

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN ANIMAL**



**"ADICIÓN DE METIL- β -CICLODEXTRINA CARGADA DE
COLESTEROL EN LA CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN DE
CARNERO"**

Presentada por:

LUIS ANTONIO CASTILLO CEVALLOS

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO
MAGISTER SCIENTIAE EN PRODUCCIÓN ANIMAL**

Lima - Perú

2017

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA
MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN ANIMAL**

**“ADICIÓN DE METIL- β -CICLODEXTRINA CARGADA DE
COLESTEROL EN LA CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN DE
CARNERO”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO
MAGISTER SCIENTIAE**

Presentada por:

LUIS ANTONIO CASTILLO CEVALLOS

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

Mg.Sc. Wilder Trejo Cadillo

PRESIDENTE

Mg.Sc. Enrique Alvarado Malca

PATROCINADOR

Mg.Sc. Segundo Gamarra Carrillo

MIEMBRO

Mg.Sc. Próspero Cabrera Villanueva

MIEMBRO

DEDICATORIA

A mis padres Fernando e Isabel, mis hermanos Mauricio y Lizbeth, demás familiares cercanos y amigos.

Por su apoyo incondicional durante estos años de estudio.

AGRADECIMIENTO

A la ingeniera Amalia del Pilar Gallegos Cárdenas y a todo el personal del Banco Nacional de Semen-UNALM, por brindarme todas las facilidades en la elaboración de esta investigación y apoyar en el desarrollo de la misma.

Al Programa de Investigación y Proyección Social en Ovinos y Camélidos Sudamericanos-UNALM, que a través de la Unidad Experimental de Ovinos “RIGORANCH” permitió el uso de los machos de su plantel para esta investigación.

Al Ing. Mg. Sc. Enrique Alvarado Malca y demás miembros del jurado de esta tesis, por colaborar con todos sus conocimientos para la redacción de la misma.

ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1	Membrana plasmática	3
2.2	Componentes lipídicos de la membrana	5
2.3	Colesterol	7
2.4	Ciclodextrinas	9
2.5	Criopreservación de Semen de carnero	11
2.5.1	Daños que sufren los espermatozoides durante el proceso de congelación ..	12
2.5.2	Selección de rangos y descensos de temperatura adecuados.....	13
2.5.3	Uso de crioprotectores	14
2.5.4	Adición de colesterol a las membranas plasmáticas.....	17
2.6	Análisis Seminal Asistido por computadora (CASA)	22
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
3.1	Lugar y duración de estudio.....	24
3.2	Animales experimentales	24
3.3	Manejo y alimentación de los animales	24
3.4	Instalaciones.....	24
3.5	Metodología	25
A.	Preparación de medios	25
B.	Colección de semen	27
C.	Evaluación del semen	28
D.	Procesamiento de semen	34
3.6	Tratamientos experimentales	39
3.7	Análisis estadístico de datos	39

IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
4.1	Efecto del colesterol sobre la viabilidad del semen refrigerado post equilibrio	41
a.	Motilidad espermática.....	41
b.	Vitalidad espermática	42
c.	Anormalidades espermáticas	42
d.	Prueba de HOST	43
4.2	Efecto del colesterol sobre la viabilidad en la criopreservación del semen.....	44
a.	Motilidad espermática.....	45
b.	Vitalidad espermática	46
c.	Anormalidades espermáticas	47
d.	Prueba de HOST	47
V.	CONCLUSIONES	51
VI.	RECOMENDACIONES	52
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
VIII.	ANEXOS	63
8.1	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DEL SEMEN REFRIGERADO POST ESTABILIZACIÓN	63
8.2	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DEL SEMEN DESCONGELADO.....	67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Composición de la membrana plasmática de espermatozoides en diferentes especies.....	6
Tabla 2: Porcentajes de motilidad total, motilidad progresiva y membranas plasmáticas intactas (PMI) cuando los eyaculados de carnero frescos se trataron con 2 mg de metil - β -ciclodextrina o 2 - hidroxipropil - β - ciclodextrina / 120×10^6 espermatozoides, cada uno precargado con colesterol (CLC) y luego crioconservado.	19
Tabla 3: Número de espermatozoides vinculados a la zona pelúcida de bovinos (N = 14) y ovinos (N = 9).....	19
Tabla 4: Concentración de ciclodextrinas cargadas con colesterol (CLC) utilizada en diferentes especies.	20
Tabla 5: Efecto del tratamiento de semen con ciclodextrinas cargadas con colesterol (CLC) sobre la capacidad fertilizante de semen in vivo.....	21
Tabla 6: Reactivos utilizados en la preparación del medio TRIS.....	25
Tabla 7: Composición de la solución hiposmótica (100 mOsm/L).	32
Tabla 8: Composición química del medio de lavado.	32
Tabla 9: Características del semen refrigerado post equilibrado tratado con metil- β -ciclodextrinas saturadas de colesterol.....	41
Tabla 10: Efecto de la adición de metil- β -ciclodextrina saturada de colesterol sobre las características microscópicas post descongelación.	44
Tabla 11: Análisis de varianza para la característica de motilidad total en semen refrigerado.	63
Tabla 12: Prueba de comparación múltiple de medias Tukey para la característica de motilidad total en semen refrigerado.	63

Tabla 13: Análisis de varianza para la característica de motilidad progresiva en semen refrigerado.	63
Tabla 14: Prueba de comparación múltiple de medias Tukey para la característica de motilidad progresiva en semen refrigerado.	64
Tabla 15: Análisis de varianza para la característica de inmóviles en semen refrigerado. .	64
Tabla 16: Prueba de comparación múltiple de medias Tukey para la característica de inmóviles en semen refrigerado.....	64
Tabla 17: Análisis de varianza para la característica de vitalidad en semen refrigerado. ...	65
Tabla 18: Prueba de comparación múltiple de medias Tukey para la característica de vitalidad en semen refrigerado.	65
Tabla 19: Análisis de varianza para la característica de anormalidades en semen refrigerado.	65
Tabla 20: Prueba de comparación múltiple de medias Tukey para la característica de anormalidades en semen refrigerado.	66
Tabla 21: Análisis de varianza para la característica de HOST en semen refrigerado.....	66
Tabla 22: Prueba de comparación múltiple de medias Tukey para la característica de HOST en semen refrigerado.	66
Tabla 23: Análisis de varianza para la característica de motilidad total en semen descongelado.	67
Tabla 24: Prueba de comparación múltiple de medias Tukey para la característica de motilidad total en semen descongelado.	67
Tabla 25: Análisis de varianza para la característica de motilidad progresiva en semen descongelado en semen descongelado.....	67
Tabla 26: Prueba de comparación múltiple de medias Tukey para la característica de motilidad progresiva en semen descongelado.	68

Tabla 27: Análisis de varianza para la característica de inmóviles en semen descongelado.	68
Tabla 28: Prueba de comparación múltiple de medias Tukey para la característica de inmóviles en semen descongelado.....	68
Tabla 29: Análisis de varianza para la característica de vitalidad en semen descongelado..	69
Tabla 30: Prueba de comparación múltiple de medias Tukey para la característica de vitalidad en semen descongelado.	69
Tabla 31: Análisis de varianza para la característica de anomalías en semen descongelado.	69
Tabla 32: Prueba de comparación múltiple de medias Tukey para la característica de anomalías en semen descongelado.	70
Tabla 33: Análisis de varianza para la característica de HOST en semen descongelado....	70
Tabla 34: Prueba de comparación múltiple de medias Tukey para la característica de HOST en semen descongelado.....	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de la organización de una membrana plasmática según la visión actual del modelo de mosaico fluido de Singer y Nicolson (1972).	3
Figura 2: Estructura química del colesterol.....	7
Figura 3: Representación esquemática de β -cyclodextrina.	10
Figura 4: Estructura química de α -, β -, γ CDs, conteniendo 6, 7 and 8 unidades de glucopiranosido respectivamente.	11
Figura 5: Esquema de la preparación de la solución de trabajo de CLC.....	26
Figura 6: Colección de las muestras de semen de carnero.	27
Figura 7: Evaluación de concentración y motilidad de las muestras seminales de carnero.	30
Figura 8: Evaluación de vitalidad de semen de carnero.	31
Figura 9: Evaluación de integridad de membrana en semen de carnero (HOST).	34
Figura 10: Esquema de adición de CLC en semen de carnero.	35
Figura 11: Dilución final y empajillado de semen de carnero.....	37
Figura 12: Proceso de descenso de temperatura y estabilización de semen de carnero.	37
Figura 13: Congelación y almacenamiento de pajillas de semen carnero.	38

ÍNDICE DE APÉNDICES

Apéndice 1: Composición de la tinción Eosina al 2%.....	71
Apéndice 2: Composición de la tinción Nigrosina al 2%	71
Apéndice 3: Valores normales de los parámetros espermáticos para carneros según los criterios del Laboratorio de Procesamiento de Semen del Banco Nacional de Semen de la UNALM.	71

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el Banco Nacional de Semen de la Universidad Nacional Agraria La Molina- Lima, con el objetivo de evaluar el efecto de la adición de metil- β - ciclodextrina cargada de colesterol (CLC) sobre las características microscópicas del semen descongelado de carnero, empleándose 4 carneros (raza Asblack) de entre 1 y 2 años de edad. Treinta eyaculados fueron colectados por el método de vagina artificial y trasladados inmediatamente al laboratorio para evaluar sus características tanto macroscópicas como microscópicas. Luego de una predilución 1:1, el semen fue dividido en 03 grupos y las CLC (Cholesterol-Loaded Cyclodextrin) fueron agregadas (0mg de CLC/120 millones de espermatozoides=T1, 1 mg de CLC/120 millones de espermatozoides=T2 y 2 mg de CLC/120 millones de espermatozoides=T3). Las muestras fueron incubadas por 15 minutos a temperatura de laboratorio (22°C), la dilución fue concluida y finalmente se realizó el descenso de temperatura hasta 5°C en 2 horas más un tiempo de 18 horas de estabilización. El congelamiento del semen se hizo en pajillas de 0,5 ml (30×10^6 espermatozoides) usando vapores de nitrógeno por 6 minutos (-120°C) para luego ser sumergidas en nitrógeno líquido (-196°C) y almacenadas en tanques criogénicos. El descongelamiento de las pajillas fue realizado a 38°C por 15 segundos y la motilidad, vitalidad, anormalidades y funcionalidad de membrana espermática fueron evaluadas. Los resultados post-descongelación demuestran mejoras con el uso de colesterol en la criopreservación de semen de carnero, obteniéndose una motilidad de 65.34 por ciento, 68.68 por ciento, 75.27 por ciento, una viabilidad de 56.58 por ciento, 60.70 por ciento, 66.23 por ciento, anormalidades del 9.60 por ciento, 10.13 por ciento, 11.23 por ciento y una integridad de membrana del 50.54 por ciento, 56.4 por ciento y 63.71 por ciento para T1, T2 y T3 respectivamente; habiendo diferencia estadística ($p < 0.05$) entre los tratamientos en todas las variables, excepto en morfología. Por lo tanto se concluye que la incorporación de colesterol a las membranas espermáticas mediante el uso de ciclodextrinas cargadas de colesterol es una forma eficiente de incrementar la calidad de los parámetros espermáticos del semen en la criopreservación.

Palabras clave: Criopreservación, semen, ciclodextrina, colesterol, carnero.

ABSTRACT

The present research work was carried out in the National Semen Bank of the National Agrarian University La Molina-Lima, with the objective of evaluating the effect of the addition of cholesterol-loaded methyl- β -cyclodextrin (CLC) on the characteristics microscopies of thawed ram semen, using 4 rams (Asblack breed) between 1 and 2 years of age. Thirty ejaculates were collected by the artificial vagina method and immediately transferred to the laboratory to evaluate their macroscopic and microscopic characteristics. After a 1:1 predilution, the semen was divided into 03 groups and the CLC (Cholesterol-Loaded Cyclodextrin) were added (0mg of CLC / 120 million sperm = T1, 1 mg of CLC / 120 million sperm = T2 and 2 mg of CLC / 120 million sperm = T3). The samples were incubated for 15 minutes at laboratory temperature (22°C), the dilution was concluded and finally the temperature decrease was made up to 5 ° C in 2 hours plus a time of 18 hours of stabilization. The freezing of the semen was done in 0.5 ml straws (30×10^6 spermatozoa) using nitrogen vapors for 6 minutes (-120°C) to be submerged in liquid nitrogen (-196°C) and stored in cryogenic tanks. The defrosting of the straws was performed at 38°C for 15 seconds and the motility, vitality, abnormalities and functionality of the spermatic membrane were evaluated. The post-thawing results show improvements with the use of cholesterol in the cryopreservation of ram semen, obtaining a motility of 65.34 percent, 68.68 percent, 75.27 percent, a viability of 56.58 percent, 60.70 percent, 66.23 percent, abnormalities of 9.60 percent, 10.13 percent, 11.23 percent and membrane integrity of 50.54 percent, 56.4 percent and 63.71 percent for T1, T2 and T3 respectively; there being a statistical difference ($p < 0.05$) between the treatments in all the variables, except in morphology. Therefore, it is concluded that the incorporation of cholesterol to the sperm membranes through the use of cholesterol-loaded cyclodextrins is an efficient way to increase the quality of semen sperm parameters in cryopreservation.

Key words: Cryopreservation, semen, cyclodextrin, cholesterol, ram.

I. INTRODUCCIÓN

La crianza de ganado ovino en el Perú tiene trascendental importancia, tanto económica como social, generando ingresos económicos para la subsistencia de miles de familias campesinas.

El 81 por ciento de la población ovina en el país es ganado criollo y el 90 por ciento de ellos se encuentra en la sierra, mayoritariamente a cargo de las comunidades campesinas, que no cuentan con programas de mejora genética para lograr un cambio de sus vientres por reproductores probados, lo cual se puede lograr a un menor costo utilizando la técnica de inseminación artificial con semen congelado. Sin embargo, la calidad post descongelamiento en semen de ovinos es baja, observadas en las tasas de preñez (menor de 40 por ciento), consiguiéndose actualmente una aceptable fertilidad, solamente con el uso de inseminación intrauterina laparoscópica; por lo tanto es necesario buscar crioprotectores más eficientes, de tal manera que reduzcan el shock frío que sufren los espermatozoides durante el congelamiento.

Cuando los espermatozoides son criopreservados van a sufrir daños tanto bioquímicos (ralentización metabólica) como estructurales (cambios en la estructura de las bicapas lipídicas de las membranas tanto plasmáticas como de los orgánulos), que finalmente van a ocasionar una disminución en la funcionalidad de los espermatozoides y de esta manera alterando su capacidad fecundante. Cambios osmóticos y la formación de hielo intracelular son la principal causa de que se produzcan estos daños celulares (Holt, 2000).

Estudios realizados recientemente demuestran que la adición de ciclodextrinas cargadas de colesterol al semen puede incrementar eficientemente las tasas de criopreservación de los espermatozoides de varias especies de interés (Purdy y Graham, 2004; Moore *et al.*, 2005; Mocé *et al.*, 2010; Fashard *et al.*, 2011; Tomás *et al.*, 2014).

Para la adición de colesterol se pueden utilizar los oligosacáridos cíclicos denominados ciclodextrinas, los cuales poseen una cara hidrofílica externa y una interna hidrofóbica. Las ciclodextrinas pueden cargarse con colesterol antes de su utilización, y de esta manera van a servir como medio transportador para incorporarlo a las membranas plasmáticas de los espermatozoides, previo a la congelación, mejorando así su fluidez y estabilidad ante los cambios osmóticos y de temperatura.

En base a los antecedentes mencionados, el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la adición de metil- β - ciclodextrina cargada con colesterol sobre la calidad de las características microscópicas del semen de carnero refrigerado y descongelado.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Membrana plasmática

La estructura que delimita a la célula es la membrana plasmática. Inicialmente conceptualizada como una barrera inerte, divisoria del interior y exterior celular, actualmente se le reconoce como un elemento dinámico y fundamental en la conservación de la integridad de la célula (Meza *et al.*, 2010). La membrana plasmática corresponde, pues, a una capa especializada, la más superficial del protoplasma, que interviene en el mantenimiento de la diferencia química y físico-química entre el medio exterior y el medio interior (Navarrete y López, 1975).

La mayoría de las membranas biológicas son similares sin importar el tipo de célula u orgánulo que se encuentren rodeando (Pérez *et al.*, 2012).

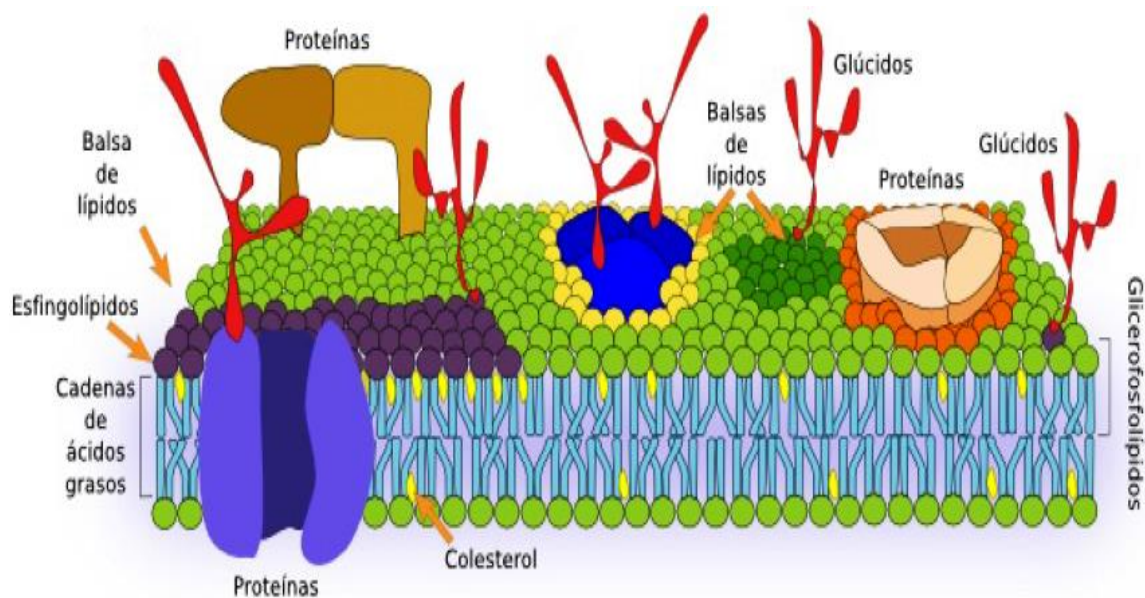


Figura 1: Esquema de la organización de una membrana plasmática según la visión actual del modelo de mosaico fluido de Singer y Nicolson (1972).

FUENTE: Megías *et al.* (2017)

La membrana plasmática, que rodea a todas las células, define la extensión de la célula y conserva las diferencias esenciales entre el contenido de ésta y su entorno. Esta membrana es un filtro, enormemente selectivo, que controla la entrada de nutrientes y la salida de los productos residuales y, además, genera diferencias en la concentración de iones entre el interior y el exterior de la célula. La membrana plasmática también actúa como un sensor de señales externas, permitiéndole alterar su comportamiento en respuesta a estímulos de su entorno (Arrazola, 1994).

Estas membranas biológicas son estructuras laminares de considerable plasticidad y tienen entre 6 a 10 nm de grosor o 50 átomos (Smith y Wood, 1997; Alberts *et al.*, 2011). Las membranas intracelulares son comúnmente de menor espesor que las membranas plasmáticas (González y Arriagada, 2008).

Todas las membranas celulares están compuestas por lípidos y proteínas, y comparten una estructura fundamental en común independientemente de su localización (Alberts *et al.*, 2011). La función principal de cada membrana, está determinada esencialmente por el complemento de proteínas que esta posee y por las proteínas adyacentes a aquella (González y Arriagada, 2008). Las proteínas representan entre el 50 y 75 por ciento de su composición total, con importantes funciones en la vida celular (Pérez *et al.*, 2012).

El otro componente de algunas membranas son los carbohidratos, unidos covalentemente, ya sea a lípidos (glicolípidos) o a proteínas (glicoproteínas) (Smith y Wood, 1997; Megías *et al.*, 2017).

Por otra parte estudios recientes sugieren que ciertas áreas de membrana están enriquecidas de colesterol y esfingolípidos, constituyendo “balsas” que se mueven lateralmente con funciones específicas, relacionadas a la señalización celular y a la toma de ciertas sustancias en la endocitosis (Pérez *et al.*, 2012).

Las membranas biológicas son estructuras muy dinámicas (flexibles) permitiendo de esta manera a los componentes celulares y subcelulares los cambios de forma que acompañan al crecimiento celular y al movimiento (movimiento ameboideo). Gracias a la fluidez de

las membranas sus componentes lipídicos y proteicos son capaces de moverse e interactuar entre sí (González y Arriagada, 2008). Decir que la bicapa lipídica se comporta como una estructura fluida significa que sus componentes rotan entorno a sus ejes y se desplazan libremente por la superficie membranosa. Los lípidos pueden pasar de una capa a otra por un tipo de movimiento llamado flip-flop. Este, movimiento es poco común comparado con la rotación y el desplazamiento lateral (De Robertis y Hib, 2004).

2.2 Componentes lipídicos de la membrana

Si bien se han descrito más especies moleculares de las involucradas en la formación de una simple bicapa lipídica, los tres componentes lipídicos principales de las membranas eucariontes son los fosfolípidos, esfingolípidos y el colesterol (Godoy, 2006).

El tipo de fosfolípidos y la cantidad de proteínas presentes en la membrana plasmática varían entre las diferentes especies, razas y aún entre individuos de la misma especie, lo que puede explicar el mayor o menor efecto protector de un diluyente a los espermatozoides de un determinado individuo (Borges *et al.*, 2011).

El fosfolípido que predomina en las membranas celulares es la fosfalidilcolina. Le siguen en este orden, la fosfatidiletanolamina, la fosfatidilserina, la esfingomiélin y la fosfatidilinositol (De Robertis y Hib, 2004).

La estructura y organización de las membranas celulares, así como sus diferentes propiedades, están condicionadas básicamente por los lípidos. Éstos son moléculas anfipáticas, con una parte hidrofílica y otra hidrofóbica, que se disponen formando una bicapa lipídica donde las partes hidrofóbicas se hallan en el centro de la membrana y las hidrofílicas en contacto con el agua (Megías *et al.*, 2017). Hay unas cinco millones de moléculas lipídicas por um^2 de membrana (Paniagua *et al.*, 2007).

La estructura que forma la bicapa lipídica es mantenida por interacciones hidrofóbicas entre las cadenas alifáticas de los ácidos grasos de los fosfolípidos (González y Arriagada, 2008). La bicapa lipídica proporciona la estructura básica de la membrana y actúa como barrera de permeabilidad para la mayoría de las moléculas hidrosolubles (Alberts *et al.*,

2011). Las dos capas de la bicapa lipídica no son idénticas en su composición, razón por la cual se dice que las membranas son asimétricas (De Robertis y Hib, 2004).

Los lípidos de las membranas biológicas tienen generalmente 16, 18 o 20 carbonos de largo y presentan de 0 a 3 dobles ligaduras. Los más sencillos son los ácidos grasos, que consisten en una larga cadena hidrocarbonada unida a un grupo ácido (-COOH). Uno, dos o tres de estos ácidos grasos se pueden unir a los grupos hidroxilos del glicerol. Este conjunto se puede unir a su vez a un fosfato (que autoriza a llamarlos fosfolípidos) y, a su través, a una base, que puede ser una serina, o una etanolamina, o una colina (que por eso se llaman fosfatidilserina, fosfatidilestanolamina y fosfatidilcolina) (Jiménez y Merchant, 2003).

Tabla 1: Composición de la membrana plasmática de espermatozoides en diferentes especies.

Especie	Ratio colesterol/fosfolípidos	Ratio poliinsaturados/saturados
Cerdo	0,26	2,5
Caballo	0,36	-
Morueco	0,38	2,5
Toro	0,45	3,5
Caprino	0,59	-
Conejo	0,88	0,8
Hombre	0,99	1

FUENTE: Darin-Bennett y White (1977); Rana *et al.* (1991); Parks y Lynch (1992).

Los componentes lipídicos no sólo afectan la forma celular sino que también desempeñan roles importantes como en el anclaje de proteínas a la membrana, en la modificación de actividades de proteínas de membrana (microambiente lipídico) y en la transducción de señales (fosfatidilinositol). A temperaturas bajas, los fosfolípidos están en un estado de gel en que las colas hidrofóbicas de los ácidos grasos están completamente extendidas, y las

interacciones de Van der Waals entre colas adyacentes están maximizadas conduciendo a una estructura rígida, cristalina. A medida que la temperatura incrementa, se produce una transición de fase a un estado cristal-líquido, con un aumento de la fluidez (González y Arriagada, 2008).

2.3 Colesterol

A medida que el modelo clásico de Singer-Nicolson de membranas celulares ha ido evolucionando, se ha prestado especial atención al papel estructural desempeñado por el colesterol, el cual es un componente clave y que representa aproximadamente un 30% de los lípidos totales que están presentes (Krause y Regen, 2014).

El colesterol es un compuesto característico de las células animales, su forma incluye un voluminoso núcleo hidrofóbico constituido por cuatro ciclos (hidrocarburo tetracíclico) que llevan una cadena carbónica lateral ramificada de ocho carbonos, que también es de tipo hidrofóbico. En el lado opuesto de esta cadena se observa un grupo alcohol (el único grupo hidrofílico de la molécula). El conjunto constituye una elipse aplastada y rígida que presenta carácter bipolar anfifílico característico de los lípidos (Callen, 2000).

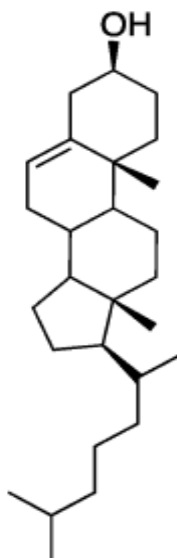


Figura 2: Estructura química del colesterol.

FUENTE: Krause y Regen (2014).

Las membranas plasmáticas de los eucariotas contienen cantidades relativamente elevadas de colesterol, hasta una proporción de más de una molécula de colesterol por cada molécula de fosfolípido (Alberts *et al.*, 1994).

Debido a su estructura de anillo hidrocarbonado, el colesterol desempeña un papel importante en la determinación de la fluidez de la membrana. Las moléculas de colesterol se insertan en las bicapas con sus grupos polares hidroxilos próximos a los grupos de la cabeza hidrofílica de los fosfolípidos. Los anillos hidrocarbonados rígidos del colesterol interactúan por lo tanto con las regiones de las cadenas de ácidos grasos que son adyacentes a los grupos de cabeza de los fosfolípidos. Esta interacción disminuye la movilidad de las porciones externas de las cadenas de ácidos grasos, haciendo que esta parte de la membrana sea más rígida. Por otra parte, la inserción del colesterol al interferir con las interacciones entre cadenas de ácidos grasos, también puede mantener la fluidez de la membrana a temperaturas más bajas (Cooper y Haushan, 2008).

El colesterol es importante para la estructura de la membrana puesto que junto con los esfingolípidos parece aportar a la formación de heterogeneidades en la distribución molecular y también participa en varios procesos metabólicos vitales como la síntesis de hormonas esteroideas o de sales biliares, entre otras (Megías *et al.*, 2017).

La permeabilidad de la membrana disminuye con la abundancia de colesterol, que presenta los siguientes efectos: (a) dificulta que las cadenas de hidrocarburos de los ácidos grasos se junten y cristalicen; (b) dificulta la permeabilidad de la membrana para pequeñas moléculas solubles; y (c) aumenta la flexibilidad y la estabilidad mecánica de la bicapa (Paniagua *et al.*, 2007).

Interesantemente, la incorporación de colesterol modula en ambos sentidos la viscosidad de las bicapas lipídicas en función de la fase en que se encuentren las cadenas aciladas; la disminuye al actuar sobre las fases cristalinas y la aumenta al incorporarse a la fase de líquido-desordenado (Simons y Vaz, 2004). Así, el colesterol, al impedir que las cadenas hidrocarbonadas se junten y cristalicen, inhibe las posibles transiciones de fase (Alberts *et al.*, 1994).

En general se puede decir que a mayor concentración de colesterol disminuye la fluidez de la membrana plasmática, aunque a bajas temperaturas esto favorece la fluidez. Por tanto, puede modular la fluidez de las membranas modificando la composición química de éstas (Megías *et al.*, 2017).

El colesterol es de enorme importancia en la célula espermática, ya que este actúa desde la protección de integridad de las membranas hasta el proceso de capacitación espermática (Cross, 1998). El colesterol es un factor potente decapacitante que ayuda a estabilizar la membrana plasmática del espermatozoide durante el tránsito del epidídimo y así evitar las interacciones intermoleculares responsables para alcanzar un estado capacitado (Davis y Bilayer, 1980). Por otra parte, la pérdida de colesterol puede causar una capacitación prematura en células sometidas a criopreservación, reduciendo de esta manera la viabilidad de los espermatozoides criopreservados (Watson, 1995).

Un eyaculado fresco tiene una relación elevada de colesterol/fosfolípido. Durante la capacitación espermática, el colesterol se mueve de la membrana para "solubilizar proteínas y receptores", mientras que los fosfolípidos se mueven hacia la parte interna de la membrana espermática. Los espermatozoides emitidos en el eyaculado pueden obtener colesterol adicional desde el plasma seminal. El colesterol se encuentra en las lipoproteínas y en cualquier tipo de células (Cross, 1998).

2.4 Ciclodextrinas

Las ciclodextrinas son compuestos macrocíclicos formados por varias unidades de glucosa unidas mediante enlaces α -D-(1,4) (Martínez y Gómez, 2007), que se pueden obtener a gran escala a partir de la conversión enzimática del almidón. Se descubrieron en 1891, y las estructuras se elucidaron a mediados de la década de 1930 (Szejtli, 2004). Las más utilizadas son las alfa-, beta- y gamma-CD que contienen 6,7 y 8 moléculas de glucopiranosas respectivamente (Muñoz *et al.*, 1995). Su importancia industrial se hizo evidente en la década de 1970, y ahora miles de toneladas de las tres ciclodextrinas (alfa, beta y gamma CD) y de sus derivados químicos y complejos de inclusión se producen de forma industrial (Szejtli, 2004).

La superficie externa de estas moléculas con forma de rosquilla es hidrófila, pero poseen una cavidad axial abierta, que es de carácter hidrofóbico y que es capaz de incluir otras moléculas apolares (o su resto) en caso de que haya compatibilidad geométrica. Esta es la esencia de la encapsulación molecular mediante la formación de complejos de inclusión (Szejtli, 2009). Estas moléculas, deberán tener un tamaño compatible con la cavidad interna de la CD, permitiendo de esta manera la formación de un “complejo de inclusión” estable (Velázquez, 2010). La formación de estos complejos da como resultado cambios significativos en la solubilidad y actividad de las moléculas invitadas, pero sin modificar su estructura química (Hu *et al.*, 2008).

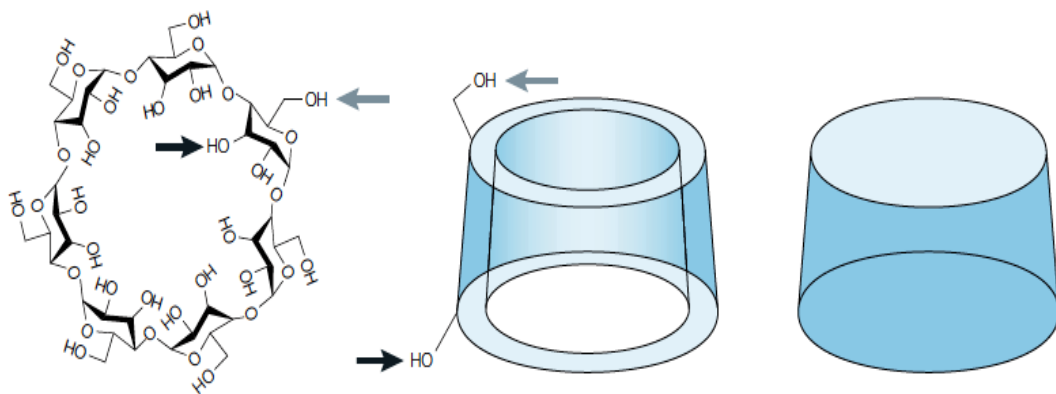


Figura 3: Representación esquemática de β -ciclodextrina.

FUENTE: Davis y Brewster (2004).

De igual manera las ciclodextrinas actúan como anfitriones en la formación de compuestos de inclusión de polímeros, dando lugar a complejos cristalinos a través de interacciones no covalentes. Las cadenas del polímero huésped quedan confinadas en los canales de las ciclodextrinas de forma extendida y aisladas de los efectos de las cadenas vecinas. La liberación de los polímeros huésped a partir de sus complejos de inclusión, puede conducir a una significativa reordenación estructural y morfológica. (Martínez y Gómez, 2007).

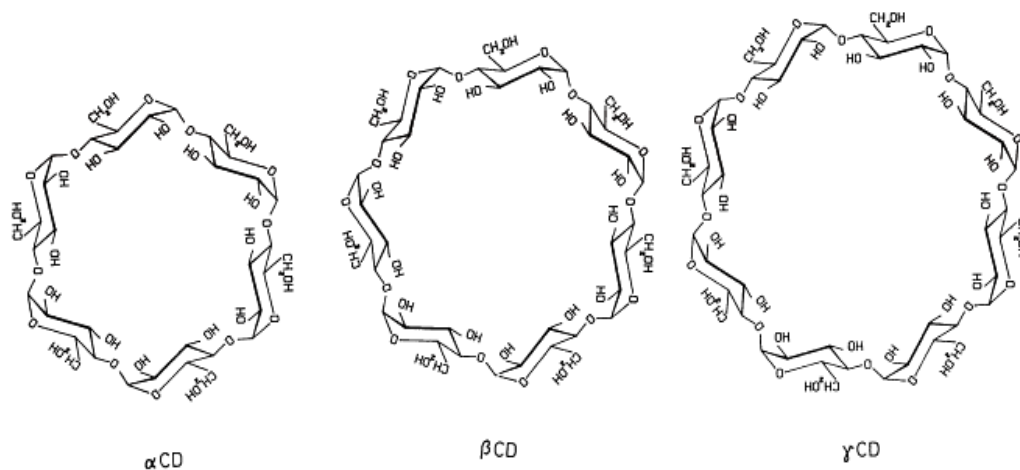


Figura 4: Estructura química de α -, β -, γ CDs, conteniendo 6, 7 y 8 unidades de glucopiranosido respectivamente.

FUENTE: Szejtli (2004).

Los complejos (cristalinos) que forman son de interés para la investigación científica ya que, contrariamente a los clatratos clásicos, existen en solución acuosa y se pueden usar para estudiar las interacciones hidrófobas que son de gran importantes en los sistemas biológicos (Saenger, 1980).

Otra diferencia entre α -, β - y γ CD es su solubilidad en agua, que en condiciones ambientales es de 2% en peso para β CD frente a 13% y 26% para α CD y γ CD respectivamente (Davis y Brewster, 2004).

Las CDs modificadas químicamente son el resultado de la eterificación o la introducción de otros grupos funcionales en los grupos 2-, 3- y 6-hidroxilo de los residuos de glucosa. Estos cambios mejoran la solubilidad a través de dos mecanismos: rompiendo los enlaces de hidrógeno 2-OH-3-OH e impidiendo la cristalización debido a la creación de un material sustituido estadísticamente que está compuesto por muchos componentes isoméricos y da lugar a un producto amorfo (Davis y Brewster, 2004).

2.5 Criopreservación de Semen de carnero

La finalidad del semen criopreservado es alcanzar porcentajes de gestación similares al logrado con el fresco, usando dosis bajas y técnicas tradicionales de inseminación, si se

cumple esto, el semen criopreservado será atractivo tanto para los ganaderos y como para centros de inseminación artificial (Mocé *et al.*, 2010).

Con el uso de semen congelado se incrementa notablemente el aprovechamiento de un reproductor, al permitir obtener un gran número de crías del mismo padre. Esto es posible debido a que mediante un adecuado fraccionamiento del semen, se obtiene un número importante de dosis por eyaculado. Las técnicas de congelamiento del semen posibilitan aún más la multiplicación y difusión de genes, al tiempo que permiten su conservación en nitrógeno líquido (a 196°C bajo cero) por un período ilimitado de tiempo. El empleo del semen congelado ovino puede producir un gran impacto en el mejoramiento genético a nivel mundial, al aumentar considerablemente el flujo de material genético de las cabañas hacia majadas, así como al facilitar el transporte de semen a nivel internacional. De esta manera, se evita el costoso traslado de los reproductores y se disminuye el riesgo sanitario (Gibbons y Cueto, 1995).

2.5.1 Daños que sufren los espermatozoides durante el proceso de congelación

La calidad del semen congelado disminuye con respecto a la del semen fresco o refrigerado, por una parte porque aproximadamente un 50 por ciento de los espermatozoides no sobreviven al proceso de crioconservación (Curry, 2000) y porque durante este proceso los espermatozoides van a sufrir alteraciones ultraestructurales (cambios en la estructura de las bicapas lipídicas de las membranas tanto plasmáticas como de los orgánulos), bioquímicos (ralentización metabólica) y funcionales.

Estos daños se acompañan de transporte deteriorado, reducción de la supervivencia de los espermatozoides en el tracto reproductivo femenino y disminución de la fertilidad (Salamon y Maxwell, 2000). Estos daños se deben básicamente a cambios osmóticos y a la formación de cristales de hielo intracelular (Holt, 2000).

Los lípidos de las membranas celulares, pasan de un estado de líquido a gel, siendo la temperatura de cambio de fase específica para cada una de las familias de lípidos. De esta manera, conforme se va produciendo el descenso de temperatura se van a ir formando agregados lipídicos de la misma familia, que van a alterar la asociación de los lípidos con

las proteínas de la membrana. Además, se forman orificios (Amann, 1999) dando lugar a un desequilibrio iónico.

Todo esto se traduce en una acumulación de daños celulares durante todo el proceso de crioconservación que conlleva a una disminución de la fertilidad del semen congelado (Medeiros *et al.*, 2002). De esta manera, la criopreservación del semen es la causante de la pérdida de motilidad espermática, viabilidad, integridad acrosomal y por supuesto de la capacidad fecundante (Holt, 2000).

Algunas de las estrategias utilizadas para optimizar los protocolos de congelación incluyen cambiar los criodiluyentes, los crioprotectores y sus concentraciones, así como también alterar las tasas de enfriamiento y / o calentamiento del protocolo. Otras estrategias se han centrado en comprender cuáles son las diferencias existentes entre los espermatozoides que sobreviven a la congelación y los que no, incluidas aquellas diferencias existentes en la composición del plasma seminal, o tratando de determinar cuándo y dónde ocurre el daño del espermatozoide y modificando o eludiendo ese punto crítico en el protocolo. (Mocé *et al.*, 2010a).

2.5.2 Selección de rangos y descensos de temperatura adecuados

Existen diferencias entre especies en cuanto a la susceptibilidad al choque térmico; estas se deben, principalmente a diferencias bioquímicas de la composición en fosfolípidos de las membranas plasmáticas, que dependen de los ratios colesterol/fosfolípidos y cadenas de ácidos grasos poliinsaturados/saturados unidas a los fosfolípidos (Darin-Bennett y White, 1977). Lo deseable es una relación elevada de colesterol/fosfolípidos y una relación baja en poliinsaturados/saturados, por una parte porque el colesterol estabiliza las membranas disminuyendo la temperatura a la cual se produce el cambio de fases de los lípidos y porque a mayor proporción de ácidos grasos insaturados existe una mayor susceptibilidad a la peroxidación. De esta forma, los espermatozoides de conejo y de humano que presentan una alta relación colesterol/fosfolípidos y un bajo ratio poliinsaturados/saturados van a ser más resistentes al shock frío que los espermatozoides de caprino, toro, ovino y porcino (Tomás, 2007).

2.5.3 Uso de crioprotectores

Se han usado varios medios de dilución para la protección y diferentes métodos para el almacenamiento de semen de carnero en estado líquido y congelado (Salamon y Maxwell, 2000).

En los medios de congelación se incluyen sustancias crioprotectoras, que se pueden dividir en no permeables y permeables como el glicerol, el dimetilsulfoxido (DMSO) y propanediol (PROH), siendo el primero el más empleado. Estas sustancias crioprotectoras van a disminuir los daños que se producen durante el proceso de enfriamiento, congelación y descongelación (Ávila *et al.*, 2006).

Los crioprotectores no permeables, no van a traspasar la membrana plasmática y se van a quedar en el espacio extracelular, modificando la membrana plasmática o reduciendo la temperatura de congelación del medio. Estudios recientes permiten sugerir que las lipoproteínas de baja densidad (LDL) presentes en la yema de huevo y las micelas de las caseínas y la lactosa presente en la leche descremada, son las principales responsables de reducir los daños por enfriamiento y congelación ya que secuestran proteínas presentes en el plasma seminal que tras la eyaculación inducen la pérdida de colesterol y fosfolípidos de las membranas citoplasmáticas (Bergeron y Manjunath, 2006).

En condiciones naturales, dichas proteínas benefician la capacitación en el tracto reproductivo de la hembra, pero durante el proceso de crioconservación van a derivar en un mayor porcentaje de espermatozoides con la membrana dañada (Bergeron y Manjunath, 2006). Por otro lado, los crioprotectores permeables actúan reduciendo la formación de hielo intracelular mediante la deshidratación de los espermatozoides, por mecanismos de difusión simple del agua desde el medio intracelular al extracelular por diferencias de presión osmótica. Además, los crioprotectores permeables producen una reorganización de los lípidos y proteínas de membrana incrementando la fluidez de la misma y favoreciendo el paso de agua y por tanto, la deshidratación celular (Purdy, 2005).

Los crioprotectores permeables son sustancias perjudiciales para los espermatozoides debido fundamentalmente a la inducción de daños osmóticos que provocan, por ello es

importante la concentración a la cual se añade el medio de congelación. El crioprotector permeable que se utiliza de manera más común es el glicerol y se usa a una concentración de entre el 3 y el 9 por ciento (Leboeuf, 2000).

Ek *et al.* (2009), al evaluar el efecto de dos diluyentes comerciales sobre la motilidad espermática, integridad del acrosoma y morfología del semen de carnero después de la congelación, mostraron que ambos diluyentes permiten obtener porcentajes satisfactorios de dosis aptas para la conservación en congelación, con una ligera y no significativa diferencia ($P > 0.05$) a favor del Triladyl (71.9 por ciento Triladyl vs 65.7 por ciento One-Step).

Cabrera y Pantoja (2008), al analizar el efecto de los dilutores Tris-glucosa y Ovine Freezing Buffer obtuvieron una motilidad individual progresiva (MIP) del semen refrigerado de 86.0 ± 2.48 y 88.5 ± 4.8 por ciento y del semen congelado de 60.8 ± 1.9 y 62.9 ± 2.4 por ciento respectivamente para ambos dilutores; mientras que la proporción de espermatozoides con membrana intacta, evaluada por la prueba de HOST (Hipo Osmotic Swelling Test) fue 77.9 ± 4.8 y 78.9 ± 4.0 por ciento para el semen refrigerado y de 39.9 ± 3.6 y 43.2 ± 2.9 por ciento para el semen congelado, utilizando los dilutores Tris y Ovine Freezing, respectivamente, existiendo diferencias altamente significativas entre dilutores, carneros y fases del proceso de congelación ($p < 0.01$).

En su estudio Sandoval (2005), encontró que el Dilutor A (fracción 1: tris 27.1 g, ácido cítrico 14 g, fructosa 10 g y yema de huevo 10 por ciento, diluidos en agua bidestilada csp. 1 L; y fracción 2: glicerol 6 por ciento, trehalosa 76 g y EDTA 1.5 g, diluidos en la fracción 1 csp. 1 L) mantenía mejor la motilidad progresiva y viabilidad e integridad acrosomal post descongelamiento (69 por ciento y 63 por ciento) en comparación con el Dilutor B (fracción 1: tris 18.17 g, ácido cítrico 9.6 g, fructosa 29.72 g y yema de huevo 10 por ciento, diluidos en agua bidestilada csp. 1 L; y fracción 2: glicerol 6 por ciento, trehalosa 76 g y EDTA 1.5 g, diluidos en la fracción 1 csp. 1 L) (37 por ciento y 35 por ciento) y el Dilutor C (fracción 1: leche descremada 9.5 mL y yema de huevo 0.5 mL; fracción 2: fructosa 0.49 g, yema de huevo 0.5 mL, trehalosa 0.89 g, EDTA 0.02 g y glicerol 1.47 mL, diluidos en la fracción 1 csp. 10 mL) (23 por ciento y 23 por ciento).

Al criopreservar muestras de semen de ovinos con la adición de dos antioxidantes: Tempo (2,2,6,6 tetrametil-1-piperidiniloxil) y Tempol (4-hidroxi 2,2,6,6 tetrametil-1-piperidiniloxil), en concentraciones de 0.5, 1.0 y 2.5 mM, para evaluar el efecto post descongelamiento, se observó que la adición de Tempo a una concentración de 0.5 mM mejora significativamente la calidad del semen criopreservado en comparación con el grupo control ($p < 0.05$), incrementado los porcentajes de motilidad progresiva (79 vs. 67 por ciento), viabilidad e integridad acrosomal (70 vs. 58 por ciento) y reduciendo la capacitación espermática prematura (9 vs. 15 por ciento) (Ruiz *et al.*, 2007).

Valdez (2013), concluye que luego del diluyente seminal TRIS + yema de huevo + surfactante, considerado estadísticamente como primera elección, los diluyentes TRIS + lecitina de soya y TRIS + yema de huevo son considerados como segunda opción para congelar semen de ovino por generar similares tasas de calidad espermática entre sí y ligeramente inferiores a la obtenida por el diluyente de primera elección en la crioconservación de semen ovino (Motilidad 2.75 ± 0.19 vs 2.90 ± 0.48 , $p > 0.05$; Integridad de la membrana 43.83 ± 5.11 por ciento vs 46.05 ± 1.39 por ciento, $p > 0.05$; Integridad del acrosoma 44.97 ± 2.49 por ciento vs 46.00 ± 1.21 por ciento, $p > 0.05$) con la ventaja de que el diluyente TRIS + lecitina de soya reduce el riesgo de contaminación bacteriana y variaciones indeseables en la crioconservación, lo que es difícil de obtener con el diluyente TRIS + yema de huevo.

Por su parte Angulo *et al.* (1999), al comparar el efecto de dos temperaturas y tiempos de descongelación sobre la motilidad y fertilidad del semen del ovino, obtuvo una motilidad al descongelar de 51.28 por ciento y 47.98 por ciento en el semen descongelado de los grupos 1 y 2, respectivamente, y la fertilidad de 30.7 por ciento y 29.2 por ciento, para los mismos grupos, respectivamente, sin que existiera diferencia significativa entre grupos ($C2$; $P > 0.05$).

Al evaluar el efecto de dos dilutores, Tris- Fructosa-Yema de huevo (Tris) y Citrato-Glucosa-Yema de huevo (citrato), sobre la motilidad espermática e integridad de la membrana espermática (HOST) en semen congelado de ovinos bajo la forma de pellets, se obtuvo que en ovinos Assaf, la MIP del semen descongelado fue de 63.77 y 61.11 por

ciento utilizando Tris y citrato, respectivamente, encontrándose diferencias significativas ($p < 0.05$) entre dilutores, mientras que en ovinos Blackbelly, la MIP fue de 62.33 y 61.33 por ciento con Tris y citrato, respectivamente, sin diferencia estadística. En ovinos Assaf, los valores de HOST del semen descongelado fueron de 43.56 y 40.38 por ciento con Tris y citrato, y en Blackbelly fueron de 40.19 y 38.16 por ciento con Tris y Citrato, respectivamente, sin diferencias significativas (Cabrera *et al.*, 2010).

2.5.4 Adición de colesterol a las membranas plasmáticas

Por una parte, se sabe que el colesterol estabiliza las membranas celulares y disminuye la temperatura a la cual se produce el cambio de fase de los lípidos de fase líquida a gel. Y por otra parte, los daños que se producen en las membranas son muy similares al estadio que se presenta en la capacitación (Gillan *et al.*, 1997). Se ha observado que cuando los espermatozoides inician este proceso su longevidad se ve disminuida (Curry, 2000), y una de las primeras alteraciones en el proceso de capacitación es la pérdida del contenido de colesterol de sus membranas.

En teoría, si se consiguiera incorporar colesterol a las membranas plasmáticas, se podría alcanzar un mayor ratio colesterol/fosfolípidos y por tanto los espermatozoides descongelados deberían estar menos capacitados, y sus membranas ser más estables (Mocé y Graham, 2006), alcanzando una relación colesterol/fosfolípidos semejante al de las membranas plasmáticas de especies que son resistentes al choque térmico (conejo y humano con 0,88 y 0,90 respectivamente).

Recientemente, se han usado las ciclodextrinas para adicionar o eliminar el colesterol de las membranas sintéticas y celulares (Mocé *et al.*, 2010a). Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos con una cara externa hidrofílica y una interna hidrofóbica. Las ciclodextrinas pueden saturarse previamente con colesterol, y van a servir como medio portador para incorporarlo a las membranas plasmáticas.

Según las unidades de glucosa que contengan las ciclodextrinas, se pueden clasificar en α , β y γ ciclodextrinas según tengan 6, 7 u 8 unidades de glucosa, respectivamente. A las ciclodextrinas se les puede adicionar residuos de metilo o hidroxipropilo para mejorar tanto

su solubilidad en agua como su capacidad para disolver compuestos hidrófobos (Yancey *et al.*, 1996).

Las ciclodextrinas pueden ser cargadas con colesterol mediante la dilución en una mezcla de metanol y cloroformo seguido de la desecación de dicha solución para obtener los cristales (Purdy y Graham 2004). La metil- β -ciclodextrina (MBC) es utilizada más frecuentemente para tratar el espermatozoide con colesterol antes de la criopreservación, aunque la 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina (HBC) es efectiva para tratar el espermatozoide de carnero (Mocé *et al.*, 2010).

Un aspecto muy importante de la utilización de la tecnología CLC es que estas y los espermatozoides necesitan incubarse en un medio libre de lípidos (diluyentes a base de yema de huevo), ya que estos componentes interfieren con la transferencia del colesterol a los espermatozoides (Purdy y Graham, 2004).

La transferencia de colesterol de las ciclodextrinas al espermatozoide es rápida, y esta ocurre en forma adecuada en 15 minutos a 22 ° C. Sin embargo, una incubación más prolongada de CLC con espermatozoide, o a temperaturas más altas, no es perjudicial. Esto podría ser importante en el desarrollo de nuevos protocolos de criopreservación que utilicen la tecnología de las CLC, ya que estas pueden agregarse a los eyaculados inmediatamente después de la recolección antes de que alcancen la temperatura ambiente, sin ser perjudicial para las células (Purdy y Graham, 2004).

Ahmad *et al.* (2013), concluyeron que el tratamiento previo con ciclodextrinas cargadas de colesterol (CLC) mejora la integridad estructural de las membranas de espermatozoides de carnero en una amplia gama de presiones osmóticas, entre 20 y 1.500 mOsm / L. Además, el tratamiento previo con CLC reduce la capacidad de los espermatozoides para someterse a reacción acrosómica *in vitro*.

Mocé *et al.* (2010), en su estudio encontraron que el espermatozoide de carnero tratado con 2-hidroxiopropil-beta-ciclodextrina antes de la crioconservación mostró mayores porcentajes de espermatozoides móviles (62 por ciento) en comparación con el control (sin tratamiento

CLC) (43 por ciento, $p < 0,05$), después de la descongelación. Además, las muestras tratadas con metil-beta-ciclodextrina exhibieron porcentajes similares de espermatozoides móviles y viables que las muestras tratadas con 2-hidroxiopropil-beta-ciclodextrina.

Tabla2: Porcentajes de motilidad total, motilidad progresiva y membranas plasmáticas intactas (PMI) cuando los eyaculados de carnero frescos se trataron con 2 mg de metil- β -ciclodextrina o 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina/120 x 10⁶ espermatozoides, cada uno precargado con colesterol (CLC) y luego crioconservado.

Tratamiento	Motilidad espermática total (por ciento)	Motilidad espermática progresiva (por ciento)	SEM
Control	32 b	25 b	18 b
Metil- β -ciclodextrina	42 a	34 a	22 b
2-Hidroxiopropil- β -ciclodextrina	50 a	39 a	33 a
SEM	5	4	4

a,bLas medias con diferentes superíndices dentro de una columna difieren, $P < 0.05$.

FUENTE: Mocé *et al.* (2010).

Además el tratamiento de los espermatozoides de carnero con CLC aumenta la capacidad de unión a la zona pelúcida tanto de bovino como de ovino, ya sea con metil-beta-ciclodextrina o 2-hidroxiopropil-beta-ciclodextrina, respecto al tratamiento control (Mocé *et al.*, 2010).

Tabla3: Número de espermatozoides vinculados a la zona pelúcida de bovinos (N = 14) y ovinos (N = 9).

Tratamiento	Zona pelúcida de bovino	Zona pelúcida de ovino	SEM
Control	4,6	9,3	2
Metil- β -ciclodextrina	5,1	14	2
2-Hidroxiopropil- β -ciclodextrina	12.0*	27.3*	5
SEM	2	4	

N: número de gotas (con cinco zonas pelúcidas cada una) examinadas por tratamiento con esperma. Se analizaron siete eyaculados / tratamiento de esperma. Para la zona pelúcida ovina, se analizaron cuatro eyaculados con dos gotitas con cinco zonas cada una, y se analizó un eyaculado con una sola gota (cinco zonas pelúcidas). La zona pelúcida ovina no se utilizó en dos de los siete eyaculados.

* Indica que la media de la columna es diferente del control a $p < 0.05$.

FUENTE: Mocé *et al.* (2010).

Se han realizado numerosas investigaciones para tratar de encontrar la dosis adecuada de ciclodextrinas cargadas de colesterol para mejorar los resultados en criopreservación de semen en diferentes especies.

Tabla4: Concentración de ciclodextrinas cargadas con colesterol (CLC) utilizada en diferentes especies.

Especies	Autores	Concentración/Número de espermatozoides
Bovina	Purdy e Graham (2004)	1,5 mg/ 120x10 ⁶
	Purdy <i>et al.</i> (2005)	1,5 mg/ 120x10 ⁶
	Mocé y Graham (2006)	2,0 mg/ 120x10 ⁶
	Amorim <i>et al.</i> (2009)	1,5 mg/ 120x10 ⁶
	Moraes <i>et al.</i> (2010)	1,5 mg/ 120x10 ⁶
Equina	Zahn <i>et al.</i> (2002)	0,125Mm
	Moore <i>et al.</i> (2005)	1,5mg/120x10 ⁶
	Spizziri <i>et al.</i> (2010)	1,5mg/ 120x10 ⁶
	Oliveira <i>et al.</i> (2010)	1,5mg/ 120x10 ⁶
	Combes <i>et al.</i> (2010)	0,125 mmolchol/L
Ovino	Mocé <i>et al.</i> (2010)	2mg/ 120x10 ⁶
	Purdy <i>et al.</i> (2010)	2mg/ 120x10 ⁶
	deGraaf <i>et al.</i> (2007)	1,8mg/ 120x10 ⁶
Caprino	Amidi; Farshad; Khor (2010)	1,5mg/240x10 ⁶ + BSA** 2,5 %
	Farshad <i>et al.</i> (2011)	2,25mg/240x10 ⁶
	Koniyali (2009)	1mg/120x10 ⁶
Suino	Zeng y Terada (2001)	20mM MBC*+ 10mM colesterol/500x10 ⁶
	Tomás <i>et al.</i> (2009)	1,0mg/ 120x10 ⁶
	Tomás <i>et al.</i> (2013)	1,0mg/ 120x10 ⁶

*MBC = metil-β-ciclodextrina.

FUENTE: Boscarato y Martins (2014).

Resultados positivos se encontraron en los parámetros después de la descongelación de espermatozoides en muchas especies, estos no se reflejan positivamente en la fertilidad, que sigue con resultados inconsistentes como se puede observar en la tabla 5 (Boscarato y Martins, 2014).

Tabla5: Efecto del tratamiento de semen con ciclodextrinas cargadas con colesterol (CLC) sobre la capacidad fertilizante de semen in vivo.

Especies	Dosis/Inseminación artificial	Control	Tratado con CLC
aBovina	750 000	50%	59%
bEquina	800 x10 ⁶	75%	25%
cEquina	400x10 ⁶	28,60%	15%
dOvina	100x10 ⁶	45,30%	41%
eSuína*	600x10 ⁶	67,70%	55,90%
eSuína**	600x10 ⁶	65,20%	66,70%

^aPurdy and Graham (2004); ^bZahn *et al.* (2002); ^cSpizziri *et al.* (2010); ^dPurdy *et al.*(2010); ^eTomás *et al.* (2013). *IA 37 horas después de la inducción a la ovulación con hCG; ** IA 30 horas después de la inducción a la ovulación con hCG. Adaptado de Mocé *et al.* (2010).

FUENTE: Boscarato y Martins (2014).

El mecanismo por el cual se produce este beneficio no es conocido exactamente, pero se le atribuye a una disminución del daño de membrana inducido cuando esta experimenta una transición de fase al estado de gel cristalino a medida que desciende la temperatura, ya que el colesterol añadido puede reducir o eliminar totalmente la temperatura a la que la transición de fase ocurre, además podría deberse en parte al aumento de la tolerancia

osmótica de los espermatozoides, así como la permeabilidad de la membrana a los crioprotectores, y aumento de la longevidad de los espermatozoides (Mocé *et al.*, 2010a).

2.6 Análisis Seminal Asistido por computadora (CASA)

Desde hace varios años se realizan pruebas adicionales a las evaluaciones seminales comunes, teniendo en cuenta la fisiología espermática con elevada precisión. Los sistemas computarizados para la valoración seminal – CASA (Computer Assisted Spem Analysis), son usados para realizar algunas de estas pruebas (Anzar *et al.*, 1991).

Después de 40 años, el sistema CASA es ampliamente aceptado por la comunidad de reproducción animal, tanto para su uso en unidades de producción como para la investigación en biología espermática básica (Amann y Waberski, 2014).

El análisis computarizado de la motilidad espermática se puede realizar posterior a los procesos de congelación y descongelación del material seminal; sin embargo, es de resaltar que dicha valoración induce cambios en el flagelo del espermatozoide ocasionando una disminución de la motilidad. Al igual que otros parámetros, la motilidad progresiva de un espermatozoide es una característica importante que debe ser evaluada, ya que está correlacionada con la fertilidad (Mortimer, 1997).

El CASA o el sistema de análisis computarizado (SCA®) para la evaluación de la motilidad y concentración espermática, es un módulo que proporciona una evaluación automatizada y clasificada de la concentración espermática y la motilidad (Osorio, 2013). Solo se requieren algoritmos muy robustos para identificar todos los espermatozoides y evaluar aquellos con características de movimiento rápido, siendo posible identificar y cuantificar con precisión la motilidad de los espermatozoides (Tomlinson *et al.*, 2010).

Las ventajas potenciales del análisis de semen asistido por computadora (CASA) sobre las técnicas de evaluación subjetiva incluyen una mejor objetividad, sensibilidad y confiabilidad (Holt *et al.*, 1994).

El principal inconveniente con esta tecnología está relacionado con la estandarización y optimización del equipo y los procedimientos. Los diferentes instrumentos del CASA han demostrado altos niveles de precisión y confiabilidad usando diferentes metodologías de clasificación de esperma. Su disponibilidad nos brinda una gran herramienta para comparar objetivamente la motilidad y la morfología de los espermatozoides y mejorar nuestro conocimiento y capacidad para manipular los espermatozoides (Verstegen, 2002).

Se reconoce que los diseños de software y hardware se están actualizando y mejorando continuamente, y también que la elección crítica de los parámetros de configuración para los sistemas CASA tienen una influencia importante en la calidad de los datos obtenidos. Claramente, las mejoras en la aplicación de los sistemas CASA se obtendrán a través del desarrollo de la tecnología en todos los aspectos (Holt *et al.*, 1994).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar y duración de estudio

El presente trabajo de investigación se realizó en las instalaciones del Banco Nacional de Semen del Programa de Mejoramiento Animal de la Universidad Nacional Agraria la Molina, ubicado en el distrito de la Molina, Lima. El clima presenta temperaturas mínimas mensuales promedio de 16.2 °C y máximas de 22.5 °C, una humedad relativa promedio anual de 81 por ciento y una precipitación total anual de 10 mm.

3.2 Animales experimentales

Se utilizaron 4 carneros de la raza Asblack (3/4 Assaf y 1/4 Black Belly) pertenecientes al RIGORANCH de la UNALM, cuyas edades estuvieron entre 1 y 2 años.

3.3 Manejo y alimentación de los animales

Los animales permanecieron bajo un mismo régimen de alimentación, manejo y cuidado sanitario. Se utilizó una oveja de la raza Assaf x Corriedale para realizar monta de los carneros experimentales para ser colectados.

Fueron alimentados con forraje verde picado, maíz chala picado y un suplementado concentrado para cubrir los requerimientos nutricionales de los animales. El forraje fue administrado dos veces al día y el concentrado solamente por las mañanas. Contaron con agua ad libitum.

3.4 Instalaciones

Los carneros se mantuvieron en corrales de tierra de 2.80 x 3.00 x 1.20, contando con una adecuada sombra, ventilación, iluminación, comederos y bebederos para su completo confort durante la duración de la investigación.

3.5 Metodología

A. Preparación de medios

a. Preparación del medio TRIS

Todos los ingredientes del medio fueron diluidos en agua desionizada y esterilizada (equivalente a tri-destilada y estéril), agitados continuamente y preparados en el laboratorio a temperatura ambiente. La osmolaridad fue medida con un osmómetro crioscópico y el pH con papel pHmetro. Una vez preparados los medios se introdujeron en tubos de plástico y se congelaron hasta el momento de su uso (Tómas, 2007).

La osmolaridad final del medio estuvo en aproximadamente 330 mOsm/L y el pH final próximo a 7.

Tabla6: Reactivos utilizados en la preparación del medio TRIS.

TRIS (300 mM)	ÁCIDO CÍTRICO (94,7 mM)	GLUCOSA (27,75 mM)	Agua desionizada y esterilizada
3,637 g	1,99 g	1,50 g	Hasta 100 ml

FUENTE: Salomon y Maxwel (2000).

b. Preparación de las Ciclodextrinas Cargadas de Colesterol (CLC)

Los productos químicos utilizados para la elaboración de las ciclodextrinas cargadas de colesterol fueron de grado reactivo procedentes de Sigma-Aldrich.

La solución de CLC fue preparada según lo descrito por Purdy y Graham (2004). En un tubo de ensayo se disolvieron 200 mg de colesterol en 1 ml de cloroformo. En otro tubo de ensayo se diluyó 1 g de metil- β -ciclodextrina en 2 ml de metanol. Se adicionó una alícuota de 450 μ l de la solución de colesterol a la solución de ciclodextrina y se mezcló hasta que la solución estuvo homogénea. En una caja Petri, se removió el solvente usando una corriente de nitrógeno gaseoso. Los cristales resultantes se dejaron secar 24 h y luego se

pasaron a un recipiente de vidrio y permanecieron almacenados a 22°C hasta su uso. La solución de trabajo CLC se preparó agregando 50 mg de CLC a 1 ml de medio de dilución TRIS, se mezcló con un vórtex y fue incubado en baño maría a 37°C hasta el momento de ser utilizado.

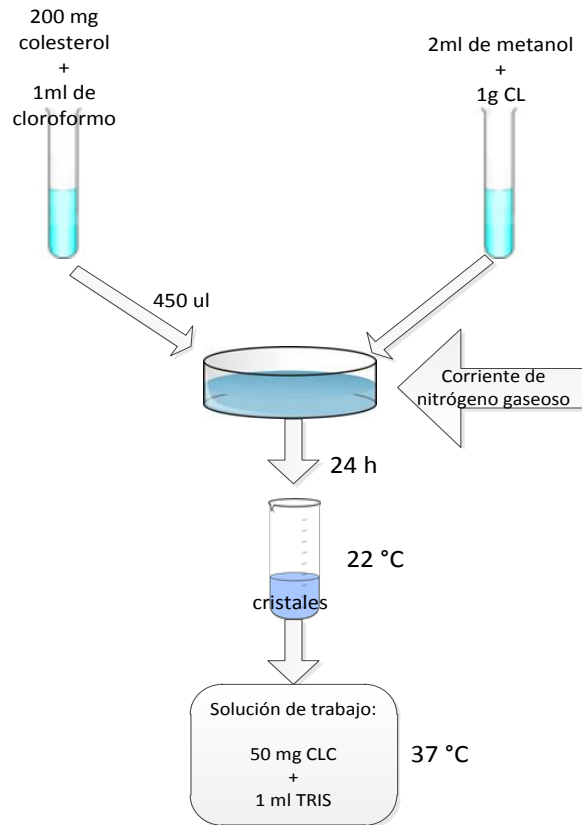


Figura 5: Esquema de la preparación de la solución de trabajo de CLC.

c. Preparación de dilutor comercial AndroMed®

Para la preparación del dilutor se emplearon 200 ml del dilutor comercial AndroMed® con 800 ml de agua bidestilada. Previo a la dilución final (10 min) se colocó en baño María a temperatura de 32.5°C, una parte del dilutor concentrado, y cuatro partes de agua bidestilada, se mezclaron y se homogenizaron obteniendo el dilutor para ser utilizado en la pre dilución y dilución final del eyaculado el cual se hizo en un tubo de ensayo debidamente rotulado con la identificación del carnero. Para lograr las propiedades óptimas de conservación de AndroMed®, la cantidad requerida de agua se agregó al concentrado y no viceversa.

B. Colección de semen

La etapa pre-experimental consistió en la selección de machos que al ser evaluados presenten las mejores características seminales, esta etapa constó de un periodo de entrenamiento y acostumbamiento a la colección por el método de vagina artificial.

La zona de colección contó con un brete de colección de 1.0 m de largo, 0.80 m de ancho y 1.20 m de alto, una fosa revestida de cemento de 1.75 m de largo, 0,74 m de ancho y 1.02 m de profundidad. Esta zona se encontraba completamente provista de sombra para evitar que los rayos solares afecten las muestras colectadas.

En la etapa experimental se realizó colecciones semanales, se consideró un régimen de dos recogidas por día, seguido de un descanso de 2 días a cada macho utilizando el método de colección con vagina artificial con el uso de una hembra para simular la monta. Se usó la vagina artificial para ovinos que consta un tubo rígido (20 cm.) de goma con válvula y cérvix artificial interior, mango interior de látex con extremos enrollados, bandas de goma, cono de colección de látex y vial de colección graduado tipo tulipán. A la vagina artificial se le añadió aire a presión y agua caliente en una cantidad suficiente que se mantuvo entre 40 a 42 °C.



Figura 6: Colección de las muestras de semen de carnero.

C. Evaluación del semen

a. Evaluación macroscópica

La evaluación de las características macroscópicas se realizó en las muestras inmediatamente después de la colección, esto gracias a la cercanía del laboratorio y las instalaciones en dónde se mantuvieron y colectaron a los animales.

a.1 Volumen

Para el semen colectado, el volumen del eyaculado se determinó por observación directa, comparándola con la escala graduada del tubo colector y fue expresado en milímetros.

a.2 Color

Se determinó mediante la observación directa de las muestras, después de cada colecta; debiendo el mismo ser blanco cremoso. El color rojizo indica presencia de sangre, así como los colores grises o marrones indican contaminación o infección, debiéndose en estos casos desechar el eyaculado y proceder a la revisión del macho.

a.3 pH

Se hizo la medición del pH de cada eyaculado, la cual se determinó a través de una banda indicadora de pH colorimétrica cuyo rango va de 0 a 14. Se hizo una medición por cada muestra colectada.

b. Evaluación microscópica

La evaluación de las características microscópicas de semen fue realizada en diferentes etapas:

- Fresco: una vez obtenida la muestra se hizo la evaluación de la concentración, motilidad, vitalidad, anormalidades y funcionalidad de membrana espermática.
- Equilibrado: en la muestra diluida con AndroMed®, refrigerada y equilibrada a 5°C, antes del congelado se evaluó la motilidad, vitalidad, anormalidades e integridad de membrana espermática.

- Descongelado: en la muestra descongelada se evaluó la motilidad, vitalidad, anormalidades e integridad de membrana espermática.

b.1 Concentración espermática

Para el análisis de la concentración se evaluó por Análisis computarizado de semen (CASA) para esta evaluación se colocó una gota de 3 μ l de la muestra de semen diluida 1:49 con diluyente comercial AndroMed® en el área de llenado de una cámara de recuento espermático, llenándose la cámara por sí misma por capilaridad lográndose una distribución uniforme de la muestra dentro de la cámara y se inició la medición con AndroVision® inmediatamente después de cargar la cámara. El software debe estar preparado de tal modo, que la medición pueda iniciarse inmediatamente, activando el botón de Análisis. Fue observado con un objetivo de 10X de un microscopio de contraste de fases y analizada en el módulo de Motilidad y Concentración del Computer Assisted Sperm Analysis (Software AndroVision®).

Se realizó la medición de varios campos centrales de cada cámara, evitando medir áreas cercanas a los extremos aguzados o los bordes, seleccionando aquellos campos con distribución óptima de semen, sin partículas e impurezas, sin aglutinación de espermios y sin burbujas de aire.

b.2 Motilidad espermática

Para el análisis de la motilidad se evaluó por Análisis computarizado de semen, para esta evaluación se colocó 6 μ l de la muestra de semen sobre una lámina portaobjetos, previamente temperada a 37°C, luego fue cubierta con una laminilla cubreobjetos a la misma temperatura, y fue observado con un objetivo de 10X de un microscopio de contraste de fases, platina caliente y analizada en el módulo de Motilidad y Concentración del Computer Assisted Sperm Analysis (CASA), Software AndroVision®. Fueron analizados un mínimo de 200 espermatozoides por cada campo y como mínimo tres campos con distribución homogénea por cada muestra.



Figura 7: Evaluación de concentración y motilidad de las muestras seminales de carnero.

b.3 Evaluación de vitalidad espermática

Para el conteo de los espermatozoides vivos se utilizó las tinciones de eosina y nigrosina, ambas al 2 por ciento. Se colocó una gota de 5 μ l de muestra a un extremo de una lámina porta objeto pre calentada a 37°C y dos gotas de 5 μ l de cada colorante. En primer lugar, se homogenizó la gota de la muestra con la gota de eosina durante 20 segundos para que el colorante penetre en los espermatozoides. Luego, la mezcla obtenida se combinó con la nigrosina que sirvió de contraste. Se realizó el frotis y se dejó secar a temperatura ambiente. Inmediatamente, se observó al microscopio con un aumento de 400x. Se identificaron como células vivas aquellas que no absorbieron el colorante (no teñidas), mientras que las que sí lo hicieron (teñidas) fueron consideradas muertas.

Se realizó 3 conteos por muestra y en cada uno se contabilizaron un total de 200 espermatozoides. Luego, se halló el valor de la vitalidad (V) para cada uno de estos conteos. Los valores hallados se promediaron para encontrar la vitalidad de una determinada muestra. Su valor se expresó en valores porcentuales.

$$V = \frac{A}{A+B} \times 100$$

Donde:

V = Vitalidad (por ciento)

A = Número de espermatozoides sin teñir

B = Número de espermatozoides teñidos

A + B = N° total de espermatozoides contabilizados (200 esp.)

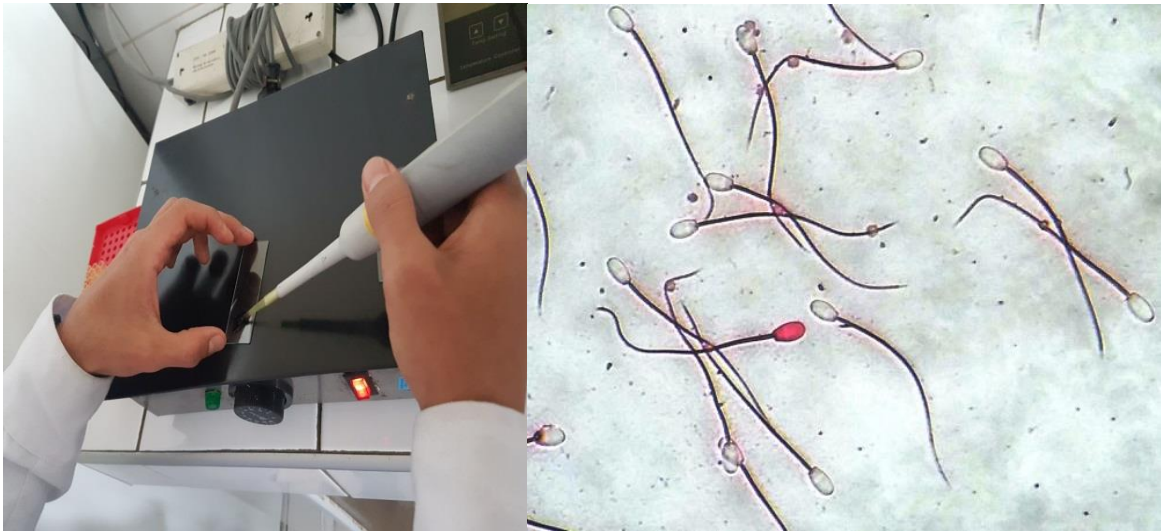


Figura 8: Evaluación de vitalidad de semen de carnero.

b.4 Anormalidades espermáticas

Para su evaluación, se utilizó la misma lámina utilizada para evaluar la vitalidad y con la misma cantidad de aumentos, 400x. Se realizó 3 conteos por muestra y en cada uno se contabilizó un total de 200 espermatozoides. Luego, se halló el valor de anomalía para cada uno de estos conteos. Los valores hallados se promediaron para encontrar el valor de anomalías de una determinada muestra. Su valor se expresó en valores porcentuales.

$$\text{Anorm.} = \frac{A}{A+B} \times 100$$

Donde:

Anorm.= Anormalidades morfológicas (por ciento)

A = Número de espermatozoides anormales

B = Número de espermatozoides normales

A + B = N° total de espermatozoides contabilizados (200 esp.)

b.5 Evaluación de la funcionalidad de la membrana espermática

En el cuadro 7 y 8 se muestran la composición química de la solución hiposmótica y el medio de lavado empleados.

Tabla7: Composición de la solución hiposmótica (100 mOsm/L).

Agente	Unidad	Cantidad
Citrato de sodio dihidratado	gr.	0,08
Fructuosa	gr.	0,025
Agua destilada	ml	10
Osmolaridad	mOsm/L	100

FUENTE: Correa, (1996).

Tabla8: Composición química del medio de lavado.

Agente	Unidad	Cantidad
Solución A		
Citrato de sodio dihidratado	g.	0,29
Agua destilada	ml	10
Total	ml	10
Solución B		
De la solución A	ml	9,8
FBS (Suero fetal bovino)	ml	0,2
Total	ml	10

FUENTE: Correa, (1996).

Esta evaluación se realizó con la prueba de HOST (Hipo Osmotic Swelling Test). Que consiste en la exposición de los espermatozoides en un medio hiposmótico, según el protocolo de Correa *et al.* (1994), de la siguiente manera:

- Descongelación de la pajilla de semen.
- Dilución: diluir a una proporción de 1:1 (v/v) usando citrato de sodio al 2,9 por ciento con 2 por ciento de suero bovino.
- Lavado: Centrifugar por 5 minutos a 1000 rpm para al final quedarse sólo con el pellet eliminando el sobrenadante.
- Reconstitución del semen al volumen original, agregando al pellet 10 μ l de solución de lavado.
- Prueba hiposmótica: mezcla de semen con solución hiposmótica a 100 mOsmol/L, en una proporción de 1:10. Seguidamente, incubar en baño maría a 34 °C por 60 minutos. Pasado el tiempo de incubación, se procede a mezclar una gota de la muestra seminal con una gota de glutaraldehído al 2 por ciento para retener la reacción.
- Finalmente se contó en un microscopio de contraste de fase a 40X, los espermatozoides con reacción positiva, registrándose un total de 200 espermatozoides en un mínimo de 10 campos diferentes.

El conteo y clasificación de los espermatozoides fue de acuerdo a lo descrito por Mellisho, (2010).

- Espermatozoides con fuerte reacción: cola enrollada (++)
- Espermatozoides con reacción débil: cola semi enrollada (+)
- Espermatozoides sin reacción: cola recta (-)

Se consideraron espermatozoides con membrana funcional (+) los que reaccionaron al estrés hiposmótico mediante la hinchazón de la parte distal de la cola espermática, mientras que aquellos espermatozoides sin cambios en la cola se consideraron funcionalmente dañados (-).

Se halló el valor de integridad de membrana para cada uno de estos conteos. Los valores se promediaron para encontrar el valor de integridad de membrana de una determinada muestra. Los resultados se expresaron en porcentaje de reacción total de espermatozoides con membrana funcional (+).

$$\text{Int. Memb.} = \frac{A}{A+B} \times 100$$

Donde:

Int.Memb, = Integridad de membrana (por ciento)

A = Número de espermatozoides con endósmosis positiva

B = Número de espermatozoides con endósmosis negativa

A + B = N° total de espermatozoides contabilizados (200 esp.)

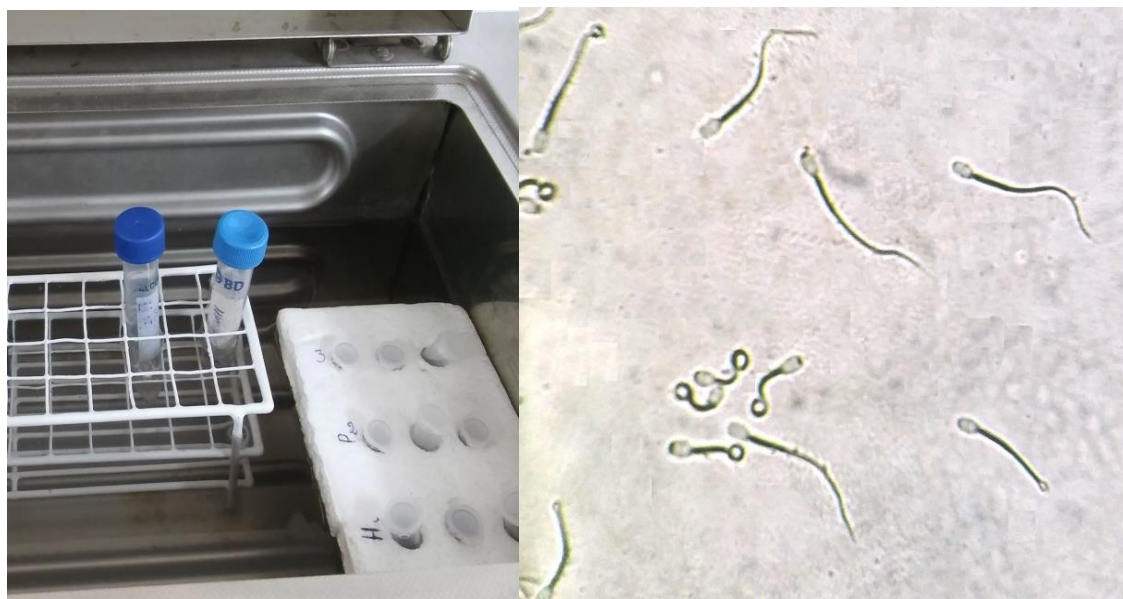


Figura 9: Evaluación de integridad de membrana en semen de carnero (HOST).

D. Procesamiento de semen

Una vez obtenido el semen, se hizo la evaluación macroscópica y microscópica, para luego continuar con el proceso que culminó con la evaluación de semen descongelado.

a. Predilución y adición de las ciclodextrinas cargadas con colesterol (CLC)

Obtenido el eyaculado, se tomó una alícuota para las evaluaciones respectivas en semen puro e inmediatamente se procedió a una predilución (1/1) agregando el dilutor en la misma proporción que el semen. El dilutor como el semen se colocó en baño María a 34 °C para que en el momento de la dilución final tengan la temperatura semejante.

Posteriormente la muestra de semen se dividió en 03 alícuotas (control sin CLC, 1 mg de CLC y 2 mg de CLC), se agregó a cada alícuota la fracción requerida, tomando en cuenta la concentración que fue de 1 mg de CLC/120 millones de espermatozoides o 2 mg de CLC/120 millones de espermatozoides, según sea el caso. Se incubó por 15 minutos a temperatura de laboratorio (a 22°C) como describe Purdy y Graham (2004).

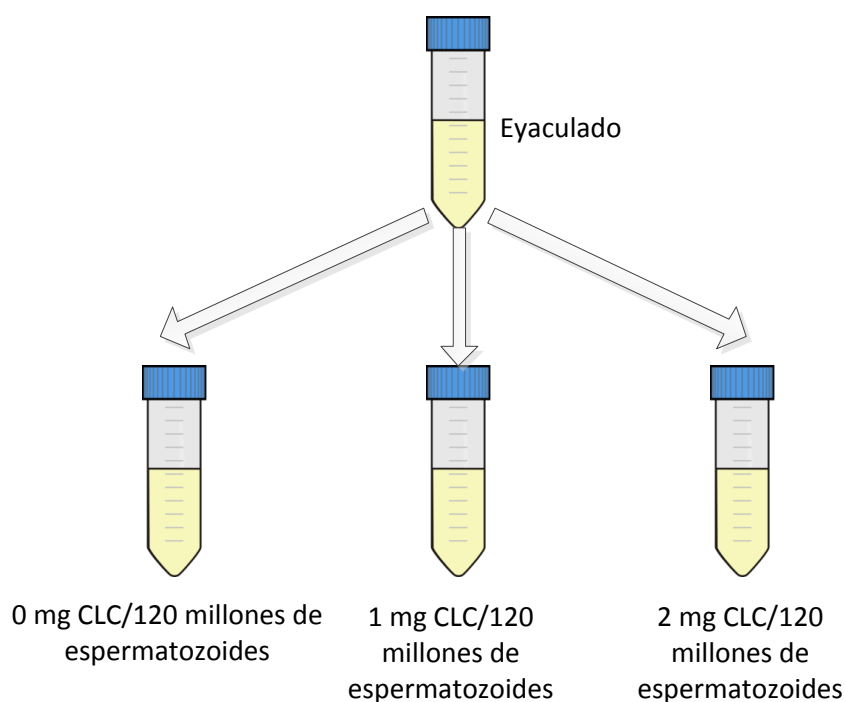


Figura 10: Esquema de adición de CLC en semen de carnero.

b. Dilución final

La muestra de semen, fue diluida hasta obtener una concentración final de 60 millones de espermatozoides/ml, de tal manera que cada dosis de 0,5ml tenga un número aproximado de 30 millones de espermatozoides.

El cálculo de la dilución, fue determinado por la siguiente fórmula:

$$V_f = \frac{V_i * C_i}{(60 * 10^6)} \quad ; \quad V_t = V_f - V_i$$

Dónde:

Vf: Volumen final de la muestra (en ml).

Vi: Volumen inicial de la muestra (en ml).

Ci: Concentración inicial de la muestra (por 10⁶ espermatozoides/ml).

Vt: Volumen total de dilutor a agregar (en ml) a la muestra.

El dilutor se agregó en un solo paso, previamente es calentado en baño maría a una temperatura de 34°C, para evitar el choque térmico de los espermatozoides; y se vertió lentamente por las paredes del tubo colector, y fue homogenizado suavemente.

c. Fraccionamiento del semen en pajillas

Se homogenizó bien el semen diluido antes de proceder al llenado de las pajillas. Las pajillas (Cassou IMV Technologies, Francia) de 0,5 ml impresas con su respectiva identificación se cargaron mediante el uso de una bomba al vacío, aspirando a través del tapón triple (algodón-alcohol polivinílico-algodón) y sumergiendo el extremo sin tapón en el semen que se encontraba en un contenedor especial. El alcohol polivinílico del tapón triple gelifica y sella en contacto con el líquido. Para proceder al sellado de las pajillas, se las tomaron del extremo con tapón (para no transmitir el calor de la mano al semen), se creó una burbuja de aire mediante el uso de un peine y se selló dicho extremo con golpes suaves y perpendiculares sobre una placa de vidrio que contenía alcohol polivinílico.

Inmediatamente se sumergieron en un recipiente con agua a 22 °C para que gelifique y selle el tapón recientemente formado.

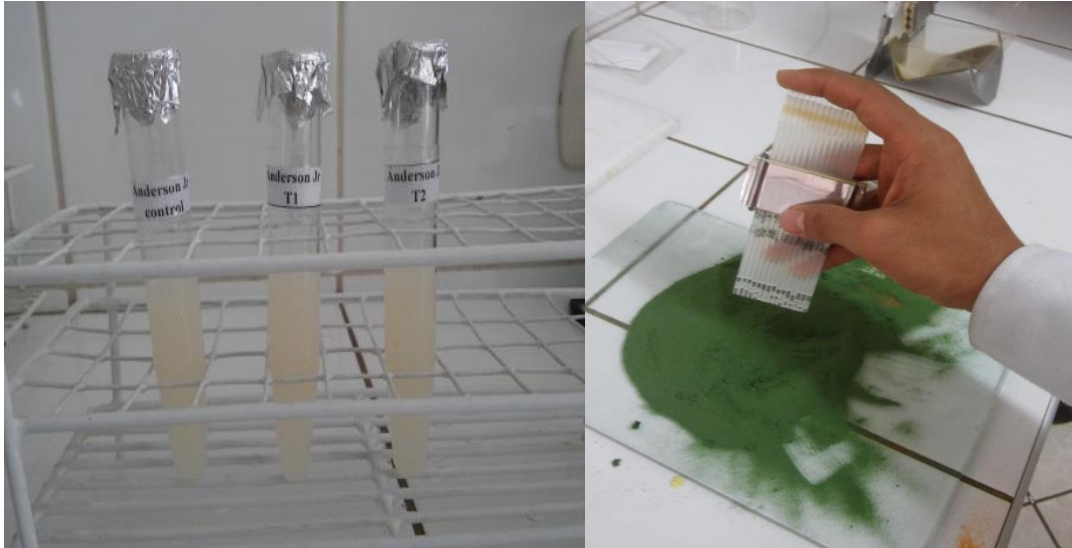


Figura 11: Dilución final y empajillado de semen de carnero.

d. Descenso de temperatura y tiempo de estabilización

Ubicadas las pajillas en los recipientes con aguase inició el descenso de temperatura, para lo cual se llevó el semen a refrigeración, acompañado de un termómetro de fácil lectura. El semen inició un descenso desde 22 a °C a 5 °C en dos horas aproximadamente. Este descenso se logró regulando previamente la refrigeradora a 5 °C.

A la fase de descenso de temperatura le siguió la de equilibrio. En esta fase, el semen permaneció en la refrigeradora a 5 °C durante 18 horas, según las recomendaciones de Quispe (1998).



Figura 12: Proceso de descenso de temperatura y estabilización de semen de carnero.

e. Congelación de semen en pajillas

Se contó con una caja de tecnopor, con tapa, de aproximadamente 30 cm de largo por 30 cm de ancho por 30 cm de altura y una rejilla de congelamiento. Para poder controlar los vapores de nitrógeno se dispuso en la base interna de la caja de tecnopor de una resistencia eléctrica de 220 voltios, la cual estuvo conectada a un cable con su respectivo interruptor y enchufe.

Se puso nitrógeno líquido en la caja de tecnopor hasta 8 cm respecto del fondo. Se tapó por unos minutos hasta que cese la ebullición y se enfríe su interior. Luego de secar las pajillas, se colocaron en el marco de aluminio apoyando sólo sus extremos y cuidando de que no se toquen entre sí. Las pajillas estuvieron a una altura de 6 cm del nivel de nitrógeno y permanecieron así durante 6 minutos hasta alcanzar la temperatura de -120°C , siendo la curva de congelación de $-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$, según recomendaciones de Pérez, (2011). Finalmente las pajillas se sumergieron directamente en el nitrógeno líquido.



Figura 13: Congelación y almacenamiento de pajillas de semen carnero.

f. Almacenado

Culminada la congelación se realizó inmediatamente la observación de la motilidad como parte de un control de calidad previo al almacenado, hecho esto se ubicó las pajillas congeladas en los globets y porta globets y posteriormente fueron introducidas y colocadas

en las canastillas dentro del tanque de nitrógeno, para ser almacenadas a -196°C hasta sus posteriores evaluaciones.

g. Descongelado

La descongelación se hizo después de 7 días de congelada la muestra, utilizando para esto una pinza de plástico, se procedió a sacar las pajillas del tanque de nitrógeno. El descongelamiento se realizó a una temperatura de 38°C , se llevó a cabo en un termo descongelador por un tiempo aproximado de 15 a 25 segundos.

h. Evaluación del semen post descongelamiento

De las muestras descongeladas, se evaluó la motilidad, vitalidad, anormalidades y funcionalidad de membrana espermática.

3.6 Tratamientos experimentales

T1: 0 mg de CLC/120 millones de espermatozoides

T2: 1 mg de CLC/120 millones de espermatozoides

T3: 2 mg de CLC/120 millones de espermatozoides

3.7 Análisis estadístico de datos

Para el caso de las características macro y microscópicas del semen fresco se utilizó la estadística descriptiva, determinándose sus promedios y desviaciones estándar.

Los datos porcentuales se transformaron angularmente por medio del arcoseno para acercarlos a una distribución normal.

$$Y = \arcsin \sqrt{\frac{x}{100}}$$

Donde:

Y = Valor transformado

x = Valor porcentual

Para la determinación del efecto de las ciclodextrinas cargadas de colesterol sobre la motilidad, vitalidad, anormalidades y funcionalidad de la membrana espermática se realizó un análisis de Diseño en Bloques Completamente al Azar con submuestreos. Para la comparación múltiple de medias se aplicó la prueba de Tukey.

Modelo aditivo lineal

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_j + \varepsilon_{ij} + \delta_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = Es la motilidad de la j-ésima repetición al aplicarse el i-ésimo tratamiento de CLC

μ = Media general

τ_i = Efecto del i-ésimo tratamiento de CLC

β_j = Efecto del j-ésimo genotipo

ε_{ij} = Error experimental

δ_{ijk} = Error del muestreo

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Efecto del colesterol sobre la viabilidad del semen refrigerado post equilibrio

Tabla 9: Características del semen refrigerado post equilibrado tratado con metil- β -ciclodextrinas saturadas de colesterol.

Variable	0 mg CLC/120 x 10 ⁶ espermatozoides	1 mg CLC/120 x 10 ⁶ espermatozoides	2 mg CLC/120 x 10 ⁶ espermatozoides
Motilidad total (%)	90.98 \pm 2.35 a	91.96 \pm 1.66 a	92.52 \pm 2.00 a
Motilidad progresiva (%)	83.88 \pm 4.82 a	85.32 \pm 4.41 a	86.53 \pm 4.06 a
Inmóviles (%)	9,02 \pm 2,35 a	8,04 \pm 1,66 a	7,49 \pm 2,00 a
Vitalidad (%)	85.79 \pm 4.55 a	87.23 \pm 4.51 a	88.34 \pm 4.73 a
Anormalidades espermáticas (%)	7.50 \pm 1.38 a	7.77 \pm 1.63 a	8.33 \pm 1.71 a
HOST (%)	86.61 \pm 3.99 a	87.81 \pm 3.67 a	88.08 \pm 3.62 a

Letras diferentes en la fila muestran diferencias estadísticas entre las medias ($p < 0.05$).

a. Motilidad espermática

La motilidad total y progresiva después de la fase de estabilización en la etapa de refrigerado, fue de 90.98 por ciento y 83.88 por ciento para T1, 91.96 por ciento y 85.32 por ciento para T2 y de 92.52 por ciento y 86.53 por ciento para T3 (tabla 9). Estos resultados son superiores a los obtenidos por Spalekova *et al.* (2014), el cual obtuvo una motilidad total y progresiva de 47.55 por ciento y 40.60 por ciento, 59.58 por ciento y 54.01 por ciento, 43.21 por ciento y 35.04 por ciento, 62.93 por ciento y 59.38 por ciento,

al evaluar efecto de la cafeína después de 24 h de incubación en condiciones de enfriamiento con concentraciones de 0, 1, 2 y 4 mmol·l⁻¹.

Resultados similares en motilidad individual progresiva fueron obtenidos por Delgado (2013), el cual reporta 86.94 por ciento y 82.44 por ciento al evaluar la calidad espermática de muestras de semen de ovino tratadas por la técnica de gradiente de densidad con respecto a muestras no tratadas refrigeradas por 24 horas a 5°C. Cabrera *et al.* (2010), también reportan porcentajes de motilidad cercanos al evaluar el efecto de los dilutores, Tris- Fructosa-Yema de huevo y Citrato-Glucosa-Yema de huevo, mostrando 84.55 por ciento y 83.33 por ciento para la raza Assaf.

b. Vitalidad espermática

Los porcentajes de vitalidad obtenidos en esta etapa fueron de 85.79 por ciento, 87.23 por ciento y 88.34 por ciento para T1, T2 y T3 respectivamente (tabla 9). Estos resultados son ligeramente superiores a los obtenidos por Apaza (2017), quien muestra una vitalidad de 81.79 por ciento, 81.97 por ciento, 80.57 por ciento y 72.56 por ciento al evaluar dilutores con yema de huevo de gallina criolla (T1), de gallina de granja (T2), de codorniz (T3) y de paloma (T4), respectivamente. De igual forma, Dinatolo (2011), muestra resultados inferiores en vitalidad a las 24 horas de refrigeración en muestras de semen de carnero diluido en Triladyl® y Triladyl® con el agregado de 100 mOsm de trehalosa, mostrando 56.67 por ciento y 70.00 por ciento respectivamente.

c. Anormalidades espermáticas

Las anormalidades para T1, T2 y T3 fueron de 7.50 por ciento, 7.77 por ciento y 8.33 respectivamente (tabla 9). Apaza (2017), reporta porcentajes de anormalidades de 2.18 por ciento, 1.36 por ciento, 1.47 por ciento y 4.74 por ciento en semen refrigerado con dilutores a base de diferentes tipos de yema de huevo; siendo estos resultados inferiores a los encontrados en esta investigación.

d. Prueba de HOST

Los porcentajes de integridad de membrana fueron de 86.61 por ciento para T1, 87.81 por ciento para T2 y de 88.08 por ciento para T3 (tabla 9). Castro *et al.* (2017), reportan resultados inferiores a esta investigación mostrando porcentajes de 83.50 por ciento para carneros Assaf y 82.56 por ciento para Blackbelly en integridad de la membrana espermática de semen diluido en Tris-fructosa-yema de huevo. Vargas (2015), también reporta resultados inferiores con una integridad de membrana de 67.33 por ciento, 49.93 por ciento, 46.93 por ciento para el efecto de tres dilutores (Tris, agua de coco y leche UHT), al momento de la refrigeración (5°C).

Cabrera y Pantoja (2008), también reportan una proporción de espermatozoides con membrana intacta más baja que en esta investigación para semen refrigerado, evaluada por la prueba de HOST (Hipo Osmotic Swelling Test), la cual fue de 77.9 ± 4.8 y 78.9 ± 4.0 por ciento, al evaluar el efecto de los dilutores Tris y Ovine Freezing, respectivamente, existiendo diferencias altamente significativas entre dilutores ($p < 0.01$).

En base a los resultados obtenidos después de la estabilización de las muestras, se puede observar pequeñas diferencias numéricas a favor del tratamiento con CLC; pero no existe diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos en todas las características evaluadas ($p < 0.05$).

A pesar de no haber diferencia significativa entre los tratamientos, lo anteriormente mostrado sigue la tendencia de los resultados mostrados en la investigación de Salmon (2016), el cual encontró que al someter a choque de frío (0°C por 20 min) en los espermatozoides de carnero se reduce la motilidad y la integridad de la membrana del espermatozoide no tratado, sin embargo, el esperma tratado con 0.25, 0.5, 1, 2 y 4 mg de CLC / 120×10^6 protege mejor la calidad del esperma (motilidad y vitalidad) después del shock frío con una concentración óptima de 2 mg de CLC / 120×10^6 espermatozoides que corresponde a 100 µg de colesterol exógeno.

En esta fase se observa en todos los casos que hay una disminución en los diferentes parámetros evaluados respecto al semen fresco, siendo más evidentes en aquellas muestras

que no han sido tratadas con CLC; esto debido al efecto del shock frío, ya que evidentemente durante el tiempo de adaptación y depósito a 5°C ocurren cambios estructurales y funcionales de la membrana (Busch y Waberski, 2010).

4.2 Efecto del colesterol sobre la viabilidad en la criopreservación del semen

Tabla 10: Efecto de la adición de metil-β-ciclodextrina saturada de colesterol sobre las características microscópicas post descongelación.

Variable	0 mg CLC/120 x 10⁶ espermatozoides	1 mg CLC/120 x 10⁶ espermatozoides	2 mg CLC/120 x 10⁶ espermatozoides
Motilidad total (%)	65.34 ± 5.94 b	68.68 ± 5.54 b	75.27 ± 5.7 a
Motilidad progresiva (%)	55.13 ± 7.59 b	56.07 ± 7.83 b	61.83 ± 7.12 a
Inmóviles (%)	34.66 ± 5.94 a	31.32 ± 5.54 a	24.73 ± 5.7 b
Vitalidad (%)	56.58 ± 7.34 b	60.70 ± 8.01 ab	66.23 ± 7.99 a
Anormalidades espermáticas (%)	9.60 ± 1.99 a	10.13 ± 1.94 a	11.23 ± 1.96 a
HOST (%)	50.54 ± 7.17 b	56.49 ± 7.43 b	63.71 ± 5.9a

Letras diferentes en la fila muestran diferencias estadísticas entre las medias (p<0.05).

Los porcentajes de espermatozoides móviles totales, móviles progresivos, vivos y con membrana citoplasmática intacta fueron superiores cuando las muestras fueron tratadas con metil-β-ciclodextrina cargada de colesterol previamente a la criopreservación comparado con el tratamiento control, habiendo diferencias estadísticas altamente significativas (p<0.05) en todas estas variables; a excepción de los móviles progresivos que presentaron diferencias estadísticas solamente significativas (p<0.05), siendo la mejor dosis la de una

concentración de 2 mg de CLC/120x10⁶ de espermatozoides (T3). Las medias de la variable de anomalías espermáticas no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (p<0.05).

a. Motilidad espermática

La motilidad total y progresiva para T1 fue de 65.34 por ciento y 55.13 por ciento, para T2 de 68.68 por ciento y 56.07 por ciento y para T3 de 75.27 por ciento y 61.83 por ciento respectivamente (tabla 10), de tal manera que con el tratamiento de las muestras con CLC se obtuvo como máximo un 9,93 por ciento más de motilidad total y un 6,7 por ciento más de móviles progresivos respecto al grupo control; estos resultados aunque son menores, concuerdan con los resultados positivos obtenidos por Batissaco (2014), quién después de la descongelación de muestras tratadas con 0 (Control, sólo tris) y 2 mg de CLC/120 x 10⁶ de espermatozoides (tris con ciclodextrina + colesterol) obtuvo una motilidad total de 49.02 por ciento y 65.49 por ciento y una motilidad progresiva de 26.19 por ciento y 37.39 por ciento, siendo la diferencia en motilidad total y progresiva de 16.47 por ciento y 11.1 por ciento respectivamente de las muestras tratadas respecto al control.

A su vez Mocé *et al.* (2010), también lograron mejores resultados en motilidad al tratar semen de carnero con metil-beta-ciclodextrina precargada con colesterol a una concentración de 0, 1 y 2 mg de CLC/120 x 10⁶ espermatozoides, obteniendo una motilidad total y progresiva de 33 por ciento y 25 por ciento con 0 mg de CLC, 39 por ciento y 29 por ciento con 1 mg de CLC, y 48 por ciento y 36 por ciento con 2 mg de CLC.

Los resultados de motilidad obtenidos en esta investigación son superiores a los obtenidos por Purdy *et al.* (2010), los cuales al tratar muestras de semen de carnero con metil-beta-ciclodextrina cargada de colesterol durante 15 minutos a 23 °C, diluidas con el medio Tris-yema-glicerol, refrigeradas y estabilizadas a 5 °C durante 24 h previo a la congelación, obtuvieron una motilidad total y progresiva de 36 por ciento y 18 por ciento con 0 mg CLC/120 x 10⁶ espermatozoides y 38 por ciento y 19 por ciento con 2 mg CLC/120 x 10⁶ espermatozoides; de tal manera que el tratamiento con 2 mg sólo tuvo un 2 por ciento más de móviles totales y 1 por ciento más de móviles progresivos que el control.

Con el tratamiento de los espermatozoides con CLC las mejoras pueden ser tan pequeñas como 2 por ciento (Purdy *et al.*, 2010), o pueden ser tan elevadas como 24 por ciento (Moraes *et al.*, 2010). Esto es debido a que además de las diferencias en la forma en que los espermatozoides de diferentes especies se ven afectados por el tratamiento de CLC, los espermatozoides de diferentes individuos dentro de una especie o líneas dentro de una especie pueden responder de manera diferente a la CLC (Mocé *et al.*, 2010).

De esta manera, los espermatozoides de sementales que normalmente no se criopreservan bien (clasificados como "congeladores malos") se benefician más del tratamiento de CLC que los espermatozoides de sementales que normalmente se crioconservan bien (Moore *et al.*, 2005) y en el caso de carneros se destacan mayores beneficios para el grupo de intermediaria congelabilidad, en el cual los parámetros de motilidad total e integridad de la membrana acrosomal se igualan estadísticamente al mismo semen en fresco (Batissaco, 2014). Además, dentro de los factores responsables de esta variabilidad de resultados, se debe considerar que en los distintos experimentos se han usado diferentes tipos de diluyentes, temperaturas de incubación con las CLC y protocolos refrigeración y congelación de las muestras.

b. Vitalidad espermática

El porcentaje promedio de vitalidad en esta investigación fue de 56.58 por ciento para T1, 60.70 para T2 y de 66.23 para T3 (tabla 10), siendo este último el cual mostró mejores resultados en comparación con los otros grupos ($p < 0.05$); mostrando 9,65 puntos porcentuales más respecto al grupo control. Estos resultados se muestran muy similares a los obtenidos por Motamedi *et al.* (2014), los cuales reportan una vitalidad de 23.7 por ciento, 33.9 por ciento, 31.4 por ciento y 30.7 por ciento para muestras tratadas con 0, 1.5, 3 o 4.5 mg de CLC/120 x 10⁶ de células respectivamente en diluyente Tris, siendo la mayor diferencia lograda respecto al control de 10.2 puntos porcentuales con el tratamiento de 1.5 mg; que no es una dosis igual pero sí muy similar a la dosis en la que se obtuvo los mejores resultados en esta investigación.

Las evidentes efectos protectores del colesterol en las membranas espermáticas, reflejadas en mayores porcentajes de vitalidad se dan debido a que el colesterol cumple varias

funciones en las membranas celulares, atribuyéndosele la estabilización de la membrana, la disminución de la permeabilidad de la membrana, permite las interacciones entre células, influye en la transición de fase de membrana, proporciona microambientes adecuados (químicos y / o físicos), y siendo un antioxidante de membrana (Crockett, 1998). Por lo tanto con la adición de la concentración más alta de CLC (2 mgCLC/120 x 10⁶ de espermatozoides) se proporciona una mayor protección a los espermatozoides ante los efectos perjudiciales de la congelación, logrando así mayores tasas de células espermáticas viables incrementando el potencial fertilizante de las mismas.

c. Anormalidades espermáticas

En cuanto a las anormalidades, los resultados indican que con la mayor concentración de CLC la proporción de espermatozoides anormales fue mayor, siendo el porcentaje de espermatozoides anormales de 9,60 por ciento para T1, 10.13 por ciento para T2 y 11,23 por ciento para T3 (tabla 10); a pesar de no haber diferencia estadística ($p < 0.05$), estos resultados muestran la misma tendencia de los resultados mostrados por Batissaco (2014), el cual obtiene anormalidades del 22.75 por ciento y 28.66 por ciento sin encontrar tampoco diferencia estadística ($p < 0.05$), luego de evaluar muestras descongeladas tratadas con 0 (Control, sólo tris) y 2 mg de CLC/120 x 10⁶ de espermatozoides (tris con ciclodextrina + colesterol) previamente a la congelación.

Las diferencias presentadas entre los grupos respecto a los porcentajes de anormalidades se deben principalmente a que los espermatozoides tratados con CLC presentaban mayores cantidades de colas dobladas; tal como lo afirma Batissaco (2014), quién demostró que con la retirada de colesterol de las membranas se reducen las anormalidades espermáticas menores y con el incremento sucede lo contrario. Además es de esperarse que se produzca un aumento en los porcentajes de defectos morfológicos en espermatozoides al pasar por el proceso de criopreservación (Verstegen, 2002).

d. Prueba de HOST

Los porcentajes de espermatozoides con membrana intacta para T1 fueron de 50.54 por ciento, para T2 de 56.49 por ciento y para T3 fue de 63.71 por ciento (tabla 10), habiendo diferencias altamente significativas entre los diferentes tratamientos ($P < 0.05$); siendo

relativamente mayor el grado de protección obtenido al adicionar 2 mg de CLC respecto al grupo control. La diferencia porcentual en integridad de membrana entre el mejor tratamiento y el control fue de 13.17 por ciento, siendo esto superior al grado de protección obtenido por Salmon (2016), el cual obtuvo una integridad de membrana del esperma de 21 por ciento y 29.6 por ciento después de la descongelación en el grupo control (Triladyl®) y el grupo suplementado a base de leche desnatada + CLC (2 mg de CLC/120 x 10⁶ espermatozoides) respectivamente y también por lo mostrado por Purdy *et al.* (2010), los cuales reportan una integridad de membrana de 41 por ciento y 49 por ciento con el tratamiento de 0 y 2 mg CLC/120 x 10⁶ espermatozoides respectivamente.

Por su parte Mocé, *et al.* (2010), obtuvieron mejores diferencias reportando 16 por ciento, 29 por ciento y 39 por ciento de integridad de membrana en muestras de semen de carnero tratadas con 0, 1 o 2 mg de CLC/120 x 10⁶ de espermatozoides previo a la congelación. Estos resultados más elevados en la conservación de la calidad de integridad de membrana respecto a la presente investigación podría deberse, a que los animales congeladores malos tratados con CLC presentan mejores resultados en lo referente al grado de protección de la membrana espermática y demás características, y como se pudo evidenciar en el desarrollo de la presente investigación se usaron animales considerados como congeladores buenos (\geq 60 por ciento de motilidad total pos-descongelación). De tal manera que la cantidad de colesterol requerida para lograr una protección adecuada de la membrana espermática sería menor a la que podrían necesitar los animales con ratios colesterol-fosfolípidos menores, considerados malos congeladores.

Las diferencias individuales de los animales se ven reflejadas en los resultados del análisis del presente estudio, en el cual se observan para todas las características evaluadas diferencias estadísticamente significativas entre individuos ($p < 0.05$), lo cual es un indicativo de que el genotipo animal tendría influencia en el mayor o menor efecto protector de la adición de CLC sobre el esperma.

Habría que considerar que, si bien, la adición de la dosis 2 mg de CLC/120 x 10⁶ de espermatozoides mejora la integridad de membrana, al mismo tiempo, los resultados son menores si la concentración excede esta concentración recomendada; es decir, si es igual o mayor a 4 mg/120 x 10⁶ de espermatozoides (Mocé *et al.*, 2010), no siendo del todo

beneficioso adicionar más colesterol del que la membrana plasmática necesita, ya que los resultados no son tan buenos como los obtenidos al usar la dosis adecuada.

El incremento de la tolerancia osmótica de los espermatozoides puede ser otra forma mediante la cual el tratamiento con CLC aumenta la criosupervivencia de los espermatozoides (Mocé *et al.*, 2010). Quienes también concuerdan con esto son Salmon *et al.* (2016), los cuales de acuerdo a sus resultados confirmaron que el tratamiento de CLC mejora la resistencia de los espermatozoides al choque de frío y la resistencia al estrés osmótico, además de aumentar el contenido de colesterol de su membrana.

Por medio del uso de ciclodextrinas, es posible manipular el contenido de colesterol celular, cambiando las condiciones que van desde el enriquecimiento neto de colesterol hasta el agotamiento; además, nos otorga un método apropiado, preciso y reproducible para modificar el contenido de colesterol de células (Christian *et al.*, 2007).

El tratamiento de los espermatozoides de carnero con CLC puede aumentar el contenido de colesterol de los espermatozoides en más de 1,9 veces y aunque se tienen pérdidas de algo de colesterol en el enfriamiento y la criopreservación, el contenido de colesterol se conserva en mayor proporción en los espermatozoides tratados con CLC respecto aquellos no tratados (Mocé *et al.*, 2010). Ante temperaturas reducidas un incremento en el contenido de colesterol puede asegurar la estabilidad de las membranas que de otro modo se vería alterado (Crockett, 1998).

Este colesterol adicional elevaría la relación colesterol: fosfolípidos (> 0.8), similares a los espermatozoides de especies que no son sensibles al choque frío. Por lo tanto, el tratamiento del semen con CLC reduciría el daño a los espermatozoides inducido por los cambios de temperatura durante la criopreservación (Mocé *et al.*, 2010a). Así, la adición de CLC a los diluyentes mejora la viabilidad de los espermatozoides y reduce el daño del acrosoma posteriores a la congelación/descongelación (Tomás *et al.*, 2014).

Los resultados de esta investigación evidencian los efectos positivos que proporcionan las ciclodextrinas cargadas de colesterol al ser adicionadas al semen de carnero, en especial al

usar la dosis de 2 mg por cada 120×10^6 de espermatozoides; lo que nos indicaría que esta es la dosis efectiva para elevar el contenido de colesterol de la membrana espermática y lograr los mejores resultados en términos de protección contra los efectos nocivos del proceso de congelación.

V. CONCLUSIONES

1. 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 tratamientos.
2. Se determinó que los mejores resultados en viabilidad espermática post descongelación fueron obtenidos con el tratamiento T3 (2 mg de CLC/120 millones de espermatozoides), en comparación con los demás tratamientos.
3. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos en todas las características evaluadas en el semen refrigerado post estabilización térmica.

VI. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda la adición de ciclodextrinas cargadas de colesterol a los espermatozoides de semen de carnero para mejorar la efectividad de los protocolos de criopreservación utilizados actualmente.
2. Realizar investigaciones en las que no solamente se busque disminuir los daños estructurales producidos por la criopreservación mediante la adición de colesterol; si no que, también se complementen con la evaluación de diferentes métodos para reducir los daños bioquímicos y así establecer protocolos mucho más eficaces aún.
3. Sería importante realizar estudios apropiados para determinar si el tratamiento con CLC afecta el tiempo de capacitación de los espermatozoides y a su vez realizar trabajos en donde se pruebe la fertilidad en vivo con protocolos modificados que se acoplen a los tiempos de capacitación presumiblemente modificados al adicionar colesterol a los espermatozoides.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, E; AKSOY, M; SERIN, I; KÜÇ, N; CEYLAN, A; UC, U. 2013. Cholesterol loaded cyclodextrin pretreatment of ram spermatozoa protects structural integrity of plasma membrane during osmotic challenge and reduces their ability to undergo acrosome reaction in vitro. *Small Ruminant Research* 115 (2013) 77– 81.

ALBERTS, B; BRAY, D; LEWIS, J; RAFF, M; ROBBERTS, K; WATSON, J. 1994. *Biología molecular de la célula*. 2ª edición. Ediciones Omega, S.A. Barcelona, España. 1300 p.

ALBERTS, B; BRAY, D; HOPKIN, K; JOHNSON,A; LEWIS, J; RAFF, M; ROBERTS, K; WALTER, P. 2011. *Introducción a la biología celular*. Editorial Médica Panamericana, S.A. de C.V. 3ª edición. México D.F, México. 732 p.

AMANN, R. 1999. Cryopreservation of sperm. *Encyclopedia of Reproduction*, Academic Press volume 1, 773-783.

AMANN RP; WABERSKI, D. 2014. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology*. Volume 81, Issue 1, 1 January 2014, Pages 5-17.e3.

ANGULO, R; ORTÍZ, A; BERRUECOS, J; FELDMAN, D; VALENCIA, J. 1999. Motilidad y fertilidad del semen de carnero descongelado a dos diferentes ritmos de temperatura. *Vet. Méx* 30(3) 1999.

ANZAR, M; HASSAN, MM; GRAHAM, EF; DEYO, RCM; SINGH, G. 1991. Efficacy of the Hamilton Thorn motility analyzer (HTM-2030) for the evaluation of bovine semen. *Theriogenology*, 36: 307-317.

APAZA, L. 2017. Efecto protector de yema de huevo en la viabilidad de semen congelado de carnero. Tesis Médico Veterinario y Zootecnista. Universidad Nacional del Altiplano, Puno. 140p.

ARRAZOLA, A. 1994. Biología de la membrana celular. *Nefrología (Madr.)* 14(4):418-426.

ÁVILA, L; MADERO, J; LÓPEZ, C; LEÓN, M; ACOSTA, L; GÓMEZ, C; LOZANO, J; REGUERO, M. 2006. Fundamentos de criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología* Vol. 57 No. 4 (291-300).

BATISSACO, L. 2014. Criopreservação do sêmen ovino com incorporação de colesterol por ciclodextrina. Tesis Master en Ciencias. São Paulo: Universidad de São Paulo. 113 p.

BERGERON, A; MANJUNATH, P. 2006. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Molecular Reproduction and Development* 73, 1338-1344.

BORGES, JC; SILVA, MR; GUIMARÃES, JD; ESPER, CR; FRANCESCHINI, PH. 2011. Membrana plasmática de espermatozoides bovinos: efeito de metabólitos do oxigênio, antioxidantes e criopreservação. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.35, n.3, p.303-314.

BOSCARATO, A; MARTINS, L. 2014. Uso de colesterol na criopreservação espermática e fertilidade: uma revisão. *Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR, Umuarama*, v. 17, n. 2, p. 143-148.

BUSCH, W; WABERSKI, D. 2010. Manual de inseminación artificial de los animales domésticos y de explotación zootécnica. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España. 368 p.

CABRERA, P; PANTOJA, C. 2008. Influencia de los dilutores tris y ovine freezing sobre la integridad de la membrana citoplasmática durante la congelación de semen de ovinos en pajillas de 0.5 ml. *Rev Inv Vet Perú*; 19 (2): 152-159.

CABRERA, P; ORELLANA, J; PANTOJA, C. 2010. Efecto de dos dilutores sobre la motilidad e integridad de la membrana espermática en semen congelado de ovinos. *Rev. Investig. Vet.* 21 (2): 154 - 160.

CALLEN, JC. 2000. *Biología celular de las moléculas a los organismos*. Editorial continental, México D.F, México. 448 p.

CASTRO, J; CHIRINOS, D; ORELLANA, J. 2017. Calidad del Semen Refrigerado de Carneros Assaf y Blackbelly. *Rev Inv Vet Perú* 2017; 28(3): 764-770.

CHRISTIAN, AE; HAYNES, MP; PHILLIPS, MC; ROTHBLAT, GH. 2007. Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *Journal of Lipid Research*. Volume 38, 1997, 2262–2272.

COOPER, G; HAUSHAN, R. 2008. *La célula*. Marban Libros S.L. 4ª edición. Madrid, España. 818 p.

CROCKETT, EL. 1998: Cholesterol function in plasma membranes from ectotherms: membrane-specific roles in adaptation to temperature. *Am Zool*38, 291–304.

CROSS, N. 1998. .Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol Reprod*, v.59, p 7-11.

CURRY, M. 2000. Crypreservation of semen from domestic livestock. *Reviews of Reproduction* 5, 46-52.

DARIN-BENNETT, A; WHITE, I. 1977. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology* 14, 466-470.

DAVIS, BK; BILAYER, L. 1980. Interaction of Lipids with the Plasma Membrane of Sperm Cells. I. The Antifertilization Action of Cholesterol. *Archives of Andrology*, 5:3, 249-254.

DAVIS, ME; BREWSTER, M.E. 2004. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future, *Nat. Rev., Drug Discov.* 3 1023–1035.

DE ROBERTIS, E; HIB, J. 2004. Fundamentos de biología celular y molecular de De Robertis. Editorial El Aleneo. 4ª edición. Buenos Aires, Argentina. 442 p.

DELGADO, B. 2013. Evaluación espermática de semen de ovino tratado por la técnica de gradiente de densidad. Tesis Licenciada en Biología. Universidad Ricardo Palma, Lima. 98p.

DINATOLO, E. 2011. Efecto de la trehalosa en la viabilidad de semen ovino refrigerado. Trabajo Final de Ingeniería en Producción Agropecuaria. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Católica Argentina. 63 p.

EK, JE; AKÉ, JR; SILVA, CA. 2009. Efecto de dos diluyentes sobre la viabilidad del semen congelado de ovinos de pelo. Bioagrociencias enero - junio de 2009 Vol. 2 No. 1: 4-13.

FARSHAD, A; AMIDI, A; KOOHI ,A; RASHIDI, A. 2001. Effect of Cholesterol-loaded-cyclodextrin in Presence and Absence of Egg Yolk during Freezing Step on Quality of Markhoz Buck's Spermatozoa. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 24(2):181-189.

GIBBONS, A; CUETO, M. 1995. Manual de inseminación artificial en la especie ovina. Reproducción y Genética. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Estación Experimental Agropecuaria Bariloche. Centro Regional Patagonia Norte. 19 p.

GILLAN, L; EVANS, G; MAXWELL, WC. 1997. Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. Reproduction, Fertility and Development 9, 481-487.

GODOY, V. 2006. Caracterización de microdominios lipídicos en membranas apicales de sinciotrofoblasto placentario humano. Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico. Universidad de Chile, Santiago. 61p.

GONZÁLEZ, F; ARRIAGADA, E. 2008. Manual de biología celular para la carrera de enfermería. Facultad de Ciencias Biológicas. Departamento de Biología Celular. Universidad de Concepción. 248 p.

HOLT, W; WATSON, P; CURRY, M; HOLT, C. 1994. Reproducibility of computer-aided semen analysis: comparison of five different systems used in a practical workshop. *Fertility and Sterility*. Volume 62, Issue 6, December 1994, Pages 1277-1282.

HOLT, W. 2000. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology* 53, 47-58.

HU, J; HUANG, R; CAO, S; HUA, Y. 2008. Unique structure and property of cyclodextrin and its utility in polymer synthesis. *e-Polymers* 2008, no. 171, 15p.

JIMÉNEZ, L; MERCHANT, H. 2003. *Biología celular y molecular*. Pearson Educación, México. 912 p.

KRAUSE, M; REGEN, S. 2014. The Structural Role of Cholesterol in Cell Membranes: From Condensed Bilayers to Lipid Rafts. *Acc. Chem. Res.*, 47 (12), pp 3512–3521.

LEBOEUF, B; RESTALL, B; SALAMON, S. 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science* 62, 113-141.

MARTÍNEZ, G; GÓMEZ, M.A. 2007. Ciclodextrinas: complejos de inclusión con polímeros. *Rev. Iberoam. Polim.*, 8(4), 300-312.

MEDEIROS, C; FORELL, F; OLIVEIRA, A; RODRIGUES, J. 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better?. *Theriogenology* 57, 327-344.

MEGÍAS, M; MOLIST, P; POMBAL, M. 2017. *Atlas de histología vegetal y animal. La célula. Membrana celular*. Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Universidad de Vigo. 31 p.

MELLISHO, E. 2010. *Manual de Laboratorio de Reproducción Animal, Practica IV: Evaluación de Calidad Seminal*. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima.

MEZA, U; ROMERO, AY; LICÓN, Y; SÁNCHEZ, S. 2010. La membrana plasmática: Modelos, balsas y señalización. *REB* 29(4): 125-134.

MOCÉ, E; GRAHAM, JK. 2006. Cholesterol-loaded cyclodextrins added to fresh bull ejaculates improve sperm cryosurvival. *Journal of Animal Science* 84(4):826-33.

MOCÉ, E; BLANCH, E; TOMÁS, C; GRAHAM, J. a 2010. Use of Cholesterol in Sperm Cryopreservation: Present Moment and Perspectives to Future. *Reproduction in Domestic Animals*, 45: 57–66.

MOCÉ, E; PURDY, P; GRAHAM, J. 2010. Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival. *Animal Reproduction Science* 118 (2010) 236–247.

MOORE, A; SQUIRES, E; GRAHAM, J. 2005. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryobiology* 51 (2005) 241–249.

MORAES, EA; GRAHAM, JK; TORRES, CAA; MEYERS, M; SPIZZIRI, B. 2010. Delivering cholesterol or cholestanol to bull sperm membranes improves cryosurvival. *Animal Reproduction Science*. Volume 118, Issues 2–4, (148-154).

MORTIMER, S. 1997. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Hum Reprod Update*. 3(5):403-39.

MOTAMEDI, R; ROOSTAEI, M; RAJABI, R. 2014. Effect of Different Levels of Glycerol and Cholesterol-Loaded Cyclodextrin on Cryosurvival of Ram Spermatozoa. *Reprod Dom Anim*, 49: 65–70.

MUÑOZ, S; DEL CASTILLO, B; MARTÍN, MA. 1995. Las ciclodextrinas: características y aplicaciones de la formación de complejos de inclusión. *Ars Pharmaceutica*; (36-2), pag 187-98.

NAVARRETE, MH; LÓPEZ, JF. 1997. *Fundamentos de la citología animal*. Editorial Alhambra, S.A. Madrid, España. 314 p.

OSORIO, C. 2013. Valoración computarizada de la integridad funcional de la membrana plasmática, motilidad y morfología espermática en semen criopreservado de búfalo. Programa de Maestría en Reproducción Animal. LUZ.Maracaibo. 106p.

PANIAGUA, R; NISTAL, M; SESMA, P; ÁLVAREZ, M; FRAILE, B; ANADÓN, R; SÁEZ, F. 2007. Citología e histología vegetal y animal: Biología celular. Mc. Graw-Hill-Interamericana de España, S.A.U. 4ª edición, vol. 1. Madrid, España. 389 p.

PARKS, JE; LYNCH, DV. 1992. Lipid composition and thermotropic phase behaviour of boar, bull, stallion and rooster sperm membranes. *Cryobiology* 29, 255-266.

PÉREZ, U. 2011. Efecto de tres temperaturas de congelación de pajillas de semen de carnero en la viabilidad espermática. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina. 64 p.

PÉREZ, M; GARCÍA, S; KOPPS, S; DANIELE, A; GONZÁLEZ, C; ROCCIA, P. 2012. Biología celular en las ciencias agropecuarias. Editorial Brujas. 1ª edición. Córdoba, Argentina. 306 p.

PURDY, P; GRAHAM, J. 2004. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. *Cryobiology* 48, 36–45.

PURDY, P. 2005. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research* 63 (2006) 215–225.

PURDY, P; MOCÉ, E; STOBART, R; MURDOCH, WJ; MOSS, GE; LARSON, B; RAMSEY, S; GRAHAM, JK; BLACKBURN, HD. 2010. The fertility of ram sperm held for 24 h at 5 °C prior to cryopreservation. *Animal Reproduction Science* 118 (2010) 231–235.

QUISPE, F. 1998. Efecto de dos dilutores, tiempo de equilibrio y raza sobre la motilidad de semen descongelado de ovino. Tesis de Magister en Producción Animal. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina. 73 p.

RANA, AP; MAJUMDER, GC; MISRA S; GHOSH, A. 1991. Lipid changes of goat sperm plasma membrana during epididymal maturation. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes* 1061, 185-196.

RUIZ, L; SANTIANI, A; SANDOVAL, R; HUANCA, W; DELGADO, A; CORONADO, L; ALZAMORA, C. 2007. Efecto de dos antioxidantes (tempo y tempol) en la criopreservación de semen ovino empleando un dilutor en base a tris. *Rev Inv Vet Perú* 2007; 18 (2): 99-106.

SAENGER, W. 1980. Cyclodextrin Inclusion Compounds in Research and Industry. Volume 19, Issue 5, pages 344–362.

SALAMON, S; MAXWELL, WM. 2000. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science* 62, 77–111.

SALMON, VM; CASTONGUAY, F; DEMERS, V; LECLERC, P; BAILEY, JL. 2016. Cholesterol-loaded cyclodextrin improves ram sperm cryoresistance in skim milk-extender. *Animal Reproduction Science*. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2016.11.011

SANDOVAL, R. 2005. Criopreservación de semen ovino empleando diferentes dilutores y combinaciones de agentes crioprotectores permeantes y no permeantes. Tesis de Médico Veterinario. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima. 72 p.

SIMONS, K; VAZ, WL. 2004. Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 33: 269-295.

SMITH, CA; WOOD, EJ. 1997. *Biología celular*. Addison-Weslwy Iberoamericana., S.A. Wilmington, U.S.A. 367 p.

SPALEKOVÁ, E; MAKAREVICH, A; KUBOVIKOVA, E; OSTRÓ, A; CHRENEK, P. 2014. Effect of caffeine on functions of cooling-stored ram sperm in vitro. *ACTA VET. BRNO* 2014, 83: 019–025.

SPIZZIRI, B E; FOX, MH; BRUEMMER, JE; SQUIRES, EL; GRAHAM, JK. 2010. Cholesterol-loaded-cyclodextrins and fertility potential of stallions spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, v. 118, p. 255-264.

SZEJTLI, J. 2004. Past, present and future of cyclodextrin research. *Pure and Applied Chemistry*, 76 (10), pp. 1825-1845.

TOMÁS, C. 2007. Nuevos protocolos para la crioconservación de espermatozoides de macho cabrío. Tesis. Universidad Politécnica de Valencia, Valencia. 40 p.

TOMÁS, C; GÓMEZ, J; GOMEZ, E; MOCÉ, E; DE MERCADO, E. 2014. Addition of Cholesterol-Loaded Cyclodextrins to the Thawing Extender: Effects on Boar Sperm Quality. *Reprod Dom Anim* 49, 427–432.

TOMLINSON, M.J; POOLEY, K; SIMPSON, T; NEWTON, T; HOPKISSON, J; JAYAPRAKASAN, K; JAYAPRAKASAN, R; NAEEM, A; PRIDMORE, T. 2010. Validation of a novel computer-assisted sperm analysis (CASA) system using multitarget-tracking algorithms. *73 (6)*, 1911-1920.

VALDEZ, D. 2013. Efecto del dodecil sulfato iónico adicionado a un diluyente libre de yema de huevo sobre la calidad del semen ovino congelado. Tesis de Magister en Reproducción Animal. Universidad de Cuenca, Cuenca. 116 p.

VARGAS, P. 2015. Efecto del factor dilutor y raza en la integridad de la membrana espermática y acrosomal en semen crioconservado de carneros. Tesis Méd. Veterinario Zootecnista. Universidad Nacional del Altiplano, Puno. 74p.

VELÁZQUEZ, M. 2010. Tecnología de las Ciclodextrinas. Informe técnico. Universal Lab. 5p.

VERSTEGEN, J; IGUER-OUADA, M; ONCLIN, K. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Animal Reproduction Journal*. Volume 57, Issue 1, Pages 149–179.

WATSON, P. F. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction of Fertility Development*, v. 7, p. 871-891.

YANCEY, P; RODRIGUEZA, W; KILSDONK, E; STOUDET, G; JOHNSON, W; PHILLIPS, M; ROTHBLAT, G. 1996. Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. Demonstration of kinetic pools and mechanism of efflux. *J. Biol. Chem.* 271, 16026-16034.

ZAHN, F; PAPA, F; DELL'AQUA, J. 2002. Cholesterol incorporation on equine sperm membrane: effects on post-thaw sperm parameters and fertility. *Theriogenology* 58, 237-240.

VIII. ANEXOS

8.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DEL SEMEN REFRIGERADO POST ESTABILIZACIÓN

Tabla11: Análisis de varianza para la característica de motilidad total en semen refrigerado.

Fuente de Variabilidad	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F calculado	Pr>F
Bloque	3	0.02877314	0.00959105	27.43	<.0001
Tratamiento	2	0.01192594	0.00596297	2.29	0.1212 NS
Muestra(Bloque)	26	0.06767777	0.00260299	7.44	<.0001
Error	58	0.02027904	0.00034964		
Total	89	0.12865589			

Tabla12: Prueba de comparación múltiple de medias Tukey para la característica de motilidad total en semen refrigerado.

	Media	N	Tratamiento
A	92.52	30	T2
A			
A	91.96	30	T1
A			
A	90.98	30	C

Tabla13: Análisis de varianza para la característica de motilidad progresiva en semen refrigerado.

Fuente de Variabilidad	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F calculado	Pr>F
Bloque	3	0.07410746	0.02470249	25.09	<.0001
Tratamiento	2	0.02117043	0.01058521	1.43	0.2584 NS
Muestra(Bloque)	26	0.19296205	0.00742162	7.54	<.0001
Error	58	0.05711095	0.00098467		
Total	89	0.34535089			

Tabla 14: Prueba de comparación múltiple de medias Tukey para la característica de motilidad progresiva en semen refrigerado.

	Media	N	Tratamiento
A	86.53	30	T2
A			
A	85.32	30	T1
A			
A	83.88	30	C

Tabla 15: Análisis de varianza para la característica de inmóviles en semen refrigerado.

Fuente de Variabilidad	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F calculado	Pr>F
Bloque	3	0.02877314	0.00959105	27.43	<.0001
Tratamiento	2	0.01192594	0.00596297	2.29	0.1212 NS
Muestra(Bloque)	26	0.06767777	0.00260299	7.44	<.0001
Error	58	0.02027904	0.00034964		
Total	89	0.12865589			

Tabla 16: Prueba de comparación múltiple de medias Tukey para la característica de inmóviles en semen refrigerado.

	Media	N	Tratamiento
A	9.02	30	C
A			
A	8.04	30	T1
A			
A	7.49	30	T2

Tabla 17: Análisis de varianza para la característica de vitalidad en semen refrigerado.

Fuente de Variabilidad	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F calculado	Pr>F
Bloque	3	0.0470664	0.0156888	19.72	<.0001
Tratamiento	2	0.0235481	0.01177405	1.03	0.3727 NS
Muestra(Bloque)	26	0.29856864	0.01148341	14.44	<.0001
Error	58	0.04613417	0.00079542		
Total	89	0.41531732			

Tabla 18: Prueba de comparación múltiple de medias Tukey para la característica de vitalidad en semen refrigerado.

	Media	N	Tratamiento
A	88.34	30	T2
A			
A	87.23	30	T1
A			
A	85.79	30	C

Tabla 19: Análisis de varianza para la característica de anormalidades en semen refrigerado.

Fuente de Variabilidad	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F calculado	Pr>F
Bloque	3	0.02106656	0.00702219	19.56	<.0001
Tratamiento	2	0.00353321	0.0017666	1.25	0.3028 NS
Muestra(Bloque)	26	0.03671021	0.00141193	3.93	<.0001
Error	58	0.02082119	0.00035899		
Total	89	0.08213116			

Tabla 20: Prueba de comparación múltiple de medias Tukey para la característica de anormalidades en semen refrigerado.

	Media	N	Tratamiento
A	8.33	30	T2
A			
A	7.77	30	T1
A			
A	7.5	30	C

Tabla 21: Análisis de varianza para la característica de HOST en semen refrigerado.

Fuente de Variabilidad	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F calculado	Pr>F
Bloque	3	0.02904764	0.00968255	16.92	<.0001
Tratamiento	2	0.00801843	0.00400921	0.5	0.6152 NS
Muestra(Bloque)	26	0.21058261	0.00809933	14.16	<.0001
Error	58	0.03318348	0.00057213		
Total	89	0.28083216			

Tabla 22: Prueba de comparación múltiple de medias Tukey para la característica de HOST en semen refrigerado.

	Media	N	Tratamiento
A	88.08	30	T2
A			
A	87.81	30	T1
A			
A	86.61	30	C

8.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DEL SEMEN DESCONGELADO

Tabla 23: Análisis de varianza para la característica de motilidad total en semen descongelado.

Fuente de Variabilidad	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F calculado	Pr>F
Bloque	3	0.08399445	0.02799815	53.13	<.0001
Tratamiento	2	0.18958368	0.09479184	10.92	0.0004 **
Muestra(Bloque)	26	0.22567143	0.00867967	16.47	<.0001
Error	58	0.030563	0.00052695		
Total	89	0.52981256			

Tabla 24: Prueba de comparación múltiple de medias Tukey para la característica de motilidad total en semen descongelado.

	Media	n	Tratamiento
A	75.27	30	T2
B	68.68	30	T1
B	65.34	30	C

Tabla 25: Análisis de varianza para la característica de motilidad progresiva en semen descongelado.

Fuente de Variabilidad	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F calculado	Pr>F
Bloque	3	0.1090925	0.03636417	24.04	<.0001
Tratamiento	2	0.0830569	0.04152844	3.41	0.0485 *
Muestra(Bloque)	26	0.3169012	0.01218851	8.06	<.0001
Error	58	0.0877203	0.00151242		
Total	89	0.5967709			

Tabla 26: Prueba de comparación múltiple de medias Tukey para la característica de motilidad progresiva en semen descongelado.

	Media	N	Tratamiento
A	61.83	30	T2
B	56.07	30	T1
B	55.13	30	C

Tabla 27: Análisis de varianza para la característica de inmóviles en semen descongelado.

Fuente de Variabilidad	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F calculado	Pr>F
Bloque	3	0.08399445	0.02799815	53.13	<.0001
Tratamiento	2	0.18958368	0.09479184	10.92	0.0004 **
Muestra(Bloque)	26	0.22567143	0.00867967	16.47	<.0001
Error	58	0.030563	0.00052695		
Total	89	0.52981256			

Tabla 28: Prueba de comparación múltiple de medias Tukey para la característica de inmóviles en semen descongelado.

	Media	N	Tratamiento
A	34.66	30	C
A			
A	31.32	30	T1
B	24.73	30	T2

Tabla 29: Análisis de varianza para la característica de vitalidad en semen descongelado.

Fuente de Variabilidad	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F calculado	Pr>F
Bloque	3	0.24033241	0.0801108	161.17	<.0001
Tratamiento	2	0.15389325	0.07694663	6.8	0.0042 **
Muestra(Bloque)	26	0.29402123	0.01130851	22.75	<.0001
Error	58	0.02882963	0.00049706		
Total	89	0.71707653			

Tabla 30: Prueba de comparación múltiple de medias Tukey para la característica de vitalidad en semen descongelado.

	Media	N	Tratamiento
A	66.23	30	T2
A			
BA	60.7	30	T1
B			
B	56.58	30	C

Tabla 31: Análisis de varianza para la característica de anomalías en semen descongelado.

Fuente de Variabilidad	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F calculado	Pr>F
Bloque	3	0.03273205	0.01091068	37.12	<.0001
Tratamiento	2	0.01135998	0.00567999	3.34	0.0513 NS
Muestra(Bloque)	26	0.04426785	0.00170261	5.79	<.0001
Error	58	0.01704613	0.0002939		
Total	89	0.10540601			

Tabla 32: Prueba de comparación múltiple de medias Tukey para la característica de anormalidades en semen descongelado.

	Media	N	Tratamiento
A	11.23	30	T2
A			
A	10.13	30	T1
A			
A	9.6	30	C

Tabla 33: Análisis de varianza para la característica de HOST en semen descongelado.

Fuente de Variabilidad	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F calculado	Pr>F
Bloque	3	0.11208717	0.03736239	31.96	<.0001
Tratamiento	2	0.2721716	0.1360858	14.43	<.0001 **
Muestra(Bloque)	26	0.2452347	0.0094321	8.07	<.0001
Error	58	0.06780342	0.00116902		
Total	89	0.69729688			

Tabla 34: Prueba de comparación múltiple de medias Tukey para la característica de HOST en semen descongelado.

	Media	N	Tratamiento
A	63.71	30	T2
B	56.49	30	T1
B			
B	50.54	30	C

Apéndice 1: Composición de la tinción Eosina al 2%.

- Eosina = 0.2g
- Citrato de sodio dihidratado = 0.3g
- Agua bidestilada = 10ml

Apéndice 2: Composición de la tinción Nigrosina al 2%.

- Nigrosina = 0.2g
- Citrato de sodio dihidratado = 0.3g
- Agua bidestilada = 10ml

Apéndice 3: Valores normales de los parámetros espermáticos para carneros según los criterios del Laboratorio de Procesamiento de Semen del Banco Nacional de Semen de la UNALM.

Característica	Valor Normal
Color	Blanquecino – Amarillento
Aspecto	Cre moso
Volumen	≥ 0.5 ml
pH	6.2 – 7.3
Motilidad Masal	3 – 5
Motilidad Individual	$\geq 80\%$
Concentración Espermática	$\geq 2 \times 10^9$ spz/ml
Células Normales	$\geq 85\%$
Vitalidad	$\geq 70\%$
Membrana Intacta	$\geq 60\%$