

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA**

**LA MOLINA**

**FACULTAD DE ZOOTECNIA**



**“INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA CITOPASMÁTICA EN SEMEN  
REFRIGERADO Y CONGELADO DE TOROS USANDO  
DOS DILUTORES SINTÉTICOS”**

Presentada por:

**PEDRO LUIS CABRERA MONTES**

Tesis para Optar el Título Profesional de:

**INGENIERO ZOOTECNISTA**

Lima – Perú

**2021**

---

La UNALM es la titular de los derechos patrimoniales de la presente investigación  
(Art. 24. Reglamento de Propiedad Intelectual)

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**FACULTAD DE ZOOTECNIA**

**“INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA CITOPASMÁTICA EN SEMEN  
REFRIGERADO Y CONGELADO DE TOROS USANDO  
DOS DILUTORES SINTÉTICOS”**

Presentada por:

**PEDRO LUIS CABRERA MONTES**

Tesis para Optar el Título Profesional de:

**INGENIERO ZOOTECNISTA**

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

---

Ing. Enrique Alvarado Malca  
Presidente

---

M.V. Segundo Gamarra Carrillo  
Miembro

---

Ing. Amalia Gallegos Cárdenas  
Miembro

---

Ing. Próspero Cabrera Villanueva  
Asesor

## DEDICATORIA

DIRIGIDO A MIS PADRES JOSÉ  
LUIS CABRERA GUZMAN Y  
CARMEN DELIA MONTES  
ÁRIAS, POR TODO EL APOYO Y  
COMPRENSIÓN DURANTE ESTE  
LARGO TIEMPO PARA EL  
DESARROLLO Y FORMACIÓN  
DE QUIEN REDACTA

A MIS HERMANAS CARMEN  
CABRERA MONTES Y LUZ DEL  
CARMEN CABRERA MONTES  
CON MUCHO CARÍO POR  
CADA UNA DE SUS ACCIONES  
FRENTE AL MENOR DE LOS  
HERMANOS.

A MI PERSONA FAVORITA QUE  
ME ACOMPAÑÓ Y ME SIGUE  
ACOMPAÑANDO KELLY  
LOARTE MELGAREJO, POR  
EXISTIR Y COINCIDIR EN ESTE  
LARGO CAMINO DE LA VIDA

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero dejar bajo escrito mi más grato agradecimiento al Ing. Mg. Sc. Prospero Cabrera Villanueva, por cada momento compartido no solo para el desarrollo de dicha investigación, sino también por cada consejo de vida en base a su gran recorrido y experiencia. Cada una de sus acertadas frases siempre quedara en mi memoria. No hay palabra que pueda contener por completo dicho agradecimiento por compartir su experiencia como Asesor de tesis, como profesor, como padre, como ciudadano como un gran amigo.

A la Ing. Amalia Gallegos Cárdenas, por todo su apoyo incondicional durante la ejecución y desarrollo de la investigación.

Al Banco Nacional de Semen y todo su equipo técnico que lo conforma por brindar las instalaciones, imprescindible para esta investigación.

A la Universidad Nacional Agraria la Molina y todos aquellos que integran la plana docente de esta gran casa de estudio el cual contribuyeron en la formación de un profesional más.

A todo el equipo administrativo y autoridades de la Facultad de Zootecnia, por la orientación y acompañamiento.

A todos mis amigos que compartieron momentos y experiencias vividas durante esta etapa de la vida.

A mis familiares que de alguna u otra forma contribuyeron conmigo para la ejecución de mis objetivos profesionales.

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	ix
ABSTRAC.....	x
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. REVISION DE LITERATURA.....	4
2.1 La célula espermática .....	4
2.2 La membrana citoplasmática .....	4
2.3 Los canales iónicos o proteínas de comunicación .....	5
2.4 Capacitación espermática.....	6
2.5 Reacción Acrosomal.....	7
2.6 La fecundación .....	7
2.7 Parámetros seminales considerados para evaluación seminal .....	8
2.7.1 Concentración espermática .....	8
2.7.2 Motilidad espermática .....	8
2.7.3 Vitalidad espermática .....	9
2.7.4 Determinación de anormalidades espermáticas .....	9
2.7.5 Integridad acrosomal de los espermatozoides .....	10
2.7.6 Integridad de la membrana citoplasmática .....	11
2.8 Test de endosmosis espermática (HOST; Hypo-Osmotic Swelling Test).....	11
2.9 Efecto del medio hipo osmótico sobre la membrana espermática.....	12
2.10 Sobre la evolución del análisis seminal .....	14
2.11 De los dilutores para la dilución del semen de toro.....	15
2.11.1 Dilutor sintético comercial AndroMed ® .....	15
2.11.2 Dilutor sintético comercial OPTIXcell.....	16
2.11.3 Similitudes y diferencias entre dilutores OPTIXcell y AndroMed .....	17
2.11.4 Proteínas del plasma seminal frente a los diluyentes. ....	19
2.12 Características seminales frente a diluyentes comerciales sintéticos.....	19
2.13 Técnica de inseminación artificial .....	25

2.14	Efecto del cambio climático y el estrés calórico en la reproducción .....	25
2.15	Sobre las razas .....	27
2.15.1	Raza Braunvieh .....	27
2.15.2	Raza Simmental.....	28
III.	MATERIALES Y METODOS.....	30
3.1	FASE DE CAMPO .....	30
3.1.1	Los animales .....	30
3.1.2	Las colecciones de eyaculados de los toros .....	31
3.2	FASE DE LABORATORIO .....	33
3.2.1	Evaluación del semen .....	34
3.2.2	Método de conservación de pajillas de semen .....	37
3.2.3	Evaluación de la integridad de la membrana citoplasmática. ....	39
3.2.4	Protocolo de Correa y Zavos, (1994) para la aplicación de la prueba hipoosmótica en semen descongelado:.....	39
3.3	ANALISIS ESTADISTICOS .....	43
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIONES .....	45
4.1	Características seminales de los toros .....	45
4.2	Visualización y nitidez frente al CASA .....	46
4.3	Características del semen refrigerado.....	47
4.3.1	Motilidad espermática individual.....	47
4.3.2	Vitalidad espermática .....	48
4.3.3	Integridad de membrana.....	49
4.4	Características del semen descongelado .....	51
4.4.1	Motilidad espermática individual.....	51
4.4.2	Vitalidad espermática .....	52
4.4.3	Integridad de membrana.....	53
V.	CONCLUSIONES .....	56
VI.	RECOMENDACIONES .....	57
VII.	BIBLIOGRAFIA.....	58
VIII.	ANEXOS.....	67

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Composición química de dilutores Optixcell y Andromed .....	18
Tabla 2: Recopilación de investigaciones sobre la evaluación de la motilidad espermática. S/N, sin especificar; *, no se reporta datos .....	21
Tabla 3: Recopilación de investigaciones sobre la evaluación de la vitalidad espermática. S/N, sin especificar; *, no se reporta datos .....	22
Tabla 4: Recopilación de investigaciones sobre evaluación de la integridad de la membrana espermática en semen refrigerado .....	23
Tabla 5: Recopilación de investigaciones sobre evaluación de la integridad de la membrana espermática en semen descongelado .....	24
Tabla 6: Edad y código de cada toro que se utilizaron en el experimento. ....	30
Tabla 7: Solución Hipo-osmótica; Correa et al. (1994).....	39
Tabla 8: Correa et al. (1994). Medio de lavado.....	41
Tabla 9: Resultados de la evaluación del semen puro considerando todos los eyaculados .....	45
Tabla 10: Resultados de medias y desviaciones estándar para características de volumen y concentración espermática de toros experimentales.....	46
Tabla 11: Promedios y desviaciones estándar de volumen seminal por razas de toros experimentales .....	46
Tabla 12: Promedios de Motilidad espermática en Porcentajes y desviaciones estándar de semen refrigerado de toros de razas Simmental y Braunvieh según dilutor empleado.....	47
Tabla 13: Vitalidad del semen refrigerado .....	48
Tabla 14: Promedios de porcentajes más desviaciones estándar de la prueba de HOS en semen refrigerado, por razas de toros .....	49
Tabla 15: Resultados porcentuales de motilidad espermática según dilutores utilizado y razas de toros en semen descongelado. ....	51
Tabla 16: Resultados porcentuales de la vitalidad en semen descongelado.....	52
Tabla 17: Comparación porcentual del test de HOS en semen descongelado.....	53

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Paso y secuencia de procesos durante el trayecto del espermatozoide hacia el ovocito dentro del tracto reproductivo de a hembra. ....	6
Figura 2. Study of Sperm Evaluation Parameters to Estimate Cryopreserved Bovine Semen Fertility (Morado, 2015).....	12
Figura 3. Cambios morfológicos de adaptación osmótica del espermatozoide frente al estrés hiposmótico. Jeyendran et al., (1984). ....	13
Figura 4. Enrollamiento e hinchazón de la cola en microscopio electrónico de barrido. Yeung et al., (2009).....	14
Figura 5. Dilutor sintético comercial AndroMed de 200ml. ....	16
Figura 6. Dilutor sintético comercial Optixcell de 200ml. ....	17
Figura 7. Esquema del efecto hormonal que ejerce el estrés frente al hipotálamo-hipófisis- gónadas. Vélez et al. (2010).....	26
Figura 8. Equipo de trabajo del Banco Nacional de Semen en las instalaciones de la Estación experimental Donoso del MINAGRI .....	30
Figura 9. Toros utilizados para las colecciones y sus respectivas pruebas.....	31
Figura 10. Equipos y materiales usados para las colecciones .....	32
Figura 11. Brete para entrenamiento y colección de toros. ....	32
Figura 12. Momento del golpe de riñón y colección de toros con vagina artificial. ....	33
Figura 13. Muestra de semen en tubo graduado de 15 ml. ....	34
Figura 14. Espectro fotómetro SDM 1 .....	35
Figura 15. Cubeta microvolumétrica para la lectura en el Espectrofotómetro SDM 1 .....	35
Figura 16. Sistema CASA del Banco Nacional de Semen de la UNALM. ....	36
Figura 17. Imagen de contraste positiva y negativa capturada del microscopio de contraste de fases de una muestra de semen con la tinción vital Eosina/Nigrosina. ....	37
Figura 18. Equipos para la congelación de semen.....	38
Figura 19. Pajillas de semen congelados .....	38



Figura 20. Almacenamiento de las pajillas a los tanques de nitrógeno e inmediato descongelado de pajilla para la evaluación del proceso.....	39
Figura 21. a) Descongelación de pajilla de semen; b) Depósito de la muestra de semen en tubos eppendorf; c) Adición de la solución hipoosmótica; d) Incubación en baño María a 34 C° por 60 minutos. ....	40
Figura 22. Visualización de muestras en el sistema CASA. ....	41
Figura 23. Esquema N°1: Fases de la prueba de endosmosis en semen refrigerado y congelado .....	42
Figura 24. Fijación de muestras frente al HOST en sus diferentes niveles de reacción; la clasificación en función de su reacción según Jeyendran (1984). ....	43
Figura 25. Imagen de campos visualizados en el CASA. a) Optixcell; b) Andromed. ....	47
Figura 26. Esquema N°2: Comparación porcentual en semen refrigerado. ....	50
Figura 27. Esquema N°3: Comparación porcentual en semen descongelado. ....	54

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 .....	68
Anexo 2: Modelo lineal general: ANOVA - MOTILIDAD vs. DILUTORES, RAZAS (refrigerado) .....	69
Anexo 3: Estadísticas descriptivas: MOTILIDAD (refrigerado), Resultados de DILUTORES = ANDROMED .....	69
Anexo 4: Estadísticas descriptivas: MOTILIDAD (refrigerado), Resultados de DILUTORES = OPTIXCELL .....	70
Anexo 5: Estadísticas descriptivas: MOTILIDAD (refrigerado).....	70
Anexo 6: Pruebas de agrupación de Tukey de la motilidad con una confianza de 95.0% en semen refrigerado.....	70
Anexo 7: Modelo lineal general: ANOVA - VITALIDAD vs. DILUTORES, RAZAS (refrigerado) .....	71
Anexo 8: Estadísticas descriptivas: VITALIDAD (refrigerado), Resultados de DILUTORES = ANDROMED .....	71
Anexo 9: Estadísticas descriptivas: VITALIDAD (refrigerado), Resultados de DILUTORES = OPTIXCELL .....	72
Anexo 10: Estadísticas descriptivas: VITALIDAD (refrigerado).....	72
Anexo 11: Pruebas de agrupación de Tukey para la vitalidad con una confianza de 95.0% en semen refrigerado. ....	72
Anexo 12: Modelo lineal general: ANOVA - HOST vs. DILUTORES, RAZAS (refrigerado .....	73
Anexo 13: Estadísticas descriptivas: HOST (refrigerado), Resultados de DILUTORES = ANDROMED.....	73
Anexo 14: Estadísticas descriptivas: HOST (refrigerado), Resultados de DILUTORES = OPTIXCELL .....	74
Anexo 15: Estadísticas descriptivas: HOST (refrigerado) .....	74

Anexo 16: Pruebas de agrupación de Tukey para el HOST con una confianza de 95.0% en semen refrigerado. ....	75
Anexo 17: Modelo lineal general: ANOVA - MOTILIDAD vs. DILUTORES, RAZAS (descongelado).....	75
Anexo 18: Estadísticas descriptivas: MOTILIDAD (descongelado), Resultados de DILUTORES = ANDROMED .....	76
Anexo 19: Estadísticas descriptivas: MOTILIDAD (descongelado), Resultados de DILUTORES = OPTIXCELL .....	76
Anexo 20: Estadísticas descriptivas: MOTILIDAD (descongelado) .....	77
Anexo 21: Pruebas de agrupación de Tukey para la motilidad con una confianza de 95.0% en semen descongelado .....	77
Anexo 22: Modelo lineal general: ANOVA - VITALIDAD vs. DILUTORES, RAZAS (descongelado).....	78
Anexo 23: Estadísticas descriptivas: VITALIDAD (descongelado), Resultados de DILUTORES = ANDROMED .....	78
Anexo 24: Estadísticas descriptivas: VITALIDAD (descongelado), Resultados de DILUTORES = OPTIXCELL .....	79
Anexo 25: Estadísticas descriptivas: VITALIDAD (descongelado).....	79
Anexo 26: Pruebas de agrupación de Tukey para la vitalidad con una confianza de 95.0% en semen descongelado. ....	80
Anexo 27: Modelo lineal general: ANOVA - HOST vs. DILUTORES, TOROS (descongelado).....	80
Anexo 28: Estadísticas descriptivas: HOST (descongelado), Resultados de DILUTORES = ANDROMED.....	81
Anexo 29: Estadísticas descriptivas: HOST (descongelado), Resultados de DILUTORES = OPTIXCELL .....	81
Anexo 30: Estadísticas descriptivas: HOST (descongelado) .....	82
Anexo 31: Pruebas de agrupación de Tukey para el HOST con una confianza de 95.0% en semen descongelado. ....	82

Anexo 32: Grafica de cajas de la MOTILIDAD (refrigerado) .....	83
Anexo 33: Grafica de cajas de la VITALIDAD (refrigerado).....	83
Anexo 34: Grafica de cajas del HOST (refrigerado).....	84
Anexo 35: Grafica de cajas de la MOTILIDAD (descongelado).....	84
Anexo 36: Grafica de cajas de la VITALIDAD (descongelado).....	85
Anexo 37: Grafica de cajas del HOST (descongelado).....	85

## RESUMEN

Se utilizaron cuatro toros de razas Simmental y Braunvieh (2 de cada raza) perteneciente a la Estación experimental Donoso del MINAGRI. Se extrajeron muestras de semen para su procesamiento (refrigeración y congelación) en el Banco Nacional de Semen evaluándose el efecto de los dilutores sintéticos Optixcell y Andromed sobre la integridad de la membrana citoplasmática.

Se analizó la concentración espermática, pH, motilidad, vitalidad e integridad de la membrana citoplasmática usando solución hipoosmótica (100 mOsm/L).

Para el análisis estadístico se utilizó el paquete estadístico Minitab usando un diseño de bloques completamente al azar tomando como tratamientos a los dilutores y como bloques a cada raza de toro. Se aplicó un DBCA para las características motilidad, vitalidad y HOST espermáticos, para semen refrigerado y descongelado en ocho repeticiones.

En la evaluación del semen puro se obtuvieron las medias  $3.34 \pm 1.42$  ml en volumen,  $1442.40 \pm 327.34$  millones de espermatozoides/ml de concentración, 3.8 de motilidad masal, 7 de pH y color blanco cremoso. En los resultados del ANOVA para el semen refrigerado; en la prueba de endosmosis (HOST) se obtuvo  $48.97 \pm 15.23$  % y  $39.66 \pm 13.39$ % utilizando Andromed y Optixcell respectivamente encontrando diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). En relación al semen descongelado se obtuvo  $41.15 \pm 10.26$ % y  $26.82 \pm 7.30$ % de endosmosis con Optixcell y Andromed respectivamente encontrándose también diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

Por lo que se concluye que el dilutor Optixcell mejoró la conservación de la integridad de la membrana citoplasmática de espermatozoides.

Con respecto a las razas, se encontró diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en la motilidad y vitalidad en semen refrigerado y descongelado. Sin embargo, en la prueba de HOST no se evidenció diferencias estadísticas ( $P \geq 0.05$ ) tanto en semen refrigerado y descongelado.

**Palabras claves:** HOST, integridad de membrana, hipo-osmótico,

## ABSTRAC

Four Simmental and Braunvieh bulls (2 of each breed) from the Donoso Experimental Station of MINAGRI were used. Semen samples were extracted for processing (refrigeration and freezing) at The National Sperm Bank and the effect of the synthetic dilutors Optixcell and Andromed on the integrity of the cytoplasmic membrane was evaluated.

Sperm concentration, pH, motility, vitality and cytoplasmic membrane integrity were analyzed using hypoosmotic solution (100 mOsm/L).

For statistical analysis, the Minitab statistical package was used using a completely randomized block design with dilutors as treatments and each bull breed as blocks. A DBCA was applied for sperm motility, vitality and HOST characteristics, for refrigerated and thawed semen in eight replicates.

In the evaluation of pure sperm, the means  $3.34 \pm 1.42$  ml in volume,  $1442.40 \pm 327.34$  million spermatozoa/ml of concentration, 3.8 of mass motility, 7 of pH and creamy white color were obtained. In the ANOVA results for the refrigerated semen; in the endosmosis test (HOST),  $48.97 \pm 15.23$  % and  $39.66 \pm 13.39$ % were obtained using Andromed and Optixcell respectively, finding significant differences ( $P < 0.05$ ). In relation to the thawed sperm,  $41.15 \pm 10.26$ % and  $26.82 \pm 7.30$ % of endosmosis were obtained with Optixcell and Andromed respectively, also finding significant differences ( $P < 0.05$ ).

Therefore, it is concluded that the Optixcell dilutor improved the conservation of the integrity of the cytoplasmic membrane of spermatozoa.

With respect to the breeds, significant differences ( $P < 0.05$ ) were found in motility and vitality in refrigerated and thawed sperm. However, in the HOST test, no statistical differences ( $P \geq 0.05$ ) were found in both refrigerated and thawed sperm.

**Keywords:** HOST, membrane integrity, hypo-osmotic.

## I. INTRODUCCIÓN

Uno de los pilares más importantes en la ganadería lechera es la reproducción; a través de los años se ha manifestado esta importancia con la generación de proyectos de implementación de técnicas reproductivas como son la inseminación artificial, transferencia de embriones, FIV, ICSI, clonación, entre otras; sin embargo, la IA ha sido la técnica más difundida, de menor costo, y de fácil acceso a los ganaderos de nuestro país.

En la actualidad la ganadería bovina se ha venido desarrollando a grandes pasos con la implementación de técnicas reproductivas de mayor difusión desde los primeros trabajos en I.A. en el año 40. Esto desencadenó una nueva visión donde el ganadero tenía la posibilidad de obtener y mejorar en cada fertilización la aptitud productiva de sus ejemplares y de su descendencia.

Estos avances tecnológicos e innovadores fueron abarcando sectores del país que en un momento hubiese parecido imposible; en la actualidad llega a cada rincón del país. No obstante, en la actualidad las vacas están presentando un insatisfactorio desempeño reproductivo debido a múltiples factores como son la selección artificial, nutricional y ambiental.

A medida que se iba segregando caracteres productivos de alta performance orientados al rendimiento económico (productivos) se fue también desplazando la importancia de aquellas características biológicas (reproductivas) que hasta el día de hoy se ve como una suerte de consecuencia.

En este contexto los fines zootécnicos en base a producción fue beneficiando al productor, pero sin embargo biológicamente las consecuencias fueron recargándose año tras año a los animales mejorados. Sin darnos cuenta trocamos de manera exitosa las características deseadas como precocidad y alta producción por aquellas características indeseables como baja fertilidad, disminución de la longevidad y bienestar sanitario (Camargo, 2012).

Por otra parte, los balances energéticos negativos y los cambios metabólicos en animales de alto rendimiento nos abren otra brecha de estudio bajo términos de infertilidad. En observaciones de modelos *in vitro* se ha demostrado que las bajas tasas de concepción y mortalidad embrionaria temprana tienen una correlación con el aspecto nutricional (balance energético negativo), ya que repercute en altos contenidos de ácidos grasos esterificados, altas concentraciones de b-hidroxibutirato y bajas concentraciones de glucosa en el microclima folicular del ovocito dando como consecuencia su apoptosis (Leroy *et al.*, 2008).

Por otro lado, otros factores que han intervenido biológicamente y de gran importancia es el aspecto medio ambiental el cual se refleja en los animales a través del estrés calórico, este repercute a su vez en: aumento de la muerte embrionaria, disminución de la duración del celo y disminución en la tasa de preñez (Senger, 2005).

Estas causas se traducen finalmente en porcentajes bajos de fertilidad, repetición de celos, abortos, retención de placenta, etc.

Una herramienta que podría aportar en la subsanación de los índices reproductivos y optimizar la eficiencia reproductiva es el potenciar el factor macho, lo cual está referido particularmente a la calidad fecundante del semen durante la aplicación de técnicas reproductivas, principalmente en la I.A.

Centrándonos en la técnica de I.A. de mayor extensión en el país, hace falta realizar más pruebas en campo con el material genético procesado con los diferentes dilutores comerciales sintéticos que existen en el mercado que sean capaces de proveer nutrientes, de buena acción buffer, capacidad para mantener el balance electrolítico, capacidad de mantener la presión osmótica, inhibir el crecimiento bacteriano, aumentar el volumen seminal y proteger las células del congelamiento para obtener un semen diluido capaz de generar porcentajes altos de fecundidad, preñes y partos, subsanando y aminorando así algunos de los problemas reproductivos señalados anteriormente.

En este sentido enfocar las tecnologías frente a las pruebas y múltiples marcas de dilutores sintéticos libres de componente orgánico ha dado paso a la selección mercantil de parte de los laboratorios o centros genéticos existentes en el país la cual tiene como único objetivo potenciar el performance de la genética de toros sementales en el tiempo y conseguir así la máxima eficiencia reproductiva en cada centro pecuario.



Por lo anteriormente expuesto, los objetivos del presente trabajo de investigación son:

- Evaluar y comparar el efecto de los dilutores sintéticos sobre la integridad de la membrana citoplasmática de espermatozoides de toros mediante la prueba hipo-osmótica (HOST).
- Estudiar las características seminales de toros raza Simmental y Braunvieh.

## **II. REVISION DE LITERATURA**

### **2.1 La célula espermática**

En citología es uno de los cuerpos más especializados, considerado como una de las células que más a podido diferenciarse de todas las demás. Las bondades de poseer una cabeza contenida de una carga genética haploide y una cola con todos los mecanismos para su movimiento han permitido que esta pueda cumplir su objetivo fundamental que es la perpetuación de la especie como unidad básica transmisora de la herencia (Avalos, 2018). La célula espermática está cubierta por una membrana citoplasmática, posee un acrosoma o casquete acrosómico la cual se estructura por una doble capa entre la membrana citoplasmática y la anterior delantera de la línea ecuatorial de la cabeza, Tiene un cuello que une la cabeza con la cola, la cual a su vez se subdivide en segmento medio, principal y caudal (Hafez, 2002).

El espermatozoide es una célula altamente especializada y atípicas que para cumplir su función debe, después de ser eyaculado, experimentar una serie de cambios dentro de la anatomía genital femenina que le aporten su capacidad fecundante. A esta serie de eventos morfológicos se le conocen con el nombre de CAPACITACION ESPERMATICA y van a desencadenar a su vez, otras dos transformaciones sobre el espermatozoide. En primer lugar, originan un incremento en la motilidad o también llamado HIPERACTIVACION, para posteriormente promover un evento exocitótico entre la membrana plasmática y la acrosomal externa conocido como REACCION ACROSOMICA (López, 1992).

Los primordiales elementos bioquímicos de los espermatozoides son ácidos nucleicos, proteínas y lípidos. Cerca de la tercera parte del peso seco de una célula espermática corresponde al núcleo (Hafez, 2002).

### **2.2 La membrana citoplasmática**

Estructura básica, la bicapa fosfolipídica de las biomembranas celulares. Los fosfolípidos son moléculas con dos largas colas de ácidos grasos hidrófobos y una cabeza que contiene un grupo fosfato hidrófilo cargado. En las condiciones adecuadas, estas moléculas forman

una estructura espontánea organizada de membrana, más o menos similar a la película de una burbuja de jabón. Esta película laminar está compuesta por dos capas de fosfolípidos. En ambas capas, las cabezas hidrófilas que apuntan hacia el exterior establecen puentes de hidrógeno con el agua, y las colas hidrófobas se disponen hacia dentro. Las proteínas incluidas en esta bicapa se denominan proteínas de membrana intrínsecas y forman la típica estructura de biomembranas (Cunningham, 2005).

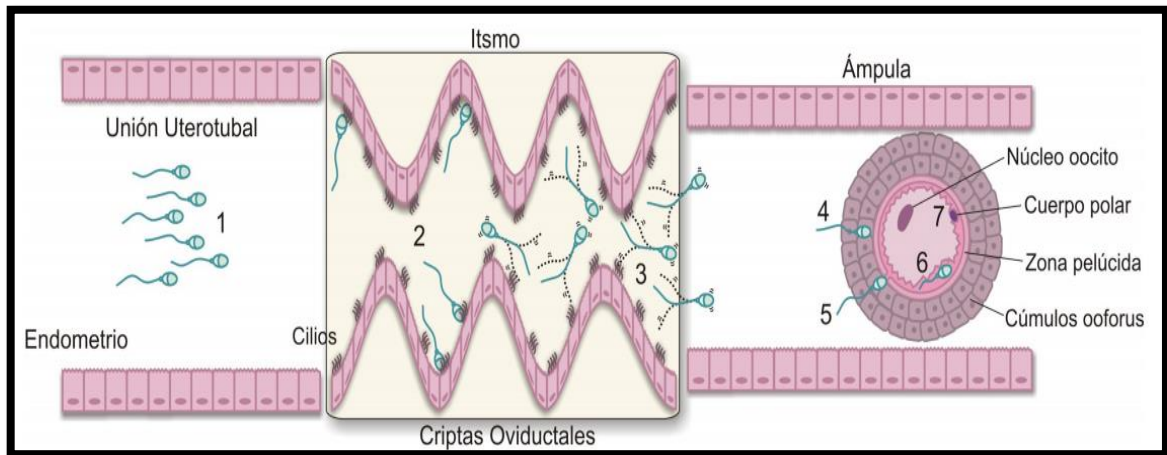
Según Hidalgo *et al.*, (2005), la pérdida de la integridad del plasmalema está precisamente relacionada con la falta de viabilidad celular, pero una membrana plasmática intacta no en todos los casos sugiere que la célula sea reproductivamente útil. El procesamiento del semen, incluida su criopreservación, es “estresante” para el espermatozoide y perjudica, primordialmente, a sus membranas. Los perjuicios que puedan producirse en éstas tienen la posibilidad de hacer configuraciones anómalas en su organización, permeabilidad y estructura lipídica. Las membranas espermáticas que tienen la posibilidad de verse perjudicadas por la criopreservación son principalmente la membrana plasmática, la membrana externa del acrosoma y las membranas mitocondriales.

### **2.3 Los canales iónicos o proteínas de comunicación**

Los canales iónicos son excelentes máquinas eficientes que permiten el movimiento interno y externo de diversas partículas de manera controlada (Darzon, 2007), podemos interpretar este movimiento de partículas como un intercambio de información entre el medio interno con el medio externo.

Esta comunicación es fundamentalmente la señalización de la fecundación en los gametos, encontrar el ovocito y fertilizarlo depende de cambios en la permeabilidad de iones modulados por señales y componentes de la capa externa del huevo. Diferentes canales iónicos realizan funciones de decodificación específicas que dan forma al comportamiento sofisticado de los espermatozoides.

Todos los procesos adaptativos y transformativos que sufre el espermatozoide según Olivera *et al.*, (2006) que involucran la fertilización del ovocito como son la activación del espermatozoide, capacitación, hiperactivación, reconocimiento entre gametos, reacción acrosomal, adhesión y fusión, son controlados por toda una serie de eventos moleculares entre el medio externo e interno que regula la membrana espermática y es ahí donde se traduce su importancia y correlación directa con la capacidad fecundante.



**Figura 1.** Paso y secuencia de procesos durante el trayecto del espermatozoide hacia el ovocito dentro del tracto reproductivo de la hembra. 1) activación, 2) capacitación, 3) hiperactivación, 4) reconocimiento entre gametos, 5) reacción acrosoma, 6) adhesión, 7) fusión. (Olivera et al., 2006)

## 2.4 Capacitación espermática

La evolución y maduración espermática se lleva a cabo en el epidídimo y no finaliza sino hasta encontrarse en el tracto genital femenino. Esta serie de cambios le atribuye al espermatozoide mayor motilidad y la capacidad de secretar sus enzimas proteolíticas (hialuronidasa y acrosina), esta desintegración de la región acrosómica facilita la penetración en el ovocito; esto es conocido como capacitación espermática (Caravaca, 2005).

Los espermatozoides experimentan cambios a partir de sus dominios (complejo esterol-caveolina) donde se encuentran ancladas estructuras de colesterol y esfingolípidos, estos funcionan como almacén en la membrana capaces de acoplar proteínas que desencadenan la cascada de señalización (Olivera *et al.*, 2006). Los espermatozoides al pasar de un medio (plasma seminal) a otro (fluido cervical) donde encontramos altas concentraciones de albumina, estimula el reordenamiento y liberación del colesterol (Avalos *et al.*, 2018). La capacitación, no es más que el desacople y salida de colesterol de la membrana acompañado además del ingreso de  $Ca^{+2}$  y  $HCO_3^-$  al citoplasma. El fluido oviductal es abundante en albúminas y lipoproteínas de alta densidad, capaces de retirar el colesterol de la membrana del espermatozoide, lo que la hace más dinámica al producir la separación de la unión de las caveolinas con las proteínas de fusión; estas últimas al quedar libres forman complejos de señalización de fusión de membranas (reacción acrosomal); las muestras seminales con alta proporción de acrosoma alterado o ausente acostumbran tener una fertilidad baja (Hidalgo, 2005).

## **2.5 Reacción Acrosomal**

Este paso previo a la fecundación se define como la activación y exposición física de las enzimas catalíticas que abrirán paso al espermatozoide a través de la zona pelúcida, la participación del  $\text{Ca}^{+2}$  en estos fenómenos son cruciales ya que desempeña un papel primordial en todos los mecanismos de exocitosis. Experimentos bajo condiciones controladas (In-vitro), se puede observar que en medios libres de  $\text{Ca}^{+2}$  no hay reacción acrosomal, aun adicionando al medio agentes inductores (Gadella y Harrison, 2000). En este sentido como menciona Arenas *et al.*, (2010), la reacción acrosomal no es más que la exposición enzimática del espermatozoide frente al contacto bioquímico del ovocito donde la zona pelúcida con su estructura glucoproteica hace que el mecanismo de reconocimiento sea muy semejante a una interacción antígeno-anticuerpo.

## **2.6 La fecundación**

A lo largo de la fecundación los espermatozoides experimentan la reacción acrosomal con la fusión de la membrana acrosomal y sub acrosomal del espermatozoide. La hialuronidasa liberada dispersa las células monticulares que cubren al ovocito recién liberado y la proacrosina como precursor de una enzima proteolítica, la acrosina; estos contribuyen enormemente en el paso de los espermatozoides a través de la zona pelúcida (Cubas, 2013).

Darzon *et al.*, (2007) explica que la fecundación ocurrirá solo si el óvulo y el espermatozoide logran “dialogar”, que es indiscutiblemente el acontecimiento biológico de mayor relevancia en las especies con reproducción de tipo sexual. La probabilidad de recombinación genética y que las especies subsistan en el tiempo depende mucho del triunfo de dicha comunicación. La manera en la que estos dos gametos, condiciona e influye una sobre la otra, ejerciendo el control de cómo los iones atraviesan su membrana citoplasmática, es una dinámica sistematizada la clave de su lenguaje. Entre las macromoléculas de la membrana citoplasmática que aceptan el flujo selectivo de iones a través de la bicapa lipídica tenemos a los canales iónicos. La regulación de estos canales influye en cómo tiene que nadar el espermatozoide, hacia donde y cuando iniciar los cambios morfológicos que le tienen que ocurrir para fusionarse con el óvulo.

## 2.7 Parámetros seminales considerados para evaluación seminal

### 2.7.1 Concentración espermática

Este parámetro está definido por la cantidad de espermatozoides por mililitro de eyaculado. La concentración espermática de un toro oscila entre 800 a 2000 millones por mL, con un volumen de 4 a 10 ml; estas características pueden variar ya que están influenciadas por la edad del toro, estación del año, frecuencia de colecciones, y raza del toro. Estas cifras pueden ir en aumento junto con la edad del toro hasta los 7 años, en adelante estos parámetros tienden a disminuir (Hafez, 2002). Investigaciones realizadas por Kumi-Diaka *et al.*, (1981) con toros *Bos Indicus* y *Bos Taurus* durante 12 meses en diferentes estaciones climáticas demuestran que toros de 3 a 7 años de edad presentan concentraciones espermáticas significativamente mayor que toros de menor o mayor a este rango de edad, asociándolo con la madurez testicular y con los cambios degenerativos de los túbulos seminíferos respectivamente.

En relación a razas Bart (1999) nos indica que históricamente aquellas que son seleccionadas por su producción de leche (ej. Braunvieh, Gelvieh, Red poll, Pinzgauer y Simmental) alcanzan la pubertad a una edad significativamente menor que aquellas que no son seleccionadas por su producción de leche (ej. Charolais, Limousin y Hereford). Según la Asociación colombiana de criadores de ganado Pardo Suizo y Braunvieh se tiene que la raza Braunvieh posee un desarrollo testicular precoz permitiendo utilizar su semen a edades a partir de los 12 a 14 meses. En el caso de la raza Simmental es de 12 a 17 meses como nos indica la Asociación Nacional de Criadores de ganado vacuno Fleckvieh-Simmental de España.

### 2.7.2 Concentración espermática Motilidad espermática

Según Hidalgo *et al.*, (2005), la motilidad es uno de los parámetros más importantes en el análisis seminal. Hasta hace pocos años el estudio de la motilidad espermática se hacía exclusivamente mediante métodos semi-cuantitativos. Estos métodos evalúan el porcentaje de espermatozoides móviles, así como el tipo de movimiento que presentaba la media de una población espermática; sin embargo, la exactitud y precisión están limitadas por las condiciones del sistema de medida y por la destreza del observador.

**Motilidad masal:** este parámetro se define por el movimiento de masa espermática, el movimiento en onda de todos los espermatozoides, observado en los eyaculados densos. Para su evaluación se toma una gota de semen a examinar (gota de semen puro) con una pipeta,

se coloca la gota sobre un portaobjeto a 37°C y se observa en campo claro (aumento 10X), sin colocar el cubre objeto (Agüero, 2012).

**Motilidad individual:** la motilidad individual de una muestra de semen se expresa como el porcentaje de células móviles bajo un campo microscópico. Esta prueba de la motilidad debe hacerse con la ayuda de un microscopio óptico (aumento 40X) a una temperatura de 37°C. El semen no diluido, está demasiado concentrado como para hacer la determinación exacta de la motilidad individual, por lo cual se diluye con una solución isotónica de cloruro de sodio al 0,9%, para poder observar individualmente el movimiento espermático (Agüero, 2012).

Cabrera (2012), las características clásicas están correlacionadas con la fertilidad del animal, pero presentan variaciones en la fertilidad individual que, en ocasiones, sobrestiman o subestiman el potencial fecundante del macho.

#### 2.7.3 Concentración espermática Vitalidad espermática

Esta evaluación está relacionada con la interacción entre un agente químico (colorante) y el plasmalema espermático, en este caso para calcular el porcentaje de vivos o muertos hace falta que las proteínas, lípidos, carbohidratos y todos los constituyentes de la membrana estén en óptimas condiciones, y esto sucede cuando la célula espermática está viva, de lo contrario estamos frente a células muertas, que al ponerse en contacto con el colorante, se tiñen rápidamente (Cox, 2005).

#### 2.7.4 Concentración espermática Determinación de anomalías espermáticas

El estudio de la morfología espermática está dentro de los parámetros de rutina más importantes ya que se define como la proporción de espermatozoides anormales encontrados en el eyaculado. Su importancia radica en la correlación directa que tiene estas anomalías con la viabilidad espermática. Según la ubicación anatómica donde tienen la posibilidad de haberse generado diferenciamos estas anomalías en primarias y secundarias (Hidalgo, 2005).

Según Avalos *et al.*, (2018) se describe los tipos de anomalías:

- **Anormalidades Primarias**

Forma de cabeza: piriforme, lanceolada, angosta o estrecha.

Acrosoma: desprendido, rugoso, pequeño.

Tamaño de cabeza: microcefalia, macrocefalia.

Cabeza desprendida.

Doble cabeza.

Cuello paraxial.

- **Anormalidades Secundarias**

Célula espermática con gota citoplasmática proximal.

Célula espermática con gota citoplasmática distal.

Célula espermática con cola enrollada.

Célula espermática con acrosoma desprendido.

Célula espermática con cola quebrada.

Esta evaluación y valoración se realizará mediante un examen microscópico, con una tinción espermática (coloración) de la siguiente manera:

Se diluye en relación volumen/volumen entre el semen puro con solución azul de metileno, se coloca en un cubre objetos y se observa a un aumento de 40X, se observa un mínimo de 100 espermatozoides y se calcula el porcentaje de espermatozoides con morfología anormal y normal. De esta última, se incluye también el porcentaje de cada clasificación de anomalía observado (Avalos, 2018).

La morfología de los espermatozoides mantiene una correlación con la integridad de los túbulos seminíferos y hasta cierto punto la del epidídimo, interpretar el tipo de anomalía y la proporción en las que se presentan nos puede servir como indicador de fertilidad como también una razón para iniciar un tratamiento de recuperación del toro (Cubas, 2013).

#### 2.7.5 Concentración espermática Integridad acrosomal de los espermatozoides

Esta prueba tiene alta correlación con la capacidad del espermatozoide para penetrar al ovocito, una serie de cambios fisiológicos que les confiere una mayor motilidad y la capacidad de desprender enzimas proteolíticas (hialuronidasa y acrosina) por la región acrosómica de la cabeza, sufriendo esta una desintegración. Estos cambios que facilitan la penetración del ovocito constituyen lo que se denomina capacitación de espermatozoides (Caravaca *et al.*, 2005). El estudio de la integridad acrosómica del espermatozoide es una



prueba especializada de control de calidad y complementa perfectamente las pruebas de evaluación seminal existentes en el laboratorio; además, permitirá conocer más sobre la calidad de un eyaculado (Osorio, 2007).

#### 2.7.6 Concentración espermática Integridad de la membrana citoplasmática

Jeyendran *et al.*, (1984), sostiene que la integridad de la membrana plasmática es una de las propiedades más importantes para el metabolismo espermático, la capacidad que tiene este para controlar de maneras sistemática todos los procesos adaptativos durante la capacitación, reacción acrosómica y la unión de los gametos masculino y femenino. Estos procesos ocurren de manera controlada por la membrana citoplasmática y es ahí donde radica la importancia de su integridad.

### 2.8 Test de endosmosis espermática (HOST; Hypo-Osmotic Swelling Test)

La prueba de HOST, desarrollado por Jeyendran *et al.*, (1984), fue diseñado para estudiar la funcionalidad e integridad de la membrana espermática humana. Se basa en la capacidad que tienen las membranas para permitir el transporte de moléculas selectivamente. Es conocida la elevada permeabilidad al agua de la mayoría de las membranas biológicas en respuesta a mínimas diferencias osmóticas que permite que los compartimientos intra y extracelular mantengan su isotonicidad, necesaria para la homeostasis intracelular (Sánchez, 2003).

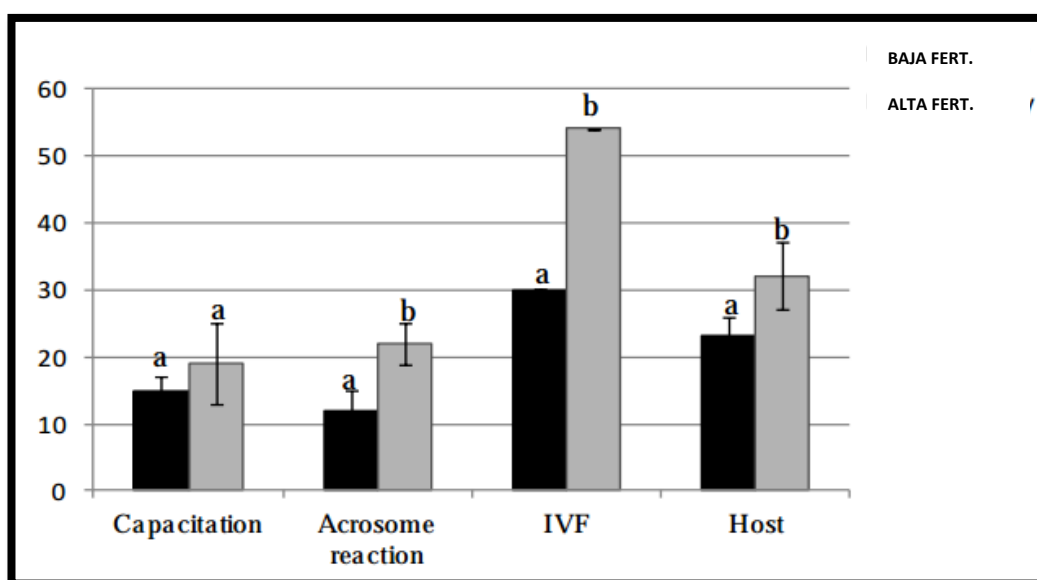
Cuando los espermatozoides son expuestos a soluciones hipoosmóticas, éstos tratan de establecer un equilibrio entre las condiciones intracelulares y extracelulares, por lo que penetra agua del medio externo hacia el medio interno del espermatozoide a favor de la gradiente para tratar de restablecer el equilibrio osmótico (Ferrian, 2007).

Desde décadas atrás ya se desarrollaba y se atribuía la importancia de evaluar muestras de semen con alta simplicidad. En 1984 Jeyendran *et al.*, en la búsqueda de desarrollar una prueba fácil de aplicar, de alta repetitividad y precisión en muestras de semen humano, reportaron que hay una alta correlación ( $r=0,90$ ) entre el porcentaje de espermatozoides de una muestra de semen que son capaces de experimentar hinchazón en un medio hipoosmótico y el porcentaje de ovocitos de hámster desnudos que fueron penetrados por espermatozoides capacitados. Los demás parámetros evaluados como porcentaje de normales, porcentaje de móviles, entre otros no obtuvieron las mismas correlaciones.

Según los trabajos de investigación de las últimas décadas, reportan la vigencia y utilidad de esta prueba para predecir la capacidad fecundante de los espermatozoides.

Así mismo Pantoja (2007), aplica la prueba hipoosmótica en muestras de semen de ovinos para determinar la integridad de la membrana citoplasmática evidenciando diferencias estadísticas entre dilutores de semen, entre carneros, momentos de procesamiento, reportando correlaciones positivas con porcentajes de fertilidad lograda por I.A. intrauterina en ovejas.

Morado *et al.*, (2015), reafirman la gran importancia de la evaluación de la integridad de la membrana citoplasmática, ya que los parámetros de rutina (motilidad y vigor progresivo) tiene un valor limitado para predecir la fertilidad de campo. Este autor nos demuestra que, al utilizar muestras seminales de toro de alta y baja fertilidad en campo, obtuvo diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) (Figura 2) en la evaluación de integridad de membrana citoplasmática y acrosomal.



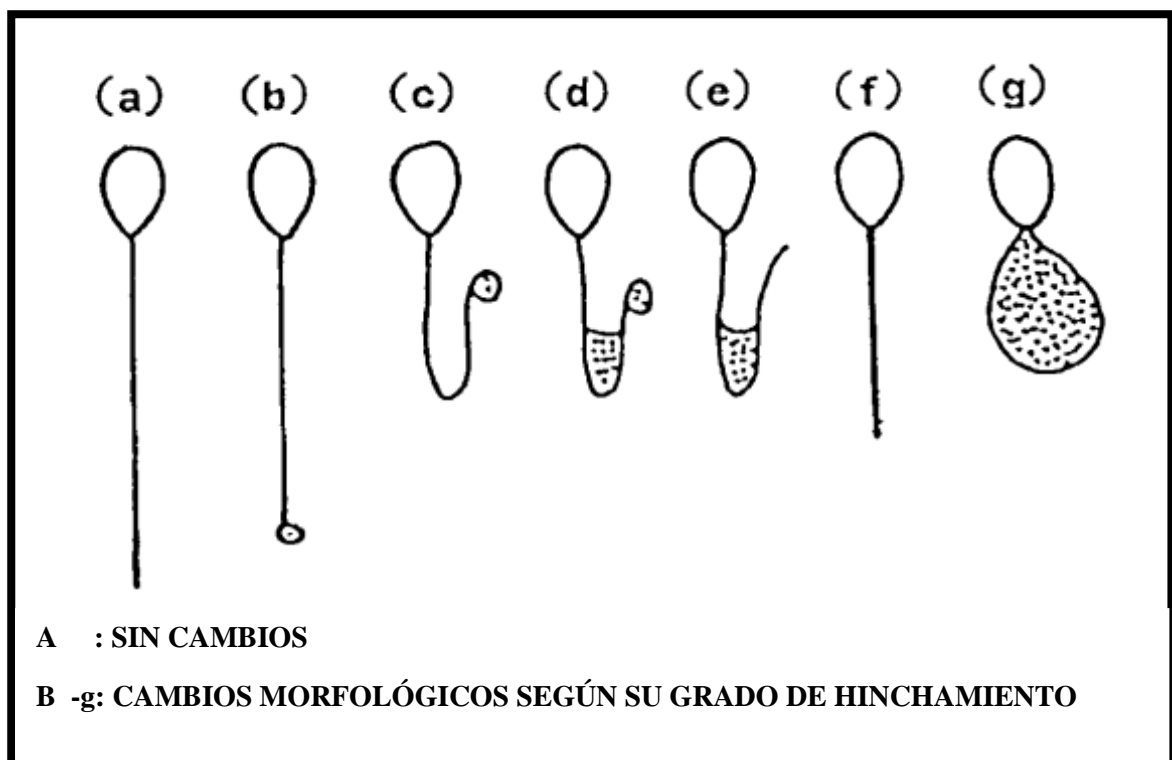
**Figura 2.** Study of Sperm Evaluation Parameters to Estimate Cryopreserved Bovine Semen Fertility (Morado, 2015)

## 2.9 Efecto del medio hipo osmótico sobre la membrana espermática

La interacción entre la membrana y su medio ocasiona la adaptación del mismo respondiendo con el ingreso y salida selectiva de partículas cuya dinámica en su paso refuerzan la afirmación de que estamos frente a una célula totalmente integra. Sin embargo, esta condición puede ser desequilibrada in-vitro colocando a prueba la respuesta adaptativa de la membrana. De esta manera un medio hipoosmótico desafía el poder adaptativo de la membrana, permitiendo la apertura de acuaporinas o canales transmembranales y el ingreso de moléculas de agua al citoplasma, de esta manera contrarresta la presión osmótica (Takahashi *et al.*, 2009) (Figura 4). Yeung *et al.*, (2009), menciona que fisiológicamente los

espermatozoides experimentan cambios en la osmolalidad de los fluidos circundantes tanto en el tracto masculino como en el femenino en su viaje desde el testículo hasta el oviducto (hasta 480 mLOsm). La regulación del volumen de esperma en respuesta a tales desafíos osmóticos es importante para mantener un tamaño celular estable para la forma y función normal de la cola espermática. Junto con los canales iónicos para los flujos de osmolitos, los canales de agua serían cruciales para la regulación del volumen de esperma

Según Jeyendran *et al.*, 1984 (Figura 3) se pueden presentar diferentes cambios morfológicos pero que corresponde a la adaptación de la membrana sometidos al estrés hipoosmótico. Moretti *et al.*, (2011) nos menciona que este efecto está muy asociado a las acuaporinas (AQP7, AQP8 y AQP11) lo cual indica un papel importante en la fertilidad.



**Figura 3.** Cambios morfológicos de adaptación osmótica del espermatozoide frente al estrés hipoosmótico. Jeyendran *et al.*, (1984).



**Figura 4.** Enrollamiento e hinchazón de la cola en microscopio electrónico de barrido. Yeung et al., (2009)

## **2.10 Sobre la evolución del análisis seminal**

Agüero (2012), sostiene que, para definir el performance reproductivo de toros, se usa la valoración muestral del semen, por medio de exámenes microscópicos en laboratorio. Esta metodología permite obtener valores con el fin de categorizar y clasificar el semen en tanto a estándares de calidad, esta se limita a ser bastante subjetiva; sin embargo, es el método más básico, versátil, rápido y económico.

En la actualidad existen métodos digitales que excluyen el error humano, en este sentido Agüero (2012) expone que el Sistema Computarizado de Análisis Seminal (Computer Assisted Sperm Analysis, CASA) como herramienta para evaluar la calidad espermática proporciona información precisa, objetiva y repetible.

Siendo una de las características más empleadas, el porcentaje de motilidad espermática existente en una muestra, además realiza un análisis del desplazamiento en tanto a velocidades, estos sistemas permiten establecer parámetros reproductivos más objetivos y repetibles.

Con el fin de optimizar el análisis y mejorar la precisión de la fertilidad potencial de muestras espermáticas en técnicas de reproducción asistida como la inseminación artificial es que Restrepo *et al.*, (2013) recomiendan e incorporan recursos tecnológicos computarizados (CASA), dejando el uso de técnicas convencionales de evaluación espermática, encontrando es sus investigaciones resultados objetivos, repetibles y precisos.

## **2.11 De los dilutores para la dilución del semen de toro**

Los espermatozoides como células vivas no pueden soportar largos tiempos de vida debido a los efectos del medio externo después de la eyaculación del animal, estos pueden ser por el contacto de oxígeno, aumento de la hipertonicidad del medio, falta de humedad, aumento de excreciones celulares entre otros. Sin embargo, la adición de esta sustancia llamada dilutor tiene la capacidad de extender el tiempo de vida de los espermatozoides en fresco, refrigerado y congelado. En este sentido Hafez (2002) afirma que estos dilutores deben contar con las siguientes características:

- Proveer nutrientes.
- Dar protección contra los efectos dañinos del enfriamiento.
- Acción buffer.
- Mantener la presión osmótica y el balance electrolítico.
- Inhibir el crecimiento bacterial.
- Aumentar el volumen del semen.
- Proteger las células en el congelamiento.

### **2.11.1 Concentración espermática Dilutor sintético comercial AndroMed ®**

Es apropiado para la preservación de semen fresco a +5°C hasta +10°C. En la investigación celular, AndroMed® es recomendable cuando se utilizan los espermatozoides como modelo, debido a que su composición estandarizada lo hace apto para el análisis computacionalmente asistido (CASA – computer assisted semen analysis) de semen. También utilizado exitosamente con semen de otras especies, especialmente ovina y caprina.

Tiene como componentes fosfolípidos, TRIS, ácido cítrico, azúcares, antioxidantes, tampones, glicerina, agua de altísima pureza y antibióticos (<<http://www.minitube.com>>) (fig 5).



**Figura 5.** Dilutor sintético comercial AndroMed de 200ml.

### 2.11.2 Concentración espermática Dilutor sintético comercial AndroMed ® Dilutor sintético comercial OPTIXcell

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

Alta bioseguridad, medio transparentes, optimiza el semen fresco, mayor movilidad post descongelamiento, caducidad amplia y preparación inmediata (<<https://www.imv-technologies.com>>) (Figura 6).



**Figura 6.** Dilutor sintético comercial Optixcell de 200ml.

### 2.11.3 Concentración espermática Dilutor sintético comercial AndroMed ® Similitudes y diferencias entre dilutores OPTIXcell y AndroMed

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

A continuación, se muestra similitudes y diferencias en sus composiciones:

**Tabla 1:** Composición química de dilutores Optixcell y Andromed

Dilutor	Andromed (Minitube)	Optixcell (IMV)
Origen	Alemania	Francia
Proteína animal	No	No
Lecitina de Soya	Si	No
Liposomas	No	Si
Tampón	Si	Si
Glicerina	Si	Si
Tris	Si	No especifica
Fosfolípidos	Si	Si
Antioxidantes	Si	Si
Color	Amarillo canario	Beige transparente
Autorización UE 88/407	Si	Si
Penicilina	No	Si
Lincomicina	Si	Si
Espectinomicina	Si	Si
Estreptomicina	No	Si
Gentamicina	Si	No
Tilosina	Si	No
Claridad de observación en el CASA	Turbio	Transparente

Encontramos mucha similitud en sus composiciones, sin embargo, la presencia de Liposomas o componentes de origen vegetal como la Lecitina puedan hacer grandes diferencias en la disminución de las criolesiones.

Como nos menciona Gao y Critser (2000) el daño o lesión que pueda ocasionar la disminución o nula viabilidad de los espermatozoides durante la criopreservación esta localizada a nivel de membrana citoplasmática. Ambos dilutores contienen mecanismos de conservación diferente. Por un lado, Minitub sostiene que el perfil lipídico de origen vegetal puede remplazar el de origen animal ya que las Lecitinas se encuentran en un porcentaje considerable (10%) en la soya, este componente es parte de la yema de huevo (Aires *et al.*, 2003). Y por otro, IMV incluye la tecnología de liposomas o vesículas de fosfolípidos la cual presenta un perfil de lípidos capaces de adherirse con mucha facilidad en la membrana citoplasmática.

Se tiene además la presencia o ausencia de algunos antibióticos como son la Penicilina, Estreptomicina, Gentamicina y Tilosina.

La penicilina y estreptomicina son considerados como antibióticos convencionales que en las últimas décadas se puso en duda su efectividad, sin embargo, Trujillo (2002) demostró que no hay diferencias significativas sobre la calidad del semen de toros, utilizando dos



grupos antimicrobianos; comparó el uso de Penicilina + Estreptomicina, versus Lincomicina + Gentamicina + Tilosina + Espectinomomicina. La presente investigación tiene mucha similitud en tanto a los componentes antibacterianos de los dilutores que fueron utilizados.

#### 2.11.4 Concentración espermática Dilutor sintético comercial AndroMed ® Proteínas del plasma seminal frente a los diluyentes.

Las proteínas del plasma seminal (BSP) son aquellas que son secretadas por las glándulas accesorias formadoras del plasma seminal, Estas proteínas tienen la capacidad de adherirse y fusionarse fácilmente con la membrana citoplasmática dándole características protectoras para el estrés térmico y oxidativo (Rueda, 2013).

Estas proteínas pueden revertir el efecto térmico de la criopreservación, como nos demuestra Rueda (2011) al adicionar proteínas aisladas de plasma seminal bovino durante el procesamiento de semen de toros, obteniendo un aumento del 20 % y 25 % de la viabilidad espermática postdescongelamiento con medio Citrato-Fructuosa y Bioxcell respectivamente. Durante los últimos 60 años se ha utilizado con mucha eficiencia la yema de huevo, estudios realizados por Manjunath *et al.*, 2002; demuestran biológicamente que el perfil lipídico de la yema de huevo es capaz de secuestrar dichas proteínas BSP previniendo el efecto perjudicial durante la criopreservación.

### **2.12 Características seminales frente a diluyentes comerciales sintéticos**

La mayoría de diluyentes que se han desarrollado en los últimos 30 años contienen yema de huevo (por ejemplo, Triladyl); sin embargo, se han desarrollado también otros sin yema de huevo (por ejemplo, Andromed y Optixcell), que contienen en su remplazo al aceite de soya. Las ventajas de estos últimos en comparación con los que incluyen yema de huevo son: no tienen ingredientes de origen animal, no existe riesgo de contaminación bacteriana, alta tasa de concepción y mayores tasas de no retorno, fácil preparación y mayor facilidad de evaluación de los espermatozoides en el microscopio (INIFAP, 2009).

Estos productos comerciales no son exclusivos para la especie bovina, se han utilizado estos mismos dilutores y otros para diversas especies a través del tiempo con el levantamiento de investigaciones biotecnológicas con fines reproductivos en menor tiempo e implementación de nuevas tecnologías.

La técnica de refrigeración y criopreservación son complementadas con las ventajas que nos proporciona los dilutores sintéticos, sin embargo es necesario considerar que la fertilidad del

semen criopreservado disminuye; en este sentido Stornelloi (2005) citado por Cabrera, Orellana y Pantoja (2010), sostiene que las características seminales dependen originalmente del semen fresco, los diluyentes del protocolo de criopreservación y de la destreza del operario en el proceso de inseminación artificial pero que en general, la valoración obtenida del semen congelado son inferiores a los del semen fresco por causas multifactoriales como el shock térmico, velocidad de enfriamiento, composición de los diluyentes y cambios en la osmolaridad, que sucede durante el proceso de congelación, por lo tanto estos eventos son los responsables de la disminución de la fertilidad con el uso de semen congelado.

A continuación, se expone algunas investigaciones de los últimos años, enfocados a análisis seminal procesado con dilutores sintéticos de diferentes marcas comerciales y especies en el mundo.

**Tabla 2:** Recopilación de investigaciones sobre la evaluación de la motilidad espermática. S/N, sin especificar; \*, no se reporta datos

PAIS	AUTORES	RAZA	ESPEC.		OPIIXCELL	ANDROMED	BIOXELL	TRILADYL	TRIS
KENIA	Juma (2018)	ALPINA	CABRA	REFRIGERADO	80.00	*	*	*	*
INDIA	Chaudhary (2017)	GYR	TORO		73.1±0.7	70.08±0.9	*	*	69.4±0.9
		SURTI	BUFALO		76.0±0.7	73.5±0.7	*	*	74.4±0.8
IRLANDA	Nongbua (2017)	HOLS/ SUECO ROJO	TORO		69.00±7.00	*	*	*	*
IRLANDA	Murphy (2017)	HOLST.	TORO		65<M<70	55<M<60	*	*	*
PERU	Perez (2016)	S/E	ALPACA		*	*	*	50.47±4.92	*
PERU	Cabrera (2012)	HOL/BW.	TORO		*	*	84.72±2.4	*	*
PERU	Paucar (2011)	BR. SW.	TORO		*	*	85.1±1.71	*	*
PERU	Damas (2010)	BR. SW.	TORO		*	87.5±1.52	86.7±1.51	*	*
						OPIIXCELL	ANDROMED	BIOXELL	TRILADYL
KOREA	Kang (2019)	HANWOO	TORO		81.1±16.5	*	*	77.3±23.8	*
EGIPTO	Fathi (2019)	S/E	PAVO	DESCONGELADO	60.00±7.65	*	*	*	38.33±4.02
INDONESIA	Amal (2019)	BALINES	TORO		46.32±2.5	*	27.87±1.46	*	31.20±1.25
INDIA	Chaudhary (2017)	GYR	TORO		42.1± 1.6	37.1±1.4	*	*	40.4±1.5
		SURTI	TORO		42.9±1.8	38.5±1.9	*	*	39.6±1.8
SUECIA	Lima-Verde (2017)	S/E	TORO		58.9±4.7	57.8±4.7	*	*	*
PAKISTAN	Ansari (2017)	FRIESIAN	TORO		55<M<60				45<M<50
PAKISTAN	Ansari (2016)	FRIESIAN	TORO		56.4±0.8	*	*	*	46.0±0.9
PERU	Perez (2016)	S/E	ALPACA		*	*	*	28.84±6.18	*
HONDURAS	Lopez (2015)	YERSEY	TORO		*	*	*	61.7	*
VENEZUELA	Quintero (2014)	HOLST./BRAH.	TORO		*	*	*	*	40.83±2.94
PERU	Cabrera (2012)	HOLST../BR. SW.	TORO		*	*	62.25±1.8	*	*
PERU	Paucar (2011)	BR. SW.	TORO		*	*	62.4±1.57	*	*
PERU	Damas (2010)	BR. SW.	TORO		*	65.3±1.70	64.16±1.46	*	*

**Tabla 3:** Recopilación de investigaciones sobre la evaluación de la vitalidad espermática. S/N, sin especificar; \*, no se reporta datos

PAIS	AUTORES	RAZA	ESPEC.	REFRIGERADO	OPIIXCELL	ANDROMED	BIO XELL	TRILADYL	TRIS
KENIA	Juma (2018)	ALPINA	CABRA			97.3	*	*	*
THAILAND	Nongbua (2017)	HOLST./ROJO SUECO	TORO		80±8	*	*	*	*
PERU	Damas (2010)	BR. SW.	TORO		*	79.02±4.65	77.38±4.31	*	*
VENEZUELA	Bedoya (2003)	ROJO OREJ	TORO					81.53	
					OPIIXCELL	ANDROMED	BIO XELL	TRILADYL	TRIS
INDONESIA	Amal (2019)	BALINES	TORO	DESCONGELADO	37.81±2.70	*	39.12±2.40	*	29.92±2.24
PAKISTAN	Ansari (2017)	FRIESIAN	TORO		75<V<80	*	*	*	65<V<70
PAKISTAN	Ansari (2016)	FRIESIAN	TORO		73.5±0.9	*	*	*	63.6±0.8
HONDURAS	Lopez (2015)	JERSEY	TORO		*	*	*	59.3	*
VEENZUELA	Quintero (2014)	HOLST./BR AH.	TORO		*	*	*	*	40.83±2.94
PERU	Damas (2010)	BR. SW./HOLST.	TORO		*	64.47±4.61	60.73±5.07	*	*
VENEZUELA	Bedoya (2003)	HOLST./ROJO OREINEG	TORO		*	*	*	65.53	*

**Tabla 4:** Recopilación de investigaciones sobre evaluación de la integridad de la membrana espermática en semen refrigerado

PAIS	AUTORES	RAZA	ESPEC.	REFRIGERADO	OPTIXCELL	ANDROMED	BIOXELL	TRILADYL	TRIS	OTROS	
MEXICO	Luna-Orozco(2019)	DORPER	CARNERO			56.7±1.5					54.0 ± 1.5
PERU	Perez (2016)	SE	ALPACA			*	*	*	51.93±6.14	*	*
BRAZIL	Martins (2013)	NELORE	TORO			*	*	*	*	*	43.6±19.3
PERU	Cabrera (2012)	HOLST ./BR. SW.	TORO			*	*	57.82±2.75	*	*	*
PERU	Paucar (2011)	BR. SW.	TORO			*	*	57.9±2.48	*	*	*
PERU	Damas (2010)	BR. SW.	TORO			*	67.90±7.42	66.00±6.19	*	*	*
PERU	Avila (2009)	BLACK B./ASSAF	CARNERO			*	*	*	*	77.16±3.60	71.99±5.01
PERU	Pantoja (2007)	BLACK B./ASSAF	CARNERO			*	*	*	*	77.88±4.76	78.87±3.96
VENEZUELA	Bedoya (2003)	HOLST./ROJO OREJINEGRO	TORO			*	*	*	62.84	*	*
JAPON	Takahashi (1990)		HOMBRE			*	*	*	*	*	57.6±7.9
USA	Jeyendran (1984)		HOMBRE			*	*	*	*	*	60.1±12.5

**Nota:** S/N, sin especificar; \*, no se reporta datos

**Tabla 5:** Recopilación de investigaciones sobre evaluación de la integridad de la membrana espermática en semen descongelado

				OPIIXCELL	ANDROMED	BIOXELL	TRILADYL	TRIS	OTROS	
EGIPTO	Fathi (2019)	SE	PAVO	DESCONGELADO	50.00±8.67	*	*	*	*	51.66±4.42
KOREA	Kang (2019)	HANWOO	TORO		60±15.1	*	*	40.0±11.4	*	*
INDONESIA	Amal (2019)	BALINES	TORO		41.51±2.10	*	39.02±1.9		38.04±1.89	*
MEXICO	Luna-Orozco(2019)	DORPER	CARNERO		53.6 ± 1.7					50.7 ± 1.5
IRLANDA	Nongbua (2017)	HOLS/SUECO ROJO	TORO		48.5±11.1	*	*	*	*	*
SUECIA	Lima-Verde (2017)	SE	TORO		48.5±3.6	38.8±3.6	*	*	*	*
PAKISTAN	Ansari (2017)	FRIESIAN	TORO		55<IM<60	*	*		45<IM<60	*
PERU	Perez (2016)	SE	ALPACA		*	*	*	26.12±5.20		*
PAKISTAN	Ansari (2016)	NILLI RAVI	BUFALO		53.8±0.8	*	*	*	43.9±0.8	*
HOMDURAS	Lopez (2015)	YERSEY	TORO		*	*	*	60	*	*
VENEZUELA	Quintero (2014)	HOLS/BRAH.	TORO		*	*	*	*	49.75±4.17	
INDIA	Mishra (2013)	YERSEY	TORO		*	*	*	*	*	68.7±0.31
PERU	Cabrera (2012)	HOLS./BR. SW.	TORO		*	*	39.9±2.06	*	*	*
PERU	Paucar (2011)	BR. SW.	TORO		*	*	40.65±3.84	*	*	*
PERU	Cabrera (2015)	ASSAF	CAENERO		*	*	*	*	43.56±7.10	40.38±3.65
		BLACK BELLY.	CAENERO		*	*	*	*	40.19±5.10	38.16±4.99
PERU	Damas (2010)	BR. SW.	TORO		*	45.93±4.63	43.94±4.49	*	*	*
PERU	Pantoja (2007)	Black B/Assaf	CARNERO		*	*	*	*	39.94±3.57	43.18±2.85
VENEZUELA	Bedoya (2003)	HOLST ./ROJO OREJINEGRO	TORO		*	*	*	44.03	*	*
USA	Correa (1994)	N/E	TORO		*	*	*	*	*	48±4.7

Nota: S/N, sin especificar; \*, no se reporta datos

### **2.13 Técnica de inseminación artificial**

La inseminación artificial es una técnica reproductiva que consiste en la introducción asistida del semen en el aparato genital de la hembra sin intervención del toro (Hernández y Ortega, 2009).

Según Caravaca y colaboradores (2005) la inseminación artificial en toros tiene ventajas y desventajas; de las cuales tenemos:

- a. Ventajas sanitarias: Reducción o nulo ingreso de animales al plantel de reproductores.
- b. Ventajas genéticas: Permite realizar un mejor control y manejo del progreso genético. Disminuye los parentescos y aumenta la selección de reproductoras.
- c. Ventajas económicas: Disminuye los gastos de instalación, manutención y alimentación de machos reproductores.
- d. Ventajas de manejo y control: Facilita la toma de registros en la granja, eliminación de hembras o machos con características no deseables.

En cuanto a las desventajas podemos mencionar:

- a. Se debe establecer protocolos y sistematización del manejo para el seguimiento de los estros.
- b. Se necesita un mínimo estándar de instalaciones para el manejo de la genética.
- c. Se necesita personal capacitado para ejecutar dichos procesos.
- d. De presentarse alguna enfermedad infecciosa en el macho reproductor, es posible diseminar dicha infección en todo el plantel si es que no es detectado a tiempo.

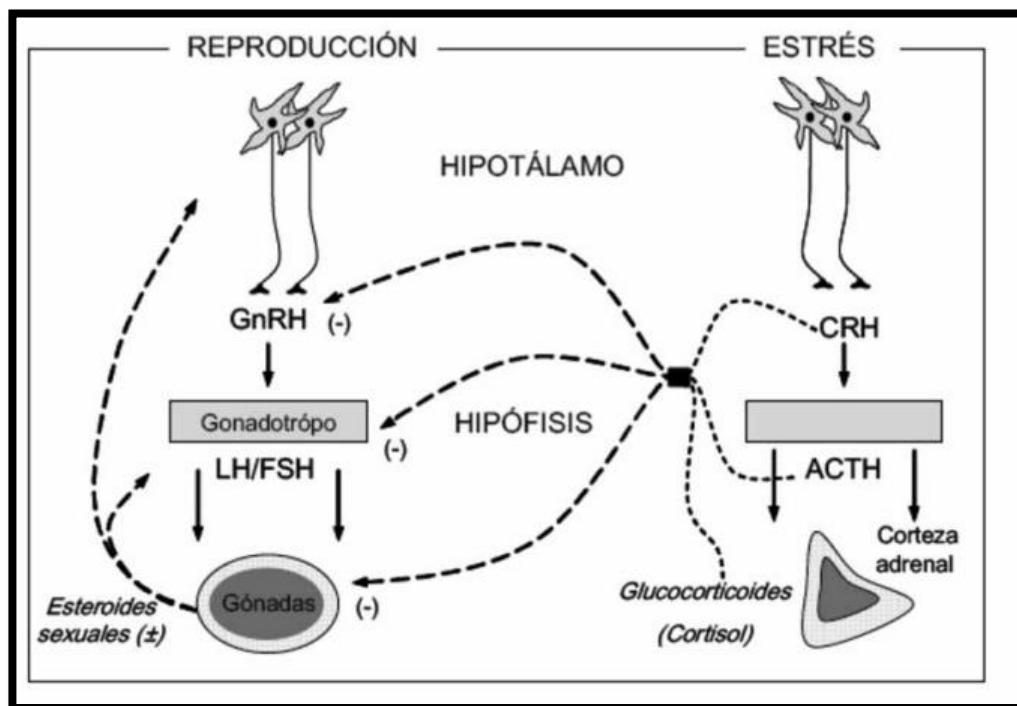
### **2.14 Efecto del cambio climático y el estrés calórico en la reproducción**

Según las publicaciones realizadas por la Dirección General de Medio ambiente de la Unión Europea (2006) se ha determinado que año tras año se está percibiendo con más frecuencia. Otros reportes hechos por el Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (2009), afirman que la expresión más evidente que se ha podido observar en los últimos 50 años es el calentamiento global y esta se refiere al incremento promedio de las temperaturas terrestres y marinas globales.

El comportamiento y la actividad del ganado bovino son claramente afectados por los agentes climáticos del hábitat natural y productivo del animal, concretamente la temperatura ambiental, la humedad relativa, evaporación, precipitación, heliofanía y otros; en conjunto, estos factores climáticos afectan su balance térmico (Roca, 2011).

Hans Selye citado por Velez y Uribe (2010) acuña el término “estrés” quien descubrió las causas que podían provocar esta condición. Este autor describió y definió el estrés como “la acción de estímulos nerviosos y emocionales provocados por el ambiente sobre los sistemas nervioso, endocrino, circulatorio y digestivo de un animal, produciendo cambios medibles en los niveles funcionales de estos sistemas”.

Los factores climáticos son causantes de un cuadro de estrés, este estado fisiológico influencia las concentraciones sanguíneas de hormonas como cortisol y tiroidea (Vélez *et al*, 2010) (Figura 7), este efecto hormonal desencadena anomalías fisiológicas como disminución de la fertilidad, alteraciones foliculares y depresión funcional en los ovocitos, todos estos eventos concluyen con el no desarrollo de un embrión viable.



**Figura 7.** Esquema del efecto hormonal que ejerce el estrés frente al hipotálamo-hipófisis-gónadas. Vélez et al. (2010).



## **2.15 Sobre las razas**

### **2.15.1 Raza Braunvieh**

Podríamos considerar que estamos refiriéndonos a una nueva raza, sin embargo, La raza Braunvieh no proviene de ningún cruce y mucho menos haber sido desarrollado en las últimas décadas. Es necesario enfatizar que tratamos con una de las razas más autóctonas y antiguas la cual data de los años 800 AC. según la ASOCIACIÓN COLOMBIANA DE CRIADORES DE GANADO PARDO SUIZO & BRAUNVIEH (2012).

En el argot ganadero podríamos confundir algunos términos en tanto a la definición de la raza, existen muchos nombres que se han originado del Braunvieh como: Braunvieh original, Brown Swiss, Pardo Suizo, Pardo Europeo, Pardo Americano, Pardo Suizo Americano, Pardo Suizo lechero, etc. Debemos considerar el nombre autóctono como raza la Braunvieh; sin embargo, actualmente también se le conoce como Pardo Europeo o Braunvieh original con características de producción para leche y carne encontrándose también Braunvieh línea cárnica. Por otro lado, tenemos la Raza Brown Swiss el cual es el resultado de una selección genética del Braunvieh en Estados Unidos; también se le conoce como Pardo suizo, Pardo suizo americano, Pardo americano, Pardo suizo americano o Pardo suizo lechero la cual tiene características orientadas a producción lechera y doble propósito.

Algunos autores consideran la procedencia de esta raza Braunvieh de Suiza por lo que la raza empezó a desarrollarse en ese país, sin embargo, otros consideran que proviene de Alemania ya que su nombre etimológicamente proviene del alemán el cual significa Vaca Parda o Vaca café; por otro lado, algunos consideran también que proviene de las regiones de Austria o de alguna zona de Europa central (Ocaña, 2006).

En tanto al desarrollo de la raza, nos remontamos a los siglos XVIII en los valles montañosos de Suiza y los registros empezaron a desarrollarse en el Siglo XIX en características de Leche y Carne (Chinchilla, 2013). Al ser una raza antigua al igual que muchas otras, ésta contenía en su genética una triple aptitud para la producción de carne, leche y tiro o fuerza de trabajo para la aradura.

A través de los años esta raza desarrollada bajo registros productivos en Suiza ha sido origen y material de uso para el desarrollo de investigaciones y avances genéticos ya que algunos países como Estados Unidos optaron por realizar selecciones orientadas a carne, leche o doble propósito, leche y carne; dando origen a una de las razas más

conocidas y utilizadas en las fincas del mundo, el pardo suizo o Brown Swiss. En tanto al aspecto económico comercial de la genética y sus bondades productivas, resulta bastante interesante como ha migrado de Europa a Estados Unidos, México, de Estados Unidos a Europa y a otros países de centro y sur de América.

En los años 1887 se fundó la primera cooperativa de criadores Braunvieh en Suiza (Cruz, 2010), no obstante, en Estados Unidos en el año 1869 – 1880 estaría muy interesada en esta genética y realizaría sus primeras importaciones, más adelante daría origen a la raza Brown Swiss declarada como tal en el año 1990. Pero además se conservarían animales Braunvieh para desarrollar líneas de carne la cual fue distribuido en muchas partes del mundo.

Chinchilla (2013) nos describe la evolución y la migración de esta genética y resulta ser bastante irónico como en los años 60s en Suiza donde se encontraba una de las razas más autóctonas, se optaría por parte de muchos ganaderos a orientar su ganado Braunvieh doble propósito a leche con el cruce del Pardo Suizo de Estados Unidos, Es decir, nuevamente adquirir su genética con un valor agregado (características lecheras de la raza Braunvieh en forma de raza Brown Swiss). En todos los sectores de Suiza y Europa encontramos animales Braunvieh y otros que han sido cruzados con el Pardo Suizo Americano. Sin embargo, en las últimas décadas un pequeño sector en Suiza que conservó estos núcleos Braunvieh han sido nuevamente recurridos para volver a insertar características del Braunvieh en la Parda suiza importada de Estados Unidos (retro - cruce).

Según nos describe la ASOPARDO, en Colombia se tiene la primera importación de Braunvieh en el año 1997 de origen alemán y con características autóctonas doble propósito. En los siguientes años también tendría importaciones de Estados Unidos y Brasil, pero de Braunvieh línea cárnica y es esta última la que presenta más núcleos difundidos en el país.

### 2.15.2 Raza Simmental

Es una raza de origen europea de los valles de Simmel en Suiza, de donde proviene su nombre, anteriormente conocidos como raza Bernesa en el siglo XIX. Este ejemplar tenía muchos matices del rojo y variedades; manchas rojas o negras y bandas rojas uniformes.

Es en este siglo en el año 1962 donde es considerado como raza (FAO, 1975).

Habitualmente solemos confundirla con la raza Fleckvieh, ya que sus características fenotípicas son muy similares, no obstante, una genera a la otra. La Fleckvieh se genera en Alemania y procede del cruce de Simmental suizo con razas que existían localmente del sur de Alemania.

Debido a las características adaptativas en el medio pudo ser difundida y distribuida en muchos puntos de Europa central como Francia, Austria, Alemania e Italia. Sin embargo más adelante pasarían a distribuirse por otros continentes en países como África y América, este último en los países de Estados Unidos, México, Guatemala, Colombia, Argentina y el resto de Latinoamérica (Escobar, 2010).

En Colombia ya se tiene trabajando esta raza desde hace más de 60 años y ha tenido mucho impacto en tanto a su difusión por las bondades en producción de leche y carne, en muchas fincas del país.

Esta raza se ha difundido en gran parte del mundo llegando a nuestro país hace más de 30 años. En el año 2016 a través de la importación de embriones durante la ejecución del Proyecto de Mejoramiento Genético en Bovinos – MINAGRI, de raza Braunvieh y Simmental provenientes del estado de Colombia, dichos embriones fueron implantados en vacas receptoras, originando machos de razas Simmental, Braunvieh Brahman y Gyr transformándose en reproductores en las instalaciones de la Estación Experimental Donoso del Ministerio de Agricultura y Riego (MINAGRI), ubicado en el distrito de Huaral, ruta Chancay Huaral. Parte de estos reproductores han servido para el presente trabajo.

### III. MATERIALES Y METODOS

#### 3.1 FASE DE CAMPO

Las muestras de semen de los toros se obtuvieron en las instalaciones de la Estación Experimental Donoso del Ministerio de Agricultura y Riego (MINAGRI), ubicado en el distrito de Huaral, ruta Chancay Huaral.



**Figura 8.** Equipo de trabajo del Banco Nacional de Semen en las instalaciones de la Estación experimental Donoso del MINAGRI

##### 3.1.1 Los animales

Se obtuvieron eyaculados de 4 toros provenientes del Proyecto de Mejoramiento Genético en Bovinos del MINAGRI. Los nombres de toros utilizados en el estudio están consignados en la tabla 6.

**Tabla 6:** Edad y código de cada toro que se utilizaron en el experimento.

<b>Toros</b>	<b>Nombre</b>	<b>Edad</b>	<b>Código</b>	<b>Raza</b>
<b>1</b>	Otto	16	31	Simmental
<b>2</b>	Pumpo	15	47	Simmental
<b>3</b>	Santos	15	41	Braunvieh
<b>4</b>	Marino	15	43	Braunvieh

Estos ejemplares a pesar de su edad, experimentaron una rutina de entrenamientos diarios desde la edad de 10 meses, el sometimiento a una rutina de acostumbramiento al operario y área de trabajo (brete) facilitó su docilidad, pero además su respuesta reproductiva a la colección de semen, finalizando con montas exitosas en tiempos prudentes (1 a 5 minutos).

Sumado a la exposición de hembras reproductoras se adecuaron a 1 monta por semana.



**Figura 9.** Toros utilizados para las colecciones y sus respectivas pruebas.

### 3.1.2 Las colecciones de eyaculados de los toros

Las colecciones se realizaron con vagina artificial las cuales en su interior tenían una temperatura de 37 a 39°C facilitando el trabajo de colección seminal de los toros, la frecuencia de colección fue de 1 colección / semana/ toro las cuales permitieron determinar las características seminales como volumen, color, pH, motilidad y concentración espermática.

Para la dilución del semen se utilizaron los dilutores sintéticos comerciales Andromed (que actuará como dilutor control) y Optixcell, dilutor nuevo que se necesita probar sus bondades; se utilizará por cada toro 8 eyaculados en los cuales se dividirá en dos lotes, uno para cada dilutor respectivamente.



**Figura 10.** Equipos y materiales usados para las colecciones



**Figura 11.** Brete para entrenamiento y colección de toros.



**Figura 12.** Momento del golpe de riñón y colección de toros con vagina artificial.

Las muestras obtenidas fueron procesadas con el siguiente protocolo, dos lotes homogéneos para cada dilutor (Andromed y Optixcell):

Se recolectó las muestras de semen con vagina artificial, una vez obtenidos en tubos de 15 ml se hizo la evaluación macroscópica; cada eyaculado por cada dilutor fue separado por lotes para dichas pruebas, se realizó la predilución en relación 1:1 (v/v) e incubación en baño maría a 34 °C por 10 minutos. Posteriormente se realizó la evaluación microscópica de motilidad espermática a 10X. En base a las características de la muestra de semen se calculó el volumen final para pajillas de 0.5 ml y se diluyeron respectivamente con cada tipo de dilutor. Las diluciones se realizaron en matraces y tubos, se cubrieron con papel aluminio y Parafilm. Para mantener la conservación durante el transporte hacia el laboratorio se colocaron en una cama de viruta con Ice Pack dentro de coolers a 5 °C para iniciar el proceso de refrigeración. Finalmente se transportó a las instalaciones del laboratorio del Banco Nacional de Semen de la Universidad Nacional Agraria La Molina, donde se completó el proceso de refrigeración, hasta el día siguiente.

### **3.2 FASE DE LABORATORIO**

Posterior a la colección de semen, la recepción y evaluaciones seminales se llevaron a cabo en el laboratorio del Banco Nacional de Semen, ...

Así mismo las muestras tuvieron el siguiente protocolo:

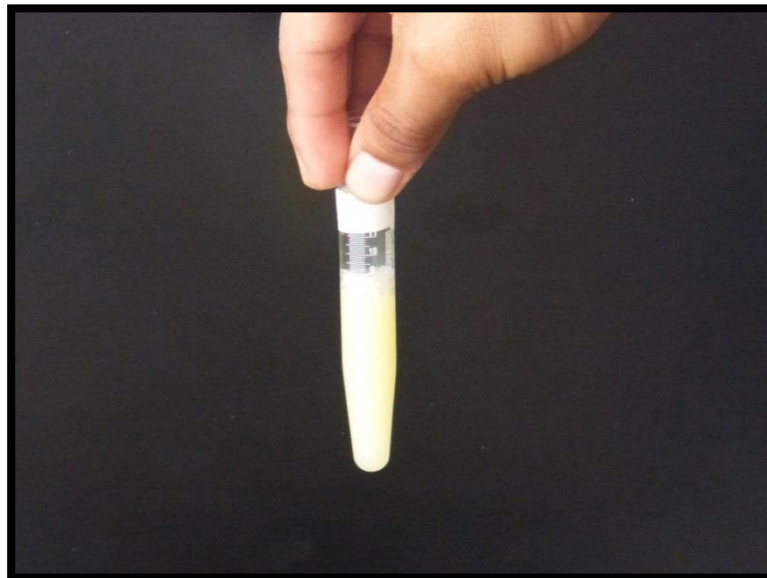
Se verificó la integridad de las muestras y materiales al momento de la recepción, confirmado esto se realizó la segunda evaluación de motilidad con el sistema CASA como punto de partida de todas las muestras. Una vez analizado se empajilló todas las muestras obteniéndose 2 lotes correspondientes a cada dilutor. Se procedió con la refrigeración de las pajillas a 4 °C durante 18 horas. Posterior a este tiempo de adaptación se realizó el primer test de HOS en semen refrigerado (primer método de conservación; evaluación endosmótica) y además otras pruebas complementarias (motilidad y vitalidad). Realizado los primeros análisis según método de conservación se pasó a la criopreservación de las mismas muestras (lote de pajillas) para finalmente ser descongeladas y proceder con su segundo test de HOS (segundo método de conservación; evaluación endosmótica; se ilustra el esquema N°1 en la Figura 23).

### 3.2.1 Evaluación del semen

Tras el desarrollo de las pruebas se fueron evaluando los siguientes parámetros:

#### 3.2.1.1 Volumen

Se determinó el volumen de todos los eyaculados mediante el uso de tubos de colección graduados de 15ml, el semen en éstos es medido de inmediato.



**Figura 13.** Muestra de semen en tubo graduado de 15 ml.

#### 3.2.1.2 Concentración espermática

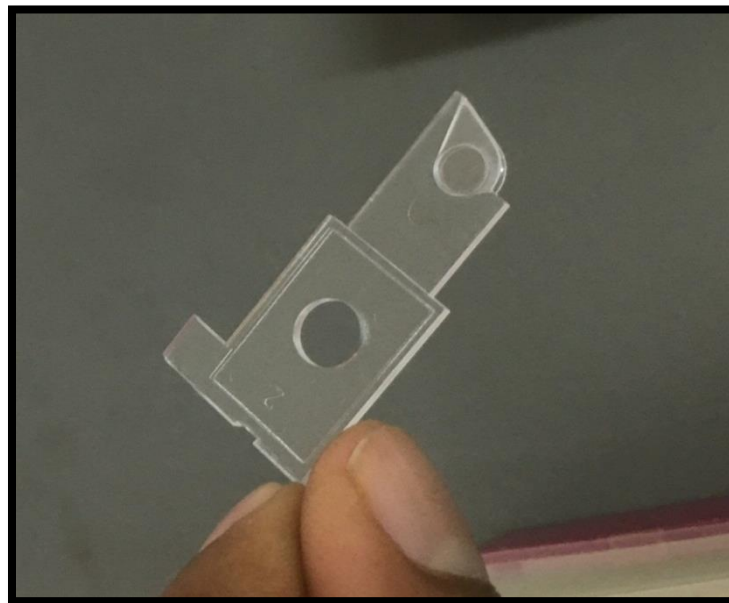
Para determinar la concentración espermática del eyaculado se utilizó un fotómetro SDM 1, este equipo desarrollado por Minitub realizó la lectura de manera rápida con la introducción



de una microgota en las cubetas descartables microvolumétricas que son complemento de este equipo.



**Figura 14.** Espectro fotómetro SDM 1



**Figura 15.** Cubeta microvolumétrica para la lectura en el Espectrofotómetro SDM 1

### 3.2.1.3 Motilidad espermática

La motilidad espermática se determinó mediante la utilización del Sistema CASA AndroVision, la cual cuenta con el módulo de estimación de motilidad individual. Con este sistema rápido y automatizado se determinó las motilidades de todos los eyaculados procesados y empajillados con su respectivo dilutor (refrigerados y descongelados) de todos los toros. Para preparar y dar lectura a la muestra se coloca 10uL en una lámina porta objetos

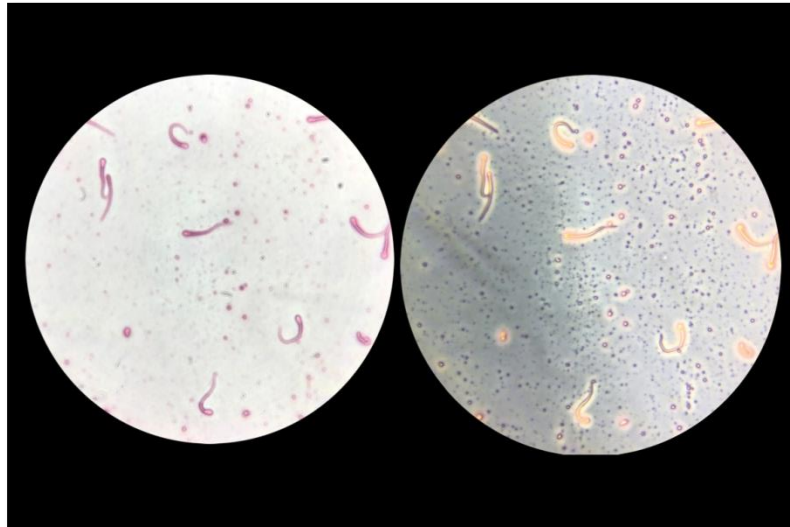
precalentado a 38°C, se coloca el cubre objetos sobre la gota, se fija la muestra en el objetivo del microscopio, en seguida el sistema CASA da lectura y arroja el porcentaje de motilidad espermática.



**Figura 16.** Sistema CASA del Banco Nacional de Semen de la UNALM.

#### 3.2.1.4 Vitalidad

La determinación de este parámetro se realizó mediante la tinción de muestras de semen con los reactivos colorantes Eosina al 5% y Nigrosina al 10%. Para la fijación de la muestra se añadió de 5uL de muestra de semen, dos gotas de Eosina y tres de Nigrosina todo en una placa porta objetos a 38°C, inmediatamente se mezcló la muestra con las dos gotas de Eosina y luego con las tres gotas de Nigrosina, se realizó un frotis con la mezcla y se dejó secar por unos segundos con la platina caliente. Luego se realizó el conteo con un mínimo de 200 espermatozoides en un microscopio de contraste de fases bajo un aumento de 40X determinándose así los porcentajes de vivos y muertos. Los espermatozoides vivos quedan de color blanco y los muertos quedan teñidos de color rojo.



**Figura 17.** Imagen de contraste positiva y negativa capturada del microscopio de contraste de fases de una muestra de semen con la tinción vital Eosina/Nigrosina.

### 3.2.2 Método de conservación de pajillas de semen

Se tomó en cuenta dos tipos de conservación, refrigerado y congelado; ambos momentos en el procesamiento del semen están determinados básicamente por la temperatura dando evidentemente variación entre sus resultados.

#### 3.2.2.1 Semen Refrigerado

Luego del empajillado del semen, este permaneció por un tiempo de 18 horas para su estabilización, este proceso es lento iniciando con una temperatura ambiente de 20°C hasta que finalizó a 5°C.

#### 3.2.2.2 Semen Congelado

La congelación de semen se dio bajo el mismo protocolo usado en el Banco Nacional de Semen, es decir las pajillas después de su refrigeración fueron sometidos a un descenso de temperatura con vapor de nitrógeno hasta los -140°C con disminución de temperatura de -20°C por cada minuto; dando un tiempo de 7 minutos, luego se sumergió las pajillas en nitrógeno, quedando de esta forma congeladas; luego se hizo la comprobación de la motilidad espermática, si esta es de 60% a más, se almacenan, de ser menor se descartan.

Finalizado su congelación y comprobación se almacenan a granel conservaron en tanques grandes de nitrógeno.



**Figura 18.** Equipos para la congelación de semen



**Figura 19.** Pajillas de semen congelados



**Figura 20.** Almacenamiento de las pajillas a los tanques de nitrógeno e inmediato descongelado de pajilla para la evaluación del proceso.

### 3.2.3 Evaluación de la integridad de la membrana citoplasmática.

Se realizó pruebas de endosmosis (HOST - Hipo Osmotic Swelling Test) según protocolo utilizado por Correa y Zavos (1994) y Jeyendran *et al.*, (1984).

Se utilizó una solución hipoosmótica con la composición química descrita en la Tabla 7.

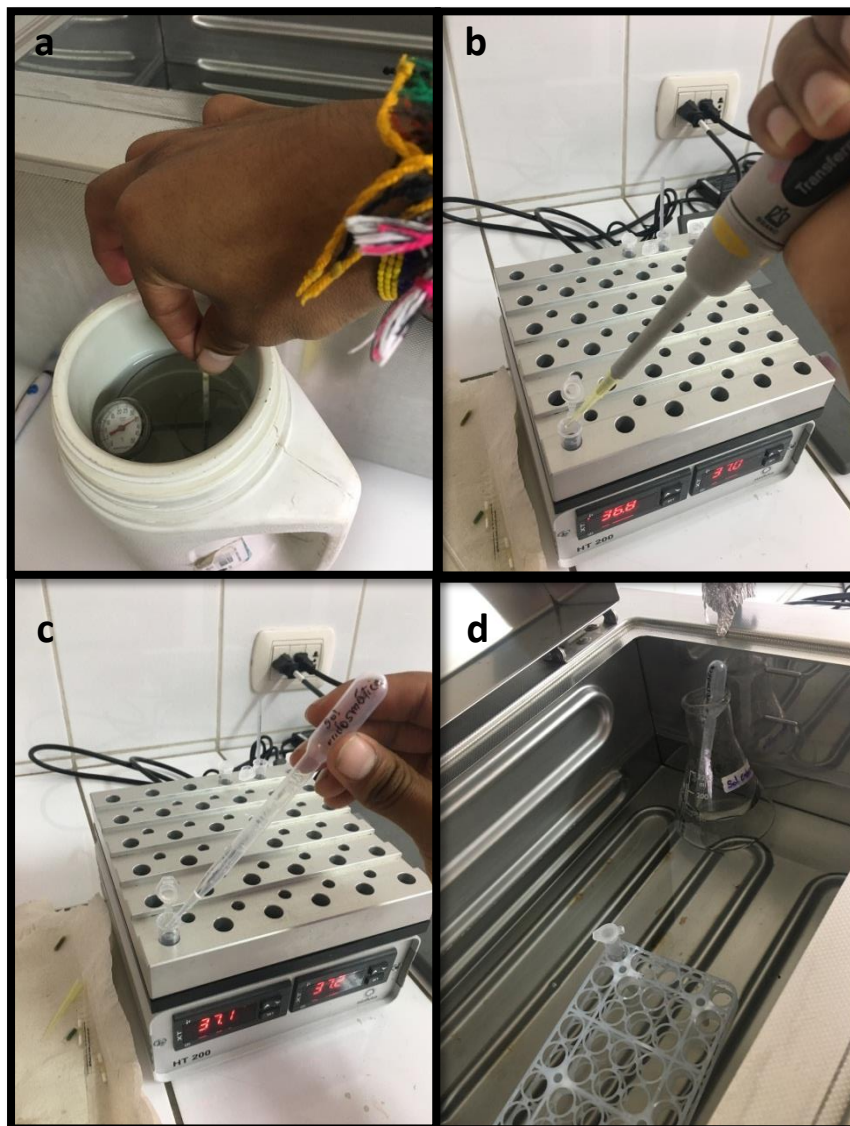
**Tabla 7:** Solución Hipo-osmótica; Correa et al. (1994)

Componentes	Unidades	Cantidades
<b>Citrato de Sodio dihidratado</b>	gr.	0.08
<b>Fructosa</b>	gr.	0.025
<b>Agua destilada</b>	ml	10
<b>Osmolaridad</b>	mOsmol/L	100

### 3.2.4 Protocolo de Correa y Zavos, (1994) para la aplicación de la prueba hipoosmótica en semen descongelado:

Debemos tomar en cuenta que la prueba hipoosmótica es realizado de una forma particular en comparación de una muestra refrigerada ya que tiene una variante que es el lavado, centrifugación y reconstitución que se describe a continuación. Una vez descongelado las pajillas de semen a 37 °C se diluyó en proporción 1:2 (v/v) usando medio de lavado modificado descrito en la tabla 8. A continuación se centrifugó por 8 minutos a 400 rpm, se descartó el sobrenadante y se utilizó el pellet residual, Este pellet fue reconstituido con solución de lavado (Figura 21, a) hasta lograr el volumen inicial. Luego se mezcló 0.1 ml de

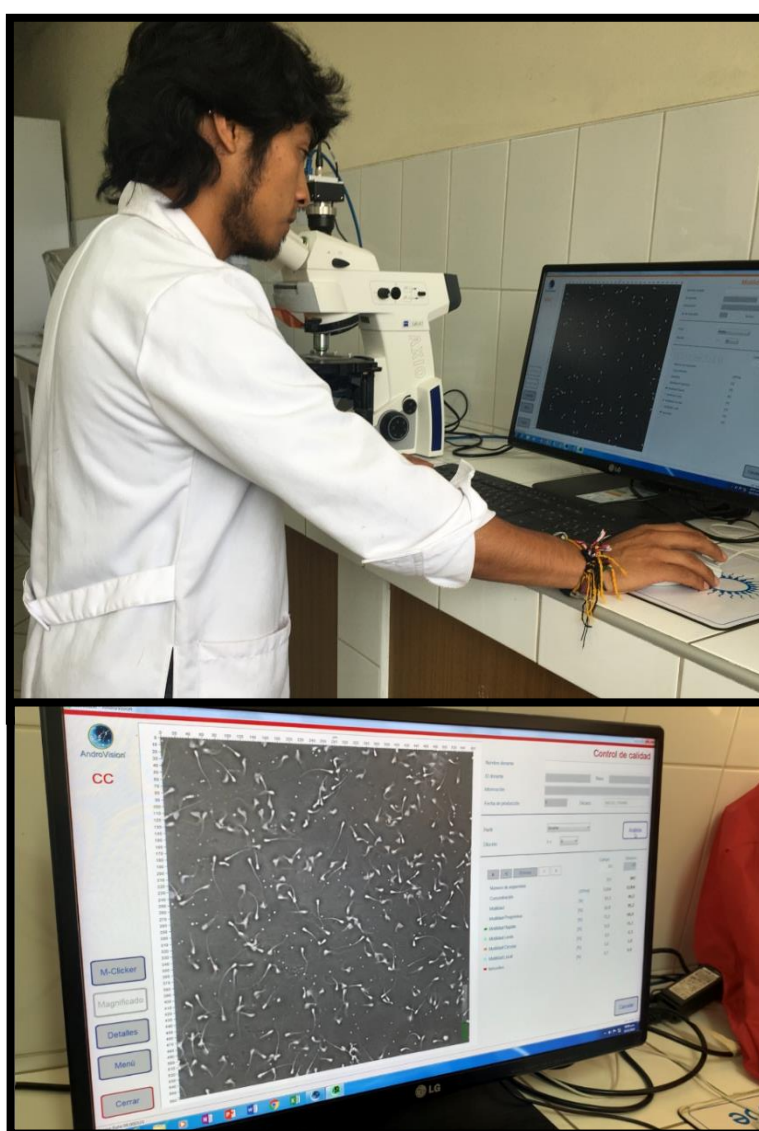
la muestra con 1 ml de solución hiposmótica (proporción 1:10; Figura 21, b). La solución hiposmótica puede estar conservada a 4°C hasta el momento de su uso (Lodhi *et al.*, 2008); se incubó la mezcla en baño maría a 34°C por 60 minutos (Figura 21, c). Finalizado la incubación, se añadió una gota de glutaraldehido al 2% para detener la reacción. Finalmente, se realizó el conteo en un microscopio de contraste de fase a 40X, registrándose un total de 200 espermatozoides; Si durante el conteo el 60% de espermatozoides presentan la forma de espiral, se considera como normales (reacción positiva), en este sentido el 40% de espermatozoides restante se consideran como anormal (reacción negativa) para la fertilidad (Zubair *et al.*, 2014) (Figura 22).



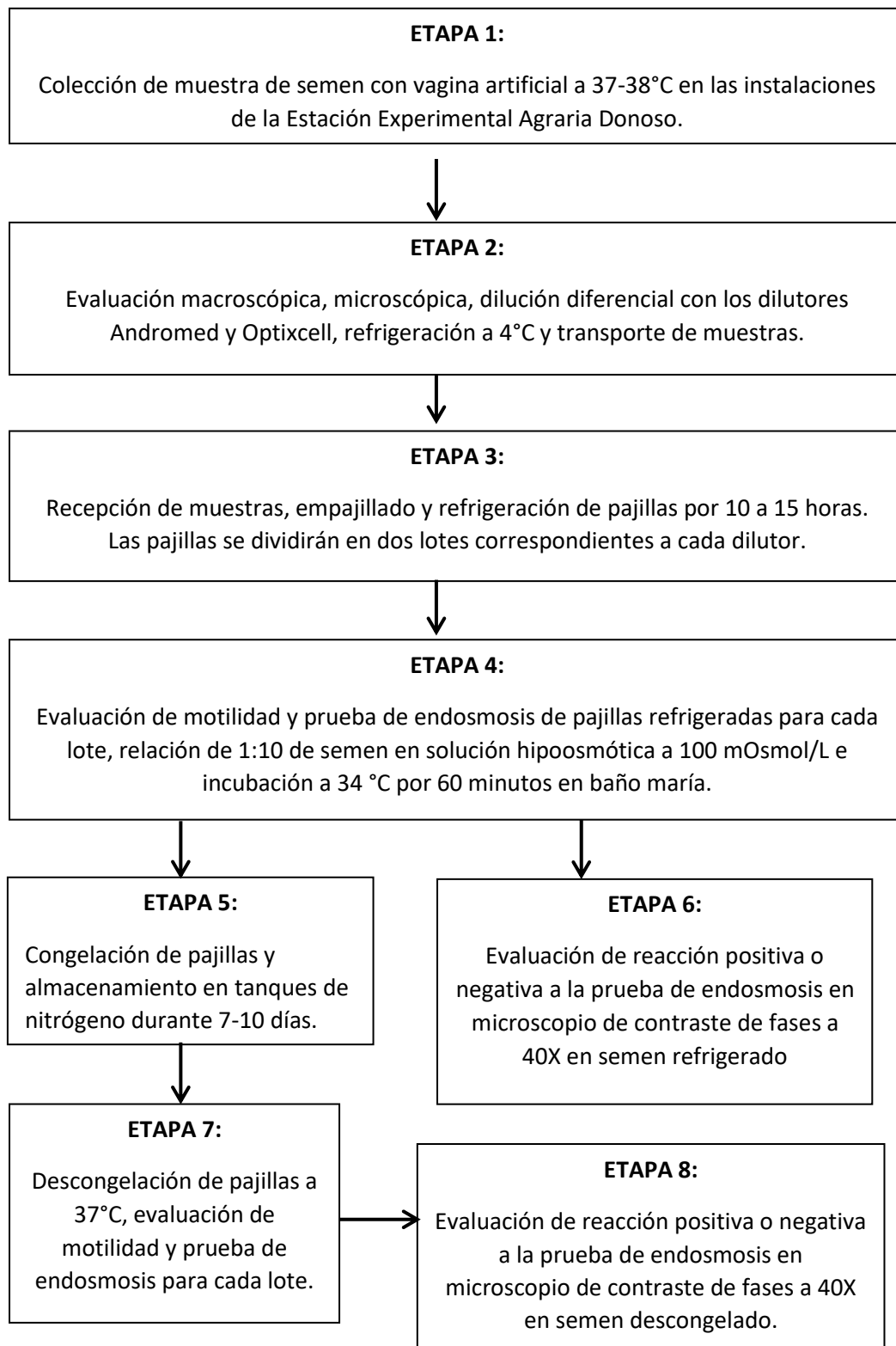
**Figura 21.** a) Descongelación de pajilla de semen; b) Depósito de la muestra de semen en tubos eppendorf; c) Adición de la solución hiposmótica; d) Incubación en baño María a 34 C° por 60 minutos.

**Tabla 8:** Correa et al. (1994). Medio de lavado.

<b>Componentes</b>	<b>unidades</b>	<b>Cantidad</b>
<b>Citrato de sodio dihidratado</b>	gr.	0.277
<b>Suero Fetal Bovino</b>	ml	0.2
<b>Agua destilada</b>	ml	9.8
<b>Total</b>	ml	10

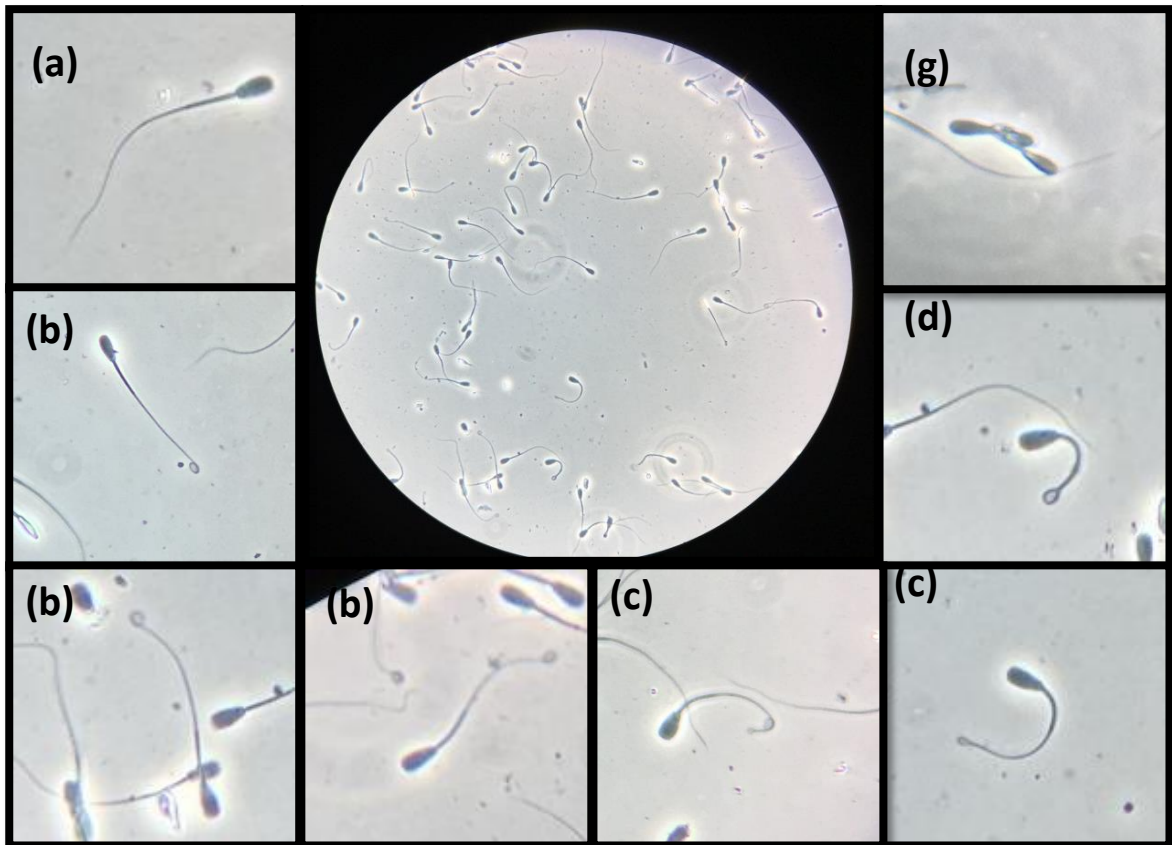


**Figura 22.** Visualización de muestras en el sistema CASA.



**Figura 23.** Esquema N°1: Fases de la prueba de endosmosis en semen refrigerado y congelado





**Figura 24.** Fijación de muestras frente al HOST en sus diferentes niveles de reacción; la clasificación en función de su reacción según Jeyendran (1984) (Figura 3).

### 3.3 ANALISIS ESTADISTICOS

Se determinó las medidas de tendencia central (promedio) y las medidas de dispersión (desviación estándar, coeficiente de variación, valores máximos y mínimos) en todas las características seminales.

Se realizó un test de normalidad para determinar si la distribución dada se ajusta a un conjunto de datos; para ello se realizó la prueba de Anderson-Darling.

Asimismo, los valores porcentuales que se obtuvieron con la prueba de endosmosis fueron normalizados angularmente (función Arco Seno) previo al análisis estadístico.

$$Y = \text{arc sen} \left[ \left( \frac{x}{100} \right)^{1/2} \right]$$

Dónde:

X: representa el valor porcentual obtenido de la característica.

Se empleó un ANOVA a través de un diseño de bloques completamente al azar, siendo los factores evaluados, los dilutores como tratamientos (Andromed y Optixcell) y cada raza de

toros como un bloque (Simmental y Braunvieh), en este sentido se aplicó individualmente el diseño estadístico para cada método de conservación de pajillas de semen (refrigerado y descongelado).

El modelo aditivo lineal fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = u + P_i + K_j + e_{ij}$$

**Dónde:**

$Y_{ij}$  = Variable respuesta media de la endósmosis positiva de la i-ésima raza con el k-ésimo diluyente.

$u$  = Media general.

$P_i$  = Efecto de la i-ésima raza (bloque).

$K_j$  = Efecto del k-ésimo diluyente (Tratamientos).

$e_{ij}$  = Efecto del error experimental.

A los análisis de varianza significativos se realizó la prueba de Tukey para determinar las relaciones entre los factores mencionados.

## IV. RESULTADOS Y DISCUCIONES

### 4.1 Características seminales de los toros

Los promedios obtenidos en tanto a concentración y volumen, (Tabla 9), se encuentran dentro de los rangos de la especie (Hafes, 2002). Estos resultados son similares a los reportados por Tamayo *et al.*, (2013); encontrando volúmenes de eyaculado de 3.6 ml. Con respecto a la motilidad masal se reporta similitud con los reportados por Veloz *et al.*, (2017) de 3.89 ml en promedio en razas Holstein, Brown Swiss y Jersey.

**Tabla 9:** Resultados de la evaluación del semen puro considerando todos los eyaculados

Parámetros	n	Promedio n = 32	Máximo	Mínimo
Volumen (ml)		<b>3.3 ±1.42</b>	<b>7.5</b>	<b>1</b>
Color		<b>Blanco cremoso</b>	*	*
pH	<b>32</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>7</b>
Motilidad M.		<b>3.8±0.72</b>	<b>5</b>	<b>3</b>
Concentración (millones)		<b>1442.4 ±332.9</b>	<b>1900</b>	<b>400</b>

Se observa investigaciones con cifras similares, a pesar de que la presente investigación fue realizada con toros jóvenes, estos son equiparables a otras razas que presentaban mayor madurez sexual.

Por otro lado Cabrera *et al.*, (2012) reporta concentraciones de  $800 \pm 103$  y  $770 \pm 149$  millones/ml en toros Holstein; así como también obtuvo  $1130 \pm 106$  y  $990 \pm 129$  millones/ml en toros Brown Swiss. Estas diferencias pueden estar marcado por la raza, la edad de los ejemplares o también por la metodología del cálculo de la concentración, en estos trabajos citados fue utilizada la técnica del Hemocitómetro en cámara de Neubauer. Actualmente se utiliza métodos más exactos y cada vez menos subjetivos como la espectrofotometría.

Con respecto a los volúmenes y concentraciones entre toros, se realizó adicional un ANVA donde no se encontró diferencias estadísticas significativas ( $P \geq 0.05$ ).

**Tabla 10:** Resultados de medias y desviaciones estándar para características de volumen y concentración espermática de toros experimentales

TORO	n°	VOLUMEN	CONCENTRACION
OTTO	8	3.43±1.2 a	1427.25 ± 324.7 a
PUMPO	8	3.06± 0.97 a	1324.625± 436.2 a
SANTOS	8	2.81±0.8 a	1560 ± 270.9 a
MARINO	8	4.06±2.06 a	1457.75±299 a
<b>MEDIA</b>	8	<b>3.34±1.42</b>	<b>1442.40±327.34</b>

a, b letras diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ) Media y desviación estándar.

**Tabla 11:** Promedios y desviaciones estándar de volumen seminal por razas de toros experimentales

RAZA	n°	VOLUMEN	CONCENTRACION
SIMMENTAL	16	3.25±1.65 c	1375.9±375.3 d
BROWNVIEH	16	3.43±1.18 c	1508.9±280.7 d

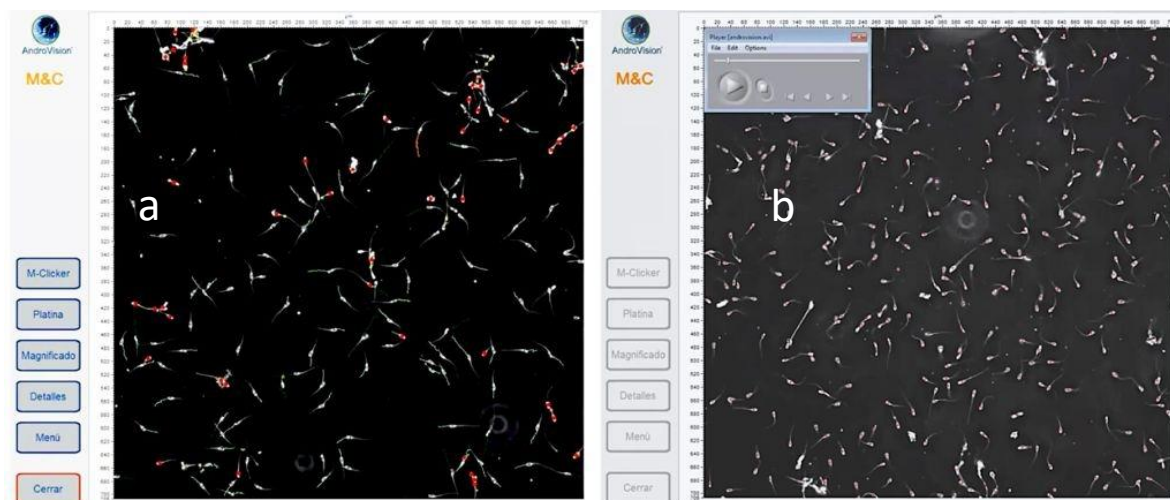
De los resultados obtenidos, se puede afirmar que para un nivel de significancia de 95 % existe evidencia estadística para afirmar que no hay diferencias estadísticas significativas ( $P \geq 0.05$ ) entre volumen de eyaculado ni concentración espermática entre toros jóvenes de raza Simmental y Braunvieh.

#### 4.2 Visualización y nitidez frente al CASA

Durante las evaluaciones fue bastante notorio la diferencias en tanto a nitidez frente al CASA (Figura 22).

El diluyente Optixcell dentro del área de investigación resulta ser mejor en tanto a visualización, en comparación del Dilutor Andromed. Como citábamos anteriormente, ambos diluyentes aplican diferentes tecnologías para la criopreservación, sin embargo, podríamos afirmar que dichos componentes que constituyen el dilutor Optixcell como los liposomas, llegan a ser aprovechados e incluidos dentro de las membranas plasmáticas de los espermatozoides, pero, además, estas vesículas tienen la capacidad de incorporar

proteínas que disminuyen el efecto térmico y oxidativo como son las BSP hacia la membrana (Manjunath *et al.*, 2002). Por otro lado, queda la incertidumbre de la naturaleza de las partículas encontradas con el dilutor Andromed, pero que probablemente ciertos componentes provenientes del plasma seminal o del dilutor, no están siendo aprovechados por los espermatozoides.



**Figura 25.** Imagen de campos visualizados en el CASA. a) Optixcell; b) Andromed.

### 4.3 Características del semen refrigerado

#### 4.3.1 Motilidad espermática individual

En la tabla 12 se muestran los resultados de la motilidad frente a los dilutores, se visualiza además la comparación de medias de las razas que resultó del ANOVA.

**Tabla 12:** Promedios de Motilidad espermática en Porcentajes y desviaciones estándar de semen refrigerado de toros de razas Simmental y Braunvieh según dilutor empleado.

DILUTOR					
RAZA	n°	OPTIXCELL	n°	ANDROMED	MEDIA
SIMMENTAL	16	84.30 ± 10.57	16	82.71 ± 9.17	<b>83.51 ± 9.77a</b>
BRAUNVIEH	16	77.70 ± 14.99	16	72.12 21.61	<b>74.91 ± 18.51b</b>
<b>MEDIA</b>		<b>81±13.19c</b>		<b>77.42±17.19c</b>	

No se encontró evidencia estadística para afirmar que existen diferencias significativas entre dilutores ( $P \geq 0.05$ ), por lo tanto, estadísticamente estos dilutores se comportan con mucha similitud frente a los eyaculados en un procesamiento de refrigeración para la característica motilidad espermática en semen refrigerado

Estos resultados son muy semejantes a los obtenidos por Chaudhary *et al.*, (2017) quien evaluando toros de raza Gyr y búfalos raza Surti arrojó  $73.1 \pm 0.7\%$  y  $76.0 \pm 0.7\%$  de motilidad espermática con dilutor Optixcell; también reportó  $70.8 \pm 0.9\%$  y  $73.5 \pm 0.7\%$  con Andromed respectivamente, evidenciándonos estadísticamente ( $P \geq 0.05$ ) que no existen diferencias significativas entre dilutores con respecto a la motilidad en semen refrigerado.

Se tiene además que estos resultados son menores que los obtenidos por Damas (2010) con  $87.5 \pm 1.52$  utilizando Andromed; sin embargo, este autor utilizó toros adultos con edades superiores a tres años.

Por otro lado, considerando las razas, encontramos diferencias significativas entre ellas ( $P \geq 0.05$ ); y que además el toro Otto que obtuvo  $87.48 \pm 6.43\%$  y Marino que arrojó  $72.81 \pm 20.66\%$  fueron los extremos (ANEXO N°1).

#### 4.3.2 Vitalidad espermática

En la tabla 13 se detalla los resultados obtenidos en tanto a porcentaje de espermatozoides vivos.

**Tabla 13:** Vitalidad del semen refrigerado

DILUTOR					
RAZA	n°	OPTIXCELL	n°	ANDROMED	MEDIA
<b>SIMMENTAL</b>	16	$82.04 \pm 10.31$	16	$81.03 \pm 7.84$	<b><math>81.54 \pm 9.03a</math></b>
<b>BRAUNVIEH</b>	16	$77.39 \pm 14.84$	16	$66.74 \pm 19.87$	<b><math>72.07 \pm 18.09b</math></b>
<b>MEDIA</b>		<b><math>79.72 \pm 12.80c</math></b>		<b><math>73.89 \pm 16.54c</math></b>	

En base al análisis de varianza con respecto a los dilutores existe evidencia estadística para no rechazar la hipótesis nula ( $P \geq 0.05$ ). Por lo tanto, estadísticamente los dilutores se comportan sin efecto alguno en semen refrigerado a las 18 horas. Se asemeja mucho a lo reportado por Bedoya *et al.*, (2003) ubicando sus cifras en  $81.53\%$  de espermatozoides vivos en toros adultos raza Holstein y Blanco Orejinegro, y también a lo que obtuvo Damas (2010) con porcentajes de  $77.38 \pm 4.31$  y  $79.02 \pm 4.65$  usando dilutor Bioxcell y Andromed respectivamente en toros Holstein y Brown Swiss. Además, que también se asemeja al resultado de Nongbua (2017) que obtuvo  $80.00 \pm 8.00$  con dilutor Optixcell en toros adultos de raza Holstein y Rojo Sueco. Se cree que estas mínimas diferencias están más sujetas al manejo y frecuencias de colectas, pero además vemos el efecto que tiene el manejo y una rutina de entrenamiento reproductivo de los toros jóvenes frente a las colectas ya que sus cifras se equiparan a la de reproductores adultos.

Encontramos mucha semejanza en resultados a pesar de que se utilizó diferentes tipos de diluyentes, esto nos lleva a creer que la refrigeración no causa tal efecto significativo que pueda marcar diferencia entre Optixcell o Andromed ya que hay mucha similitud en su composición.

Por otro lado, adicional el ANOVA considerando solo la variable raza se encontró diferencias significativas ( $P < 0.05$ ); donde la raza Simmental con  $81.54 \pm 9.03$  difiere estadísticamente de la raza Braunvieh  $72.07 \pm 18.09$ .

#### 4.3.3 Integridad de membrana

Se muestra en la tabla 14 los resultados del ANOVA de la prueba endosmótica. Los espermatozoides que dieron reacción positiva al test HOS denotaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

**Tabla 14:** Promedios de porcentajes más desviaciones estándar de la prueba de HOS en semen refrigerado, por razas de toros

DILUTOR					
RAZA	n°	OPTIXCELL	n°	ANDROMED	MEDIA
SIMMENTAL	16	51.33±13.96	16	41.63±11.60	<b>46.48 ± 13.55a</b>
BRAUNVIEH	16	46.60±16.51	16	37.69±15.10	<b>42.15±16.21a</b>
<b>MEDIA</b>		<b>48.97±15.23c</b>		<b>39.66±13.39d</b>	

Estos resultados nos muestran diferencias estadísticas significativas entre dilutores ( $P < 0.05$ ) para la característica porcentaje de endosmosis positiva obteniéndose  $48.97 \pm 15.23$  % de espermatozoides que reaccionaron (Optixcell) frente a  $39.66 \pm 13.39$  (Andromed). Estos resultados son menores a los reportados por Bedoya *et al.*, (2003) que obtuvo 62.84 % de reacción positiva frente al HOST en toros de 24 meses raza Holstein y Blanco Orejinegro, los obtenidos por Damas (2010) con  $66.00 \pm 4.98$  % y  $67.90 \pm 5.40$  % utilizando los diluyentes Bioxcell y Andromed respectivamente en toros nacionales, Cabrera (2012) obtiene  $57.82 \pm 2.75$  % usando dilutor Bioxcell en toros nacionales raza Holstein y Brown Swiss, y Paucar (2011) obtuvo  $57.9 \pm 2.48$  % con dilutor Bioxcell en toros Brown Swiss. Cabe resaltar lo importante que puede ser el efecto del factor edad de las unidades experimentales (toros) y que lo podemos observar ya que los utilizados en este trabajo de investigación apenas sobrepasan la pubertad (15 meses) (Hafes, 2002). Es posible que esto ocasione cierta variabilidad en los resultados; tomando las investigaciones de Kumi-Diaka *et al.*, (1981) se podría encontrar mayores cifras y con alta homogeneidad en los parámetros

estudiados ya que toros de 3 a 7 años de edad ya se encontrarían en edad óptima de producción asociado a su madurez testicular.

Sin embargo, fueron superiores a los reportados por Martins (2013) la cual reporta  $43.6 \pm 19.3$  % en toros de 18 a 22 meses raza Nelore, podemos considerar dichos toros como jóvenes, sin embargo, la disimilitud de las cifras responde a la variación de dicho autor en la solución hipoosmótica (150 mOsm/L), no permitiendo expresar con mayor porcentaje la reacción de dilatación espermática en comparación con la solución hipoosmótica de esta investigación (100). Como vemos el porcentaje de reacción cambiara, a menor osmolaridad mayor porcentaje de espermatozoides reaccionados; No obstante, al disminuir por debajo de los 100 mOsm/L podría ocasionar perdida de la integridad física de la membrana (ruptura) que al visualizarla en el microscopio lo observaríamos como una célula sin reacción.

En esta primera etapa no se ve diferencias muy marcadas entre dilutores, ya que posiblemente el tratamiento del semen refrigerado no sufre alteraciones o efectos severos que puedan presentarse durante las primeras 18 horas. No obstante, será la criopreservación y el efecto que pueda tener en la membrana la que realmente ponga a prueba las diferencias o similitudes de ambos diluyentes. Por lo tanto, se debe verificar si los liposomas sintéticos (Optixcell) mantiene mejor la integridad de la membrana espermática frente a las Lecitinas de soya (Andromed).

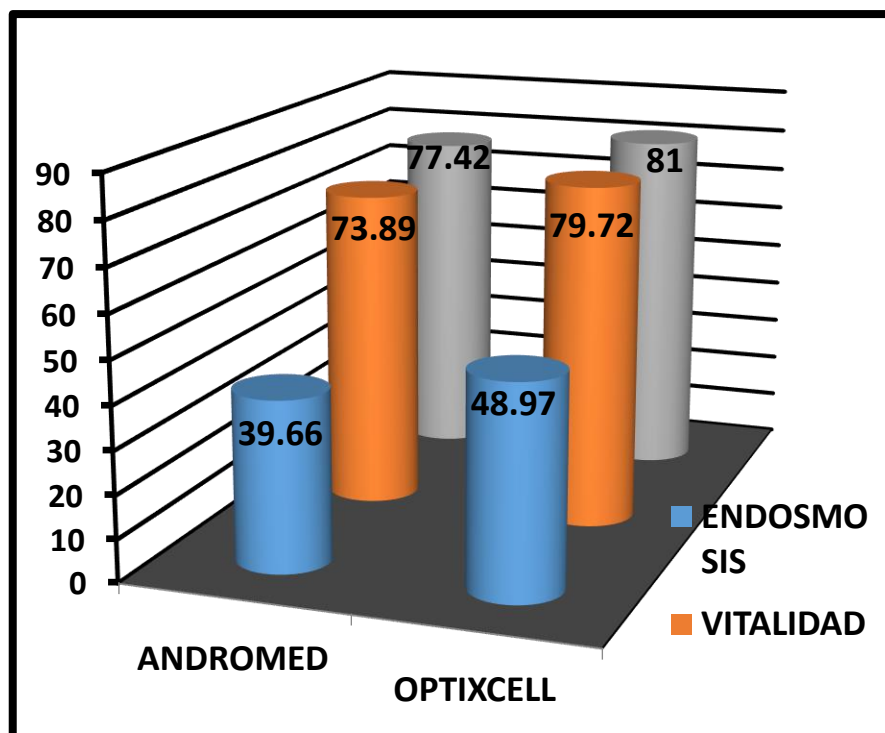


Figura 26. Esquema N°2: Comparación porcentual en semen refrigerado.



## 4.4 Características del semen descongelado

### 4.4.1 Motilidad espermática individual

Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 15; no se observa diferencias estadísticas significativas entre dilutores pero si entre razas, para esta característica.

Los resultados del ANVA nos dan evidencia estadística ( $P \geq 0.05$ ) para afirmar que no existen diferencias significativas entre dilutores con respecto a la motilidad espermática en semen descongelado teniéndose  $65.78 \pm 14.18 \%$  y  $58.22 \pm 18.07 \%$  de motilidad usando dilutores Optixcell y Andromed respectivamente; sin embargo tomando como referencia los resultados de Chaudhary *et al.*, (2017) que obtuvo  $42.1 \pm 1.6 \%$  y  $37.1 \pm 1.4 \%$  con dilutor Optixcell y Andromed respectivamente en toros raza Gyr; Amal *et al.*, (2019) de  $46.32 \pm 2.5\%$ ,  $27.87 \pm 1.46\%$  y  $31.20 \pm 1.25\%$  con los dilutores Optixcell, Bioxcell y Tris respectivamente en toros Balineses.

**Tabla 15:** Resultados porcentuales de motilidad espermática según dilutores utilizado y razas de toros en semen descongelado.

DILUTOR					
RAZA	n°	OPTIXCELL	n°	ANDROMED	MEDIA
SIMMENTAL	16	$72.09 \pm 10.12$	16	$64.61 \pm 15.39$	<b><math>68.35 \pm 13.36a</math></b>
BRAUNVIEH	16	$59.47 \pm 15.10$	16	$51.82 \pm 18.74$	<b><math>55.64 \pm 17.68b</math></b>
<b>MEDIA</b>		<b><math>65.78 \pm 14.18c</math></b>		<b><math>58.22 \pm 18.07c</math></b>	

Observamos lo influyente que puede ser el factor raza. Como nos indica Chenowet (2013) al afirmar que los toros *Bos Indicus* presentan menor desarrollo de libido e impulso sexual en comparación de toros *Bos Taurus*; Sin embargo, no se especifica en que circunstancias o actividad se encontraban dichos animales raza Gyr y Balines.

En toros nacionales también se encuentra una superioridad equiparable tendiendo a la semejanza como nos indica Paucar (2011) reportándonos  $62.40 \pm 1.57$  por ciento de motilidad individual con dilutor Bioxcell y Damas (2010) con porcentajes de motilidad de  $63.70 \pm 1.85 \%$  y  $65.04 \pm 2.05 \%$ , dilutores Bioxcell y Andromed respectivamente, ambos autores con toros Brown Swiss.

Por otro lado comparando los toros; una particularidad observada al evaluar estos resultados es que existe evidencia estadística ( $P < 0.05$ ) para afirmar que entre razas hay diferencias

estadísticas significativas al utilizar este método de conservación, ya que se tiene una media de  $68.36 \pm 13.43$  % y  $55.65 \pm 17.46$  % siendo la raza Simmental superior a la raza Braunvieh para esta característica.

#### 4.4.2 Vitalidad espermática

Los valores de la evaluación microscópica se muestran en la Tabla 16.

El ANOVA muestra que existen diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre dilutores y entre razas teniéndose medias de  $67.14 \pm 10.36$  y  $57.59 \pm 12.73$  para Optixcell y Andromed respectivamente; para razas los valores fueron  $64.88 \pm 12.48$  % y  $59.85 \pm 12.15$  % para Simmental y Braunvieh, respectivamente.

Como se sospechaba, la influencia de los dilutores frente a la criopreservación se hace evidente, dejándose observar que Optixcell tiene un mejor efecto sobre la membrana al mantener su integridad física, la adaptación a un estrés térmico u oxidativo es crucial para la supervivencia, el perfil lipídico de los liposomas del diluyente Optixcell hace un mejor uso de las proteínas del plasma seminal al adherirlas a la membrana citoplasmática, este mecanismo es similar al que describe Manjunath (2002) con el perfil lipídico de la yema de huevo. Esto nos lleva a confirmar que el mecanismo que utiliza Andromed al utilizar un perfil lipídico en base a Lecitinas de Soya, no logra sustituir de forma análoga el efecto que si proporciona Optixcell.

**Tabla 16:** Resultados porcentuales de la vitalidad en semen descongelado.

		DILUTOR			
TORO	n°	OPTIXCELL	n°	ANDROMED	MEDIA
SIMMENTAL	16	$68.59 \pm 9.53$	16	$61.17 \pm 14.20$	<b><math>64.88 \pm 12.48a</math></b>
BRAUNVIEH	16	$65.69 \pm 11.24$	16	$54.01 \pm 10.29$	<b><math>59.85 \pm 12.15b</math></b>
<b>MEDIA</b>		<b><math>67.14 \pm 10.36c</math></b>		<b><math>57.59 \pm 12.73d</math></b>	

Los resultados obtenidos en el presente experimento son semejantes a lo obtenido por Damas (2010) quien reporta porcentajes de vitalidad de  $60.73 \pm 5.07$  % y  $64.47 \pm 4.61$  % con dilutores Bioxcell y Andromed respectivamente en toros nacionales razas Holstein y Brown Swiss, y superiores a los obtenidos por Quintero *et al.*, (2014) que evaluando diferentes osmolaridades en el HOST encontró medias de vitalidad de  $43.58 \pm 3.27$  % utilizando Tris como dilutor en toros Holstein y Brahman, Amal (2019) reportando porcentajes de  $37.81 \pm 2.70$  %,  $39.12 \pm 2.40$  % y  $29.92 \pm 2.24$  % con dilutor Optixcell, Bioxcell y Tris

respectivamente en toros Balineses y López (2015) obteniendo 59.3 % usando el dilutor Triladyl en toros Jersey. Se tiene además que los resultados obtenidos son menores que los reportados por Ansari (2016),  $73.5 \pm 0.9\%$  y  $63.6 \pm 0.8\%$  empleando dilutor Optixcell y Tris respectivamente en toros raza Friesian.

Por otro lado, se encontró diferencias estadísticas significativas ( $P < 0.05$ ) entre razas colocando la raza Simmental con  $64.88 \pm 12.48\%$  de vitalidad espermática por encima de la raza Braunvieh que obtuvo  $59.85 \pm 12.15\%$ .

#### 4.4.3 Integridad de membrana

Los resultados porcentuales de integridad de membrana citoplasmática se muestran en la Tabla 17.

El ANOVA nos da evidencia estadística para afirmar que existen diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre las medias de las reacciones positivas observadas en el Test de HOS que son  $41.15 \pm 10.26$  y  $26.82 \pm 7.30$  para Optixcell y Andromed respectivamente. Nuestros resultados son menores a los obtenidos por Kang *et al.*, (2019) quienes reportan  $60 \pm 15.1\%$  y  $40.09 \pm 11.4\%$  para Optixcell y Triladyl en toros Koreanos raza Hanwoo; Nongbua (2017) con  $48.5 \pm 11.1\%$  empleando dilutor Optixcell en toros Holstein y Rojo Sueco; Lima-Verde (2017) con  $48.5 \pm 3.6\%$  y  $38.8 \pm 3.6\%$  utilizando dilutor Optixcell Andromed, respectivamente y Ansari (2016) con  $53.8 \pm 0.8\%$  y  $43.9 \pm 0.8\%$  usando dilutores Optixcell y Tris respectivamente en búfalos.

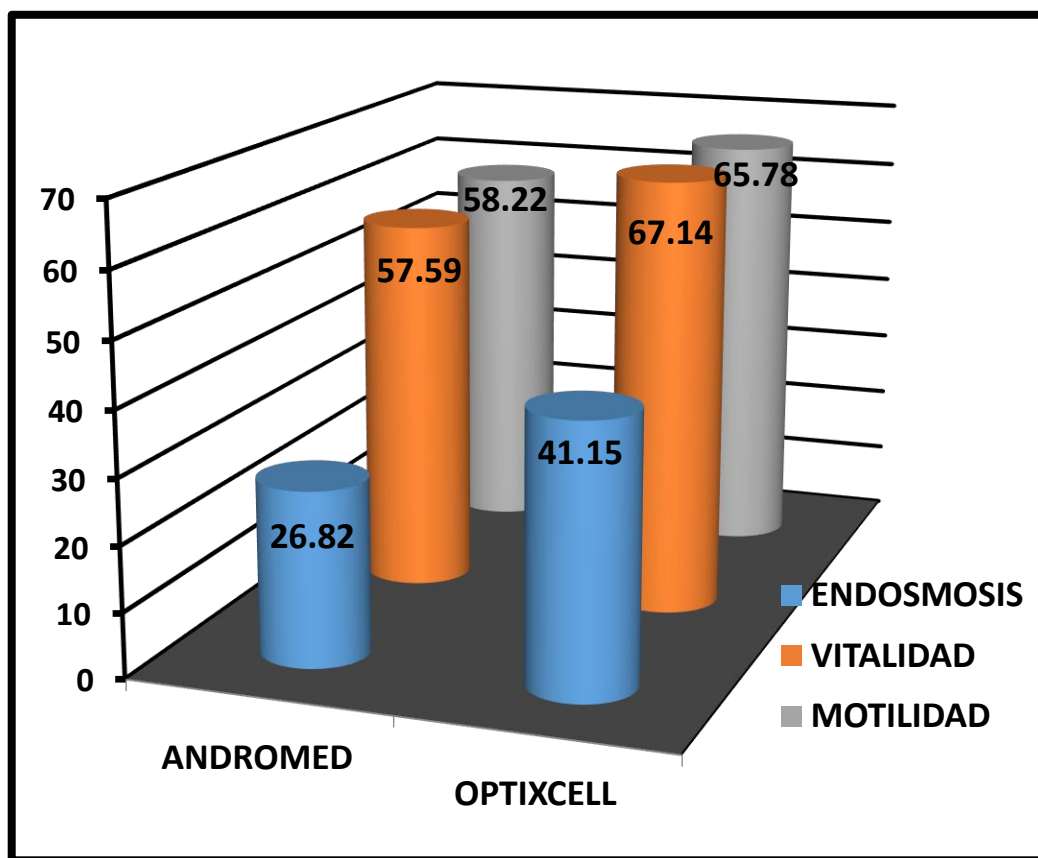
**Tabla 17:** Comparación porcentual del test de HOS en semen descongelado.

DILUTOR					
TORO	n°	OPTIXCELL	n°	ANDROMED	MEDIA
SIMMENTAL	16	$44.27 \pm 11.88$	16	$27.15 \pm 7.94$	<b><math>35.71 \pm 13.21a</math></b>
BRAUNVIEH	16	$38.03 \pm 7.46$	16	$26.49 \pm 6.84$	<b><math>32.26 \pm 9.16a</math></b>
MEDIA		<b><math>41.15 \pm 10.26b</math></b>		<b><math>26.82 \pm 7.30c</math></b>	

Sin embargo, Amal (2019) obtiene  $41.51 \pm 2.10\%$ ,  $39.02 \pm 1.9\%$  y  $38.04 \pm 1.89$  usando los diluyentes Optixcell, Bioxcell y Tris respectivamente en toros de raza Balinesa, estas cifras son similares a lo que se obtuvo en esta investigación.

Investigaciones realizadas en el Banco Nacional de Semen con toros en edades óptimas para producción (3 a 5 años) reportaron porcentajes de integridad de membrana semejantes a lo obtenido; Damas (2010) nos indica que usando dilutores Bioxcell y Andromed, obtiene

43.94±4.49% y 45.93±4.63% como también lo que reporta Paucar (2011) obteniendo porcentajes de 40.65±3.84 con dilutor Bioxcell. Ambos autores realizaron sus experimentos con toros nacionales adultos de razas Holstein y Brown Swiss.



**Figura 27.** Esquema N°3: Comparación porcentual en semen descongelado.

En tanto a los diluyentes, es bastante notorio la diferencia en porcentajes de reacción frente al HOST, como mencionaba Gao y Critser (2000), el punto frágil se localiza en la membrana citoplasmática durante la criopreservación, de esto se desglosa la importancia de que tecnología se adecua mejor a un procesamiento de conservación. Tanto motilidad como vitalidad son pruebas importantes que nos puede estimar la eficiencia del procesamiento mas no la de los diluyentes.

Si nos basamos en las características físicas de ambos dilutores, podríamos proponer que el dilutor Optixcell no deja componentes residuales, sino que, los componentes del plasma seminal y del mismo dilutor están siendo aprovechados por las membranas de los espermatozoides. Complementado la investigación con lo planteado por Manjunath et al., (2002), estas vesículas (liposomas) funcionan como vehículos, no solo tienen la capacidad de fusionarse con la membrana, sino que también, es capaz de introducir proteínas del medio hacia el interior de las vesículas e introducirlas a la membrana espermática. De esto se

postula que los liposomas tienen 3 funciones principales en tanto a mecanismo de crioprotección; 1) secuestrar las proteínas presentes del plasma seminal como las BSP, 2) Adherir y conservar dichas proteínas dentro de esta vesícula transformando este liposoma en una lipoproteína ideal para la membrana plasmática del espermatozoide, 3) Fusionar todos sus componentes a la membrana citoplasmática del espermatozoide. De esta manera se puede disminuir las criolesiones durante el procesamiento. Este mecanismo es similar a la técnica de preservación con yema de huevo la cual las lipoproteínas tenían la capacidad de incluir y adherir de manera eficientemente dichas partículas protectoras a la membrana durante la criopreservación sin embargo ya no son utilizados por encontrar evidencia de restos biológicos, por ser posibles vectores bacteriológicos y por el tiempo de procesamiento del diluyente.

En este sentido, incluir solo un perfil de lípidos crioprotectores en los diluyentes, podría no abastecer a la membrana de una eficiente protección, a diferencia de aquel perfil lipídico cuyo componentes no solo protegen la membrana sino que también permita aprovechar al máximo las proteínas (sinergia) que interviene en la adaptación del espermatozoide ante medios de estrés térmico y oxidativo.

## V. CONCLUSIONES

Según las cifras y discusiones realizadas en el presente trabajo se tiene las siguientes conclusiones:

- EL dilutor comercial sintético Optixcell demostró ser mejor para la conservación de la integridad de la membrana citoplasmática en semen de toros raza Simmental y Braunvieh frente al actual dilutor Andromed, mostrando mayor porcentaje de reacción positiva en la prueba de HOST en semen refrigerado y descongelado.
- Con respecto a las razas se tiene evidencia para afirmar que la raza Simmental presenta mejores características seminales sobre la raza Braunvieh; sin embargo, en el HOST no se halló diferencias estadísticas.

## **VI. RECOMENDACIONES**

Tomando como referencia los resultados y las conclusiones de la presente investigación se recomienda:

- Se recomienda continuar la investigación con pruebas de fertilidad in vivo y correlacionar el HOST versus tasas de fertilidad en vacas en producción.
- Se recomienda seguir probando el dilutor Optixcell para el procesamiento de semen bovino en los centros de producción de pajillas y hacer seguimiento de sus bondades en función a fertilidad en los establos lecheros.

## VII. BIBLIOGRAFIA

- Aires, V.; Hinsch, K.; Mueller-Schloesser, S. & Bogner, E. (2003). In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithinbased extenders for cryopreservation of bovine semen. *Teriogenología*; 60 (2): 269-79
- Agüero, G. (2012) “Evaluación de las características seminales de sementales de bovinos mediante el analizador seminal computarizado”. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Amal, A.; Arifiantini, R.; Setadi, M. & Said, S. (2019). “Characteristics of the post-thawed Balinese bull semen extended in three different extenders and equilibration times”. *J. Indonesian Trop.Anim.Agric.* 44(2):135-145.
- Andromed® - Diluyente sin yema de huevo para semen bovino. Recuperado de <http://www.minitube.com>.
- Ansari, M.; Rakha, B.; Akhter, S. & Ashiq, M. (2016). “OPTIXcell improves the postthaw quality and fertility of buffalo bull sperm”. *Theriogenology* 85 (2016) 528–532.
- Ansari, M.; Rakha, B. & Akhter, S. (2017). “Cryopreservation of bull semen in OptiXcell® and conventional extenders: Comparison of semen quality and fertility”. *Animal Science Papers and Reports* vol. 35 (2017), No. 3, 317-328.
- Asociacion Colombiana De Criadores De Ganado Pardo Suizo Y Braunvieh. (2012). Braunvieh. Recuperado de <https://www.asopardocolombia.co/braunvieh>.
- Asociacion Nacional De Criadores De Ganado Fleckvieh-Simmental De España. (2011). Centro de Selección y Reproducción Animal de Movera-Zaragoza. Recuperado de [https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/Programa%20de%20Mejora%20Raza%20Bovina%20Fleckvieh.%20Definitivo.\\_tcm30-115597.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/Programa%20de%20Mejora%20Raza%20Bovina%20Fleckvieh.%20Definitivo._tcm30-115597.pdf)



- Arenas, E.; Cambron, A.; Ambriz, D.; Zuñiga, P.; Tobon, A. & Rosado, A. (2010). “Bases fisiológicas de la capacitación y de la reacción acrosomal del espermatozoide”. *Contactos* 78, 5–11.
- Avalos, A.; Gonzales, J.; Vargas, A. & Herrera, J. (2018). “Recolección y manipulación seminal in vitro”. Primera edición. Universidad Autónoma Metropolitana. México. Pág. 8-11.
- Avila, M. (2009). “Efecto de dos dilutores en la conservación de la integridad de la membrana plasmática de espermatozoide en semen refrigerado de carnero”. Tesis para optar el título de Ing. Zootecnista. Universidad Nacional Agraria la Molina. Lima-Perú.
- Barth, A. (1999). “Factores que afectan la pubertad de los toros, el uso de toros de un año en servicio a campo y en centros de inseminación artificial”. *Sitio Argentino de Producción Animal. Taurus* 1(3):4-17.
- Bedoya, N.; Vásquez, N.; Rivera, M.; Correa, G. & Trujillo, L. (2003). “Evaluación de la integridad funcional de la membrana plasmática de espermatozoides bovinos mediante el test hipoosmótico (host)”. *Revista de la Facultad Nacional de Agronomía Colombia-Medellín. Vol. 56, (2): 1983 - 1997.*
- Cabrera, P.; Orellana, J. & Pantoja, C. (2010). “Efecto de dos dilutores sobre la motilidad y la integridad de la membrana espermática en semen congelado de ovino”. *Rev. Inv. Vet Perú* 2010; 21 (2): 154-160.
- Cabrera, P. & Pantoja, C. (2012). “Viabilidad espermática e integridad del acrosoma en semen congelado de toros nacionales”. *Rev Inv Vet Perú* 2012; 23 (2): 192-200.
- Camargo, O. (2012). “The dairy cow: between economic efficiency and biological inefficiency”. Departamento de Producción Animal. Universidad Nacional de Colombia. Sede Medellín. Colombia. *Arch. Zootec.* 61 (R): 13-29.
- Caravaca, F.; Castel, J.; Guzman, J.; Delgado, M.; Mena, Y.; Alcalde, M. & Gonzales, P. (2005). “Bases de la producción animal”. *Manuales Universitarios de la Universidad de Sevilla. Sevilla, España.*
- Chaudhary, P.; Dhimi, A.; Chaudhari, D. & Pathan, M. (2017). “Leakage of transaminases during cryopreservation of cattle and buffalo semen in egg yolk

- tris and soya bean milk based extenders”. *Indian Journal of Animal Reproduction* 39 (2): 32-35.
- Chenoweth, P.J. (2003). “Impulso sexual del toro y comportamiento reproductivo”. *Large Animal Clinical Sciences, College of Veterinary Medicine, Kansas State University, Manhattan, Kansas, USA.*
- Chinchilla, M. (2013). Braunvieh, Pardo Suizo. *Rev. Agroenfoque. Lima-Perú.* Pág. 58-60.
- Correa, J. & Zavos, P. (1994). “The hypo-osmotic swelling test: Its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane”. *Theriogenology*, 42: 351-360.
- Cox, M. (2005). “Caracterización andrológica de potros de raza chilota”. *Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.*
- Cubas, G. (2013). “Evaluación seminal en toros manuales o computarizados” *Facultad de Veterinaria. Universidad de La Republica. Montevideo, Uruguay.*
- Cruz, S. L. (2012) *Federación colombiana de ganaderos fedegan. El Braunvieh N°. 119. Revista. Pág. 70-72.*
- Cunningham, J. (2005). “Fisiología Veterinaria”. Tercera edición. Editorial Elseiver España. Pág. 7-8.
- Damas, R. (2010). “Evaluación de dos dilutores comerciales en semen congelado de toros en el banco nacional”. Tesis para optar el título de Ing. Zootecnista. *Universidad Nacional del Centro del Perú. Huancayo, Perú.*
- Damas, R. (2010). “Efecto de dos dilutores y dos volúmenes de pajillas sobre la viabilidad espermática y fertilidad en semen congelado de toros”. Tesis Magister Scientiae en producción animal. *Universidad Agraria La Molina. Lima, Perú.*
- Darszon, A.; Acevedo, J.; Galindo, B.; Hernandez, E.; Nishigaki, T.; Treviño, C.; Wood, C. & Beltran, C. (2006). “Sperm channel diversity and functional Multiplicity”. *Reproduction* vol. 131:6 pg. 977-988.
- Darszon, A. (2007). “Canales, iones y como el espermatozoide interpreta los mensajes del ovulo”. *Biotecnología. Vol. 4 pg. 28-42.*

- DGMA DE LA UNION EUROPEA. (2006). “El cambio climático, ¿qué es?” Oficinas de Publicaciones Oficiales de la Comunidad Europea. Luxemburgo.
- Escobar, J.C. (2010). Ganadería Lechera con raza Simmental. Corporación Universitaria la Sallista Facultad de Ciencias Administrativas y Agropecuarias Administración de Empresas Agropecuarias Caldas – Antioquia. [En línea] <<http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/584/1/GANADERIA%20%20LECHERA%20CON%20RAZA%20SIMMENTAL.pdf>> [Consulta: 02 de octubre del 2020]
- FAO (1975). Estudios Agropecuarios. N 67. Razas Europeas de ganado bovino II. Italia. Pág. 5-8. Recuperado de <http://www.fao.org/3/an473s/an473s00.htm>
- Fathi, M.; Zaher, R.; Ragab, D.; Gamal, I.; Mohamed, A.; Naga, E. & Badr, M. (2019). “Soybean lecithin-based extender improves Damascus goat sperm cryopreservation and fertilizing potential following artificial insemination”. Asian Pacific Journal of Reproduction 2019; 8(4): 174-180.
- Ferrián, S. (2007). “Influencia de las características seminales del eyaculado de conejo Sobre la calidad espermática post descongelación”. Departamento de Ciencia Animal. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España.
- Gadella, B. & Harrison, R. (2000). “The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane”. Development 127, 2407-2420.
- Gao, D. & Critser, J.K. (2000). “Mecanismos de criolesión en células vivas”. Revista ILAR; 41: 187-196.
- Hafez, E.S.E (2002). “Reproducción e inseminación artificial en animales” Séptima Edición. Editorial Interamericana McGrawHill. México. 98 p.
- Hernández, J. & Ortega, A. (2009). “Manual de inseminación artificial en bovinos”. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Hidalgo, C.; Tamargo, C. & Diez, C. (2005). “Análisis del Semen Bovino”. Boletín informativo SERIDA. Argentina.

- INIFAP (Instituto Nacional de Investigación Forestales, Agrícolas y Pecuarias); UV (Universidad Veracruzana); CP (Colegio de Postgraduados); UACH (Universidad Autónoma Chapingo); ITUG (Instituto Tecnológico de Úrsula Galvan); ITBOCA (Instituto Tecnológico de Boca del Rio). (2009). “Avances en la investigación Agrícola, Pecuaria, Forestal y Acuícola en el Trópico Mexicano 2009”. Libro científico N°6. Veracruz, México. Pg. 416.
- Jeyendran, R.; Van Der Ven, H.; Pérez M.; Crabo, B. & Zaneveld, L. (1984). “Desarrollo de un ensayo para evaluar la integridad funcional de la membrana espermática humana y su relación con las otras características del semen”. *J Reprod Fertile*. 70: 219-228.
- Juma, P.; Tsuma, V.; Mutembei, H. & Agumbah, G. (2018). “Coconut Water and OPTIXcell™ for Alpine Goat Semen Extension: A Comparative Evaluation of Post-Extension Semen Parameters with and without Seminal Plasma”. *Inter J Vet Sci*, 2018, 7(4): 172-177.
- Kang, S.; Lee, M.; Kim, U.; Lee, S.; Yang, B.; Yang, B. & Cho, S. (2019). “Effect of Optixcell and Triladyl extenders on frozen-thawed sperm motilities and calving rates following artificial insemination in Hanwoo”. *Korean Journal of Agricultural Science* 46(1): 195-204.
- Kumi-Diaka, J.; Nagaratnam, V. & Rwuaan, J. (1981) “Cambios estacionales y relacionados con la edad en la calidad del semen y la morfología testicular de los toros en un ambiente tropical”. *Registro veterinario* 108, 13-15.
- Lima-Verde, I.; Johannisson, A.; Ntallaris, T.; Al-Essawe, E.; Al-Kass, Z.; Nongbua, T.; Dórea, F.; Lundeheim, N.; Kupisiewicz, K.; Edman, A. & Morrell, J. (2017). “Effect of freezing bull semen in two non- egg yolk extenders on post-thaw sperm quality”. *Reprod. Dom. Anim.* 2017;1–10.
- Leroy, J.L.M.R.; Van Soom, A.; Opsomer, G. & Bols, P.E.J. (2008). “The consequences of metabolic changes in high-yielding dairy cows on oocyte and embryo quality”. *Animal*, 2: 1120- 1127.
- Lodhi, L.; Zubair, M.; Qureshi, Z.; Ahmad, I. & Jamil, H. (2008) “Correlation between hypo-osmotic swelling test and various conventional semen evaluation parameters in fresh nili-ravi buffalo and sahiwal cow bull semen”. *Pakistan Vet J* 28:186– 188.

- Lopez, J. (1992) “Congelación de semen en la especie ovina: Características biológicas de las dosis descongeladas”. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.
- Lopez, N. (2015). “Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática en espermatozoides de toro”. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras.
- Luna-Orozco, J.; González, M.; Calderon, G.; Gaytan, L.; Arellano, F.; Ángel, O. & Véliz, F. (2018). “Comparison of different diluents based on liposomes and egg yolk for ram semen cooling and cryopreservation”. Iranian Journal of Veterinary Research, Shiraz University. Vol. 20, No. 2, Ser. No. 67, Pages 126-130.
- 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
- Martins, L.; Pinho, R.; Siqueira, J.; Costa, D.; Guimarães, S.; Miranda-Neto, T. & Guimarães, J. (2013). “Hypoosmotic swelling test in young Nelore bulls classified as sound and unsound for breeding”. Anim. Reprod., v.10, N°4, p.684-688.
- Mishra, S.; Kundu, A. & Mahapatra, A. (2013). “Effect of ambient temperature on membrane integrity of spermatozoa in different breeds of bulls”. The Bioscan. 8(1): 181-183, 2013.
- Morado, S.; Pereyra, V. & Breininger, E. (2015). “Study of sperm evaluation parameters to estimate cryopreserved bovine semen fertility”. Austin Journal of Veterinary Science & Animal Husbandry. 2 (1): 1005. ISSN: 2472-3371.
- Moretti, E.; Terzuoli, G.; Mazzi, L.; Lacoconi, F. & Collodel, G. (2011). “Immunolocalization of aquaporin 7 in human sperm and its relationship with semen parameters”. Systems Biology in reproductive medicine, 2012, 58 129-125.
- Murphy, E.; Murphy, C.; Meara, C.; Dunne, G.; Eivers, B.; Lonergan, P. & Fair, S. (2017). “Comparison of semen diluents on the in vitro and in vivo fertility of liquid bull semen”. J. Dairy Sci. 100:1541–1554.

- Nongbua, T. (2017). "The Role of Bovine Seminal Plasma in Fertility". Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science Department of Clinical Sciences Uppsala. Doctoral Thesis Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala.
- Ocaña, G. (2006). Revista rancho. El ganado Braunvieh. México. N°. 28. Recuperado de <https://www.patrocipes.org.mx/revistarrancho/Marzo-Mayo2006No28/Convierte.pdf>
- Olivera, M.; Ruiz, T. & Tarazona, A. (2006). "El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización". Rev Col Cienc Pec Vol. 19:4, 2006.
- Osorio, R.; Giraldo, J.; Mesa, H.; Gomez, G. & Hernao, F. (2007). "Evaluación de la integridad acrosómica en semen de verraco". vet.zootec. 1(1): 41-47.
- OPTIXcell – Medio para semen bovino congelado o fresco. Recuperado de <https://www.imv-technologies.com>
- Pantoja, C. (2007). "Evaluación de dos dilutores en semen congelado y su efecto en la fertilidad de ovejas inseminadas por vía laparoscópica en sierra central". Tesis para optar el grado de Magister Scientiae en producción animal. Universidad Agraria La Molina. Lima, Perú.
- Paucar, J. (2011). "Viabilidad espermática e integridad del acrosoma en semen congelado de toros nacionales". Tesis para optar el grado de Magister Scientiae en producción animal. Universidad Agraria La Molina. Lima, Perú.
- PNUD. (2009). "Cambio Climático. Ciencia, evidencia y acciones". Dirección General de Estadística e Información Ambiental de la SEMARNAT. México.
- Pérez, M.; Zevallos, J. & Perez U. (2016). "Viabilidad in-vitro e in-vivo de los espermatozoides congelados/descongelados del conducto deferente de alpacas (Vicugna pacos)". Rev. Investig. Altoandin. 2016; Vol 18 N° 2: 223 – 230.
- Quintero, A.; Nava, J. & Osorio, C. (2014). "Comparison of Three Hyposmotic Solutions to Evaluate the Integrity of Plasmatic Sperm Membrane in Cryopreserved and Thawed Bull Semen". Revista Científica, FCV-LUZ / Vol. XXIV, N° 6, 489 – 495.

- Restrepo, G; Usuga, A. & Alberto, B. (2013). “Técnicas para el análisis de la fertilidad potencial del semen equino”. Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia, 8 (1), 69-81.
- Roca, A. (2011). “Efecto del estrés calórico en el bienestar animal, una revisión en tiempo de cambio climático”. Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí. Manabí, Ecuador.
- Rueda, F.; Garcés T.; Herrera, R.; Arbeláez, L.; Peña, M.; Velásquez H.; Hernández, A. & Cardozo, J. (2013). “Las proteínas del plasma seminal incrementan la viabilidad espermática post-descongelación del semen de toros Sanmartinero”. Rev.MVZ Córdoba 18(1):3327-3335.
- Rueda, F. (2011). “Proteínas del plasma seminal de toros sanmartinero y cebú y su relación con la integridad de la membrana del espermatozoide sometido a procesos de criopreservación”. Tesis de Maestría para optar al título de Magister en salud animal. Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- Sanchez, J. (2003). “Acuaporinas: Proteínas mediadoras del transporte de agua”. Colomb Med 2003; 34: 220-227.
- Senger, P. (2005). “Factores de fertilidad en el ganado lechero de alta producción ¿cuáles son realmente importantes?”. Departamento de Ciencias Animales, Universidad de Washington.
- Takahashi, K.; Uchida, A. & Kitao, M. (2009). “Hypoosmotic Swelling Test of Sperm”. Archives of Andrology, 25:3, 225-242.
- Tamayo, M. (2013). “La selección de sementales bovinos en Cuba. 3. Calidad de la producción seminal en futuros sementales Holstein, relación con el desarrollo testicular”. Revista electrónica de veterinaria. Málaga – España. Vol. 14. N°1. Pág. 1-22.
- Trujillo, L. E. & Rivera, M. (2002). “Estudio comparativo de dos tratamientos con antibióticos sobre la calidad bacteriológica y espermática del semen bovino”. Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín. Vol.55, No.1, pág.1457-1472.
- Vélez, M. & Uribe, L. (2010). “¿Cómo afecta el estrés calórico la reproducción?”. Biosalud, Volumen 9 No.2, pág. 83 – 95.

- Veloz, M. (2017). “Evaluación de la calidad espermática de reproductores bovinos mediante el uso de sistemas de evaluación seminal convencional y sistema CASA (análisis seminal asistido por computadora) y su respuesta con la fertilidad por inseminación artificial”. UNIVERSIDAD DE CUENCA Facultad de Ciencias Agropecuarias. Tesis de magister en Producción Animal. Cuenca – Ecuador.
- Yeung, C. (2009). “Aquaporins in spermatozoa and testicular germ cells: identification and potential role”. *Asian Journal of Andrology*. 12: 490–499.
- Zubair, M.; Ahmad, M. & Jamil, H. (2014). “Review on the screening of semen by hypo-osmotic swelling test”. *University of Agriculture – Theriogenology*. Pakistan. *Andrologia*, xx, 1–7.



## **VIII. ANEXOS**

Anexo 1

		REFRIGERADO										DESCONGELADO					
		SEMEN FRESCO				OPTIXCELL			ANDROMED			OPTIXCELL			ANDROMED		
TOROS	MUESTRA	COLOR	VOLUMEN	PH	MOTLIDAD M.	% MOTLIDAD I.	% VITALIDAD	% ENDOSMOSIS	% MOTLIDAD I.	% VITALIDAD	% ENDOSMOSIS	% MOTLIDAD I.	% VITALIDAD	% ENDOSMOSIS	% MOTLIDAD I.	% VITALIDAD	% ENDOSMOSIS
2	BL	3.0	7	3.0	96.57	88.46	52.78	97.64	87.73	28.50	75.50	69.58	56.38	74.00	40.85	12.65	
3	BL	1.0	7	5.0	85.03	90.98	46.34	81.69	90.23	41.82	76.93	77.84	52.94	63.26	60.76	41.53	
4	BL	5.5	7	3.0	86.45	83.59	58.19	90.12	82.22	54.47	82.09	60.73	36.45	86.02	82.40	25.54	
5	BL	3.5	7	4.0	73.99	72.84	42.87	80.68	82.72	50.60	68.00	65.50	28.56	65.43	63.85	30.72	
6	BL	5.0	7	5.0	84.64	86.56	86.36	80.72	81.93	68.07	48.95	44.77	66.90	25.49	34.45	19.60	
7	BL	3.5	7	4.0	92.49	90.03	55.00	89.48	87.28	46.11	74.87	71.56	44.43	71.69	52.55	21.45	
8	A	2.5	7	4.0	89.78	92.74	63.73	84.45	90.69	49.00	75.66	72.73	54.65	78.28	70.65	39.54	
P U M P O	1	A	2.5	7	4.0	74.29	79.72	61.02	80.54	85.39	29.83	64.6	74.56	40.38	43.76	47.72	17.99
	2	BL	2	7	4.0	97.30	86.30	23.00	61.78	62.12	33	71.8	72.81	38.92	57.29	64.10	25.82
	3	BL	4.5	7	4.0	96.07	89.72	32.03	85.23	82.28	30.15	87.98	84.73	36	84.98	86.07	22.67
	4	BL	3	7	4.0	70.63	63.96	52.40	75.69	81.39	30.29	69.83	61	41.5	59.00	50.56	23.80
	5	BL	2	7	3.0	61.79	57.33	49.33	68.02	66.39	41	54.78	58.38	35.23	53.62	55.90	32.03
	6	BL	4.5	7	5.0	75.80	85.00	45.35	77.49	74.52	38.83	76.86	68	37.43	68.00	74.78	33.93
	7	BL	3	7	3.0	91.73	91.94	51.21	90.06	84.12	35.34	81	79.43	27.84	60.88	60.62	22.88
	8	A	3	7	5.0	79.82	75.23	56.89	86.22	78.18	56.54	64.83	70.84	45.3	77.06	73.04	35.00
S A N T O S	1	BL	2.5	7	4.0	87.68	81.63	51.70	84.71	78.77	32.99	55.1	71.48	42.47	28.90	49.25	28.63
	2	BL	2.5	7	4.0	95.56	93.69	47.93	79.37	69.28	38.20	38.5	65.25	38.37	69.23	57.11	24.44
	3	BL	1.5	7	4.0	65.40	71.67	45.62	62.18	49.61	40.29	78.83	80.88	46.21	43.80	43.10	35.83
	4	BL	3	7	3.0	80.71	81.70	48.28	76.39	65.10	50.50	50.2	55.78	40.34	67.07	63.74	31.67
	5	A	3	7	3.0	50.52	44.69	48.00	34.29	28.23	33.67	36.49	41.93	29.78	32.31	40.56	30.00
	6	BL	4.5	7	3.0	74.95	86.34	73.25	86.39	83.56	67.92	48	55.9	45.11	52.89	53.30	20.83
	7	BL	2.5	7	3.0	88.67	87.56	48.17	83.55	72.93	29.89	73.99	73.83	24.27	49.42	36.39	13.12
	8	BL	3	7	3.0	91.64	94.67	59.03	90.19	84.66	45.93	76.47	75.55	35.73	86.45	75.00	36.23
M A R I N O	1	BL	2.5	7	3.0	90.06	89.85	38.83	92.07	76.10	25.61	69.4	63.9	35.59	55.80	50.66	15.34
	2	BL	3	7	3.0	96.18	75.33	14.87	95.48	89.01	15.45	44.8	82.54	44	53.67	48.76	28.90
	3	BL	4	7	3.0	92.45	99.34	25.85	84.13	89.52	27.62	67.87	70.08	40.66	48.37	53.00	36.19
	4	A	5	7	5.0	73.94	67.49	53.64	76.63	69.93	49.40	56.52	55.12	49.8	35.49	46.85	23.29
	5	BL	6	7	3.0	70.63	71.81	36.47	62.38	56.78	24.51	71.72	67.71	26	64.73	61.74	28.12
	6	BL	7.5	7	4.0	65.28	67.71	79.99	61.66	68.30	56.56	77.38	70.09	43.38	60.02	54.53	22.72
	7	BL	1	7	4.0	50.83	55.00	26.03	15.00	20.54	13.57	39.05	50.18	29.73	10.79	62.39	24.38
	8	BL	3.5	7	4.0	68.73	69.82	48.00	69.56	65.54	50.93	67.15	70.82	37	70.23	67.78	24.11
<b>PROMEDIO</b>			<b>3.3</b>	<b>7.0</b>	<b>3.8</b>	<b>81.0</b>	<b>79.7</b>	<b>49.0</b>	<b>77.4</b>	<b>73.9</b>	<b>39.7</b>	<b>65.8</b>	<b>67.1</b>	<b>41.2</b>	<b>58.2</b>	<b>57.6</b>	<b>26.8</b>
MAXIMO			7.50	7.00	5.00	97.30	99.34	86.36	97.64	90.69	68.07	87.98	84.73	66.90	86.45	86.07	41.53
MINIMO			1.00	7.00	3.00	50.52	44.69	14.87	15.00	20.54	13.57	36.49	41.93	24.27	10.79	34.45	12.65
VARIANZA			2.01	0.00	0.52	174.05	163.75	232.04	295.48	273.53	179.36	200.95	107.27	105.35	326.67	162.12	53.29
DES. ESTANDAR			1.42	0.00	0.72	13.19	12.80	15.23	17.19	16.54	13.39	14.18	10.36	10.26	18.07	12.73	7.30
COEF VARIACIO			0.42	0.00	0.19	0.16	0.16	0.31	0.22	0.22	0.34	0.22	0.15	0.25	0.31	0.22	0.27

**Anexo 2:** Modelo lineal general: ANOVA - MOTILIDAD vs. DILUTORES, RAZAS (refrigerado)

**Modelo lineal general: ANOVA - MOTILIDAD vs. DILUTORES, RAZAS (refrigerado)**

**DBCA**

Factor	Tipo	Niveles	Valores
DILUTORES	fijo	2	ANDROMED, OPTIXCELL
RAZA	fijo	2	BRAUNVIEH, SIMMENTAL

Análisis de varianza para MOTILIDAD, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
DILUTORES	1	0.03812	0.03812	0.03812	1.14	0.290
RAZA	1	0.16678	0.16678	0.16678	4.99	0.029
Error	61	2.03733	2.03733	0.03340		
Total	63	2.24224				

S = 0.182754    R-cuad. = 9.14%    R-cuad. (ajustado) = 6.16%

**Anexo 3:** Estadísticas descriptivas: MOTILIDAD (refrigerado), Resultados de DILUTORES = ANDROMED

**Estadísticas descriptivas: MOTILIDAD (refrigerado)  
Resultados de DILUTORES = ANDROMED**

Variable	TOROS	N	N*	Media	Error estándar de la media	Desv.Est.	Mínimo
PORCENTAJE	MARINO	8	0	69.61	9.00	25.44	15.00
	OTTO	8	0	87.29	2.26	6.39	80.68
	PUMPO	8	0	78.13	3.38	9.56	61.78
	SANTOS	8	0	74.63	6.50	18.40	34.29

**Anexo 4:** Estadísticas descriptivas: MOTILIDAD (refrigerado), Resultados de DILUTORES = OPTIXCELL

**Estadísticas descriptivas: MOTILIDAD (refrigerado)  
Resultados de DILUTORES = OPTIXCELL**

Variable	TOROS	N	N*	Media	Error estándar de la media	Desv.Est.	Mínimo
PORCENTAJE	MARINO	8	0	76.01	5.53	15.63	50.83
	OTTO	8	0	87.67	2.44	6.91	73.99
	PUMPO	8	0	80.93	4.55	12.86	61.79
	SANTOS	8	0	79.39	5.37	15.20	50.52

**Anexo 5:** Estadísticas descriptivas: MOTILIDAD (refrigerado)

**Estadísticas descriptivas: MOTILIDAD (refrigerado)**

Variable	DILUTORES	N	N*	Media	Error estándar de la media	Desv.Est.	Mínimo
PORCENTAJE	ANDROMED	32	0	77.42	3.04	17.19	15.00
	OPTIXCELL	32	0	81.00	2.33	13.19	50.52

Variable	RAZA	N	N*	Media	Error estándar de la media	Desv.Est.	Mínimo
PORCENTAJE	BRAUNVIEH	32	0	74.91	3.27	18.51	15.00
	SIMMENTAL	32	0	83.51	1.73	9.77	61.78

**Anexo 6:** Pruebas de agrupación de Tukey de la motilidad con una confianza de 95.0% en semen refrigerado.

**Pruebas de agrupación de Tukey de la motilidad con una confianza de 95.0% en semen refrigerado.**

RAZA	N	Media	Agrupación
SIMMENTAL	32	1.1697	A
BRAUNVIEH	32	1.0676	B

DILUTORES	N	Media	Agrupación
OPTIXCELL	32	1.143	A
ANDROMED	32	1.094	A

**Anexo 7:** Modelo lineal general: ANOVA - VITALIDAD vs. DILUTORES, RAZAS (refrigerado)

**Modelo lineal general: ANOVA - VITALIDAD vs. DILUTORES, RAZAS (refrigerado)**

**DBCA**

Factor	Tipo	Niveles	Valores
DILUTORES	fijo	2	ANDROMED, OPTIXCELL
RAZA	fijo	2	BRAUNVIEH, SIMMENTAL

Análisis de varianza para VITALIDAD, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
DILUTORES	1	0.09313	0.09313	0.09313	3.30	0.074
RAZA	1	0.16810	0.16810	0.16810	5.95	0.018
Error	61	1.72320	1.72320	0.02825		
Total	63	1.98443				

S = 0.168075    R-cuad. = 13.16%    R-cuad.(ajustado) = 10.32%

**Anexo 8:** Estadísticas descriptivas: VITALIDAD (refrigerado), Resultados de DILUTORES = ANDROMED

**Estadísticas descriptivas: VITALIDAD (refrigerado)  
Resultados de DILUTORES = ANDROMED**

Variable	TOROS	N	N*	Media	Error estándar de la media	Desv.Est.	Mínimo
PORCENTAJE	MARINO	8	0	66.97	7.73	21.88	20.54
	OTTO	8	0	85.27	1.50	4.25	79.34
	PUMPO	8	0	76.80	3.02	8.53	62.12
	SANTOS	8	0	66.52	6.78	19.17	28.23

**Anexo 9:** Estadísticas descriptivas: VITALIDAD (refrigerado), Resultados de DILUTORES = OPTIXCELL

**Estadísticas descriptivas: VITALIDAD (refrigerado)  
Resultados de DILUTORES = OPTIXCELL**

Variable	TOROS	N	N*	Media	Error estándar de la media	Desv.Est.	Mínimo
PORCENTAJE	MARINO	8	0	74.54	4.92	13.93	55.00
	OTTO	8	0	85.43	2.43	6.86	72.84
	PUMPO	8	0	78.65	4.39	12.43	57.33
	SANTOS	8	0	80.24	5.70	16.13	44.69

**Anexo 10:** Estadísticas descriptivas: VITALIDAD (refrigerado)

**Estadísticas descriptivas: VITALIDAD (refrigerado)**

Variable	DILUTORES	N	N*	Media	Error estándar de la media	Desv.Est.	Mínimo
PORCENTAJE	ANDROMED	32	0	73.89	2.92	16.54	20.54
	OPTIXCELL	32	0	79.72	2.26	12.80	44.69

Variable	RAZA	N	N*	Media	Error estándar de la media	Desv.Est.	Mínimo
PORCENTAJE	BRAUNVIEH	32	0	72.07	3.20	18.09	20.54
	SIMMENTAL	32	0	81.54	1.60	9.03	57.33

**Anexo 11:** Pruebas de agrupación de Tukey para la vitalidad con una confianza de 95.0% en semen refrigerado.

**Pruebas de agrupación de Tukey para la vitalidad con una confianza de 95.0% en semen refrigerado.**

RAZA	N	Media	Agrupación
SIMMENTAL	32	1.1361	A
BRAUNVIEH	32	1.0336	B

DILUTORES	N	Media	Agrupación
OPTIXCELL	32	1.1230	A
ANDROMED	32	1.0467	A

**Anexo 12:** Modelo lineal general: ANOVA - HOST vs. DILUTORES, RAZAS (refrigerado)

**Modelo lineal general: ANOVA - HOST vs. DILUTORES, RAZAS (refrigerado)**

**DBCA**

Factor	Tipo	Niveles	Valores
DILUTOR	fijo	2	ANDROMED, OPTIXCELL
RAZA	fijo	2	BRAUNVIEH, SIMMENTAL

Análisis de varianza para ENDOSMOSIS, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
DILUTOR	1	0.15277	0.15277	0.15277	6.63	0.012
RAZA	1	0.03676	0.03676	0.03676	1.60	0.211
Error	61	1.40520	1.40520	0.02304		
Total	63	1.59474				

S = 0.151776    R-cuad. = 11.89%    R-cuad.(ajustado) = 9.00%

**Anexo 13:** Estadísticas descriptivas: HOST (refrigerado), Resultados de DILUTORES = ANDROMED

**Estadísticas descriptivas: HOST (refrigerado)  
Resultados de DILUTORES = ANDROMED**

Variable	TOROS	N	N*	Media	Error estándar de la media	Desv.Est.	Mínimo
PORCENTAJE	MARINO	8	0	32.96	5.96	16.85	13.57
	OTTO	8	0	46.39	4.42	12.49	28.50
	PUMPO	8	0	36.87	3.17	8.97	29.83
	SANTOS	8	0	42.42	4.38	12.38	29.89

**Anexo 14:** Estadísticas descriptivas: HOST (refrigerado), Resultados de DILUTORES = OPTIXCELL

**Estadísticas descriptivas: HOST (refrigerado)  
Resultados de DILUTORES = OPTIXCELL**

Variable	TOROS	N	N*	Media	Error estándar de la media	Desv.Est.	Mínimo
PORCENTAJE	MARINO	8	0	40.46	7.18	20.31	14.87
	OTTO	8	0	56.25	4.98	14.09	42.87
	PUMPO	8	0	46.40	4.53	12.80	23.00
	SANTOS	8	0	52.75	3.27	9.25	45.62

**Anexo 15:** Estadísticas descriptivas: HOST (refrigerado)

**Estadísticas descriptivas: HOST (refrigerado)**

Variable	DILUTOR	N	N*	Media	Error estándar de la media	Desv.Est.	Mínimo
PORCENTAJE	ANDROMED	32	0	39.66	2.37	13.39	13.57
	OPTIXCELL	32	0	48.97	2.69	15.23	14.87

Variable	RAZA	N	N*	Media	Error estándar de la media	Desv.Est.	Mínimo
PORCENTAJE	BRAUNVIEH	32	0	42.15	2.87	16.21	13.57
	SIMMENTAL	32	0	46.48	2.40	13.55	23.00



**Anexo 16:** Pruebas de agrupación de Tukey para el HOST con una confianza de 95.0% en semen refrigerado.

**Pruebas de agrupación de Tukey para el HOST con una confianza de 95.0% en semen refrigerado.**

RAZA	N	Media	Agrupación
SIMMENTAL	32	0.7501	A
BRAUNVIEH	32	0.7021	A

DILUTOR	N	Media	Agrupación
OPTIXCELL	32	0.7750	A
ANDROMED	32	0.6772	B

**Anexo 17:** Modelo lineal general: ANOVA - MOTILIDAD vs. DILUTORES, RAZAS (descongelado)

**Modelo lineal general: ANOVA - MOTILIDAD vs. DILUTORES, RAZAS (descongelado)**

**DBCA**

Factor	Tipo	Niveles	Valores
DILUTORES	fijo	2	ANDROMED, OPTIXCELL
RAZA	fijo	2	BRAUNVIEH, SIMMENTAL

Análisis de varianza para MOTILIDAD, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
DILUTORES	1	0.10470	0.10470	0.10470	4.01	0.050
RAZA	1	0.29497	0.29497	0.29497	11.30	0.001
Error	61	1.59264	1.59264	0.02611		
Total	63	1.99232				

S = 0.161583      R-cuad. = 20.06%      R-cuad. (ajustado) = 17.44%

**Anexo 18:** Estadísticas descriptivas: MOTILIDAD (descongelado), Resultados de DILUTORES = ANDROMED

**Estadísticas descriptivas: MOTILIDAD (descongelado)  
Resultados de DILUTORES = ANDROMED**

Variable	TOROS	N	N*	Media	Error estándar de la media	Desv.Est.	Mínimo
PORCENTAJE	MARINO	8	0	49.89	6.71	18.99	10.79
	OTTO	8	0	66.15	6.41	18.12	25.49
	PUMPO	8	0	63.07	4.66	13.19	43.76
	SANTOS	8	0	53.76	6.92	19.57	28.90

**Anexo 19:** Estadísticas descriptivas: MOTILIDAD (descongelado), Resultados de DILUTORES = OPTIXCELL

**Estadísticas descriptivas: MOTILIDAD (descongelado)  
Resultados de DILUTORES = OPTIXCELL**

Variable	TOROS	N	N*	Media	Error estándar de la media	Desv.Est.	Mínimo
PORCENTAJE	MARINO	8	0	61.74	4.82	13.62	39.05
	OTTO	8	0	72.73	3.69	10.45	48.95
	PUMPO	8	0	71.46	3.70	10.45	54.78
	SANTOS	8	0	57.20	6.03	17.06	36.49

**Anexo 20:** Estadísticas descriptivas: MOTILIDAD (descongelado)

**Estadísticas descriptivas: MOTILIDAD (descongelado)**

Variable		N	N*	Media	Error estándar de la media	Desv.Est.	Mínimo
PORCENTAJE	DILUTORES						
	ANDROMED	32	0	58.22	3.20	18.07	10.79
	OPTIXCELL	32	0	65.78	2.51	14.18	36.49

Variable		N	N*	Media	Error estándar de la media	Desv.Est.	Mínimo
PORCENTAJE	RAZA						
	BRAUNVIEH	32	0	55.64	3.04	17.18	10.79
	SIMMENTAL	32	0	68.35	2.36	13.36	25.49

**Anexo 21:** Pruebas de agrupación de Tukey para la motilidad con una confianza de 95.0% en semen descongelado

**Pruebas de agrupación de Tukey para la motilidad con una confianza de 95.0% en semen descongelado**

RAZA	N	Media	Agrupación
SIMMENTAL	32	0.9797	A
BRAUNVIEH	32	0.8439	B

DILUTORES	N	Media	Agrupación
OPTIXCELL	32	0.9523	A
ANDROMED	32	0.8714	A

**Anexo 22:** Modelo lineal general: ANOVA - VITALIDAD vs. DILUTORES, RAZAS  
(descongelado)

**Modelo lineal general: ANOVA - VITALIDAD vs. DILUTORES, RAZAS (descongelado)**

**DBCA**

Factor	Tipo	Niveles	Valores
DILUTORES	fijo	2	ANDROMED, OPTIXCELL
RAZA	fijo	2	BRAUNVIEH, SIMMENTAL

Análisis de varianza para VITALIDAD, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
DILUTORES	1	0.14100	0.14100	0.14100	6.00	0.017
RAZA	1	0.57515	0.57515	0.57515	24.49	0.000
Error	61	1.43245	1.43245	0.02348		
Total	63	2.14860				

S = 0.153241    R-cuad. = 33.33%    R-cuad. (ajustado) = 31.15%

**Anexo 23:** Estadísticas descriptivas: VITALIDAD (descongelado), Resultados de DILUTORES = ANDROMED

**Estadísticas descriptivas: VITALIDAD (descongelado)  
Resultados de DILUTORES = ANDROMED**

Variable	TOROS	N	N*	Media	Error estándar de la media	Desv.Est.	Mínimo
PORCENTAJE	MARINO	8	0	55.71	2.63	7.44	46.85
	OTTO	8	0	58.25	5.48	15.50	34.45
	PUMPO	8	0	64.10	4.64	13.13	47.72
	SANTOS	8	0	52.31	4.54	12.85	36.39

**Anexo 24:** Estadísticas descriptivas: VITALIDAD (descongelado), Resultados de DILUTORES = OPTIXCELL

**Estadísticas descriptivas: VITALIDAD (descongelado)  
Resultados de DILUTORES = OPTIXCELL**

Variable	TOROS	N	N*	Media	Error	Desv.Est.	Mínimo
					estándar de la media		
PORCENTAJE	MARINO	8	0	66.30	3.55	10.04	50.18
	OTTO	8	0	65.96	3.56	10.06	44.77
	PUMPO	8	0	71.22	3.12	8.81	58.38
	SANTOS	8	0	65.07	4.60	13.00	41.93

**Anexo 25:** Estadísticas descriptivas: VITALIDAD (descongelado)

**Estadísticas descriptivas: VITALIDAD (descongelado)**

Variable	DILUTORES	N	N*	Media	Error	Desv.Est.	Mínimo
					estándar de la media		
PORCENTAJE	ANDROMED	32	0	57.59	2.25	12.73	34.45
	OPTIXCELL	32	0	67.14	1.83	10.36	41.93

Variable	RAZA	N	N*	Media	Error	Desv.Est.	Mínimo
					estándar de la media		
PORCENTAJE	BRAUNVIEH	32	0	59.85	2.15	12.15	36.39
	SIMMENTAL	32	0	64.88	2.21	12.48	34.45

**Anexo 26:** Pruebas de agrupación de Tukey para la vitalidad con una confianza de 95.0% en semen descongelado.

**Pruebas de agrupación de Tukey para la vitalidad con una confianza de 95.0% en semen descongelado.**

RAZA	N	Media	Agrupación
SIMMENTAL	32	0.9415	A
BRAUNVIEH	32	0.7519	B

DILUTORES	N	Media	Agrupación
OPTIXCELL	32	0.8937	A
ANDROMED	32	0.7998	B

**Anexo 27:** Modelo lineal general: ANOVA - HOST vs. DILUTORES, TOROS (descongelado)

**Modelo lineal general: ANOVA - HOST vs. DILUTORES, TOROS (descongelado)**

**DBCA**

Factor	Tipo	Niveles	Valores
DILUTOR	fijo	2	ANDROMED, OPTIXCELL
RAZAS	fijo	2	BRAUNVIEH, SIMMENTAL

Análisis de varianza para ENDOSMOSIS, utilizando SC ajustada para pruebas

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	F	P
DILUTOR	1	0.38110	0.38110	0.38110	42.60	0.000
RAZAS	1	0.02008	0.02008	0.02008	2.24	0.139
Error	61	0.54565	0.54565	0.00895		
Total	63	0.94682				

S = 0.0945783    R-cuad. = 42.37%    R-cuad.(ajustado) = 40.48%

**Anexo 28:** Estadísticas descriptivas: HOST (descongelado), Resultados de DILUTORES = ANDROMED

**Estadísticas descriptivas: HOST (descongelado)  
Resultados de DILUTORES = ANDROMED**

Variable	TOROS	N	N*	Media	Error estándar de la media	Desv.Est.	Mínimo
PORCENTAJE	MARINO	8	0	25.38	2.12	6.00	15.34
	OTTO	8	0	27.53	3.48	9.84	12.65
	PUMPO	8	0	26.77	2.18	6.16	17.99
	SANTOS	8	0	27.59	2.77	7.85	13.12

**Anexo 29:** Estadísticas descriptivas: HOST (descongelado), Resultados de DILUTORES = OPTIXCELL

**Estadísticas descriptivas: HOST (descongelado)  
Resultados de DILUTORES = OPTIXCELL**

Variable	TOROS	N	N*	Media	Error estándar de la media	Desv.Est.	Mínimo
PORCENTAJE	MARINO	8	0	38.27	2.77	7.84	26.00
	OTTO	8	0	50.72	4.75	13.45	28.56
	PUMPO	8	0	37.83	1.83	5.17	27.84
	SANTOS	8	0	37.79	2.69	7.60	24.27

**Anexo 30:** Estadísticas descriptivas: HOST (descongelado)

**Estadísticas descriptivas: HOST (descongelado)**

Variable		N	N*	Media	Error estándar de la media	Desv.Est.	Mínimo
PORCENTAJE	DILUTOR						
	ANDROMED	32	0	26.82	1.29	7.30	12.65
	OPTIXCELL	32	0	41.15	1.81	10.26	24.27

Variable		N	N*	Media	Error estándar de la media	Desv.Est.	Mínimo
PORCENTAJE	RAZAS						
	BRAUNVIEH	32	0	32.26	1.62	9.16	13.12
	SIMMENTAL	32	0	35.71	2.34	13.21	12.6

**Anexo 31:** Pruebas de agrupación de Tukey para el HOST con una confianza de 95.0% en semen descongelado.

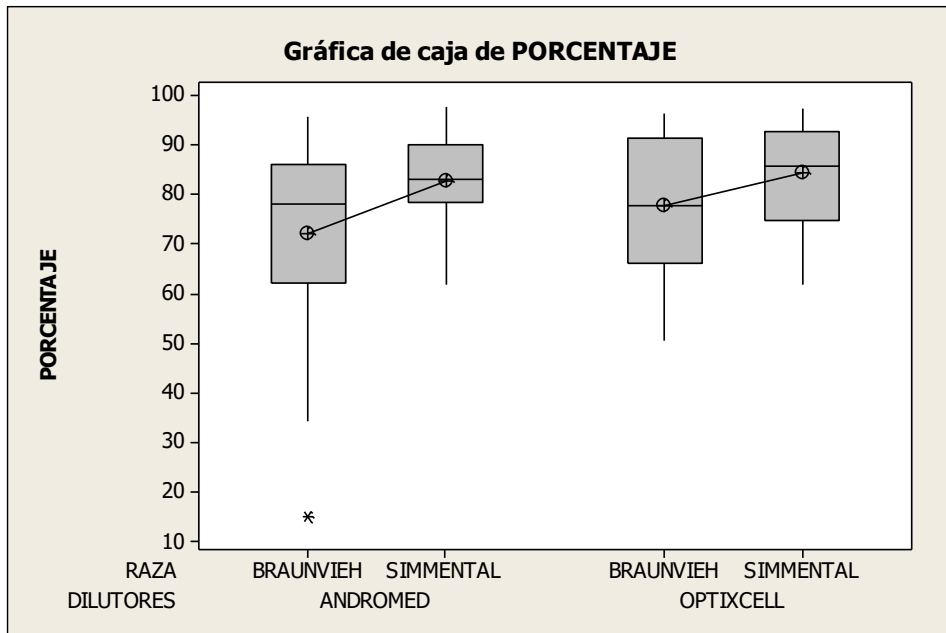
**Pruebas de agrupación de Tukey para el HOST con una confianza de 95.0% en semen descongelado.**

RAZAS	N	Media	Agrupación
SIMMENTAL	32	0.6355	A
BRAUNVIEH	32	0.6001	A

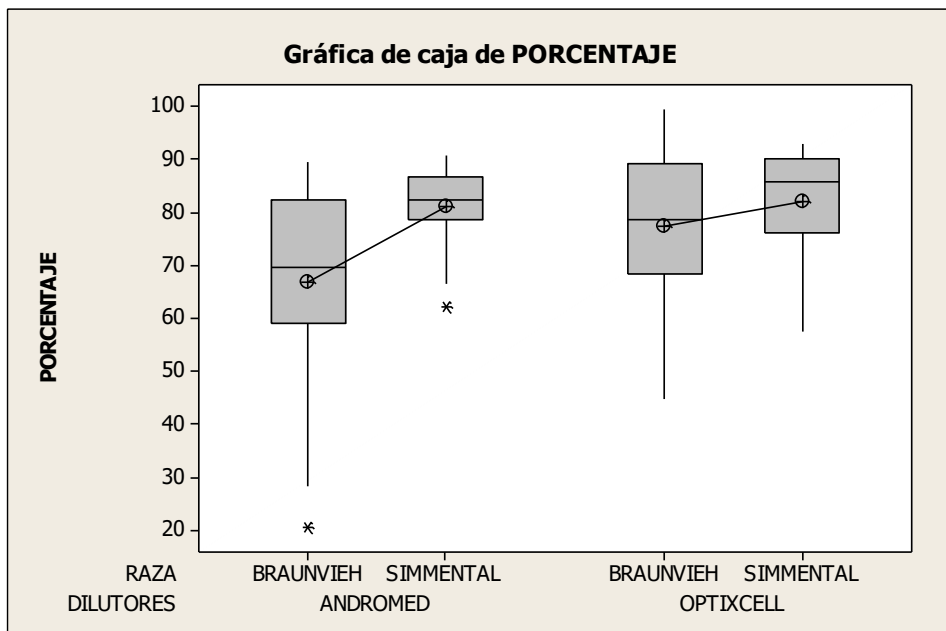
DILUTOR	N	Media	Agrupación
OPTIXCELL	32	0.69496	A
ANDROMED	32	0.54063	B



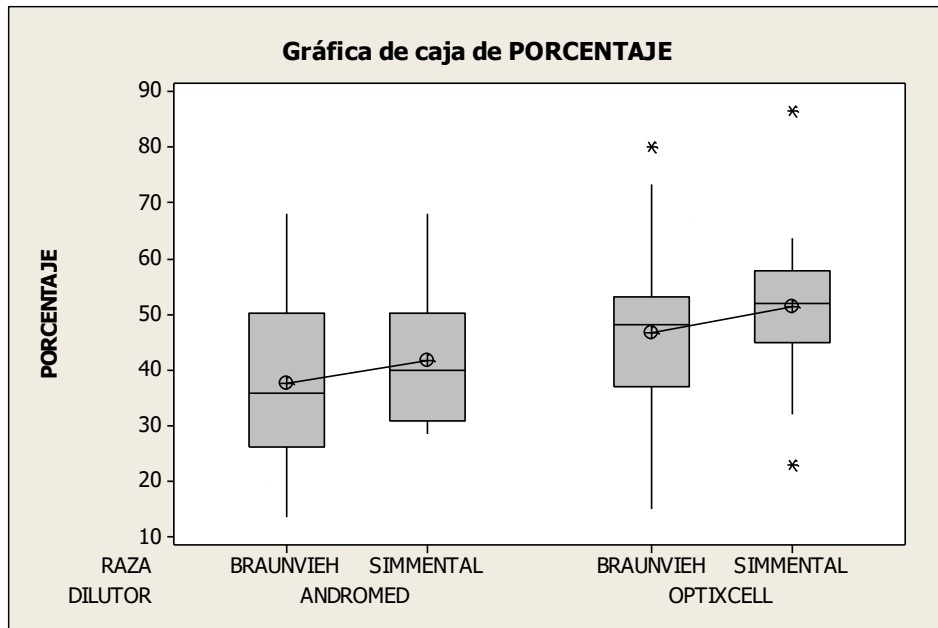
**Anexo 32:** Grafica de cajas de la MOTILIDAD (refrigerado)



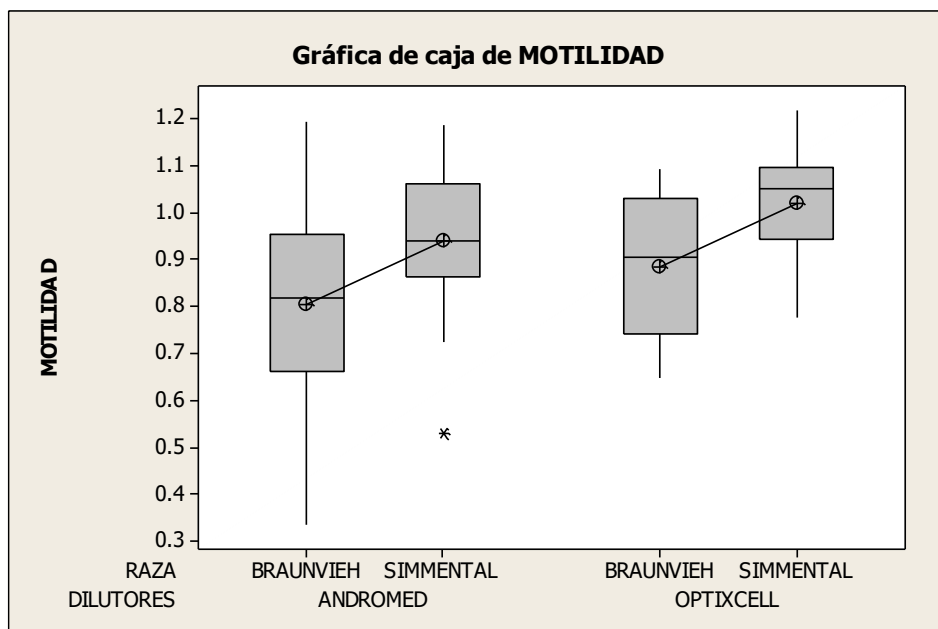
**Anexo 33:** Grafica de cajas de la VITALIDAD (refrigerado)



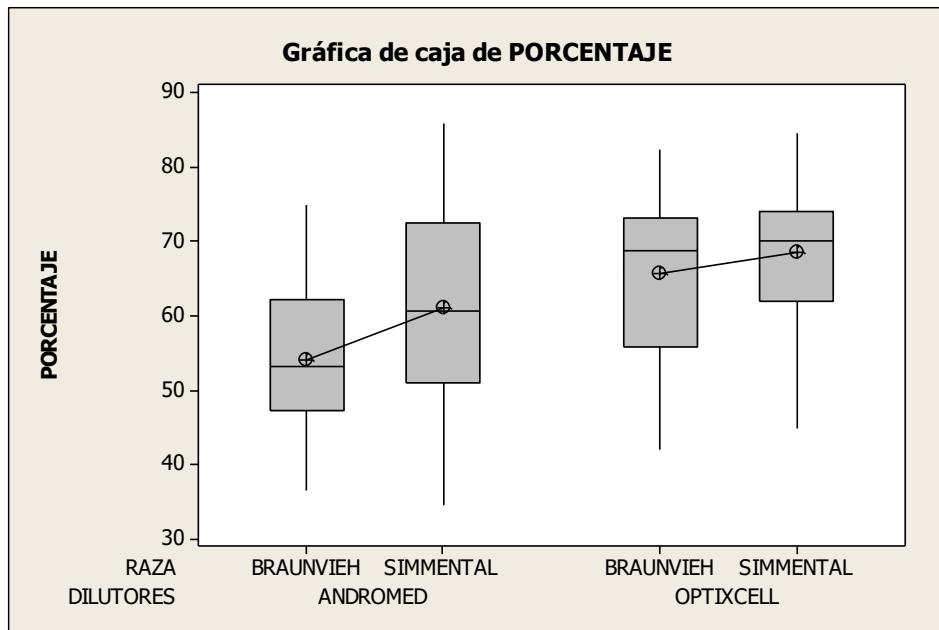
Anexo 34: Grafica de cajas del HOST (refrigerado)



Anexo 35: Grafica de cajas de la MOTILIDAD (descongelado)



**Anexo 36:** Grafica de cajas de la VITALIDAD (descongelado)



**Anexo 37:** Grafica de cajas del HOST (descongelado)

