



## RESUMEN

**TÍTULO: “EFICACIA DE DOS DILUYENTES: TRIS + LECITINA DE SOYA (ANDROMED®) Y TRIS + YEMA DE HUEVO (TRILADYL ®), EN LA CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN DE TORO DE LA RAZA JERSEY EN CUENCA – ECUADOR”**

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de dos diluyentes: TRIS + Lecitina de soya (AndroMed®) y TRIS + yema de huevo (Triladyl ®), sobre tres tiempos de equilibrio a 4° C (2, 4 y 7 horas) en refrigeración antes de la congelación y evaluar los porcentajes de motilidad individual progresiva, vitalidad espermática y anomalías post descongelación. Se utilizó el semen de un toro de raza Jersey, colectado en una vagina artificial, diluido y envasado en pajuelas de 0,25 cc a concentración de 20 x 10<sup>6</sup> espermatozoides, los cuales fueron congelados con vapores de nitrógeno líquido bajando la temperatura en 15 minutos hasta -140° C y luego rápidamente hasta -196° C. Se evaluó motilidad, viabilidad y anomalías espermáticas. Los datos fueron analizados por medio del diseño completamente al azar (DCA), con las pruebas de significación de Duncan con el 95% de confiabilidad. La motilidad individual progresiva post descongelado con el diluyente AndroMed® (41,81 %), y Triladyl® (40,65%) se comportaron en igual forma (P<0,05), pero se encontraron diferencias significativas en los tiempos de equilibrio, siendo el porcentaje más alto de 2 horas (43,53%), comparado con las 5 horas (41,25%) y 7 horas (38,91%).



En vitalidad espermática se obtuvo porcentajes más altos con Triladyl® (51,73%), que con AndroMed® (48,96%) y el mejor tiempo de equilibrio fue el de dos horas (54,06%). Con respecto a anomalías espermáticas se obtuvo mejores resultados con el diluyente Triladyl® (10,19%), que con AndroMed® (10,48) y el mejor tiempo de equilibrio fue de dos horas (9,69%). En conclusión los dos diluyentes utilizados no mostraron diferencias significativas, salvo la prueba de vitalidad espermática que mostró mejores resultados con el Triladyl y en los tiempos de equilibrios se obtuvo mejores resultados a las 2 horas, en el proceso de descongelación.

Palabras Claves: Diluyentes, semen congelado, toro.

## INDICE

<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>6</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>11</b>
<b>1.1. Descripción del problema .....</b>	<b>11</b>
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>16</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>16</b>
<b>2.1. Membrana espermática.....</b>	<b>16</b>
<b>2.2. Criopreservación del espermatozoide .....</b>	<b>17</b>



---

<b>2.3. Alteraciones morfo-funcionales de los espermatozoides derivados de la criopreservación. ....</b>	<b>18</b>
<b>2.4. Diluyentes .....</b>	<b>20</b>
<b>2.5. Composición de los diluyentes.....</b>	<b>21</b>
<b>2.6. Agentes crioprotectores .....</b>	<b>22</b>
<b>2.7. Diluyentes comerciales para conservación de espermatozoides. ....</b>	<b>25</b>
2.7.1. AndroMed® (Minitube, Tiefenbach, Germany).....	25
2.7.2. Triladyl® (Minitube, Tiefencach, Germany).....	26
<b>2.8. Pruebas de viabilidad espermática.....</b>	<b>27</b>
2.8.1. Motilidad.....	27
2.8.2. Anormalidades espermáticas .....	27
2.8.3. Porcentaje de vivos.....	28
2.8.4. Prueba de integridad de la membrana plasmática. ....	28
<b>2.9. Efecto de los diluyentes en semen congelado y fertilidad. ....</b>	<b>29</b>
<b>CAPÍTULO III.....</b>	<b>31</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
<b>3.1. Materiales.....</b>	<b>31</b>
3.1.1. Recursos biológicos.....	31
3.1.2. Materiales de campo .....	31
3.1.3. Equipos e instrumentos de laboratorio .....	32
3.1.4. Reactivos.....	32
<b>3.2. Caracterización de la unidad de análisis .....</b>	<b>32</b>
<b>3.3. Lugar de la investigación.....</b>	<b>33</b>
<b>3.4. Reproductor .....</b>	<b>34</b>
<b>3.5. Metodología de trabajo.....</b>	<b>35</b>



---

3.5.1.	Preparación del toro donante. ....	35
3.5.2.	Excitación pre-coital.....	35
3.5.3.	Colección del semen .....	36
3.5.4.	Evaluación de semen. ....	37
3.5.4.1.	Volumen .....	37
3.5.4.2.	Concentración espermática .....	38
3.5.4.3.	Motilidad espermática progresiva.....	38
3.5.4.4.	Vitalidad espermática. ....	39
3.5.5.	Procesamiento del semen. ....	40
3.5.5.1.	Determinación del número de espermatozoides viables en el eyaculado y número de dosis inseminantes.....	40
3.5.5.2.	Determinación de la cantidad de diluyente necesario .....	41
3.5.5.3.	Preparación del diluyente .....	41
3.5.6.	Dilución de semen. ....	43
3.5.7.	Preparación de pajuelas y rejillas. ....	44
3.5.8.	Envasado del semen. ....	45
3.5.9.	Crioconservación del semen.....	45
3.5.10.	Descongelamiento .....	45
3.5.11.	Evaluación del semen descongelado .....	46
3.5.11.1.	Motilidad Individual progresiva espermática.....	46
3.5.11.2.	Vitalidad espermática.....	46
<b>3.6.</b>	<b>Diseño estadístico .....</b>	<b>47</b>
<b>CAPÍTULO IV .....</b>	<b>.....</b>	<b>49</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>.....</b>	<b>49</b>
<b>4.1. Motilidad espermática individual progresiva. ....</b>	<b>.....</b>	<b>49</b>
<b>4.2. Vitalidad espermática.....</b>	<b>.....</b>	<b>55</b>
<b>4.3. Anomalías espermáticas .....</b>	<b>.....</b>	<b>60</b>
<b>CAPÍTULO V .....</b>	<b>.....</b>	<b>65</b>



5. DISCUSIÓN .....	65
CAPÍTULO VI .....	69
6. CONCLUSIONES .....	69
CAPÍTULO VII .....	70
7. RECOMENDACIONES .....	70
CAPÍTULO VIII .....	71
8. BIBLIOGRAFÍA .....	71
ANEXOS.....	78



UNIVERSIDAD DE CUENCA  
Fundada en 1867

Yo, **Diego Andrés Galarza Lucero**, autor de la tesis "Eficacia de dos diluyentes: TRIS + Lecitina de soya (AndroMed®) y Tris + yema de huevo (Triladyl®), en la crioconservación de semen de toro de la raza Jersey en Cuenca – Ecuador", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 13 de marzo del 2013



Andrés Galarza Lucero  
0103912846

Cuenca Patrimonio Cultural de la Humanidad. Resolución de la UNESCO del 1 de diciembre de 1999

Av. 12 de Abril, Ciudadela Universitaria, Teléfono: 405 1000, Ext.: 1311, 1312, 1316

e-mail: [c@jv@ucuenca.edu.ec](mailto:c@jv@ucuenca.edu.ec) casilla No. 1103

Cuenca - Ecuador



UNIVERSIDAD DE CUENCA  
Fundada en 1867

Yo, **Diego Andrés Galarza Lucero**, autor de la tesis "**Eficacia de dos diluyentes: TRIS + Lecitina de soya (AndroMed®) y Tris + yema de huevo (Triladyl®)**", en la **crioconservación de semen de toro de la raza Jersey en Cuenca – Ecuador**", reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de **MAGÍSTER EN REPRODUCCIÓN ANIMAL**. El uso que la Universidad de Cuenca hiciera de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autor.

Cuenca, **11** de marzo del 2013



Andrés Galarza Lucero  
0103912846

Cuenca Patrimonio Cultural de la Humanidad. Resolución de la UNESCO del 1 de diciembre de 1999

Av. 12 de Abril, Ciudadela Universitaria, Teléfono: 095 1000, Ext: 1211, 1212, 1216

e-mail: cdjbv@ucuenca.edu.ec casilla No. 1103

Cuenca - Ecuador



## CERTIFICACIÓN

El Tribunal de tesis de grado **CERTIFICA:** Que fue aprobado el presente trabajo de investigación titulado “***Eficacia de dos diluyentes: TRIS + Lecitina de soya (AndroMed®) y Tris + yema de huevo (Triladyl®), en la crioconservación de semen de toro de la raza Jersey en Cuenca – Ecuador***”, realizado por el Sr. Diego Andrés Galarza Lucero. Médico Veterinario Zootecnista.

Cuenca, 11 de marzo de 2013

---

**Dr. Guillermo Serpa Mg. Sc.**

**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**

---

**Dr. Galo Guzmán. Mg. Sc.**

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**



**UNIVERSIDAD DE CUENCA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**“MAESTRÍA EN REPRODUCCIÓN ANIMAL”**

***“Eficacia de dos diluyentes: TRIS + Lecitina de soya (AndroMed®) y Tris + yema de huevo (Triladyl®), en la crioconservación de semen de toro de la raza Jersey en Cuenca – Ecuador”***

**Tesis previo a la obtención del título de  
MAGÍSTER EN REPRODUCCIÓN ANIMAL**

**El Autor:**

**MVZ Diego Andrés Galarza Lucero.**

**Director:**

**Dr. Luis Eduardo Ayala Guanga PhD.**

**Cuenca – Ecuador**



## DEDICATORIA

A mi esposa Paula Carolina Lituma Vintimilla y a mi hijo Joaquín Andrés Galarza Lituma, por ser siempre un apoyo constante en mi vida personal y profesional; que les sirva de experiencia en su vida futura en plantearse las metas.

**Andrés**



## CAPÍTULO I

### 1. INTRODUCCIÓN

#### 1.1. Descripción del Problema

La Inseminación Artificial (IA) es un procedimiento biotecnológico reproductivo, que implica la maximización de la capacidad reproductiva de los toros como reproductores élitos y han demostrado ampliamente un gran aporte al mejoramiento genético del ganado bovino productor de leche en diferentes partes del mundo. Sin embargo uno de los factores que influyen en esta técnica es la calidad de semen, relacionado con la capacidad reproductiva del macho, manejo del semen y métodos de criopreservación (Lozano, 2009).

Los espermatozoides sometidos a criopreservación están sujetos a una serie de alteraciones morfológicas como dilatación y ruptura de la membrana plasmática. Degeneración acrosomal y lesiones en las mitocondrias. El éxito en la criopreservación depende del mantenimiento del potencial fertilizante de los espermatozoides, que deben ofrecer la integridad y funcionalidad de las diferentes estructuras celulares (Hummersted, Graham, & Nolan, 1990).



La supervivencia y vitalidad espermática post-congelación en la crioconservación, son dados por los protocolos de procesamiento del semen de toro y la dilución en los diferentes diluyentes comerciales. La Motilidad Progresiva (MP) y Vitalidad Espermática (VE) del semen descongelado se ve afectada por los tiempos de equilibrio recomendado (refrigerado) en los diferentes protocolos de congelación, en el procesamiento del semen de toro, para su crioconservación.

Además la motilidad espermática y vitalidad post-congelación se puede ver afectada con el uso de los diferentes diluyentes de origen sintético (a base de lecitina de soya) y diluyentes orgánicos (yema de huevo), por varios factores como son él ser propensos a infecciones (origen animal); por la manipulación a nivel del laboratorio; por la exactitud al momento de aplicar la cantidad recomendada (20, 25 ó 30%) según sea el protocolo; y la conservación del diluyente en refrigeración a temperaturas estables (ascensos o descensos).

Diluyentes a base de yema de huevo han sido utilizados y aún se usan para la crioconservación de semen de animales de granja (Fukui, Kohno, Togari, Hiwasa, & Okabe, 2008), pero son difíciles de estandarizar, por argumentos de su composición y constante riesgo de contaminación por bacterias y micoplasmas (Van Wagtendonk-de Leeuw, Haring, Kaal-Lansbergen, & JH, 2000) (Aires, Hinsch, Mueller-Schloesser, & Bogner, 2003).



La yema de huevo contiene hormonas y sus precursores, que al no tener una estandarización puede causar disminución de la capacidad de fertilización (Herold FC, 2006).

Diluyentes libres de elementos de origen animal que contiene lecitina de soya, se han desarrollado y pueden sustituir a la yema de huevo (Aires, Hinsch, Mueller-Schloesser, & Bogner, 2003). Tienen un efecto crioprotector por su baja viscosidad, menos residuos y altos contenidos de fosfolípidos al igual que la yema de huevo (Fukui, Kohno, Togari, Hiwasa, & Okabe, 2008) que mejoraría la viabilidad espermática post descongelado y en consecuencia la fertilidad en vacas.

La IA<sup>1</sup> es una herramienta de gran utilidad en la ganadería mundial; y un aspecto relevante es el utilizar dosis de semen bien elaboradas, trabajadas con un buen diluyente y con pasos adecuados en su preparación. El conocimiento de la fertilidad de los toros, representa un objetivo importante para la producción de semen bovino que se logra mediante un buen análisis de semen entre otras valoraciones. En este sentido, diseñar un análisis seminal ideal para bovino, es una meta en el área de reproducción para valorar y predecir la fertilidad de un eyaculado.

---

<sup>1</sup> Inseminación Artificial



Un eyaculado fecundante debe cumplir con estándares de calidad de parámetros seminales como: motilidad progresiva, morfología normal, metabolismo energético activo, integridad estructural y funcionalidad de la membrana, capacidad de penetración y transferencia óptima de material genético.

Los diluyentes comerciales con adición de proteína animal, como es la yema de huevo, han tenido éxitos en trabajos investigativos, pero el sustituir la yema de huevo con lecitina de soya, puede representar ventajas en Motilidad Progresiva y Vitalidad espermática, teniendo en cuenta que las inversiones y precios en los dos diluyentes comerciales que se utilizarán son muy similares, pero el AndroMed (diluyente a base de lecitina de soya), posee una ventaja al Triladyl (yema de huevo) por su fácil preparación y procesamiento de semen.

Esta investigación en reproducción bovina, permite que los profesionales ganaderos y personas que estén dentro del campo reproductivo, utilicen de manera confiable el diluyente AndroMed y/o Triladyl con el tiempo de equilibrio más eficaz para congelar semen de toro con pajillas de 0,25 ml.

Para el estudio investigativo me he planteado los siguientes objetivos:



Determinar el tiempo óptimo de equilibrio que permita maximizar la eficiencia en los protocolos de los diluyentes AndroMed (TRIS + lecitina de soya), y Triladyl (TRIS + yema de huevo), en el procesamiento y crioconservación de semen de toro. Los objetivos específicos fueron:

- Comparar la Eficiencia del Diluyente AndroMed (TRIS + Lecitina de soya) y Triladyl (TRIS + Yema de Huevo), de acuerdo a los protocolos establecidos en la crioconservación de semen de toro.
- Evaluar Motilidad Progresiva Espermática (MPE) de las muestras tratadas con diluyente AndroMed y Triladyl, de los tres protocolos de tiempo de equilibrio en el procesamiento de semen bovino.

La hipótesis de estudio manifiesta que al incrementar el tiempo recomendado de equilibrio o refrigeración de semen procesado a 4°C para la crioconservación de semen de toro, mejorará en un 10% el resultado post-congelación del semen, lo que repercutirá positivamente en la Motilidad Progresiva Espermática (MPE) al descongelar las pajuelas de 0,25ml.



## CAPÍTULO II

### 2. MARCO TEÓRICO

Existen numerosos factores que pueden afectar la motilidad, la membrana plasmática, la integridad y la viabilidad de semen de toro búfalo durante el almacenamiento, por ejemplo tipo crioprotectores de diluyente, permeables y no permeables, sistemas de envases o tiempo de congelación y descongelación (Andrabi, 2009).

#### 2.1. Membrana espermática

La membrana espermática se compone básicamente de lípidos, proteínas y un pequeño porcentaje de carbohidratos que es variable de acuerdo al tipo de especie celular (Avila-Portillo, et al., 2006). Es una estructura dinámica que participa en el reconocimiento y transporte de moléculas, está altamente compartimentada, y en cada compartimiento presenta una composición y organización característica, lo que origina propiedades físicas y funciones distintas (Pérez, González, Clemente, & García-Casado, 1999). Estos compartimientos son principalmente: la red mitocondrioflagelar que es importante en el metabolismo y motilidad del espermatozoide, el núcleo



necesario para el almacenamiento estable del ADN<sup>2</sup>, la cabeza del cual destaca la porción anterior, fundamental para la apropiada activación acrosómica y el segmento posterior imprescindible para la unión espermatozoide – ovocito. Cada compartimiento es susceptible a las variaciones de temperatura y a los daños provocados por la congelación de un modo diferente (Hummersted, Graham, & Nolan, 1990) (Tartaglione CM, 2004).

## 2.2. Criopreservación del espermatozoide

El éxito en la criopreservación de espermatozoides depende del mantenimiento del potencial fertilizante de los espermatozoides, que deben ofrecer la integridad y funcionalidad de las diferentes estructuras celulares (Hummersted, Graham, & Nolan, 1990). Los espermatozoides capaces de fecundar el ovocito, deben mantener al menos cuatro atributos básicos después de la congelación y descongelación, entre ellos el metabolismo para producir energía, la motilidad progresiva, las enzimas acrosómicas importantes para la penetración de los espermatozoides a través de las estructuras que rodean al ovocito (Salomon & Maxwell, 1995), y las proteínas de la membrana plasmática importantes para la supervivencia de los espermatozoides en el tracto reproductor femenino y para su conexión a la

---

<sup>2</sup> Ácido Desoxiribo Nucleico



membrana del ovocito durante la fecundación (Andrabi, 2009) (Trimeche, Yvon, Vidament, Palmer, & Magistrini, 1999).

El proceso de Criopreservación incluye 5 etapas: dilución, refrigeración, adición del crioprotector, congelación y descongelación (Watson, 1995). Cada etapa del protocolo ejerce una interacción especial con la estructura, la función de la membrana y con el metabolismo celular (Hummersted, Graham, & Nolan, 1990) (England, 1993); pudiendo el espermatozoide perder su capacidad de funcionar normalmente en cualquiera de estas etapas (Watson, 1995) (Avila-Portillo, y otros, 2006).

### **2.3. Alteraciones morfo-funcionales de los espermatozoides derivados de la criopreservación.**

Un enfriamiento lento induce estrés sobre la membrana del espermatozoide. Este hecho se relaciona con un cambio en la fase lipídica y alteraría el estado funcional de la membrana (Stornelli, Tittarelli, Savignone, & Stornelli, 2005), porque distintos lípidos que forman parte de la composición de la membrana espermática, van a tener diferentes temperaturas de fase de transición. Cambios de temperatura como enfriamiento rápido del semen entre 30 °C y 0 °C induce un estrés a los espermatozoides, el cual es proporcional a la tasa de enfriamiento en este rango de temperaturas debe



ser realizado cuidadosamente (Watson, 1995). Algunos lípidos pasan al estado gel y otros permanecen en estado líquido en un ambiente lipídico no fisiológico lo que origina un cambio en su funcionalidad que conlleva a una alteración de la integridad estructural o en el metabolismo iónico (Woelders, 1997).

La transición de lípidos fluidos a sólidos se da a una temperatura de 10° C a – 16° C alterando de esta manera la funciones de la membrana y dándole un alto grado de fragilidad durante la deshidratación celular, en el proceso de congelación puede haber pérdida de lípidos, lo cual afectaría la integridad de la membrana plasmática por pérdida de su capacidad de expansión durante la rehidratación a volver a condiciones isotónicas (Seidel, 2006).

La disminución de la temperatura desde 25° C a 10° C reduce en un 60% la actividad de las bombas dependientes de ATP<sup>3</sup> y la difusión facilitada o co-transporte (transporte concomitante de dos moléculas a través de la membrana dependiente a una de ellas ATP<sup>3</sup> y/o iones H<sup>+</sup>); en consecuencia, los procesos de difusión y ósmosis son los que predominan en los momentos de estrés osmótico (Mendoza, Dulin, & Warrent, 2000).

---

<sup>3</sup> Adenosin Tri Fosfato



Los principales daños celulares inducidos por la congelación incluyen alteraciones morfológicas como ruptura de la membrana plasmática (principal estructura afectada durante la congelación), degeneración acrosomal y lesiones en las mitocondrias. El daño principal a la membrana se produce a temperaturas de  $-15^{\circ}\text{C}$  a  $-60^{\circ}\text{C}$  y no durante el almacenamiento de la células en nitrógeno líquido a  $-195^{\circ}\text{C}$  (Parks & Graham, 1992). Daños que son de tipo térmico, mecánico, químico y osmótico; incluyendo la adición del crioprotector antes de la congelación, las alteraciones del volumen de la célula, las contracciones y expansiones de la membrana en respuesta a las soluciones hiperosmóticas crioprotectoras, la fase de transición de los fosfolípidos de membrana, la formación extracelular de hielo que resulta en el incremento de los solutos y de ahí una osmolaridad incrementada, llevándolo a la pérdida de agua celular (deshidratación) y la formación intracelular de hielo que llevan a la destrucción del citoesqueleto (Parks & Graham, 1992) (Tyler, Kime, Cooke, & Driscoll, 1996).

#### **2.4. Diluyentes**

Los diluyentes empleados en la conservación de espermatozoides, deben ser isotónicos con el plasma seminal (320 mOsm/kg) cuando es utilizado en refrigeración, e hiperosmótico (400 mOsm/kg) en congelación; debe poseer un pH próximo a 7 y capacidad tampón con el fin de mantener el pH en la



neutralidad, compensando la producción de ácido láctico durante la congelación, contener moléculas que protejan a los espermatozoides frente al frío; poseer una fuente de energía siendo la glucosa y la fructosa las más utilizadas; estar libres de bacterias y contaminación, para lo cual se utilizan antibióticos en su composición (Garde, Aguado, Pérez, Garrido, & Vázquez, 1995).

Diluyentes libres de elementos de origen animal que contienen lecitina de soya, se han desarrollado y el 10% de los lípidos de soya es lecitina que también es encontrada en la yema de huevo (Aires, Hinsch, Mueller-Schloesser, & Bogner, 2003) que pueden sustituir a la yema de huevo. Tiene un efecto crioprotector por su baja viscosidad, menos residuos (Van Wagendonk-de Leeuw, Haring, Kaal-Lansbergen, & JH, 2000) y alto contenido de fosfolípidos al igual que la yema de huevo (Fukui, Kohno, Togari, Hiwasa, & Okabe, 2008).

## **2.5. Composición de los diluyentes**

Los criopreservantes generan estrés osmótico sobre las células aumentando la osmolaridad del medio. Las células inicialmente se deshidratan para compensar la fuerza osmótica inducida por la presencia de los agentes crioprotectores y después se hidrata (Avila-Portillo, y otros, 2006).



El ácido cítrico en los diluyentes neutraliza los productos de desecho del metabolismo de los espermatozoides, en especial del ácido láctico, es decir, desempeña una acción buffer efectiva neutralizando la acidez del medio causado por los catabolitos. El ácido cítrico fija tiene acción fijadora de calcio, que junto con los iones de sodio y potasio mantienen el equilibrio osmótico, favoreciendo la motilidad de los espermatozoides por participar en la activación de la fosfatasa ácida presente en el plasma seminal (Holy, 1983).

La fructuosa es necesaria para la supervivencia de los espermatozoides en condiciones anaeróbicas y están estrechamente relacionada con la motilidad inicial de los espermatozoides (Borque & Saguez, 1992). El semen y la yema de huevo están propensos a contaminación bacteriana, los diluyentes tienen antibióticos (penicilina procaínica, ampicilina, sulfato de gentamicina y lincomicina hidroclicorizado) para prevenir más crecimiento bacteriano (Althouse & Lu, 2005).

## **2.6. Agentes crioprotectores**

Los crioprotectores pueden clasificarse en agentes penetrantes (glicerol, dimetilsulfoxido, propanediol), que son bajos en peso molecular y permeables a través de la membrana celular; también en agentes no penetrantes



(sacarosa, glucosa, dextrosa y dextrano) que son de alto peso molecular, efectivas a velocidades altas de congelación, promueven la rápida deshidratación celular y suelen usarse asociados a los agentes penetrantes (Avila-Portillo, y otros, 2006).

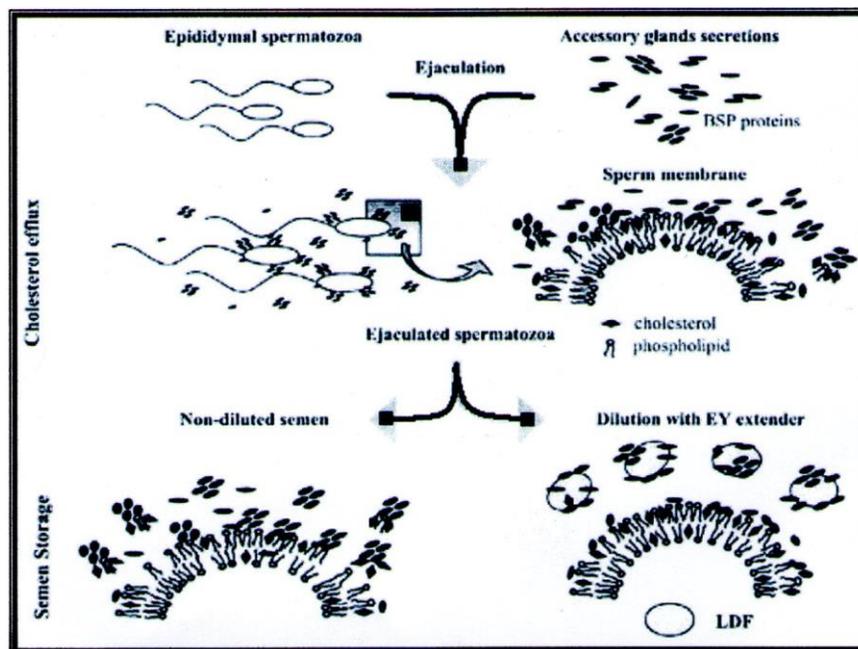
La adición de la yema de huevo al diluyente tiene un efecto benéfico sobre el porcentaje de motilidad, particularmente luego de un rápido enfriamiento del semen a 10 y 5° C, ya que las lipoproteínas de baja densidad actúan como crioprotectores contribuyendo con dos factores: uno de los cuales protege contra el shock de frío (factor de resistencia) y un segundo que mantiene una viabilidad (factor de conservación) (Fiser & Fairfull, 1986). Se cree que la fosfatidilcolina (lecitina) de las LDL (lipoproteínas de baja densidad) es uno de los responsables de esta protección, contra el golpe de frío y congelación (Watson, 1995).

Estudios demuestran que la fracción de LDL de la yema de huevo se une a las proteínas del plasma seminal (BSP<sup>4</sup>) que se encuentra de 35 – 50 mg/ml, y se dice que esta interacción juega un rol importante en la protección del espermatozoide. En la eyaculación, las proteínas BSP<sup>4</sup> se unen en los fosfolípidos de la membrana espermática, esta unión se produce de forma rápida, específica, saturable y estable, y se mantiene durante la congelación

---

<sup>4</sup> Solución Búfero Fosfatada

y la descongelación y mejora la capacidad espermática inducidos por las lipoproteínas de alta densidad y heparina, estimulando el movimiento o salida de colesterol y fosfolípidos de la membrana espermática. Pero si el eyaculado no es diluido entonces los espermatozoides son expuestos a altas concentraciones de BSP<sup>4</sup> y hay un continuo movimiento de lípidos que puede ser perjudicial para la membrana espermática provocando su desestabilización (Bergeron, Crete , Brindle, & ManjunathP, 2004) (Manjunath, Bergeron, Lefebvre, & Fan, 2007).



**Figura 1. Mecanismo de protección espermática por las LDL**

*Fuente: (Manjunath, Bergeron, Lefebvre, & Fan, 2007)*

El glicerol es añadido para la criopreservación, su concentración final en el semen diluido está en el rango de 4% a 6% siendo importante en el momento



de congelamiento hasta  $-30^{\circ}\text{C}$  (England, 1993). Además, el glicerol también disminuye el estrés osmótico intracelular resultante de la deshidratación que se produce por la sustitución del agua intra-celular, necesaria para el mantenimiento del volumen celular, por la interacción con iones y macromoléculas e incluso por la depresión del punto de congelación del agua (Medeiros, Forell, Oliveira, & Rodrigues, 2002).

## **2.7. Diluyentes comerciales para conservación de espermatozoides.**

### **2.7.1. AndroMed® (Minitube, Tiefenbach, Germany).**

Es un diluyente comercial para semen de toros y también utilizado exitosamente con semen de especies no bovinas, su presentación es en frascos de 200 ml. Posee las siguientes características: a) es apropiado para la presentación de semen fresco a  $+5^{\circ}\text{C}$  hasta  $+10^{\circ}\text{C}$ , b) tiene ausencia de componentes de origen animal (tales como yema de huevo), c) previenen efectos indeseados de hormonas, bacterias y residuos de drogas, d) es medio altamente transparente que entrega imágenes de semen extremadamente claras bajo el microscopio (Minitube, 2003) (Mendoza, Dulin, & Warrent, 2000) (Woelders, 1997).



AndroMed® está siendo utilizado con eyaculados de baja concentración y a altas tasas de dilución (bajo 10 millones de células por pajueta), contiene fosfolípidos, TRIS, ácido cítrico, azúcares, antioxidantes, tampones, glicerina, agua de altísima pureza y antibióticos (Tilosina 5,0 mg, Gentamicina 25,0 mg, Espectinomicina 30,0 mg, Lincomicina 15,0 mg, todo en 100 ml) (Minitube, 2003) (Ansari, BA, SM, & S., 2011).

### **2.7.2. Triladyl® (Minitube, Tiefencach, Germany).**

Fabricado en Alemania, por la Empresa Minitube; este es un concentrado para la preparación de un diluyente listo para el uso de un solo paso, que está basado en TRIS (Hidroximetilaminometano, un amortiguador sintético), y además contiene agua bidestilada, glicerol, ácido cítrico, fructuosa, y por cada 100 ml contiene los siguientes antibióticos: tilosina 5 mg, gentamicina 25 mg, espectinomicina 30 mg y lincomicina 15 mg. Para su preparación se se adiciona tres partes de agua destilada, una parte de yema de huevo y 1 parte del concentrado comercial Triladyl® (20%) (Minitube, 2003) (Fukui, Kohno, Togari, Hiwasa, & Okabe, 2008).



## 2.8. Pruebas de viabilidad espermática.

### 2.8.1. Motilidad.

La motilidad individual se estima visualizando el movimiento progresivo de cada uno de los espermatozoides (Holy, 1983), considerándose un 60% como recomendable para lograr buenas tasas de fertilidad, siendo esta observación subjetiva (Hafez & Hafez, 2000) (Hafez E. , 1987).

Recomiendan para la inseminación en vacunos, un mínimo de 50% de espermatozoides con motilidad individual progresiva después de congelar y descongelar (Medeiros, Forell, Oliveira, & Rodrigues, 2002), con un mínimo en la dosis de  $16 \times 10^6$  espermatozoides por ml (Pesch & Hoffmann, 2007). En el congelado y descongelado de la pajuela se pierde alrededor de 20% (Silva & Gadella, 2006).

### 2.8.2. Anormalidades espermáticas

Si la proporción de anormalidades es más del 20%, entonces nos encontramos ante un semen de baja fertilidad y entre las anormalidades más frecuentes se encuentran espermatozoides sin cola, cabeza grande, cabeza pequeña, cola reducida, cabeza adelgazada, rotura de cuello y acrosoma



anormal (Hafez & Hafez, 2000) (Stornelli, Tittarelli, Savignone, & Stornelli, 2005).

### **2.8.3. Porcentaje de vivos**

Determinado por tinción supra vital con una mezcla de colorantes, como eosina al 5% y nigrosina al 10%, donde las células que están vivas excluyen el colorante, mientras las que están muertas se tiñen de rojo con la eosina (Hafez & Hafez, 2000) (Parks & Graham, 1992).

### **2.8.4. Prueba de integridad de la membrana plasmática.**

La funcionalidad e integridad de la membrana espermática, son vitales para la viabilidad del espermatozoide y metabolismo, además para una adecuada capacitación y reacción del acrosoma y por lo tanto, para la fertilidad del macho (Sánchez, Rubilar, & Gatica, 2002) (Manjunath, Bergeron, Lefebvre, & Fan, 2007).

Esta prueba tiene la ventaja de no solo indicar si la membrana está intacta. Sino también de indicar si es osmóticamente activa y podría usarse para predecir la capacidad fertilizante del semen post descongelado (Dumont,



2002), dado que el daño de la membrana es un factor muy importante (Colenbrander, Gadellaa, & Stout, 2003) (Fiser & Fairfull, 1986).

La prueba de permeabilidad de la membrana vía endósmosis o hipo-osmotic-swelling test (HosT), está basada en las propiedades físicas y bioquímicas de la membrana plasmática (Garde, Aguado, Pérez, Garrido, & Vázquez, 1995). Consiste en someter a los espermatozoides a un medio de presión hipo-osmótica (más baja que la fisiológica), lo que causa una entrada de agua en la célula en un intento de equilibrar la presión osmótica interna con el medio externo (Pérez, González, Clemente, & García-Casado, 1999) (Senger PL, 1983).

## **2.9. Efecto de los diluyentes en semen congelado y fertilidad.**

Se comparó la calidad de semen congelado en toros, procesando con tres diferentes diluyentes comerciales AndroMed, Bioxcell y Triladyl, y se demostró que la motilidad total al descongelado del semen procesado en AndroMed fue de 67,7% y se mostró una diferencia significativa para Bioxcell que fue de 60,9% y Triladyl 52,4 %. La vitalidad espermática fue significativamente mejor con Triladyl (78,5%) que AndroMed (72,6%) o Bioxcell (70,8%) (Janett, Keo, Bollwein, Hassing , & Thun, 2005).



Se comparó tres diluyentes para congelar semen de toros, envasados en pajillas de 0,25 cc. La motilidad progresiva observada fue similar entre el diluyente Bioxcell y AndroMed; sin embargo, el diluyente Botu-Bov mostró diferencia cuando fue comparado con el Bioxcell y AndroMed (Braga, y otros, 2006).



## CAPÍTULO III

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Materiales

Los materiales que se emplearán para la investigación se clasificaron de acuerdo a su naturaleza en recursos biológicos, materiales de laboratorio y materiales fungibles.

##### 3.1.1. Recursos biológicos

- Animales
- Eyaculados de animales machos de la especie bovina
- Yema de huevos de gallina.

##### 3.1.2. Materiales de campo

Vagina artificial bovina modelo IMV, tubos plásticos recolectores de semen, termo para agua caliente, termómetro, guantes, agua.



### 3.1.3. Equipos e instrumentos de laboratorio

Microscopio, placa térmica, baño maría, centrífuga, porta y cubreobjetos, cámara de Neubauer, pipetas de 1ml, 5 ml y 10ml, pipetas para glóbulos rojos, vasos de precipitación de 10ml, 50ml y 100ml, matraz erlenmeyer de 200ml, pipetas pasteur, pajuelas de 0,25 ml de capacidad, varilla agitadora.

### 3.1.4. Reactivos

- **Diluyente seminal:** AndroMed® y Triladyl®
- Eosina 5% y Nigrosina 10%,
- **Prueba de Concentración:** Solución Salina NaCl (Norma IUPAC) 0,9%, Solución salina formolada al 5%.

## 3.2. Caracterización de la unidad de análisis

Las unidades experimentales y de análisis fueron las pajuelas de 0,25 ml de semen bovino de la raza Jersey criopreservado y descongelado. El universo destinado para la investigación fueron las pajuelas obtenidas por cada eyaculado, con un total de cuatro repeticiones y seis tratamientos dando un total de 96 unidades experimentales en estudio.

### 3.3. Lugar de la Investigación

El trabajo investigativo se realizó en la Granja experimental IRQUIS de la Universidad de Cuenca, que está ubicada en el km 23 de la vía a Girón. Aquí se desarrolló el trabajo de campo, colección y procesamiento de semen, con instrumental de laboratorio.



**Figura 2. Granja Experimental IRQUIS - Universidad de Cuenca.**

Fuente: Google Earth

### 3.4. Reproductor

El toro donador de semen fue único, de la Raza Jersey, con fecha de Nacimiento del 25 de diciembre de 2010, de dos años de edad. Se trasladó al lugar de estudio y a partir de una semana de reposo y adaptación se recolectó en el régimen de una vez por semana. La condición corporal fue de 3, con un estado de salud aparentemente sano y sin signos de enfermedad.

**Nombre:** Ithaola,

**Dispositivo de Identificación:** No. EC.MAGAP-SITA 786010122596

Los testículos no presentaban afecciones externas, tenían un diámetro de 13 cm de largo y 8 cm de ancho.



**Foto 1. Reproductor donante**

Fuente: El Autor



### **3.5. Metodología de trabajo.**

#### **3.5.1. Preparación del toro donante.**

El Toro reproductor donante de la Raza Jersey, se trasladó a la Hacienda Experimental IRQUIS, de la Universidad de Cuenca, en la parroquia Victoria del Portete, donde se le dio 7 días de descanso y adaptación.

Posteriormente se les sometió a un baño usando Jabón con pH neutral 7 y se realizó un control del Vello prepucial, además se lavó el pene y prepucio usando Cloruro de Sodio al 0,9% por tres veces y se trasladó al Galpón para su reposo. Esto se realizó un día antes de la extracción.

#### **3.5.2. Excitación pre-coital.**

Se realizó montas falsas y maniobras, con la regla XXRX, donde X: Monta Falsa y R: Reposo activo. En esta etapa se armó y preparó la vagina artificial (modelo IMV-Francia). Cada tubo colector de semen se identificó con el código de extracción.

### 3.5.3. Colección del semen

La Vagina Artificial (VA) francesa brinda condiciones de presión y temperatura (40 – 45°C). Se tuvo especial cuidado en la limpieza y rotulado de los tubos colectores, además todas las recolecciones fueron realizadas por el mismo operario bajo las mismas condiciones: misma hora en la mañana con una frecuencia de 1 vez por semana.



**Foto 2. Colección de semen de Toro.**  
Fuente: El Autor

### 3.5.4. Evaluación de semen.

Se consideró dos tipos de evaluación: macroscópica y microscópica, entre las que consideramos el volumen, tras la colecta, el semen de cada eyaculado fueron analizado de inmediato, midiendo el volumen en los tubos de colección, además se midió el pH usando tiras de papel tornasol y la coloración del semen.

#### 3.5.4.1. Volumen

Tras la colecta, el volumen de semen eyaculado fue determinado de inmediato, midiendo el volumen en el tubo de colección graduado.



**Foto 3. Evaluación de volumen.**

Fuente: El Autor



### 3.5.4.2. Concentración espermática

Se determinó mediante el método de homocitómetro, utilizando la cámara de Neubauer (para conteo de glóbulos rojos). Se realizó una dilución de 1:200 (semen – solución tampón – formol 5%), se absorbió semen puro con la micropipeta hasta la marca de 0,5 y luego se enrasó con la solución formolada hasta la marca 101 y se homogeneizó, se deja caer las 5 primeras gotas y del restante fue colocado en cada extremo de la cámara de Neubauer (dentro del cubre objeto de la cámara), para luego proceder con el conteo de los cinco cuadrantes pequeños escogidos al azar. Se sacó un promedio de espermatozoides entre los dos cuadrantes de la cámara. A la cantidad promedio de células contadas se les multiplicó por el factor  $10^7$  para obtener una concentración por  $\text{cm}^3$ .

### 3.5.4.3. Motilidad espermática progresiva.

La evaluación de la motilidad expresada en porcentajes se determinó por observación en el microscopio óptico a un aumento de 20X y 40X, colocándose 10  $\mu\text{l}$  de semen puro sobre la lámina de porta objeto previamente calentado a 37°C.

#### 3.5.4.4. Vitalidad espermática.

Se mezcló una gota de 5  $\mu$ l aspiradas por una micropipeta, de semen puro a 37°C con dos gotas de eosina más una gota de nigrosina. Posteriormente se hace un frotis con la lámina de otro portaobjetos (37°C). Después de unos segundos se observa al microscopio y se cuenta 200 espermatozoides y se saca porcentajes entre espermatozoides vivos (con cabeza blanca) y espermatozoides muertos (con cabeza roja).

En esta prueba, también se contó la cantidad de 200 espermatozoides, de los cuales se sacó el número de anormales existentes en el frotis y se determinó el porcentaje.



**Foto 4. Evaluación del Semen.**

Fuente: El Autor



### 3.5.5. Procesamiento del semen.

El semen recolectado en el tubo graduado, fue dividido en dos partes completamente iguales para partir en las mismas condiciones. La una parte se procesó con el diluyente AndroMed® y a la otra parte con el diluyente Triladyl®, el porcentaje de dilución fue del 20% en los dos diluyentes comerciales.

#### 3.5.5.1. Determinación del número de espermatozoides viables en el eyaculado y número de dosis inseminantes.

Por lo general se requieren de  $10 \times 10^6$  espermatozoides viables en el momento de la inseminación. Sin embargo, bajo condiciones de campo se considera que más de un 50% de las células pueden morir durante alguna fase del proceso de congelación – descongelación, por lo que se debe poner un mínimo de  $20 \times 10^6$  espermatozoides por dosis inseminante. En base a esto se determinó el número de dosis que se pueden obtener dividiendo el número total de espermatozoides viables entre el número de espermatozoides por dosis.

Para conocer la cantidad de diluyente total a usar se trabajó con la siguiente

fórmula:



$$\text{No. Pajuelas esperadas} = \frac{\text{Volumen x concentración x \% Motilidad x \% Vivos}}{\text{Concentración de espermatozoides por pajuela}}$$

### 3.5.5.2. Determinación de la cantidad de diluyente necesario

El total de espermatozoides por dosis debe estar suspendido en un volumen final de 0,25 ml, por lo tanto, la cantidad que obtendremos de la división entre el número de espermatozoides viables en el eyaculado para  $20 \times 10^6$  espermatozoides por dosis inseminantes, se multiplica por 0,25 que es el volumen de cada pajuela. Si consideramos que el volumen inicial del semen (total del volumen del eyaculado dividido en dos partes), obtendremos:

$$\text{Diluyente Total} = (\text{Pajuelas esperadas } 0,25 \text{ ml}) - (\text{Volumen Eyaculado})$$

### 3.5.5.3. Preparación del diluyente

#### TRILADYL®

La composición final de este diluyente deberá ser de un 20%, es decir, tres partes de agua bidestilada, una parte de yema de huevo y una parte de este diluyente.



Se mezcló 100 ml de Triladyl en 300 ml de agua bidestilada. Esta solución es estable y puede guardarse en refrigeración a 5°C. Cuando se vaya a utilizar para la dilución, mezclar esta solución madre con 100 ml de yema de huevo en una probeta graduada. En este paso se abrió los huevos y separó totalmente la clara pasando repetidamente la yema de un cascaron a otro, teniendo cuidado de no romper la membrana. Colocar la yema en un papel filtro estéril y hacerlo rodar cuidadosamente hasta despegar todos los restos de clara, colocar el filtro con la yema en la boca de la probeta y abrir con cuidado la membrana de manera que el líquido de la yema pueda gotear directamente a la solución madre. Mezclar el contenido con una varilla de vidrio evitando en lo posible la formación de espuma. Colocar el diluyente en baño maría para permitir que se iguale a la temperatura del semen.

### **ANDROMED®**

Se utilizó también la misma composición al 20% como es en el caso del Triladyl®, mezclar 200 ml de AndroMed® con 800 ml de agua bidestilada a 35°C.



### 3.5.6. Dilución de semen.

Se hizo una Pre-dilución del semen directamente en el recipiente de recolección y se transfirió a un matraz Erlenmeyer, dos partes de diluyente con una parte de semen (2:1). Se completó el diluyente necesario utilizando una pipeta graduada para medir con exactitud la cantidad agregada, esto se hace en el laboratorio y así permanecerá por el tiempo necesario para completar cada tratamiento.

En este punto, está la parte fundamental de la investigación ya que se deja reposar el semen en los 3 tiempos de equilibrio:

- Tiempo de equilibrio 1: 2 horas
- Tiempo de equilibrio 2: 5 horas
- Tiempo de equilibrio 3: 7 horas

A cada tiempo se le rotuló e identificó, pasado el tiempo de equilibrio según sea el estudio, se evaluó Motilidad Progresiva Individual (MPI) llevándole a una temperatura de 37° C para medir supervivencia de espermatozoides antes de la congelación.

### 3.5.7. Preparación de pajuelas y rejillas.

Se rotularon las pajuelas con el nombre del toro reproductor, así como su identificación según el número de dispositivo (arete), se lo hizo manualmente. Además se preparó las rejillas donde se van a colocar las pajuelas también debidamente rotuladas.



Foto 5. Preparación de Rejillas.

Fuente: El Autor



### **3.5.8. Envasado del semen.**

Se envasó las pajuelas una vez pasado el tiempo de equilibrio del semen dependiendo del tratamiento, absorbiendo manualmente y sellando con el alcohol polivinílico, esta práctica se realiza a 4°C.

### **3.5.9. Crioconservación del semen.**

La crioconservación de pajuelas para todos los tratamientos se efectuó sobre rampas en vapor de Nitrógeno, a una altura de 4 cm sobre el nivel de nitrógeno líquido, por un tiempo de 15 minutos, luego se dejó caer sobre el nitrógeno líquido y crio-conservar, de esta manera se logra que llegue a una temperatura de – 196°C. Esta técnica fue tomada por la empresa fabricante Minitube.

### **3.5.10. Descongelamiento**

A los 2 días de haber criopreservado las pajuelas se realizó el proceso de descongelado, donde se extrajeron las pajuelas sometiéndolas a una temperatura de 37°C por 1 minuto para su posterior evaluación.



### 3.5.11. Evaluación del semen descongelado

Las pruebas a evaluar son las siguientes:

#### 3.5.11.1. Motilidad Individual progresiva espermática

Se evaluó la motilidad expresada en porcentajes y se determinó por observación en el microscopio óptico a un aumento de 20X y 40X, colocándose 10  $\mu$ l de semen post congelado sobre la lámina de porta objetos previamente calentados a 37°C.

#### 3.5.11.2. Vitalidad espermática

Se determinó la viabilidad y morfología espermática post congelación, se realizó con la misma metodología utilizada en semen fresco con un mínimo de espermatozoides viables y normales del 40 y 70 % respectivamente. La determinación de los acrosomas intactos se lo realizó deteniendo el movimiento que se logra, mezclando una gota de semen con una gotita de glutaraldehído al 0,2% en un porta y cubre objetos para observar al microscopio. Se examina 200 células en 1000 aumentos, inmediatamente tras descongelar el semen.



### 3.6. Diseño estadístico

Los tratamientos para el estudio fueron seis, cada tratamiento estará formado por un diluyente y un tiempo de equilibrio en horas. El DCA constó de 6 tratamientos con 4 repeticiones cada uno, con un total de 96 unidades experimentales.

Los datos recolectados en las hojas de campo, fueron registrados en hojas de cálculo de excel, y luego procesados por pruebas estadísticas. El tipo de diseño estadístico empleado para este estudio fue un Diseño Completamente al Azar (DCA) con arreglo factorial de 2 x 3 con 4 repeticiones.

Factor 1: Diluyente 1: Triladyl (**d1**)

Diluyente 2: AndroMed (**d2**)

Factor 2: Tiempo de equilibrio: Tiempo 1: 2 horas (**t1**)

Tiempo 2: 5 horas (**t2**)

Tiempo 3: 7 horas (**t3**)

El modelo matemático empleado para este estudio fue el siguiente:



Cuadro 1. Esquema del ADEVA.

F. de V.	gl	F <sub>tab</sub>	
		0,05	0,01
<b>Total</b>	<b>23</b>		
(Tratam)	<b>5</b>		
Diluyente (A)	1	4,41	8,29
Tiempo (B)	2	3,55	6,01
A x B	2	3,55	6,01
E.Exp	<b>18</b>		

Fuente: Investigación del Trabajo  
Elaborado por: El Autor

**Modelo estadístico asociado al diseño:**

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij} \quad i = 1, 2, 3, \dots, t$$
$$j = 1, 2, 3, \dots, n$$

donde:

$Y_{ij}$  = Variable respuesta en la j-ésima repetición del i-ésimo tratamiento

$\mu$  = Media general

$\tau_i$  = Efecto del tratamiento i.

$\varepsilon_{ij}$  = Error aleatorio, donde  $\varepsilon_{ij} \sim N(0, \sigma^2)$

Análisis de la Varianza para el modelo  $Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$



## CAPÍTULO IV

### 4. RESULTADOS

#### 4.1. Motilidad espermática individual progresiva.

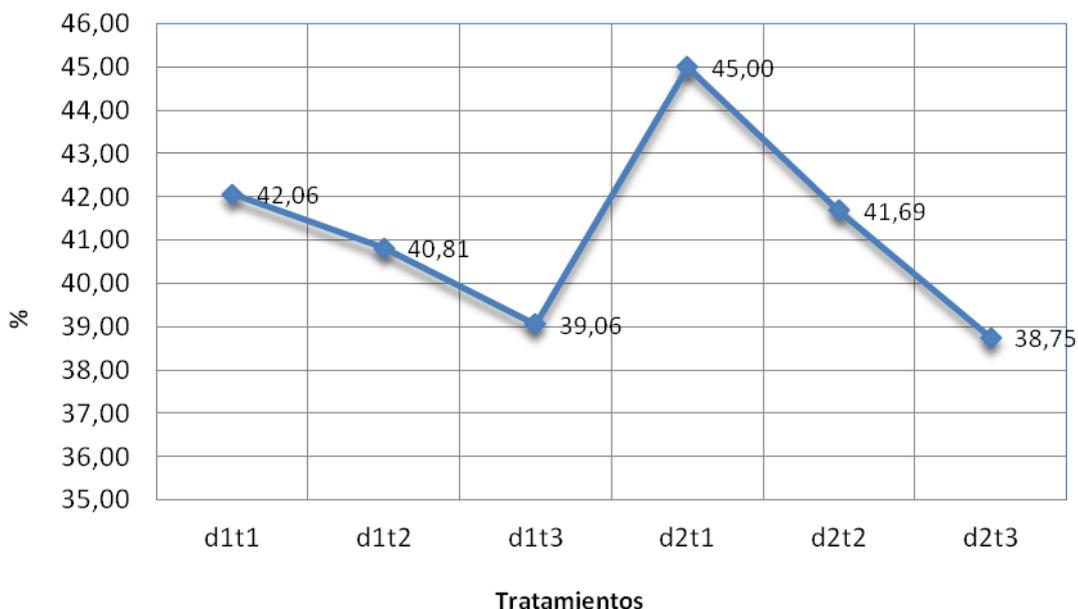
En el cuadro 2, se muestran los porcentajes promedio, de la interacción de factores (dos diluyentes: AndroMed® y Triladyl® y tres tiempos de equilibrio: 2, 5 y 7 horas, post congelación), para la motilidad individual progresiva (MIP).

De acuerdo con el ADEVA, se observaron diferencias no significativas entre las interacciones de los factores estudiados como se muestra en el gráfico siguiente.

**Cuadro 2. Motilidad espermática (%) de la interacción de factores para un DCA con arreglo factorial 2x3, con 4 repeticiones.**

Tratamiento	Repeticiones				$\bar{x}$
	I	II	III	IV	
<b>d1t1</b>	45,00	42,00	43,00	38,25	<b>42,06</b>
<b>d1t2</b>	40,00	39,50	40,00	43,75	<b>40,81</b>
<b>d1t3</b>	38,75	38,75	40,00	38,75	<b>39,06</b>
<b>d2t1</b>	45,50	47,50	45,75	41,25	<b>45,00</b>
<b>d2t2</b>	42,50	40,00	40,00	44,25	<b>41,69</b>
<b>d2t3</b>	41,25	37,50	38,75	37,50	<b>38,75</b>

Fuente: Investigación del Trabajo  
Elaborado por: El Autor



**Gráfico 1. Porcentajes de Motilidad espermática de las interacciones (Tratamientos) en semen de Toro Jersey.**

Fuente: Investigación del Trabajo  
Elaborado por: El Autor



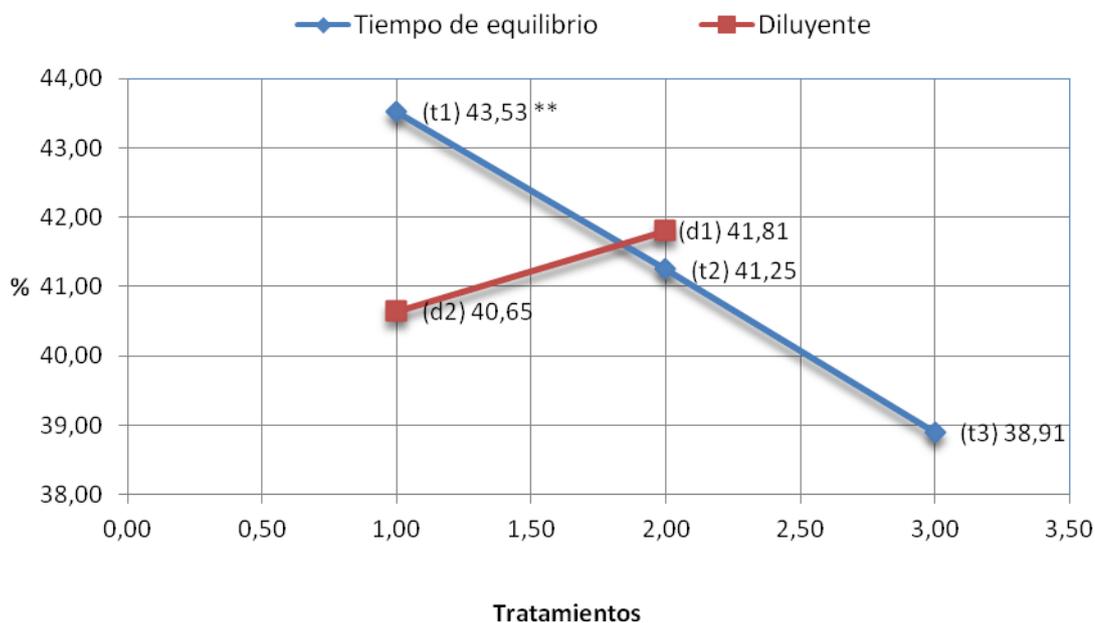
El gráfico 3, muestra los promedios porcentuales de motilidad espermática de los tratamientos. De conformidad con el ADEVA, las diferencias entre los promedios de motilidad de la interacción: diluyentes x tiempos de equilibrio, fueron no significativas; por lo tanto, las discrepancias que se ven en el gráfico ocurrieron por casualidad.

El cuadro 3 muestra los porcentajes promedio de motilidad progresiva, correspondientes a la separación de factores (diluyentes-tiempos de equilibrio).

**Cuadro 3. Promedio de interacción de tratamientos diluyente-tiempo (AxB).**

A		Tiempo (B)			(%)
		t1	t2	t3	$\bar{X}$
Diluyente (A)	d1	168,25	163,25	156,25	<b>40,65</b>
	d2	180,00	166,75	155,00	<b>41,81</b>
( $\bar{X}$ )		<b>43,53</b>	<b>41,25</b>	<b>38,91</b>	

Fuente: Investigación del Trabajo  
Elaborado por: El Autor



**Gráfico 2. Porcentajes de motilidad espermática por factor en semen de toro Jersey.**

Fuente: Investigación del Trabajo

Elaborado por: El Autor

El gráfico 4, muestra los porcentajes de motilidad espermática por cada factor. Según el ADEVA se encontraron diferencias altamente significativas, entre los porcentajes de motilidad, únicamente para los tiempos de equilibrio utilizados en la crioconservación.



**Cuadro 4. ADEVA para porcentajes de motilidad espermática en semen de toro.**

F. de V.	GI	SC	CM	F.Cal	Ftab	
					0,05	0,01
<b>Total</b>	<b>23</b>	184,86				
(Tratamiento)	<b>5</b>	104,5525				
Diluyente (A)	1	8,17	8,17	1,83 ns	4,41	8,29
Tiempo (B)	2	85,57	42,79	9,59 **	3,55	6,01
A x B	2	10,81	5,41	1,21 ns	3,55	6,01
E.Exp	<b>18</b>	80,31	4,46			

Fuente: Investigación del Trabajo  
Elaborado por: El Autor

**CV: 5,12%**

El CV del 5,12% indica que la variabilidad entre las unidades experimentales está entre los límites de tolerancia para experimentos con este tipo de diseño.



**Cuadro 5. Prueba de significación de Duncan al 5%, para separación de promedios de motilidad espermática con 3 tiempos de equilibrio.**

A	B	C
t1	t2	t3
43,53	41,25	38,91
a	b	c

Fuente: Investigación del Trabajo  
Elaborado por: El Autor

t1: 2 horas

t2: 5 horas

t3: 7 horas

La prueba de significación de Duncan al 5%, para el factor tiempo en horas, con el 95% de seguridad, permite manifestar que con el tratamiento t1 (2 horas) se obtuvo el mejor tiempo de equilibrio para la motilidad espermática del semen de toro.

## 4.2. Vitalidad espermática

**Cuadro 6. Vitalidad espermática (%) de interacciones, para un DCA con arreglo factorial 2x3, con 4 repeticiones.**

Tratamiento	Repeticiones				$\bar{x}$
	I	II	III	IV	
<b>d1t1</b>	55,00	52,50	53,75	57,50	<b>54,69</b>
<b>d1t2</b>	58,75	53,75	52,00	53,75	<b>54,56</b>
<b>d1t3</b>	46,25	45,00	46,25	46,25	<b>45,94</b>
<b>d2t1</b>	52,50	50,00	56,25	55,00	<b>53,44</b>
<b>d2t2</b>	47,50	51,25	48,75	46,25	<b>48,44</b>
<b>d2t3</b>	45,00	41,25	46,25	47,50	<b>45,00</b>

Fuente: Investigación del Trabajo  
Elaborado por: El Autor



**Gráfico 3. Porcentajes de vitalidad espermática de interacciones (tratamientos), en semen de toro.**

Fuente: Investigación del Trabajo  
Elaborado por: El Autor.

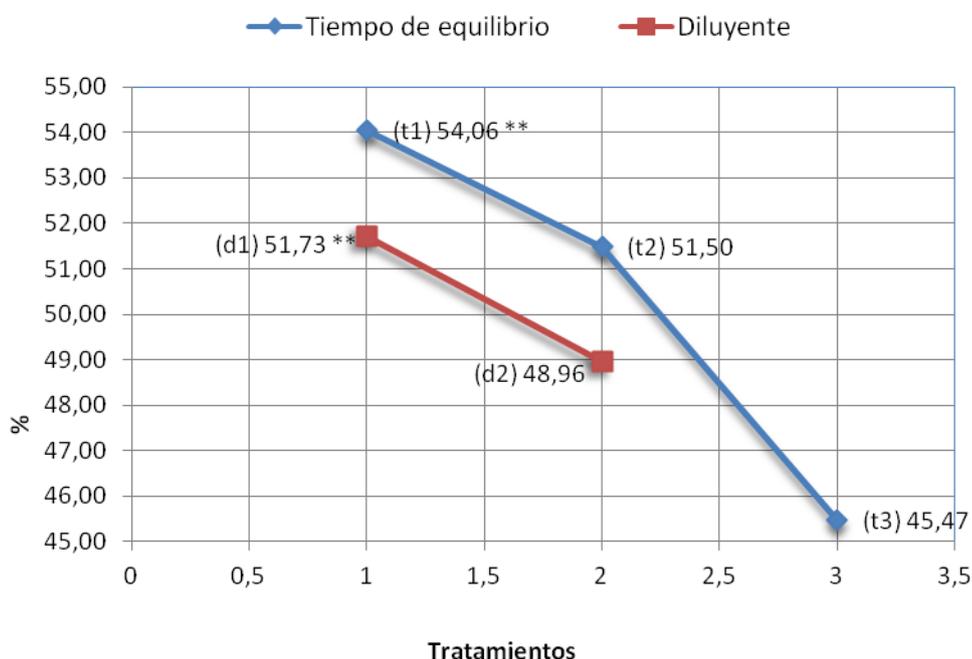


El gráfico 5, muestra los promedios porcentuales de vitalidad espermática de la interacción de los factores estudiados. De conformidad con el ADEVA, las diferencias entre los promedios de vitalidad de la interacción, son no significativas; por lo tanto, los factores actúan de manera independiente.

**Cuadro 7. Porcentajes de vitalidad por factor.**

A		Tiempo (B)			$\Sigma A$	$\bar{x}$
		t1	t2	t3		
<b>Diluyente (A)</b>	d1	218,75	218,25	183,75	620,75	<b>51,73</b>
	d2	213,75	193,75	180,00	587,50	<b>48,96</b>
$\Sigma B$		432,50	412,00	363,75	1208,25	
$\bar{x}$		<b>54,06</b>	<b>51,50</b>	<b>45,47</b>		

Fuente: Investigación del Trabajo  
Elaborado por: El Autor.



**Gráfico 4. Porcentaje de vitalidad espermática por factor.**

Fuente: Investigación del Trabajo

Elaborado por: El Autor.

El gráfico 6 muestra los porcentajes de vitalidad espermática de los 2 factores estudiados. Según el ADEVA existen diferencias estadísticas altamente significativas entre los porcentajes de vitalidad de ambos factores, (tiempos de equilibrio y diluyentes); sin embargo, los dos factores no están asociados y actúan independientemente.



**Cuadro 8. ADEVA para porcentajes de vitalidad espermática en semen de toro.**

F. de V.	gl	SC	CM	F.Cal	Ftab	
					0,05	0,01
Total	23	490,22				
(Tratamiento)	5	391,363				
Diluyente (A)	1	46,06	46,06	8,39 **	4,41	8,29
Tiempo (B)	2	311,45	155,73	28,35 **	3,55	6,01
A x B	2	33,85	16,93	3,08 ns	3,55	6,01
E.Exp	18	98,86	5,49			

Fuente: Investigación del Trabajo  
Elaborado por: El Autor.

**CV: 4,65%**

El CV del 4,65% indica que la variabilidad entre las unidades experimentales se encuentra entre los límites de tolerancia para experimentos con este tipo de diseño.

**Cuadro 9. Prueba de significación de Duncan al 5%, para separación de promedios de vitalidad espermática**

A	B
d1	d2
51,73*	48,96

Fuente: Investigación del Trabajo  
Elaborado por: El Autor



Según la prueba de significación de Duncan al 5% para el factor diluyente, con el 95% de seguridad, el mejor porcentaje de vitalidad espermática corresponde al diluyente Tryladil®.

**Cuadro 10. Prueba de significación de Duncan al 5%, para separación de promedios de vitalidad espermática para 3 tiempos de equilibrio.**

A	B	C
t1	t2	t3
54,06 *	51,5	45,47
a	b	C

Fuente: Investigación del Trabajo  
Elaborado por: El Autor.

La prueba de significación de Duncan al 5%, para el factor tiempo de equilibrio, con el 95% de seguridad, permite manifestar que con el tratamiento t1 (2 horas) se obtuvo el mejor tiempo de equilibrio para la vitalidad espermática del semen de toro.



### 4.3. Anomalías espermáticas

**Cuadro 11. Anomalías espermáticas (%) de la interacción de factores, para un DCA con arreglo factorial 2x3, con 4 repeticiones.**

Tratamiento	Repeticiones				$\bar{x}$
	I	II	III	IV	
<b>d1t1</b>	8,00	10,00	10,50	10,50	<b>9,75</b>
<b>d1t2</b>	10,50	10,50	8,75	11,75	<b>10,38</b>
<b>d1t3</b>	10,75	10,75	9,75	10,50	<b>10,44</b>
<b>d2t1</b>	9,50	9,75	9,25	10,00	<b>9,63</b>
<b>d2t2</b>	11,00	8,75	10,75	10,50	<b>10,25</b>
<b>d2t3</b>	10,50	11,50	11,25	13,00	<b>11,56</b>

Fuente: Investigación del Trabajo  
Elaborado por: El Autor.



**Gráfico 5. Porcentaje de anomalías espermática de la interacción de factores, en semen de toro**

Fuente: Investigación del Trabajo  
Elaborado por: El Autor.

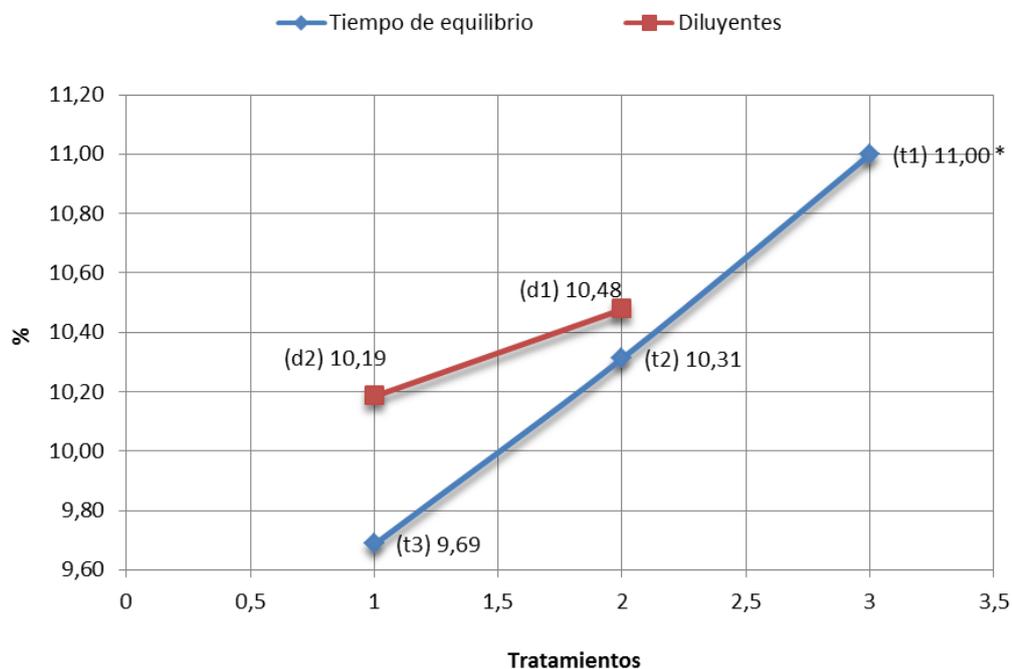
El gráfico 7 exhibe los porcentajes promedio de anomalías encontradas de la interacción de los factores estudiados, según el ADEVA (Cuadro 13) las diferencias son no significativas. Los dos factores no están asociados y actúan independientemente con respecto a las anomalías de los espermatozoides observadas en el semen de toro.

**Cuadro 12. Porcentaje de anomalías por factor.**

A		Tiempo (B)			$\bar{X}$
		t1	t2	t3	
Diluyente (A)	d1	39,00	41,50	41,75	<b>10,19</b>
	d2	38,50	41,00	46,25	<b>10,48</b>
$\bar{X}$		<b>9,69</b>	<b>10,31</b>	<b>11,00</b>	

Fuente: Investigación del Trabajo  
Elaborado por: El Autor.

**Graf 6. Porcentaje de anomalías espermáticas de factores, en semen de toro.**



**Gráfico 6. Porcentaje de anomalías espermática por factor, en semen de toro**

Fuente: Investigación del Trabajo  
Elaborado por: El Autor.



El gráfico 8, muestra los porcentajes de anomalías espermáticas de los 2 factores estudiados. Según el ADEVA existen diferencias estadísticas significativas entre los porcentajes de anomalías de los tiempos de equilibrio utilizados en la crioconservación.

**Cuadro 13. ADEVA para porcentajes de anomalías espermáticas en semen de toro.**

F. de V.	GI	SC	CM	F.Cal	Ftab	
					0,05	0,01
Total	23	25,7				
(Tratamiento)	5	9,48625				
Diluyente (A)	1	0,51	0,51	0,57 ns	4,41	8,29
Tiempo (B)	2	6,89	3,45	3,83 *	3,55	6,01
A x B	2	2,09	1,05	1,16 ns	3,55	6,01
E.Exp	18	16,21	0,90			

Fuente: Investigación del Trabajo  
Elaborado por: El Autor.

**CV: 9,18%**

El CV del 9,18% indica que la variabilidad entre las unidades experimentales se encuentra entre los límites de tolerancia para experimentos con este tipo de diseño.



**Cuadro 14. Prueba de significación de Duncan al 5%, para separación de promedios de porcentajes de anomalías espermáticas.**

<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
<b>t1</b>	<b>t2</b>	<b>t3</b>
9,69	10,31	11,00
a	a	
	b	b

Fuente: Investigación del Trabajo  
Elaborado por: El Autor.

La prueba de significación de Duncan al 5%, para el tiempo de equilibrio espermático en horas, del semen de toro, con el cual se obtuvo el menor porcentaje promedio de anomalías en espermatozoides, fue de 2 horas (t1).



## CAPÍTULO V

### 5. DISCUSIÓN

Stradaioli y colaboradores en el año de 2007, realizaron una investigación y al evaluar motilidad individual progresiva en pajuelas de 0,5 cc obtuvieron 74,7% con un diluyente Bioxcell® y 72,5% con Tris – yema al post refrigerarlo y 46,4% y 41,8% al post-descongelarlo respectivamente, concluyendo que el diluyente Bioxcell® resultó mejor (Stradaioli , Noro, Sylla, & Monaci, 2007). En otra investigación, Nur y colaboradores en el año de 2003, se reportó que utilizando el diluyente Laiciphos hubo el 56,6% de espermatozoides motiles post descongelación (NUR, DOGAN, SOYLU, & AK, 2003).

En otra investigación realizada por Janett y colaboradores en el 2005, se reportó el 60% de motilidad utilizando un diluyente a base de lípidos de la soya y un 55% con el diluyente Triladyl® (Janett, Keo, Bollwein, Hassing , & Thun, 2005).

La motilidad individual progresiva es una prueba subjetiva que es determinada visualizando el movimiento progresivo de cada uno de los espermatozoides al microscopio y exige una experiencia para hacer dicha evaluación (Hafez & Hafez, 2000).



Del post refrigerado al post descongelado se pierde el 22 % de motilidad individual progresiva, similares resultados fueron obtenidos en el 2006, quienes obtuvieron el 20% de la pérdida de MIP<sup>5</sup> (Silva & Gadella, 2006). Además cambios de temperatura como enfriamiento rápido y lento del semen entre 30° C y 0° C induce un estrés en los espermatozoides y debe ser realizado cuidadosamente (Watson, 1995). Además esto se relaciona con cambios de fase lipídica y alteraría al estado funcional de la membrana (Stornelli, Tittarelli, Savignone, & Stornelli, 2005). Mientras que el descenso de temperatura por debajo de 0° C, a un ritmo lento promueve una mayor salida de agua de la célula que puede conducir a deshidratación celular muy intenso, pero un enfriamiento muy rápido no es suficiente para permitir la salida de agua, lo que conduce a una formación de cristales de hielo intracelular (Celeghini EC, y otros, 2007).

Algunos El Autores mencionan que están reemplazando la yema de huevo con una combinación de fosfolípidos extraídos de la lecitina encontrada en el aceite de la soya. El 10% de los lípidos de la soya es lecitina que también es encontrada en la yema de huevo (Aires, Hinsch, Mueller-Schloesser, & Bogner, 2003) (Van Wagendonk-de Leeuw, Haring, Kaal-Lansbergen, & JH, 2000).

---

<sup>5</sup> Motilidad Individual Progresiva



Janett y colaboradores en sus investigaciones indican que el diluyente AndroMed® mantuvo más espermatozoides vivos frente a otros diluyentes como Bioxcell®, al post refrigerarlo y post descongelarlo, encontrando diferencias significativas entre los diluyentes (Janett, Keo, Bollwein, Hassing , & Thun, 2005).

En el año 2006 investigadores obtuvieron un 68,62% de espermatozoides vivos con el diluyente Bioxcell® (CM, 2006), y un 74,80% (Stradaioli , Noro, Sylla, & Monaci, 2007), mientras al post descongelado un 46,4%.

En otra investigación Rubio y colaboradores en el año 2009, obtuvieron porcentajes de vitalidad que variaron de 64,80 a 72,79% al post descongelado (Rubio-Gullen, Quintero - Moreno, & González Villalobos, 2009).

Del semen puro al post descongelado se pierde un promedio de 24% de espermatozoides vivos. Al respecto se menciona que las membranas celulares son las estructuras celulares que sufren mayor daño en los procesos de congelación, debido a la pérdida de fluidez de sus componentes lipídicos (Parks & Graham, 1992) (Seidel, 2006), y en la congelación existe varios obstáculos que necesita ser superados, como la formación extracelular de hielo que resulta entre el incremento de solutos y de allí una osmolaridad incrementada, llevándolo a la pérdida de agua



celular (deshidratación) in la formación intra-celular de hielo que llevan a la destrucción del citoesqueleto (Tyler, Kime, Cooke, & Driscoll, 1996).

La adición de glicerol en proporción de 4 % a 6% para la criopreservación disminuirá el estrés osmótico intracelular resultante de la deshidratación que se produce por la sustitución del agua intracelualr, necesaria para el mantenimiento del volumen celular (England, 1993) (Medeiros, Forell, Oliveira, & Rodrigues, 2002).

El uso de ácido cítrico en los diluyentes, neutralizaría los productos de desecho del metabolismo espermático (Salomon & Maxwell, 1995), que junto con los iones de sodio y potasio mantienen el equilibrio osmótico (Holy, 1983), también la adición de aminoácidos son capaces de aportar protección a la membrana del espermatozoide (Chen, Foote, & Brockett, 1993).



## CAPÍTULO VI

### 6. CONCLUSIONES

Según los resultados de esta investigación, se pueden realizar las siguientes conclusiones:

Al hacer las evaluaciones de motilidad individual progresiva, vitalidad espermática y anomalías en semen de toro, se encontraron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre los diluyentes post descongelados y los tiempos de equilibrio en horas.

1. Con respecto a motilidad, ambos diluyentes se comportaron en igual forma; pero los porcentajes más altos se obtuvieron con el tiempo de equilibrio de 2 horas.
2. El porcentaje más alto de vitalidad se obtuvo con el diluyente tryladil® con 2 horas de tiempo de equilibrio.
3. Con respecto a anomalías espermáticas, el tiempo de equilibrio en horas, con el cual se obtuvo el menor porcentaje de anomalías fue de 2 horas.



## CAPÍTULO VII

### 7. RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos en la investigación, permiten realizar las siguientes recomendaciones:

1. Utilizar 2 horas como tiempo de equilibrio a fin de alcanzar porcentajes más altos de motilidad espermática del semen de toro en crio-conservación.
2. Se debe utilizar tryladil® como diluyente y 2 horas como tiempo de equilibrio, para obtener los mejores porcentajes de vitalidad de espermatozoides en semen de toro.
3. El tiempo de equilibrio de 2 horas con el fin de reducir el porcentaje de anomalías en espermatozoides en semen de toro.



## CAPÍTULO VIII

### 8. BIBLIOGRAFÍA

- Aires, V., Hinsch, K., Mueller-Schloesser, S., & Bogner, E. (2003). *In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen*. Obtenido de Theriogenology: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/202003>
- Althouse, G., & Lu, K. (2005). *Bacteriospermia in extended porcine semen*. Obtenido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15626417>
- Andrabi, S. (2009). *Factors affecting the quality of cryopreservation buffalo (Bubalus bubalis) bull spermatozoa*. Obtenido de [http://www.uesc.br/cursos/pos\\_graduacao/mestrado/animal/bibliografia2012/paola\\_artigo3\\_factors.pdf](http://www.uesc.br/cursos/pos_graduacao/mestrado/animal/bibliografia2012/paola_artigo3_factors.pdf)
- Ansari, M., BA, R., SM, A., & S., A. (2011). *Effect of straw size and thawing time on quality of cryopreserved buffalo (Bubalus bubalis) semen*. Obtenido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21455280>
- Avila-Portillo, L. M., Madero, J., López, C., León, M. F., Acosta, L., Gómez, C., y otros. (2006). *Fundamentos de crio - preservacion*. Obtenido de [http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0034-74342006000400008&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0034-74342006000400008&script=sci_arttext)
- Avila-Portillo, L. M., Madero, J. I., López, C., León, M. F., Acosta, L., Gómez, C., y otros. (2006). *Fundamentos de criopreservación / Basic points in cryopreservation*. Obtenido de <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=441219&indexSearch=ID>
- Bergeron, A., Crete, M., Brindle, Y., & ManjunathP. (Marzo de 2004). *Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the*



*binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane.* Obtenido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14613896>

Borque, M., & Saguez, A. (1992). *Variaciones estacionales de los niveles de fructosa, ácido cítrico y proteínas totales en eyaculados de Moruecos de la Raza Manchega.* Obtenido de [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1609-91172008000200008](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172008000200008)

Braga, M., Franco, A., Rodrigues, A., Galeli, G., Olivera, K., Reis, F., y otros. (2006). *110 COMPARISON OF ANDROMED®, BIOXCELL®, AND BOTU-BOV® EXTENDERS FOR CRYOPRESERVATION OF BULL SEXED SEMEN.* Obtenido de [http://www.publish.csiro.au/view/journals/dsp\\_journal\\_fulltext.cfm?nid=44&f=RDv19n1Ab110](http://www.publish.csiro.au/view/journals/dsp_journal_fulltext.cfm?nid=44&f=RDv19n1Ab110)

Celeghini EC, d. A., Celeghini, E., De Arruda, R., De Andrade, A., Nascimento, J., Raphael, C., y otros. (2007). *Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin.* Obtenido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17368970>

Chen, Y., Foote, R., & Brockett, C. (1993). *Effect of sucrose, trehalose, hypotaurine, taurine, and blood serum on survival of frozen bull sperm.* Obtenido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8403993>

CM, R. (2006). *Prueba de integridad de membrana citoplasmática (endósmosis) en células espermáticas de toros jóvenes.*

Colenbrander, B., Gadellaa, B., & Stout, T. (2003). *The predictive value of semen analysis in the evaluation of stallion fertility.* Obtenido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12887569>

Dumont, P. (2002). *Adjusting the number of spermatozoa in ministraws by determination of the operative volume of bovine semen.* Obtenido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12035983>

E.S.E., H. (1987). *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales* (5a Edición ed.). Mexico: Interamericana S.A. de C.V. una división de McGraw-Hill.



- England, G. (1993). *Cryopreservation of dog semen: a review*. Obtenido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8229932>
- Fiser, P., & Fairfull, R. (1986). *The effect of rapid cooling (cold shock) of ram semen photoperiod and egg yolk in diluents on the survival of spermatozoa before and after freezing*. Obtenido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3802890>
- Fukui, Y., Kohno, H., Togari, T., Hiwasa, M., & Okabe, K. (2008). *Fertility after Artificial Insemination Using a Soybean - Based semen extender in sheep*. Obtenido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Fertility%20after%20Artificial%20Insemination%20Using%20a%20Soybean%20Based%20semen%20extender%20in%20sheep>
- Garde, J., Aguado, M., Pérez, S., Garrido, D., & Vázquez, I. (1995). *Tecnología para la conservación del semen de morueco*. Obtenido de <http://bddoc.csic.es:8080/detalles.html?id=92456&bd=ICYT&tabla=docu>
- Hafez, B., & Hafez, E. (2000). *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales* (Séptima ed.). México, México: Interamericana Mc Graw - Hill.
- Hafez, E. (1987). *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales* (5a Edición ed.). Mexico: Interamericana S.A. de C.V. una división de McGraw-Hill.
- Herold FC, d. H. (2006). *Comparison of equilibration times when freezing epididymal sperm from African buffalo (Syncerus caffer) using Triladyl or AndroMed*. Obtenido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16620923>
- Holy, L. (1983). *Bases Biológicas de la Reproducción Bovina*. México DF: Diana.



- Hummersted, R. H., Graham, J. K., & Nolan, J. P. (1990). *Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive*. Recuperado el 21 de Abril de 2012, de <http://www.andrologyjournal.org/cgi/content/abstract/11/1/73>
- Janett, F., Keo, S., Bollwein, H., Hassing, M., & Thun, R. (2005). *Comparison of AndroMed®, Bioxcell® and Triladyl® extender for cryopreservation of bull semen*.
- Kommisrud, B. E., Paulenz, H., Sehested, E., & Grevle, I. (2002). *Influence of Boar and Semen Parameters on*. Obtenido de <http://www.actavetscand.com/content/43/1/49>
- Lozano, H. (2009). *Factores que afectan la calidad seminal en toros*. Obtenido de <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/remeevez/.../14753>
- Manjunath, P., Bergeron, A., Lefebvre, J., & Fan, J. (2007). *Seminal plasma proteins: functions and interaction with protective agents during semen preservation*. Obtenido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17644964>
- Medeiros, C., Forell, F., Oliveira, A., & Rodrigues, J. (2002). *Current status of cryopreservation: why isn't it better*. Obtenido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11775978>
- Mendoza, J., Dulin, P., & Warrent, T. (2000). *The lower hydrolysis of ATP by the stress protein GroEL is a major factor responsible for the diminished chaperonin activity at low temperature*. Obtenido de Cryobiology: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11222029>
- Minitube. (2003). *Diluyente sin yema de huevo para conservación de semen bovino (en línea)*. (Minitub, Productor) Recuperado el 15 de 03 de 2012, de [http://www.minitube.de/var/StorageMinitube/Datenblaetter/135030200\\_AndroMed\\_es\\_101109.pdf](http://www.minitube.de/var/StorageMinitube/Datenblaetter/135030200_AndroMed_es_101109.pdf).



- NUR, Z. °., DOGAN, I., SOYLU, M., & AK, K. (2003). *Effect of different thawing procedures on the quality of bull semen*. Obtenido de [http://www.revmedvet.com/2003/RMV154\\_487\\_490.pdf](http://www.revmedvet.com/2003/RMV154_487_490.pdf)
- Parks, J., & Graham, J. (1992). *Effects of criopreservation procedures on sperm membranes*. Obtenido de Department of Animal Science, Cornell University Ithaca, NY 14853 USA.: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16727131>
- Pérez, B., González, J., Clemente, M., & García-Casado, P. (1999). *El test de endósmosis (HOST) en semen de ganado porcino*. Obtenido de Gestión Veterinaria Porcina: <http://194.30.13.80/AdministracionWeb/imagenes/gvporcina/albeitar30host.pdf>
- Pesch, S., & Hoffmann, B. (2007). *Cryopreservation of Smermatozoa in Veterinary Medicine*. Obtenido de Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology: <http://www.kup.at/kup/pdf/6429.pdf>
- Rubio-Gullen, J. L., Quintero - Moreno, A. A., & González Villalobos, D. M. (2009). *Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides de toros*. Obtenido de [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0798-22592009000400010](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592009000400010)
- Salomon, S., & Maxwell, W. (1995). *Frozen storage of ram semen. I processing frezzing, thawing and fertility after cervical insemination*. Obtenido de <http://www.journals.elsevierhealth.com/periodicals/anirep/article/0378-4320%2894%2901327-l/abstract>
- Sánchez, A., Rubilar, J., & Gatica, M. (2002). *Evaluation of fresh and frozen canine semen by hypoosmotic swelling test*. Obtenido de [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0301-732X2002000100014&lng=en&nrm=iso&ignore=.html](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-732X2002000100014&lng=en&nrm=iso&ignore=.html)
- Seidel, G. J. (2006). *Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation*. Obtenido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16263160>
-



- Senger PL, M. J. (1983). *Influence of cooling rates and extenders upon post-thaw viability of bovine spermatozoa packaged in .25-ml and .5-ml French straws.* Obtenido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6874607>
- Silva, P., & Gadella, B. (2006). *Detection of damage in mammalian sperm cells.* Obtenido de *Theriogenology*: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16242762>
- Stevenson, J., Higgins, J., & Jung, Y. (2009). *Pregnancy outcome after insemination of frozen - thawed bovine semen packaged into straw sizes: a meta- analysis.* Obtenido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19700703>
- Stornelli, M., Tittarelli, C., Savignone, C., & Stornelli, M. (2005). *Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal.* Obtenido de [http://old.fcv.unlp.edu.ar/analecta/volumenes/contenido/103\\_stornelli\\_criopreservacion.pdf](http://old.fcv.unlp.edu.ar/analecta/volumenes/contenido/103_stornelli_criopreservacion.pdf)
- Stradaioli , G., Noro, T., Sylla, L., & Monaci, M. (2007). *Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: comparison between two extenders.* Obtenido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17337045>
- Tartaglione CM, R. M. (2004). *Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen.* Obtenido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15325551>
- Trimeche, A., Yvon, J., Vidament, M., Palmer, E., & Magistrini, M. (1999). *Effects of glutamine, proline, histidine, and betaine on post.thaw motility of stallion spermatozoa.* Obtenido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10734416>
- Tyler, J., Kime, L., Cooke, S., & Driscoll, G. (1996). *Temperature change in cryo-containers during short exposure to ambient temperatures.* Obtenido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8671494>



- Van Wagtendonk-de Leeuw, A., Haring, R., Kaal-Lansbergen, L., & JH, D. D. (2000). *Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soy bean extract*. Obtenido de Theriogenology: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10990347>
- Viviana A. Aires, K.-D. H.-S.-S. (2009). *In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine*. Obtenido de <http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X%2809%2900460-9>
- Watson, P. F. (1995). *Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function*. Obtenido de <http://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8711221>
- Woelders, H. (1997). *Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen*. Obtenido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9323856>



**ANEXOS**

**Anexo No. 1. Motilidad espermática (%) para un DCA con arreglo factorial 2x3, con 4 repeticiones**

Tratam	Repeticiones				$\Sigma$ Trat	$\bar{x}$
	I	II	III	IV		
<b>d1t1</b>	45,00	42,00	43,00	38,25	168,25	<b>42,06</b>
<b>d1t2</b>	40,00	39,50	40,00	43,75	163,25	<b>40,81</b>
<b>d1t3</b>	38,75	38,75	40,00	38,75	156,25	<b>39,06</b>
<b>d2t1</b>	45,50	47,50	45,75	41,25	180,00	<b>45,00</b>
<b>d2t2</b>	42,50	40,00	40,00	44,25	166,75	<b>41,69</b>
<b>d2t3</b>	41,25	37,50	38,75	37,50	155,00	<b>38,75</b>
<b><math>\Sigma</math> Rep</b>	<b>253,00</b>	<b>245,25</b>	<b>247,50</b>	<b>243,75</b>	<b>989,50</b>	<b>41,23</b>

Triladyl: d1

t1: 2 horas

t3: 7 horas

AndroMed : d2

t2: 5 horas



**Anexo No. 2. Factores y simbología para el estudio de MIP<sup>6</sup>**

Factor	Símbolo	Niveles	símbolo
Diluyente	A	2	a
Tiempo	B	3	b
repeticiones		4	n

**Anexo No. 3. Sumatoria de factores e interacciones diluyente – tiempo de equilibrio (AxB), para MIP<sup>6</sup>**

		Tiempo (B)			Σ A	$\bar{x}$
		t1	t2	t3		
A						
Diluyente (A)	d1	168,25	163,25	156,25	<b>487,75</b>	40,65
	d2	180,00	166,75	155,00	<b>501,75</b>	41,81
Σ B		<b>348,25</b>	<b>330,00</b>	<b>311,25</b>	989,50	
$\bar{x}$		43,53	41,25	38,91		



**Anexo No. 4. Cálculos de ADEVA de motilidad progresiva**

1. FC =	$\frac{(\sum x_{ij})^2}{abcn}$	=	$\frac{989,50^2}{24}$	=	40796,26
2. SC Tot =	$\sum x^2_{ij} - FC$	=	40981 - 40796	=	184,86
3. SC Trat =	$\frac{\sum x^2_{ijk} - FC}{n}$	=	$\frac{163603}{4} - 40796$	=	104,5525
SC A (Diluy) =	$\frac{\sum x^2_{i..}}{bn} - FC$	=	40804 - 40796	=	8,17
SC B(Tiempo) =	$\frac{\sum x^2_{.j.}}{an} - FC$	=	40882 - 40796	=	85,57
SC A x B =	$\frac{\sum x^2_{ij.}}{n} - FC - (SC A + SC B)$	=	104,55 - 93,7	=	10,81
4. SC EExp =	SC Tot - SC Trat - SC Rep =	=		=	80,31



**Anexo No. 5. ADEVA para un DBA con arreglo factorial 2X3 con 4 repeticiones para motilidad espermática.**

F. de V.	gl	SC	CM	F.Cal	Ftab	
					0,05	0,01
<b>Total</b>	<b>23</b>	184,86				
(Tratamiento)	<b>5</b>	104,5525				
Diluyente (A)	1	8,17	8,17	1,83 ns	4,41	8,29
Tiempo (B)	2	85,57	42,79	9,59 **	3,55	6,01
A x B	2	10,81	5,41	1,21 ns	3,55	6,01
E.Exp	<b>18</b>	80,31	4,46			

CV = 5,12%



**Anexo No. 6. Cálculo de promedios y error estándar para motilidad progresiva**

B (Tiempo)	t1	43,53	
	t2	41,25	0,75
	t3	38,91	

**Anexo No. 7. Pruebas de significación al 95% para motilidad progresiva**

	D =	Q( $\alpha$ ; p; fe)S0			
	D =	Q(0,05; 2; 18)S0			
	D =	2,97	3,12		
	D =	2,22	2,33001		
ORDENAMIENTO DE MEDIAS					
	A	B	C		
	<b>t1</b>	<b>t2</b>	<b>t3</b>		
	43,53	41,25	38,91		
	a	b	C		
Trat			Difer	Duncan	Signif
A-B	43,53	41,25	2,28	2,22	s
A-C	43,53	38,91	4,63	2,33	s
B-C	41,25	38,91	2,34	2,22	S



**Anexo No. 8. Vitalidad espermática (%) para un DCA con arreglo factorial 2x3, con 4 repeticiones en vitalidad espermática (VE)**

Tratam	Repeticiones				$\Sigma$ Trat	$\bar{x}$
	I	II	III	IV		
<b>d1t1</b>	55,00	52,50	53,75	57,50	218,75	<b>54,69</b>
<b>d1t2</b>	58,75	53,75	52,00	53,75	218,25	<b>54,56</b>
<b>d1t3</b>	46,25	45,00	46,25	46,25	183,75	<b>45,94</b>
<b>d2t1</b>	52,50	50,00	56,25	55,00	213,75	<b>53,44</b>
<b>d2t2</b>	47,50	51,25	48,75	46,25	193,75	<b>48,44</b>
<b>d2t3</b>	45,00	41,25	46,25	47,50	180,00	<b>45,00</b>
<b><math>\Sigma</math> Rep</b>	<b>305,00</b>	<b>293,75</b>	<b>303,25</b>	<b>306,25</b>	<b>1208,25</b>	<b>50,35</b>

Triladyl: d1

t1: 2 horas

t3: 7 horas

AndroMed : d2

t2: 5 horas



**Anexo No. 9. Factores y simbología para el estudio de vitalidad espermática (VE)**

Factor	símbolo	Niveles	símbolo
Diluyente	A	2	a
Tiempo	B	3	b
Repeticiones		4	N

**Anexo No. 10. Sumatoria de factores e interacciones diluyente – tiempo de equilibrio (AxB, para VE).**

A		Tiempo (B)			$\Sigma A$	$\bar{x}$
		t1	t2	t3		
<b>Diluyente (A)</b>	d1	218,75	218,25	183,75	<b>620,75</b>	51,73
	d2	213,75	193,75	180,00	<b>587,50</b>	48,96
$\Sigma B$		<b>432,50</b>	<b>412,00</b>	<b>363,75</b>	1208,25	
$\bar{x}$		54,06	51,50	45,47		



**Anexo No. 11. Cálculos de ADEVA para VE.**

	1208,2		60827,8
1. FC = $\frac{(\sum x_{ij})^2}{abcn}$ =	-	$\frac{5^2}{24}$	= 4
		6082	
2. SC Tot = $\sum x^2_{ij} - FC$ =	61318	-	8 = 490,22
		6082	391,363
3. SC Trat = $\frac{\sum x^2_{ijk}}{n} - FC$ =	<u>244877</u>	-	8 = 1
		4	
		6082	
SC A (Diluy) = $\frac{\sum x^2_{i..}}{bn} - FC$	60874	-	8 = 46,06
SC B(Tiempo)		6082	
= $\frac{\sum x^2_{.j.}}{an} - FC$	61139	-	8 = 311,45
		$\frac{\sum x^2_{ij..}}{n} - FC - (SC A + SC$	
SC A x B = B)	391,36	-	357,5 = 33,85
4. SC EExp = SC Tot - SC Trat - SC Rep =			= 98,86



**Anexo No. 12. ADEVA para un DBA con arreglo factorial 2X3 con 4 repeticiones, para VE.**

F. de V.	gl	SC	CM	F.Cal		Ftab	
						0,05	0,01
<b>Total</b>	<b>23</b>	490,22					
(Tratam)	<b>5</b>	391,3631					
Diluyente (A)	1	46,06	46,06	8,39	**	4,41	8,29
Tiempo (B)	2	311,45	155,73	28,35	**	3,55	6,01
A x B	2	33,85	16,93	3,08	ns	3,55	6,01
E.Exp	<b>18</b>	98,86	5,49				

CV = 4,65%



**Anexo No. 13. Cálculo de promedio, y Error Estándar por  
tratamiento e interacciones para VE**

Factor	Tratamiento	Promedio	Error estándar
A (Diluyente)	d1 Tyladil	51,73	0,68
	d2 Andromed	48,96	
B (Tiempo)	t1 2 hrs	54,06	0,83
	t2 4 hrs	51,50	
	t3 7 hrs	45,47	



**Anexo No. 14. Prueba de significación de Duncan al 5%, para separación de promedios de VE.**

	D =	Q( $\alpha$ ; p; fe)S <sub>0</sub>				
	D =	Q(0,05; 1; 18)S <sub>0</sub>			<b>0,68</b>	
	D =	2,97				
	D =	<b>2,009</b>				
<b>ORDENAMIENTO DE MEDIAS</b>						
	A	B				
	<b>d1</b>	<b>d2</b>				
	51,73	48,96				
<b>Comparación de medias</b>				<b>Dif.</b>	<b>Duncan</b>	<b>Signif.</b>
A-B =	51,73	-	48,96	2,77	2,01	*



**Anexo No. 15. Prueba de significación de Duncan al 5%, para separación de promedios de vitalidad espermática para 3 tiempos de equilibrio, en VE.**

	D =	Q(a; p; fe)S0			
	D =	Q(0,05; 2; 18)S0			0,83
	D =	2,97	3,12		
	D =	2,46	2,59		
<b>ORDENAMIENTO DE MEDIAS</b>					
	A	B	C		
	<b>t1</b>	<b>t2</b>	<b>t3</b>		
	54,06	51,50	45,47		
	a	b	c		
Trat			Difer	Duncan	Signif
A-B	54,06	51,50	2,56	2,46	S
A-C	54,06	45,47	8,59	2,59	S
B-C	51,50	45,47	6,03	2,46	S



**Anexo No. 16. Anomalías espermáticas (%) para un DCA con arreglo factorial 2x3, con 4 repeticiones en anomalías espermáticas**

Tratam	Repeticiones				$\Sigma$ Trat	$\bar{x}$
	I	II	III	IV		
d1t1	8,00	10,00	10,50	10,50	39,00	9,75
d1t2	10,50	10,50	8,75	11,75	41,50	10,38
d1t3	10,75	10,75	9,75	10,50	41,75	10,44
d2t1	9,50	9,75	9,25	10,00	38,50	9,63
d2t2	11,00	8,75	10,75	10,50	41,00	10,25
d2t3	10,50	11,50	11,25	13,00	46,25	11,56
$\Sigma$ Rep	60,25	61,25	60,25	66,25	248,00	10,34

Triladyl: d1

t1: 2 horas

t3: 7

horas

AndroMed : d2

t2: 5 horas

**Anexo No. 17. Factores y simbología para el estudio de anomalías espermáticas**

Factor	símbolo	Niveles	símbolo
Diluyente	A	2	A
Tiempo	B	3	B
Repeticiones		4	N



**Anexo No. 18. Sumatoria de factores e interacciones diluyente – tiempo de equilibrio (Ax B, para anomalías espermáticas)**

A		Tiempo (B)			Σ A	$\bar{x}$
		t1	t2	t3		
Diluyente (A)	d1	39,00	41,50	41,75	<b>122,25</b>	10,19
	d2	38,50	41,00	46,25	<b>125,75</b>	10,48
Σ B		<b>77,50</b>	<b>82,50</b>	<b>88,00</b>	248,00	
$\bar{x}$		9,69	10,31	11,00		

**Anexo No. 19. Cálculos de ADEVA para anomalías espermática**

1. FC =	$\frac{(\sum x_{ij})^2}{abcn}$	=	$\frac{248,00^2}{24}$	=	2562,67
2. SC Tot =	$\sum x^2_{ij} - FC$	=	2588 - 2563	=	25,7
3. SC Trat =	$\frac{\sum x^2_{ijk} - FC}{n}$	=	$\frac{10289}{4} - 2563$	=	9,48625
SC A (Diluy)	$\frac{\sum x^2_{i..}}{bn} - FC$	=	2563 - 2563	=	0,51
SC B(Tiempo)	$\frac{\sum x^2_{.j.}}{an} - FC$	=	2570 - 2563	=	6,89
SC A x B =	$\frac{\sum x^2_{ij.}}{n} - FC - (SC A + SC B)$	=	9,49 - 7,4	=	2,09
4. SC EExp =	$SC Tot - SC Trat - SC Rep$	=		=	16,21



**Anexo No. 20. ADEVA para un DBA con arreglo factorial 2X3 con 4 repeticiones, para anomalías espermáticas**

F. de V.	gl	SC	CM	F.Cal		Ftab	
						0,05	0,01
<b>Total</b>	<b>23</b>	25,7					
(Tratam)	<b>5</b>	9,48625					
Diluyente (A)	1	0,51	0,51	0,57	ns	4,41	8,29
Tiempo (B)	2	6,89	3,45	3,83	*	3,55	6,01
A x B	2	2,09	1,05	1,16	ns	3,55	6,01
E.Exp	<b>18</b>	16,21	0,90				

CV = 9,18%

**Anexo No. 21. Cálculo de promedio, y Error Estándar por tratamiento e interacciones para anomalías espermáticas**

Factor	Tratamiento	Promedio	Error estándar
B (Tiempo)	t1	9,69	
	t2	10,31	0,34
	t3	11,00	



**Anexo No. 22. Prueba de significación de Duncan al 5%, para separación de promedios de porcentajes de anomalías espermáticas.**

	D =	Q( $\alpha$ ; p; fe)S0			
	D =	Q(0,05; 2; 18)S0			<b>0,34</b>
	D =	2,97	3,12		
	D =	0,996	1,047		
		<b>ORDENAMIENTO DE MEDIAS</b>			
	<b>t1</b>	<b>t2</b>	<b>t3</b>		
	9,69	10,31	11,00		
	a	a			
		b	b		
Trat			Difer	Duncan	Signif
A-B	9,69	10,31	0,63	0,996	Ns
A-C	9,69	11,00	1,31	1,047	s
B-C	10,31	11,00	0,69	0,996	Ns