



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

Modificación de la membrana espermática a través de la adición de metil - β - ciclodextrina cargada de colesterol en medios de criopreservación para bovinos lecheros

SILVIA PATRICIA PATARON ANDINO

Trabajo de Titulación modalidad: Proyecto de Investigación y Desarrollo, presentado ante el Instituto de Posgrado y Educación Continua de la ESPOCH, como requisito parcial para la obtención del grado de:

MAGISTER EN REPRODUCCIÓN ANIMAL MENCIÓN REPRODUCCIÓN BOVINA

Riobamba-Ecuador

Septiembre 2022

DERECHOS DE AUTOR

©2022, **Silvia Patricia Patarón Andino**

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

CERTIFICACIÓN

EL TRIBUNAL DE TRABAJO DE TITULACIÓN CERTIFICA QUE:

El trabajo de titulación modalidad Proyectos de Investigación y Desarrollo, titulado **Modificación de la membrana espermática a través de la adición de metil - β - ciclodextrina cargada de colesterol en medios de crioconservación para bovinos lecheros** de responsabilidad del Srta. **Silvia Patricia Patarón Andino**, ha sido prolijamente revisado y se autoriza su presentación.

Tribunal:

Ing. Luis Eduardo Hidalgo Almedia, PhD.

PRESIDENTE

FIRMA

Dr. Nelson Antonio Duchi Duchi, PhD.

DIRECTOR

FIRMA

Ing. Pablo Rigoberto Andino Nájera, Mag.

MIEMBRO

FIRMA

Ing. Edgar Washington Hernández Cevallos, Mag.

MIEMBRO

FIRMA

Riobamba, septiembre 2022

DERECHOS INTELECTUALES

Yo, **Silvia Patricia Patarón Andino**, declaro que soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este Trabajo de Titulación modalidad Proyectos de Investigación y Desarrollo, y que el patrimonio intelectual generado por la misma pertenece exclusivamente a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.



Silvia Patricia Patarón Andino

C.I. 0603361775

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Silvia Patricia Patarón Andino, declaro que el presente Trabajo de Titulación modalidad proyectos de investigación y desarrollo, es de mi autoría y que los resultados del mismo proyecto son auténticos y originales, los textos que constan en el documento provienen de otra fuente mismos que están debidamente citados y referenciados.

Como autor asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este proyecto de investigación de maestría.

Riobamba, septiembre 2022.



Silvia Patricia Patarón Andino
C.I. 0603361775

DEDICATORIA

A mis padres JULIO y ELENA quienes supieron guiarme y por haberme brindado todo el apoyo para la culminación del presente trabajo.

A mis hermanas por su apoyo incondicional, durante todo este proceso y por estar conmigo en todo momento.

A toda mi familia porque con sus oraciones, consejos y palabras de aliento hicieron de mí una mejor persona y que de una u otra forma me acompañan en todos mis sueños y metas.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a DIOS por darme la fuerza y la paciencia para continuar y no desmayar en el camino hasta la consecución de la meta propuesta.

A mi familia por su apoyo y comprensión.

El más sincero agradecimiento a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, por darme la oportunidad de continuar con la especialización y ser una ayuda para la sociedad.

Silvia

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
CAPÍTULO I.....	3
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Planteamiento del problema.....	4
1.1.1 Situación del problema.....	4
1.1.2 Formulación del problema.....	4
1.1.3 Preguntas directrices o específicas de la investigación	5
1.2 Justificación de la investigación.....	5
1.3 Objetivos de la investigación	6
1.3.1 Objetivo general	6
1.3.2 Objetivos específicos.....	6
1.4 Hipótesis.....	6
1.4.1 Hipótesis nula.....	6
1.4.2 Hipótesis alternativa.....	6
CAPÍTULO II	7
2. MARCO DE REFERENCIA	7
2.1 Membrana plasmática	7
2.1.1 Composición de la membrana plasmática.....	7
2.1.2 Membrana plasmática del espermatozoide.....	8
2.1.3 Membrana plasmática en el proceso de capacitación.....	10
2.2 Crioconservación del espermatozoide	12
2.2.1 Crio daño en las células espermáticas.....	12
2.3 Ciclodextrina	14
2.3.1 Complejos anfitrión-huésped.....	15
2.4 Modificación de la membrana con agregados de ciclodextrina cargada con colesterol	16
2.5 Uso de ciclodexteina cargada con colesterol	17
CAPITULO III.....	19
3. METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN.....	19
3.1 Identificación de las variables	19
3.1.1 Variables Independientes.....	19

3.1.2	<i>Variables dependientes</i>	19
3.2	Operacionalización de las variables	19
3.2.1	<i>Evaluación pre congelación</i>	19
3.2.2	<i>Evaluación post congelación</i>	22
3.3	Metodología	28
3.3.1	<i>Colección del semen</i>	28
3.3.2	<i>Solución ciclodextrina cargada con colesterol (CLC)</i>	28
3.3.3	<i>Adición de ciclodextrina cargada con colesterol</i>	29
3.3.4	<i>Dilutor Andromed</i>	29
3.3.5	<i>Empajillado y sellado</i>	29
3.3.6	<i>Congelación</i>	30
3.4	Tipo y diseño de investigación	30
3.4.1	<i>Esquema del Experimento</i>	30
3.4.2	<i>Esquema del análisis de la varianza (ADEVA)</i>	31
3.4.3	<i>Análisis estadístico y pruebas de significancia</i>	31
3.5	Métodos de investigación	31
3.6	Enfoque de la investigación	31
3.7	Alcance de la investigación	31
3.8	Población de estudio	32
3.9	Unidad de análisis	32
3.10	Técnica de recolección de datos	32
3.11	Instrumentos de recolección de datos	32
3.11.1	<i>Instrumentos primarios</i>	32
3.11.2	<i>Instrumentos secundarios</i>	33
3.12	Instrumentos para procesar datos recolectados	33
3.13	Cronograma de actividades	33
	CAPITULO IV	34
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
4.1	Evaluación pre congelación	34
4.1.1	<i>Volumen del eyaculado (ml)</i>	34
4.1.2	<i>Color</i>	34
4.1.3	<i>Ph</i>	35
4.1.4	<i>Concentración (spz/ml)</i>	35
4.1.5	<i>Morfología normal (%)</i>	35
4.1.6	<i>Motilidad individual (%)</i>	36

4.1.7	<i>Motilidad masal (pts)</i>	36
4.2	Evaluación post descongelación	37
4.2.1	<i>Motilidad individual, %</i>	37
4.2.2	<i>Vitalidad espermática, %</i>	39
4.2.3	<i>Morfoanomalías, %</i>	41
4.2.4	<i>Integridad de la membrana, %</i>	42
	CAPITULO V	45
5.	PROPUESTA DE PROTOCOLO DE CONGELACIÓN	45
5.1	Higiene antes de la colecta	45
5.2	Armado vagina artificial	45
5.3	Colecta de semen a través de la vagina artificial	46
5.4	Evaluación del semen eyaculado	47
5.4.1	<i>Color</i>	47
5.4.2	<i>Volumen</i>	47
5.4.3	<i>Motilidad masal</i>	47
5.4.4	<i>Motilidad individual</i>	48
5.4.5	<i>Morfología anormal</i>	48
5.4.6	<i>Concentración</i>	50
5.5	Preparación y dilución de ciclodextrina cargada de colesterol	51
5.6	Dilución del semen	52
5.6.1	<i>Cálculo para determinar el número de dosis</i>	52
5.7	Congelación de semen	53
	CONCLUSIONES	55
	RECOMENDACIONES	56
	GLOSARIO	
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

LISTA DE TABLAS

Tabla 1-2: Investigaciones a base de ciclodextrina y colesterol	18
Tabla 2-3: Color y densidad del eyaculado fresco en bovinos.....	20
Tabla 3-3: Medio Hipoosmotico (HOST).....	23
Tabla 4-3: Operacionalización de las variables	24
Tabla 5-3: Matriz de consistencia	26
Tabla 6-3: Medio TALP: Tyrode's-Albumina-Lactato Piruvato	29
Tabla 7-3: Esquema del Experimento	30
Tabla 8-3: Esquema del ADEVA.....	31
Tabla 9-3: Cronograma de actividades	33
Tabla 10-4: Valoración de la calidad seminal previa congelación.....	36
Tabla 11-4: Evaluación post descongelación previa adición de ciclodextrina más colesterol en medios de congelación.....	37
Tabla 12-5: Evaluación de la motilidad masal	48
Tabla 13-5: Parámetros para la Motilidad Individual Progresiva	48

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1-4: Motilidad lineal progresiva del semen post descongelación previa adición de ciclodextrina más colesterol en medios de congelación.	38
Gráfico 2-4: Tendencia de la regresión para la motilidad espermática asociada a la integridad de la membrana post descongelación.	39
Gráfico 3-4: Vitalidad espermática del semen post descongelación previa adición de ciclodextrina más colesterol en medios de congelación.	40
Gráfico 4-4: Tendencia de la regresión para la vitalidad espermática asociada a la integridad de la membrana post descongelación	41
Gráfico 5-4: Morfoanomalías espermática del semen post descongelación previa adición de ciclodextrina más colesterol en medios de congelación.	42
Gráfico 6-4: Integridad de la membrana del semen post descongelación previa adición de ciclodextrina más colesterol en medios de congelación.	43
Gráfico 7-4: Tendencia de la regresión para la integridad de la membrana asociada al nivel de utilización de ciclodextrina cargada de colesterol.	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-2. Estructura de la membrana plasmática.....	8
Figura 2-2. Estructura del esperma	9
Figura 3-2. Reacción del acrosoma.....	11
Figura 4-2 Ciclodextrina	14
Figura 5-2. Asociación de CL (anfitrión) y sustrato (huésped)	15
Figura 6-2. Molécula de colesterol	16
Figura 7-2. Motilidad masal.....	21
Figura 8-5. Recuento celular en la cámara de Neubauer	50
Figura 9-5. Diagrama de flujo para la preparación y dilución de CLC.....	51

LISTA DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 1-5: Higiene pre colecta	45
Fotografía 2-5: Armado de la vagina artificial	46
Fotografía 3-5: Colecta de semen	46
Fotografía 4-5: Color	47
Fotografía 5-5: Tinción eosina-nigrosina	49
Fotografía 6-5: Llenado de pajuelas	53
Fotografía 7-5: Sellado de pajuelas	53
Fotografía 8-5: Proceso de crioconservación	54

ANEXOS

- Anexo A.** Estadística descriptiva de las características seminales pre congelación.
- Anexo B.** Análisis de varianza para la evaluación post descongelación previa adición de ciclodextrina cargada con colesterol en medios de congelación.
- Anexo C.** Análisis de Varianza de la regresión para la integridad de la membrana post descongelación, ante la utilización de diferentes niveles de ciclodextrina cargada con colesterol en medios de congelación.
- Anexo D.** Análisis de Varianza de la regresión para las variables de motilidad, y vitalidad con respecto a la integridad de la membrana.
- Anexo E.** Presupuesto de la investigación

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar la calidad espermática post descongelación ante el efecto de la adición de ciclodextrina cargada con colesterol (CLC) en el medio de crio preservación. La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Pecuarias de la ESPOCH, utilizando un solo reproductor Jersey de 3 años de la Ganadería “San Diego” se utilizó vagina artificial para un total de 5 colectas, cuyas características macroscópicas fueron: (color: blanquecino de aspecto ligeramente cremoso, volumen: 8ml, pH: 6,78) y microscópicas (concentración: 1040×10^6 spz/ml, motilidad masal: 4 puntos, motilidad individual: 87% y morfología normal: 87%). El semen pre diluido fue dividido en 3 partes iguales agregando la CLC para sus respectivos tratamientos (T0:0 mg, T1:1,5 mg, T2:3,0 mg) las cuales fueron incubadas a 37°C por 15 minutos, pasado este tiempo se realizó la dilución final empajillándolas inmediatamente en pajuelas de 0,5 ml llevándolas al congelador automático, descendiendo la temperatura progresivamente hasta los -196°C y almacenándolas en el tanque de nitrógeno líquido, las pajuelas fueron descongeladas cada 7 días para su respectiva evaluación. Se utilizó un Diseño Completamente al Azar obteniendo diferencias significativas $P(<0,01)$ para la motilidad, vitalidad e integridad de la membrana con medias de 63,50%; 75,36%; 60,08% respectivamente pertenecientes al T1, en cuanto, a las morfoanomalías no se encontraron diferencias estadísticas, siendo el T2 quien presento mayor porcentaje con una media de 5,40%; donde el mejor nivel de utilización el T1, recomendando la adición de 1,5 mg CLC en medios de crioconservación ya que de acuerdo a los resultados obtenidos se espera obtener mejores parámetros reproductivos.

Palabras claves: CICLODEXTRINA CARGADA CON COLESTEROL (CLC), MOTILIDAD, MORFOANOMALIAS, VITALIDAD



0115-DBRA-UPT-IPEC-2022

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate post-thaw sperm quality in the face of the effect of addition of cholesterol-loaded cyclodextrin (CLC) in the cryopreservation medium. The research was carried out in the Animal Reproduction Laboratory at the animal Sciences Faculty at ESPOCH, using a single 3-year-old Jersey breeder from the "San Diego" Livestock, an artificial vagina was used for a total of 5 collections, macroscopic characteristics were: (color: whitish with a slightly creamy appearance, volume: 8ml, pH: 6.78) and microscopic (concentration: 1040×10^6 spz/ml, mass motility: 4 points, individual motility: 87% and normal morphology: 87%). The pre-diluted semen was divided into 3 equal parts adding the CLC for their respective treatments (T0:0 mg, T1:1.5 mg, T2:3.0 mg) which were incubated at 37°C for 15 minutes, after this time the final dilution was carried out by packing them immediately into 0.5 ml straws, taking them to the automatic freezer, lowering the temperature progressively down to -196°C and storing them in the liquid nitrogen tank, the straws were thawed every 7 days for their respective evaluation. A Complete Design Was Used Randomly obtaining significant differences $P(<0.01)$ for motility, vitality and integrity of the membrane with means of 63.50%; 75.36%; 60.08% respectively belonging to T1, in terms of morphoanomalies no statistical differences were found, being T2 the one that presented the greatest percentage with an average of 5.40%; where the best level of use was T1, recommending the addition of 1.5 mg CLC in cryopreservation media according to the results obtained better reproductive parameters are expected.

Keywords: CHOLESTEROL-LOADED CYCLODEXTRIN (CLC), MOTILITY, MORPHANOMALIES, VITALITY

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

Una de las técnicas de reproducción asistida más utilizadas en la actualidad y a nivel mundial, es la inseminación artificial gracias a los bajos costos y a los enormes beneficios que esta representa; uno de estos beneficios es obtener un mayor avance genético, razón por la cual ha sido implementada en programas de cruzamiento y de conservación de varias especies tanto de aquellas de interés zootécnico como de aquellas especies que se encuentran en peligro de extinción no cabe duda, que el resultado de esta biotecnología va a depender de la calidad de semen que se obtenga, así como el procesamiento y los métodos de crio preservación del material biológico. (Viñán, H. 2017, p.1).

A pesar de un sin número de investigaciones y de los continuos avances en protocolos de congelación con el desarrollo de nuevos crio protectores, las características seminales post descongelación son inferiores a las obtenidas en el semen fresco, puesto que, durante la dilución, crio protección, enfriamiento, congelación, almacenamiento y descongelación los espermatozoides pueden presentar alteraciones mismas que se traducen en movimientos irregulares, pérdida de motilidad, aumento de la permeabilidad de la membrana, pérdida de componentes intracelulares, disminución del metabolismo y la producción energética afectando la funcionalidad de la célula espermática lo que podría conducir a una reducción de la fertilidad (Díaz & López, 2018, p.3).

Con el fin de evitar el daño espermático la ciencia ha desarrollado una amplia variedad de diluyentes a base de azúcares como fuente energética (fructuosa, glucosa), amortiguadores que impiden cambios de pH al formarse ácido láctico (tris, ácido cítrico), antibióticos que inhibe la proliferación bacteriana, agentes crio protectores de la membrana (yema de huevo, leche descremada) que protegen a la célula espermática durante el proceso de congelación.(Vallecino, 2011, p.89).

Varios estudios realizados buscan reemplazar la yema de huevo como agente crio protector debido a las barreras sanitarias que se han impuesto a nivel internacional por los riesgos de contaminación microbiana que este presenta a pesar de los beneficios que tiene en la preservación espermática; por ello existe en el mercado diluyentes a base de lecitina de soya, mismos que, al adicionar complejos de ciclodextrina cargada de colesterol permitirá insertar colesterol a la membrana plasmática manteniendo la funcionalidad y la estabilidad de la célula espermática

1.1 Planteamiento del problema

1.1.1 Situación del problema

Los cambios en la membrana plasmática durante el proceso de congelación esta dado por la pérdida de componentes intracelulares, produciendo baja motilidad y disminución de la vitalidad espermática post descongelación obteniendo una insuficiencia en la capacidad fertilizante, motivo por el cual se menciona como una de las alternativas el uso de complejos de ciclodextrina-colesterol ya que este reemplaza los fosfolípidos perdidos en el proceso de congelación dándole mayor estabilidad a la célula para su posterior supervivencia.

En la fase de congelación y descongelación del material espermático se produce una baja de la calidad seminal, gracias a que las células espermáticas experimentan un sin número de cambios mecánicos y osmóticos, dando lugar a la formación de hielo intracelular durante el proceso de congelación rápida, afectando así la viabilidad de los espermatozoides descongelados; mientras que, para la congelación lenta los espermatozoides sufren de estrés osmótico causando la formación de hielo extracelular.

Tanto como para la congelación lenta como para la congelación rápida los espermatozoides sufren daños bioquímicos y estructurales, especialmente en la membrana plasmática, misma que es indispensable en la conservación de la viabilidad espermática post descongelación, del mismo modo en su funcionalidad durante el proceso de capacitación y fecundación del ovocito.

1.1.2 Formulación del problema

Se sabe que durante el proceso de congelación, la membrana espermática sufre daños significativos mientras ocurre el descenso de temperatura, puesto que inicia un estado de transición, desde la fase líquida cristalina a un estado de gel volviéndose menos fluida más rígida y porosa, lo que conlleva al aumento en la permeabilidad de la membrana, induciendo el paso de moléculas extracelulares, perdiendo contenido intracelular como enzimas y lípidos, reduciendo así la actividad metabólica; de ahí la utilización de metil- β – ciclodextrina quien por su estructura presentan un centro hidrofóbico capaz de transportar colesterol por gradiente de concentración desde y hacia la membrana plasmática, llevando altas cantidades de colesterol limitando la movilidad de los fosfolípidos, proporcionando mayor estabilidad a la membrana y reduciendo su permeabilidad.

1.1.3 Preguntas directrices o específicas de la investigación

¿Con el uso de complejos de ciclodextrina cargada con colesterol en protocolos de congelación se tendrá un menor daño en la membrana espermática?

¿La calidad seminal post descongelación será superior con agregados de ciclodextrina y colesterol?

¿Se logrará crear un protocolo de referencia para futuras investigaciones añadiendo ciclodextrina más colesterol en medios de congelación?

1.2 Justificación de la investigación

La congelación de semen es una técnica ampliamente estudiada y difundida, sin embargo no se ha logrado alcanzar los niveles más óptimos de supervivencia espermática post descongelación, en relación a las características espermáticas presentes en el semen fresco, de ahí la necesidad del surgimiento de nuevas biotecnologías las cuales deberán ser mejoradas y estandarizadas en cada uno de los procesos de crio preservación con el único fin de brindar una mejor protección celular lo que conllevaría al incremento en las características post descongelación.

En la actualidad existe un sin número de protocolos para la congelación y preservación de semen bovino en los cuales se incluye con frecuencia la yema de huevo como agente crio protector, ya que este actúa como una reserva de fosfolípidos y colesterol, mismos que sustituyen a los lípidos perdidos por la membrana durante el proceso de congelación y descongelación; cabe mencionar que este componente no está libre de factores de transmisión como el virus de la influenza aviar, salmonelosis entre otros, por ello la importancia de utilizar medios que no contengan productos animales, siendo los complejos de ciclodextrina cargados de colesterol una alternativa viable para este fin.

Hasta el momento en el Ecuador los efectos de la ciclodextrina cargada con colesterol sobre la membrana espermática no han sido evaluados en protocolos de congelación, motivo por el cual es necesario valorar la calidad espermática una vez adicionado la ciclodextrina cargada con colesterol en medios de crio preservación, cuya única finalidad es conservar las características y vitalidad de los espermatozoides, factores importantes para llevar a cabo la fecundidad del ovocito de manera normal, mejorando así la eficiencia reproductiva en los sementales,

incrementando el número de vacas preñadas, el uso eficiente de toros y un mayor progreso genético.

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo general

Evaluar la calidad espermática post descongelación ante el efecto de la adición de ciclodextrina cargada con colesterol en el medio de crio preservación.

1.3.2 Objetivos específicos

- Evaluar la calidad espermática de eyaculados frescos de bovino Jersey.
- Valorar las pajuelas post descongelación previa adición de ciclodextrina cargada con colesterol en medios de congelación.
- Determinar el mejor nivel de utilización de ciclodextrina cargada con colesterol (0 mg CLC; 1,5 mg CLC; 3,0 mg CLC) en protocolos de crio preservación.

1.4 Hipótesis

1.4.1 Hipótesis nula

La inclusión de ciclodextrina cargada con colesterol en el medio de crioconservación no incrementa la calidad espermática post congelación.

1.4.2 Hipótesis alternativa

La inclusión de ciclodextrina cargada con colesterol en el medio de crioconservación si incrementa la calidad espermática post congelación.

CAPÍTULO II

2. MARCO DE REFERENCIA

2.1 Membrana plasmática

La membrana plasmática es la estructura que delimita a la célula como una barrera inerte que divide el interior y el exterior de la célula, sin embargo y hasta la actualidad se sabe que la membrana es un elemento dinámico e importante en el funcionamiento e integridad de la misma, gracias a sus componentes lipídicos, proteicos y elementos del glucocálix, metabolitos que participan en un sin número de procesos tales como: transporte, excitabilidad, movilidad, diferenciación, exocitosis, reconocimiento intercelular y transducción de señales extracelulares (Meza, Romero, Licón, & Sánchez, 2010, p.125).

Se la define como una amplia estructura selectiva que permite la identificación y el transporte de moléculas, nutrientes y productos de desechos desde y hacia el interior de la célula, posee distintos compartimentos con características y propiedades diferentes, capaz de presentar modificaciones en su diseño, gracias a las variaciones de temperatura al momento de realizar el proceso de crioconservación (Arrazola, 1994, p.418).

2.1.1 Composición de la membrana plasmática

La estructura básica de las membranas biológicas son los lípidos que se disponen en una doble capa o bicapa lipídica donde se insertan un sin número de proteínas; los fosfolípidos, glucolípidos y colesterol son los lípidos con mayor presencia, constituyéndose aproximadamente en un 50% de la masa total de la membrana en las células animales; estos lípidos presentan una estructura anfipática, donde uno de sus extremos es hidrofílico polar mismo que es atraído por el agua colocándose hacia afuera, y el otro extremo hidrofóbico no polar que rehúye del agua enfrentadas hacia el interior (Arenas et al., 2010, p.5).

El colesterol representa un 25-30% de la membrana plasmática disponiéndose de manera intercalada entre los fosfolípidos disminuyendo la movilidad de los mismos generando mayor estabilidad a la membrana y reduciendo su permeabilidad. (Arrazola, 1994, p.7).

Las proteínas se encuentran incorporadas en la bicapa lipídica mismas que varían con respecto a la cantidad de lípidos presentes en la membrana, existiendo una relación cerca de 1:40 en número de moléculas, lo que indicaría que las membranas contienen bastantes proteínas. Hay

dos grandes grupos de proteínas relacionadas con las membranas: las integrales que forma parte de la membrana permanentemente y las asociadas que se unen a la membrana mediante interacciones eléctricas con moléculas de la propia membrana (Megías, Molist, & Pombal, 2014, p.10).

Los glúcidos de la membrana plasmática se unen a los lípidos mediante enlaces covalentes formando los glucolípidos y a las proteínas formando glucoproteínas siendo abundantes en la monocapa externa; los glúcidos de la membrana se forman principalmente en el aparato de Golgi aunque también lo hacen en el retículo endoplasmático (Megías et al., 2014, p.12).

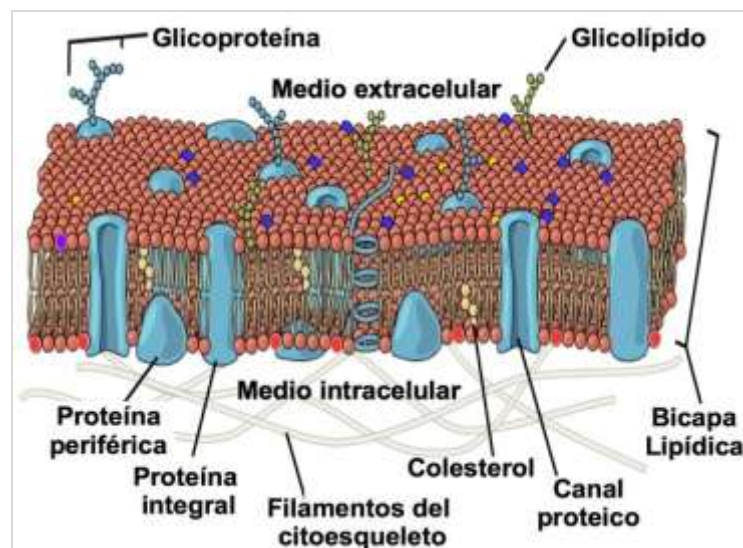


Figura 1-2. Estructura de la membrana plasmática
Fuente: Megías et al., 2014

2.1.2 Membrana plasmática del espermatozoide

Varios estudios han determinado que el 70-80% de la superficie de la membrana del espermatozoide contiene altos niveles de fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, difosfatidilglicerol, esterol y lípidos neutros, de la misma manera se encuentra ácidos grasos y algunos glucolípidos. La fosfatidilcolina se encuentra estable en las tres principales regiones del epidídimo (cabeza, cuerpo y cola) y las cantidades de fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol disminuyen considerablemente hasta llegar a la región caudal (Arenas et al., 2010, p.7).

Las proteínas en la membrana cambian significativamente entre la cola, pieza media y el acrosoma, siendo las más importantes el β -1,4 galactosiltransferasa, fucosiltransferasa, a-d-manosidasa, sp56, p95, entre otras cuya función es el transporte de las moléculas específicas hacia el interior y exterior de la célula; las cuales actúan como enzimas o catalizadores de las

diversas reacciones y funcionan como receptores en la transducción de señales (Arenas et al., 2010 p7).

Por todo ello se dice que la membrana plasmática que recubre al espermatozoide es heterogénea puesto que no presenta características físicas y químicas similares más bien se dividen en regiones, dominios y compartimientos como: la región acrosomal (cabeza anterior) y región postacrosomal (cabeza posterior).

La región acrosomal se subdivide en dominio del segmento marginal, dominio principal y dominio del segmento ecuatorial. El dominio del segmento marginal comprende el dominio del segmento apical, dominio de la banda anterior y dominio del borde periférico a lo largo del margen del acrosoma; en tanto que el dominio del segmento principal está constituido por el dominio anterior acrosomal en la mayor parte del acrosoma, finalmente el dominio del segmento ecuatorial formado por el dominio acrosomal posterior sobre la parte posterior del acrosoma. (Reyes, 2012, p.13).

La región postacrosomal incluye la membrana plasmática entre el margen posterior del acrosoma y la pieza de conexión. Las regiones acrosomal y postacrosomal están limitadas por el anillo subacrosomal o banda dentada que rodea la cabeza del espermatozoide en el margen posterior del segmento ecuatorial (Reyes, 2012, p.14).

Entre la unión de la cabeza y pieza de conexión se encuentra el anillo posterior o anillo nuclear mismo que forma un sello hermético entre los compartimientos citoplasmáticos de las dos partes principales del espermatozoide. (Reyes, 2012, p.14).

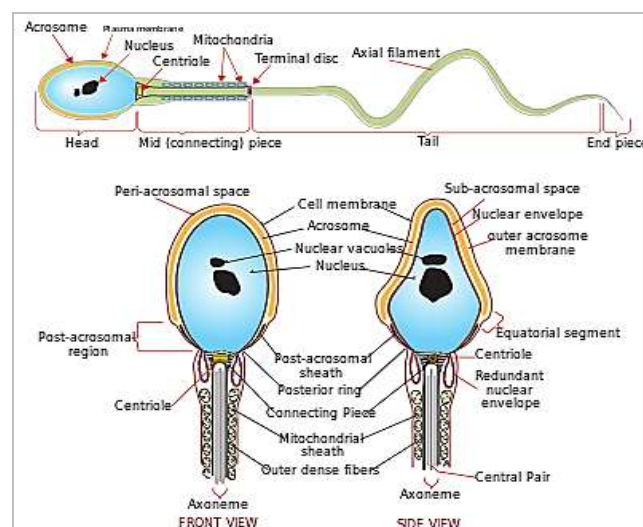


Figura 2-2. Estructura del espermatozoide

Fuente: Megías et al., 2014

El dominio de la pieza media, dominio de la pieza principal y el dominio de la pieza distal se distribuyen a lo largo del flagelo, los dominios de la pieza media y la pieza principal están separados por el *annulus*, un anillo fibroso que es un componente del citoesqueleto flagelar (Reyes, 2012, p14).

Cabe mencionar que en la membrana plasmática se encuentran un sin número de moléculas que al asociarse entre sí forman regiones ordenadas y estables llamadas dominios en los que se encuentra las balsas o rafts, mismas que pueden ser estabilizadas mediante plataformas de mayor tamaño a través de interacciones proteína-proteína y proteína-lípido. Los tipos de balsa de la membrana son las planas y las caveolas siendo las últimas una invaginación de la membrana cuya característica principal es su asociación con proteínas denominadas caveolinas las cuales ayudan a estabilizar la estructura de la capa interna de la membrana ya que funcionan como andamios para distintas proteínas de señalización y como transportadoras del colesterol (Cohen, Hnasko, Schubert, & Lisanti, 2004, p.1350)

Existen dos subdominios en la cabeza del espermatozoide, la acrosomal que cubre la región del mismo nombre caracterizada por presentar colesterol y esfingolípidos anclados a caveolinas y el dominio subacrosomal que es rico en fosfolípidos; cabe mencionar que el colesterol juega un papel importante en la compartimentalización de las vías de señalización en regiones específicas del espermatozoide ya que durante la capacitación espermática existe una fuga de colesterol de la membrana al igual que ingreso de calcio y bicarbonato (Olivera, Ruiz, Tarazona, & Giraldo, 2006, p.431).

2.1.3 Membrana plasmática en el proceso de capacitación

La capacitación espermática es un conjunto de procesos donde el espermatozoide sufre varias modificaciones las cuales se desarrollan a partir del epidídimo hasta llegar al óvulo de la hembra cuya finalidad es desencadenar la reacción acrosomal misma que consiste en la fusión de la membrana plasmática del espermatozoide con la membrana acrosómica externa lo que le confiere la capacidad de fertilizar al ovocito. (Salazar, 2019, p.1).

El proceso de capacitación se ve influenciado por la salida del colesterol de la membrana, así como del ingreso de calcio y bicarbonato. La salida del colesterol se da por la cantidad de albúminas y lipoproteínas de alta densidad (HDL) capaces de retirar el colesterol de la membrana del esperma haciéndola más fluida gracias a la ruptura de la unión de las caveolinas

con las proteínas de función formando complejos de señalización de fusión de las membranas a lo que se le conoce como reacción acrosomal (Olivera et al., 2006, p.432).

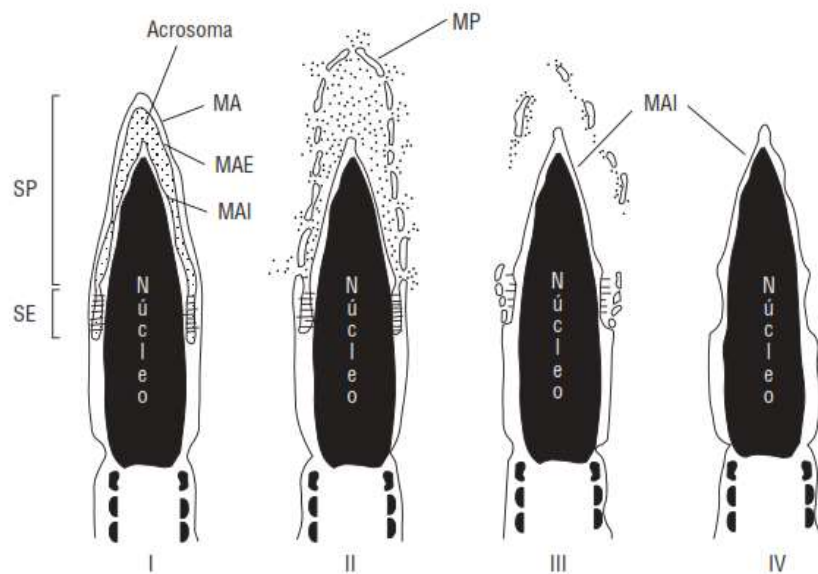


Figura 3-2. Reacción del acrosoma

Fuente: Del Río et al., 2007

Con la salida del colesterol se activan los canales de calcio y bicarbonato, donde el calcio es indispensable en la hiperactivación ya que en la cabeza del espermatozoide existe la presencia de calmodulina quien modula la captación de calcio para la reacción del acrosoma (Del Río et al., 2007p370), mientras que el bicarbonato ingresa al citosol activando la adenililciclasa aumentando así las concentraciones de Adenosin monofosfato cíclico (AMP) activa la proteína quinasa A1 (PKA1) encargada de la fosforilación de tirosinas, de la misma manera la PKA1 también activaría en la membrana acrosomal externa un canal de Ca^{++} , con el consecuente aumento de las concentraciones citosólicas de este catión, las cuales gradualmente activan la fosfolipasa C γ acoplada al receptor del factor de crecimiento epidermal (Olivera et al., 2006, p.432).

Todo el proceso de capacitación ocurre en la fase de enfriamiento donde se asemeja a la capacitación fisiológica del espermatozoide, cabe mencionar que los espermatozoides capacitados y con reacción del acrosoma tienen una vida útil limitada, lo que conlleva a un deterioro de la fertilidad (Tartaglione & Ritta, 2004, p.1245).

Durante el proceso de crio preservación las membranas sufren un daño irreversible, presentando inflamación e interrupción de las membranas plasmáticas y acrosómicas, cambios en la fluidez de la membrana, flujo de calcio alterado y cambios en la actividad enzimática (Tartaglione & Ritta, 2004, p.1246).

2.2 Crioconservación del espermatozoide

El objetivo de los procesos de crioconservación de células o tejidos es mantener la viabilidad y funcionabilidad a temperaturas bajas, por ello es importante conocer la estructura y propiedades fisicoquímicas del material biológico ya que este proceso se ve mermado por distintas variables como la permeabilidad celular, volumen osmótico inactivo y la relación de la superficie de la célula variando de acuerdo a la especie (Ávila-Portillo et al., 2006, p.293).

Es importante saber que al momento de congelar semen bovino se debe conservar las propiedades del espermatozoide y que este cubra todos sus requerimientos para poder llevar a cabo la fertilización; dentro de esto es fundamental mantener el metabolismo con el cual lleva a cabo la producción de energía, la cantidad de proteína necesaria para la supervivencia en el aparato reproductor femenino y para la adhesión al ovocito, al igual que la capacidad de movimientos progresivos y enzimas acrosomales útiles para la penetración del ovocito (Palacios, 2004, p.207).

2.2.1 Crio daño en las células espermáticas

Durante la congelación de los espermias, las células pasan por un sin número de procesos entre ellos: manipulación del material biológico, empleo de crio protectores, descenso de temperatura, enfriamiento, llenado de pajuelas, período de estabilización, congelación y descongelación causando alteraciones tanto en volumen como en temperatura existiendo pérdida en las características químicas y físicas de la membrana plasmática citado por (Blanch, 2007, p.1).

Los principales daños en las células espermáticas se dan en la membrana afectando al citoplasma, el citoesqueleto y la composición genética; el aumento de la permeabilidad permite el ingreso de agua, iones, crioprotectores, calcio y activación de la motilidad, reactivación del proceso de capacitación y de fusión de la membrana plasmática y acrosómico, citado por (Castro & Chacon, 2016, p.52)

El daño de la membrana da lugar a situaciones similares a la capacitación del espermatozoide conocida como crio capacitación donde el espermio sufre la reacción acrosomal disminuyendo el tiempo de vida de la célula espermática. Durante el proceso de congelación el calcio ingresa al medio intracelular provocando una disminución de la fertilidad, de la misma manera la variación en el incremento de las concentraciones de este ion induce a la muerte celular (Castro & Chacon, 2016, p.52).

Otro de los efectos es el desprendimiento de fosfolípidos durante el periodo de transición donde en el descenso de la temperatura ocasiona la pérdida de la permeabilidad, daños y muerte. (Amann & Pickett, 1999, p.152).

2.2.1.1 Estrés osmótico

Se presenta cuando existe bajas velocidades de enfriamiento, involucra la deformación de la célula gracias a la reducción de tamaño originada por el proceso de deshidratación y a la prolongada exposición de la célula a elevadas cantidades de electrolitos (Fernández et al., 2009, p.21).

Existen dos hipótesis que determinan este fenómeno, la primera hace mención a las altas concentraciones de iones en el medio extracelular y la segunda considera la cantidad mínima de células, relacionando la cantidad de solutos y la muerte celular producto de la deshidratación con el regreso a las condiciones isotónicas una vez finalizada el proceso de congelación conocido como choque osmótico (Fernández et al., 2009, p.21).

Dicho en otras palabras, a velocidades de enfriamiento lentas el espermatozoide pierde toda el agua intracelular siendo el daño producido por la elevada concentración de solutos en el medio extra celular y a elevadas velocidades de enfriamiento la formación de hielo intracelular es inminente debido a que el líquido vital interno del espermatozoide no completa la salida del mismo (Hammerstedt, Graham, & Nolan, 1990, p.79).

2.2.1.2 Estrés mecánico

Se presenta una vez que las células espermáticas pasan por el proceso de enfriamiento inferior al punto de congelación donde inicia el apareamiento de cristales de hielo en el exterior e interior de la célula debido a la congelación del agua proveniente de la parte interna del espermatozoide dado el diferencial de la presión osmótica, proceso que se da gracias a la aglutinación del crioprotector utilizado, permeabilidad de la membrana plasmática, y rapidez durante el proceso de congelación y descongelación (Hammerstedt et al., 1990, p.84).

2.2.1.3 Estrés térmico

Se presenta cuando la membrana plasmática sufre cambios estructurales, por estar sometida a descensos de temperatura, una vez que las cadenas de los ácidos son endurecidas por el cambio de la fase líquida-cristalina a una fase de gel; constituyendo dominios de gel según los

fosfolípidos que lleguen a su temperatura de transición, en tanto que las familias de otros fosfolípidos permanecen en fase líquida rompiendo de esta manera las asociaciones normales entre los fosfolípidos y con las proteínas de la membrana siendo el resultado final una reagrupación y redistribución de lípidos, proteínas y una mayor rigidez de la membrana.

Una vez que la membrana retorna a su temperatura inicial los fosfolípidos vuelven a su estado líquido, cabe mencionar que, al no regresar a su estado inicial tanto las proteínas como los fosfolípidos generan un daño en el funcionamiento de la membrana aumentando la permeabilidad de la misma y con ello el paso de cationes y agua, así como la disminución en la actividad de las enzimas asociadas a la membrana, etc. citado por (Blanch, 2007, p.3).

2.3 Ciclodextrina

Son oligosacáridos puesto que están constituidos por varias moléculas de glucosa unidas por enlaces α -D-(1,4) formando compuestos macrocíclicos cuya estructura molecular se presenta en forma de cono. Los tipos de ciclodextrina más utilizados en la industria para la fabricación de fármacos, pesticidas, aditivos alimenticios entre otros son el α -ciclodextrina, β -ciclodextrina y γ -ciclodextrina mismos que presentan 6, 7 y 8 unidades de glucopiranososa en su estructura cíclica respectivamente dándole una característica no tóxica y a su vez puede protegerse de la evaporación, degradación, y oxidación formando complejos de inclusión de ciclodextrina. (Martínez & Gómez, 2007, p.300).

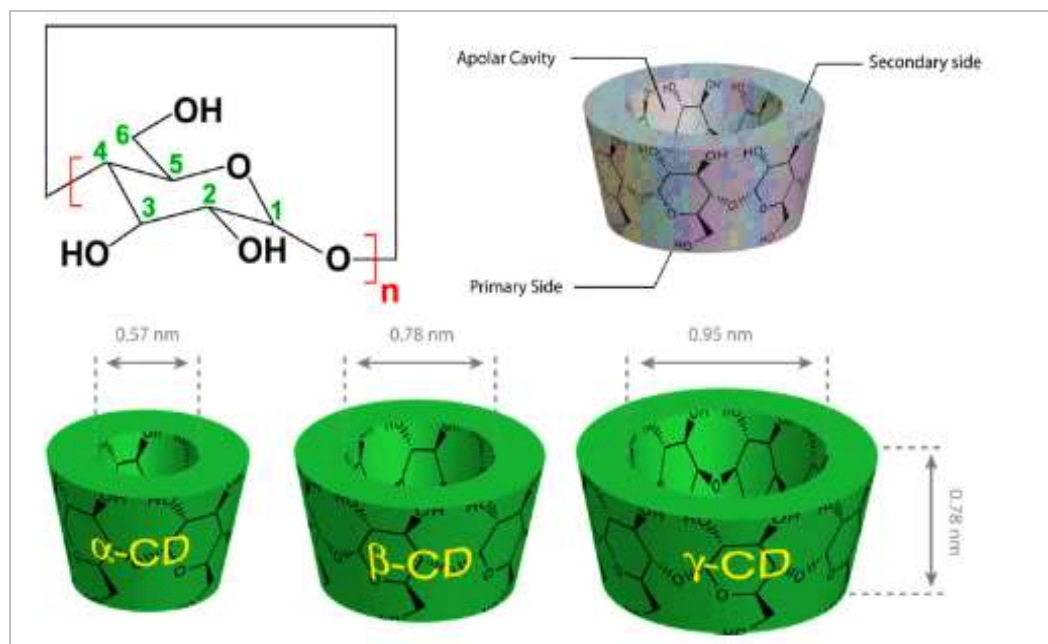


Figura 4-2 Ciclodextrina

Fuente: Crini, G. 2014

2.3.1 Complejos anfitrión-huésped

En la parte exterior de la estructura cíclica la molécula presenta una cara hidrofílica misma que le permite ser soluble en agua en tanto que su cavidad interior es hidrófoba, por lo que estos compuestos son capaces de encapsular y albergar moléculas hidrófobas como por ejemplo el colesterol (Huésped), el cual permanece encapsulado por la Ciclodextrina (Anfitrión) formando una relación anfitrión -huésped; donde el sustrato invitado o huésped es cristalizado por la ciclodextrina sin importar el estado de la molécula ya sea gaseosa, líquida o sólida. (Crini, 2014, p.10965).

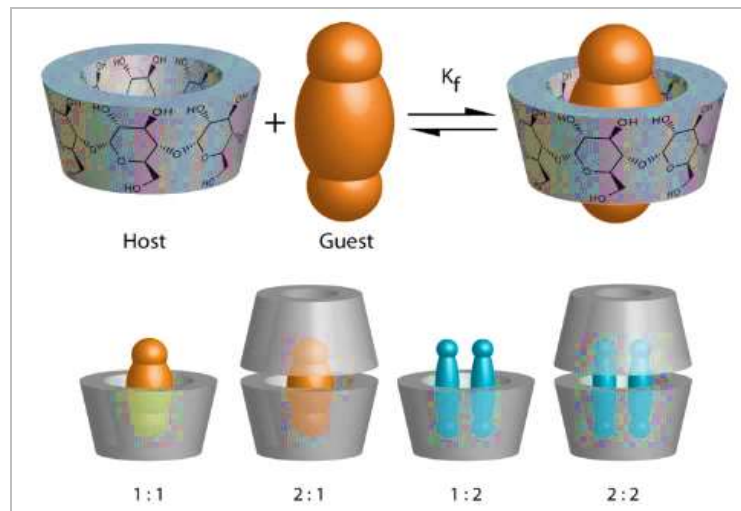


Figura 5-2. Asociación de CL (anfitrión) y sustrato (huésped)
Fuente: Crini, G. 2014

El colesterol junto con los ácidos grasos, acilgliceroles y ceras forman parte de los lípidos que son biomoléculas orgánicas compuestas principalmente de carbono, hidrogeno y oxígeno cuya característica principal es que son solubles en disolventes orgánicos e insolubles en un medio acuoso. El colesterol es uno de los principales constituyentes de la membrana plasmática en las células de los animales vertebrados a su vez es precursor de lipoproteínas, sales biliares, vitamina D y hormonas sexuales y corticoesteroides. (Argueso, Díaz, & Rodríguez, 2011, p.9).

La principal función del colesterol es la orientación reguladora y el flujo de la membrana lipídica, su estructura al igual que los fosfolípidos es anfipática cuyo grupo funcional formado de un átomo de oxígeno y uno de hidrógeno, se localizan en medio de las cabezas de los lípidos con dirección a la parte externa, mientras que hacia el interior junto a las cadenas de ácidos grasos y entre las cadenas apolares se halla hidrocarbonada; en un amplio rango de temperatura el colesterol bloquea los grandes movimientos de los ácidos grasos previniendo la compactación de la cadenas carbonadas de estos ácidos e impide que las cola se junten proporcionando la estabilidad de los mismos. (Darin-Bennett & White, 1977, p.467).

A mayor cantidad de colesterol en la membrana menor es su permeabilidad dificultando que las cadenas de hidrocarburos de los ácidos grasos se junten y se cristalicen, también dificultan la permeabilidad de la membrana para pequeñas moléculas solubles y aumenta la flexibilidad y estabilidad mecánica de la bicapa citado por (Castillo, 2017, p.9).

En la célula espermática el colesterol es de vital importancia puesto que actúa en la protección e integridad de las membranas durante el proceso de capacitación espermática citado por (Castillo, 2017 p9), ya que se lo considera como un factor decapitante que ayuda a estabilizar la membrana durante el tránsito del epidídimo evitando reacciones intermoleculares evitando llegar a un estado capacitado; por otro lado en la crio capacitación la disminución o pérdida de colesterol causa una capacitación prematura disminuyendo la viabilidad de los espermatozoides (Watson, 1995, p.872).

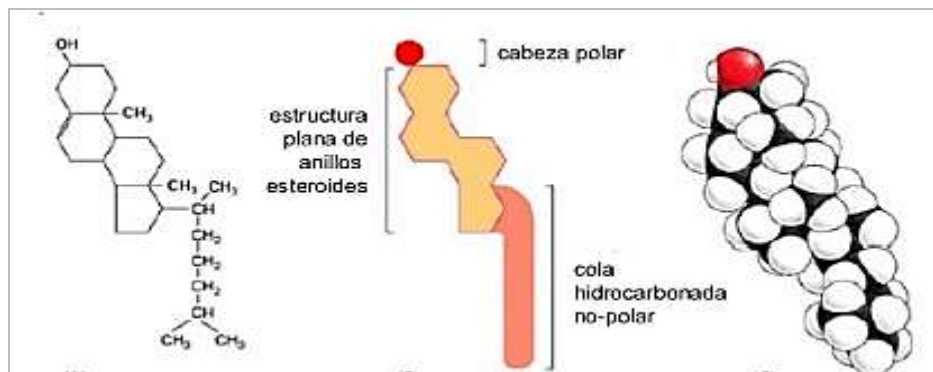


Figura 6-2. Molécula de colesterol

Fuente: Argueso, A. 2011

La eliminación de colesterol desde la membrana del espermatozoide disminuye la relación colesterol/fosfolípidos afectando la fluidez de la membrana redistribuyendo las proteínas iniciándose el proceso de capacitación. El ratio de colesterol/fosfolípidos con valores cercanos a la unidad aumentan su supervivencia al enfriamiento y a la congelación tal es el caso de los humanos y los conejos, no sucede lo mismo con los cerdos, caballos, moruecos, toros o cabras que tiene una ratio menor a 0,6 haciéndoles más susceptibles al proceso de congelación (Purdy, Fox, & Graham, 2005, p.103).

2.4 Modificación de la membrana con agregados de ciclodextrina cargada con colesterol

En la actualidad las ciclodextrinas se han utilizado para insertar o eliminar el colesterol de las membranas celulares teniendo en cuenta que las ciclodextrinas pueden transferir el colesterol siempre y cuando estas hayan sido previamente saturadas caso contrario las ciclodextrinas extraen el colesterol de la membrana de cualquier tipo de célula incluido los espermatozoides,

se pueden utilizar derivados de las ciclodextrinas, modificados químicamente al sumar grupos alquilo derivados del metano (metilo), ya que incrementan su cualidad de soluble en H_2O al igual que su característica para separar moléculas miscible con el agua (Moore, Squires, & Graham, 2005, p.242).

Con la incorporación de colesterol a la membrana plasmática por medio de complejos de ciclodextrina se busca mejorar la ratio colesterol/fosfolípido por lo tanto las células espermáticas descongeladas deberían estar menos capacitados y con sus membranas más estables (Mocé & Graham, 2006, p.826). El paso del colesterol desde la ciclodextrina a la membrana del espermatozoide es rápido aproximadamente 15 minutos con una temperatura de 22°C, cabe señalar que si la transferencia se la hace de una manera más lenta y progresiva o con temperaturas más altas no será perjudicial para las células. (Purdy & Graham, 2004, p.525).

Para cargar los complejos de ciclodextrinas cargadas con colesterol se utiliza una dilución en una mezcla de metanol y cloroformo misma que deberá ser desecada por un lapso de tiempo y de esta manera obtener los cristales para su posterior utilización; es necesario saber que los medios de congelación para la utilización de ciclodextrina cargada con colesterol no deben contener diluyentes a base de yema de huevo puesto que interfieren en el paso del colesterol hacia la membrana (Purdy & Graham, 2004, p.523).

No se sabe a ciencia exacta cual es el mecanismo para obtener mayores resultados después de la congelación, sin embargo se da por hecho a una reducción del daño en la membrana inducido ya que experimenta una transición de fase líquida a gel mientras baja la temperatura gracias a que el agregado de colesterol reduce o elimina totalmente la temperatura a la que la fase de transición ocurre; otra de las teorías es el aumento de la tolerancia osmótica de los espermatozoides, de la misma manera puede inhibir la entrada de calcio en los espermatozoides importante en la capacitación (Mocé, Purdy, & Graham, 2010, p.244).

2.5 Uso de ciclodextrina cargada con colesterol

Varios han sido los estudios realizados en distintas especies con la finalidad de encontrar el mejor nivel de utilización de complejos de ciclodextrina cargada con colesterol buscando preservar y mejorar las características seminales post descongelación.

La adición de metil- β -ciclodextrina saturada de colesterol antes de la criopreservación conservó con mayor efectividad la calidad de la motilidad, vitalidad e integridad de membrana del semen

de carnero luego de la descongelación, mostrando diferencias estadísticas significativas entre tratamiento (Castillo, 2017, p.51)

Tabla 1-2: Investigaciones a base de ciclodextrina y colesterol

Especies	Concentración	Motilidad espermática Total(%)		Integridad de membrana plasmática (%)	
		Control	Col	Control	Col
Toro	1,5mg CLC/120x10 ⁶ spz	42	60	46	55
	2 mg CLC/120x10 ⁶ spz	58	58	45	62
	3 mg CLC/120x10 ⁶ spz	50	57		
Garañón	1,5mg CLC/120x10 ⁶ spz	37	51		
	0,125 mM	69	67	44	49
Caprino	2,5mg CLC/120x10 ⁶ spz	42	52	53	57
	1mg CLC/120x10 ⁶ spz	42	48	40	49
Carnero	2 mg CLC/120x10 ⁶ spz	28	46-45	24	45-47
Verraco	1mg CLC/120x10 ⁶ spz	57	63		
	20Mmmbc+5mM col y 500x10 ⁶ spz/ml	35	52	8	13
	1,5mg CLC/120x10 ⁶ spz	37	46		
Burro	2 mg CLC/120x10 ⁶ spz	30	45	23	31

Fuente: Ciprian, R. 2018.

Realizado por: Patarón, Silvia, 2021

Para Viñán, H (2017), la utilización de ciclodextrina más colesterol previo al proceso de congelación, no mejora el porcentaje de anomalías, sin embargo, mejora las características espermáticas después de ser descongeladas. (p.42).

La incubación del semen sexado post-descongelado con CLC mantiene los patrones de motilidad durante más tiempo, aumenta la tasa de fecundación y producción de embriones in vitro (Ferré, Grotter, & Cattaneo, 2006, p.332).

El efecto del colesterol y la dimetilformamida sobre parámetros post descongelación en espermatozoides de caballos criollos colombianos mejoraron los parámetros evaluados debido a efectos aditivos del crioprotector y del modificador de membrana, pero no hubo interacción entre estos dos factores. (Mesa & Henao, 2012, p.2908).

CAPITULO III

3. METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN

3.1 Identificación de las variables

3.1.1 Variables Independientes

Niveles de inclusión de ciclodextrina cargada con colesterol en el medio de congelación (T0= 0 mg CLC; T1=1,5 mg CLC y T2=3,0 mg CLC).

3.1.2 Variables dependientes

3.1.2.1 Evaluación pre congelación

*Volumen (ml)

*Color

*Ph (puntos)

*Concentración (spz/ml)

*Morfología normal (%)

*Motilidad Individual (%)

*Motilidad masal (%)

3.1.2.2 Evaluación post descongelación

*Motilidad individual progresiva (%)

*Vitalidad espermática (%)

*Morfoanomalías (%)

*Integridad de la membrana (%)

3.2 Operacionalización de las variables

3.2.1 Evaluación pre congelación.

3.2.1.1 Volumen (ml)

Se utilizó un tubo graduado donde el valor fue determinado a través de la lectura directa expresada en mililitros (ml).

3.2.1.2 Color

Se evaluó por medio de la visualización directa del eyaculado dentro del tubo colector basado en los siguientes criterios:

Tabla 2-3: Color y densidad del eyaculado fresco en bovinos.

Aspecto	Concentración aparente	Color
Muy denso	Más de 1300.000/mm ³	Blanco Cremoso
Denso	800,000 y 1300,000/mm ³	Blanco Lechoso
Semi-denso	500,000 y 800,000/mm ³	Lechoso
Ralo	200,000 y 500,000/mm ³	Traslúcido
Oligozoospermico	Inferior a 200,000/mm ³	Trasparente

Fuente: Rutter, B. 2006

Realizado por: Patarón, Silvia, 2021

3.2.1.3 pH (pts)

La valoración de pH se realizó con la ayuda de un pehachímetro digital previamente calibrado, para lo cual fue necesario sumergir el electrodo en una pequeña muestra de semen fresco para su posterior lectura.

3.2.1.4 Concentración (spz/ml)

La concentración fue determinada según lo descrito por Olivera, M (2014), para lo cual se usó la cámara Neubauer, donde, se colocó 1 ml de agua destilada en un tubo eppendorf equivalente a 1000 µl actuando como espermatocida, se añadió 5 µl de semen fresco obteniendo una dilución de 1:200, la muestra fue homogenizada y colocada sobre la cámara de Neubauer dejándola reposar de 4 a 5 minutos.

La muestra fue colocada en el microscopio y observada con objetivo de 100X, contando el número de espermatozoides en los 5 cuadrantes de la cámara de Neubauer; una vez realizado el conteo celular; este resultado fue multiplicado por 200 como factor de dilución, la profundidad de la cámara, para llevarlo a medida cúbica (1/10) y 1/5 de los pequeños cuadrados contados de los 25 que hacían el milímetro cuadrado. De esa forma se obtiene el número de espermatozoides por mm³; si el resultado se multiplica por 1.000 se transforma en una medida volumétrica y la

concentración queda expresada en cantidad de espermatozoides por ml (# espermatozoides/ml) como se indica en la siguiente fórmula.

$$\text{Concentración (spz/ml)} = N^{\circ}\text{spz} \cdot 5 \cdot 10 \cdot 1000 \cdot 200$$

3.2.1.5 Motilidad masal espermática (pts)

Para su valoración se utilizó la técnica de gota gruesa, la cual consiste en colocar una gota del tamaño de una lenteja de semen fresco puro, sobre un portaobjeto precalentado a 37 °C mismo que fue evaluado en una escala subjetiva del 1 al 5 para estimar las características de las ondas espermáticas en cuanto a su ancho, altura, grosor, forma y velocidad.

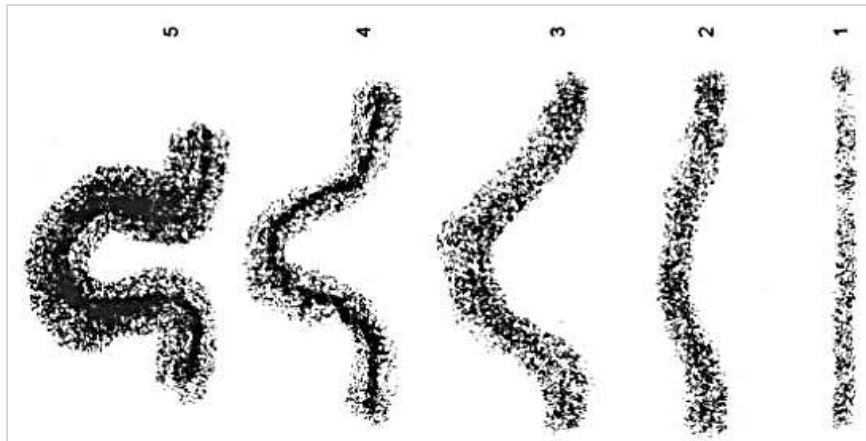


Figura 7-2. Motilidad masal
Realizado por: Rutter & Russo, 2006

3.2.1.6 Motilidad individual (%)

El semen diluido fue colocado en una placa portaobjetos precalentado a 37°C, evaluándola de una manera subjetiva basada en la experiencia del operador, teniendo en cuenta el movimiento progresivo rectilíneo, movimiento en el lugar (circular, ondulatorio, etc) y espermatozoides inmóviles (muertos o en estado de anabiosis); considerando la tasa de espermatozoides en movimiento de 0 al 100%; La motilidad puede verse alterada tanto por una inadecuada temperatura como por la presencia de sustancias tóxicas en el equipo de recolección.

3.2.1.7 Morfología normal

Para determinar el porcentaje de morfología normal, fue necesario la utilización de eosina-nigrosina, misma que fue colocada sobre 5 µl de semen fresco, y haciendo un pequeño frotis se dejó reposar por un lapso no mayor a 5 min para luego ser observada en el microscopio con objeto de 400X

3.2.2 *Evaluación post congelación*

3.2.2.1 *Motilidad progresiva (%)*

Previa evaluación se debió atemperar el porta y cubre objetos a 37°C para luego colocar 0,5 µl de semen y observando la muestra en el microscopio con lente de 400X se determinó la motilidad de manera subjetiva en base al vigor presentado por los espermias.

3.2.2.2 *Vitalidad espermática (%)*

La utilización Eosina – Nigrosina fue necesaria en la determinación de la Vitalidad, para ello se tempero las placas porta objetos a 37°C, se colocó 5 µl de la tinción sobre 5 µl de semen, haciendo un pequeño barrido se dejó reposar por 1 min, para luego ser observada en el microscopio con lente de 400X, realizando el conteo en distintos campos.

Las células cuyas cabezas fueron teñidas de color rojo o rosado oscuro fueron contabilizadas como muertas dado que su membrana está deteriorada, en tanto que, espermatozoides que no han sido teñidos o presentan una coloración rosada clara fueron considerados vivos debido a que su membrana se encontraba ilesa, citado por (Ciprian, 2018, p.8).

El cálculo para determinar el porcentaje de vitalidad espermática fue:

$$\text{Vitalidad espermática (\%)} = \frac{\text{Número spz vivos}}{\text{Número spz totales}} * 100$$

3.2.2.3 *Morfoanomalías (%)*

Los espermatozoides fueron evaluados utilizando la misma muestra con la que se determinó la vitalidad, contando las células que no presentaron cambios en su estructura tal es el caso de la cabeza y el flagelo clasificándolas como normales, sin embargo, aquellos espermatozoides cuyas cabezas fueron muy grandes, muy pequeñas o tenían doble cabeza fueron considerados anormales al igual que aquellas células con colas dobladas, enrollados, múltiples o sin flagelo.

$$\text{Morfoanomalías (\%)} = \frac{\text{Número spz anormales}}{\text{Número spz totales}} * 100$$

Cabe mencionar que el porcentaje de anomalías no debe exceder el 20% para que este sea viable.

3.2.2.4 Integridad de la membrana (%)

Se realizó la dilución del semen en un medio hipoosmótico de fructosa y citrato de sodio a 100 mOsm/ kg (González et al., 2013, p.39).

En un tubo eppendorf se colocó el contenido de 0.5 ml de esta solución entibiada durante 5 minutos más 1 ml de semen, este fue llevado a baño María a 37 °C durante 20 minutos. Pasado este tiempo se añadió a la muestra dos gotas de glutaldehído al 25% para fijar la muestra, se homogenizó y con una pipeta se tomó una pequeña muestra; se colocó en un porta objetos realizando un frotis y se observó al microscopio, donde se contó 100 células a 400X y se calculó el porcentaje. Los espermatozoides con colas enrolladas están vivos y están reaccionantes. (Espinosa, 2012, p.50).

Tabla 3-3: Medio Hipo osmótico (HOST)

Reactivo	Cantidad
Citrato de sodio, mg	490,00
Fructosa, mg	900,00
Agua bidestilada, ml	100,00
Formaldehído al 40%, ml	0,10

Fuente: González et al., 2013

Realizado por: Patarón, Silvia, 2021

Las células espermáticas que fueron reactivas a la prueba de HOST evidenciaron un hinchamiento y enrollamiento de la cola identificándose como endósmosis (+), demostrando que la membrana plasmática permanece intacta y con un adecuado funcionamiento después del proceso de congelación, en tanto que, para aquellos espermatozoides cuya membrana fue funcionalmente dañada no presentaron cambio alguno en su flagelo conociéndose como endósmosis (-) (Espinosa, 2012, p.50).

$$Int.Membrana (\%) = \frac{A}{A + B} * 100$$

Donde:

Int. Memb. = Integridad de membrana en porcentaje

A = Recuento de espermatozoides con endósmosis positiva

B = Recuento de espermatozoides con endósmosis negativa

A + B = Total de espermatozoides contabilizados

Tabla 4-3: Operacionalización de las variables

Variable	Tipo	Definición	Indicador	Técnicas	Instrumento
EVALUACIÓN MACROSCÓPICA PRE CONGELACIÓN					
Volumen	Cuantitativa discreta	Cantidad de líquido seminal que provee alguna información en cuanto a la capacidad de producción de espermatozoides.	ml	Obtenido por la graduación del tubo colector.	Tubo recolector
Color	Cualitativa nominal	Influenciado por la concentración espermática	Blanco cremoso Blanco lechoso Lechoso Transparente	Obtenido por la observación directa	Tubo recolector
pH	Cuantitativa continua	Muestra el equilibrio entre las distintas secreciones como el ácido de la próstata y las vesículas seminales	6,7 – 7	Se evaluará extrayendo una gota de semen y colocándola en un tubo eppendorf introduciendo la punta del pehachimetro digital para su lectura.	Tubo eppendorf pehachimetro
EVALUACIÓN MICROSCÓPICA PRE Y POST CONGELACIÓN					
Concentración	Cuantitativa discreta	El número exacto de espermatozoides por unidad de volumen (ml)	spz/ml	Utilización de la Cámara de Neubauer, dándonos como resultado en millones de espermatozoides por ml	Cámara de Neubauer
Motilidad progresiva individual	Cuantitativa continua	Capacidad de movimiento de los espermatozoides.	%	Visualización subjetiva y directa del vigor espermático	Microscopio Placas porta y cubreobjetos
Motilidad masal	Cuantitativa discreta	Movimiento de los espermatozoides de manera	Puntos (1-5)	Se tomará una gota de semen y se colocará en un	Microscopio Placas porta y

		grupal, está relacionada con la vitalidad, la velocidad del movimiento de los espermatozoides y la concentración espermática del semen.		porta objeto a 37 °C procediendo a observarlo en el microscopio con aumento de 10X	cubeobjetos
Vitalidad espermática	Cuantitativa continua	Relaciona la cantidad de espermatozoides vivos y muertos	%	Recuento celular mediante tinción con eosina nigrosina	Microscopio con un aumento de 400x
Morfoanomalias	Cuantitativa continua	Alteración en la estructura espermática del flagelo o la cola.	Menor 20%	Recuento celular	Microscopio Placas porta y cubeobjetos
Funcionalidad de la membrana	Cuantitativa continua	Evalúa el estado anatómico-funcional de la membrana plasmática del espermatozoide	60 % Endosmosis positiva normal <50% anormal %	Test de HOST (solución hipoosmótica de fructosa y citrato de sodio)	Microscopio con un aumento de 400x

Realizado por: Patarón, Silvia, 2021

Tabla 5-3: Matriz de consistencia

Formulación del problema	Objetivo general	Hipótesis general	Variables	Indicadores	Técnicas	Instrumento
<p>Los daños sufridos por la membrana espermática durante el proceso de criopreservación disminuyen la motilidad y vitalidad post descongelación</p> <p>¿La adición de ciclodextrina cargada de colesterol en el medio de criopreservación mejorará las características seminales post descongelación?</p>	<p>Evaluar el efecto de la adición de ciclodextrina cargada con colesterol en el medio de congelación sobre la calidad espermática post descongelación.</p>	<p>La inclusión de ciclodextrina cargada con colesterol en el medio de criopreservación si incrementará la calidad espermática post congelación</p>	Variables Independientes			
	<p>Objetivos Específicos.</p>		<p>Niveles de inclusión de ciclodextrina cargada con colesterol en el medio de congelación</p>	<p>0 mg CLC 1,5 mg CLC 3,0 mg CLC</p>	<p>Método descrito por Purdy y Graham</p>	<p>Balanza Caja Petri Espátula</p>
	<p>Evaluar la calidad espermática de eyaculados frescos de bovino Jersey.</p>		Variables dependientes			
	<p>Valorar las pajuelas previa adición de ciclodextrina cargada con colesterol en medios de congelación.</p>		<p>Volumen</p>	<p>(ml)</p>	<p>La extracción de semen se lo realizará aplicando el método de Vagina artificial, misma que tendrá en uno de los extremos un tubo recolector para determinar el volumen del eyaculado</p>	<p>Vagina artificial Tubos de recolección graduados</p>
<p>Determinar el</p>	<p>Determinar el</p>		<p>Color</p>	<p>Blanco cremoso Blanco lechoso Lechoso Traslucido</p>	<p>Observación directa</p>	<p>Tubo recolector transparente</p>

mejor nivel de utilización de ciclodextrina cargada con colesterol (0 mg CLC; 1,5 mg CLC; 3,0 mg CLC) en protocolos de crío preservación.	Ph	6,6-7	Pehachimetro digital	Pehachimetro digital
	Concentración	(spz/ml)	Conteo espermático	Cámara de Neubauer Microscopio
	Motilidad individual progresiva	(%)	Técnica de la gota gruesa	Microscopio Placas porta y cubreobjetos
	Motilidad masal	(1-5 pts.)	Técnica de la gota gruesa	Microscopio Placas porta y cubreobjetos
	Morfoanomalías	(Menor 20%)	Conteo celular	Microscopio Porta y cubre objetos solución isotónica de NaCl- al 0,9%
	Vitalidad	(%)	Tinción de Eosina – Nigrosina	Microscopio Porta y cubre objetos Eosina Nigrosina
	Integridad de la membrana	60 % Endosmosis positiva normal <50% anormal	Test HOST	Medio hipoosmótico Tubo de ensayo Glutaldehído al 25% Microscopio Placas porta y cubre objetos

Realizado por: Patarón, Silvia, 2021

3.3 Metodología

3.3.1 Colección del semen

Para la recolección del material biológico se debió realizar la limpieza del prepucio, recortando los pelos en la zona externa del mismo; se debió limpiar la parte interna utilizando una jeringa con 10 ml de agua fisiológica tres o cuatro veces hasta que al momento de pasar el papel toalla de color blanco no existiera residuos de orina o impurezas en el prepucio.

El armado de la vagina artificial se realizó con la camisa dentro del cilindro asegurándola con las bandas externas dejando un espacio entre la camisa interna y el cilindro, el cual será llenado con agua y aire; la temperatura del agua al momento de armar la vagina artificial fue de 39-40 bajando progresivamente hasta el momento de recolectar el semen. En uno de los extremos de la vagina se colocará el cono juntamente con el tubo graduado de colecta previamente esterilizado, finalmente colocamos una bolsa térmica para mantener la temperatura del eyaculado en 37°C transportándolo rápidamente al laboratorio para su posterior evaluación.

La utilización de una hembra en celo fue necesaria para calentar al macho, dejándolo montar por pocos segundos sin que haya penetración del pene, una vez que el animal haya tenido un calentamiento previo se dejó al animal montar y cuando este desenvainó el pene fue desviado ingresándolo a la vagina artificial.

3.3.2 Solución ciclodextrina cargada con colesterol (CLC)

- En 1 ml de cloroformo se disolvió 200 mg de colesterol
- En 2 ml de metanol se diluyó 1 g de β -ciclodextrina
- Se adicionó 450 μ l del colesterol previamente diluido en el cloroformo a la solución de ciclodextrina, luego se homogenizó con la ayuda de un vortex
- Una vez que la solución fue homogenizada se colocó en una caja Petri de vidrio dejándola secar a 37°C por dos días
- Los cristales formados en el interior de la caja Petri fueron removidos y almacenarlos a 22°C hasta su uso.

Una vez cargada la ciclodextrina con colesterol se preparó la solución de trabajo para lo cual se tomó 50 mg de CLC a 1 ml de medio TALP (Tyrode's-Albumina-Lactato Piruvato) (Purdy & Graham, 2004, p.523).

Tabla 6-3: Medio TALP: Tyrode's-Albumina-Lactato Piruvato

Reactivo	Molaridad (Mm)	(g)
Tris	375	4,5428
Ácido cítrico	124	2,3823
Glucosa	41	0,7388
Agua ultrapura, ml	100	100

Fuente: Viñán, H. (2017)

Realizado por: Patarón, Silvia, 2021

3.3.3 Adición de ciclodextrina cargada con colesterol

Una vez evaluada la concentración del eyaculado se realizó una pre dilución 1:1 (semen: solución de trabajo) a una concentración final de 120 millones de espermatozoides. Posteriormente el eyaculado fue dividido en tres alícuotas numeradas al azar según el tratamiento a realizar. T0 no tiene la adición de CLC por cada 120 millones de spz/ml, el T1 tuvo la adición de 1,5 mg de CLC por cada 120 millones de spz/ml, y al T2 se la adición 3,0 mg de CLC por cada 120 millones de spz/ml, cada alícuota fue incubada por 15 minutos en baño maría a 37°C (Mesa & Henao, 2012, p.2910).

El total del diluyente fue agregado pasado los 15 min con el fin de estabilizar las muestras por un lapso de 10 min en temperatura ambiente, luego se inició el proceso de empajillado. (Viñán, 2017, p.1).

3.3.4 Dilutor Andromed

Una vez que la muestra llegó al laboratorio el eyaculado fue evaluado, prediluido en relación 1:1 y por un lapso de 10 min este se mantuvo a 32°C en Baño María considerando que el diluyente debe tener la misma temperatura que el eyaculado (+/-1°C); pasado el tiempo de estabilización se realizó la dilución final cuya relación del Andromed fue de 1:4 es decir, 4 partes de agua bidestilada previamente temperada a +32°C con una parte del eyaculado según haya sido el volumen recolectado; teniendo en consideración que se debe agregar el agua bidestilada al eyaculado para conservar las propiedades del dilutor (Minitub, 2014, p.12).

3.3.5 Empajillado y sellado

El empajillado se lo realizó de forma manual, es decir el semen fue aspirado a través de la boca asegurándonos siempre que la absorción del semen se encuentre dentro de la pajilla; para el sellado se puso en contacto el extremo libre o anterior de la pajilla con el Alcohol Polivinílico, introduciéndola en agua a 5° C con la finalidad de solidificar el alcohol polivinílico.

3.3.6 Congelación

Una vez selladas las pajuelas fueron colocadas en la rampa de refrigeración y estabilización del congelador automático, con una temperatura inicial de 17 °C estabilizando la temperatura de las pajillas antes del proceso de congelación, temperatura que desciende hasta llegar a la temperatura de refrigeración 5°C manteniéndola por un lapso de 3 horas y 30 minutos, pasado este tiempo conocido como periodo de estabilización las pajuelas fueron colocadas en el rack de congelación

3.4 Tipo y diseño de investigación

Para la presente investigación se planteó dos tratamientos, siendo los niveles de inclusión de ciclodextrina cargada con colesterol (T1=1,5 mg CLC y T2=3,0 mg CLC), junto al tratamiento testigo (T0) el cual no incluye la adición de CLC; con cinco repeticiones y un tamaño de la unidad experimental de 10 pajillas, distribuyéndose bajo un Diseño Completamente al Azar el mismo que se basa en el siguiente modelo lineal aditivo:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Dónde:

Y_{ij} = Valor de la variable dependiente

μ = Media general

τ_i = Efecto del nivel de inclusión de ciclodextrina cargada con colesterol

ε_{ij} = Efecto del error Experimental

3.4.1 Esquema del Experimento

Tabla 7-3: Esquema del Experimento

TRATAMIENTO	CÓDIGO	REPETICIONES	TUE	TUE*REP
0 mg CLC	T0	5	10	50
1,5 mg CLC	T1	5	10	50
3,0 mg CLC	T2	5	10	50
TOTAL				150

T.U. E= Tamaño de la Unidad Experimental

Realizado por: Patarón, Silvia, 2021.

3.4.2 Esquema del análisis de la varianza (ADEVA)

Tabla 8-3: Esquema del ADEVA

Fuente de variación	Grados de libertad
Total	14
Tratamiento	2
Error	12

Realizado por: Patarón, Silvia, 2021.

3.4.3 Análisis estadístico y pruebas de significancia

Para la presente investigación se utilizó un Diseño completamente al Azar (DCA), donde los datos fueron sometidos a los siguientes análisis estadísticos:

- Estadística descriptiva para variables cualitativas, Excel (2008).
- ADEVA (Análisis de Varianza), Infostat V (2018), Spss V (2010).
- Separación de medidas por el método del rango múltiple de Waller Duncan a un nivel de significancia $p < 0,05$ y $p < 0,01$.
- Análisis de regresión y correlación siempre y cuando exista significancia. Excel (2008).

3.5 Métodos de investigación

El método de estudio empleado en la esta investigación fue de tipo EXPERIMENTAL, aplicando el método HIPOTETICO-DEDUCTIVO ya que a través de las hipótesis planteadas se demostró que la adición de ciclodextrina cargada con colesterol influye en la disminución de la mortalidad de espermatozoides después de la crio-conservación en nitrógeno líquido.

3.6 Enfoque de la investigación

El presente tema de investigación pretende mejorar de manera cualitativa y cuantitativa la problemática en estudio, partiendo desde los escasos de trabajos realizados en Ecuador sobre la utilización de ciclodextrina cargada de colesterol en protocolos de congelación, y como está influye en la calidad espermática post descongelación.

3.7 Alcance de la investigación

La presente investigación está dirigida a centros de inseminación, laboratorios de reproducción animal, bancos de germoplasma animal y universidades; teniendo en cuenta que el material biológico (semen) deberá seguir protocolos adecuados de tratamiento, almacenamiento y crioconservación para su posterior utilización en programas de reproducción asistida con fines de mejoramiento genético de las diversas especies zootécnicas.

3.8 Población de estudio

El estudio se realizó en el laboratorio de Reproducción Animal de la facultad de Ciencia Pecuarias de la ESPOCH utilizando 5 eyaculados provenientes de un solo reproductor de 3 años de edad, raza Jersey perteneciente a la ganadería “San Diego” para lo cual se tomó en consideración los siguientes criterios de inclusión:

- Coloración y consistencia cremosa
- Libre de partículas extrañas.

Los eyaculados que no fueron tomados en consideración son aquellos que presentaron los siguientes criterios de exclusión:

- Eyaculados de aspecto ralo, translúcido
- Eyaculados con coloración amarillentos o con presencia de plasma, linfa

3.9 Unidad de análisis

El número de unidades experimentales fue de 150 pajillas divididas en 3 tratamientos y 5 repeticiones considerando como repeticiones a la frecuencia de extracción de semen, con un tamaño de unidad experimental de 10 pajuelas.

3.10 Técnica de recolección de datos

Los datos fueron recolectados una vez realizada la evaluación post descongelación, mismos que fueron tomados cada semana, donde se evaluó 10 pajuelas por cada unidad experimental, considerando los parámetros de motilidad individual progresiva, vitalidad, integridad de la membrana espermática y morfoanomalías.

3.11 Instrumentos de recolección de datos

Para determinar las características macroscópicas y microscopias se utilizará registros donde conste el número del animal, edad, fecha de recolección, volumen espermático, concentración, motilidad masal e individual y vitalidad

3.11.1 Instrumentos primarios

Vagina artificial, tubos graduados de recolección, cámara de Neubauer, microscopio, placas cubre y porta objetos, pehachímetro, termos, termómetro, micropipetas

3.11.2 Instrumentos secundarios

Cuadernillo, esfero gráfico, mandil, mascarilla.

3.12 Instrumentos para procesar datos recolectados

Una vez recolectados los datos fueron procesados en el software estadístico Infostat y Excel.

3.13 Cronograma de actividades

Tabla 9-3: Cronograma de actividades

ACTIVIDADES	TIEMPO DE LA INVESTIGACIÓN											
	Nov				Dic				Ene			
	Semanas											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Evaluación inicial del semen (macro y microscópica)	x											
Preparación de los medios de congelación	x											
Recolección y evaluación macro y microscópica del semen		x	x	x	x	x						
Inclusión de ciclodextrina cargada con colesterol		x	x	x	x	x						
Procesamiento del semen		x	x	x	x	x						
Evaluación post descongelación		x	x	x	x	x						
Tabulación de datos							x	x	x			
Análisis de resultados										x		
Elaboración del documento final											x	x

Realizado por: Patarón, Silvia, 2021

CAPITULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Evaluación pre congelación

4.1.1 Volumen del eyaculado (ml)

La media obtenida para los cinco saltos fue de $8,00 \pm 2,12$ ml siendo ligeramente superior al reportado por (Lemma & Shemsu, 2015, p.38) con un promedio de 7,73 ml para toros Jersey, mientras que para (Aguilar, 2016, p.64) quien evaluó el potencial reproductivo de toros Jersey en la hacienda El Rosario registro una media de 5,25 ml.

Para Rutter & Russo, (2006), el volumen tiene un rango de entre 2 y 12 ml y que, en toros mayores de 2 años debería ser superior a 4 ml; los toros de raza Holando Argentino en general producen mayor volumen de semen que los de razas británicas como Angus, Hereford o continentales como Limousin y Charolais. (p.76).

Otros factores que influyen en el volumen es la frecuencia de la eyaculación, estado nutricional, ubicaciones geográficas, estaciones del año, método de recolección del semen y manipulación de toros durante la extracción. (Lemma & Shemsu, 2015, p.38).

4.1.2 Color

En general, el 80% de las cinco colectas fueron de color blanquesino de aspecto ligeramente cremoso en tanto que el 20% fue de color blanco lechoso.

El color normal del semen suele presentar varias tonalidades que van desde el blanco, blanco amarillento, marfil o inclusive hasta grisáceo; cuando existe algún tipo de pigmentos el semen se torna de un tinte amarillento (Rutter & Russo, 2006, p.77).

Para Aguilar, G (2016), quien encontró varias tonalidades del color blanco en reproductores de la Hacienda El Rosario señala que la coloración está relacionada con la densidad y la concentración presentes en el semen fresco.

4.1.3 Ph

Al analizar el pH del semen durante cada una de las colectas se obtuvo una media de $6,78 \pm 0,08$ (Tabla 10-4), encontrándose dentro de los parámetros normales, el cual varía de 6,6 a 7; en caso de que el pH sea menor puede tratarse de una oclusión en las vesículas seminales caso contrario, cuando el potencial de hidrógeno es superior a 7 nos indica que existe la posibilidad de que haya un proceso infeccioso. (Aguilar, G 2016, p.19).

4.1.4 Concentración (spz/ml)

La concentración espermática en las cinco extracciones alcanzó una media de $1040 \times 10^6 \pm 393,2 \times 10^6$ espermatozoides/ml valores que concuerdan con otras investigaciones, sin embargo, existen valores superiores como los hallados por Mackinnon, (2016), con un promedio de $1389,1 \times 10^6$ espermatozoides/ml en su investigación acerca de la influencia de los cambios estacionales en parámetros espermáticos. (p.15).

La concentración espermática puede variar dada las diferentes técnicas de conteo espermático, como, recuentos de hemocitómetro, espectrofotómetro y sistemas de conteo electrónico como lo indica (Veloz, 2017, p.50) en su investigación sobre los diferentes métodos para la evaluación de la calidad espermática de reproductores bovinos donde registra una concentración espermática de $1237,23 \times 10^6$ espermatozoides/ml en toros Jersey al evaluar con el método CASA (Análisis seminal asistido por computadora), dato que es superior al presentado en esta investigación.

4.1.5 Morfología normal (%)

El porcentaje de espermatozoides normales durante las cinco extracciones fue del $87\% \pm 0,07$ dato que es superior al reportado por (López & Rivera, 2015, p.11), con el 80,2% mismos que a su vez concuerdan con (Rutter & Russo, 2006, p.84), quien menciona, que un semen debe contener mínimo un 70 % de espermatozoides con morfología normal.

Rutter & Russo, (2006), mencionan que la disminución de la fertilidad de un toro no siempre está dado por el porcentaje de morfoanomalías presentes en el semen, ya que existen alteraciones que se encuentran en el núcleo y el acrosoma de células aparentemente normales causando anormalidades citogenéticas que disminuyen la fertilidad del toro, teniendo que recurrir a técnicas especiales para su evaluación, (p.83).

Tabla 10-4: Valoración de la calidad seminal previa congelación

PARAMETROS	MEDIA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	Prob
Volumen del eyaculado (ml)	8,00	2,12	2,63
Morfología normal (%)	87,00	0,07	0,08
Motilidad individual (%)	87,00	0,04	0,06
Concentración (spz/ml)	1040x10 ⁶	393,2x10 ⁶	0,48
Motilidad masal (pts)	4,00	0,00	0,00
pH (pts)	6,78	0,08	0,10

EE: Error estándar

Prob: Probabilidad.

Realizado por: Patarón, Silvia 2021.

4.1.6 Motilidad individual (%)

Los resultados obtenidos durante la evaluación en semen fresco, mostraron ser superiores con una media de 87 % \pm 0,02 a los obtenidos por (Lemma & Shemsu, 2015, p.37) quienes evaluaron la motilidad individual en reproductores de raza Jersey obteniendo el 79,41%, mientras que, (López & Rivera, 2015, p.11) reportan el 95% de motilidad individual en semen fresco de reproductores Jersey dato que es superior al encontrado en la presente investigación.

La motilidad progresiva individual está asociada a varios factores de tipo endógeno y exógeno como las asociadas al aumento de la carnitina intracelular en los espermatozoides, así como al incremento intracelular de Adenosín monofosfato cíclico (AMP) y proteínas-quinasas dependientes de AMP, así como el descenso de Calcio y de la proteína calmodulina. (Suárez, et al 1984, citados por Saavedra, 2018, p.27), estas modificaciones bioquímicas se da principalmente por el paso de los espermatozoides a través de la cabeza y el cuerpo del epidídimo.

4.1.7 Motilidad masal (pts)

La motilidad masal de las cinco extracciones expresadas mediante una escala de calificación subjetiva, registro una media de 4 pts, el cual indica que la actividad cinética es muy buena, con remolinos intensos y ondas espermáticas apreciables, valor que supera al evaluado por (Lemma & Shemsu, 2015, p.38) con un promedio de 3,51 pts. Veloz, D (2017), menciona que la tanto la concentración espermática como la cantidad de células con movimiento progresivo y al igual que la velocidad en sus movimientos son factores predominantes para determinar la motilidad

masal; los movimientos en ondas vigorosas y en remolinos rápidos se ven afectadas o eliminadas cuando estos tres factores o uno de estos se encuentra disminuido, (p.23).

4.2 Evaluación post descongelación

4.2.1 Motilidad individual, %

Una vez realizado el proceso de descongelación los resultados mostraron diferencias altamente significativas ($P < 0,01$), cuyos porcentajes de motilidad individual fueron superiores cuando se utilizó 1,5 mg CLC (T1) con una media de 63,50 %, en tanto que, para el tratamiento testigo y para el T2 (3,0 mg CLC) se registraron promedios de 57,10 y 54,90% respectivamente siendo la dispersión de cada media de $\pm 0,6893\%$ como se indica en la tabla 11-4

Tabla 11-4: Evaluación post descongelación previa adición de ciclodextrina más colesterol en medios de congelación

VARIABLES	NIVELES DE CLC (mg)				
	0	1,5	3,0	EE	Prob.
Motilidad (%)	57,10 b	63,50 a	54,90 c	0,6893	0,001
Vitalidad (%)	54,13 b	75,36 a	52,00 b	0,9239	0,001
Morfoanomalías (%)	5,21 a	5,01 a	5,40 a	0,2418	0,537
Integridad de la membrana (%)	46,77 c	60,08 a	55,06 b	1,2943	0,001

Letras iguales no difieren estadísticamente

EE: Error estándar

Prob: Probabilidad

Realizado por: Patarón, Silvia, 2021

Resultados que superan a los encontrados por (Mejía, 2017, p.34) quién valoró el semen post descongelación con dos diferentes métodos de colecta registrando el 46,30% usando vagina artificial y 51,30% con electroeyaculador al utilizar Andromed como único diluyente.

Los resultados reportados por (Purdy & Graham, 2003, p.36) en su estudio con diferentes cantidades de ciclodextrina cargada con colesterol diluido en dos medios de criopreservación, establecieron porcentajes del 60, 57 y 54% correspondientes al 1,5; 3,0 y 4,5mg CLC respectivamente cuando utilizaron el diluyente a base de huevo, mientras que, al diluir el semen en citrato de sodio obtuvieron 53 y 50% perteneciente al 1,5 y 3,0 mg CLC datos que son inferiores a los hallados en esta investigación.

Viñán, 2017 pp 37 reporta un 63,42 y 55,83% al adicionar 1,5 y 2,0 mg CLC en la criopreservación de semen de toros holstein friesian resultados similares a los encontrados en la presente investigación.

En el gráfico 1-4 se observa que la motilidad individual mostró variabilidad durante el tiempo de evaluación, debido a la sobresaturación de colesterol en la membrana, afectando la fluidez de la misma, existiendo así, una relación inversa entre el aumento en la cantidad de CLC y la motilidad individual.

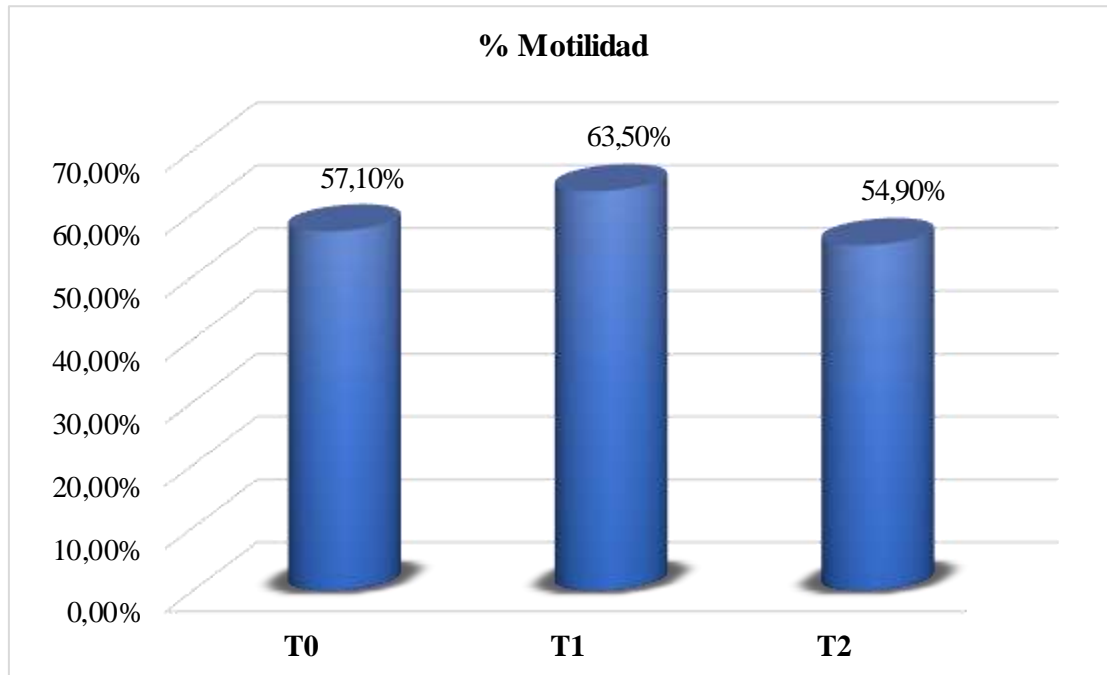


Gráfico 1-4: Motilidad del semen post descongelación previa adición de ciclodextrina más colesterol en medios de congelación.

Realizado por: Patarón, Silvia. 2021

Mediante el análisis de regresión se pudo determinar que la motilidad se encuentra relacionada significativamente ($P < 0,01$) con la integridad de la membrana a una regresión positiva de primer orden cuyo coeficiente de correlación es de $r = 0,4697$ y con un coeficiente de determinación de $R^2 = 0,2206$ señalando que la motilidad depende en un 22,06% de la integridad de la membrana, ver gráfico 2-4

El modelo de regresión obtenido es el siguiente:

$$\text{MIPD} = 42,683 + 0,293\text{IMPD}$$

Dónde:

MIPD: Motilidad individual post descongelación, (%).

IMPD: Integridad de la membrana post descongelación, (%).

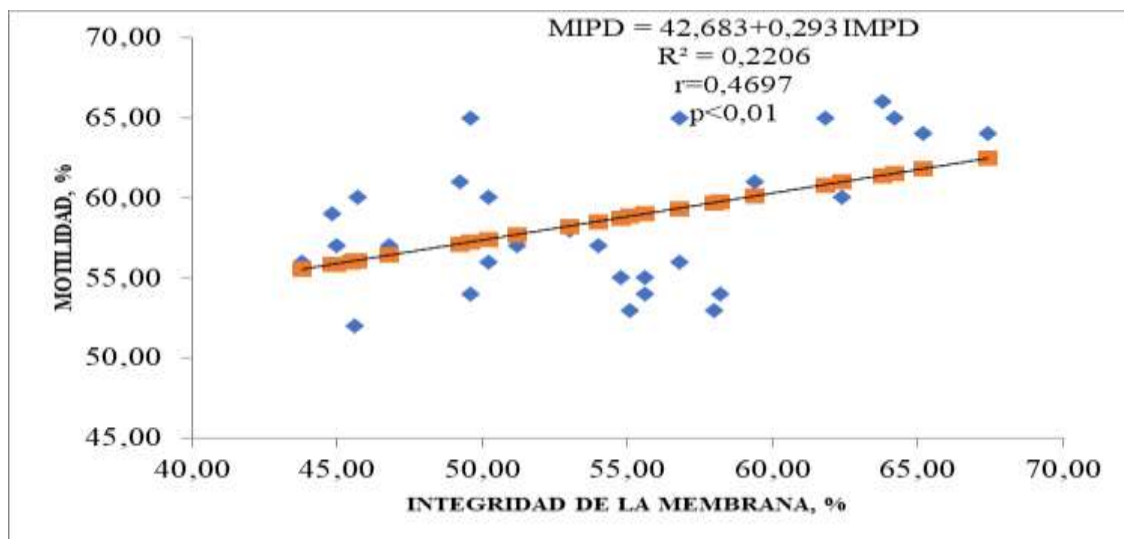


Gráfico 2-4: Tendencia de la regresión para la motilidad espermática asociada a la integridad de la membrana post descongelación.

Realizado por: Patarón, Silvia. 2021

La correlación entre la integridad de la membrana y la motilidad individual puede atribuirse al hecho de que la motilidad depende del contenido y la función de la adenosin trifosfato, es decir que la fuga de ATP a través de la membrana plasmática dañada disminuye la motilidad del espermatozoide.

4.2.2 Vitalidad espermática, %

En la tabla 11-4 se muestra como el porcentaje de vitalidad presenta diferencias significativas ($P < 0,01$), con medias de dispersión de $\pm 0,9239$ % para cada uno de los tratamientos, siendo el T1 (1,5 mg CLC) quien presentó el mayor porcentaje con 75,36% seguido por el tratamiento testigo y el T2 (3,0 mg CLC) mismos que comparten significancia con promedios de 54,13 y 52,00% respectivamente; resultados que superan a los hallados por (E. Mocé & Graham, 2006 p. 829), quienes encontraron porcentajes de espermatozoides vivos entre el 52 y 25% al usar 2 mg y 4 mg de ciclodextrina cargadas de colesterol agregadas a eyaculados de toro frescos para mejorar la crio supervivencia de los espermatozoides, por su parte, (Viñan 2017, p. 37) obtuvo el 75,84% de vitalidad espermática al utilizar el 1,5 mg CLC resultado que concuerda con la presente investigación.

Mejia, (2017), quien utilizó dos métodos de colecta de semen y el AndroMed como diluyente reportó un 59,10% de vitalidad espermática post descongelación al usar el electroeyaculador

(p.34), en tanto que al utilizar la vagina artificial encontró un 53,8% de espermatozoides vivos, sin embargo, (Quispe, 2019, p.40), al utilizar el AndroMed registró el 48,4% de vitalidad espermática y el 59,8% al usar Triladyl.

En el gráfico 3-4 se muestra el efecto de los niveles de utilización de ciclodextrina cargada de colesterol sobre la vitalidad espermática post descongelación, cuyo resultado este asociado a la reducción en el daño del esperma, dado que el semen cargado con CLC tiende a dar mayor estabilidad a la membrana plasmática sustituyendo el colesterol perdido en el proceso de congelación e incrementando el ratio colesterol/fosfolípidos (Purdy et al., 2005, p.103).

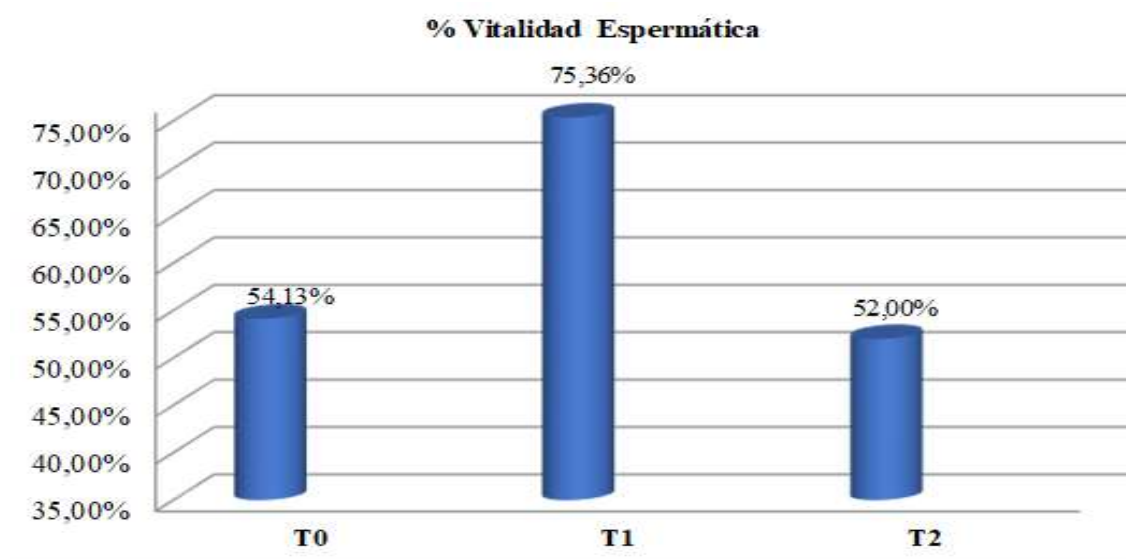


Gráfico 3-4: Vitalidad espermática del semen post descongelación previa adición de ciclodextrina más colesterol en medios de congelación.

Realizado por: Patarón, Silvia. 2021

En base al análisis de regresión, se determinó que el porcentaje de espermatozoides vivos presenta relación de dependencia al ($P < 0,01$) con la integridad de la membrana obteniendo un modelo de regresión lineal con un coeficiente de determinación de $R^2 = 0,3507$ y un coeficiente de correlación de $r = 0,5922$ señalando que la vitalidad espermática depende en un 35,07% de la integridad de la membrana como se indica en el gráfico 4-4 siendo el modelo de regresión el siguiente:

$$VEPD = 8,6245 + 0,9611IMP$$

Dónde:

VEPD: Vitalidad espermática post descongelación, (%).

IMPD: Integridad de la membrana post descongelación, (%).

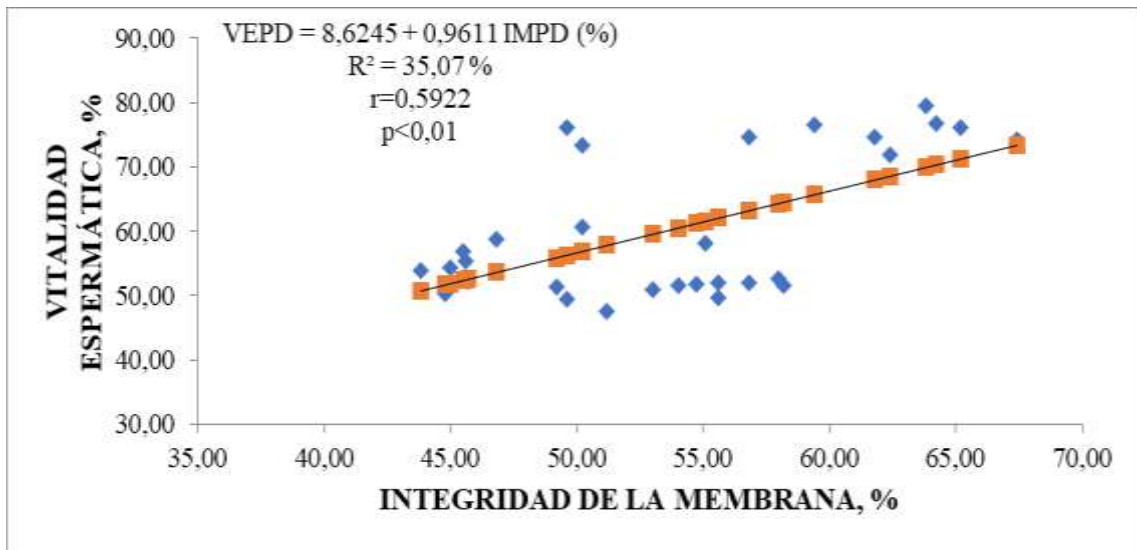


Gráfico 4-4: Tendencia de la regresión para la vitalidad espermática asociada a la integridad de la membrana post descongelación

Realizado por: Patarón, Silvia. 2021.

4.2.3 Morfoanomalías, %

En el análisis de varianza para el porcentaje de morfoanomalías no se registró diferencias estadísticas entre las medias de los tratamientos ($P > 0,05$), sin embargo, se encontraron diferencias numéricas, donde el menor porcentaje de morfoanomalías fue para el T1 (1,5 mg CLC) con 5,01% seguido por el 5,21% perteneciente al tratamiento control, siendo el T2 (3,0 mg CLC) quien presentó el mayor valor con 5,40% teniendo una dispersión para cada media de $\pm 0,2418$ % como se indica en el cuadro 11-4.

Resultados que son superiores a los presentados por (Viñan, H 2017 p. 37) quien en su investigación acerca del uso de metil- β -ciclodextrina con colesterol en la conservación de semen registra el 4,54 y 4,75% de morfoanomalías al utilizar 1,5 y 2,0 mg CLC respectivamente; a su vez, estos resultados son inferiores a los reportados por (Mejía, J 2017, p. 34) en su estudio sobre la evaluación pre y post congelación de semen con diferentes métodos de colecta como la vagina artificial y el electro eyaculador con un 15 y 12,6% correspondientemente.

Moncayo (2016) establece un 7% de morfoanomalías para espermatozoides provenientes de toros de la raza Holstein con el diluyente Triladyl, mientras que para espermatozoides de toros de la raza Brown Swiss obtiene mayor alteración morfológica después de la criopreservación con un promedio de 17,3% (p.45), resultados que son superiores a los encontrados en la presente investigación.

Para Viñán, H (2017, p.42), la utilización de ciclodextrina más colesterol previo al proceso de congelación, no mejora el porcentaje de anomalías, sin embargo, mejora las características espermáticas después de ser descongeladas; cabe mencionar que el semen descongelado no debe presentar más del 30% anomalías totales puesto que se cuestionaría la capacidad reproductiva del animal (Moncayo, S 2016, p. 45).

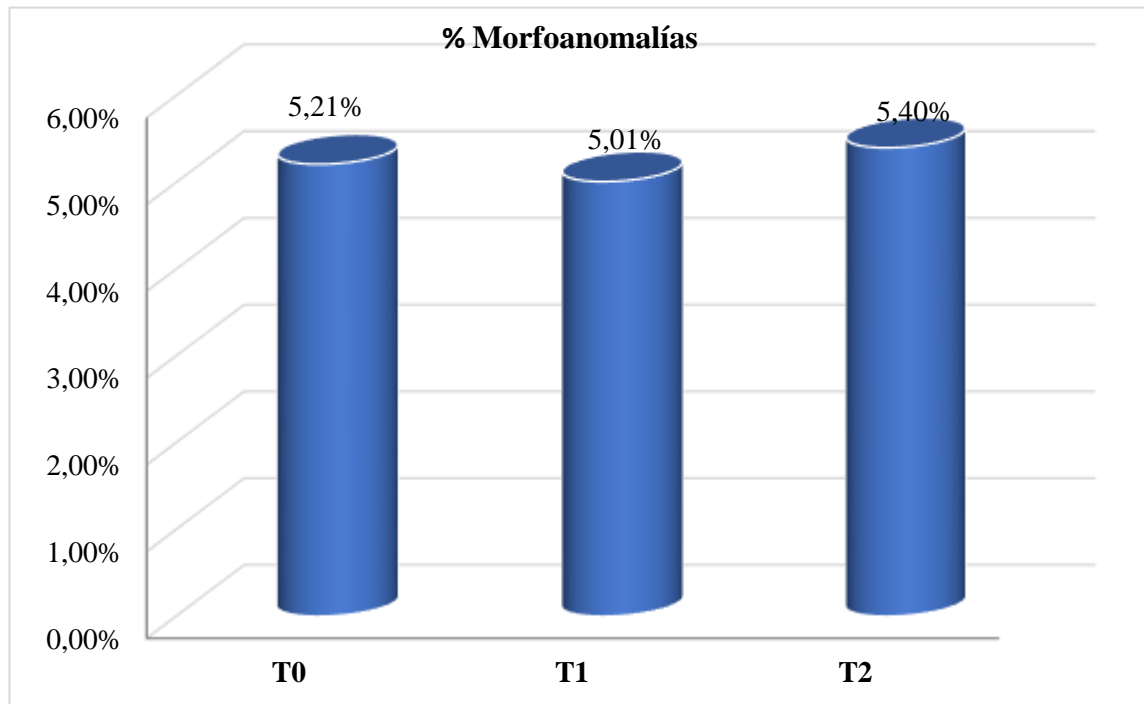


Gráfico 5-4: Morfoanomalías espermiática del semen post descongelación previa adición de ciclodextrina más colesterol en medios de congelación.

Realizado por: Patarón, Silvia. 2021

El gráfico 5-4 muestra el efecto de la adición de metil - β - ciclodextrina cargada de colesterol en medios de crioconservación para bovinos sobre el porcentaje de morfoanomalías cuyo resultado posiblemente se encuentre asociado al correcto funcionamiento testicular, en caso de existir formas inmaduras de los espermios, presencia de células sanguíneas, entre otros, poniéndonos en sobre aviso sobre las posibles anomalías en los genitales, dando origen a morfologías primarias las cuales se generan en la parte interna de la gónada masculina a través del proceso de espermatogénesis, mientras que, las morfoanomalías secundarias inician a nivel del epidídimo una vez terminada la formación del espermatozoide (De Alba, 2014, p.40).

4.2.4 Integridad de la membrana, %

Las pajuelas que no fueron cargadas con ciclodextrina más colesterol presentan el promedio más bajo en cuanto a la integridad de la membrana con 46,77%, mismas que difieren estadísticamente ($P < 0,01$) del resto de tratamientos, siendo el T1(1,5 mg CLC) quien registro el

mejor porcentaje con una media de 60,08% seguido por el T2(3,0 mg CLC) con 55,06±1,2943% respectivamente como se muestra en la tabla 11-4 y el gráfico 6-4.

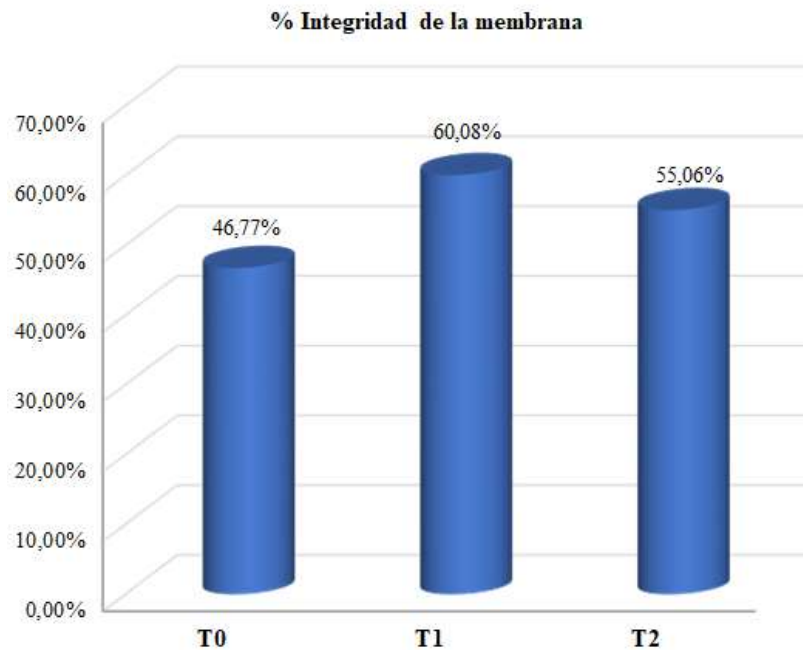


Gráfico 6-4: Integridad de la membrana del semen post descongelación previa adición de ciclodextrina más colesterol en medios de congelación.

Realizado por: Patarón, Silvia. 2021

Resultados que, al ser comparados con (Quispe, S 2019, p. 4) en su estudio al utilizar distintos dilutores como el Tris-YH, Trilady1-YH y AndroMed reporto 51,5; 53,8 y 44,4% respectivamente; para (Bedoya, et al, 2003 pp,1989) encontraron espermatozoides que reaccionaron al test hipoosmótico en un 53,40% en su estudio sobre la integridad funcional de la membrana plasmática de espermatozoides bovinos para lo cual utilizaron Tris-YH como diluyente, resultados que son inferiores a los encontrados en la presente investigación.

Viñan, H (2017 p. 47) presenta datos que concuerdan con la presente investigación, mostrando una integridad de la membrana de 60,43% al incluir 1,5mg CLC y 46,89% para el control; sin embargo, (Purdy y sus colaboradores 2005, pp 102) encontraron valores superiores con 1.5 mg de CLC del 76% y con el tratamiento control del 60 por ciento valores superiores a la presente investigación.

La disminución de la permeabilidad es el principal cambio estructural que la célula sufre durante el proceso de congelación y descongelación, imposibilitando al espermatozoide experimentar el proceso de hinchamiento típico en células reactivas positivamente al Test de HOST, de ahí que, los agregados de ciclodextrina aumentan la tolerancia osmótica de los espermatozoides conservando la estructura de la membrana lo que conlleva al incremento en los

índices de fertilidad dada la disminución en el daño celular osmótico. (Eva Mocé, Purdy, & Graham, 2010, p. 244).

La integridad de la membrana está relacionada significativamente ($P < 0,01$) con los niveles de adición de metil β - ciclodextrina cargada de colesterol a una regresión de segundo orden, siendo el coeficiente de correlación de $r = 0,5034$ y el coeficiente de determinación de $R^2 = 0,2534$ mostrando que el porcentaje de integridad de la membrana depende en un 25,34% de los niveles de ciclodextrina cargada de colesterol.

El modelo de regresión obtenido es el siguiente:

$$\text{IMPD} = -9,1585\text{CLC}^2 + 40,778\text{CLC} + 15,159$$

Donde:

IMPD: Integridad de la membrana, %

CLC: Nivel de ciclodextrina cargada de colesterol en medios de crioconservación

De acuerdo al modelo de regresión obtenido se determinó que el mejor nivel de utilización de ciclodextrina cargada de colesterol en medios de crio preservación para obtener un mejor porcentaje de integridad de la membrana es del 1,5 mg CLC, siendo los 3 mg CLC el punto donde la pendiente del modelo comienza a ser negativa, ver gráfico 7-4

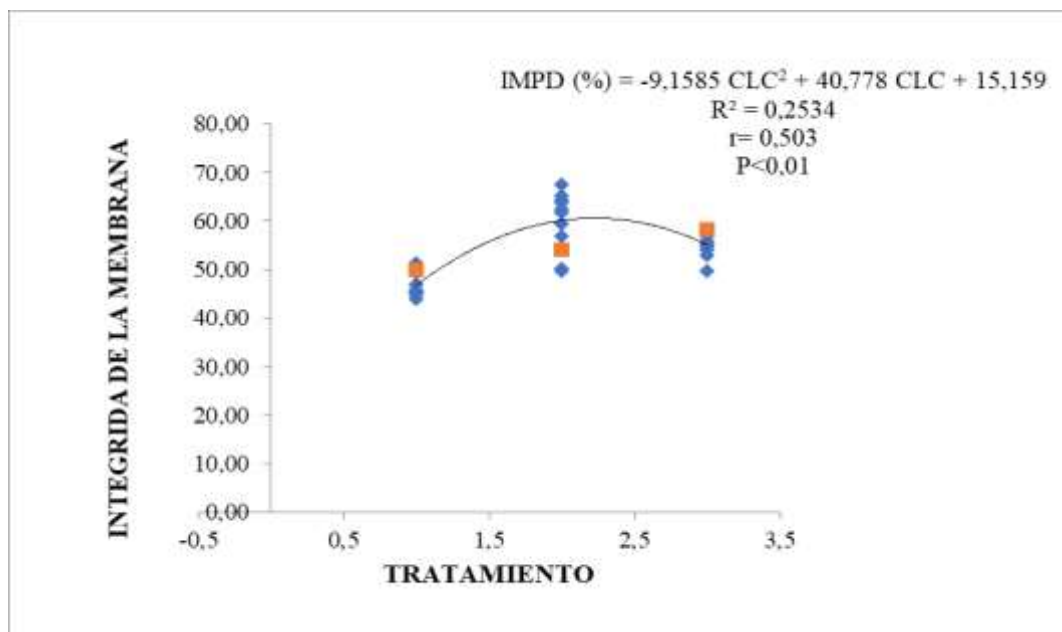


Gráfico 7-4: Tendencia de la regresión para la integridad de la membrana asociada al nivel de utilización de ciclodextrina cargada de colesterol.

Realizado por: Patarón, Silvia. 2021

CAPITULO V

5. PROPUESTA DE PROTOCOLO DE CONGELACIÓN

En el presente capítulo se desarrolla una propuesta de mejora continua a los protocolos de congelación en base al marco teórico y a los resultados obtenidos en el capítulo anterior. Esta propuesta se enfoca en siete puntos los cuales son: higiene pre-colecta, armado de la vagina artificial, colecta del material biológico, evaluación del semen eyaculado, preparación y dilución de ciclodextrina cargada de colesterol, dilución y congelación del semen.

5.1 Higiene antes de la colecta

Proceso que inicia con la preparación del toro, para ello, es indispensable la utilización de abundante agua con la cual se realiza un lavado de limpieza en la parte ventro abdominal y del prepucio de manera descendente, remover cualquier tipo de suciedad mediante una serie de masajes para luego secar el prepucio con papel toalla. Con una tijera corte el exceso de pelo alrededor del ostium prepucial a unos 2 o 3 cm de la base aproximadamente, una vez terminado dicho proceso lave y vuelva a secar, finalmente se usa una jeringa y colocándola en el orificio prepucial se procede a un lavado interno a base de solución salina con el objetivo de evitar la contaminación del semen sea por sustancias externas o por las mismas secreciones del animal.

Fotografía 1-5: Higiene pre colecta



Realizado por: Patarón, Silvia. 2021

5.2 Armado vagina artificial

El método de vagina artificial permite simular la cópula natural obteniendo eyaculados de alta calidad, el equipamiento de este material esta dado por un tubo rígido en cuyo interior se coloca una camisa de látex, misma que se conecta a una válvula el cual permite el llenado de agua caliente y la insuflación de aire, ajustando la presión y temperatura de la vagina artificial; en uno de sus extremos con ayuda de bandas elástica se sujeta la camisa, mientras que por el otro

extremo se dispone el cono colector con el tubo graduado de recolección, revestido con una cubierta protectora que aísla los rayos solares considerados como espermaticidas.

Fotografía 2-5: Armado de la vagina artificial



Realizado por: Patarón, Silvia. 2021

5.3 Colecta de semen a través de la vagina artificial

El operario encargado de realizar la recolección del semen debe ubicarse al lado derecho del animal, en tanto que al lado izquierdo se ubica la persona encargada de sujetar al semental mediante una cuerda, resguardando así la seguridad del operario en caso de cualquier movimiento brusco por parte del semoviente. Una vez que el animal realice el salto se coloca la vagina artificial por atrás del miembro anterior del toro con la abertura de la vagina dirigida hacia el pene a unos 45 grados de inclinación, con la utilización de la mano izquierda se toma el prepucio direccionándolo a la abertura de la vagina sin tocar el pene directamente ya que puede ocasionar una posible falta de inhibición en la erección disminuyendo la posibilidad de que el toro vuelva a montar nuevamente.

Fotografía 3-5: Colecta de semen



Realizado por: Patarón, Silvia. 2021

5.4 Evaluación del semen eyaculado

Una vez realizada la colecta, la evaluación se la debe realizar de manera inmediata y eficiente con el fin de no disminuir la calidad seminal obtenida, para lo cual se utiliza varias técnicas como la observación directa y el recuento celular.

5.4.1 Color

Aspecto a ser considerado de manera subjetiva y por observación directa en el tubo de recolección teniendo en cuenta los lineamientos establecidos en la tabla 2-3; desechando aquellos eyaculados que presenten fragmentos de material o coloraciones como rojo o marrón, misma que indica la presencia de sangre fresca o hemolizada.

Fotografía 4-5: Color



Realizado por: Patarón, Silvia. 2021

5.4.2 Volumen

Se determina por observación directa a través del tubo recolecto, su medición es expresada en ml pudiendo variar según el método de colecta, edad del animal, vigor reproductivo y frecuencia en el número de servicios.

5.4.3 Motilidad masal

Es evaluada por microscopia óptica y de forma subjetiva, tomando una gota de semen fresco y colocándola en una placa portaobjetos previamente atemperada a 37°C, se procede a la evaluación expresándose en una calificación de 1 a 5 puntos de acuerdo a los lineamientos establecidos en la siguiente tabla.

Tabla 12-5: Evaluación de la motilidad masal

Puntos	Calificación	Descripción
1	Muy pobre	Sin movimiento
2	Pobre	Algunos grupos de espermatozoides se mueven
3	Aceptable	Presencias nítidas de ondas
4	Bueno	Intensos movimientos de ondas bien marcadas
5	Muy bueno	Movimientos formando la letra “Ω”

Fuente: Adaptado por Villamizar, G. 2014

Realizado por: Patarón, Silvia, 2021

5.4.4 Motilidad individual

Evaluación que se la realiza de manera subjetiva ya que depende de la experiencia del evaluador, a su vez esta medición se considera cuanti-cualitativa dado que evalúa la tasa de espermatozoides en movimiento de 0 a 100% y la calidad según el movimiento siendo este lineal rápido, no progresivo e inmóvil como se detalla en la siguiente tabla.

Tabla 13-5: Parámetros para la Motilidad Individual Progresiva

Clasificación	Motilidad progresiva individual	Valor %
Pobre	Muy lento y errático	<50
Aceptable	Lineal lento y generalizado	60-70
Bueno	Lineal moderadamente rápido	70-80
Muy bueno	Lineal rápido	80-100

Fuente: Crespo, 2014.

Realizado por: Patarón, Silvia, 2021

El semen de toro es demasiado concentrado como para hacer una determinación exacta de la motilidad individual, motivo por el cual se realiza una predilución 1:0,5 a base de citrato de sodio al 2,9%, empleando 500µl de semen en 250µl de citrato de sodio previamente atemperado, se coloca una gota diluida en un portaobjeto y se cubre para observar al microscopio de contraste de fase con aumento de 200X a 400X y a una temperatura de 37°C, la cual puede mantenerse constante con una platina calentadora termorregulable adherida al microscopio.

5.4.5 Morfología anormal

La evaluación de las formas anormales permite distinguir los desórdenes de la espermatogénesis (morfoanomalías primarias) y los que se producen durante el tránsito del espermatozoide por el epidídimo o fase de maduración (anomalías secundarias) que en general afectan menos a la fertilidad.

La técnica de coloración vital ayuda a determinar las morfoanomalías, esta consiste en colocar 5µl de semen puro en uno de los extremos del portaobjetos atemperado a 37°C; sobre esta gota se coloca un agota de 5µl de eosina para que luego por capilaridad se distribuya sobre el portaobjetos, y se realiza el extendido en forma firme, este barrido no se lo debe realizar directamente en la gota gruesa dónde se mezcló para evitar que el frotis tenga un grosor excesivo y resulte dificultosa su lectura; se deja secar sobre la platina térmica y se procede a su lectura observando al menos 100 espermatozoides y se determina el porcentaje de espermatozoides con morfología normal y anormal.

Fotografía 5-5: Tinción eosina-nigrosina



Realizado por: Patarón, Silvia. 2021

Con el fin de interpretar las estructuras halladas en cada una de las muestras se propone la siguiente clasificación basada en las anomalías descritas con mayor frecuencia

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

Espermatozoides con gota citoplasmática proximal.

Espermatozoides con gota citoplasmática distal.

Espermatozoide con cola enrollada.

Espermatozoide con acrosoma desprendido.

Espermatozoide con cola quebrada. (Rodríguez, H. 2002)

5.4.6 Concentración

Existen varios métodos para determinar la cantidad de células en volumen del eyaculado una de ellas es sin duda la fometría la cual utiliza equipos para su valoración ejemplo de ello es el spermacuer a partir de un agota de 5 µl de semen, o que aquellos métodos que miden la concentración por espectrofotometría como el sistema CASA, sin embargo, el método más común es el recuento espermático el cual consiste en el conteo de células en la cámara de Neubauer

Se toma una alícuota de semen de 5 µl y se lo diluye en 1ml de agua destilada obteniendo así una dilución 1:200 Posteriormente se monta en la laminilla de la cámara de Neubauer dejándola reposar de 4 a 5 minutos para que la muestra se sedimente; se realiza el conteo en 5 de los 25 cuadros de la cámara en forma de X como se indica en la siguiente figura.

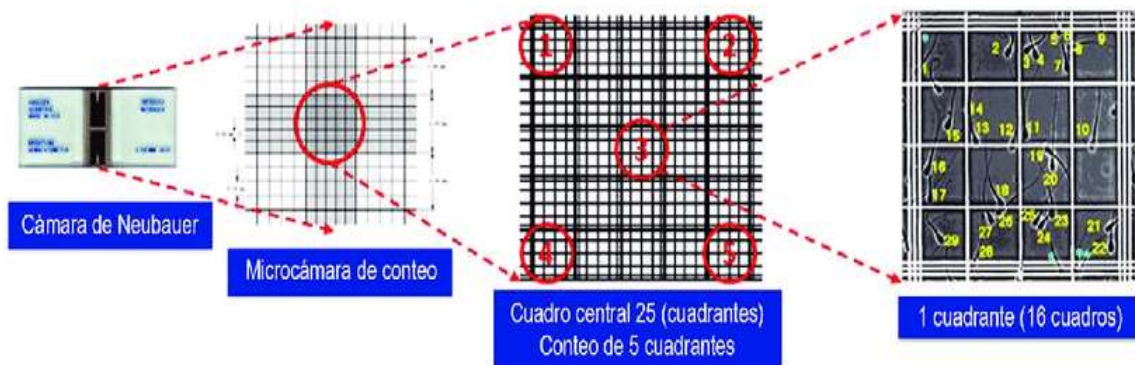


Figura 8-5. Recuento celular en la cámara de Neubauer

Fuente: Olivera, M. 2014

Una vez realizado el conteo espermático se aplica la siguiente formula:

$$\text{Concentración (spz/ml)} = N^{\circ}\text{spz} \cdot 5 \cdot 10 \cdot 1000 \cdot 200$$

Donde:

N.º spz= Total de espermatozoides contados en la cámara Neubauer

5= N.º de cuadros en la cámara Neubauer

10= Espesor de la cámara Neubauer

1000= Factor de transformación de mm³ en ml.

200= Factor de dilución.

5.5 Preparación y dilución de ciclodextrina cargada de colesterol

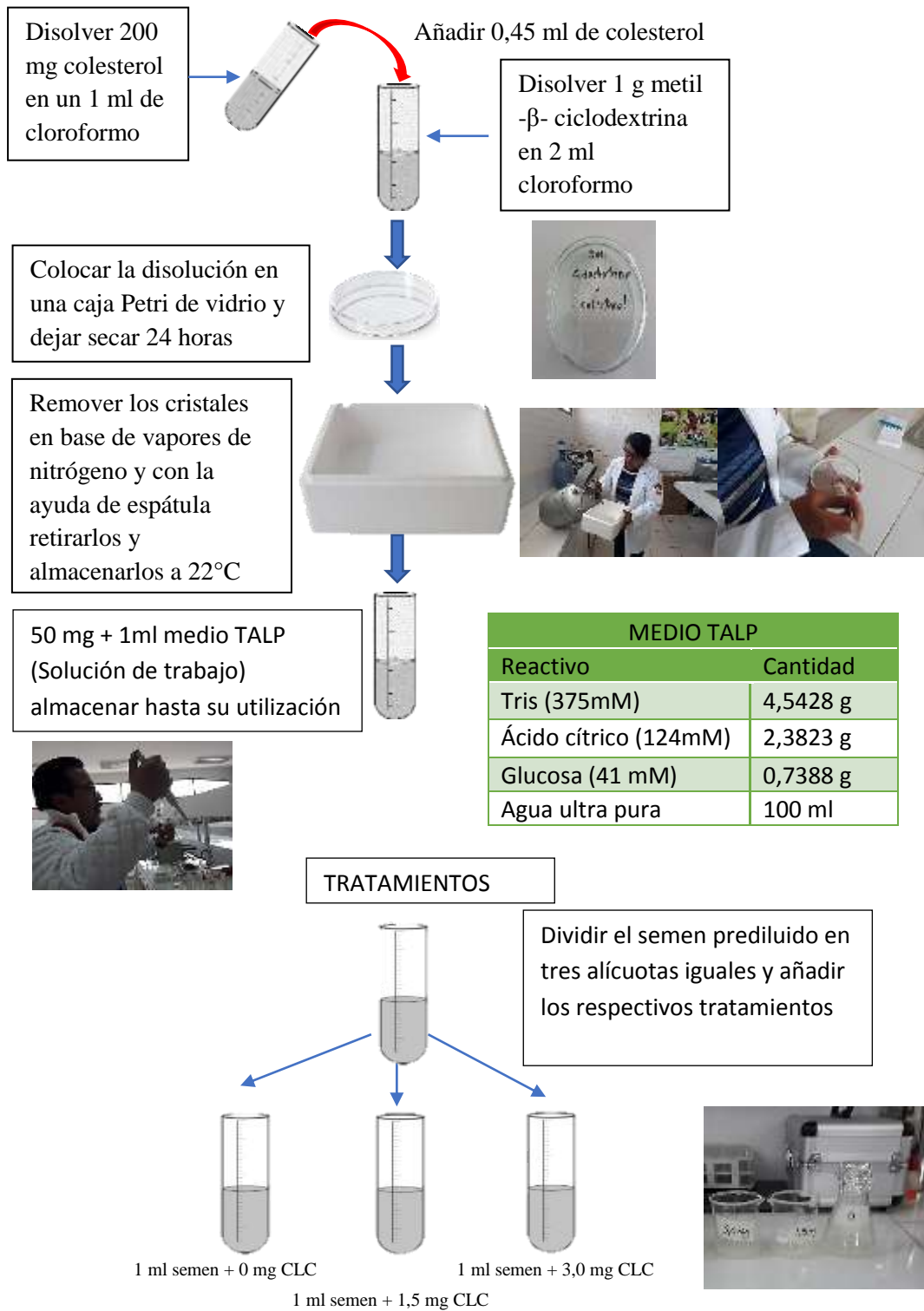


Figura 9-5. Diagrama de flujo para la preparación y dilución de CLC
 Realizado por: Patarón, Silvia. 2021

5.6 Dilución del semen

Los crio protectores o diluyentes son necesarios para la protección de los espermatozoides durante la etapa de refrigeración, congelación y descongelamiento; el diluyente escogido para adicionar el complejo de ciclodextrina cargada de colesterol es aquel que se encuentra libre de yema de huevo evitando la contaminación microbiológica.

Una vez obtenida la muestra seminal, se debe realizar un proceso de adaptación el cual consiste en una primera dilución en una proporción 1:1 por un lapso de diez minutos permitiendo una mejor adaptación del semen al diluyente; pasado ese tiempo se divide el semen en tres alícuotas iguales y se agrega la solución de trabajo el cual debe mantener una temperatura de 37°C dejando las muestras en baño maría por un tiempo de 15 min para finalmente realizar la dilución final cuya relación fue de 1:4 donde se agrega 4 partes de agua bidestilada previamente atemperadas a 32°C para conservar las propiedades del dilutor con una parte del eyaculado, dejándolo 10 min para que la temperatura se estabilice en 20-23°C y proceder a empajillar.

5.6.1 Cálculo para determinar el número de dosis

$$\text{Spz viables} = \text{Volumen} * \text{Concentración} * \% \text{Normalidad} * \% \text{Motilidad}$$

Donde:

Volumen: Cantidad (ml) de semen que quedan después de realizado las pruebas de evaluación.

Concentración/ml: Número de espermatozoides por ml

% Motilidad: se debe transformar el % en valor absoluto es decir si encontramos un 90% de motilidad el valor a ir en la formula será 0.90.

% Normalidad: se obtiene restando el porcentaje de anomalías encontradas del cien por ciento.

$$\text{No dosis} = \frac{\text{Espermatozoides viables}}{\text{Número de espermatozoides/dosis}}$$

Donde:

Espermatozoides viables: número de espermatozoides con capacidad fecundante

Número de espermatozoides por dosis: requerimiento spz/ml mismo que es igual a 120×10^6 de células espermáticas por dosis.

5.7 Congelación de semen

5.7.1 Empajillado

El llenado de las pajuelas se lo puede realizar de forma automática a través de máquinas, o de forma manual mediante un puente de aspiración; la utilización de cualquiera de los dos métodos estará determinada por el volumen de semen a ser procesado. Para el empajillado manual se utiliza una jeringa de insulina o a su vez se lo realiza de manera directa a través de la aspiración por medio la absorción con la boca.

Fotografía 6-5: Llenado de pajuelas



Realizado por: Patarón, Silvia. 2021

5.7.2 Sellado

El sellado se lo realiza de manera automática con máquinas de tipo bifuncional cuyas características es llenar la pajuela y sellarlas al mismo tiempo; sin embargo, este proceso se lo puede realizar con una selladora de tipo manual; o a su vez, se puede untar Alcohol Polivinílico en el extremo abierto de la pajilla para luego colocarla en agua fría solidificando el alcohol y sellándola.

Fotografía 7-5: Sellado de pajuelas



Realizado por: Patarón, Silvia. 2021

5.7.3 Proceso de crioconservación

La mayoría de los centros de procesamiento de semen utilizan el método manual dado que no necesita de equipos especializados, tal es el caso del congelador automático que permite tasas de enfriamiento más estables entre alícuotas de un mismo eyaculado; a pesar de ello la congelación de tipo convencional puede dar lugar a tasas de vida satisfactorias.

Una vez que las pajuelas son selladas estas son llevadas al refrigerador manteniéndolas por un lapso de 3 horas a una temperatura constante de 4°C mismas que deben permanecer sobre una gradilla o soporte, dando inicio a la fase de refrigeración

Fotografía 8-5: Proceso de crioconservación



Realizado por: Patarón, Silvia. 2021

Terminada la fase de refrigeración las pajuelas son ingresadas al interior de una caja de poliestireno sobre una gradilla con una altura de 3-5 cm del nivel de nitrógenos expuestas únicamente a los vapores durante 20 minutos, pasado este tiempo se sumergen las pajillas en nitrógeno líquido, se procede a realizar su almacenamiento en los globet y bastones finalizando así el proceso de crio congelación.

CONCLUSIONES

Mediante la evaluación de características macro y microscópicas se determinó que el semen fresco presenta una alta capacidad inicial de refrigeración y crioconservación debido a que los valores son aceptables tanto para el volumen, morfología normal, concentración espermática, motilidad individual y masal.

A través de la evaluación seminal post descongelación se pudo determinar, que la adición de ciclodextrina carga de colesterol previa congelación mejora significativamente el porcentaje de motilidad con el 63,50% a su vez, se evidenció un incremento en el porcentaje de vitalidad con el 75,36%, de la misma manera se pudo observar menor daño en la membrana con agregados de ciclodextrina con el 60,08%

Mediante el análisis de regresión se pudo determinar que el mejor nivel de utilización de ciclodextrina cargada con colesterol previo proceso de congelación fue para aquellas pajuelas del T1 a las cuales se les añadió el 1,5mg CLC ya que presentaron mejores características seminales al momento de la descongelación.

RECOMENDACIONES

En función a los resultados alcanzados en la presente investigación se recomienda:

Añadir 1,5 mg de ciclodextrina previamente saturada con colesterol al semen fresco de bovino reduciendo los daños causados en la membrana durante el proceso de refrigeración, congelación y descongelación mejorando con ello la efectividad en los protocolos de crio preservación utilizados actualmente.

Realizar estudios donde se valore la efectividad de pajuelas con 1,5 mg de ciclodextrina cargada de colesterol en programas de sincronización e inseminación artificial evaluando así la fertilidad y la prolificidad.

Dado que la ciclodextrina actúa como vehículo en el transporte de colesterol sustituyendo los fosfolípidos perdidos en el proceso de congelación es preciso continuar con estudios sobre la efectividad de estos agregados en la actividad bioquímica de la membrana durante la crioconservación de semen.

GLOSARIO

Alcohol Polivinílico: polímero sintético soluble en agua y al mismo tiempo termoplástico, sustancia que se sintetiza debido a la reacción de intercambio de alcoholisis e hidrólisis alcalina

Acrosoma: vesícula secretora localizada en la cabeza del espermatozoide.

Anfipática: dicho de una molécula o de una sustancia: Que tiene propiedades tanto hidrófilas como hidrófobas.

Catalizador: sustancia que acelera o retarda una reacción química sin participar en ella.

Caveolas: son invaginaciones de la membrana plasmática conformada por proteínas denominadas caveolinas

Caveolina: proteína de la membrana plasmática que cumple un rol fundamental en la formación de la caveola y actúa como una proteína conectora organizando complejos macromoleculares en la superficie celular implicados en la señalización intracelular.

Ciclodextrina: son una familia de compuestos formados de moléculas de azúcar unidas en un anillo. Las ciclodextrinas se producen a partir de almidón mediante conversión enzimática. Se utilizan en la industria alimentaria, farmacéutica, la entrega de fármacos y las industrias químicas, así como en la agricultura y la ingeniería ambiental.

Colesterol: sustancia grasa que se encuentra en las membranas de muchas células animales y en el plasma sanguíneo

Corticoesteroides: hormonas esteroídicas producidas por la corteza de las glándulas adrenales, que pueden sintetizarse artificialmente y tienen aplicaciones terapéuticas, principalmente como antiinflamatorios

Crioconservación: proceso para enfriar y almacenar células, tejidos u órganos a temperaturas muy bajas o congelarlos para guardarlos para su uso en el futuro. También se llama crio banco.

Crioprotector: soluciones que protegen del frío actuando sinérgicamente en la deshidratación de la célula.

Diluyente: sustancia líquida que se añade a una disolución para disminuir su concentración y hacerla más fluida.

Dilución: hacer un líquido menos espeso, más débil, menos concentrado o menos puro mediante el agregado de algo.

Dimetilformamida: disolvente utilizado en varias aplicaciones en la industria química.

Enzima: proteína soluble producida por las células del organismo, que favorece y regula las reacciones químicas en los seres vivos.

Esfingolípidos: Cualquier lípido que esté constituido por esfingosina, un ácido graso de cadena larga, y un éster de ácido fosfórico y una base nitrogenada, o un oligosacárido o un monosacárido.

Espermatogénesis: proceso de formación de las células sexuales masculinas, desde la espermatogonia hasta los espermatozoides.

Espermatozoide: célula reproductora masculina de los animales, destinada a la fecundación del óvulo; mide de diez a sesenta micras de longitud y está compuesta de una cabeza que contiene el material cromosómico y de una cola o flagelo que actúa como propulsor.

Eyacuación: Sscreción seminal y prostática expulsada durante el orgasmo masculino, a través de la uretra que se produce habitualmente con el orgasmo masculino durante el coito o la masturbación.

Fertilización: proceso complejo por el que el espermatozoide penetra en el óvulo u ovocito maduro, permitiendo que la carga genética materna y paterna se unan para formar el embrión.

Fosfolípidos: son un tipo de lípidos o grasas polares compuestos por un glicerol, al que se le unen dos ácidos grasos (1,2-diacilglicerol) y un grupo fosfato. El fosfato se une mediante un enlace fosfodiéster a otro grupo de átomos, que frecuentemente contienen nitrógeno.

Glúcido: sustancia orgánica sólida, blanca y soluble en agua, que constituye las reservas energéticas de las células animales y vegetales; está compuesta por un número determinado de átomos de carbono, un número determinado de átomos de oxígeno y el doble de átomos de hidrógeno.

Glucocálix: capa externa que recubre la membrana plasmática de muchas células vivas, formada por glucoproteínas.

Glucolípido: es un lípido que se encuentra unido a un hidrato de carbono. Coloquialmente suele decirse que se trata de una grasa asociada a un azúcar.

Hidrófila: dicho de una materia o una sustancia que adsorbe el agua con gran facilidad

Hidrófoba: dicho de una materia o una sustancia que no adsorbe el agua.

Hemocitómetro: llamado también cámara de Neubauer es un instrumento utilizado en medicina y biología para realizar el recuento de esporas y células en un medio líquido, que puede ser; un cultivo celular, sangre, orina, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, semen, etc

Inseminación Artificial: consiste en el depósito de espermatozoides en la mujer mediante instrumental especializado y utilizando técnicas que reemplazan a la copulación con el fin de lograr la gestación.

Lípido: grasa, sustancia orgánica insoluble en agua que se encuentra en el tejido adiposo y en otras partes del cuerpo de los animales, así como en los vegetales, especialmente en las semillas de ciertas plantas; está constituida por una mezcla de ácidos grasos y ésteres de glicerina y sirve como reserva de energía.

Morfología normal: medida que determina las características morfométricas de la cabeza, la pieza media y la cola del espermatozoide.

Motilidad individual: movimiento del esperma, el análisis evalúa si los espermatozoides están nadando correctamente y en línea recta

Nitrógeno Líquido: sustancia en estado líquido que se encuentra a una temperatura de 196 grados bajo cero y que permite mantener mejor y por más tiempo, espermatozoides y embriones previamente tratados para ello.

Oligozoospermia: situación en la que el número de espermatozoides eyaculados está por debajo del valor normal.

Ostium prepucial: pliegue cutáneo, elástico y retráctil, que cubre y protege el glande y el meato urinario cuando el pene no está erecto.

Parámetros macroscópicos: en un seminograma se analizan dos tipos de parámetros. – Macroscópicos y microscópicos. Los primeros son aquellos que pueden valorarse a simple vista, como la viscosidad, el volumen, el pH y el olor.

pH: potencial de hidrógeno es una medida del grado de acidez o alcalinidad de una sustancia o una solución. El pH se mide en una escala de 0 a 14.

Proteína: sustancia química que forma parte de la estructura de las membranas celulares y es el constituyente esencial de las células vivas; sus funciones biológicas principales son la de actuar como biocatalizador del metabolismo y la de actuar como anticuerpo.

Reacción del acrosoma: consiste en la fusión de la membrana plasmática del espermatozoide con la membrana acrosómica externa

Refrigeración: procedimiento técnico que hace que baje la temperatura de un lugar o un mecanismo.

Reproducción Asistida: procedimientos de manipulación controlada de gametos (óvulos y espermatozoides) y/o embriones en laboratorios altamente especializados, necesarios para llevar a cabo la inseminación intrauterina y la fertilización in vitro.

Semen: líquido compuesto por las células que provienen de los testículos (espermatozoides, espermátides, etc) contenidas en un líquido llamado plasma seminal que está segregado fundamentalmente por la próstata y las vesículas seminales.

Transducción: proceso por el que la célula responde a sustancias del exterior de la célula mediante moléculas de señalización que están en la superficie de la célula o dentro de ella.

Vagina artificial: dispositivo para recolectar semen cuya base es un tubo rígido con una manga de goma que se llena con agua tibia (40°) a fin de simular la temperatura corporal del animal.

Vitalidad espermática: test que nos indica el número de espermatozoides vivos presentes en una muestra de eyaculado.

BIBLIOGRAFIA

- Aguilar, G. (2016). *Determinación de la fertilidad potencial de toros reproductores bos taurus en la Hacienda El Rosario mediante la evaluación de parámetros reproductivos* (Universidad de las Américas). Retrieved from <http://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/5386>
- Amann, R. P., & Pickett, B. W. (1999). Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, 7(3), 145–173. [https://doi.org/10.1016/S0737-0806\(87\)80025-4](https://doi.org/10.1016/S0737-0806(87)80025-4)
- Arenas, E., Cambrón, A., Ambriz, D., Zúñiga, P., Rodríguez, A., & Rosado, A. (2010). *Bases fisiológicas de la capacitación y de la reacción acrosomal del espermatozoide*. 5–11. Retrieved from https://scholar.google.es/scholar?hl=es&as_sdt=0%2C5&q=Bases+fisiol%27ogicas+de+la+capacitaci%27on+y+de+la+reacci%27on+acrosomal+del+espermatozoide&btnG=
- Argueso, A., Díaz, P., & Rodríguez, A. (2011). Lípidos, colesterol y lipoproteínas. *Galicia Clínica / Sociedade Galega de Medicina Interna*, 72, 7,17. Retrieved from <http://www.fao.org/3/a-i1953s.pdf>
- Arrazola, A. (1994). Biología De La Membrana Celular. *Nefrología*, 14(4), 418–426. Retrieved from <https://www.revistanefrologia.com/es-biologia-membrana-celular--articulo-X021169959400663X>
- Ávila-Portillo, L. M., Madero, J. I., López, C., León, M. F., Acosta, L., Delgado, L. G., ... Reguero, M. (2006). Fundamentos de la criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 57(4), 291–300. Retrieved from <https://www.google.com/search?client=firefox-b-d&q=FUNDAMENTOS+DE+CRIOPRESERVACIÓN+Basis+points+in+cryopreservation&spell=1&sa=X&ved=0ahUKEwj-pofr1ePkAhUmh-AKHdMpAHIQBQgrKAA&biw=1366&bih=654>
- Bedoya, N., Araque, N., Rivera, M., Londoño, G., & Trujillo, L. (2003). Evaluación de la integridad de la membrana plasmática de espermatozoides mediante test Hipoosmótico (HOST). *Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 56, 1983–1997. Retrieved from <https://docplayer.es/85710666-Evaluacion-de-la-integridad-funcional-de-la-membrana-plasmatica-de-espermatozoides-bovinos-mediante-el-test-hipoosmotico-host-resumen.html>
- Blanch, E. (2007). *Modificación de la membrana de los espermatozoides de verraco para mejorar su supervivencia a la crioconservación* (Universidad Politécnica de Valencia). Retrieved from https://scholar.google.es/scholar?hl=es&as_sdt=0%2C5&q=MODIFICACIÓN+DE+LA+

MEMBRANA+DE+LOS+ESPERMATOZOIDES+DE+VERRACO+PARA+MEJORAR
+SU+SUPERVIVENCIA+A+LA+CRIOCONSERVACIÓN&btnG=

- Castillo, L. A. (2017). *Adición de metil ciclodextrina cargada de colesterol en la criopreservación de semen de carnero* (Universidad Nacional Agraria La Molina). Retrieved from <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/UNALM/3165>
- Castro, J., & Chacon, L. (2016). Aspectos Generales Del Proceso De Conservación De Semen Equino : Una Revisión. *Conexión Agropecuaria*, 6(1), 43–64. Retrieved from https://scholar.google.es/scholar?hl=es&as_sdt=1%2C5&as_vis=1&q=ASPECTOS+GENERALES+DEL+PROCESO+DE+CONSERVACIÓN+DE+SEMEN+EQUINO%3A+UN+A+REVISIÓN+DESDE+LA+CONGELACIÓN+ESPERMÁTICA&btnG=
- Ciprian, R. (2018). *Criopreservación del semen de alpaca utilizando metil ciclodextrina cargada con colesterol* (La Molina). Retrieved from https://scholar.google.es/scholar?hl=es&as_sdt=0%2C5&q=CRIOPRESERVACIÓN+DEL+SEMEN+DE+ALPACA+UTILIZANDO+METIL-β-CICLODEXTRINA+CARGADA+CON+COLESTEROL&btnG=
- Cohen, A. W., Hnasko, R., Schubert, W., & Lisanti, M. P. (2004). Role of caveolae and caveolins in health and disease. *Physiological Reviews*, 84(4), 1341–1379. <https://doi.org/10.1152/physrev.00046.2003>
- Crespo, E. (2014). *Valoración de los descriptores de motilidad espermática mediante análisis computarizado en semen criopreservado de toros Criollo Limonero*. Universidad del Zulia.
- Crini, G. (2014). Review: A history of cyclodextrins. *Chemical Reviews*, 114(21), 10940–10975. <https://doi.org/10.1021/cr500081p>
- Darin-Bennett, A., & White, I. G. (1977). Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology*, 14(4), 466–470. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(77\)90008-6](https://doi.org/10.1016/0011-2240(77)90008-6)
- De Alba, C. (2014). Jornada ANEMBE Problemas reproductivos de las vacas nodrizas. *Valoración de La Calidad Del Semen Bovino*, 40–44. Retrieved from <http://anembeformacion.es/libro ponencias jornadas vacas nodrizas 2014.pdf>
- Del Río, M. J., Godoy, A., Toro, A., Orellana, R., Cortés, M. E., Moreno, R. D., & Vigil, P. (2007). La reacción acrosómica del espermatozoide: Avances recientes. *Revista Internacional de Andrología*, 5(4), 368–373. [https://doi.org/10.1016/S1698-031X\(07\)74086-4](https://doi.org/10.1016/S1698-031X(07)74086-4)
- Díaz, N., & López, P. (2018). *Protocolos de criopreservación de semen bovino* (Universidad Tecnológica de Pereira). Retrieved from <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/handle/11059/9496/T636.08245D542.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Espinosa, W. (2012). Efecto de la adición de un surfactante natural (aloe vera) al diluyente triladyl para crioconservación de semen bovino en toros reproductores de Agso-Genes Quito-Pichincha (Universidad Técnica de Cotopaxi; Vol. 15).
<https://doi.org/10.22401/jnus.15.2.31>
- Fernández, A., Gonzalvo, M., Clavero, A., Ruíz, R., Zamora, S., Roldán, M., ... José, C. (2009). *Fundamentos de criobiología espermática para bancos de semen*. 14(1), 19–25. Retrieved from <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=23484>
- Ferré, L., Grotter, L., & Cattaneo, L. (2006). Efecto de la suplementación con ciclodextrinas cargadas con colesterol al semen sexado bovino post-descongelación para su uso en producción invitro de embriones. *Archivos De Zootecnia*, 55(259), 127–138. Retrieved from <https://www.uco.es/ucopress/az/index.php/az/%0AEfecto>
- González, L., Fischman, M., Bouquet, M., Acerbo, M., Miguez, M., Ferrari, M., & Cisale;H. (2013). *Boar semen : complementary techniques for its evaluation Técnicas*. 15(1), 37–46. Retrieved from <http://www.scielo.org.ar/pdf/invet/v15n1/v15n1a04.pdf>
- Hammerstedt, R., Graham, J., & Nolan, J. (1990). Cryopreservation of Mammalian Sperm: What We Ask Them to Survive. *American Society of Andrology*, 11(1), 73–86. Retrieved from https://scholar.google.es/scholar?hl=es&as_sdt=0%2C5&q=Hammerstedt+RH%2C+Graham+JK%2C+Nolan+JP.+Cryopreservation+of+mammalian++sperm%3A+what+we+ask+them+to+survive.+J+Androl%2C+1990%3B11%3A73-86.&btnG=
- Lemma, A., & Shemsu, T. (2015). Effect of Age and Breed on Semen Quality and Breeding Soundness Evaluation of Pre-Service Young Bulls. *Reproduction and Infertility*, 6(2), 35–40. <https://doi.org/10.5829/idosi.jri.2015.6.2.94131>
- López, N., & Rivera, D. (2015). *Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática en espermatozoides de toro* (Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano). Retrieved from <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/4596/1/CPA-2015-049.pdf>
- Mackinnon, M. (2016). *Estudio de las variaciones estacionales de la calidad espermática en toros de un centro comercial de procesamiento de semen* (Universidad de la República). Retrieved from <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/19698>
- Martínez, G., & Gómez, M. A. (2007). *CICLODEXTRINAS : COMPLEJOS DE INCLUSIÓN CON POLÍMEROS*. 8(4), 300–312. Retrieved from https://scholar.google.es/scholar?as_vis=1&q=CICLODEXTRINAS:+COMPLEJOS+DE+INCLUSIÓN+CON+POLÍMEROS+Gerardo+Martínez*,+Marián+A.+Gómez+Instituto&hl=es&as_sdt=1,5
- Megías, M., Molist, P., & Pombal, M. (2014). Membrana celular.
<https://doi.org/10.24927/rce2014.035>

- Mejía, J. (2017). *Evaluación pre y post congelación del semen obtenido con vagina artificial y electroeyaculador en el ganado criollo* (Universidad de Cuenca). Retrieved from [https://www.google.com/search?ei=WTUPYPqkFIWZwbkPuKSIgAs&q="Evaluación+pre+y+post+congelación+del+semen+obtenido+con+vagina+artificial+y+electroeyaculador+en+el+ganado+criollo"+Tesis+de+grado+previo+a+la+obtención+del+título+de+Magister+en+Reproducción+Animal.+AUTOR%3A+MVZ.+Javier+Esteban+Mejía+Gutiérrez.+DIRECTOR%3A&oq="Evaluación+pre+y+post+congelación+del+semen+obtenido+con+vagina+artificial+y+electroeyaculador+en+el+ganado+criollo"+Tesis+de+grado+previo+a+la+obtención+del+título+de+Magister+en+Reproducción+Animal.+AUTOR%3A+MVZ.+Javier+Esteban+Mejía+Gutiérrez.+DIRECTOR%3A&gs_lcp=CgZwc3ktYWIQA1DZ6BBY2egQYPDqEGgAcAB4AIABAIgBAJIBAJgBA6ABAqABAaoBB2d3cy13aXrAAQE&scient=psy-ab&ved=0ahUKEwi6tan-LjuAhWFTDABHTgSArAQ4dUDCAw&uact=5](https://www.google.com/search?ei=WTUPYPqkFIWZwbkPuKSIgAs&q=)
- Mesa, A. ., & Henao, G. (2012). Efecto del colesterol y la dimetilformamida sobre parámetros posdescongelación en espermatozoides de caballos criollos colombianos. *Revista MVZ Cordoba*, 17(1), 2908–2915. Retrieved from <https://www.uco.es/ucopress/az/index.php/az/%0AEfecto>
- Meza, U., Romero, A., Licón, Y., & Sánchez, S. (2010). *LA MEMBRANA PLASMÁTICA: MODELOS, BALSAS Y SEÑALIZACION*. 29(4), 125–134. Retrieved from <https://www.google.com/search?client=firefox-b-d&q=LA+MEMBRANA+PLASMÁTICA%3A+MODELOS%2C+BALSAS+Y+SEÑALIZACION>
- Minitub. (2014). Tecnología de Reproducción Animal Bovino. Retrieved from Minitub website: https://www.google.com/search?biw=1366&bih=608&ei=wnaIXcHjLOqmgge-kKqQBg&q=MINITUB&oq=MINITUB&gs_l=psy-ab.3..0i67j014j0i67j012j0i10j0.141301.141301..141713...0.5..0.211.211.2-1.....0....1..gws-wiz.....0i71.uBylvkF6ZjE&ved=0ahUKEwjBzJOxuObkAhVqk-AKHT6IC
- Mocé, E., & Graham, J. K. (2006). Cholesterol-loaded cyclodextrins added to fresh bull ejaculates improve sperm cryosurvival. *American Society of Animal Science*, 84(4), 826–833. Retrieved from https://scholar.google.com.ec/scholar?hl=es&as_sdt=0%2C5&as_vis=1&q=Cholesterol-loaded+cyclodextrins+added+to+fresh+bull+ejaculates+improve+sperm+cryosurvival1+E.+Moce+and+J.+K.+Graham2+Department&btnG=
- Mocé, Eva, Purdy, P. H., & Graham, J. K. (2010). Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival. *Animal Reproduction Science*, 118(2–4), 236–247. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.06.013>
- Moncayo, S. (2016). *Evaluación de la calidad seminal de reproductores bovinos antes y*

- después del proceso de criopreservación (Politécnica Salesiana). Retrieved from [https://www.google.com/search?ei=6TIPYNGrN-Kc5wKU1LTyDQ&q=EVALUACIÓN+DE+LA+CALIDAD+SEMINAL+DE+REPRODUCTORES+BOVINOS+ANTES+Y+DESPUÉS+DEL+PROCESO+DE+CRIOPRESERVACIÓN+AUTORA%3A+STEPHANIE+ABIGAIL+MONCAYO+PICERNO&oq=EVALUACIÓN+DE+LA+CALIDAD+SEMINAL+DE+REPRODUCTORES+BOVINOS+ANTES+Y+DESPUÉS+DEL+PROCESO+DE+CRIOPRESERVACIÓN+AUTORA%3A+STEPHANIE+ABIGAIL+MONCAYO+PICERNO&gs_lcp=CgZwc3ktYWIQAzICCAAYBAgAEB4yBAgAEB4yBAgAEB4yBAgAEB4yBAgAEB4yBAgAEB4yBAgAEB4yBAgAEB4yBAgAEB4yBAgAEB4yBAgAEB4yBAgAEB4yBAgAEB4yBAgAEB5Qhw1Yhw1g3Q9oAHAAeACAAAbQBiAG0AZIBAZAuMZgBAKABAqABAaoBB2d3cy13aXrAAQE&sclient=psy-ab&ved=0ahUKEwiRxIbV_rfuAhVizlkKHRQqDdsQ4dUDCAw&uact=5](https://www.google.com/search?ei=6TIPYNGrN-Kc5wKU1LTyDQ&q=EVALUACIÓN+DE+LA+CALIDAD+SEMINAL+DE+REPRODUCTORES+BOVINOS+ANTES+Y+DESPUÉS+DEL+PROCESO+DE+CRIOPRESERVACIÓN+AUTORA%3A+STEPHANIE+ABIGAIL+MONCAYO+PICERNO&oq=EVALUACIÓN+DE+LA+CALIDAD+SEMINAL+DE+REPRODUCTORES+BOVINOS+ANTES+Y+DESPUÉS+DEL+PROCESO+DE+CRIOPRESERVACIÓN+AUTORA%3A+STEPHANIE+ABIGAIL+MONCAYO+PICERNO&gs_lcp=CgZwc3ktYWIQAzICCAAYBAgAEB4yBAgAEB4yBAgAEB4yBAgAEB4yBAgAEB4yBAgAEB4yBAgAEB4yBAgAEB4yBAgAEB4yBAgAEB4yBAgAEB4yBAgAEB5Qhw1Yhw1g3Q9oAHAAeACAAAbQBiAG0AZIBAZAuMZgBAKABAqABAaoBB2d3cy13aXrAAQE&sclient=psy-ab&ved=0ahUKEwiRxIbV_rfuAhVizlkKHRQqDdsQ4dUDCAw&uact=5)
- Moore, A. I., Squires, E. L., & Graham, J. K. (2005). Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryobiology*, *51*(3), 241–249. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2005.07.004>
- Olivera, M. (2014). Procedimientos para la evaluación de semen utilizado en la producción de embriones bovinos. In M. Olivera & C. Giraldo (Eds.), *Cultivo de tejidos reproductivos y producción y manipulación de embriones bovinos* (Primera, p. 178). Retrieved from <https://www.researchgate.net/>
- Olivera, M., Ruiz, T., Tarazona, A., & Giraldo, C. (2006). ENSAYO El espermatozoide , desde la eyaculación hasta la fertilización. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, *19*(4), 426–436. Retrieved from https://scholar.google.es/scholar?hl=es&as_sdt=0%2C5&q=El+espermatozoide%2C+desde+la+eyaculación+hasta+la+fertilización&btnG=
- Palacios, A. (2004). *Aspectos fisiológicos acerca del congelamiento de semen*. 25, 207–209. Retrieved from <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=23484>
- Purdy, P., & Graham, J. (2004). Effect of Adding Cholesterol to Bull Sperm Membranes on Sperm Capacitation , the Acrosome Reaction , and Fertility 1. *Biology of Reproduction*, *71*(April), 522–527. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.025577>
- Purdy, P. H., Fox, M. H., & Graham, J. K. (2005). The fluidity of Chinese hamster ovary cell and bull sperm membranes after cholesterol addition. *Cryobiology*, *51*(1), 102–112. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2005.05.004>
- Purdy, P. H., & Graham, J. K. (2003). Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm q. *Cryobiology*, *48*, 36–45. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2003.12.001>
- Quispe, S. (2019). *Evaluación de tres dilutores sobre características espermáticas antes y*

- después de la congelación de semen bovino Holstein* (Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac). Retrieved from <http://repositorio.unamba.edu.pe/handle/UNAMBA/836>
- Reyes, M. (2012). “ *Estudio De Las Balsas Lipídicas En Espermatozoides De Cerdo Criopreservados* ” (Universidad Autónoma Metropolitana). Retrieved from https://scholar.google.es/scholar?hl=es&as_sdt=0%2C5&q=“ESTUDIO+DE+LAS+BALSAS+LIPÍDICAS+EN+ESPERMATOZOIDEOS+DE+CERDO+CRIOPRESERVADOS”&btnG=
- Rodríguez-Martínez, H. (2002). Evaluación de la calidad seminal en el verraco. In *Evaluación de la calidad seminal en el verraco* (p. 16). Retrieved from <https://www.avparagon.com/docs/reproduccion/ponencias/21.pdf>
- Rutter, B., & Russo, A. (2006). *Bases para la evaluación de la aptitud reproductiva* (Segunda; E. Capdevielle, Ed.). Retrieved from <https://docplayer.es/55664957-Bases-para-la-evaluacion-de-la-aptitud-reproductiva-del-toro-bruno-rutter-angel-russo-buenos-aires-2006-prologo-a-la-segunda-edicion.html>
- Saavedra, D. (2018). *Conservación seminal en toros Cebú. Efecto dela retirada del plasma y su posterior incorporación sobre la calidad espermática en los protocolos de criopreservación* (Universidad de Zaragoza). Retrieved from <https://zaguan.unizar.es/record/69214/files/TESIS-2018-020.pdf>
- Salazar, J. (2019). Biología de la capacitación espermática: un proceso in vivo. *Colegio de Microbiología Química Clínica de Costa Rica*, 25(1), 1–11. Retrieved from https://scholar.google.es/scholar?hl=es&as_sdt=0%2C5&q=Biología+de+la+capacitación+espermática%3A+un+proceso+in+vivo+Sperm+capacitation+biology%3A+an+in+vivo+process+Jorge+Alberto+Salazar+Cartín+%281%29+%281%29Sección+de+Inmunología+Molecular%2C+Laborator
- Tartaglione, C. M., & Ritta, M. N. (2004). Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, 62(7), 1245–1252. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.01.012>
- Vallecino, A. (2011). *Departamento de genética* (Universidad de Córdoba). Retrieved from <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=56759>
- Veloz, D. (2017). *Facultad de Ciencias Agropecuarias MAESTRIA EN REPRODUCCIÓN ANIMAL TITULO : "Evaluación de la calidad espermática de reproductores bovinos mediante el uso de sistemas de evaluación seminal convencional y sistema CASA (análisis seminal asistido por computa* (Universidad de Cuenca). Retrieved from <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/28466>
- Villamizar, G. (2014). *Manual de procedimientos para la colecta y criopreservación de semen bovino para la empresa santa clara genética Paraná-Brasil* (Universidad cooperativa de

Colombia). Retrieved from [https://repository.ucc.edu.co/bitstream/20.500.12494/63/1/35-%28499-14%29manual de procedimientos para la colecta y criopreservacion de semen bovino para la empresa santa clara genetica estado parana -brasil..pdf](https://repository.ucc.edu.co/bitstream/20.500.12494/63/1/35-%28499-14%29manual%20de%20procedimientos%20para%20la%20colecta%20y%20criopreservacion%20de%20semen%20bovino%20para%20la%20empresa%20santa%20clara%20genetica%20estado%20parana%20-brasil..pdf)

Viñán, H. (2017). *ADICION DE METIL CICLODEXTRINA CARGADA DE COLESTEROL SOBRE LA CRIOPRESERVACION DE SEMEN DE TOROS HOLSTEIN FRIESIAN* (Universidad Nacional Agraria La Molina). Retrieved from https://scholar.google.es/scholar?hl=es&as_sdt=0%2C5&q=ADICIÓN+DE+METIL-+β-CICLODEXTRINA+CARGADA+DE+COLESTEROL+SOBRE+LA+CRIOPRESERVACIÓN+DE+SEMEN+DE+TOROS+HOLSTEIN+FRIESIAN%22+TESIS&btnG=

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

ANEXOS

ANEXO A. Estadística descriptiva de las características seminales pre congelación.

1. VOLUMEN DEL EYACULADO

Media	8
Error típico	0,9486833
Mediana	8
Moda	10
Desviación estándar	2,12132034
Varianza de la muestra	4,5
	-
Curtosis	0,96296296
Coefficiente de asimetría	-0,5237828
Rango	5
Mínimo	5
Máximo	10
Suma	40
Cuenta	5
Nivel de confianza 95%	2,63

2. MORFOLOGÍA NORMAL

Media	0,87
Error típico	0,03
Mediana	0,9
Moda	0,8
Desviación estándar	0,067082039
Varianza de la muestra	0,0045
	-
Curtosis	2,407407407
Coefficiente de asimetría	- 0,165634665
Rango	0,15

Mínimo	0,8
Máximo	0,95
Suma	4,35
Cuenta	5
Nivel de confianza 95%	0,08

3. MOTILIDAD INDIVIDUAL

Media	0,87
Error típico	0,02
Mediana	0,9
Moda	0,9
Desviación estándar	0,04472136
Varianza de la muestra	0,002
Curtosis	0,3125
Coefficiente de asimetría	- 1,25778824
Rango	0,1
Mínimo	0,8
Máximo	0,9
Suma	4,35
Cuenta	5
Nivel de confianza 95%	0,06

4. CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA

Media	1040400000
Error típico	175849254
Mediana	1000000000
Moda	#N/D
Desviación estándar	393210885
Varianza de la muestra	1,5461E+17
Curtosis	1,77295633
Coefficiente de asimetría	- 0,992805
Rango	1062000000
Mínimo	598000000
Máximo	1660000000

Suma	5202000000
Cuenta	5
Nivel de confianza 95%	0,48

5. MOTILIDAD MASAL

Media	4
Error típico	0
Mediana	4
Moda	4
Desviación estándar	0
Varianza de la muestra	0
Curtosis	----
Coefficiente de asimetría	-----
Rango	0
Mínimo	4
Máximo	4
Suma	24
Cuenta	6
Nivel de confianza 95%	---

6. pH

Media	6,78
Error típico	0,03741657
Mediana	6,8
Moda	6,8
Desviación estándar	0,083666
Varianza de la muestra	0,007
Curtosis	-0,6122449
Coefficiente de asimetría	0,51224083
Rango	0,2
Mínimo	6,7
Máximo	6,9
Suma	33,9
Cuenta	5
Nivel de confianza 95%	0,10

ANEXO B. Análisis de varianza para la evaluación post descongelación previa adición de ciclodextrina cargada con colesterol en medios de congelación.

1. PORCENTAJE DE MOTILIDAD

Fuente de variación	GL	SC	CM	F Cal	Pr > F
Tratamiento	2	399,200	199,600	42,005	<0,000
Error	27	128,300	4,752		
Total	29	527,500			

Duncan	Media	N	Tratamiento
A	63,5000	10	T1
B	57,1000	10	T0
C	54,9000	10	T2

2. PORCENTAJE DE VITALIDAD

Fuente de variación	GL	SC	CM	F Cal	Pr > F
Tratamiento	2	3337,994	1668,997	195,523	<0,000
Error	27	230,474	8,536		
Total	29	3568,468			

Duncan	Media	N	Tratamiento
A	75,3660	10	T1
B	54,1320	10	T0
B	52,0000	10	T2

3. PORCENTAJE DE MORFOANOMALIAS

Fuente de variación	GL	SC	CM	F Cal	Pr > F
Tratamiento	2	0,745	0,372	0,637	0,537
Error	27	15,793	0,585		
Total	29	16,538			

Duncan	Media	N	Tratamiento
A	5,2120	10	T0
B	5,0180	10	T1
C	5,4040	10	T2

4. PORCENTAJE DE INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA

Fuente de variación	GL	SC	CM	F Cal	Pr > F
Tratamiento	2	902,559	451,280	26,939	<0,000
Error	27	452,310	16,752		
Total	29	1354,869			

Duncan	Media	N	Tratamiento
A	60,0800	10	T1
B	55,0650	10	T2
C	46,7780	10	T0

ANEXO C. Análisis de Varianza de la regresión para la integridad de la membrana post descongelación, ante la utilización de diferentes niveles de ciclodextrina cargada con colesterol en medios de congelación.

1. Integridad de la membrana

Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0,50342073
Coeficiente de determinación R ²	0,25343243
R ² ajustado	0,2267693
Error típico	6,01042456
Observaciones	30

Análisis de la varianza

	Grados libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	343,369247	343,369247	9,50497756	0,00456979
Residuos	28	1011,5057	36,1252034		
Total	29	1354,87494			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>
Intercepción	49,8308251	1,73506012	28,7199415	2,5665E-22
Tratamiento	2,76232289	0,89598119	3,08301436	0,00456979

ANEXO D. Análisis de Varianza de la regresión para las variables de motilidad, y vitalidad con respecto a la integridad de la membrana.

1. MOTILIDAD ESPERMÁTICA

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,4697
Coefficiente de determinación R ²	0,2206
R ² ajustado	0,1927
Error típico	3,8320
Observaciones	30

Análisis de la varianza

	Grados libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	116,352449	116,352449	7,92384281	0,00883132
Residuos	28	411,147551	14,6838411		
Total	29	527,5			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>
Intercepción	42,6829585	5,66236474	7,53800938	3,2789E-08
Integridad	0,29304759	0,10410468	2,81493211	0,00883132

2. VITALIDAD**Estadísticas de la regresión**

Coefficiente de correlación múltiple	0,59222727
Coefficiente de determinación R ²	0,35073314
R ² ajustado	0,32754504
Error típico	9,09626147
Observaciones	30

Análisis de la varianza

	Grados libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	1251,51906	1251,51906	15,1255647	0,00056519
Residuos	28	2316,77524	82,7419727		
Total	29	3568,2943			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>
Intercepción	8,62451095	13,4412896	0,64164312	0,52632322
Integridad	0,96110122	0,24712309	3,8891599	0,00056519

ANEXO E. Presupuesto de la investigación

REACTIVO	TO	T1	T2
Colesterol	---	31,1	31,1
Metil-Beta ciclodextrina	---	3,23	6,45
Cloroformo	1,00	1,00	1,00
Metanol	3,00	3,00	3,00
SP- TALP(TL-Sperm/Sperm- Tyrode's- Albumina-Lactato Piruvato	---	23,00	23,00
Agua Bidestilada	6,00	6,00	6,00
Citrato de sodio	2,00	2,00	2,00
Fructosa	4,00	49,00	49,00
Formaldehido al 40%	8,00	8,00	8,00
Eosina	13,00	13,00	13,00
Nigrosina	13,00	13,00	13,00
Tris (375 mM)	---	30,00	30,00
Acido cítrico (124mM)	---	3,00	3,00
Andromed	27,00	27,00	27,00
SUBTOTAL	77,00	212,33	215,55
TOTAL		504,88	