

2013

Eficiencia comparativa entre dos diluyentes para la criopreservación de semen en toros brahmán en el departamento de Antioquia

Anggie Katherine González Lascarro
Universidad de La Salle, Bogotá

José David Pallares Sierra
Universidad de La Salle, Bogotá

Follow this and additional works at: https://ciencia.lasalle.edu.co/medicina_veterinaria



Part of the [Comparative and Laboratory Animal Medicine Commons](#), and the [Large or Food Animal and Equine Medicine Commons](#)

Citación recomendada

González Lascarro, A. K., & Pallares Sierra, J. D. (2013). Eficiencia comparativa entre dos diluyentes para la criopreservación de semen en toros brahmán en el departamento de Antioquia. Retrieved from https://ciencia.lasalle.edu.co/medicina_veterinaria/208

This Trabajo de grado - Pregrado is brought to you for free and open access by the Facultad de Ciencias Agropecuarias at Ciencia Unisalle. It has been accepted for inclusion in Medicina Veterinaria by an authorized administrator of Ciencia Unisalle. For more information, please contact ciencia@lasalle.edu.co.

UNIVERSIDAD DE LA SALLE

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Programa de Medicina Veterinaria



UNIVERSIDAD DE LA SALLE
Educar para Pensar, Decidir y Servir

EFICIENCIA COMPARATIVA ENTRE DOS DILUYENTES PARA LA
CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN EN TOROS BRAHMÁN EN EL
DEPARTAMENTO DE ANTIOQUIA.

Trabajo de Grado Para Optar al Título de Médico Veterinario

Anggie Katherine González Lascarro

José David Pallares Sierra

Bogotá, Colombia

2013

UNIVERSIDAD DE LA SALLE

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Programa de Medicina Veterinaria



UNIVERSIDAD DE LA SALLE
Educar para Pensar, Decidir y Servir

EFICIENCIA COMPARATIVA ENTRE DOS DILUYENTES PARA LA
CRIOPRESERVACION DE SEMEN EN TOROS BRAHMÁN EN EL
DEPARTAMENTO DE ANTIOQUIA

Trabajo de Grado Para Optar al Título de Médico Veterinario

Anggie Katherine González Lascarro

14072022

José David Pallares Sierra

1051099

Director

Dr. Jair Perez Osorio

Bogotá, Colombia

2013

APROBACIÓN

DIRECTOR

Doctor Jair Pérez Osorio

JURADO

Doctora Liliana Chacón

JURADO

Doctor Fernando Escobar

DIRECTIVOS

RECTOR	Hno. Carlos Gabriel Gómez Restrepo
VICERRECTOR ACADÉMICO	Hno. Fabio Humberto Coronado Padilla
VICERRECTOR DE PROMOCIÓN Y DESARROLLO HUMANO	Hno. Frank Leonardo Ramos Baquero
VICERRECTOR ADMINISTRATIVO	Dr. Eduardo Ángel Reyes
VICERRECTOR DE INVESTIGACION Y TRANSFERENCIA	Hno. Manuel Cancelado Jiménez
DECANO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS	Dra. Claudia Aixa Mutis
DIRECTOR DE PROGRAMA DE MEDICINA VETERINARIA	Dr. Juan Fernando Vela Jiménez

COMPROMISO

Los trabajos de grado no deben contener ideas que sean contrarias a la doctrina de la Iglesia Católica en dogma y moral.

Ni la universidad, ni el director, ni el jurado calificador son responsables de las ideas expuestas por el graduando.

TABLA DE CONTENIDO

Resumen.....	xi
Abstract.....	xiii
Introducción.....	6
1. Objetivos.....	8
2. Marco Teórico.....	9
2.1 historia.....	9
2.2 Aspectos Fisiológicos del Congelamiento del Semen.....	10
2.3 Principios de Criopreservación.....	11
2.4 diluyentes.....	16
2.4.1. Adiciones Empleadas en Diluyentes.....	19
2.4.2. Características que Debe Reunir un Diluyente.....	20
2.5 Daños Causados Por la Criopreservación.....	21
2.6 Accion de los Crioprotectores Intra y Extracelulares.....	23
2.7 Curvas de enfriamiento y congelamiento.....	23
2.8 Evaluación de Semen... ..	24
2.8.1 Prueba Hiposmótica.....	24
2.8.2 Prueba de termorresistencia.....	26
2.8.3 Tinciones espermática.....	26
2.9 Antecedentes.....	27
3. Materiales y Métodos.....	37
3.1 Localización.....	37
3.2 Población y Muestra.....	37
3.3 Variables.....	37
3.4 Análisis estadístico.....	38

3.5 Métodos y Procedimiento.....	38
3.5.1 selección y colecta.....	38
3.5.2 Procesamiento del semen pre congelación.....	38
3.5.3 Motilidad espermática.....	39
3.5.4 Motilidad o movimiento en masa.....	39
3.5.5 Calificación descriptiva del movimiento en masa.....	39
3.5.6 Vigor.....	40
3.5.7 Concentración espermática.....	40
3.5.8 Morfología espermática.....	40
3.5.9 Proceso de criopreservación del semen.....	40
3.5.10 Curvas de enfriamiento y congelamiento.....	41
3.5.11 Descongelación del semen.....	41
3.5.12 Evaluación del semen.....	42
3.5.13 Prueba de Termo Resistencia (TTR).....	42
4. Resultados y Discusión.....	43
5. Conclusiones y Recomendaciones.....	53
6. Lista de Referencias.....	54

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. promedios de los parámetros espermáticos antes de la congelación de los toros clasifican de acuerdo con el grado de criopreservación en semen en regular (R) y muy buena (VG).....	29
Tabla 2. Parámetros de espermatozoides en movimiento, motilidad total después de la prueba termorresistencia rápida y la integridad de la membrana plasmática (media \pm desviación estándar agruparon, n = 10 por grupo eyacula) para esperma criopreservado respectivamente con Botu-Bov® (BB) o Tris-yema de huevo-fructosa (TRIS).....	31
Tabla 3. Medias y errores estandar analizados en el CASA en semen bovino: fresco y diluido con bioxcell y Botu-bov (pág. siguiente).....	32
Tabla 4. porcentajes de tasas de concepción y tasa de parto concepción con tris, tris concentrado y biociphos.....	34
Tabla 5. medias Y el error estándar de cada variable evaluada en (CASA).....	35
Tabla 6. porcentajes de motilidad espermática y tasas de no retorno utilizando tris y andromed.....	36
Tabla 7. Valores de Viabilidad Espermática pre congelación y pos descongelación.....	43
Tabla 8. Valores de morfología posdescongelación.....	46
Tabla 9. Valores de Espermatozoides reactivos al HOST pos descongelamiento.....	49
Tabla 10. Test de termo resistencia	50

LISTA DE GRAFICAS

Grafica 1.Eosina/Nigrosina.....	47
Grafica 2.Rojo congo/verde malaquita	48
Grafica 3.Motilidad total en la prueba de termorresistencia.....	52
Grafica 4. Motilidad progresiva en la prueba de termorresistencia.....	52
Grafica 5.Vigor en la prueba de termorresistencia	53

LISTA DE FIGURAS

1. Fig. 1 espermatozoide reactivo a prueba hiposmotica.....25
2. Fig.2 Método de coloración de una muestra de semen usando eosina nigrosina. (Barth 1989).....27

RESUMEN

En los últimos 50 años en Colombia se ha venido utilizando la inseminación artificial como herramienta para el mejoramiento genético de un hato, aumentar la productividad y evitar pérdidas económicas en el remplazo de toros. Para esto se ha utilizado la criopreservación de semen, teniendo en cuenta que la eficiencia de fecundación de este semen congelado depende de diferentes factores, los cuales llegan a influir sobre la vida de la célula espermática bovina, tales como: el diluyente, el crioprotector utilizado, la calidad seminal y la curva de enfriamiento.

El objetivo de este trabajo fue comparar la efectividad de dos medios diluyentes Botu-Bov® y Tris citrato yema de huevo en semen bovino en el proceso post-descongelamiento en toros brahmán, mediante la evaluación de cuatro pruebas específicas: integridad y funcionalidad de la membrana plasmática en la cola del espermatozoide mediante la prueba HOST; la viabilidad espermática por medio de la prueba de termo resistencia, la morfología espermática por medio de coloraciones, la supervivencia y longevidad espermática post-descongelación del semen bovino congelado con los dos diluyentes. Para esto se utilizaron diez (10) toros de la raza brahmán con edades (entre 2 y 5 años), manejados en sistema de pastoreo rotacional; los toros se encuentran ubicados en el municipio de Sonsón Antioquia. El semen se obtuvo por medio de la técnica de electroeyaculación, cada muestra seminal se analizó tanto microscópica como macroscópicamente. Los eyaculados fueron fraccionados en dos muestras sometidas a la criopreservación con los diluyentes Botu-Bov® y TRIS posteriormente se congeló con una curva de enfriamiento realizada en una nevera convencional a 5°C durante 4 horas sin abrirla para evitar el cambio de temperatura.

Con este estudio se demuestra que el uso de diluyentes a base yema de huevo se obtienen mejores índices de viabilidad pos-descongelación en semen de toros brahmán en la región de Antioquia, debido a la acción de las lipoproteínas y fosfolípidos protegiendo las membranas espermáticas aumentando la proporción de colesterol y fosfolípidos presentes en los espermatozoides, reduciendo así la ocurrencia del choque térmico y favoreciendo la manutención del espermatozoide.

ABSTRACT

During the last 50 years in Colombia has been used artificial insemination as a tool for genetic improvement of a herd, it is also used to increase productivity and avoid losses during replacement of bulls. In order to achieve this goal has been used Cryopreservation of semen; taking into account that the fertilization efficiency of this frozen semen depends on different factors, that affect the life of the bovine sperm cell, such as: the diluent, the cryoprotectant used, semen quality and freezing curve.

The principal aim of the present work was to compare effectiveness of two extenders Botu-Bov® and Tris-egg yolk in bovine semen at the post-thaw process on bulls Brahman, in order to achieve this objective are evaluated four specific test: integrity and functionality of the plasma membrane in the sperm tail using Host test, sperm viability through Thermal resistance test, sperm morphology employing staining, survival and longevity sperm post-thaw of the bovine semen freezing in TRIS-egg yolk or Botu-Bov®.

For this study, ten bulls Brahman between 2 and 5 years old, handled in rotational grazing system, these bulls are located in Sonsón. Antioquia. The semen was obtained by electroejaculation technique; each seminal sample was analyzed using microscopic and macroscopic methods, the samples were split into two groups for freezing in TRIS-egg yolk or Botu-Bov® with a freezing curve.

This study demonstrates that the use based thinner yolk obtain better rates post-thaw viability in Brahman bull semen in the Antioquia region, due to the action of lipoproteins and phospholipids protect the sperm membranes increasing cholesterol and phospholipid ratio present in the sperm, thereby reducing the occurrence of thermal shock and facilitating the maintenance of sperm.

INTRODUCCIÓN

En Colombia la inseminación artificial en toros ha tomado auge durante los últimos años, cobrando importancia el uso de pajillas con semen congelado, puesto que esto facilita el manejo a nivel reproductivo. El éxito de la producción bovina encuentra sus pilares en la eficiencia reproductiva del hato, esta eficiencia depende del aporte de los toros (Cardozo, 2.000) y la forma de mejorarla es la utilización de semen congelado. El utilizar este tipo de biotecnologías aplicadas a la reproducción permite maximizar el uso de la genética superior permitiendo el aumento de la productividad (Celeghini, 2.005). Las razas de ganado cebú son la base genética del ganado en Colombia. Las características fisiológicas, de resistencia y productivas de este tipo de ganado han permitido adaptarse favorablemente al ambiente de trópico húmedo bajo que compone gran parte del territorio colombiano.

Por esto, el cebú (*Bos indicus*) y sus cruces han sido ampliamente usados por los ganaderos en nuestro país (Novoa, 2.010) los ganaderos en busca de un mayor retorno financiero por medio de la eficiencia de los sistemas de producción intensificada han instaurado el uso de biotecnologías de la reproducción con el fin de mejorar su hato, seleccionando animales de la mejor genética y el uso de inseminación artificial; para la estación de monta en su hato. La utilización de estas herramientas es de gran importancia puesto que contribuyen al mejoramiento genético y el aumento de la productividad en el sector (Vishwanath, 2.003) además ayudan al médico veterinario a generar animales fenotípica y genotípicamente superiores. El uso de la inseminación artificial necesita el uso de semen congelado (Celeghini ,2.005) o semen fresco

A partir del uso del eyaculado de un reproductor genéticamente superior es posible fecundar varias hembras maximizando la distribución de genes favorables, se minimiza el contacto coital evitando la propagación de enfermedades infecciosas transmitidas sexualmente, transporte a distancia, minimiza gastos económicos en cuanto a la manutención de un reproductor o varios toros y facilita el manejo; además nos proporciona un largo almacenamiento, permitiendo la utilización de germoplasma superior en toros ya muertos. (Bailey; Bilodeau; Cormier, 2.000).

También proporciona la formación de un banco de reserva genética para animales de alto valor zootécnico, permite el intercambio entre diversos criadores de diferentes regiones y

países. La congelación de semen evita pérdidas económicas cuando un reproductor muere y ayuda a la conservación de la especie, raza (Watson, 2000).

La inseminación artificial es una técnica viable económicamente, capaz de mejorar la genética de un hato, nos ahorra trabajo, nos disminuye la reposición de toros, nos facilita cruzamientos y lo más importante garantiza la obtención de crías con mayor potencial de producción y reproducción.

Colombia se está enfrentando a nuevos tratados de libre comercio con países como Brasil, Argentina, Estados Unidos entre otros, lo que lo obliga a ser competitivo con estos dichos países, aumentando la necesidad de modernizar y hacer que una de las principales formas de participación ganadera colombiana sea la exportación de embriones bovinos y semen, ya que en este país se han venido creando muy buenos bancos de germoplasma bovino con alto valor zootécnico (Fedegrario, 2009) por eso se debe estandarizar las técnicas de congelamiento de semen bovino para de esta forma poder competir en cuanto a calidad con los otros países.

1. OBJETIVOS

1.1 Objetivo General

Comparar la eficiencia entre dos diluyentes Botu-Bov® y tris-citrato-yema de huevo en semen bovino durante el proceso pos- descongelamiento

1.2 Objetivos Específicos

Determinar cuál diluyente mejora la viabilidad de las células espermáticas post-descongelación mediante la prueba de termo resistencia.

Analizar la eficiencia de cada diluyente frente a la integridad y funcionalidad de la membrana plasmática de la cola del espermatozoide post-descongelación utilizando la prueba de HOST.

Comprobar la vitalidad espermática de cada diluyente post-descongelación por medio de la coloración Eosina/Nigrosina.

Establecer cuál diluyente preserva una adecuada morfología espermática post-descongelación usando tinciones vitales.

2. MARCO TEORICO

2.1 Historia

La criopreservación se remonta a 1677, cuando una carta escrita por Antonie Van Leeuwenhoek a la real sociedad de Londres reporta el hallazgo de haber encontrado células móviles en el semen humano (Van Leeuwenhoek, 1677). En 1982 Derivaux informa que los primeros en usar inseminación artificial fueron los árabes en el siglo XIV, pero los primeros datos que se tienen son del italiano Spallanzani que inseminó una perra en 1779 quedando preñada.

Por otro lado en 1803 Spallanzani informa que el esperma en la nieve no muere solo se inmoviliza y que puesto al calor recupera su movilidad por unas horas (Bearden, 1982). Luego

Mantegazza (1866), reportó en sus hallazgos que el semen puede ser preservado al reducir la temperatura y escribió:

“si el semen humano puede ser preservado por más de 4 días a la temperatura que se derrite el hielo sin pasar por ningún cambio, de seguro los investigadores del futuro podrán mejorar la calidad de los caballos y vacas, sin tener que pagar mucho dinero por el transporte de sementales. Será fácil llevar inseminaciones artificiales con semen congelado de una localidad a otra”

En 1940 Phillips y Lardy descubren un medio nutritivo para diluir el eyaculado (Bearden 1982) y en 1942 Salisbury ideó un diluyente a base de citrato de sodio y yema de huevo, que resultó de fundamental importancia pues evita el shock frío de los espermatozoides sometidos al congelamiento y a lo que se le debe la difusión de la I.A (Oka, 2001). Almquist fue el primero en comunicar el uso de la penicilina para el control de contaminantes bacterianos del semen (Bearden, 1982).

En 1940 se hicieron varios intentos para congelar el semen solamente bajando su temperatura, pero dieron como resultado una recuperación muy baja como consecuencia de la formación de cristales de hielo en el interior de los espermatozoides, en esta época no existían los crioprotectores, y los primeros intentos para evitar la formación de cristales de

hielo fue el uso de la vitrificación, un proceso de congelamiento tan rápido que no permite que se formen cristales (Parkers, Polge, Smith, 1949). Estos mismos autores en 1952 adicionan con éxito la glicerina al diluyente como medio de protección del espermatozoide al encontrar que si se mezclaban los espermatozoides con glicerol y se dejaba así durante una noche antes de la congelación los resultados de este proceso serian mejores, los espermatozoides absorben el glicerol para remplazar cierta cantidad de agua de la célula, en la actualidad esto se conoce como tiempo de equilibrio (Bearden, 1982). En 1957 los americanos iniciaron el uso de nitrógeno líquido como refrigerante para la congelación y almacenamiento del semen.

2.2 Aspectos Fisiológicos del Congelamiento del Semen

El congelamiento es un método que permite preservar una célula a temperatura extremadamente baja, permitiendo que el metabolismo se reduzca absolutamente sin que se pierda su potencial vital a temperaturas de -196°C no hay reacciones bioquímicas ni energía térmica dentro de la célula, no hay cambios de índole genético. Dicha estabilidad es mantenida solo a temperaturas por debajo de los -130°C , puesto que a temperaturas mayores, puede haber agua no congelada intracelularmente la cual permite funciones metabólicas, causando degradación de la célula (Palacios,1994).

El objetivo de este método es mantener los siguientes requerimientos y propiedades de un espermatozoide para poder fertilizar:

- Metabolismo para llevar a cabo la producción de energía para sus funciones.
- Proteínas necesarias para la sobrevivencia dentro del aparato reproductor femenino y para la adhesión al ovocito en el momento de la fertilización.
- Mantener enzimas acrosomales útiles para penetración al ovocito.
- Capacidad de movimientos progresivos (Amman, Pickett, 1987).

Al reducir la temperatura por debajo de los 20°C , el espermatozoide comienza a presentar cambios biofísicos, principalmente en la membrana plasmática, cuando se somete a temperatura entre los 0°C y los -20°C o hasta los -60°C , el espermatozoide sufre efectos de descomposición iónica y de líquidos suficientemente grave para causar un choque térmico (Carvalho,2005). Esto se detecta al microscopio por la presencia de espermatozoide con

cola doblada, con pérdida de movilidad por la disminución de energía, o realizando movimientos en círculo, lo cual se debe al aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática y a la salida de iones y moléculas.

Durante la congelación se producen fenómenos que se derivan del enfriamiento tales como la formación de cristales intracelulares y extracelulares, deshidratación y distorsión de la membrana (Daw, Farrant, Morris ,1973).

El termino pre congelado define el momento umbral antes que una célula o su ambiente sean congelado (Franks, 1983), dentro de la célula hay también agua precongelada, la cual se difunde hacia el exterior de la célula para que la concentración de sales en el interior y el exterior de la misma se equilibren, sucediendo así la deshidratación celular. Si el agua no sale rápidamente hay formación de cristales intracelulares, que dañan mecánicamente a la célula.

Si la tasa de enfriamiento es lenta hay alta concentración de sales en la parte no congelada de la célula lo que puede dañarla, por esto es importante encontrar el ritmo óptimo de enfriamiento (Amann, pickett, 1987).

2.3 Principios de Criopreservación

La crioconservación es una técnica mediante la cual el material biológico puede ser mantenido viable por tiempo indefinido (Cloud, 1990). Esta tecnología constituye una alternativa para el establecimiento de bancos genéticos, los cuales ayudan a mantener la biodiversidad y asegurar la conservación física de una especie (Cloud et al, 1990; Medina-Robles et al, 2006).

El principal propósito de este es mantener la capacidad fertilizante de los espermatozoides en cuanto a la dilución de los eyaculados proporcionando el uso máximo de toros genéticamente superiores Kommisrud , Graffer , Steine (1996).

El semen bovino criopreservado proporciona menores tasas de fertilidad en relación con el semen fresco basándose en el número de espermatozoides móviles y los resultados de fertilidad de semen congelado son inferiores a los obtenidos con semen fresco (Watson, 2000).

Durante la crioconservación el semen es sometido a etapas de refrigeración, congelación y descongelación. Estas son capaces de causar varios grados de daño celular, reduciendo la fertilidad cuando se compara con la de semen fresco. Esta reducción se debe a una combinación de la pérdida de la viabilidad del espermatozoide y el patrón de motilidad de la población sobreviviente (Watson, 2000). Algunos de los factores que afectan la supervivencia del semen congelado, son la composición del medio, los crioprotectores y las tasas de congelación/descongelación (Liu, 1998). Incluso bajo las mejores condiciones de criopreservación, alrededor de la mitad de la población inicialmente mueren después de la descongelación y en los que sobreviven pueden producirse cambios que afecten la actividad funcional del espermatozoide descongelado (Medeiros et al, 2002).

Si el número total de espermatozoides funcionales para la inseminación artificial con semen congelado es menor que el número necesario para alcanzar una alta probabilidad de fertilización (20×10^6), las posibilidades de éxito son reducidas. (Watson, 2000) Se requiere ocho veces mayor concentración de espermatozoides congelados para lograr una tasa de fertilización equivalente a la obtenida en vivo Shannon "et al."(1995) para así compensar la pérdida de los gametos. Además, el semen sometido a condiciones de criopreservación se expone a la dilución de plasma seminal y bajas temperaturas (Medeiros et al, 2002).

Estos cambios resultan en el tiempo de supervivencia la disminución de los espermatozoides, así como su capacidad de interactuar con el medio ambiente del tracto reproductivo femenino. Esto se debe principalmente a que los resultados dependen de factores tales como el diluyente, el crioprotector usado y el tamaño del sistema de empaque; así como también de la calidad seminal, parámetro altamente variable entre individuos (Landsverk, 2000).

El proceso de refrigeración forma parte de la criopreservación del semen; sin embargo, también puede utilizarse como método de conservación a corto plazo, para lo que necesita medios diluyentes adecuados que deben contener componentes específicos, es decir, una solución tampón, sales, azúcares y sustancias que aporten una cierta protección de la membrana contra el descenso de temperatura, como la yema de huevo (Parks Graham, 1992).

A diferencia de la refrigeración del semen, el proceso de criopreservación necesita también del empleo de un agente crioprotector que permita un descenso mayor de la temperatura, desde el descubrimiento del glicerol como agente crioprotector efectivo (Polge et al,1949) y del establecimiento de las técnicas básicas de criopreservación, el semen de una variedad de especies se congela y se utiliza con éxito en la inseminación artificial, con excepción de los bóvidos, la utilización generalizada de semen congelado no se ha extendido a las otras especies domésticas (Parks y Graham, 1990; Holt, 2000), esto se debe en parte porque los protocolos de criopreservación no arrojaron resultados aceptables de fertilidad (Parks y Graham, 1990). Las diferencias entre especies se deben principalmente a diferencias en la fisiología, la bioquímica del espermatozoide y, también, a las variaciones en la anatomía y fisiología del tracto reproductor femenino que dan lugar a importantes diferencias en las características del transporte espermático (Holt, 2000).

La reducción de la temperatura por debajo de los 37°C y, principalmente, de los 20°C induce una serie de alteraciones de naturaleza biofísica en el espermatozoide (Amann y Pickett, 1987). El mayor desafío para las células en el proceso de congelación no es resistir a las bajas temperaturas del nitrógeno líquido, sino mantener la viabilidad en un rango de temperaturas, entre los -15°C y -60°C, que las células experimentan por dos ocasiones, es decir, durante la congelación y durante la descongelación. A -196°C no se producen reacciones térmicas, puesto que debajo de los -130°C no existe agua en el estado líquido (Mazur, 1984).

Con el enfriamiento de la suspensión celular por debajo de los 0°C, se producen una serie de procesos nocivos para la célula que comienzan con la formación de hielo en el compartimento extra-celular, la membrana plasmática actúa como barrera, impidiendo la expansión de los cristales de hielo del medio exterior hacia el compartimento intracelular (Watson, 1979). Las sales no forman parte de los cristales de hielo, de modo que habrá una considerable concentración de sales en la porción remanente del agua no-congelada, el aumento del gradiente osmótico a través de la membrana plasmática provoca la difusión del agua intracelular hacia el ambiente extra-celular, causando deshidratación de la célula y de la membrana plasmática (Amann y Pickett, 1987). Por tanto la deshidratación osmótica, más que la formación de hielo intra-celular, es la principal causa de las alteraciones estructurales

de la membrana y una de sus consecuencias es la pérdida de la selectividad de la membrana (Parks y Graham, 1992).

Cuando las células están sujetas a temperaturas inferiores a 0°C, inicialmente se refrigeran más del tiempo adecuado se “súper refrigeran”, el modo en que van a recuperar el equilibrio depende del ritmo de refrigeración y de su permeabilidad al agua. Si el ritmo de enfriamiento es lento o si la permeabilidad al agua es elevada, las células se equilibran por la transferencia del agua intracelular hacia el hielo externo, o sea, se equilibran por deshidratación; pero si son refrigeradas rápidamente o si su permeabilidad al agua es baja, éstas se van equilibrar, en parte, por congelación intracelular (Mazur, 1970). El ritmo de enfriamiento debe, por tanto, tener en cuenta estos fenómenos (Amann y Pickett, 1987)

La presencia de hielo extracelular, aunque puede deformar las células, no causa ruptura de la membrana plasmática ni tampoco daños irreversibles (Watson, 1979). Por el contrario, la formación intracelular de cristales de hielo provoca lesión y muerte de la célula, dado que la formación de hielo intracelular es dependiente del ritmo de congelación y descongelación, el estricto control del ritmo del descenso y del aumento de la temperatura puede minimizar las lesiones celulares causadas por el hielo intracelular, hay que tener en cuenta que, si el ritmo de congelación es extremadamente rápido el hielo intracelular constituye microcristales y los daños derivados son muy reducidos (Amann, Pickett, 1987).

El proceso de criopreservación incluye cinco (5) etapas: dilución, refrigeración, adición del crioprotector, congelación y descongelación, mientras que algunas fases son relativamente inocuas, otras son muy estresantes como es el caso de la refrigeración y la congelación (Watson, 1995). Cada etapa del protocolo ejerce una interacción especial con la estructura, la función de la membrana y con el metabolismo celular (Hammerstedt Graham y Nolan, 1990); pudiendo el espermatozoide perder su capacidad de funcionar normalmente en cualquiera de estas etapas (Watson, 1995). Por otra parte, dichas etapas del protocolo de congelación se influyen mutuamente, así que los ritmos de cambio de temperatura elegidos en una determinada etapa del proceso afectan directamente a los que se utilizarán en la etapa siguiente (Hammerstedt et al, 1990). Es por eso que el logro de una longevidad celular máxima, requiera que el ritmo de descongelación esté en concordancia con el ritmo apropiado de congelación (Mazur, 1984).

El resultado de un protocolo de criopreservación depende de una serie de factores como la composición del diluyente y la concentración del crioprotector, el ritmo de refrigeración y de congelación, y el ritmo de descongelación (Mazur, 1984). Idealmente, estos pasos deberían reducir al mínimo los daños celulares y asegurar una adecuada longevidad in vivo e in vitro (Farstad, 1996). No obstante y a pesar de los progresos en los protocolos de criopreservación, los datos de motilidad y de integridad de la membrana indican que solo cerca del 50% de las células sobreviven al proceso de congelación (Curry, 2000).

Durante algún tiempo, se ha asumido que los espermatozoides que sobrevivían a los procesos de refrigeración, congelación y descongelación eran semejantes a las células pre-congeladas, es decir, que no se verían afectados por los tratamientos de conservación (Watson, 1995). Sin embargo, advierte que los espermatozoides sobrevivientes presentan características diferentes a las que tenían antes de la congelación; lo que corrobora tras observar que, utilizando el mismo número de espermatozoides en inseminación artificial, los espermatozoides criopreservados proporcionan niveles de fertilidad más reducidos que el semen fresco (Watson, 1996). Así mismo, la evidencia de que la motilidad del semen descongelado se mantiene durante menos tiempo, en comparación con la del semen no congelado, permite concluir que los espermatozoides descongelados son menos resistentes y que el proceso de congelación altera las membranas (Parks y Graham, 1992).

La sobrevivencia después de la crioconservación de muchos tipos de células, incluyendo los espermatozoides, es fuertemente dependiente de la tasa de congelación/descongelación y especialmente de la temperatura a la cual las células son enfriadas antes de su introducción en nitrógeno líquido, fenómeno conocido como “temperatura intermedia de sumergimiento sub-cero” (Watson, 1995).

Se ha reportado que uno de los factores críticos para la sobrevivencia de las células después de la congelación, es abolir la formación de cristales de hielo intracelular, por medio de una deshidratación adecuada antes de su sumergimiento en nitrógeno líquido, lo cual también está estrechamente relacionado con bajas tasas de enfriamiento que permiten un mayor eflujo de agua intracelular (Mazur, 1970; Medina Y Robles., 2006).

La refrigeración y la congelación son acontecimientos que pueden conducir a la muerte o bien a alteraciones funcionales del espermatozoide, las lesiones causadas en la membrana y

en los distintos orgánulos del espermatozoide derivan de dos de los principales motivos de estrés de la criopreservación: 1.) las alteraciones de la temperatura y la formación y disolución de los cristales de hielo (Watson, 1995). 2.) la cristalización implicada en las alteraciones osmóticas, que conducen a daños celulares evidentes (Homfo y Berg, 1989). En consecuencia, la motilidad y la integridad acrosómica disminuyen de modo significativo, tras la congelación/descongelación.

2.4 Diluyentes

Para minimizar los efectos perjudiciales de la criopreservación se han venido probando a través de los años numerosos diluyentes, aditivos y crioprotectores para proteger la célula, proporcionando substratos para el mantenimiento durante y después de la congelación Leite, Scherder, Almeida, Zuccari y Silva (2011).

Como menciona Chaveiro (2006) La composición del diluyente es de gran importancia para la supervivencia de los espermatozoides durante la criopreservación, se deben considerar varias características del ambiente como la concentración del crioprotector, la concentración de sal y de la inclusión de detergentes

La interacción entre las células espermáticas y el medio diluyente representan un factor crucial para la preservación de la integridad espermática y habilidad de fertilización Manjunath, Nauc ,Bergeron y Menard, (2002).

Muchos diluyentes se han descrito entre los cuales se encuentran:

- Diluyente de yema de huevo fosfatada:
Composición: $\text{Na}^2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , agua destilada y yema de huevo este diluyente permite conservar la actividad fertilizante del espermatozoide durante algunos días; presenta el inconveniente de hacer difícil el examen del espermatozoide en el momento del empleo debido a la presencia de grumos de grasa, frente a los cuales el fosfato no tiene ninguna actividad que lo disperse.
- Diluyente de yema de huevo citrada:

El espermatozoide contiene ácido cítrico y la adición de este producto a una solución de ringer-fosfato aumenta la vitalidad de los espermatozoides y se demostró entonces que un medio a base de citrato sódico era mejor que el de fosfato asegurando mejor la vida y fertilidad de los espermatozoides este diluyente contiene $\text{Na}_3\text{O}_6\text{H}_5\text{O}_7\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ citrato de sodio por 100ml de agua destilada medio isotónico al que se le añade la yema de huevo. Este facilita el examen microscópico porque el citrato se une al calcio y otros metales pesados ejerciendo así una acción dispersante sobre los glóbulos grasos de la yema de huevo.

- Diluyentes a base de glicocola y glicerina:
Contiene yema de huevo con glicocola en igual volumen este medio asegura in vitro una supervivencia de duración más larga que la que se consigue con los medios de yema de huevo fosfatada y citrada (Derivaux, 1982).

Estos efectos favorables de la glicocola son debido a su unión con ciertos metales pesados que tienen un efecto desfavorable sobre la vitalidad del espermatozoide.

Lo mismo sucede con la glicerina cuando se adiciona a medios conservados a 5°C y empleados de inmediato, se señala que la eficacia reproductora del espermatozoide diluido en el medio de leche y glicerina es mejorada.

- Diluyentes a base de leche:
La leche contiene fosfatos, citratos y azúcares; por esto, fue recomendado como medio de criopreservación por autores rusos quien comenzaron a utilizarlo en espermatozoides difícil de conservar.

Una serie de trabajos han demostrado que la leche homogenizada, descremada pasteurizada, y en polvo reconstruida adicionando antibióticos como penicilina y estreptomina pueden constituir un buen medio de dilución a este también se le puede agregar glicina o glicerol, mejorando ventajosamente (Kenney ,1975)

- Diluyentes a base de gelatina :

En Dinamarca se empleó de base el medio fosfato-glucosa, gelatinado con yema de huevo pero este no ofreció ventaja sobre los otros medios.

También se han utilizado diluyentes a base de leche de coco y yema de huevo los cuales aseguran una mayor supervivencia a 2-3°C que el medio de citrato yema de huevo y diluyente a base de extractos de músculo, de corazón de buey, de embriones de ternera, permitiendo una conservación bastante buena pero tiene una desventaja de ser de preparación delicada, difíciles de esterilizar y por tanto conservar y poseen un precio bastante elevado (Derivaux, 1982).

Los componentes básicos de los diluyentes de congelación son una sustancia iónica y no iónicas para mantener la osmolaridad (tampones) y los medios de comunicación, una fuente de lipoproteína de alto peso molecular para proteger la célula contra el choque térmico, tales como yema de huevo y leche; azúcares, glicerol, 1,2-propanodiol o dimetilsulfóxido (DMSO) como crioprotectores y otros aditivos tales como antioxidantes, enzimas y antibióticos (Vishwanath, 2000).

Un sistema tampón debe ser uno de los constituyentes de los disolventes para neutralizar los iones de hidrógeno producidos por el metabolismo espermático, manteniendo el pH de la solución cercano a la neutralidad (6,8 a 7,1).

Los búferes más utilizado en los diluyentes para semen bovino son el citrato, por sus propiedades tamponantes como mejorar la solubilidad fracciones de proteína de yema de huevo y Tris hidroximetil-aminometano (TRIS) (Borges, 2003)

Los disolventes utilizados se basan en la yema de huevo y leche, en este último caso necesario considerar la inactivación de lactenina, sustancia bacteriostática que actúa como el factor tóxico espermatozoide (Amirat, 2004). El mayor inconveniente del uso de disolventes a base de leche es la baja visibilidad del esperma bajo el microscopio, por lo que las evaluaciones post-descongelación es más difícil, diversos medio utilizan leche integral homogenizada o leche descremada fresca, también agua coco siendo utilizados para la preservación seminal aunque la yema de huevo prevalece para la criopreservación (Amirat Anton et al, 2005).

La yema de huevo en combinación con sustancias tamponadas como el tris–hidroximetilaminometano) y citrato de sodio son los constituyentes más comunes que se encuentran en los medios diluyentes de congelación de semen bovino (viswanath y Shannon,2000), el tris yema de huevo es el medio diluyente más utilizado en el mundo según (Tardif Farrel y Trouern,1997) existen resultados científicos y comerciales que demuestran que utilizando este diluyente se observan motilidad alrededor del 50% post-descongelación para semen bovino en relación con semen fresco (Bilodeau Blanchette y Cormier,2002). Sin embargo, debe prestarse atención al hecho que el diluyente en los animales que contienen los compuestos es más difícil estandarizar, y es mayor el riesgo de contaminación microbiana.

Los crioprotectores penetrantes son necesarios para la criopreservación de la mayoría de las células (Chaveiro et al, 2004) varias moléculas han sido probadas en relación con eficiencias de otros crioprotectores apuntando al glicerol como el crioprotector de elección para la congelación de espermatozoides bovinos (Guthrie Liu y Crister 2002).

2.4.1 Adiciones Empleadas en Diluyentes

- Glucosa y fructosa:

Esta elemento favorece la vitalidad de los espermatozoides , también intervienen por su acción física en mantener la presión osmótica y un balance electrolítico conveniente para el medio y energía metabólica (Derivaux, 1982)

- Agentes antimicrobianos:

Desde 1941 se puso atención al problema de los contaminantes microbianos en el eyaculado del toro, muchos no son patógenos, pero compiten con los espermatozoides por nutrientes y producen compuestos metabólicos que tienen efectos adversos sobre la viabilidad de los espermatozoides y generan contaminación. (Salisbury, 1982)

En 1946 se descubrió el efecto benéfico de añadir antibióticos a los diluyentes de semen, algunos de los antibióticos empleados en los diluyentes son:

- Sulfonamidas
- Penicilinas
- Estreptomycinas
- Polimixina (bearden, 1982)

2.4.2 Características que Debe Reunir un Diluyente

1. Capacidad amortiguadora (evitar cambios de pH al neutralizar los ácidos producidos por metabolismo de los espermatozoides)
2. Deben ser isotónicos al semen (tener la misma concentración de iones libres)
3. Proporcionar nutrientes para el metabolismo de los espermatozoides
4. Proteger a los espermatozoides de las lesiones producidas por el choque térmico
5. Los espermatozoides deben de estar protegidos contra daño durante la congelación y descongelación
6. Controlar contaminantes microbianos
7. Preservar la vida de los espermatozoides con un mínimo de efectos sobre la fertilidad (Bearden,1982)
- 8.

En los últimos años los laboratorios han elaborado diferentes preparaciones de diluyentes comerciales de fácil uso a nivel de campo y sin necesidad de tener que contar con un laboratorio o con equipos sofisticados, pero tienen el inconveniente que a nivel de campo es difícil reunir todas las condiciones para su elaboración.

Ejemplos de diluyentes comerciales:

- El universal IMV:
Fabricado en Francia, por la compañía IMV. Este es un concentrado de dos pasos, en el cual hay que preparar la porción glicerada y la no glicerada. El concentrado es llamado “concentrado buffer EUROPHOS” y contiene buffer de iones hidrogenados, ácido cítrico y carbohidratos; además antibióticos CSS que equivale a 60mg de tilosina, 300mg de gentamicina y 180/360mg de lincospectina; y glicerol (Manual universal de IMV)

- **Triladyl:**
Fabricado en Alemania, por el laboratorio minitube; que está basado en tris (hidroximetil aminometano, un amortiguador sintético) y además contiene agua destilada, glicerol, ácido cítrico, fructosa y por cada 100ml contiene los siguientes antibióticos: tilosina 5mg, gentamicina 25mg, espectinimicina 30mg y lincomicina 15mg. Se agrega yema de huevo (Manual de triladyl)
- **Diladyl:**
Fabricado en Alemania por la misma empresa del triladyl; este es para preparación en dos pasos, está constituido por una fracción A una B (con glicerol) y una C con antibiótico (catalogo, minitube)
- **Andromed®:**
Es un diluyente a base de lecitina de soya es de la nueva generación de medio andrológico libre de ingredientes de origen animal, para la congelación de semen bovino. Este medio tiene ventaja sobre los diluyentes anteriormente mencionados, ya que ha logrado tasas de retorno hasta de 2.6% mayores que los diluyentes convencionales preparados a base de yema de huevo. En un estudio realizado por el centro de dermatología y andrología de la universidad justun-leibig de giessen Alemania (aires, 2003) se demostró que este medio posee 67.85% tasa de retorno con los preparados a base de yema de huevo contra un 70.45% con diluyente sin yema de huevo.

2.5 Daños Causados Por la Criopreservación

Los espermatozoides de los mamíferos son muy sensibles al enfriamiento rápido, o a la temperatura ambiente, el daño causado por esta reducción de la temperatura durante el enfriamiento a 4°C o 5°C se llama choque térmico y causa la pérdida irreversible de viabilidad de los espermatozoides. la rápida disminución de la motilidad o la aparición de un patrón anormal de los mismos, que se convierte en circular o retrógrada, también se reduce la glucólisis, la respiración celular y frutólisis, lo que aumenta los daños en el ADN y la liberación de material intracelular (Watson, 2000). La reducción de la temperatura conduce a la transición de los lípidos de membrana mediante el paso de la fase líquida o fluida para

cristalina o gel, lo que resulta en una membrana rígida (Holt, 2000). Si fuera posible eliminar el paso de transición de los lípidos, o al menos reducir la temperatura en que se produce, las membranas se mantienen fluidas a bajas temperaturas y el daño se disminuiría (Purdy, 2004).

Otro aspecto a tener en cuenta es la presencia de proteínas BSP-A1/-A2, BSP-A3 y BSP-30 kDa, en el plasma seminal, colectivamente denominadas proteína seminal bovina (BSP), estos son un grupo de moléculas que se une a los fosfolípidos de la membrana espermática y actúan como reguladores de la capacitación del espermatozoide junto con, el flujo de colesterol de las lipoproteínas y estimulante de membrana plasmática (Holt, 2000).

La preservación de la congelación del plasma seminal expone los espermatozoides BSP y éstos, promueven el flujo de colesterol, lo que lo convierten en gametos más susceptibles a la criopreservación, este efecto se puede minimizar utilizando lipoproteínas de baja densidad presentes en los crioprotectores, como lo son la yema de huevo, ya que éstos se unen a los BSP de forma estable para evitar su acción nociva sobre la membrana plasmática (Manjunath et al, 2002).

Además de los cambios físicos que experimentan los fosfolípidos en la membrana durante el enfriamiento, la regulación de la afluencia del calcio también se ven afectados por ella, con graves consecuencias en términos de la función celular, e incluso pueden ser incompatibles con la viabilidad de los espermatozoides, cuando hay afluencia de calcio durante el enfriamiento, contribuyen a la aparición y la formación como para el inicio de la fusión de las membranas plasmática y en la reacción acrosomal esto es un paso crítico del proceso que implica la adición y eliminación del crioprotector que causa el estrés osmótico a los espermatozoides y se pone la proporción de células que sobreviven a la congelación, este estrés puede ser minimizado por la adición del crioprotector en forma gradual (Guthrie et al, 2002).

En virtud del proceso de crioconservación espermática se da peroxidación lipídica de las membranas, con la generación de especies reactivas de oxígeno que contribuyen a la ocurrencia de daño celular (Stradaoli Noro Sylla Monaci y Decreasein, 2007).

2.6 Acción de los Crioprotectores Intra y Extracelulares

Teóricamente estos ayudan a hacer más resistente al espermatozoide ya que estos reducen el número de poros en la membrana reduciendo las funciones ATP-dependientes, así como la agregación proteínica y formación de bloques lipídicos. Esta es la acción de las lipoproteínas de la yema de huevo o de la leche en los diluyentes y de crioprotectores, como por ejemplo, la botaina y el glicerol. Hay evidencias que la presencia de un aditivo crioprotector reduce la concentración de sales intracelulares a una temperatura dada, debido a que incrementan la fracción no congelada en el exterior de la célula (Carballo, 2005).

El problema que se presenta con estos crioprotectores es que también produce toxicidad, y que esta disminuye la concentración de otros aditivos que pueden ser usados en el diluyente y por tanto limita la eficiencia de ellos. (Carballo, 2005).

En los diluyentes utilizados, tanto para semen refrigerado como para congelado, ha sido necesario incluir leche descremada o yema de huevo ya que esta mejora la fertilidad del semen, pues tiene bondades conocidas pero no se conoce como puede afectar actividades de tipo enzimático potencialmente dañinas (Palacios, 1994)

Al utilizar yema de huevo se presentan obstáculos para realizar la evaluación del semen ya que por su consistencia y viscosidad interfiere en la nitidez que tiene el campo visual del microscopio.

Recientemente se han sugerido investigaciones en las que se utilizan alternativas proteínicas dentro del diluyente en lugar de la yema de huevo, así pues, se ha utilizado albumina sérica bovina, suero equino, suero bovino, proteína de soya, calostro, alcohol polivinílico, etc. Todos ellos proveen la oportunidad de hacer estudios in vitro con buena visibilidad ante el microscopio (Palacios, 1994)

2.7 Curvas de enfriamiento y congelamiento

Entre temperaturas de -5°C y -10°C se inicia la formación de cristales de hielo en el medio extracelular, pero el agua intracelular se mantiene en estado frío, resultando en un aumento

de la concentración de soluto en el fluido que queda fuera de la célula, lo que conduce a la deshidratación del mismo (Medeiros, 2002)

Por lo tanto, la velocidad de congelación óptima debe ser lo suficientemente lenta para evitar la formación de hielo intracelular, pero rápidamente suficiente para evitar el daño causado por la exposición al extenderse a concentraciones más altas soluto (Holt, 2000)

Por otra parte, al realizar la descongelación se debe tener en cuenta la velocidad de congelación que se adoptó con el fin de no causar daño letal para las células. Si los honorarios semen congelado, si se descongelan rápidamente o a la inversa de los que se congelo puede haber gran afluencia de agua, lo que causa destrucción de la membrana plasmática, pues el hielo intracelular puede ser recrystalizar en cristales más grandes, causando lesiones mecánicas en la membrana (Hallap,et al, 2004)

2.8 Evaluación del Semen

2.8.1 Prueba Hiposmótica

En la membrana espermática el metabolismo espermático, que se genera allí, promueve procesos bioquímicos que permiten la sobrevivencia e integridad funcional del espermatozoide (Pereira, 2006). Uno de los métodos existentes para evaluar la membrana espermática, es por medio de la prueba de membrana, vía endósmosis o Hipo Osmotic Swelling Test (HOST), está se basa en las propiedades fisicoquímicas que presenta la membrana plasmática (Cabrera & Pantoja, 2008), cuando sufre o es sometida a un proceso o medio hiposmótico y evalúa la integridad funcional de la misma, aparte de servir como referencia, de capacidad fertilizante de los espermatozoides (Machado, 2008), a diferencia de las tinciones que solo evalúan la morfología y no la condición fisiológica de la membrana plasmática (Cabrera & Pantoja, 2008).

El principio de la prueba hiposmótica, consiste en el transporte de fluidos a través de la membrana de la cola del espermatozoide, donde se produce un edema. Este proceso, se desarrolla bajo condiciones hiposmóticas, hasta que el medio externo e interno este equilibrado (Pereira, 2006). Los espermatozoides de los mamíferos tienen una alta conductibilidad hidráulica, permitiendo que el equilibrio osmótico, vía membrana espermática, suceda en pocos segundos (Pereira, 2006). Esta prueba, fue la primera en

utilizarse para evaluar la integridad funcional de la membrana plasmática del espermatozoide en humanos, posteriormente en bovinos, suinos, caninos, equinos, caprinos y ovinos (Toniolli, 1989; Silva, A., Cardoso, R., Silva, L., 2003, citados en Amorin, 2008; Vasquez et al., 1997, citado en Cabrera y Pantaja, 2008).

En la endosmosis positiva (capacidad de la corriente osmótica de atravesar la membrana plasmática) se observa como el flagelo del espermatozoide, expuesto a una solución con osmolaridad que esté por debajo a la del plasma seminal, (o en un medio hiposmótico de 100 mOsm/ml o de 100 a 200 mOsm/ml, se doble helicoidalmente el espermatozoide y ascienda dentro de la misma membrana (Machado, 2008).

Como consecuencia a un desajuste osmótico entre el medio extra e intracelular, y al encontrarse en un medio hiposmótico, los espermatozoides sufren una desnaturalización proteica, disociando las lipoproteínas que influyen en la activación, estabilización o inhibición de enzimas (Machado, 2008), los espermatozoides difunden el agua al compartimiento intracelular, aumentando su volumen (edema), haciendo que el equilibrio sea nuevamente estable entre los fluidos de los compartimientos intracelulares y el ambiente extracelular, mostrando un flagelo en curva cuando tiene membrana funcional, mientras que los espermatozoides no viables, mantienen sus colas rectas (Cabrera & Pantoja, 2008). Otra característica a evaluar es el patrón de doblamiento de la cola y la dinámica de dicho doblamiento a lo largo de su extensión (Machado, 2008).



(Gonzalez,2012)

Figura.1 espermatozoide reactivo a prueba hiposmotica

Los cristales de hielo intracelular causan ruptura y vacuolización aumento de tamaño del citoplasma y membranas, especialmente de las liposomas, asociada a la liberación de

enzimas hidrofílicas liposomales moléculas que tienen afinidad con el agua lo que conlleva a la destrucción química de la célula (Cabrera & Pantoja, 2008).

2.8.2 Prueba de Termo Resistencia (TTR)

Consiste en poner en contacto a una muestra de semen con una solución hipotónica. Luego de cierto tiempo se realizan mediciones y el porcentaje de espermatozoides que haya sufrido curvatura de las colas, representan aquellos que eran normales y cuya membrana citoplasmática fue capaz de reaccionar ante el estrés osmótico (Gallina y Valencia, 2006).

Las muestras fueron sometidas a una prueba de resistencia y duración de la motilidad de los espermatozoides, inmediatamente después de la descongelación e incubándolas en el baño de maría a 37°C en su respectivo medio sea Tris-citrato-yema de huevo o Botu-Bov®. Las evaluaciones de la motilidad total, progresiva y vigor se realizaron a intervalos de tiempo correspondientes a 30 minutos hasta que el porcentaje de la motilidad disminuyó al 5% (Pérez, 2006).

2.8.3 Tinciones para morfología

Existen coloraciones como la eosina nigrosina que actúan a través de reacciones con enzimas citoplasmática ligadas con el DNA espermático (Arruda Celeghini Andrade, 2004), (Palacios, 2005) señala que la morfología espermática es un factor determinante en la capacidad de fertilización del semen, ya que existe una correlación entre defectos espermáticos e infertilidad.

Los espermatozoides son traslucidos y virtualmente invisibles al microscopio de luz directa. Barth (2003) señala por lo tanto, se requiere el uso de colorantes que provean de un fondo oscuro para visualizarlos. Lo más recomendable es la técnica en un solo paso, (en donde se mezcla el colorante con el espermatozoide sobre el porta objetos), porque todo lo que se encuentra en el semen puede ser observado, Algunas de estas funciones son cosa de bengala, tinta china, la tinción de eosina/nigrosina o llamada vital (vivos-muertos).

La coloración vital (eosina, azul de anilina, o eosina/nigrosina) es la más comúnmente usada en la examinación morfológica de esperma, el azul de anilina y nigrosina proveen un fondo oscuro, sobre el cual resaltan los espermatozoides, la eosina por su parte tiñe las células, penetrando la membrana de las células dañadas, tiñendo las lesiones y espermatozoides no viables o muertas de rosa. También para conocer la morfología y las anomalías se utiliza la coloración de verde malaquita y rojo congó.

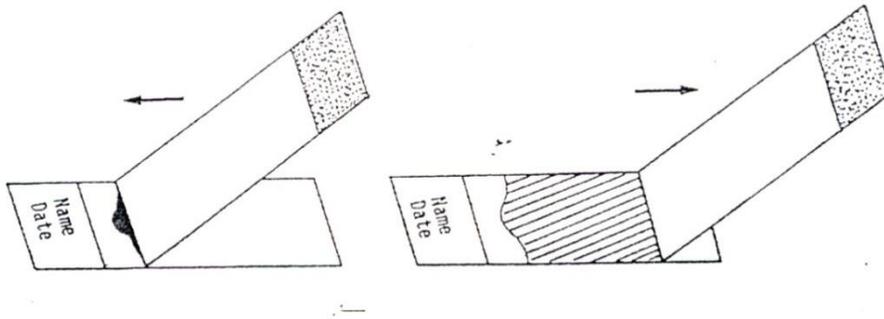


Fig. 2 Método de coloración de una muestra de semen usando eosina nigrosina. (Barth 1989)

Según(Barth ,2003), para la preparación del extendido (Fig. 2) se coloca una gota de 5 - 6 mm de diámetro de tinción eosina nigrosina en un extremo de porta objetos tibio, y seguido se coloca una gótica de semen de 3 a 5 mm de diámetro cerca de la tintura, luego de haber mezclado la tintura con el semen, y dejar actuar un minuto, la mezcla es extendida de un lado hasta el otro con otro portaobjetos tibio, formando una película delgada en la cual después de seca se puede hacer la evaluación con un objeto de inmersión de aceite a 1000 - 1250 aumentos. Aumentos menores no revelan la mayoría de los defectos que existen. Cuando hay pocas anomalías es suficiente contar 100 espermatozoides y cuando encontramos gran cantidad de anomalías es recomendado contar 300 o más (Catena, 1999 y Barth, 2003), así lo confirman.

2.9 Antecedentes

Los primeros medios utilizados para diluir semen, fueron principalmente las soluciones salinas o azucaradas aumentando el volumen del eyaculado para su empleo inmediato como conservadores (Salisbury, 1982).

En las técnicas de criopreservación de los espermatozoides hubo un lento progreso (Hammerstedt, Graham, Nolan ,1990). En 1983 se comenzó a estandarizar la técnica de congelamiento y los efectos de la criopreservación sobre la función espermática y la fertilidad empezando a describirse particularmente en bovinos (Leeuwe, De Leeuw, Den Daas, Colenbrander, y Verkleij. 1990).

Para minimizar los efectos perjudiciales de la crioconservación se ha probado, durante décadas, los crioprotectores, diluyentes, y aditivos para proteger las células y se han proporcionado sustratos para el mantenimiento durante y después de la criopreservación, varias tasas de enfriamiento y descongelación han sido ensayadas en la crioconservación seminal de diferentes especies sin que se haya determinado con exactitud una curva estándar (Hochi et al., 1996; Yu et al., 2002; Peña-Martínez, 2004; Velasco-Santamaría et al., 2005).

A través de los años se ha investigado, descubierto y evaluado muchos medios de dilución de semen en bovinos, los cuales en la década de 1950 solo les permitía conservar la viabilidad hasta 4 días, a temperaturas aproximada de 4°C en estado líquido o a temperatura ambiente de 15 °C a 25°C (sorensen,1984)

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

En una investigación se propuso como una alternativa el uso de la leche de soja para reemplazar el componente de yema de huevo en el diluyente utilizado en esta investigación (Biociphos-Plus®), la investigación compara, Tris Citrato Yema De Huevo envasado a 4°C , tris citrato yema de huevo envasado a temperatura ambiente y Biociphos Plus ® y manifiesta que, teniendo en cuenta factores tales como los costosos reactivos, la preparación de una temperatura, diluyente, material, entre otros, los resultados presentados, nos dan a conocer que los espermatozoides del Tris envasado a temperatura ambiente fueron de mayor calidad y fertilidad después de la descongelación en toros simmental (Thun Hurtado y Janett, 2002).

En otros trabajos anteriores autores como Chacur, Sanchez, Ozanam, Louvison, Calesco, Papa, (2012) evaluaron nuevos medios de criopreservación de semen bovino como TRIS-yema, Botu-Bov® y Botu-Bov Egg Free® ya que estos presentan tasas altas y regulares para mantener la viabilidad de los espermatozoides pos- descongelamiento. Para esto Fueron utilizados eyaculados de 10 toros Cebuínos, clasificados como de criopreservación alta (n=5) y regular (n=5). Los eyaculados fueron criopreservados con los diluyentes anteriormente nombrados y evaluados por análisis computadorizado (CASA). Así

mismo, la integridad de membrana fue evaluada por fluorescencia. Y se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y prueba de Tukey al 5%.

Estos autores encontraron que No hubo diferencia ($p>0,05$) entre el semen de alta y baja criopreservación antes de la congelación. Pero los diluyentes Botu-Bov® y Botu-Bov Egg Free® se mostraron superiores ($p<0,05$) ante CASA: MP motilidad progresiva , MT motilidad total ,ALH dislocamiento lateral de la cabeza , BCF frecuencia de batimiento de cola, STR capacidad de ir en línea recta , LIN linealidad y RAP porcentaje de espermatozoides rápidos para el semen de criopreservación regular.

El semen de criopreservación regular presentó superioridad ($p<0,05$) en los parámetros MT y VSL cuando fue usado el diluyente Botu-Bov Egg Free® con relación al Botu-Bov®. También se encontró superioridad de los diluyentes Botu-Bov® y Botu-Bov Egg Free® ($p<0,05$) en los parámetros BCF y STR en semen de criopreservación alta. Los diluyentes Botu-Bov® y Botu-Bov Egg Free® fueron mejores en la mayoría de los parámetros evaluados por CASA, principalmente en semen de criopreservación regular. Como se muestra en la tabla 1

Tabla 1: promedios de los parámetros espermáticos antes de la congelación de los toros clasificados de acuerdo con el grado de criopreservación en semen en regular (R) y muy buena (VG)

Parámetros	Criopreservación Regular			Criopreservación Alta		
	Tris	Botu-Bov®	Botu-Bov egg free®	Tris	Botu-Bov®	Botu-Bov egg free®
MT	59.7±9.2	63.8±12.4	73.3±6.6	68.9±6.8	72.6±6.9	71.5±5.1
MP	38.7±8.1	52.4±5.3	50.5±11.4	46.9±6.0	54.1±5.7	54.3±3.4
ALH	6.9±0.8	5.6±0,7	5.9±0.7	6.8±0.6	5.8±0.9	5.5±0.8
BCF	25.8±3.7	30.1±2.7	31.7±3.3	24.2±2.8	28.0±3.2	31.1±3.3
STR	76,7±4.7	83.6±3.3	84.1±3.3	75.4±3.6	80.6±4.1	82.9±3.7
LIN	46,4±4.9	54.2±5.2	54.9±4.1	46.1±3,0	53.3±5.2	56.2±5.4
RAP	55,8±9.5	64,9±8.8	61.6±14.1	70.2±7.8	66.5±9.6	69.3±5.5

Adaptado de Chacur et al. (2012)

MT (motilidad total, $\mu\text{m/s}$), MP (motilidad progresiva $\mu\text{m/s}$), ALH (desplazamiento lateral de la cabeza μm), BCF (frecuencia de batimento de cauda, Hz), STR (retilinearidad, %), LIN (linealidad, %), RAP (porcentaje sptz rápidos).

Todos estos resultados nos demuestran que los diluyentes Botu-Bov Bov® y Botu-Free Egg® presenta superioridad en la mayoría de los parámetros evaluados por el CASA, que el Tris en toros con semen de viabilidad regular lo que nos lleva a corroborar que el diluyente botu bov preserva mejor la viabilidad del semen pos-descongelamiento.

Por otro lado (Freitas, JA Dell'Aqua., Papa, Alvarenga, Crespilho, Landim-Alvarenga 2008) compararon el efecto criopreservante del TRIS y botulinum-bov® en semen bovino sexado, utilizando Dos eyaculados de 10 toros (*Bos taurus* y *Bos indicus*) en edad reproductiva, estos fueron evaluados por análisis de semen asistido (CASA) donde comprobaron que hubo una mejora significativa en la motilidad progresiva con el uso de botulinum-bov®, en comparación con TRIS (67,4% v 56,7%,). Además hubo una diferencia estadísticamente significativa de la velocidad curvilínea (VCL) y el desplazamiento lateral de la cabeza (ALH), con TRIS mostrando valores más altos que botulinum-bov®. El semen congelado con el botulinum-Bov tenía un movimiento de escalera más alta (STR; 85,1%) y linealidad (57,4%) que el grupo TRIS (79,8% y 45,6%,). Estas características indican un movimiento recto y uniforme cuando se utiliza botulinum-Bov®. Estos resultados sugieren que botulinum-Bov® ofrece mejores condiciones para el mantenimiento de la viabilidad del semen sexado congelado que el TRIS, probablemente debido a la alta concentración de aminoácidos esenciales y no esenciales presentes en el extensor botulinum-Bov®

Crespilho, papa, alberti, filho, martins, novaes, dell'aqua (2006) compararon la efectividad de dos diluyentes de criopreservación para semen bovino con relación a los patrones de motilidad post descongelación, evaluada por el método computadorizado (CASA), y examinaron la integridad de la membrana plasmática (IMP) y la viabilidad a la prueba de termorresistencia rápida (TTR). Para el estudio fueron utilizados 10 toros de la raza nelore, obteniéndose dos eyaculados de cada animal. Los eyaculados fueron fraccionados en dos muestras sometidas a la criopreservación con los diluyentes Botu-Bov® y TRIS-yema-fructosa.

En este estudio concluyeron. Que los espermatozoides criopreservados con el diluyente Botu-Bov® presentaron mayor linealidad en relación al TRIS, indicando una mayor viabilidad espermática post descongelación como se muestra en la tabla 2 donde se observan diferencias significativas ($p < 0,05$) para la motilidad progresiva (MP), amplitud lateral de cabeza (ALH), frecuencia de batimientos (BCF), rectilinealidad (STR) y linealidad (LIN) entre los dos grupos estudiados. Mientras en el test de termo resistencia no hubo significancia Lo que nos lleva apoyar nuestra hipótesis que el botu bov preserva mejor la viabilidad espermática en el proceso post-descongelamiento que el medio diluyente Tris citrato yema de huevo.

Tabla: 2 Parámetros de espermatozoides en movimiento, motilidad total después de la prueba termorresistencia rápida y la integridad de la membrana plasmática (media \pm desviación estándar agruparon, n = 10 por grupo eyacula) para esperma criopreservado respectivamente con Botu-Bov ® (BB) o Tris-yema de huevo-fructosa (TRIS).

	Botu-Bov ®	TRIS	P- valor
MP%	61.8 \pm 6.1	52.5 \pm 9.8	0.0211
ALH	4.84 \pm 1.1	5.9 \pm 0.5	0.0086
BCF(Hz)	30.4 \pm 4.2	26.6 \pm 1.3	0.0217
STR%	89.3 \pm 4.6	81.5 \pm 3.0	0.0003
LIN%	66.4 \pm 8.3	55 \pm 7.4	0.0045
TTR	24.7 \pm 27,4	24.5 \pm 21.9	0,9858

Adaptado de Crespilho et al. (2006)

MP: Motilidad Progresiva; ALH: Amplitud de Dislocamiento Lateral de cabeza Espermática; BCF: Frecuencia de Batimientos; STR: reitilinidad ; LIN: Linealidad; TTR: motilidad total con test de Termo resistencia.

Celeghini, Arruda , Andrade , Nascimento , Raphael , Rodrigues_ (2008) evaluó el efecto de la criopreservación de dos diluyentes bioxcell® y botu-bov® en el eyaculado de ocho toros simental donde evaluó subjetivamente el volumen, concentración, motilidad, vigor y la movilidad por el sistema informático (CASA), las características morfológicas en el microscopio de interferencia diferencial, la integridad de las membranas plasmática y

acrosomal y la función mitocondrial con naranja acridina en el semen post-descongelamiento.

Encontrando que el botu-bov® fue mejor en preservar la integridad de la membrana y la motilidad en comparación con bioxcell®. La siguiente tabla 3 nos muestra que el semen fresco tiene una mayor motilidad total y motilidad progresiva que el semen congelado, ya sea diluido con Bioxcell® o Botu-Bov® (P <0,0001). La motilidad total y progresiva se conservaron en mayor medida con Botu-Bov® que con Bioxcell® (P <0,0001). Ya que las pérdidas estimadas de motilidad total y progresiva relacionado con el proceso de crioconservación fueron 55,8% y 49,6%, para el Bioxcell®, en comparación con 39,8% y 9,5%, respectivamente, para el Botu-Bov®. Lo que nos indica que hubo menor pérdida de motilidad utilizando el botu-bov®.

Tabla 3

Medias y errores estandar analizados en el CASA en semen bovino: fresco y diluido con bioxcell y Botu-bov (pág. siguiente)

Variables	Semen fresco	bioxcell®	Botu-bov®
Motilidad total%	79.9±1.3	24.1±1.4	40.1±1.9
Pérdidas estimadas MT		55.8%	39.8%
Motilidad progresiva	60.3±1.9	10.7±0.9	20.8±1.4
Pérdidas estimadas MP		49.6%	9.5%
Membrana plasmática intacta (%)	78.8±1.1	18.1±0.9	28.8±1.1
Pérdidas estimadas		59.9%	42.9%
Membrana acrosomal	86.0±0.9	55.2±1.7	68.8±0.9

intacta (%)		
Pérdidas estimadas	30.8%	17.2%

Adaptado de Celeghini et al. (2008)

En cuanto a la integridad de las membranas plasmáticas y membranas acrosomal la función mitocondrial detectado mediante la combinación de las sondas fluorescentes, se concluyó que el diluyente que causo más daño en las membranas plasmáticas en semen congelado fue con el 59,9% para Bioxcell® y 49,2% para Botu-Bov®, mientras que para el daño de la membranas acrosomales fue de con 30,8% y 17,2% como se muestra en la tabla anterior

La función mitocondrial fue de 59,9% menor con Bioxcell® y el 52,9% menor por Botu-Bov®. Todo estos resultados nos indican que el Botu-Bov® conserva mejor las membranas plasmáticas, las membranas acrosomales y la función mitocondrial que el Bioxcell®.

Por lo tanto se concluye en el presente estudio, que el Botu-Bov® presenta más ventajas en términos de preservación de células de esperma bovino que el Bioxcell®.

En un trabajo realizado por Leeuw ,haring, kaal-lansbergen, den dass(2000) donde se investigó la fertilidad evaluado por 56 días-tasa de no-retorno (NR56)del semen bovino criopreservado con 3 extensores como el TRIS-estándar, que contiene 20% de yema de huevo pasteurizada, TRIS-Concentrado, que contiene 20% de yema de huevo pasteurizada y 01:05 de agua no pirogénica, y Biociphos se encontró que no hubo diferencia significativa entre Tris-Standard y Tris-Concentrado (P = 0,54),ya que la tasa de días de retorno 56 días(NR56) fueron muy parecidas como muestran La tabla mientras el Biociphos Plus tuvo un resultado menor significativo . Como se muestra en la tabla numero 4.

Tabla 4 porcentajes de tasas de concepción y tasa de parto concepción con tris , tris concentrado y biociphos®

Parámetros	Tris estándar	Tris concentrado	Biociphos
NR56	70,1%	69,9%	66,7%
Tasa de concepción	72,1%	73,6%	69,6%
Tasa parto/concepción	80,6%	78,3%	77,1%

Adaptado de Leeuw et al. (2000)

Estos resultados demostraron que el diluyente tris estándar mantiene la fertilidad del semen ya que este posee una buena tasa de retorno , tasa de concepción y tasa parto concepción lo que lleva a considerar que el tris mantiene una buena viabilidad del semen pos descongelación

En otra investigación donde se evaluó el efecto de tres diluyentes de criopreservación Botu-Bov® , Botu-Bov® base de yema de huevo, y Andromed® base de lecitina de soja donde se comparó la motilidad, hiper activación del esperma, la reacción del acrosoma, la capacitación y la peroxidación de lípidos de la membrana espermática. En seis muestras de semen de 10 toros Nelore para esto se utilizó análisis de esperma asistido por ordenador (CASA) y citometría de flujo para la reacción del acrosoma, la peroxidación de las membranas espermáticas y la capacitación espermática por la estabilidad de la membrana plasmática.

Tomando resultados de esta investigación se puede interpretar que el diluyente Botu-Bov® preserva muy bien la viabilidad espermática pos descongelamiento ya que se conoció que los diluyentes que contenían base de yema de huevo conservaban mejor la motilidad del esperma, como se muestra en la tabla 5, la población de células con la integridad de la membrana plasmática y que no había reacción acrosómica en el semen de bovino. Además hubo menor subpoblación de células con hiperactividad, por lo tanto menor desestabilización de la membrana plasmática pues permiten una disminución de la

peroxidación lipídica de las membranas cuando se comparó con la base de la lecitina de soja. (Zaffalon, 2009).

Tabla 5 las medias Y el error estándar de cada variable evaluada en (CASA)

parámetros	Botu Bov® base yema de huevo	Botu Bov® base de lecitina de soja	Andromed®
Motilidad total%	42.41±2.04	20.08±1.51	19.90±1.20
Motilidad progresiva %	36.27±1.77	17.47±1.27	16.06±1.06

Adaptado de Zaffalon (2009)

La motilidad total y progresiva fueron mejor preservadas en el diluyente Botu-Bov® teniendo diferencia significativas ($p < 0,05$) frente a los otros diluyentes, ya que en el diluyente 2 y 3 no fueron encontradas diferencias significativas.

Por otro lado Aires, Hinsch, Mueller-Schloesser, Bogner, Hinsch (2003) en su investigación en la congelación de semen en toros lecheros encontraron que al comparar el TRIS yema de huevo con andromed® lecitina de soja el que mejor preserva la viabilidad pos descongelamiento fue el andromed® ya que este presentó mayor motilidad espermática que el tris citrato yema de huevo. y a la evaluación de la fertilidad por tasa de no-retorno a celo a los 56 días (56 d, TNR), los resultados fueron menores para el semen congelado con TRIS, el que tuvo mayor éxito fue el andromed como lo muestran los resultados. Tabla 6

Tabla 6 porcentajes de motilidad espermática y tasas de no retorno utilizando tris y andromed

Parámetros	Andromed®	Tris citrato yema de huevo
Motilidad espermática	73,54%	59,57%
TNR	70,45%	67,85%

Adaptado de Aires et al. (1967)

TNR 56 (Tasas de no retorno a celo a los 56 días)

Por lo tanto, concluyeron que el uso de diluyentes de proteínas libre puede evitar los problemas asociados con el uso de yema de huevo incluyendo bacterias y las variaciones en el medio y que estos mejoran la viabilidad espermática pos descongelamiento.

Leite, Vale y Filho (2010) Evaluaron los efectos del tris-citrato-yema de huevo y del Bioxcell® para la crioconservación de semen de toro. En semen de 12 toros Gyr conocieron que TRIS tenía una mayor acción crioprotectora que Bioxcell®, con mayor, motilidad individual y progresiva, y el porcentaje de espermatozoides con el plasma y las membranas intactas acrosómica IPIA en 2 y 4 horas, así como la proporción más baja de la membrana plasmática dañada (DPM, 72,2% frente a 85,8%) para todos los tiempos. En general, la combinación de TRIS y 4h de equilibrio fue el método de crioconservación de semen más deseable.

En otros resultados de las pruebas con Tris-yema-fructosa (TRIS) y Botulinum-Bov® ®, una innovación nacional en la congelación semen de bovino, también se basa en la yema de huevo, indicó que no difieren en cuanto a la motilidad total e integridad de la membrana plasmática. Sin embargo, Botulinum-Bov® fue más eficaz en la preservación de la linealidad de espermatozoides móviles después de la descongelación, este atributo que al tener una posible asociación con la fertilidad in vivo sugerido, según los autores, su superioridad como un diluyente para la congelación de semen bovino (Crespilho et. al, 2006)

3. Materiales y Métodos

3.1 Localización

El presente estudio se llevó a cabo en dos haciendas del departamento de Antioquia en el municipio de Sonsón vereda la Linda y la Danta.

Sonsón es un municipio de Colombia, localizado en la zona oriente del departamento de Antioquia. Con una temperatura 14°C y una superficie de 1.323 km² posee varios pisos térmicos caliente, templado y frío.

3.2 Población y Muestra

Se utilizaron diez (10) bovinos machos de la raza Brahmán comercial de edades (entre 2 y 5 años).

Los animales permanecen en potrero, son manejados en sistema de pastoreo rotacional alimentados con pasto como *Brachiaria Brizantha* y *Brachiaria Decumbens*, se le administra agua potable a voluntad. En las haciendas se manejan dos animales por hectárea aproximadamente.

3.3 Variables

En este trabajo se evaluarán:

- En cuanto a la morfología se evaluaron las siguientes variables las cuales comprenden:
 - 2 de vitalidad con eosina nigrosina (vivos y muertos)
 - 2 de morfología con verdes malaquitas (morfológicamente normales y anormales)
 - 2 de morfología con rojo Congo (morfológicamente normales y anormales)
- En la prueba Hiposmótica se evaluaron las siguientes variables
 - 2 en tiempo cero (células reactivas y no reactivas)
 - 2 en tiempo treinta (células reactivas y no reactivas)

- En cuanto a la evaluación Microscópica con semen fresco se evaluarán 4 variables las cuales comprenden: motilidad total, progresiva, Masal y vigor
- Pos-dilución se evaluará 3 variables las cuales comprende : motilidad total, progresiva y vigor
- En la prueba de Termo resistencia se evaluarán 21 variables las cuales comprenden:
 - 3 para el tiempo cero que incluye(motilidad total, progresiva y vigor)
 - 3 para el tiempo treinta que incluye (motilidad total, progresiva y vigor)
 - 3 para el tiempo sesenta que incluye (motilidad total, progresiva y vigor)
 - 3 para el tiempo noventa que incluye (motilidad total, progresiva y vigor)
 - 3 para el tiempo ciento veinte que incluye (motilidad total, progresiva y vigor)
 - 3 para el tiempo ciento cincuenta que incluye (motilidad total, progresiva y vigor)
 - 3 para el tiempo ciento ochenta que incluye (motilidad total, progresiva y vigor)

Para un total de 38 variables

Las variables de termo resistencia se evaluaron cada 30 minutos

3.4 Análisis estadístico

Se utilizó el programa estadístico statgraphics para realizar una prueba test student con el fin de evaluar los dos grupos experimentales G1: diluyente tris G2: diluyente botu bov® de igual forma se realizó un análisis de varianza para evaluar la robustez de los datos.

ANOVA determinó si hubo diferencias significativas entre las medias. Si las hay, las Pruebas de Rangos Múltiples le dirán cuáles medias son significativamente diferentes de otras.

3.5 Métodos y Procedimiento

3.5.1 selección y colecta

Los animales seleccionados fueron 10 machos reproductivamente aptos, sexualmente activos de fertilidad comprobada, la colecta fue realizada mediante electroeyaculación, o masaje a través de las ampollas de los ductos deferentes, con previa desinfección del ostio prepucial externo y lavados con solución salina fisiológica o ringer lactato. En tubos conicos previamente ajustados a la temperatura en baño de maría a 37°C. El volumen promedio fue de $0,5 \pm 0,16$ y el pH de 7, de color blanco cremoso y con motilidad masal superior a 4. La evaluación microscópica se realizó en láminas previamente calentadas donde se adiciono una alícuota de la muestra 0.5 μ l para realizar la evaluación de las características seminales. y parámetros espermáticos como motilidad total, motilidad progresiva, vigor, motilidad masal .

La concentración, fue determinada por cámara de Neubauer (Baracaldo, Barthand, Bertrand, 2007).

3.5.2. Procesamiento del semen pre congelación

Sólo se utilizaron para la congelación los eyaculados que presenten motilidad igual o superior al 60% y una concentración igual o superior a 60 millones de espermatozoides por ml Jasko ,morán y Farlin(1994). Al finalizar la evaluación microscópica, se dividió la muestra en dos partes iguales para permitir la aplicación de los medios diluyentes Botu –bov ® y TRIS-Citrato-Yema de Huevo

3.5.3 Motilidad espermática

Este parámetro se determinó mediante la utilización de microscopía óptica con un aumento de 400X, utilizando 10 μ l de semen colocado entre el portaobjetos y el cubreobjetos, a una temperatura de 37°C. La motilidad progresiva fue analizada por la evaluación del porcentaje de células espermáticas que presenten movimiento circular abierto, en la evaluación de mínimo 6 campos visuales. Solamente serán seleccionados eyaculados para el proceso de criopreservación que presenten motilidad espermática progresiva igual o superior a 70 % (Pineda, 2002).

3.5.4 Motilidad o movimiento en masa

Se colocó una gota de semen de 5 mm de diámetro sobre un portaobjetos precalentado, observando el movimiento en masa de los espermatozoides usando microscopía de campo claro, con magnificación de 40x. Los factores que influyen en el movimiento en masa de los espermatozoides son la concentración, el porcentaje de células con movimiento progresivo y la velocidad/vigor del movimiento de los espermatozoides. Si uno o más de estos factores se encuentran comprometidos, el movimiento en masa se reducirá (Barth, 1997).

3.5.5 Calificación descriptiva del movimiento en masa:

- Muy Bueno (MB): remolinos oscuros y rápidos
- Bueno (B): remolinos lentos
- Regular (R): sin remolinos, pero movimiento visible de células individuales
- Pobre (P): poco o nada de movimiento celular individual (Barth, 1997)

3.5.6 Vigor

El vigor o el movimiento de los espermatozoides fue clasificado de cero (ausente) a cinco (máximo). La evaluación de los parámetros anteriormente nombrados fue realizado por profesionales experimentados, en compañía del equipo de investigación de este proyecto.

3.5.7 Concentración espermática

La concentración se determinó en la muestra de semen fresco, realizando una dilución en una solución de formol salina tamponada, se utiliza para prevenir el efecto osmótico que provoca el empleo de disoluciones de formaldehído en agua destilada y se prepara disolviendo 9gr de cloruro sódico en 1000 ml de formalina al 10% solución de formaldehido (37% a 49%) 100ml, agua destilada 900ml.

Fosfato de sodio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 4.0gr, fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4) 6.5gr (Montalvo, 2010) en una proporción 1:200. Para el conteo de células fue utilizada la cámara de Neubauer y realizada la lectura en microscopía óptica con aumento de 400 veces (Guimarães, 2010).

3.5.8 Morfología espermática

Se evaluó muestras de semen fresco, colocándose una gota de semen suficiente (100 µl) y una gota de coloración en una lámina procediendo hacer el extendido, se dejó secar por un minuto para así observarla. La evaluación se realizó en microscopia de contraste de fase y se consideraron mínimo 100 células, de acuerdo al protocolo descrito por (Nie y Wenzel 2001).

Se utilizaron coloraciones como la eosina nigrosina, verde malaquita y rojo Congo. Al ver Los espermatozoides traslucidos y virtualmente invisibles al microscopio de luz directa. Se observaron y se buscaron anormalidades en la morfología tanto como de cabeza y cola.

Con La coloración vital (eosina/nigrosina) se examinó la morfología de esperma, y que espermatozoides estaban vivos y muertos

3.5.9 Proceso de criopreservación del semen

Después de haber realizado la dilución seminal 1:1 con el medio diluyente 1 + crioprotector y diluyente 2 + crioprotector, el semen se mantiene a temperatura ambiente 37°C por diez minutos hasta que sea transportado del lugar de la colecta hasta el laboratorio, el cual estará localizado en el mismo lugar de la colecta. Posterior a la dilución se realiza nuevamente la evaluación de todos los parámetros seminales (Motilidad masal, motilidad total, motilidad progresiva, vigor) y se procede a realizar la dilución definitiva con base en el cálculo de la concentración realizada en la muestra de semen fresco sin medio diluyente, será realizada una dilución de 1:10 con ambos diluyentes, en el mismo día se procederá a realizar criopreservación del semen con ambos diluyentes, para cada toro se realizó cinco toros en un día y los otros cinco restantes al otro día.

3.5.10 Curvas de enfriamiento y congelamiento

Se realizó una curva de enfriamiento de cuatro horas para cada diluyente la temperatura debe permanecer alrededor de -5°C, para que el agua intracelular y extracelular permanezca en un estado de congelación. Al terminar el enfriamiento, se llevó el semen a un estado de refrigeración, desde los 37°C hasta los 5°C a una tasa de 0,25 °C/min (Pérez, 2006), intervalo en que los espermatozoides son sensibles al choque térmico. El semen se envaso y fue llevado a una nevera convencional se colocaron las pajillas en la parte de conservación

de la nevera mas no en el congelador, se mantuvo cerrada para que la temperatura sea estable y allí se realizó la curva de refrigeración durante 4 horas, posteriormente se congelo exponiendo primero las pajillas durante 15 minutos en una nevera de icopor a 4 cm por encima del nivel del nitrógeno (vapores de nitrógeno) y pasado este tiempo se sumergio en el nitrógeno líquido en la misma nevera de icopor a una temperatura de -196°C . Después de haberlas sumergido en el nitrógeno, se procedió a empacar las pajillas en el termo de nitrógeno cada lote de pajillas en un canister determinado y previamente identificado con el nombre o el número del toro.

3.5.11 Descongelación del semen

La descongelación del semen se realizó sumergiendo las pajillas a una temperatura de 37°C durante 30 segundos en el baño de maría (Pérez, 2006). Para posteriormente ser envasadas en un Eppendorf y proceder a ser evaluadas.

3.5.12 Evaluación del semen

Después de la descongelación del semen se realizó la evaluación de este, la cual incluye los parámetros anteriormente nombrados como la motilidad total, motilidad progresiva, vigor y morfología, además de la integridad de la membrana espermática mediante la prueba Hiposmótica (HOST). La motilidad y el vigor se evaluaron mediante la prueba de Termo resistencia.

3.5.13 Prueba de Termo Resistencia (TTR)

Se puso una gota de muestra de semen con una solución hipotónica. El momento de colocar la gota de semen en la solución se tomó como tiempo 0 donde se evaluó el porcentaje de espermatozoides que sufrió curvatura de las colas ,lo que representa aquellos que eran normales y cuya membrana citoplasmática fue capaz de reaccionar ante el estrés osmótico. Los que no sufrieron curvatura de cola nos indicaron que se afectó su membrana citoplasmática lo que nos representó que eran anormales Luego contabilizar 30 minutos se

procedió a evaluar otra vez qué porcentaje de espermatozoides habían reaccionado a la prueba.

4. Resultados y Discusión

Este estudio se basa en la comparación de la eficiencia de dos diluyentes botu-bov® y tris-citrato-yema de huevo.

Según los resultados obtenidos para cada uno de los parámetros espermáticos motilidad total, motilidad progresiva, y vigor que se compararon en los dos protocolos asociados a dos medios diluyentes en el proceso del pos descongelamiento Tabla 7 no fue posible observar diferencias significativas ($p < 0.05$)

Tabla 7. Valores de Viabilidad Espermática pre congelación y pos descongelación

Tratamientos	BOTU	BOV	TRIS	VALOR P
variables	Med \pm SD		Med \pm SD	P
MOT F (%)	79.5 \pm 6.43		79.5 \pm 6.43	10.000
MP F(%)	74.5 \pm 6.43		74.5 \pm 6.43	10.000
MTM	3.1 \pm 0.87		3.1 \pm 0.87	10.000
VIGOR	3.6 \pm 0.51		3.6 \pm 0.51	10.000
MOT/ PD(%)	71.5 \pm 7.09		68.5 \pm 9.14	0.4230
MP/PD	67.5 \pm 5.89		67.5 \pm 5.89	0.1285
V/PD	3.3 \pm 0.48		3.1 \pm 0.31	0.2878

González y Pallares (2012)

MOT F (motilidad total en fresco) MP F(motilidad progresiva en fresco) MTM(motilidad masal en fresco) MOT/PD(motilidad total pos descongelamiento) MP/PD(motilidad progresiva pos descongelamiento) V/PD(vigor posdescongelamiento).

De acuerdo con los valores representados en la tabla 7 no fue posible determinar diferencias significativas en el comportamiento de los parámetros espermáticos que se evalúan en este estudio, al comparar el efecto de los medios diluyentes, ya que al realizar la

primera dilución con medios diluyentes (botu Bov y tris) y analizar las medias obtenidas como motilidad total, motilidad progresiva y vigor según los valores P; estos no muestran significancia estadística con lo cual es posible observar los siguientes valores de las medias (Botu bov 79.5 ± 6.43 vs tris 79.5 ± 6.43 ; Botu bov 74.5 ± 6.43 vs tris 74.5 ± 6.43 ; Botu bov 3.6 ± 0.51 vs tris 3.6 ± 0.51).

Al evaluar los parámetros arriba descritos (tabla 7) como motilidad total, motilidad progresiva y vigor (Botu bov 71.5 ± 7.09 Tris 68.5 ± 9.14 ; Botu bov 67.5 ± 5.89 Tris 67.5 ± 5.89 ; Botu bov 3.3 ± 0.48 Tris 3.1 ± 0.31) en el proceso pos descongelamiento se encontró una disminución de los parámetros seminales como se relata en muchos estudios ya que el proceso de criopreservación es posible observar la disminución de las características espermáticas reportado por (Watson, 2000; thun et al., 2002; Medeiros, 2002), sin embargo o fue posible determinar diferencias significativas en el comportamiento de las variables evaluadas en este estudio, al comparar el efecto de los medios diluyentes, pero es posible observar diferencias numéricas en la motilidad total, progresiva y el vigor.

En este contexto los medios diluyentes utilizados en este estudio demostraron ser eficientes en el proceso de criopreservación ya que estos preservaron el 50% de células móviles totales y progresiva pos descongelación y al comparar los valores obtenidos en esta investigación son similares a los reportados por Zhang et al. (1999) el cual observo un comportamiento similar de las muestras criopreservadas.

Estudios anteriores donde comparan diferentes medios diluyentes autores como Leew et al. (2000) evaluó la fertilidad del semen bovino criopreservado por dos medios diluyentes diferentes como el tris y el Biociphos Plus (medio diluyente a base de lectina de soya) y encontró que la motilidad fue mayor en el medio que posee como crioprotector yema de huevo tris, afirmando que la yema de huevo específicamente la lipoproteína de baja densidad tiene efectos benéficos en la criopreservación que no pueden ser alcanzados por otros crioprotectores como los que están presentes en el medio diluyente Biociphos Plus (lectina de soya).

También fueron encontrados resultados similares en estudios de Thun et al. (2002) comparando tris yema de huevo con Biociphos Plus, demostrando resultados diferentes a los obtenidos en nuestro estudio debido a que la composición de los medios diluyentes estudiados es diferente de la composición de los medios comparados en nuestro experimento, y a las condiciones experimentales las cuales son completamente controladas,

además los métodos de criopreservación son realizados con máquinas computarizadas y en laboratorios con temperaturas controladas sin tener el efecto de las condiciones medio ambientales adversas como se evidencio en el presente estudio.

Crespilho (2007); De Celeghini et al. (2008) utilizando diluyentes como el botu-bov® a base yema de huevo y el bioxcell observaron que no hubo diferencia significativa para motilidad pos descongelacion en espermatozoides criopreservados con botu-bov y tris yema de huevo fructosa, lo cual concuerda con lo encontrado en el presente estudio.

Otros estudios donde autores como Crespilho et al.(2006) observaron diferencia significativa entre la motilidad total del eyaculado criopreservado con el botu-bov® y el tris(BB= $71,8 \pm 9,7$; TRIS= $67,4 \pm 10,5$) siendo mayor preservada por el diluyente botu-bov® semejantes a los resultados encontrados por Crespilho et al (2010) donde encontró diferencias significativas entre la motilidad total en eyaculados criopreservados con los diluyentes tris, botu-bov® y botu-bov® lectina de soja ($58,52 \pm 13,65$, $61,24 \pm 14,58$ e $31,43 \pm 17,73$), donde se encontró mayor motilidad total en el eyaculado criopreservado con el diluyente botu-bov® lo que no concuerda con los resultados obtenidos en este estudio, debido a que el tipo de protocolo utilizado, curvas de enfriamiento y congelamiento, y además el medio diluyente, y la concentración de las pajillas pueden ejercer influencia directa sobre la viabilidad espermática pos descongelación, las cuales fueron diferentes a las utilizadas en el protocolo de criopreservación de este estudio.

Los mejores índices de viabilidad pos descongelación probablemente se debe a la acción de las lipoproteínas y fosfolípidos presentes en la yema de huevo que se evidencian en los medios botu-bov® y el tris ya que estos protegen las membranas espermáticas a través del aumento de la proporción de colesterol, fosfolípido presente en los espermatozoides reduciendo así la ocurrencia del choque térmico Medeiros et al. (2002) y auxiliando la manutención de la viabilidad celular kulaksiz et al.(2010)

Alberti et al. (2005) encontró una diferencia significativa entre el eyaculado preservado con el diluyente botu-bov® y el TRIS con respecto a la evaluación de la integridad de membrana. Resultados similares fueron reportados por Celeghini et al. (2008) donde observaron una mayor preservación de la membrana plasmática para el eyaculado criopreservado por el diluyente botu-bov® en relación al preservado por el diluyente bioxcell®. Thun et al. (2002) por su parte observo que el diluyente que mejor preservaba la

integridad de la membrana plasmática fue el medio a base de yema de huevo TRIS en relación con el diluyente Biociphos-plus® a base de lectina de soja.

Tabla 8. Valores de morfología posdescongelación

	BOTU BOV	TRIS	VALOR P	SIGNIFICANCIA
Variables	Med ± SD	Med ± SD	P	
E/N	74.6± 14.88	74.2 ±15.50	0.9537	NS
E/N M	25.2±15.15	28.8±15.80	0.9312	NS
RC/N	65.6±13.76	58.8±8.36	0.1984	NS
RC/A	34.4±13.76	41.2±8.36	0.1984	NS
VM/N	65.1±10.97	57.5±16.72	0.2453	NS
VM/A	34.9±10.97	45.2± 16.72	0.2453	NS

González y Pallares (2012)

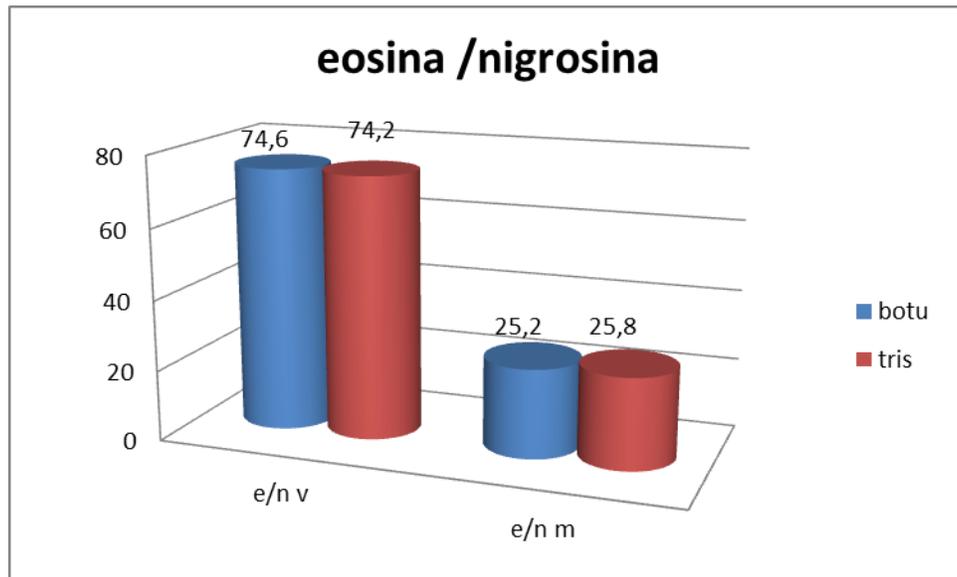
E/N espermatozoides vivos con coloración de vitalidad eosina nigrosina E/N M espermatozoides muertos con coloración de vitalidad eosina nigrosina RC/N espermatozoides con morfología normal coloración rojo Congo RC/A espermatozoides con morfología anormal coloración rojo congo VM/N espermatozoide con morfología normal coloración verde malaquita VM/A espermatozoide con morfología anormal coloración verde malaquita

Con relación a los datos arriba representados en la tabla 8 no se evidencian resultados estadísticamente significativos, lo cual posiblemente se puedan explicar debido a la composición de los medios diluyentes los cuales contienen sustancias como yema de huevo específicamente las lipoproteínas de baja densidad la cual ejerce efectos crioprotector no penetrante el cual estaría protegiendo la integridad de la células en el proceso pos

descongelamiento, además el soporte nutricional brindado por los azúcares como la fructosa actuando de crioprotector no permeable, y como un sustrato energético que provee fuente de energía a las células, los tampones presentes en los medios diluyentes como el Tris y Botu Bov[®] nos ayuda a soportar los cambios abruptos de osmolaridad controlando las diferencias de pH, osmolaridad que experimentan las células para evitar el colapso y la hinchazón en el proceso post descongelamiento, lo cual es posible evidenciar en este estudio a través de la tinción de vitalidad eosina nigrosina, y las tinciones supra vitales verde malaquita y rojo congo.

En cuanto a la evaluación de la vitalidad con eosina nigrosina se encontró un 74.6% de células vivas con botu bov[®] mientras que con el tris se encontró un 74.2% de células vivas en comparación con un 25.2% con botu-bov[®] y un 25.8% con el tris de células muertas. Lo que nos indica que los diluyentes preservan la vitalidad de la célula espermática post-descongelamiento como se muestra en la (gráfica 1).

Gráfica. 1 porcentaje de vitalidad espermática con tinción vital eosina nigrosina



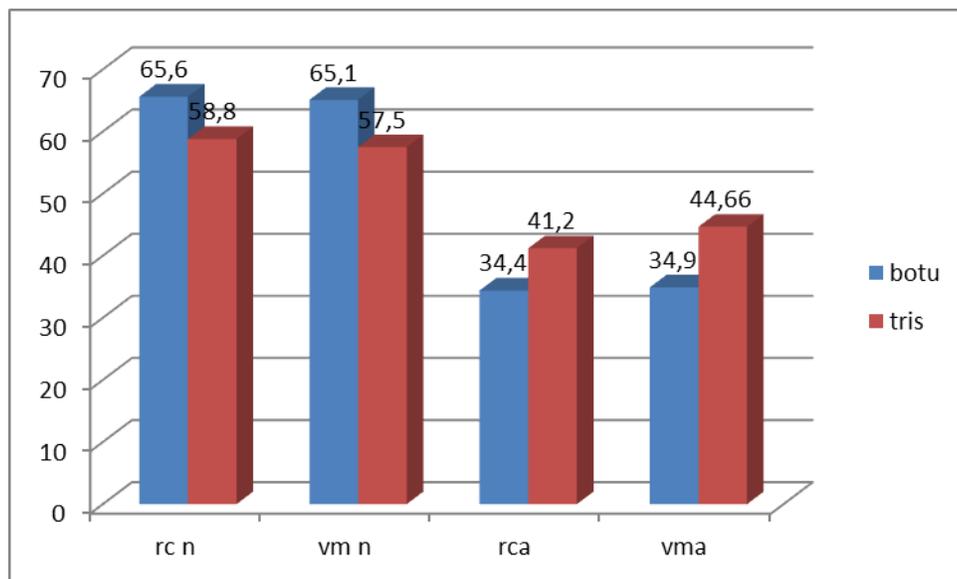
González y Pallares (2012)

e/n v porcentaje de espermatozoides vivos con la tinción eosina /nigrosina

e/n m porcentaje de espermatozoides muertos con la tinción eosina /nigrosina

Al observar la morfología con la tinción de rojo Congo y verde malaquita encontramos que con ambas tinciones el Botu Bov® fue sobresaliente ya que el porcentaje de células normales para ambas coloraciones con Botu Bov® fueron 65,6% Y 65,1% respectivamente, esto posiblemente puede ser evidenciado a los componentes del Botu Bov® los cuales con sus tampones, azúcares, yema de huevo, antibiótico y crioprotector estarían protegiendo a la célula de los efectos adversos del proceso de criopreservación como lo son el estrés osmótico, formación de cristales de hielo y efecto solución.

Grafica 2. porcentaje de morfología espermática normal y anormal con las tinciones Rojo congo/verde malaquita.



González y Pallares (2012)

Rc n porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales con la tinción rojo congo

Vm n porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales con la tinción verde malaquita

Rc a porcentaje de espermatozoides morfológicamente anormales con la tinción rojo congo

Vm a porcentaje de espermatozoides morfológicamente anormales con la tinción verde malaquita

Barnabé et al., (1980) afirma que la motilidad progresiva es un parámetro clásico que nos demuestra la calidad del semen y sus características pos descongelamiento, cuanto mayor sea el índice de motilidad progresiva en la muestra seminal, esta tendrá menor incidencia de presentar acrosomas anormales, reportando una correlación significativa entre el patrón de movimiento y la preservación de la estructura de los espermatozoides

Tabla 9. Valores de Espermatozoides reactivos al HOST pos descongelamiento

	BOTU BOV	TRIS	VALOR P	SIGNIFICANCIA
Variables	Med ± SD	Med ± SD	P	
H0N	38.2 ± 4.75	34.3 ± 5.07	0.0932	NS
H0A	60.2 ± 7.52	64.0 ± 4.96	0.1992	NS
H30N	34.6 ± 9.69	32.9 ± 6.22	0.6465	NS
H30A	66.5 ± 9.44	65.6 ± 4.27	0.7868	NS

González y Pallares (2012)

H0N promedio de células reactivas a la prueba tiempo cero H0A promedio de células no reactivas a la prueba tiempo cero H30N células reactivas a la prueba tiempo treinta H30A células no reactivas a la prueba tiempo treinta

En cuanto a la prueba Hiposmótica, se encontró que el botu -bov® presentó mayor cantidad de células que aumentaron su volumen ante la solución sacarosa (Tabla 9), lo que posiblemente pueda deberse a que el medio diluyente botu Bov® sea capaz de mantener la integridad de membrana plasmática y los mecanismos de intercambio de fluidos, ya que este es capaz de causar un incremento del volumen celular pero pequeño para prevenir la lisis de las membranas espermáticas (Zavos, 1990; Vazquez et al., 1997)., ofreciendo mayor protección ante la lipoperoxidación que se produce en el congelamiento y

descongelamiento de las muestras seminales, en nuestro estudio fue posible utilizar la solución de sacarosa la cual presenta una osmolaridad de 100mOsm/l la cual ha resultado ser la de mayor producción de espermatozoides bovinos hinchados claramente identificables y la que mejor conserva la integridad durante la prueba Host (Correa y Zavos, 1994)

Tabla 10. Test de termo resistencia se representara en la tabla n 4

ITEMS	BOTU BOV	TRIS	VALOR P	SIGNIFICANCIA
variables	Med \pm SD	Med \pm SD	P	
T0MT	35.5 \pm 5.50	32.0 \pm 5.37	0.1673	NS
T0MP	30.5 \pm 5.50	27.0 \pm 5.37	0.1673	NS
T0V	3.4 \pm 0.51	3.1 \pm 0.31	0.1346	NS
T30MT	33.5 \pm 7.47	29.5 \pm 4.97	0.1758	NS
T30MP	26.0 \pm 6.14	24.0 \pm 6.14	0.4762	NS
T30V	NA	NA	NA	NS
T60MT	29.5 \pm 5.98	25.5 \pm 5.50	0.1372	NS
T60MP	23.5 \pm 6.68	20.0 \pm 4.71	0.1929	NS
T60 V	NA	NA	NA	NS
T90MT	26.0 \pm 5.67	21.5 \pm 6.25	0.1094	NS
T90MP	19.5 \pm 5.98	16.5 \pm 6.25	0.2878	NS
T90V	NA	NA	NA	NS
T120MT	22.0 \pm 5.86	17.0 \pm 5.86	0.0729	NS
T120MP	16.5 \pm 5.79	11.5 \pm 5.79	0.0697	NS
T120V	NA	NA	NA	NS
T150MT	16.5 \pm 5.29	11.0 \pm 4.59	0.0232	S
T150MP	10.0 \pm 4.71	6.1 \pm 4.28	0.0686	NS
T150V	2.4 \pm 0.51	2.2 \pm 4.21	0.3553	NS
T180MT	10.0 \pm 3.33	7.5 \pm 2.63	0.0792	NS
T180MP	5.4 \pm 2.71	3.5 \pm 1.58	0.0720	NS
T180V	1.8 \pm 0.42	1.2 \pm 0.42	0.0052	S

González y Pallares (2012)

T0MT medias en tiempo cero motilidad total T0MP medias en tiempo cero motilidad progresiva T0V medias en tiempo cero vigor T30MT medias en tiempo treinta motilidad total T30MP media en tiempo

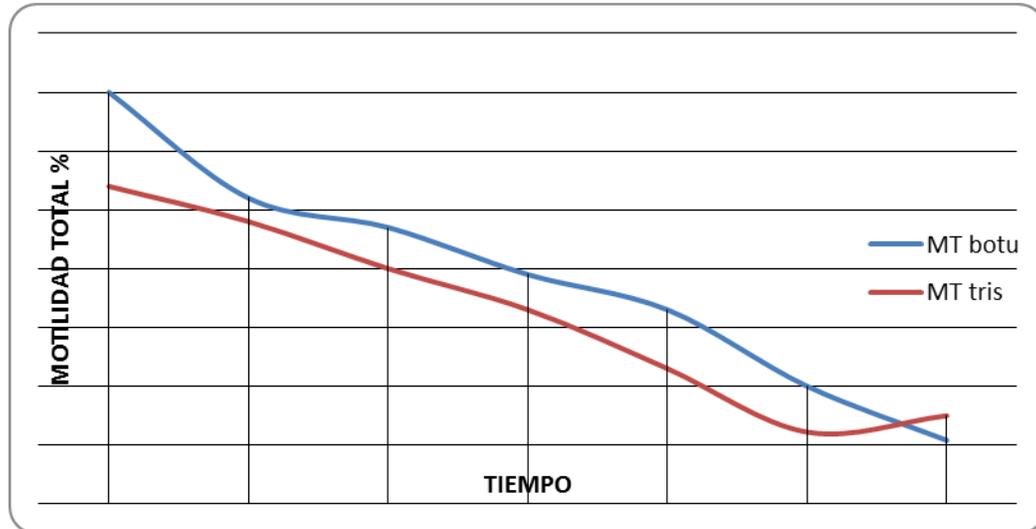
treinta motilidad progresiva T30V medias en tiempo treinta vigor T60MT medias en tiempo sesenta motilidad totalT60MPmedias en tiempo sesenta motilidad progresivaT60 V medias en tiempo sesenta vigorT90MT medias en tiempo noventa motilidad totalT90MPmedias en tiempo noventa motilidad progresivaT90V medias en tiempo noventa vigorT120MT medias en tiempo ciento veinte motilidad total T120MPmedias en tiempo ciento veinte motilidad progresivaT120V medias en tiempo ciento veinte vigorT150MT medias en tiempo ciento cincuenta motilidad total T150MPmedias en tiempo ciento cincuentamotilidad progresiva T150V medias en tiempo ciento cincuenta vigor T180MT medias en tiempo ciento ochenta motilidad total T180MPmedias en tiempo ciento ochenta motilidad progresiva T180V medias en tiempo ciento ochenta vigor

Estudios anteriores han comparado el efecto de estos dos diluyentes sobre la célula espermática bovina con relación la manutención de sus características espermáticas pos descongelamiento en relación al tiempo Test de termo resistencia (Crespilho et. al, 2006; Braga , Franco , Rodrigues.et al, 2006; Freitas, JA Dell'Aqua. et, al, 2008; Leite Vale Filho, 2010). Se ha demostrado qué el diluyente Botu-Bov® presenta una mayor viabilidad espermática post descongelación ante Tris-citrato-yema de huevo (Crespilho, papa, alberti, filho, martins, novaes, dell'aqua 2006) lo que no concuerda con los resultados obtenidos en este estudio. Pero según Leite Vale Filho (2010) demostró que en general, la combinación de TRIS y 4h de equilibrio fue el método de criopreservación de semen más deseable. Crespilho et. al, (2006) indica en otros resultados de las pruebas con Tris-citrato-yema de huevo (TRIS) y Botu-Bov®, no difieren en cuanto a la motilidad total e integridad de la membrana plasmática.

Sin embargo, Botu-Bov® fue más eficaz en la preservación de la linealidad de espermatozoides móviles después de la descongelación en contraste a lo observado en este trabajo, lo cual nos permite mostrar que el tris tuvo un mejor comportamiento en la prueba de termo resistencia ya que posiblemente el medio diluyente tris en su composición posee tris un excelente tampón que ayuda a preservar la estabilidad de las moléculas y evitar los cambios abruptos de ph, al igual que la fructosa actuando como azúcar para proveer la energía y actuar como crio protector, además las lipoproteínas presentes en la yema de huevo sean capaces de preservar las características espermáticas durante mayores periodos de tiempo como lo observado en el análisis estadístico el cual muestra significancia.

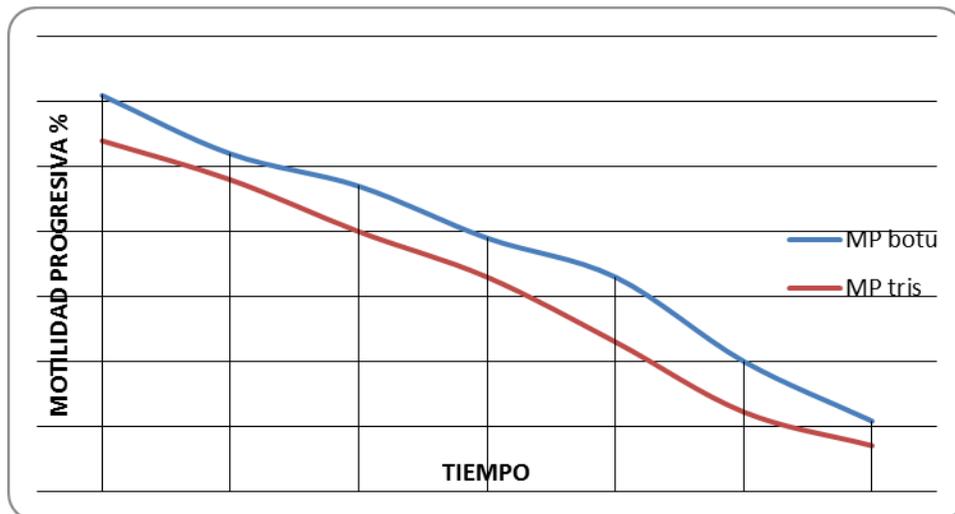
Los resultados del análisis de la prueba de termo resistencia se observan descritos arriba en la tabla 10 a continuación en las figuras 1, 2, y 3 se observan como ocurre la disminución gradual de las características espermáticas (motilidad total, motilidad progresiva y el vigor.

Grafica 3. Motilidad total en la prueba de termorresistencia



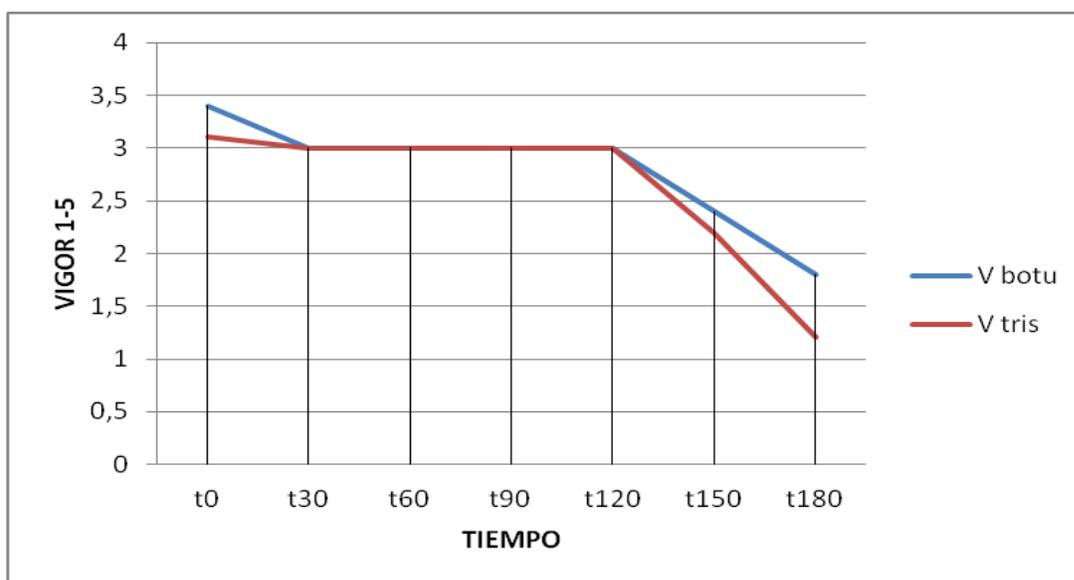
González y Pallares (2012)

Grafica 4. Motilidad progresiva en la prueba de termorresistencia.



González y Pallares (2012)

Grafica 5. vigor en la prueba de termorresistencia



González y Pallares (2012)

5. Conclusiones y Recomendaciones

La utilización de medios que contengan yema de huevo como se evidencian en los medios botu-bov® y el Tris Citrato Yema de Huevo los cuales fueron utilizado en este estudio nos lleva a concluir que se obtienen mejores índices de viabilidad pos descongelación en semen de toros brahmán en la región de Antioquia. Esto se debe a la acción de las lipoproteínas y fosfolípidos presentes en la yema de huevo el cual tiene como función proteger las membranas espermáticas atreves del aumento de la proporción de colesterol y fosfolípidos presentes en los espermatozoides, reduciendo así la ocurrencia del choque térmico y apoyando la manutención de la viabilidad celular.

Es importante tener en cuenta el contenido de los diluyentes ya que estos van a ser en realidad los encargados de la protección y la nutrición de las células espermáticas que se sometán al proceso de criopreservación.

Es recomendable cuando se llevan a cabo procesos de criopreservación de células espermáticas tener en cuenta el uso de coloración como eosina/nigrosina, rojo congó y verde malaquita para poder confirmar la veracidad y la calidad del semen post-descongelamiento ya que estas coloraciones también emiten resultados favorables en cuanto a la calidad de los

diluyentes comparados observando la vitalidad y la morfología de las células espermáticas criopreservadas.

El uso de sistemas computarizados que faciliten el análisis del semen bovino dejando a un lado la subjetividad que se ve relacionado con el error humano, sería de mucha ayuda y precisión en investigaciones futuras.

Cuando se usa un diluyente cuyo contenido sea a base de yema de huevo se espera que al descongelar las células criopreservadas se mantenga la viabilidad espermática en un 50% siempre y cuando se sigan las respectivas curvas de enfriamiento para cada diluyente, ya que esta curva afecta a los espermatozoides en el momento de la congelación.

Las células espermáticas de toros brahmán en la región de Antioquia soportan y se comportan muy bien cuando se someten al proceso de criopreservación utilizando medios diluyentes a base de yema de huevo como el botu-bov® y el tris citrato yema de huevo comparados en este estudio.

LISTA DE REFERENCIAS

Aires VA, Hinsch KD, Mueller-Schloesser F, Bogner K, Mueller Schloesser S, Hinsch E. (2003) In vitro and in vivo comparison of egg-yolk based and soya bean lecithin based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology* 60:269-79

Alberti, K (2005) effect of botu-bov and tris extenders on semen freezability in bulls *bos Taurus* & *bos Taurus indicus* in reunao annual sociedade brasileira de tecnologia de embrioes p 326

Amann, R.P.; Pickett, B.W. (1987) - Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Science* 7: 145-176

Amirat L, Tainturier D, Jeanneau L, Thorin C, Gérard O, Courtens JL, Anton M. (2004) Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl®, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology* ,61,895-907

Amirat, L.; Anton, M.; Tainturier, D.; Chatagnon, G.; Battut, I.;Courtens, J.L.(2005) Modifications of bull spermatozoa induced by three extenders:Biociphos, low density lipoprotein and Triladyl, before, during and after freezing and thawing. *Reproduction*, ,129, 535-543

Amorim, J., (2008). Avaliação “in vitro” e “in vivo” do sêmen eqüino diluído em água de coco em pó (ACP-105) resfriado a 5°C. Dissertação de mestrado em ciências agrárias. Faculdade de agronomia e medicina veterinária. Universidade de Brasília.

Arruda, R. P., Celeghini, E. C. C., Andrade, A. F. C.et al. (2004)Importância da qualidade do sêmen em programasde IATF e TEFT. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, Londrina. Anais Palestra... Londrina: Paraná .166-179

Barnabe V.H Barnaber R.C..VisintinJ.A (1980)estudo comparativo entre as provas rápida e lenta de termorresistencia para avalicao de semen congelado revista brasileira de reproducao animal ,4,6-12

Baracaldo¹, A.D. Barth² and W. Bertrand (2007) Pasos para el congelamiento de semen bovino: desde la colección del semen hasta el almacenamiento en el tanque de nitrógeno líquido Minitube Canada, Ingersoll, ON Canada. ²Department of Large Animal Clinical Sciences, Western College of Veterinary Medicine, University of Saskatchewan, Saskatoon, SK, Canada.

Barth, A.D., Oko, R.J.,(1989) Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa. Iowa State University Press

Barth AD. (1997) Bull Breeding Soundness Evaluation, 3rd Printing. Saskatoon, SK: The Western Canadian Association of Bovine Practitioners.; 24-26

BARTH, Albert, BO, Gabriel, TRIBULO, Humberto (2000).Curso de evaluación de toros y control de la calidad seminal: 16 al 19 de Agosto del 2000. 1 ed. Córdoba (Argentina). Universidad católica de Córdoba, 55, 3-10 .

Bearden,H.J (1982) reproducción animal aplicada 135-181 Mexico D.F editorial manual moderno

Bilodeau, J. F., Blanchette, S., Cormier, N.(2002).Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. Theriogenology, v. 57, n.3, 1105-1122

Borges, J.C.(2003) Utilização de antioxidantes associados ou não a emulsificante na criopreservação de sêmen bovino. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa.

Braga, R. V. Franco, L. F. Rodrigues, G. Galeli, K. M. Oliveira, F. A. C. Reis, M. F. A. Nishikawa and E. P. Moura(2006) Comparison of Andromed®, Bioxcell® and Botu-Bov® extender for cryopreservation of bull sexed semen Reproduction, Fertility and Development (19)(1):172. Proceedings of the Annual Conference of The International Embryo Transfer (IETS). Kyoto, Japan. 6-10 January 2007.

Cabrera, P., Pantoj, C. (2008). Influencia de los dilutores Tris y Ovine Freezing sobre la integridad de la membrana plasmática durante la congelación de semen de ovinos en pajillas de 0,5 mL. Revista de Investigaciones Veterinarias de Perú; 19(2) 152-159.

Catena, M. y J. Cabodevila (1999.)Taurus, 1(3):18-31.(1) Facultad. De Ciencias Veterinarias. Univ. Nac. del Centro de la Prov. de Bs. As. Campus Universitario, (7000) Tandil.Trabajo presentado en el Simposio Internacional de Reproducción Bovina (UNCPBA), Tandil, 6 de agosto de 1999

Cardozo C J(2000) evaluacion reproductiva y de fertilidad de toros, y su utilización para aumentar la eficiencia reproductiva en sistemas de trópico bajo regional 1 CI tibaitata

Carvalho F.C e pinheiro F.J (2002) avaliação Andrológica no touro:pp.29-40

Celeghini ,E.C.C (2005) efeitos de criopreservação do semen bovino sobre as membranas plasmática,acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes .tese doutorado em medicina veterinária e reprodução animal –faculdade de medicina veterinária e zootecnia da universidade de são paulo 186.

Cloud J. G., Miller W. H., Levanduski M. J.(1990)Cryopreservation of sperm as a means to store salmonid germ plasm and to transfer genes from wild to hatchery populations. The Progressive Fish Culturist, 52,51-53

Crespilho AM, Papa FO, Alberti K, Filho ERS, Martin Junior A, Novaes JLC et al.(2006) Eficiência comparativa entre dois diluidores para a congelação de sêmen bovino sobre os padrões de motilidade e integridade de membrana plasmática. Ars Vet 22(3)229-35

Correa, Zavos(1994) the hypoosmotic swelling test its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane theriogenology ,42, 361-370

Correa, J.R., Zavos, P.M. (1996). Preparation and recovery of frozen-thawed bovine spermatozoa via various sperm selection techniques employed in assisted reproductive technologies. Theriogenology,7, 1225–1232.

Curry, M.R. (2000) - Cryopreservation of semen from domestic livestock. Reviews of Reproduction ,5, 46-52.

Chacur M, Sanchez H, Ozanam F, et al (2012) efecto de disolventes sobre la viabilidad de semen de bovino congelado; vet e Zootec, mar; 19(1):346-355

Chaveiro A, et al (2004) Determination of bull sperm membrane permeability to water and cryoprotectants using a concentration-dependent self quenching fluorophore; cryobiology, v.,48, 72-80.

Chaveiro A, Machado L, Frijters A, Engel B, WoeldersH (2006) Improvement of parameters of freezing medium and freezing protocol for bull sperm using two osmotic supports; theriogenology, 65,1875-90

Daw,A, Farrant, J and Morris, GJ(1973) membrane leakage of solutes after thermal shock or freezing .cryobiology ,10,126-133

Derivaux.J (1982) reproducción de los animales domésticos, 2 edición Zaragoza; España; editorial acribia p 167-193.

Farstad, W (1996) Semen cryopreservation in dogs and foxes; Anim Reprod Sci, 42,251-260

Franks, F, et al (1983) ice nucleation and freezing in undercooled cells cryobiology, 20,298-309

Freitas, C, P, Dell' Aqua-Junior, J, A, Papa, F, O, Alvarenga, M, A, Crespilho, A, M; and Landim-Alvarenga, F, C (2008) the effect of tris and botu-bov® for bovine sexed sperm cryopreservation; Reproduction, Fertility and Development 20, p 211–212.

Gadea(2003)spanish journal of agricultural research 1(2) 17-27.

Guthrie HD, Liu J, Crister JK, Osmotic tolerance limits and effects os cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa; Biol Reprod ,67,1811-6

Gallina, C; Valencia, J, (2006). Reproducción de Animales Domésticos, segunda edición; editorial limusa S.A de CV. México; 215-223.

Guimaraes J D,Moraes E efeito de fontes de oleo e nivels de suplementacao de vitamina e na racao sobre as características físicas e morfológicas do semen(2010)bras.med.vet zootec vol62(3)521-527

Hammerstedt R, Graham J, Nolan J; (1990), cryopreservation of mammalian sperm. What we ask them to survive, journal of andrology,11,73-88.

Hochi S, Semple E, Leibo S, p,(1996) effect of cooling and warming rates during cryopreservation on survival of in vitro-produced bovine embryos, theriogenology, ,46, 837-47.

Hofmo, p.o; berg, k.a (1989) electron microscopical studies of membrane injuries in blue fox spermatozoa subjected to the process of freezing and thawing, cryobiology 26: p 124-131.

Holt, w, v, (2000a) basic aspects of frozen storage semen, animal reproduction science, v; 62, n.1/3, p 2-22.

Holt, w, v (2000b) fundamental aspects of sperm cryobiology; the importance of species and individual differences, *theriogenology*, v, 43, p, 47-58.

Jasko DJ, Moran DM, Farlin y Squires effect of seminal plasma dilution or removal on spermatozoa motion characteristics of cooled stallion semen *theriogenology*(1994) 35:1059-1068

Kenney RM, Bergman RV, Cooper WL(1975) minimal contamination techniques for breeding mares. technique and preliminary finding in: 21st annual convention of the American association of equine practitioners USA 327-336

Kommisrud E, Graffer T, Steine T (1996) comparison of two processing systems for bull semen with regard to post thaw motility and nonreturn rates, *theriogenology*, v, 45, n.8, p 1515-1521.

Landsverk K,(2000), Packaging and distribution—their impact on fertility in: Johnston L.A and Guthrie HD (Editors) IV International conference on boar semen preservation, Maryland, USA, 137-139.

Leeuw FE, De Leeuw AM, Den Daas JHG, Colenbrander B, Verkleij AJ (1990) Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*, 30,32-44.

Leite T.G; Vale filho V.R; Arruda R.P; Andrade, A.F.C, Emerick, L L Zaffalon, F.G; Martins, J.A.M.; Andrade, V.J (2010) Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry, *Animal Reproduction Science*, 120, 31–38.

Leite A, Scherder, Almeida, Zuccari, Silva(2011), criopreservação do semen bovino unopar *cienc biol saude* 13; 279-286

Liu Z, Foote, R.H (1998) Bull Sperm motility and membrane integrity in media varying in osmolality, *J. dairy Sci*, 81, 1868-73.

Machado, M. (2008). Extração das lipoproteínas de baixa densidade da gema do ovo de *Gallus domesticus* e sua aplicação na criopreservação do sêmen canino. Tese apresentada para obtenção do grau de Doutor em ciência animal. Faculdade medicina veterinária, UFMG, Brasil

Mantegazza P (1866) Sullo sperma umano .rediconti dell istitoto lombardo di scienze e lettere, 3:183-196.

Manjunath P, Nauc V, Bergeron A, Ménard M, (2002) Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. Biol Reprod ;67:1250-8

Mazur, P. (1970) - Cryobiology: the freezing of biological systems. Science ,168, 939-949.

Mazur, P.(1984) Freezing of living cells: mechanisms and implications. Am. J. Physiol. 247, 125–142

Mazur P, Katkov I, Katkova N, Critser JK(2000). The enhancement of the ability of mouse sperm to survive freezing and thawing by the use of high concentrations of glycerol and the presence of an *Escherichia coli*

Medeiros CMO, Forell F, Oliveira ATD, Rodriguez JL(2002).Current status of sperm cryopreservation: why isn't better Theriogenology ,57,327-34.

Medina-Robles V. M., Velasco-Santamaría Y. M., Cruz- Casallas P. E. (2006). Los bancos de recursos genéticos y su papel en la conservación de la biodiversidad. Revista Orinoquía. ,10, 71-77

Nagy S, Hallap T, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H(2004).Changes in plasma membrane and acrosome integrity of frozen-thawed bovine spermatozoa during a 4 h incubation as measured by multicolor flow cytometry. Anim Reprod Sci 80,225-35.

Oka,H.A , Prieto (2001) manual de inseminación artificial bovina .asuncion paraguay, editorial fondo ganadero

Palma (2001)Biotecnología de la reproducción argentina editorial paraíso 1ra edición

Palacios CJ.(2005) Técnicas para la evaluación de la capacidad fecundante de los espermatozoides. Memorias posgrado de reproducción bovina CGR Colombia

Parks, J.E. & graham, J.K.(1992) Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. Therio ,38,209-222.

Peña-Martínez A. I(2004). Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. Anim Reprod Sci.82: 209-24

Polge, C.; Smith, A.U.; Parkes, A.S. (1949) - Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. Nature 164: 666.

Purdy PH, Graham JK. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. Cryobiology (2004);48:36-45

Salisbury, G.W., VanDemark, N.L., Lodge, J.R., 1978. Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle. Principles and techniques of freezing spermatozoa.(2ed). Freeman and Company. San Francisco. pp. 494-554.

SILVA, R.P.M.; BUSTAMANTE FILHO, C.; TREIN, C.(2005) Relação entre a motilidade espermática e testes de termo-resistência no sêmen bovino congelado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16., 2005, Goiânia. Resumos... Goiânia.

Shannon P, Vishnawath R.(1995) The effect of optimal and suboptimal concentrations of sperm on the fertility of fresh and frozen bovine semen and a theoretical model to explain the fertility differences. Anim Reprod Sci ,30,1-10.

Sorensen ,M.A.(1984)reproducción animal.Ed .McGraw-hill 117-192

Squires EL, Pickett BW, Graham JK, Vanderwall DK, McCuePM, Bruemmer JE.(1999) Cooled and frozen stallion semen. Colorado: Colorado State University. Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory.

Stradaioli G, Noro T, Sylla L, Monaci M. (2007) Decrease in glutathione (GSM) content in bovine sperm after cryopreservation: comparison between two extenders. *Theriogenology* ,67,1249-55

Tardif, A. L., Farrel, P. B., Trouern-trend, V. et al(1997). Computer-assisted sperm analysis for assessing initial semen quality and changes during storage at 5°C. *Journal of Dairy Science*, v.80, (8)1606-12.

Thun R, Hurtado M, Janett F.(2002) Comparison of Biociphos-Plus® and TRIS egg-yolk extender for cryopreservation of bull semen. *Theriogenology* ,57,1087-94

Van Leeuwenhoek 1677 observations de anthonu lewenhoek , de natis e semine genital animaculus. *Philosophical transactions of the royal society of London* 12,1040 -1043

van Wagendonk-de Leeuw AM, Haring RM, Kaal-Lansbergen LM, den Daas JH.(2000) *Theriogenology*. Jul 1;54(1):57-67.

Vasquez(1997) hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analysing the sperm membrane *theriogenology* 47:913-922

Velasco-Santamaría Y. M., Medina-Robles V. M, Cruz-Casallas P. E. 2006. Cryopreservation of yamú (*Brycon amazonicus*) sperm for large scale fertilization. *Aquaculture*. 256: 264-71.

Vidament, M.; Ecot, P.; Noue, P.; Bourgeois, C.; Magistrini, M.; Palmer, E. (2000) Centrifugation and addition of glycerol at 22°C instead of 4°C improve post-thaw motility and fertility of stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v.54, p. 907-919.

Vishwanath R, Shannon P.(2000) Storage of bovine semen in liquid and frozen state. Anim Reprod Sci 2000;62,23-53

Watson, P.F. (1979) - The preservation of semen in mammals. In: Oxford Reviews of Reproductive Biology, Finn, C.A. (ed), Oxford University Press, Oxford, 283-350.

Watson, P.F. (1995) - Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. Reprod Fert Dev 871-891.

Watson,P.F.(2000) the cause of reduced fertility with cryopreserved semen.animal reproduction science,60,481-492.

Woelders H, Matthijs A ,Engel B.1997 effects of trehalose and sucrose,osmolity of the freezing medium and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing. Cryobiology ,35,93-105

Zaffalon, F. G. (2009). Alterações semelhantes à capacitação no sêmen bovino após a criopreservação utilizando diluidores a base de gema de ovo ou lecitina de soja. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. Recuperado em 2012

Zhang B R(1999) prediction of bull fertility by combined in vitro assesments of frozen-thawed semen from young dairy bulls entering an IA programe .international journal of andrology 22,253-260

Zavos P (1990)hypoosmotic swelling test(hos)functional integrity of sperm membrane journals of as reproduction technology andrology 2,215-216