agua bidestilada para luego homogenizar la mezcla durante 1 minuto, seguidamente se dejó durante 7 minutos en baño de maría, el Erlenmeyer con la preparación



del dilutor a 32°C, homogenizando y dejando a temperatura ambiente hasta el momento de usarlo.

3.5.4.2 Predilución

Para la predilución, se realizó la evaluación de las características macroscópicas (color y volumen) y microscópicas (concentración espermática).

Luego de la predilución 1:1 a una temperatura de 37°C durante 10 minutos en baño maría con la finalidad de que los espermatozoides se acostumbren al nuevo medio (Damas Huaman, 2010). Se realizó la evaluación de la motilidad espermática, vitalidad e integridad de membrana plasmática (Test Hipoosmótico).

3.5.4.3 Dilución final

La dilución final, se realizó basándonos en la concentración final de espermatozoides por pajilla (Ecuación 1). Se agregó el semen prediluido en el volumen total del dilutor que se determinó para la concentración espermática deseada por pajilla (Ecuación 2), posteriormente se dejó durante 10 minutos en baño maría.

Ecuación 1. Fórmula para calcular Número de pajillas.

$$\text{Nro de pajillas esp.} = \frac{\text{Volumen} \times \text{Concentracion} \times \% \text{Motilidad} \times \% \text{Vitalidad}}{\text{Concentracion de espermatozoides por pajilla}}$$

Ecuación 2. Fórmula cantidad de dilutor a utilizarse.

$$\text{Dil. total} = (\text{Pajillas esp.} \times \text{Vol. de la pajilla}) - \text{Vol. del eyaculado}$$



3.5.4.4 Rotulado de pajuelas

El rotulado de pajuelas se realizó en el país de Francia en la empresa IMV technologies con los siguientes caracteres.

Nombre del establo de procedencia de los animales, nombre del padre y madre y nombre del toro con su respectivo número de registro, como se describe:

- San Antonio Kingpin Wonderment Impala RG 3115.
- Sequion Goliath Surge Luther RG 14668.
- Vsy Carter Clear Parker RG 2330.

3.5.4.5 Envasado del semen en pajuelas

Todo el procedimiento se realizó manualmente, se envasó o empajillo en pajuelas de 0.5 mL, donde se indicó el nombre y registro de los toros, siendo 25×10^6 el número de espermatozoides por pajilla, se dejó espacio vacío con ayuda de un peine especial y se selló la pajilla con alcohol polivinílico.

3.5.4.6 Descenso de la temperatura y fase de equilibrio

Las pajillas envasadas, se depositaron en una bandeja plástica con agua a temperatura de 20 a 23°C, seguidamente se colocaron en la refrigeradora para que gradualmente descienda la temperatura hasta 5°C, durante un periodo de 2 horas.

3.5.4.7 Criopreservación

Se realizó según lo indicado por Palomino, (2019) con algunas modificaciones.



- Para el congelamiento se utilizó una caja de Tecnopor de 40 x 30 x 30 cm, que contenía 2 kg de nitrógeno líquido. La caja de Tecnopor en su interior estuvo provista de una rejilla con área ligeramente menor que la caja, para colocar las pajillas previamente secadas con papel toalla.
- El proceso de congelación se realizó con los vapores de nitrógeno líquido donde se colocó la rejilla sobre 5cm sobre el nivel del nitrógeno líquido durante 10 minutos luego de ese tiempo las pajillas fueron sumergidas en nitrógeno líquido, finalmente las pajillas fueron colocadas en goblets, para su almacenamiento en el termo criogénico.

3.5.4.7 Descongelación

Antes de cada evaluación se realizó el proceso de descongelamiento de pajillas, y para lo cual se utilizó agua temperada a 38 °C. Durante 1 minuto. Luego se secó completamente la pajilla descongelada, se cortó el extremo de alcohol polivinílico y se realizaron las evaluaciones correspondientes.

Para la evaluación de las características espermáticas se consideró los procedimientos recomendados por Hafez, (2002) y Vera, (2011), los cuales se describen a continuación:

3.6 EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS MACROSCOPICAS

3.6.1 Volumen

El volumen del eyaculado fue medido mediante observación directa del tubo colector graduado con capacidad para 15 ml, cada toro se colecto, con fundas y tubos asignados a cada animal, el tubo colector se ha protegido con un protector



diseñado para ello con la finalidad de mantener temperatura adecuada y en el caso de las colecciones al ambiente contra los rayos solares.

3.6.2 Color

Se realizó mediante la observación visual el color del semen de cada eyaculado.

3.7 EVALUACIÓN MICROSCÓPICA DEL ESPERMATOZOIDE

3.7.1 Concentración

La concentración espermática fue determinada utilizando una cámara de Neubauer (Boeco de fabricación Alemania); se realizó una dilución del semen 1:200 (en pipeta cuenta glóbulos rojos) con agua destilada; el proceso consistió en los siguientes pasos:

- Con la pipeta cuenta glóbulos rojos se aspiró el semen puro hasta la marca 0.5 de la pipeta, y luego se completó aspirando el diluyente espermicida (agua destilada) hasta la marca 101, Se agitó la pipeta en sentido transversal por 1 minuto aproximadamente, para luego descartar las 3 o 4 primeras gotas.
- Seguidamente se tomó una alícuota de 10uL (microlitros) del semen diluido y se colocó en cada campo de la cámara de Neubauer, se cubrió con su laminilla especial de la cámara y se dejó en reposo unos 4 a 5 minutos antes de realizar el conteo. Antes de realizar el conteo se colocó, la cámara de Neubauer en el microscopio óptico, se localizó con un menor aumento a (10x) uno de los campos, para iniciar el



conteo se enfocó con el objetivo (40X), y se realizó el conteo de 5 cuadrantes de los 25 existentes.

La concentración real de los espermatozoides se obtuvo según la fórmula Mellisho & Gallegos, (2010):

$$\text{Concentración} = N \times D \times 10000$$

Donde:

- **Concentración:** se determina en millones por ml.
- **N:** Promedio de número de espermatozoides contados de 5 cuadrantes pequeños en ambas cámaras (total).
- **D:** Grado de dilución 0.1ml de semen en 0.9ml de suero fisiológico: 10

Las características microscópicas como motilidad total, motilidad progresiva vitalidad espermática y el test Hipoosmótico se evaluaron a la pre-congelación y a la post- descongelaación.

3.7.2 Motilidad total

La evaluación de la motilidad total espermática consistió en el conteo del total de espermatozoides vivos. Se colocó una gota de semen sobre una lámina portaobjetos previamente temperada a 37 °C sobre una platina térmica, a continuación, se cubrió con cubreobjetos y se observó al microscopio (objetivo 40x). Para el conteo de los espermatozoides se utilizó el programa de captura de imágenes y video LAZ EZ, para poder grabar 4 diferentes campos microscópicos donde se contaron como mínimo un total de 200 espermatozoides. La motilidad



total, fue considerada aquellos espermatozoides que tenían cualquier tipo de movimiento, la cual se expresó en porcentaje.

Ecuación 3. Fórmula para el porcentaje de motilidad total.

$$\% \text{ de motilidad total} = \frac{\text{Numero de espermatozoides motiles}}{\text{Numero total de espermatozoides observados}} \times 100$$

3.7.3 Motilidad total

Se siguió el mismo procedimiento que la motilidad total, con la diferencia de que, en la motilidad progresiva rectilínea, se observó movimientos con tendencia recta que atraviesa el campo microscópico para lo cual se contaron un total de 200 espermatozoides como mínimo y los datos fueron expresados en porcentajes.

Ecuación 4. Fórmula para determinar el porcentaje de motilidad progresiva.

$$\% \text{ de motilidad progresiva} = \frac{\text{Numero de espermatozoides con movimiento rectilineo.}}{\text{Numero total de espermatozoides observados.}} \times 100$$

3.7.4 Vitalidad espermática

La proporción de espermatozoides vivos y muertos se realizó mediante la técnica de coloración con Eosina al 5% y Nigrosina al 10%.

Para lo cual sobre una lámina porta objetos temperada a 37°C, se puso 1 gotas de Eosina-Nigrosina y junto a la gota se colocó una gota de semen, se esperó que ambas gotas se temperen, para poder mezclar con ayuda de una cubeta la cual se dejó en reposo por 4 segundos. Finalmente se realizó el frotis extendiendo la



mezcla sobre otra lámina portaobjetos de un extremo al otro, para posteriormente dejar la lámina porta objeto sobre la platina térmica para que se atempere a 37°C.

Para la evaluación se utilizó un microscopio a un aumento de 100x con aceite de inmersión realizando el conteo de 200 espermatozoides como mínimo, donde se consideró espermatozoides vivos aquellos que no se colorearon y espermatozoides muertos a los que son teñidos de color rosado, cuyos datos obtenidos fueron expresados en porcentajes.

Ecuación 5. Fórmula para determinar la vitalidad espermática.

$$\% \text{ de vitalidad} = \frac{\text{Numero de espermatozoides sin coloracion}}{\text{Numero total de espermatozoides observados}} \times 100$$

3.7.5 Evaluación del Test Hipoosmótico (Host)

La evaluación del Test Hipoosmótico se realizó por el método descrito por Jeyendran et al. (1984) con ciertas modificaciones.

En un tubo de ensayo se colocó 1 mL. De solución Hipo osmótico en baño maría a 37 °C. Una vez temperada la solución Hipo osmótica se adicionó 0.1 mL de muestra espermática. La mezcla se incubó a 37 °C durante 30 min. Luego con la ayuda de una jeringa adosada con un tip de 5µL, se aspiró y se colocó una gota de la mezcla sobre una lámina porta-objetos, se cubrió con una lámina cubre-objetos, dejándose reposar por 1 minuto antes de realizar la evaluación, se observó los espermatozoides en un microscopio a un aumento de 100x considerando reacción positiva a los espermatozoides con cola enrollada e hinchada, los datos obtenidos fueron expresados en porcentajes.



Ecuación 6. Fórmula para determinar la funcionabilidad de membrana
(Test Hipoosmótico).

%de test Hipoosmotico

$$= \frac{\text{Nº de espermatozoides con cola enrollada}}{\text{Numero total de espermatozoides observados}} \times 100$$

3.8 ANALISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó mediante el software estadístico Jamovi 1.6.23.0 (R Core Team, 2021). Para la evaluación de volumen, concentración y color se realizó mediante estadística descriptiva, para el análisis de las características: Motilidad total, Motilidad progresiva, Vitalidad y Funcionalidad de membrana (test Hipoosmótico) en las diferentes etapas como en la pre-dilucion (37°C) y post-descongelación (37°C), para determinar el efecto de los dos tratamientos experimentales las cuales fueron T1: AndroMed y T2: Optixcell; realizando una comparación de los promedios con la prueba de t de Students con un nivel de significancia de 0.05.

Con la siguiente formula:

$$t = \frac{X - \mu}{\frac{S_x}{\sqrt{n}}}$$

X : Media

μ : valor a analizar

S_x : Desviación estándar

n : Tamaño de muestra.



CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 CARACTERÍSTICAS SEMINALES MACROSCÓPICAS A LA COLECCIÓN

4.1.1 Volumen seminal de toros reproductores según edad a la colección

Tabla 3. Volumen seminal de toros reproductores según edad a la colección (promedio).

EDAD	TORO	Medias	N	E.E.	
3	LUTHER	5.03	8	0.14	a
4	PARKER	6.63	8	0.14	b
5	IMPALA	6.75	8	0.14	b

Nota: a, b: letras diferentes en cada columna indican diferencia significativa ($p > 0.05$)

La tabla 3, muestra que según edad no existe diferencia estadística entre los toros Parker e Impala que tienen 4 y 5 años, respectivamente mientras que si existe diferencia estadística con el toro Luther de 3 años frente a los toros Parker e Impala que tienen 4 y 5 años respectivamente.

Este resultado estaría evidenciando que existe diferencia estadística en cuanto a la edad, y se estaría corroborando con lo indicado por Cabrera V. & Pantoja A., (2012), que reportó 4.33ml en toros de la raza Holstein y Brown Swiss de 1.5 a 2 años de edad, ya que palacios, (2015) reportó en toros Brown swiss 4.25 ml, estos valores inferiores reportados por los autores se debería principalmente a la influencia de la edad, por otra parte Damas Huaman,(2010) reportó en cuanto al volumen seminal para toros Holstein y Brown Swiss $5,30 \pm 1,3$ ml y $6,52 \pm 2,15$ ml respectivamente.



Finalmente indican que el volumen de los eyaculados de toros es un parámetro que no tiende a repetirse, ya que este parámetro muy importante depende de diferentes factores como la edad, condición de los toros reproductores, factores ambientales y el manejo que realizan los operarios durante la colección. El volumen que se colecta luego de cada eyaculado disminuye gradualmente debido a la frecuencia de recolección a lo largo de cada extracción (Cristhian & Washington, 2022).

4.1.2 Color de semen de toros reproductores a la colección

La evaluación de los colores se pudo evidenciar que fue blanco cremoso y blanco lechoso con aspecto denso en todas sus extensiones y según Holy & Martínez Jústiz, (1975) el semen de buena calidad debe tener un color blanco lechoso, grisáceo lechoso o amarillento cremoso.

La característica depende de la cantidad de espermatozoides, cuando el semen es de buena calidad, se observa con una coloración blanco-lechosa o cremosa y cuando es de mala calidad su color es similar a leche aguada normalmente, el color del semen es blanco cremoso y a medida que disminuye la concentración espermática se hace más claro hasta llegar a la azoospermia (Urdaneta & Olivares, 1985).

El color de semen refleja la viabilidad espermática por ser uno de los parámetros asociado con la calidad espermática y es un indicador de salud de los reproductores ya que se considera que una muestra de semen normal debe ser un color blanco y amarillento, mientras que los colores rosado, marrón y verdoso, son indicativo de signos patológicos (Cristhian & Washington, 2022).

4.2 CARACTERÍSTICAS SEMINALES MICROSCÓPICAS A LA PRE-DILUCIÓN CON 2 DILUTORES COMERCIALES (ANDROMED Y OPTIXCELL)

Tabla 4. Características seminales de semen pre-diluido con dilutor AndroMed y Optixcell (promedio \pm desviación estándar).

	N	AndroMed	OptiXcell	p valué
Motilidad total (%)	12	91.6a \pm 2.09	88.5b \pm 3.45	0.013
Motilidad Progresiva (%)	12	80.6a \pm 2.30	75.1b \pm 3.73	<0.001
Vitalidad (%)	12	92.8a \pm 1.98	88.6b \pm 1.82	<0.001
Test Hipoosmótico (%)	12	84.7a \pm 2.49	81.0a \pm 2.24	0.001

Nota: a, b: letras diferentes en cada fila indican diferencia significativa.

La Tabla 4, muestra los parámetros microscópicos de semen fresco, donde se observa diferencias en los parámetros de motilidad total, motilidad progresiva y vitalidad siendo superior el dilutor Andromed en comparación al OptiXcell. Para el test Hipoosmótico no hay diferencia entre dilutores. Esto se debería probablemente a la composición del dilutor AndroMed que contiene como crioprotector no permeable la lecitina de soya, ya que le confiere estabilidad estructural a las membranas celulares (Oke et al., 2010), por otra parte OptiXcell contiene liposomas de soya como crioprotector no permeable. Las diferencias del resto de características espermáticas como motilidad progresiva y vitalidad se deberían al efecto de los diferentes crioprotectores no permeables ya que AndroMed mantendría adecuadamente la motilidad progresiva y la vitalidad en semen de toros en fase de predilución.

En nuestro estudio se planteó el uso de dilutores libres de componentes de origen animal, ya que la yema de huevo entera contiene algunos agentes anti-crioprotectores



como lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Pace & Graham, 1974), hormonas (Lipar et al., 1999) y, al ser de origen animal, conlleva riesgos de contaminación microbiana (Aires, 2003). Además, la composición de la yema de huevo de gallina comercial varía según el híbrido seleccionado, el manejo y las prácticas nutricionales adoptadas (Bathgate et al., 2006). Por lo tanto, se empleó diluyentes químicamente libres de proteínas de origen animal.

Diversos autores respecto a la motilidad total con el mismo método de colección reportaron valores inferiores. Así, Pernas et al. (2023), indica valores menores de motilidad total con Andromed de 77.6%. Por otro lado, empleando dilutores como Tris-yema, Botu- Bov® (BB) y agua de coco en polvo ACP-111 reporto valores de 81.38%, 78.87% y 76.19% (Furtado Zorzetto, 2013); empleando el dilutor AndroMed reportan valores de 86.25 %, 85.63% y 84.69% (Rojas, 2014); con los dilutores Tris-YH, Triladyl-YH y AndroMed reportaron 78.0%, 80.7% y 76.7% respectivamente para cada dilutor, la superioridad de nuestros resultados probablemente de deba a la diferencia de los eyaculados dada por la especie y el mismo individuo. Por otra parte, con diferentes técnicas de colección reportaron valores similares empleando el dilutor AndroMed reporto 90.7% (Nuñez & Rubio, 2015); 85.55% y 92.72% (Furtado Zorzetto, 2016). Mientras que empleando dilutores como AndroMed, EYC y Triladyl reportaron valores de 89%, 90% y 88% (Palacios, 2015). Autores con diferentes técnicas de colección de semen reportan valores inferiores de 74.5% (Ribeiro-Peres et al., 2014).

Respecto a la motilidad progresiva, diversos autores con el mismo método de colección seminal reportaron valores similares al empleando dilutores como AndroMed y Steridyl 82.50% y 82.38% (Romero, 2016). Por otra parte reportan valores inferiores con diferentes técnicas de colección seminal, fueron reportados por Pernas et al. (2023) con una motilidad rogresiva de 71.6% utilizando Andromed. También, (Gallardo &



Vargas 2015), reportaron 73% de motilidad progresiva y al realizar un análisis computarizado mediante un sistema CASA Furtado & Zorzetto (2016), reportaron 65.00% y 61.78%. Además, Maleki et al. 2023), reporta una motilidad progresiva de 75.21%. En estudios con otros dilutores como Tris-YH, Botu- Bov® (BB) y agua de coco en polvo ACP -111 encontraron 61,34%, 54,00% y 57,41% respectivamente para cada dilutor Furtado Zorzetto, (2013); estos porcentajes inferiores respecto a nuestro estudio se debería a las condiciones medio ambientales, especie y a diferentes métodos de colección. Mientras que otros autores reportan valores superiores con la misma técnica de colección, al emplear dilutores comerciales, que contienen lecitina de soya como Bioxcell obtuvo 85.64% y con AndroMed 86.54% (Huaman, 2010) estos resultados son superiores respecto a nuestro trabajo, se debería principalmente al efecto de la raza ya que la colección que realizo fue en toros Holstein y Brown Swiss.

Vitalidad espermática se mantiene mejor el dilutor AndroMed que el dilutor OptiXcell a la predilución. Diversos Autores reportan valores inferiores al realizar la colección con la misma técnica empleando el dilutor AndroMed y Steridyl reportan valores de 72.18% y 75.90% respectivamente para cada dilutor (Romero, 2016); con el dilutor Bioxcell y AndroMed reportan valores de 77.38% y 78.85% (Huaman, 2010). Además, Maleki et al. (2023), reporta una viabilidad del 81.27% del semen fresco diluido con Andromed en toros Limousin. Esto se debería principalmente al efecto de la raza y la especie. Se corroboraría con los valores reportados por Cabrera, (2017), quien al comparar dos razas como ,Simmental empleando dilutores como OptiXcell y AndroMed reporto 84.30% y 82.71% para cada dilutor, mientras que en toros braunvieh con los dilutores OptiXcell y AndroMed hallo 77.39% y 66.74% para cada dilutor, observándose el efecto de tipo de dilutor frente a los eyaculados de diferentes individuos. Mientras que al realizar la colección seminal con diferentes técnicas de colección reportan valores



inferiores de 69.4% (Ribeiro-Peres et al., 2014) nuestros resultados presentan superioridad y se debería a que los espermatozoides fueron recuperados del epidídimo de toros.

La integridad de la membrana no presenta diferencia estadística entre los dos dilutores, pero si se muestra una superioridad numérica con el dilutor AndroMed en comparación con el dilutor OptiXcell. Autores reportan valores inferiores con el mismo método de colección empleando el dilutor Bioxcell reporto 66.00% y con AndroMed 67,90% (Huaman, 2010); mientras que (Ribeiro-Peres et al., 2014) empleando dilutores como OptiXcell y AndroMed hallo 51.33% y 41.63% con la raza Simmental, por otro lado empleando OptiXcell y AndroMed 46.60% y 37.69% con la raza Braunvieh, todos estos valores inferiores se deberían principalmente a la diferencia entre individuos y al método de colección.

Dentro de los factores que afectan la calidad seminal de toros se tiene principalmente a la raza. Notándose que la raza bos Indicus está mejor adaptada a climas cálidos, mientras que los bus Taurus son más resistentes a climas fríos (Brito et al., 2002). Por otra parte la resistencia a los diferentes climas se vería afectado por la época del año ya que la capacidad de tolerancia al estrés calórico y a la temperatura del día afecta a las características espermáticas (Lozano, 2009), el testículo al ser un órgano que logra mantener una temperatura ideal de 33-34,5 °C, debe mantener una termorregulación testicular constante, siendo la temperatura ambiental ideal para ello entre 18 y 22 °C. esto indicaría que las condiciones del trópico no favorecen a las condiciones de formación adecuada de los espermatozoides (Fuerst-Waltl et al., 2006).

4.3 CARACTERÍSTICAS SEMINALES MICROSCÓPICAS A LA POST-DESCONGELACIÓN CON 2 DILUTORES COMERCIALES (ANDROMED Y OPTIXCELL)

Tabla 5. Características seminales post-descongelación con el dilutor AndroMed y Optixcell (promedio \pm desviación estándar).

	n	Media \pm DS		p value
		AndroMed	OptiXcell	
Motilidad total (%)	12	60.7a \pm 3.14	59.0a \pm 1.25	0.101
Motilidad progresiva (%)	12	38.0a \pm 5.89	36.8a \pm 5.02	0.604
Vitalidad (%)	12	61.8a \pm 1.26	59.5b \pm 1.45	<0.001
Test Hipoosmótico (%)	12	54.0a \pm 3.56	54.6a \pm 3.16	0.6517

Nota: a, b: letras diferentes en cada fila indican diferencia significativa.

La Tabla 5, muestra los parámetros microscópicos de semen después del proceso de criopreservación/descongelación con el dilutor AndroMed y el OptiXcell.

Donde se observa que no existe diferencia significativa para la motilidad total, motilidad progresiva y Test Hipoosmótico las características espermáticas muestran superioridad numérica con el dilutor AndroMed, mientras que si existe diferencia estadística para la vitalidad espermática entre los dos dilutores.

Según Hafez, (2002), Los parámetros espermáticos microscópicos después de procesos de criopreservación/post-descongelación se reducen alrededor de 40-50%. Debiéndose al estrés que sufren los espermatozoides en la membrana plasmática por los cambios de temperatura (Watson, 2000).



Resultados mayores de motilidad total post-descongelación de 76.98% y motilidad progresiva de 66.34%, vitalidad del 78.50% e integridad de membrana del 77.35%, fueron reportados por Arif et al. (2022), usando Andromed en toros Limosiuun de 3 años de edad y evaluado en el sistema de CASA, debido a que estos estudios se realizaron a nivel del mar. Es decir que la altitud es un factor importante para un adecuado funcionamiento del espermatozoide durante el proceso de criopreservación.

Resultados inferiores, son indicados por Salmah et al. (2021), la motilidad post descongelación utilizando Andromed fue del 50.80% y una viabilidad del 54.20% en toros Bali, al trabajar con esta raza tropical existiría un efecto negativo del estrés calórico sobre la motilidad espermática. En otro estudio, la motilidad progresiva fue 52.41%, viabilidad del 49.64%, test de Host 39.07% en el semen descongelado con dilutor andromed, en toros Limousin (Maleki et al., 2023).

En proceso de crio-preservación se producen shock frio el cual modifica irreversiblemente los fosfolípidos de las membranas plasmática de los espermatozoides (Drobnis et al., 1993). Ante este efecto negativo la lecitina de soya que contiene el dilutor AndroMed protege a los espermatozoides mediante la sustitución de los fosfolípidos de la membrana del espermatozoide, y la prevención de la formación de cristales de hielo intracelulares (Mutalik et al., 2014). Los fosfolípidos y liposomas protegen a los espermatozoides uniéndose con las membranas o transformando su estructura mediante la regulación del intercambio de colesterol y fosfolípidos, mejorando el porcentaje de supervivencia de los espermatozoides de toros (Röpke et al., 2011). Nuestros resultados indican que los dos dilutores presentan el mismo efecto con respecto a la motilidad total, motilidad progresiva y vitalidad espermática. Esto podría explicarse debido a que los dilutores presentan como crioprotectores no permeable a la lecitina de soya (AndroMed), y a base liposomas de soya (Optixcell), contiene fosfolípidos con igual composición



química, presentando una concentración mayor de fosfatidilcolina en ambos dilutores (García & Agüero, 2015; Miguel-Jimenez et al., 2020). La Lecitina disminuye las lesiones que se producen en los procesos de criopreservación (Cabrera, 2017). Tanto el dilutor AndroMed y OptiXcell tienen mecanismos de criopreservación diferentes. Como lo menciona Minitube, (2021) indica que las lecitinas se encuentran en un 10 % en la soya, y este componente es parte de la yema de huevo (Aires et al., 2003), Technologies, (2020) indica que los liposomas o vesículas de fosfolípidos la cual presenta un perfil de lípidos capaces de adherirse con mayor facilidad a la membrana citoplasmática. Por tal motivo la protección de la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides tiene el mismo resultado en el proceso de criopreservación/descongelación en ambos dilutores.

Para la vitalidad espermática se puede observar que el dilutor AndroMed mantiene mejor esta característica en comparación con el dilutor OptiXcell, esto se debe a que el dilutor AndroMed es de origen Minitube, Tiefenbach, Alemania con un pH de 6.7 y contiene como crioprotector no permeable a la lecitina de soya, fosfolípidos, tris, ácido cítrico, antioxidantes, glicerol, tilosina, gentamicina, espectinomicina y lincomicina; mientras que el dilutor Optixcell tiene como origen IMV Technologies, Francia con un pH de 6.8 y contiene como crioprotector no permeable a los liposomas de soya, hidratos de carbono, sales minerales, tampón, antioxidantes, glicerol, tilosina, gentamicina, espectinomicina y lincomicina, esta sería la principal razón por la cual con el dilutor (Al-Bulushi et al., 2019) observándose que tienen diferencias en cuanto a sus composiciones y lo más relevante son las variaciones del pH. Los cambios en la estructura en los espermatozoides, particularmente en la membrana plasmática y las membranas acrosómicas externas y función mitocondrial alterada, se producen durante la criopreservación/descongelación (Layek et al., 2016). Una de las principales causas para la disminución de la sobrevivencia espermática son los cambios de pH; es por ese motivo



que se busca dilutores adecuados que tenga una capacidad amortiguar y mantener el pH en las muestras seminales (Buitrago & Pérez, 2008); los solutos disueltos en el medio que rodea al espermatozoide genera presión sobre la membrana celular conociéndose a este fenómeno como presión osmótica del diluyente (Evans et al., 1990). Y se podría concluir que el pH de 6.7 del dilutor AndroMed mantiene adecuadamente la vitalidad espermática del semen de toros después de procesos de criopreservación/descongelación.

En trabajos similares para la motilidad total con la misma técnica de colección de semen reportaron valores similares a la post-descongelación con el dilutor Triladyl 60.1% y AndroMed 58.6% (Jimenez et al., 2020); Con el dilutor Bioxcell reporto 62.7%, 62.1%, 63% y 61.2% (Cabrera & Pantoja, 2012) y con el dilutor OptiXcell 59.0% (Murphy et al., 2018)

Mientras que de la misma manera reportan valores inferiores con el BullXcell (a base de yema de huevo) de 51.9 % y AndroMed 41.93% (Murphy et al., 2018); con los dilutores como Tris-yema reporto de 58.59%, Botu- Bov® (BB) 52.64% y agua de coco en polvo ACP -111 36.94% (Furtado Zorzetto, 2013). La superioridad de nuestros resultados en el presente trabajo se debería principalmente al efecto del tipo de dilutor, la diferencia entre las razas y a las condiciones climáticas ya que los trabajos antes mencionados se realizaron en condiciones medio ambientales del trópico. Por otra parte, con diferentes técnicas de colección reportan valores inferiores, empleando el dilutor AndroMed 44.3% (Nuñez & Rubio, 2015)

Respecto a la motilidad progresiva a la post-descongelación no existe diferencia estadística, pese a que ambos dilutores tiene derivados de la soya por un lado la lecitina de soya que posee el dilutor AndroMed, y por otro lado liposomas de soya que posee el dilutor OptiXcell, y se aprecia que existe inferioridad numérica de la motilidad progresiva



con el dilutor OptiXcell en comparación con el dilutor AndroMed. Según Pulido, (1997) menciona que, la motilidad individual progresiva después de la criopreservación debe estar dentro de un rango de 24- 45%. Nuestros valores de 38% y 36.82% estarían en un rango aceptable y se podría indicar que los dilutores AndroMed y OptiXcell mantienen adecuadamente la motilidad progresiva de los espermatozoides post-descongelados de toros Brown Swiss.

Los diferentes resultados obtenidos en diversas investigaciones se deben principalmente a varios factores como a las técnicas de criopreservación, la concentración de espermatozoides por dosis, la descongelación, la genética, la raza y las prácticas de manejo de los toros todos estos factores podrían afectar la calidad de los espermatozoides (Anzar et al. 2002; Nichi et al. 2006; Morrell et al. 2018)

Mientras autores en trabajo similares reportan, valores inferiores empleando el dilutor AndroMed obtuvo 31.7% (Murphy et al., 2018); con agua de coco en polvo ACP-111 29.59% (Furtado Zorzetto, 2013), observándose superioridad en el presente trabajo y se debería principalmente al efecto de los dilutores comerciales que empleamos, ya que contienen derivados de soya como la lecitina y los liposomas. Ya que la lecitina de soya, es una mezcla natural de fosfatidilcolina y ácidos grasos como oleico, esteárico y palmítico que confiere estabilidad estructural a las membranas celulares (Oke et al., 2010) mientras que las liposomas contienen una composición y concentración óptima de fosfolípidos que aseguran la protección celular durante la crioconservación (Manjunath, 2012). Estas características permitirían la conservación de la motilidad progresiva de los espermatozoides de toros Brown Swiss. Por otra parte, autores en trabajos similares reportan similitud en los resultados, empleando el dilutor AndroMed reportó 41.81 % y Triladyl 40.65% (L. Galarza, 2013); y con BullXcell obtuvo 41.8% (Murphy et al., 2018); como Botu- Bov® (BB) 40.39% (Furtado Zorzetto, 2013).



Otros autores reportan porcentajes superiores empleando el dilutor OptiXcell de 45.7% (Murphy et al., 2018); con Tris-yema de huevo 47.56% (Furtado Zorzetto, 2013); con el dilutor AndroMed 60.65% y con Steridyl 57.22% (Romero, 2016). Al comparar con nuestros resultados, se observa que los porcentajes reportados por los autores son superiores y se debería principalmente a nuestro método de congelación a las condiciones medio ambientales y la diferencia entre especies y los individuos.

Se observa un descenso en relación al porcentaje desde la fase de pre-congelación a la post-descongelación, y según Cristhian & Washington (2022), indican que la reducción de la motilidad espermática está asociado a las lesiones de la mitocondrial, pues dicho organelo es necesario para la generación de energía tanto para la motilidad como para la fertilización, y este descenso del porcentaje se debería a todos los procesos que ocurren desde el momento de pre-congelación, criopreservación y finalmente post-descongelación, ya que dichos procesos producen daño en la mitocondria de los espermatozoides.

Respecto al efecto de los dilutores derivados de la soya sobre la vitalidad espermática a la post-descongelación existe diferencia estadística para el efecto del dilutor sobre la sobrevivencia de los espermatozoides, pese a que ambos dilutores poseen derivados de la soya por un lado la lecitina de soya que posee el dilutor AndroMed y por otro lado liposomas que posee el dilutor OptiXcell. Las diferencias que se muestran en su composición están basadas en la presencia y ausencia de antibióticos como AndroMed que contiene lincomicina, espectinomicina, gentamicina y tilosina. Mientras que Bioxcell por otra parte contiene penicilina, lincomicina, espectinomicina, estreptomycin (Cabrera, 2017) estas diferencias serían las que se encarguen de que ambos dilutores tengan porcentajes de vitalidad espermática diferente. En cuanto a la vitalidad espermática autores en trabajos similares reportan porcentajes inferiores, empleando el dilutor



AndroMed 48.96% y con el dilutor Triladyl 51.73% (L. Galarza, 2013); con el dilutor AndroMed 53.0% y con el dilutor Triladyl 55.0% con dos horas de equilibrio; con 4 horas de equilibrio con el dilutor AndroMed 48.2% y con el dilutor Triladyl 55.4% y finalmente con 7 horas de equilibrio con AndroMed 45.3% y con Triladyl 46.2% (D. Galarza et al., 2016). Observándose que los tiempos prolongados de equilibrio o la exposición prolongada a los crioprotectores no favorece la sobrevivencia de los espermatozoides. Diversos autores reportan similitud en los resultados. Empleando el dilutor AndroMed 60.85% y con el dilutor Steridyl 61.30% (Romero, 2016)

La integridad de membrana plasmática mediante el test host a la post-descongelación no existe diferencia estadística para el efecto del dilutor sobre la reacción al test de host donde se indica que los espermatozoides con membrana integra reaccionaron positivamente. Para los espermatozoides, la membrana plasmática es una estructura dinámica que participa en el reconocimiento y transporte de moléculas al medio circundante, proporcionando un sistema molecular para el reconocimiento del ovocito (Rubio & Quintero, 2008). Por esa misma razón es fundamental determinar el efecto que tienen los distintos dilutores y crio-protectores en la criopreservación seminal sobre la integridad de la membrana plasmática. Y se podría afirmar que los dos dilutores poseen derivados de la soya mantienen de igual manera la integridad de la membrana. ya que los dilutores de origen vegetal contienen una mezcla natural de fosfatidilcolina y una serie de ácidos grasos como el ácido esteárico, oleico y palmítico, que se sabe que confieren estabilidad estructural a las células (Chaudhari et al., 2015; Oke et al., 2010).

Autores con técnicas similares respecto a la integridad de la membrana plasmática con reacción endosmótica positiva reportaron valores inferiores, empleando el dilutor AndroMed reporto 44.87% y con el dilutor Steridyl reporto 42.65% (Romero, 2016); con el dilutor Bioxcell reporto 40.7%, 40.6%, 37.1% y 41.2% (Cabrera & Pantoja, 2012);



empleando el dilutor Bioxcell obtuvo 43.44% y con Andromed 45,93% (Huaman, 2010). Y según Rubio & Quintero,(2008) indica que la disminución de la motilidad progresiva está relacionada con la integridad de la membrana plasmática ya que en procesos de descongelamiento los espermatozoides son muy susceptibles a la criopreservación, a la adición de crio-protector, el proceso de enfriamiento, la congelación, el almacenamiento en nitrógeno líquido y la descongelación causando un marcado deterioro de la membrana plasmática. Esto indicaría que la integridad o funcionabilidad de la membrana plasmática estaría relacionada con la motilidad. Ya que las diferentes alteraciones celulares que producen los distintos crio-protectores están más relacionadas con un shock osmótico, que con la toxicidad química (Rubio & Quintero, 2008). Por otra parte Vera, (2001) indica que la congelación de semen causa daños a nivel de la membrana plasmática y en su acrosoma.



V. CONCLUSIONES

- Las características macroscópicas seminales de toros Brown Swiss como, el volumen presento una diferencia estadística según la edad mientras que el color fue de blanco cremoso y blanco lechoso.
- Las características microscópicas seminales de toros Brown Swiss a la predilución presento diferencia estadística para motilidad total, motilidad progresiva y vitalidad mientras que para integridad de la membrana plasmática mediante el test Hipoosmótico no mostro diferencia estadística entre los dilutores AndroMed y OptiXcell.
- Las características microscópicas seminales de toros Brown Swiss a la post-descongelación no presento diferencias estadísticas para la motilidad total, motilidad progresiva y la integridad de la membrana plasmáticas mediante el test Hipoosmótico, mientras que si se observó una diferencia estadística para la vitalidad espermática entre los dilutores AndroMed y OptiXcell.



VI. RECOMENDACIONES

- Realizar pruebas de fertilidad *In-vivo* e *In-vitro* para determinar la tasa de fertilidad con los dos dilutores comerciales.
- Realizar investigaciones con otros dilutores comerciales con la finalidad de obtener mejores resultados de calidad seminal
- Realizar la criopreservación de semen con los mismos dilutores y probar diferentes tiempos de equilibrio y diferentes temperaturas de descongelación.
- Se recomienda seguir probando el dilutor Optixcell y Andromed para el procesamiento de semen bovino en los centros de producción de pajillas y hacer seguimiento de sus bondades en función a fertilidad en los establos lecheros.



VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aires, V. A. (2003). 3. Bogner K, Mueller-Schloesser S, Hinsch E. *Vitro and in Vivo Comparison of Egg Yolk-Based and Soybean Lecithin-Based Extenders for Cryopreservation of Bovine Semen. Theriogenology*, 60, 269–279.
- Aires, V. A., Hinsch, K. D., Mueller-Schloesser, F., Bogner, K., Mueller-Schloesser, S., & Hinsch, E. (2003). In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology*, 60(2), 269–279. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01369-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01369-9)
- Al-Bulushi, S., Manjunatha, B. M., Bathgate, R., Rickard, J. P., & de Graaf, S. P. (2019). Liquid storage of dromedary camel semen in different extenders. *Animal Reproduction Science*, 207(May), 95–106. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.06.008>
- Allende, R., & Arisnabarreta, E. (2021). Fisiología espermática , producción de semen y evaluación de la calidad seminal. *Taurus*, 1.
- Alonso, R., Gonzalez, F., Da, E., Usando, C., & Técnicas, D. (2004). *CONGELAÇÃO E CRIOPROTETORES SOBRE PARÂMETROS ESPERMÁTICOS E A INTEGRIDADE DE MEMBRANAS DO*.
- Amann, R. P., & Pickett, B. W. (1987). Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, 7(3), 145–173. [https://doi.org/10.1016/S0737-0806\(87\)80025-4](https://doi.org/10.1016/S0737-0806(87)80025-4)
- Amirat, L., Tainturier, D., Jeanneau, L., Thorin, C., Gérard, O., Courtens, J. L., & Anton, M. (2004). Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: A comparison with Optidyl®, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology*, 61(5), 895–907. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00259-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00259-0)
- Bathgate, R., Maxwell, W. M. C., & Evans, G. (2006). Studies on the effect of supplementing boar semen cryopreservation media with different avian egg yolk types on in vitro post-thaw sperm quality. *Reproduction in Domestic Animals*, 41(1), 68–73. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00623.x>
- Becker, W. C., Senger, P. L., & Aalseth, E. P. (1977). *INFLUENCE OF GLYCEROL LEVELS, DILUENT AND POST-THAW TEMPERATURE ON MOTILITY AND*



ACROSOMAL MAINTENANCE IN BOVINE SEMEN FROZEN IN PLASTIC STRAWS. 44(6), 1067–1071.

- Bergeron, A., Crête, M. H., Brindle, Y., & Manjunath, P. (2004). Low-Density Lipoprotein Fraction from Hen's Egg Yolk Decreases the Binding of the Major Proteins of Bovine Seminal Plasma to Sperm and Prevents Lipid Efflux from the Sperm Membrane. *Biology of Reproduction*, 70(3), 708–717. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.022996>
- Bergeron, A., & Manjunath, P. (2006). New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Molecular Reproduction and Development*, 73(10), 1338–1344. <https://doi.org/10.1002/mrd.20565>
- Blackshaw, A. W., & Salisbury, G. W. (1957). Factors Influencing Metabolic Activity of Bull Spermatozoa. II. Cold-Shock and its Prevention. *Journal of Dairy Science*, 40(9), 1099–1106. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(57\)94601-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(57)94601-5)
- Boiso, I. (2001). Principios básicos de Criobiología. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*, 18(4), 4–6.
- Brito, L. F. C., Silva, A. E. D. F., Rodrigues, L. H., Vieira, F. V., Deragon, L. A. G., & Kastelic, J. P. (2002). Effects of environmental factors, age and genotype on sperm production and semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* AI bulls in Brazil. *Animal Reproduction Science*, 70(3–4), 181–190. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(02\)00009-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(02)00009-X)
- Buitrago, J. M., & Pérez, L. M. (2008). *Comparacion de dos diluyentes para la criopreservacion de semen ovino.*
- Cabrera, P. (2017). *Integridad de la membrana citoplasmatica en semen refrigerado y congelado de toros usand dos dilutores sinteticos.*
- Cabrera, P., & Pantoja, C. (2012). Viabilidad Espermática E Integridad Del Acrosoma En Semen Congelado De Toros Nacionales. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 23(2), 192–200. <https://doi.org/10.15381/rivep.v23i2.899>
- Castelo, T. de S., Rodrigues, T., & Silva, A. R. (2008). *CONSIDERAÇÕES SOBRE A CRIOPRESERVAÇÃO.* 67–75.
- Chaudhari, D. V., Dharni, A. J., Hadiya, K. K., & Patel, J. A. (2015). Relative efficacy of egg yolk and soya milk-based extenders for cryopreservation (-196°C) of buffalo



semen. *Veterinary World*, 8(2), 239–244.
<https://doi.org/10.14202/vetworld.2015.239-244>

- Concannon, P. W. (1989). Canine semen freezing and artificial insemination. *Current Veterinary Therapy, Small Animal Practice*, 1247–1259.
- Crespo, E., & Quintero, A. (2014). Calidad seminal de toros criollo limonero. *Revista Científica de La Facultad de Ciencias Veterinarias de La Universidad Del Zulia*, 24(6), 518–525.
- Cristhian, W., & Washington, E. (2022). *VALORACIÓN ESPERMÁTICA DE SEMEN BOVINO CRIOPRESERVADO CON TRES CURVAS DE TEMPERATURA*. 0–2.
- Curry, M. R. (2000). *Cryopreservation of semen from domestic livestock*. 46–52.
- Dalimata, A. M., & Graham, J. K. (1997). *CRYOPRESERVATION OF RABBIT SPERMATOZOA USING ACETAMIDE IN COMBINATION WITH TREHALOSE AND METHYL CELLULOSE*. 97.
- Damas Huaman, R. E. (2010). Evaluación de dos dilutores comerciales en semen congelado de toros en el Banco Nacional. *Universidad Nacional Del Centro Del Perú*. <http://repositorio.uncp.edu.pe/handle/UNCP/2895>
- Damas, R. (2010). Evaluación de dos dilutores comerciales en semen congelado de toros en el Banco Nacional. In *Universidad Nacional del Centro del Perú*. Universidad Nacional del Centro del Perú.
- De-Leeuw, W., Haring, R. M., Kaal-Lansbergen, L. M. T. E., & Daas, J. H. G. den. (2000). *Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soy bean extract*. 00, 57–67.
- De Leeuw, F. E., Colenbrander, B., & Verkleij, A. J. (1991). The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury. *Reproduction in Domestic Animals*, 1(9), 95–104.
- Drobnis, E. Z., Crowe, L. M., Berger, T., Anchooguy, T. J., Overstreet, J. W., & Crowe, J. H. (1993). Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: A demonstration using sperm as a model. *Journal of Experimental Zoology*, 265(4), 432–437. <https://doi.org/10.1002/jez.1402650413>
- Evans, G., Maxwell, W. M. C., & Salamon, S. (1990). Inseminación artificial de ovejas y cabras. Editorial Acribia. *Zaragoza, España*. 204p.



- Fahy, M. (1986). *of Cryoprotectant " Toxicity " to Cryobiology ' s2. 13.*
- Fiume, M. Z. (2001). Final report on the safety assessment of Lecithin and Hydrogenated Lecithin. *International Journal of Toxicology*, 20(SUPPL. 1), 21–45.
<https://doi.org/10.1080/109158101750300937>
- Fuerst-Waltl, B., Schwarzenbacher, H., Perner, C., & Sölkner, J. (2006). Effects of age and environmental factors on semen production and semen quality of Austrian Simmental bulls. *Animal Reproduction Science*, 95(1–2), 27–37.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.09.002>
- Fukui, Y., Kohno, H., Togari, T., Hiwasa, M., & Okabe, K. (2008). Fertility after artificial insemination using a soybean-based semen extender in sheep. *Journal of Reproduction and Development*, 54(4), 286–289.
<https://doi.org/10.1262/jrd.20004>
- Furtado Zorzetto, M. (2013). *AVALIAÇÃO DO SÊMEN DE BÚFALOS EM TRÊS MEIOS DE CRIOPRESERVAÇÃO*. UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA FACULDADE.
- Furtado Zorzetto, M. (2016). *PERFIL LIPÍDICO DO SÊMEN DE TOUROS NELORE (Bos taurus indicus) DE ALTA E BAIXA RESISTÊNCIA ESPERMÁTICA À CRIOPRESERVAÇÃO*. UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA.
- Galarza, D., Serpa, V., & Torres, C. (2016). Comparación de dos medios para congelar semen de toro y la influencia de tres tiempos de equilibración en la calidad post-descongelación. *Maskana*, 6(Supl.), 189–190.
- Galarza, L. (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."* Facultad de ciencias agropecuarias universidad de cuenca.
- Gallardo, J., & Vargas, C. (2015). *"Evaluación de tres diluyentes para criopreservar semen bovino de toros cruce sahiwal (Bos taurus) en el trópico húmedo."*
<https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/15728/1/T-IASA I-005483.pdf>
- Galvez, J. (2017). *Evaluacion de dilutores a base de lecitina de soya y liposomas sobre la criopreservacion de espermatozoides de toros.*
- García, J. T., & Agüero, S. D. (2015). Fosfolípidos: Propiedades y efectos sobre la salud.



- Nutricion Hospitalaria*, 31(1), 76–83. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.1.7961>
- Gil, J., Lundeheim, N., Söderquist, L., & Rodríguez-Martínez, H. (2003). Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. *Theriogenology*, 59(5–6), 1241–1255. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01177-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01177-9)
- Gil, L. J. (1999). *Evaluation of post-thaw sperm quality in the bull and ram with special emphasis on semen processing*.
- Hafez. (2002). *Reproducción e inseminación artificial en animales* (6ta Ed.). Editorial Interamericana - Mc Graw – Hi.
- Hammerstedt, H., Graham, K., & Nolan, P. (1990). *Cryopreservation What of Mammalian Sperm : We Ask Them to Survive other retrace*. 11(1).
- Herman, H. A., Mitchell, J. R., & Doak, G. A. (1994). *The artificial insemination and embryo transfer of dairy and beef cattle: A handbook and laboratory manual* (Issue 636.08245 H551a). Illinois, US: Interstate Publishers.
- Hernández, A. (2017). El pequeño mundo de los liposomas. *Vol, 6*, 1–13.
- Herold, F. C., de Haas, K., Colenbrander, B., & Gerber, D. (2006). Comparison of equilibration times when freezing epididymal sperm from African buffalo (*Syncerus caffer*) using Triladyl™ or AndroMed®. *Theriogenology*, 66(5), 1123–1130. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.03.007>
- Hezavehei, M., Sharafi, M., & Kouchesfahani, H. M. (2018). Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 00(0), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.05.012>
- Hezavehei, M., Sharafi, M., Kouchesfahani, H. M., Henkel, R., Agarwal, A., Esmaeili, V., & Shahverdi, A. (2018). Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reproductive BioMedicine Online*, 37(3), 327–339. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.05.012>
- Hinsch, E., Hinsch, K., Boehm, J. G., & Schill, W. (1997). *Functional Parameters and Fertilization Success of Bovine Semen Cryopreserved in Egg-yolk Free and Egg-yolk Containing Extenders*. 149, 143–149.
- Holt, W. V. (2000). Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1–3), 3–22. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00152-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00152-4)



- Holy, L., & Martínez Jústiz, G. C. (1975). *Biología de la reproducción bovina*.
- Hong, C. Y., Shieh, C. C., Wu, P., Huang, J. J., & Chiang, B. N. (1986). Effect of phosphatidylcholine, lysophosphatidylcholine, arachidonic acid and docosahexaenoic acid on the motility of human sperm. *International Journal of Andrology*, 9(2), 118–122. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1986.tb00874.x>
- Huaman, D. (2010). Evaluación de dos dilutores comerciales en semen congelado de toros en el Banco Nacional. *Universidad Nacional Del Centro Del Perú*.
- Janett, F., Keo, S., Bollwein, H., Hässig, M., & Thun, R. (2005). Comparison of AndroMed®, Bioxcell® and Triladyl® extender for cryopreservation of bull semen. *Schweiz Arch Tierheilk*, 147, 62.
- Jeyendran, R. S., Van der Ven, H. H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B. G., & Zaneveld, L. J. D. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Reproduction*, 70(1), 219–228.
- Jimenez, S., Álvarez rodríguez, M., Hídalgo, C. O., Penae, A. I., Rodríguez gilb, J. E., & Mogasb, T. (2020). *Evaluación in vitro de diluyentes a base de yema de huevo , lecitina de soja y liposomas para la criopreservación de semen de toros lecheros*. 215.
- Kumar, S., Millar, J. D., & Watson, P. F. (2003). The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: A comparison of two controlled-rate cooling machines. *Cryobiology*, 46(3), 246–253. [https://doi.org/10.1016/S0011-2240\(03\)00040-3](https://doi.org/10.1016/S0011-2240(03)00040-3)
- Kumar, Saini, M., Kumar, D., Balhara, A. K., Yadav, S. P., Singh, P., & Yadav, P. S. (2015). Liposome-based semen extender is suitable alternative to egg yolk-based extender for cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Animal Reproduction Science*, 159, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.05.010>
- Layek, S. S., Mohanty, T. K., Kumaresan, A., & Parks, J. E. (2016). Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders. *Animal Reproduction Science*, 172, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.04.013>
- Leeuw, F. E. De, Leeuw, A. M. De, Daas, J. H. G. Den, Colenbrander, B., & Verkleij, A. J.



- (1993). *effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing.*
- Lima-Verde, I. B., Johannisson, A., Ntallaris, T., Al-Essawe, E., Al-Kass, Z., Nongbua, T., Dórea, F., Lundeheim, N., Kupisiewicz, K., Edman, A., & Morrell, J. M. (2018). Effect of freezing bull semen in two non-egg yolk extenders on post-thaw sperm quality. *Reproduction in Domestic Animals*, 53(1), 127–136. <https://doi.org/10.1111/rda.13080>
- Lipar, J. L., Ketterson, E. D., Nolan, V., & Casto, J. M. (1999). Egg yolk layers vary in the concentration of steroid hormones in two avian species. *General and Comparative Endocrinology*, 115(2), 220–227. <https://doi.org/10.1006/gcen.1999.7296>
- Lozano, H. (2009). Factores que afectan la calidad seminal en toros. *Revista De La Facultad De Medicina Veterinaria Y De Zootecnia*, 56(3), 258. <https://www.redalyc.org/pdf/4076/407639221010.pdf>
- Manjunath, P. (2012). New insights into the understanding of the mechanism of sperm protection by extender components. *Anim. Reprod.*, V, 9(4), 809–815. <https://www.animal-reproduction.org/article/5b5a6053f7783717068b46cc>
- Manjunath, P., Nauc, V., Bergeron, A., & Me, M. (2002). *Major Proteins of Bovine Seminal Plasma Bind to the Low-Density Lipoprotein Fraction of Hen 's Egg Yolk 1.* 1258, 1250–1258. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.004358>
- Medeiros, C., Forell, F., Oliveira, A., & Rodrigues, J. (2002). CURRENT STATUS OF SPERM CRYOPRESERVATION: WHY ISN'T IT BETTER? *Theriogenology*, February 1921, 1–4.
- Mellisho, E., & Gallegos, A. (2010). Manual de laboratorio de reproducción animal. URL: <Http://Tarwi.Lamolina.Edu.Pe/~Emellisho/Reproduccionarchivos/Practica>.
- Mendoza, E. (2015). *Evaluación de dos protocolos para la congelación de semen de alpaca (Vicugna pacos) a 2736 m.s.n.m. - Ayacucho 2013.* <http://repositorio.unsch.edu.pe/handle/UNSCH/2825>
- Miguel-Jimenez, S., Rivera del Alamo, M. M., Álvarez-Rodríguez, M., Hidalgo, C. O., Peña, A. I., Muiño, R., Rodríguez-Gil, J. E., & Mogas, T. (2020). In vitro assessment of egg yolk-, soya bean lecithin- and liposome-based extenders for cryopreservation of dairy bull semen. *Animal Reproduction Science*,



- 215(September 2019), 106315. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106315>
- Minitube. (2021). *Diluyente sin yema de huevo para semen bovino*.
- Moussa, M., Martinet, V., Trimeche, A., Tainturier, D., & Anton, M. (2002). Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, 57(6), 1695–1706.
- Müggenburg, M., & Pérez, I. (2007). Los maestros escriben Tipos de estudio en el enfoque de investigación cuantitativa. *Revista Enfermería Universitaria ENEO-UNAM*, 4(1), 35–38. <http://www.redalyc.org/pdf/3587/358741821004.pdf>
- Muiño, R. (2007). Evaluación de la motilidad y viabilidad del semen bovino mediante el uso de sistemas casa y citometría de flujo: identificación de subpoblaciones espermáticas. In *Uclm.Es*. [https://minerva.usc.es/xmlui/bitstream/handle/10347/2406/9788497509886_content.pdf;jsessionid=9259B4AB24E94133189B15F7AD45A8BC?sequence=1%0Ahttp://www.uclm.es/irec/Ecologia/pdf/repro_tesis/Tesis Doctoral Olga García Álvarez 2011.pdf](https://minerva.usc.es/xmlui/bitstream/handle/10347/2406/9788497509886_content.pdf;jsessionid=9259B4AB24E94133189B15F7AD45A8BC?sequence=1%0Ahttp://www.uclm.es/irec/Ecologia/pdf/repro_tesis/Tesis%20Doctoral%20Olga%20García%20Álvarez%202011.pdf)
- Muiño, R., Fernández, M., & Peña, A. I. (2007). Post-thaw survival and longevity of bull spermatozoa frozen with an egg yolk-based or two egg yolk-free extenders after an equilibration period of 18 h. *Reproduction in Domestic Animals*, 42(3), 305–311. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00784.x>
- Murphy, E. M., O’Meara, C., Eivers, B., Lonergan, P., & Fair, S. (2018). Comparison of plant- and egg yolk-based semen diluents on in vitro sperm kinematics and in vivo fertility of frozen-thawed bull semen. *Animal Reproduction Science*, 191(February), 70–75. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.02.010>
- Mutalik, S., Salian, S. R., Avadhani, K., Menon, J., Joshi, H., Hegde, A. R., Kumar, P., Kalthur, G., & Adiga, S. K. (2014). Liposome encapsulated soy lecithin and cholesterol can efficiently replace chicken egg yolk in human semen cryopreservation medium. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 60(3), 183–188. <https://doi.org/10.3109/19396368.2014.902521>
- Naz, S., Umair, M., & Iqbal, S. (2018). Comparison of Tris egg yolk-based, Triladyl® and Optixell® extender on post-thaw quality, Kinematics and in vivo fertility of Nili Ravi Buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Andrologia*, 50(8), 1–6. <https://doi.org/10.1111/and.13063>



- Nöthling, J. O., Gerber, D., Colenbrander, B., Dijkstra, M., Bakker, T., & De Cramer, K. (2007). The effect of homologous prostatic fluid on motility and morphology of dog epididymal spermatozoa extended and frozen in Biladyl with Equex STM paste or Andromed. *Theriogenology*, 67(2), 264–275. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.07.018>
- Nuñez, A. L., & Rubio, A. A. (2015). *Comparación de la calidad biológica del semen bovino poscongelado utilizando como crioprotector leche al 2% de grasa, Andromed® y Continental® one step.* <https://bdigital.zamorano.edu/handle/11036/4610>
- Oke, M., Jacob, J. K., & Paliyath, G. (2010). Effect of soy lecithin in enhancing fruit juice/sauce quality. *Food Research International*, 43(1), 232–240. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.021>
- Pace, M. M., & Graham, E. F. (1974). *COMPONENTS IN EGG YOLK WHICH PROTECT BOVINE SPERMATOZOA DURING FREEZING.*
- Páez-Barón, M. E., & Corredor-Camargo, S. E. (2014). *Evaluación de la aptitud reproductiva del toro. Breeding Soundness Evaluation of the Bull.*
- Páez, E., & Corredor, E. (2014). Evaluación de la aptitud reproductiva del toro. *Ciencias y Agricultura*, 11(2), 49–59.
- Pagl, R., Aurich, J. E., Müller-Schlösser, F., Kankofer, M., & Aurich, C. (2006). Comparison of an extender containing defined milk protein fractions with a skim milk-based extender for storage of equine semen at 5 °C. *Theriogenology*, 66(5), 1115–1122. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.03.006>
- Palacios, L. (2015). *Evaluación de dos diluyentes caseros y un diluyente comercial para criopreservar semen bovino de las razas brown swiss y patua(bos taurus) en el tropico humedo.*
- Palomino, S. Q. (2019). *Evaluación de tres dilutores sobre características espermáticas antes y después de la congelación de semen bovino Holstein.*
- Polge, C., Smith, A. U., & Parkes, A. (1949). Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration. In *Nature (London)* (Vol. 164, p. 666).
- Pulido, J. (1997). *Memorias del VI curso de Actualización en reproducción animal: Determinación de la calidad biológica del semen congelado.*



- Ramírez, R., Cesari, A., & Hozbor, F. (2019). Los componentes del diluyente y el plasma seminal pueden modificar la respuesta de los espermatozoides ovinos a la criopreservación. *Taurus*, 21(84), 12–17.
- Ribeiro-Peres, A., Munita-Barbosa, L., Yumi-Kanazawa, M., Mello-Martins, M. I., & Ferreira De Souza, F. (2014). Criopreservación de espermatozoides bovinos extraídos de la cola del epidídimo utilizando los métodos convencional y automatizado. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 46(1), 31–38. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2014000100005>
- Ricker, J. V., Linfor, J. J., Delfino, W. J., Kysar, P., Scholtz, E. L., Tablin, F., Crowe, J. H., Ball, B. A., & Meyers, S. A. (2006). Equine sperm membrane phase behavior: The effects of lipid-based cryoprotectants. *Biology of Reproduction*, 74(2), 359–365. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.046185>
- Rojas, E. C. (2014). *Evaluacion espermatica en sementales de la raza (brown swiss) americano adaptados a condiciones medioambientales de cajamarca*. UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA.
- Romero, A. (2016). *Efecto de dos dilutores en la conservacion de la integridad de la membrana plasmatica en semne refrigerado y congelado de toros del banco nacional de semen*.
- Röpke, T., Oldenhof, H., Leiding, C., Sieme, H., Bollwein, H., & Wolkers, W. F. (2011). Liposomes for cryopreservation of bovine sperm. *Theriogenology*, 76(8), 1465–1472. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.06.015>
- Rubio, J., & Quintero, A. (2008). Uso de las pruebas de resistencia osmótica para valorar la funcionalidad espermática en toros. C. González Stangnaro, N. Madrid Bury, y E. Soto Belloso, *Desarrollo Sostenible de La Ganadería Doble Propósito* (Pág. 617). Editorial Astro Data SA Zulia, Venezuela.
- Sari, S. amelia. (2017). *Evaluacion de la fertilizacion In-vitro en ganado bovino en condiciones de altura* (Vol. 549).
- SENAMHI. (2022). *Imágenes de satélite*. <https://www.senamhi.gob.pe/?p=satelites>
- Snoeck, P. P. N. (2003). Aspectos da criopreservação de sêmen equino: composição do meio diluidor, curvas de congelamento e fertilidade. *Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais–UFMG. Belo Horizonte*.



- Snoeck, P. P. N., Henry, M., & Melo, M. I. V. (2007). *Efeito de diferentes diluidores sobre a viabilidade espermática pós-descongelção de sêmen equino*. 56–64.
- Stornelli, M. C., Tittarelli, C. M., & Savignone, C. a. (2005). Efecto de los procesos de criopreservacion sobre la fertilidad seminal. *Analecta Veterinaria*, 25(2), 28–35.
- Suarez, C. (2015). *Fertilidad de semen congelado de toros nacionales Holstein usando los dilutores leche-yema, Tris-yema y Triladyl*.
- Suarez, S. S. (2001). Carbohydrate-mediated formation of the oviductal sperm reservoir in mammals. *Cells Tissues Organs*, 168(1–2), 105–112. <https://doi.org/10.1159/000016811>
- Tamargo, B., & Cuellar Cuellar, A. (2011). *OBTENCIÓN DE FOSFOLÍPIDOS A PARTIR DE LA LECITINA DE SOYA (Glicine max L), PARA USOS BIOMÉDICOS*. <https://www.researchgate.net/publication/230554264>
- Technologies, I. (2020). *Liposomes-based medium for bovine semen* (Issue March).
- Thun, R., Hurtado, M., & Janett, F. (2002). *Comparison of Biociphos-Plus 1 and TRIS-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen*. 57, 1087–1094.
- Torrelló, Viscasillas, & Pozo. (2015). *Liposomas (I). Conceptos generales y relación con las estructuras cutáneas / Offarm*. 21(I), 188–190. <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-liposomas-i-conceptos-generales-relacion-13038745>
- Trujillo, L. E; Rivera, M. (2002). Estudio Comparativo De Dos Tratamientos Bacteriológica Y Espermática Del Semen Bovino. *Revista Nacional Facultad de Agronomía Medellín*, 55(1), 1457–1472.
- Ugur, M. R., Abdelrahman, A. S., Evans, H. C., & Gilmore, A. A. (2019). *Advances in Cryopreservation of Bull Sperm*. 6(August), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00268>
- Urdaneta, R., & Olivares, R. (1985). *Colección, evaluación y procesamiento del semen de toros*. FONAIAP.
- Vera, C. A. (2011). *Evaluación de la validez de la cria y analisis de semen para predecir la fertilidad del toro*. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/3054/1/mv191.pdf>
- Vera, O. (2001). Evaluación seminal comparativa pre y postcongelación en machos



bovinos. *Reproducción Bovina*, 251–262.

Vishwanath, R., & Shannon, P. (2000). *Storage of bovine semen in liquid and frozen state*. 23–53.

Wall, R. J., & Foote, R. H. (1999). Fertility of bull sperm frozen and stored in clarified egg yolk-tris-glycerol extender. *Journal of Dairy Science*, 82(4), 817–821. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75301-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75301-4)

Watson, P. F. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*, 7(4), 871–891. <https://doi.org/10.1071/RD9950871>

Watson, P. F. (2000). *The causes of reduced fertility with cryopreserved semen*. 481–492.



ANEXOS

Materiales, equipos y reactivos.

Reactivos.

- Dilutor comercial AndroMed.
- Dilutor comercial Optixcell.
- Aceite de inmersión.
- Eosina nigrosina.

Materiales.

- Gradilla.
- Portaobjetos.
- Cubreobjetos.
- Matraz Erlenmeyer de vidrio.
- Probeta Graduada de vidrio
- Vasos de precipitados de vidrio.
- Pipeta de glóbulos rojos.
- Micropipetas de volumen de 100 a 1000 ml.
- Piseta de 500 ml.
- Cámara de Neubauer.
- Embudo de vidrio.
- Detergente biodegradable.
- Pajuelas de cloruro polivinilo de 0.5 ml.
- Polvo de alcohol polivinílico.
- Vagina artificial (IMV Modelo 005417, Francia)
- Bolsas plásticas
- Toallas de absorción
- Pinza

Equipos.

- Microscopio óptico
- Maño de maría
- Agitador magnético
- Hornilla eléctrica
- Termos de nitrógeno líquido
- Refrigerador
- Termómetro

Anexo A

Figura 2. Corrales de descanso de los toros donadores de semen.



Figura 3. Preparación y armado de vagina artificial.



Figura 4. Traslado e higienización de toros donadores de semen.



Figura 5. Pre- estimulación y monta falsa a los toros donadores.



Figura 6. Colección de semen bovino.



Figura 7. Dilutores comerciales AndroMed y OptiXcell.



Figura 8. Volumen de semen post colección.

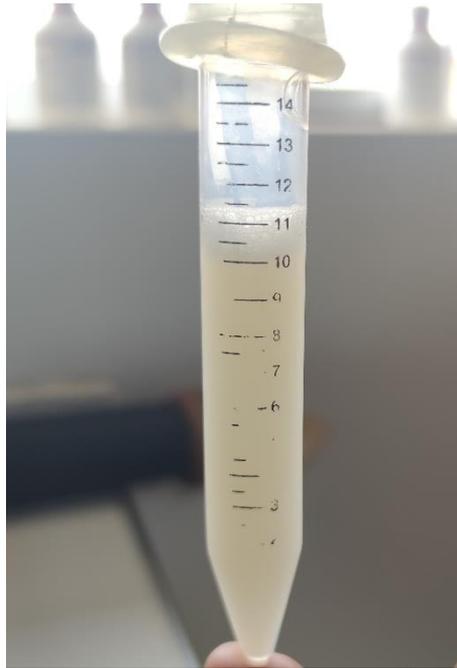


Figura 9. Control de volumen eyaculado, pre dilución y dilución final.



Figura 10. Estabilización y refrigeración de pajillas de semen.



Figura 11. Proceso de criopreservación de semen.



Figura 12. Almacenamiento y conservación de pajillas de semen bovino.



Anexos B

Tabla 6. Características macroscópicas a la colección.

TORO	EDAD	COLOR	VOLUMEN
IMPALA	5	BC	6.5
LUTHER	3	BC	4.5
PARKER	4	BC	6.5
IMPALA	5	BC	6.7
LUTHER	3	BC	5.5
PARKER	4	BC	6.1
IMPALA	5	BL	7.6
LUTHER	3	BC	5.1
PARKER	4	BL	7.1
IMPALA	5	BL	7.2
LUTHER	3	BC	4.9
PARKER	4	BC	6.8
IMPALA	5	BC	6.3
LUTHER	3	BC	4.7
PARKER	4	BC	6.7
IMPALA	5	BC	7.1
LUTHER	3	BC	5.3
PARKER	4	BL	7
IMPALA	5	BL	6.4
LUTHER	3	BC	5.2
PARKER	4	BC	6.3
IMPALA	5	BC	6.2
LUTHER	3	BC	5
PARKER	4	BC	6.5

Tabla 7. Parámetros seminales a la predilución con el dilutor AndroMed y OptiXcell

TRATAMIENTOS	TORO	MOTILIDAD TOTAL	MOTILIDAD PROGRESIVA	VITALIDAD	TEST HOST
T1	IMPALA	90.42	80.32	95.4	97.21
T1	LUTHER	92.53	80.53	90.1	95.6



T1	PARKER	88.81	79.6	92.42	93.9
T1	IMPALA	89.91	77.8	93.4	96.32
T1	LUTHER	92.53	81.32	92.32	95.6
T1	PARKER	89.46	79.23	95.2	96.21
T1	IMPALA	92.65	82.75	90.11	94.67
T1	LUTHER	91.81	83.25	92.21	94.32
T1	PARKER	96.8	83.94	93.51	95.61
T1	IMPALA	92.63	81.29	90.32	93.12
T1	LUTHER	91.04	80.84	92.65	95.69
T1	PARKER	91.18	75.75	95.67	97.6
T2	IMPALA	89.77	77.56	89.4	92.23
T2	LUTHER	90.42	75.44	88.32	90.45
T2	PARKER	89.77	73.23	89.33	89.99
T2	IMPALA	84.24	72.35	86.59	87.4
T2	LUTHER	81.73	71.23	90.41	92.32
T2	PARKER	85.74	73.2	84.32	85.87
T2	IMPALA	88.73	72.2	87.21	87.99
T2	LUTHER	92.52	83.2	89.34	91.21
T2	PARKER	92.73	78.2	87.75	89.54
T2	IMPALA	88.66	75.43	90.3	92.12
T2	LUTHER	85.75	70.32	89.3	91.21
T2	PARKER	91.81	78.32	90.35	92.09

Tabla 8. Parámetros seminales a la post-descongelación con el dilutor AndroMed y OptiXcell.

TRATAMIENTO	TORO	MOTILIDAD TOTAL	MOTILIDAD PROGRESIVA	VITALIDAD	TEST HOTS
T1	IMPALA	65.354	50.394	63.462	56.038
T1	LUTHER	66.387	44.538	62.143	56.142
T1	PARKER	61.224	38.776	61.607	57.593
T1	IMPALA	62.420	40.764	63.158	49.307
T1	LUTHER	60.101	42.424	62.832	57.890
T1	PARKER	61.392	37.342	63.121	55.741
T1	IMPALA	60.870	34.783	59.854	57.153
T1	LUTHER	58.879	34.579	60.241	55.663
T1	PARKER	58.470	29.508	61.702	48.027
T1	IMPALA	54.610	31.206	60.000	51.287
T1	LUTHER	58.974	37.821	61.392	53.770
T1	PARKER	59.231	33.846	62.222	49.369
T2	IMPALA	58.647	42.857	59.048	47.857
T2	LUTHER	57.377	36.066	58.621	57.544
T2	PARKER	57.983	31.933	59.459	55.766
T2	IMPALA	58.824	33.088	58.197	55.049
T2	LUTHER	61.058	42.788	60.169	55.094
T2	PARKER	60.833	29.167	59.836	56.337
T2	IMPALA	57.047	36.242	60.839	55.789
T2	LUTHER	59.358	44.385	57.798	54.539
T2	PARKER	59.880	41.916	62.500	56.452
T2	IMPALA	58.824	36.765	59.375	56.412
T2	LUTHER	59.722	33.333	60.714	48.310
T2	PARKER	58.333	33.333	57.343	56.372

Tabla 9. Estadística descriptiva del volumen seminal según el toro.

Descriptives		
	TORO	VOLUMEN
N	IMPALA	8
	LUTHER	8
	PARKER	8
Missing	IMPALA	0
	LUTHER	0
	PARKER	0
Mean	IMPALA	6.75
	LUTHER	5.03
	PARKER	6.63
Median	IMPALA	6.6
	LUTHER	5.05
	PARKER	6.6
Standard deviation	IMPALA	0.499
	LUTHER	0.324
	PARKER	0.341
Minimum	IMPALA	6.2
	LUTHER	4.5
	PARKER	6.1
Maximum	IMPALA	7.6
	LUTHER	5.5
	PARKER	7.1
Shapiro-Wilk W	IMPALA	0.921
	LUTHER	0.99
	PARKER	0.973
Shapiro-Wilk p	IMPALA	0.435
	LUTHER	0.995
	PARKER	0.917

Tabla 10. One-way ANOVA para volumen seminal según edad del toro.

		F	df1	df2	p
VOLUMEN	Welch's	55.8	2.0	13.6	<.001
	Fisher's	47.2	2.0	21.0	<.001

Tabla 11. Prueba Post-Hoc de Tukey para volumen seminal según edad de toro.

		IMPALA	LUTHER	PARKER
IMPALA	Mean difference	—	1.72***	0.125
	p-value	—	<.001	0.805
LUTHER	Mean difference		—	-1.6
	p-value		—	<.001
PARKER	Mean difference			—

p-value

Note. * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$

Tabla 12. Estadística descriptiva de los parámetros microscópicos a la pre- dilución según el tipo de dilutor AndroMed (T1) y OptiXcell(T2).

	TRATAMIENTO	MOTILIDAD-TOTAL	MOTILIDAD-PROGRESIVA	VITALIDAD	TEST-HOST
N	T1	12.000	12.000	12.000	12.000
	T2	12.000	12.000	12.000	12.000
Missing	T1	0.000	0.000	0.000	0.000
	T2	0.000	0.000	0.000	0.000
Mean	T1	91.600	80.600	92.800	84.700
	T2	88.500	75.100	88.600	81.000
Median	T1	91.500	80.700	92.500	85.600
	T2	89.300	74.300	89.300	81.200
Standard deviation	T1	2.090	2.300	1.980	2.490
	T2	3.450	3.730	1.820	2.240
Minimum	T1	88.800	75.800	90.100	77.600
	T2	81.700	70.300	84.300	77.400
Maximum	T1	96.800	83.900	95.700	87.200
	T2	92.700	83.200	90.400	85.900
Shapiro-Wilk W	T1	0.897	0.966	0.912	0.753
	T2	0.935	0.930	0.880	0.943
Shapiro-Wilk p	T1	0.145	0.862	0.229	0.003
	T2	0.439	0.378	0.087	0.532

Tabla 13. Prueba -t para muestras independientes de las características microscópicas según el tipo de dilutor a la pre- dilución.

		Statistic	df	p
MOTILIDAD-TOTAL	Student's t	2.71	22	0.013
MOTILIDAD-PROGRESIVA	Student's t	4.35	22	< .001
VITALIDAD	Student's t	5.44	22	< .001
TEST-HOST	Student's t	3.75	22	0.001

Tabla 14. Estadística descriptiva de los parámetros microscópicos a la post-descongelación según el tipo de dilutor AndroMed (T1) y OptiXcell(T2).

	TRATAMIENTO	MOTILIDAD-TOTAL	MOTILIDAD-PROGRESIVA	VITALIDAD	TEST-HOST
N	T1	12	12	12	12
	T2	12	12	12	12
Missing	T1	0	0	0	0
	T2	0	0	0	0
Mean	T1	60.7	38	61.8	54
	T2	59	36.8	59.5	54.6
Median	T1	60.5	37.6	61.9	55.7
	T2	58.8	36.2	59.4	55.8
Standard deviation	T1	3.14	5.89	1.26	3.56
	T2	1.25	5.02	1.45	3.16
Minimum	T1	54.6	29.5	59.9	48
	T2	57	29.2	57.3	47.9
Maximum	T1	66.4	50.4	63.5	57.9
	T2	61.1	44.4	62.5	57.5
Shapiro-Wilk W	T1	0.95	0.969	0.92	0.864
	T2	0.97	0.916	0.976	0.702
Shapiro-Wilk p	T1	0.642	0.901	0.29	0.055
	T2	0.91	0.254	0.966	<.001

Tabla 15. Prueba -t para muestras independientes de las características microscópicas según el tipo de dilutor a la post-descongelación.

		Statistic	df	P
MOTILIDAD-TOTAL	Student's t	1.71 ^a	22	0.101
MOTILIDAD-PROGRESIVA	Student's t	0.526	22	0.604
VITALIDAD	Student's t	4.19	22	<.001
TEST-HOST	Student's t	-0.458	22	0.652

^a Levene's test is significant ($p < .05$), suggesting a violation of the assumption of equal variances



DECLARACIÓN JURADA DE AUTENTICIDAD DE TESIS

Por el presente documento, Yo ELVIS JANO AVILES MENDOZA,
identificado con DNI 77159127 en mi condición de egresado de:

Escuela Profesional, Programa de Segunda Especialidad, Programa de Maestría o Doctorado

MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

informo que he elaborado el/la Tesis o Trabajo de Investigación denominada:

“ EVALUACION DE DOS DILUTORES COMERCIALES
EN LA CRIOPRESERVACION DE SEMEN DE
TORO BROWN SWISS. ”

Es un tema original.

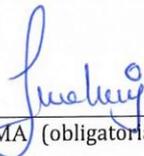
Declaro que el presente trabajo de tesis es elaborado por mi persona y **no existe plagio/copia** de ninguna naturaleza, en especial de otro documento de investigación (tesis, revista, texto, congreso, o similar) presentado por persona natural o jurídica alguna ante instituciones académicas, profesionales, de investigación o similares, en el país o en el extranjero.

Dejo constancia que las citas de otros autores han sido debidamente identificadas en el trabajo de investigación, por lo que no asumiré como tuyas las opiniones vertidas por terceros, ya sea de fuentes encontradas en medios escritos, digitales o Internet.

Asimismo, ratifico que soy plenamente consciente de todo el contenido de la tesis y asumo la responsabilidad de cualquier error u omisión en el documento, así como de las connotaciones éticas y legales involucradas.

En caso de incumplimiento de esta declaración, me someto a las disposiciones legales vigentes y a las sanciones correspondientes de igual forma me someto a las sanciones establecidas en las Directivas y otras normas internas, así como las que me alcancen del Código Civil y Normas Legales conexas por el incumplimiento del presente compromiso

Puno 17 de OCTUBRE del 2023


FIRMA (obligatoria)



Huella



**AUTORIZACIÓN PARA EL DEPÓSITO DE TESIS O TRABAJO DE
INVESTIGACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL**

Por el presente documento, Yo ELVIS JANO AVILES MENDOZA,
identificado con DNI 77159127 en mi condición de egresado de:

Escuela Profesional, Programa de Segunda Especialidad, Programa de Maestría o Doctorado

MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA,
informo que he elaborado el/la Tesis o Trabajo de Investigación denominada:

“ EVALUACION DE DOS DILUTORES COMERCIALES
EN LA CRIOPRESERVACION DE SEMEN DE
TORO BROWN SWISS. ”

para la obtención de Grado, Título Profesional o Segunda Especialidad.

Por medio del presente documento, afirmo y garantizo ser el legítimo, único y exclusivo titular de todos los derechos de propiedad intelectual sobre los documentos arriba mencionados, las obras, los contenidos, los productos y/o las creaciones en general (en adelante, los “Contenidos”) que serán incluidos en el repositorio institucional de la Universidad Nacional del Altiplano de Puno.

También, doy seguridad de que los contenidos entregados se encuentran libres de toda contraseña, restricción o medida tecnológica de protección, con la finalidad de permitir que se puedan leer, descargar, reproducir, distribuir, imprimir, buscar y enlazar los textos completos, sin limitación alguna.

Autorizo a la Universidad Nacional del Altiplano de Puno a publicar los Contenidos en el Repositorio Institucional y, en consecuencia, en el Repositorio Nacional Digital de Ciencia, Tecnología e Innovación de Acceso Abierto, sobre la base de lo establecido en la Ley N° 30035, sus normas reglamentarias, modificatorias, sustitutorias y conexas, y de acuerdo con las políticas de acceso abierto que la Universidad aplique en relación con sus Repositorios Institucionales. Autorizo expresamente toda consulta y uso de los Contenidos, por parte de cualquier persona, por el tiempo de duración de los derechos patrimoniales de autor y derechos conexos, a título gratuito y a nivel mundial.

En consecuencia, la Universidad tendrá la posibilidad de divulgar y difundir los Contenidos, de manera total o parcial, sin limitación alguna y sin derecho a pago de contraprestación, remuneración ni regalía alguna a favor mío; en los medios, canales y plataformas que la Universidad y/o el Estado de la República del Perú determinen, a nivel mundial, sin restricción geográfica alguna y de manera indefinida, pudiendo crear y/o extraer los metadatos sobre los Contenidos, e incluir los Contenidos en los índices y buscadores que estimen necesarios para promover su difusión.

Autorizo que los Contenidos sean puestos a disposición del público a través de la siguiente licencia:

Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional. Para ver una copia de esta licencia, visita: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

En señal de conformidad, suscribo el presente documento.

Puno 17 de OCTUBRE del 20 23


FIRMA (obligatoria)



Huella