



UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
CENTRO DE POSTGRADO

Maestría en
“REPRODUCCIÓN ANIMAL”

**“EVALUACIÓN DE DOS AGENTES CRIOPROTECTORES NO
PERMEABLES Y UN DILUYENTE COMERCIAL (TRILADYL) EN LA
CONGELACIÓN DE SEMEN BOVINO”**

**Tesis previa a la obtención
del título de MAGISTER EN
REPRODUCCIÓN ANIMAL**

Autor: MVZ Juan Carlos Ramón Cárdenas.

Director: Dr. MsC. Saúl Landivar Abril.

Cuenca – Ecuador

2013



RESUMEN

La criopreservación del semen es una técnica desarrollada para satisfacer sobre todo dos necesidades fundamentales: la conservación de material genético valioso por tiempo indefinido y el desarrollo de la Inseminación Artificial que representa su aplicación por excelencia un instrumento de mejora genética. Este estudio se realizó en el cantón Sucúa. Se utilizó un solo semental para controlar la variable individuo, éste se sometió a un proceso de evaluación de su capacidad de monta - libido. Posterior a esto se colectó seis eyaculados, dos por cada tratamiento y se analizó las características físico – químicas. Posterior a esto se diluyó el semen en los diferentes tratamientos: Trehalosa, Sacarosa y Triladyl, se envasó en pajillas de 0.5ml y se congeló. Después de 15 días se realizó el descongelado de 20 pajillas por tratamiento en baño María y se evaluó la motilidad, viabilidad y anormalidad espermática determinándose los efectos de cada uno de los crioprotectores utilizados, mediante un análisis de varianza y prueba de Tukey encontrándose en motilidad progresiva una tendencia $p=0,09$; Trehalosa (32,00%) y Sacarosa (29,45%), pero en comparación con el diluyente Triladyl (46,50%), este último mostró ser mejor ($p<0.05$). con relación al porcentaje viabilidad entre tratamientos el Triladyl (51,80%), fue mejor ($p<0.05$), Trehalosa (33,85%) y Sacarosa (31,85%) y no encontrándose diferencias ($p>0.05$) en relación a la variable anormalidades entre tratamientos.

Palabras claves: Trehalosa, sacarosa, triladyl, semental, libido.



ABSTRACT

Semen cryopreservation is a technique especially developed to meet two needs: the conservation of valuable genetic material for an indefinite period and the development of AI application representing an instrument par excellence breeding. This study was conducted in the canton Sucúa. Stallion was used only to control the variable individual, he underwent an evaluation process of riding ability - libido. Following this six ejaculates were collected, two from each treatment and analyzed the physico - chemical. Following this semen diluted in the different treatments: trehalose, sucrose and Triladyl, was packaged in 0.5 ml straws and frozen. After 15 days was 20 thawing straws for bath treatment and evaluated for motility and viability of sperm abnormality determining the effects of each of the cryoprotectants used, by ANOVA and Tukey test being in motility progressive trend $p = 0.09$, trehalose (32.00%) and sucrose (29.45%), but compared with the diluent Triladyl (46.50%), the latter proved to be better ($p < 0.05$). percentage relative to the Triladyl viability between treatments (51.80%) was better ($p < 0.05$), trehalose (33.85%) and sucrose (31.85%) and no differences ($p > 0.05$) in relation the variable abnormalities.

Keywords: Trehalose, sucrose, Triladyl, stallion libido.



ÍNDICE

RESUMEN	I
ABSTRACT	II
CAPÍTULO I	1
1. INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO II	4
2. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. HISTORIA DE LA CONGELACIÓN DE SEMEN.....	4
2.2. PROCESOS METABÓLICOS DE LOS ESPERMATOZOIDES.	5
2.3. CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN.....	5
2.4. REGULACIÓN DEL PH.	16
2.5. PRESIÓN OSMÓTICA.....	17
2.6. AMINOÁCIDOS.	17
2.7. AGENTES ANTIMICROBIANOS.	17
2.8. OTROS COMPUESTOS Y ADITIVOS.....	18
CAPÍTULO III	21
3. MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1. Materiales	21



Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias
3.2. Métodos..... 22

CAPÍTULO IV..... 33

4. RESULTADOS..... 33

4.1. Análisis Estadístico de las variables estudiadas..... 33

CAPÍTULO V..... 47

5. DISCUSIÓN..... 47

CAPÍTULO VI..... 51

6. CONCLUSIONES..... 51

CAPÍTULO VII..... 52

7. RECOMENDACIONES..... 52

CAPÍTULO VIII..... 53

8. BIBLIOGRAFÍA..... 53

ANEXOS..... 66



Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

Yo, Juan Carlos Ramón Cárdenas, autor de la tesis "EVALUACIÓN DE DOS AGENTES CRIOPROTECTORES NO PERMEABLES Y UN DILUYENTE COMERCIAL (TRILADYL) EN LA CONGELACIÓN DE SEMEN BOVINO", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 07 de Octubre de 2013



Juan Carlos Ramón Cárdenas
0103611604

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

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

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

Cuenca - Ecuador



Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

Yo, Juan Carlos Ramón Cárdenas, autor de la tesis "EVALUACIÓN DE DOS AGENTES CRIOPROTECTORES NO PERMEABLES Y UN DILUYENTE COMERCIAL (TRILADYL) EN LA CONGELACIÓN DE SEMEN BOVINO", reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Magister en Reproducción Animal. El uso que la Universidad de Cuenca hiciera de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autor.

Cuenca, 07 de octubre de 2013



Juan Carlos Ramón Cárdenas
0103611604

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

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

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

Cuenca - Ecuador



Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Universidad de Cuenca

Dr. Saúl Landivar Abril MsC.

CERTIFICA:

Que, una vez que he acompañado en el proceso de desarrollo de la Tesis: "EVALUACIÓN DE DOS AGENTES CRIOPROTECTORES NO PERMEABLES Y UN DILUYENTE COMERCIAL (TRILADYL) EN LA CONGELACIÓN DE SEMEN BOVINO", realizada por el Dr. Juan Carlos Ramón Cárdenas, me permito autorizar su presentación.

Cuenca, 07 de octubre del 2013

Atentamente

Dr. Saúl Landivar Abril. MsC.

DIRECTOR DE LA TESIS



Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Universidad de Cuenca


El Tribunal de Grado:

CERTIFICA:

Que ha procedido a revisar minuciosamente el Trabajo de Tesis: "EVALUACIÓN DE DOS AGENTES CRIOPROTECTORES NO PERMEABLES Y UN DILUYENTE COMERCIAL (TRILADYL) EN LA CONGELACIÓN DE SEMEN BOVINO", realizada por el Dr. Juan Carlos Ramón Cárdenas, quedando autorizada su presentación.

Cuenca, 07 de octubre del 2013

Atentamente


Dr. Carlos Vaca V. MsC.
PRESIDENTE TRIBUNAL


Dr. Luis Ayala G. PhD
MIEMBRO DEL TRIBUNAL



Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer primeramente a Dios por ser una guía espiritual y una fortaleza diaria en mi vida.

A la Universidad de Cuenca, a la Facultad de Ciencias Agropecuarias, al departamento de Postgrado, a todas las personas que hicieron posible que este trabajo investigativo se realizara, especialmente a los doctores José Luis Pesántez, Carlos Soria y Saúl Landivar por el apoyo incondicional durante la investigación.

A mi esposa e hijas, que de una u otra forma han colaborado conmigo para la presentación de la tesis final y a mi madre y hermanos que siempre han sido un ejemplo en mi vida.

JUAN CARLOS



Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

DEDICATORIA

A mi esposa María Dolores Carvallo González y a mis hijas Sol y Samantha, por ser siempre un apoyo constante en mi vida personal y profesional; que les sirva de experiencia en su vida futura en plantearse nuevas y mejores metas.

**CAPÍTULO I****1. INTRODUCCIÓN**

La congelación y descongelación de semen de toro conduce al daño o la muerte de aproximadamente el 30% de los espermatozoides, reduciendo el porcentaje de espermatozoides móviles aproximadamente en un 50% (Chaveiro et al 2006). Con el fin de evitar el daño durante el proceso de congelamiento, se han desarrollado numerosos diluyentes en base a amortiguadores de pH (tris, ácido cítrico), azúcares de bajo peso molecular (fructuosa, glucosa) que pasan a través de la membrana celular sirviendo como fuente de energía para el espermatozoide, agentes protectores de membrana (yema de huevo, leche descremada) que contienen macromoléculas que protegen contra el shock por frío, y agentes crioprotectores permeables glicerol, polialcoholes y no permeables trehalosa y sacarosa; los primeros son sustancias de bajo peso molecular que atraviesan la membrana plasmática, evitando la formación intracelular de cristales de hielo y la excesiva deshidratación causada por la congelación lenta (Medeiros et al., 2002) (Medina et al., 2007). Los agentes no permeables tienen un alto peso molecular y son útiles cuando se aplican velocidades rápidas de congelación, estos provocan una deshidratación y una interacción específica con la membrana fosfolipídica, mejorando la restauración poscongelamiento del espermatozoide (Aisen et al., 2005).

La criopreservación de semen de toro en nuestro medio todavía es un reto debido a los daños que sufre este durante los procesos de refrigeración, congelación y descongelación con los que se crea un estrés oxidativo en la membrana del esperma (Chatterjee et al., 2001) (Gutiérrez-Pérez et al., 2009).

El crioprotector permeable más frecuentemente utilizado es el glicerol que tiene que ser usado en bajas concentraciones (menos de 4%) debido a su



Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias
toxicidad potencial; (Bhur et al., 2001). por esta razón se ha investigado la utilización de otros agentes crioprotectores menos dañinos tales como los agentes no permeables. Dentro de los agentes crioprotectores no permeables, vemos que los azúcares juegan un papel importante en la viabilidad espermática durante la congelación y descongelación. Los azúcares tales como la trehalosa favorecen la excreción de agua fuera de la célula a fin de disminuir la formación de cristales de hielo intracelular, manteniendo la presión osmótica del extensor y teniendo un papel crioprotector (Chen et al., 2004); sin embargo su efecto crioprotector es dependiente de la temperatura de almacenamiento, peso molecular y tipo de extender; por tal motivo es imperante realizar esta investigación encaminada a encontrar los elementos más apropiados para mantener una criopreservación espermática en condiciones apropiadas sin que ellas sufran alteraciones futuras en la calidad del mismo.

Para el presente trabajo de investigación nos planteamos los siguientes objetivos:

1.1. Objetivos.

1.1.1. General.

Determinar las tasas de motilidad espermática, relación espermatozoides vivos - muertos y anormalidades espermáticas con tres diluyentes diferentes en semen bovino criopreservado.

1.1.2. Específicos.

- Comparar la eficacia protectora en la criopreservación de semen bovino de los diluyentes: Sacarosa + Glicerol; Trehalosa + Glicerol y el diluyente comercial (Trilady®).

1.2. Hipótesis planteada.

Ha. La adición de los agentes crioprotectores no permeables sacarosa y trehalosa en combinación con glicerol mejoran la motilidad



Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias
espermática progresiva individual, la cantidad de espermatozoides
vivos/muertos y espermatozoides normales/anormales en el semen de
toro crioconservado, en comparación con la utilización del diluyente
comercial Triladyl®



2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. HISTORIA DE LA CONGELACIÓN DE SEMEN

El primer reporte de criopreservación de semen, fue realizado por Spallanzani en el año de 1776, quien observó que cuando los espermatozoides de humano, garañón y rana eran enfriados en nieve hasta 30 minutos se volvían inactivos pero podían ser reactivados; la reducción de la temperatura fue empleada para deprimir la actividad metabólica y prolongar la vida activa del espermatozoide. Un siglo después Mantegazza (1866), observó que el espermatozoide de humano sobrevivió en semen congelado a -17°C , éste fue uno de los primeros reportes de recuperación de células de mamíferos después de haber sido expuestas a bajas temperaturas en un punto de congelación (Bwanga, 1991).

La primera vez que se realizó con éxito la congelación de material seminal fue cuando Polge et al., 1949 demostraron el poder crioprotector del glicerol. Estos investigadores lograron recuperar espermatozoides de varias especies después de congelarlos en solución con este agente crioprotector. El gran descubrimiento de la acción crioprotectora del glicerol abrió una era exitosa en la criopreservación no solo de gametos de varias especies, sino también de otras células y tejidos. Los reportes de fertilidad con espermatozoides congelados de toro condujeron a un intenso desarrollo en la siguiente década de métodos de criopreservación que pudiera ser aplicado en programas de inseminación. Stewar (1951) guió un intenso desarrollo de métodos de criopreservación que pudieran ser aplicables para los propósitos en práctica de inseminación.



Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

2.2. PROCESOS METABÓLICOS DE LOS ESPERMATOZOIDES.

La energía requerida para la motilidad proviene de reservas intracelulares de ATP cuyo empleo está regulado por la concentración endógena del monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), compuesto que también interviene directamente sobre la motilidad de los espermatozoides (Hoskins y Casillas, 1973). Los espermatozoides degradan los azúcares, glucosa, fructosa o manosa, ácido láctico bajo condiciones anaerobias. Esta actividad glucolítica o más correctamente fructolítica, dado que la fructosa es el principal azúcar del semen, permite a los gametos sobrevivir en las condiciones anaerobias, característica que es importante de considerar durante el almacenamiento de espermatozoides para fines de inseminación artificial (Garner y Hafez, 2000). El espermatozoide utiliza una variedad de sustratos en presencia de oxígeno, cadena respiratoria que le permite emplear el lactato y el piruvato resultantes de la fructólisis de los azúcares, generando dióxido de carbono y agua (Mann, 1975). Esta vía oxidativa, que se localiza en las mitocondrias, es mucho más eficiente que la fructólisis en producir energía. Aunque gran parte del ATP es empleado como fuente de energía para la actividad de motilidad espermática, parte de ésta es destinada al mantenimiento de la integridad de los procesos que intervienen en el transporte activo que se dan a nivel de las membranas del espermatozoide, procesos de transporte activo cuya función es la de mantener la concentración de los componentes iónicos vitales para la célula espermática. De existir ausencia de sustratos exógenos para generar energía (White, 1980), los espermatozoides hacen uso de sus reservas intracelulares de plasmalógeno para dicho fin, pero siendo útil sólo a corto plazo.

2.3. CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN.

La criopreservación de semen de animales domésticos ofrece muchas ventajas en los sistemas de producción, particularmente en los programas de mejoramiento genético. El proceso de criopreservación produce un daño celular



Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias que disminuye el porcentaje de espermatozoides viables (Quinn et al., 1969). Consecuentemente, es de esperar que cuando se utiliza la inseminación artificial con semen congelado la fertilidad obtenida es menor en comparación a cuando se utiliza semen fresco (Watson, 2000).

2.3.1. Principios básicos de la criopreservación

El objetivo principal de la criopreservación es el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad celular por un período prolongado de tiempo. Para lo cual, es necesario mantener el semen a temperaturas inferiores a -130°C para detener completamente los procesos metabólicos (Medeiros et al., 2002). La supervivencia a la congelación es el producto de numerosos factores que interaccionan entre sí (Boiso, 2001). La criopreservación de cualquier material biológico se efectúa indispensablemente dentro de una solución que otorgue propiedades físico-químicas favorables para la sobrevivencia durante la congelación y descongelación (Vila, 1984). Cuando la suspensión alcanza temperaturas entre -5 y -10°C se forman núcleos de hielo, que se distribuyen aleatoriamente en el medio extracelular. La membrana plasmática del espermatozoide constituye una barrera que detiene la formación de hielo dentro de la célula (Vila y García, 1983; Holt, 2000). La cristalización en el medio extracelular da lugar a hielo puro, dejando los solutos progresivamente más concentrados en la fracción líquida. Este proceso recibe el nombre de crioconcentración. La fracción líquida se hace hipertónica y en respuesta a la diferencia de gradientes de concentración, la célula se deshidrata (Boiso, 2001).

El punto eutéctico refleja la máxima concentración de solutos que puede alcanzarse justo antes de que el agua y los solutos se solidifiquen conjuntamente (Grossmann y Santaló, 1991). Cuando la temperatura baja hasta alcanzar el punto eutéctico, la fracción no congelada y los solutos se solidifican (Vila y Carretero, 1985). Al ocurrir la cristalización, hay una liberación



Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias

de energía en forma de calor latente de solidificación. Esto eleva transitoriamente la temperatura de la solución. Este proceso de aumento y disminución rápida de la temperatura es perjudicial para las células (Boiso, 2001). La velocidad de congelamiento es un factor importante en la criopreservación. Cuando la velocidad de congelamiento es muy rápida, la célula no es capaz de deshidratarse lo suficiente (Boiso, 2001). Consecuentemente, se produce una inadecuada deshidratación y el agua que aún se encuentra en el interior de la célula forma cristales de hielo, que tienen un efecto letal para la célula (Mazur, 1984). Por el contrario, si la velocidad es demasiado lenta, la deshidratación será extrema pudiendo llegar al colapso celular (Boiso, 2001). La deshidratación severa produce la desnaturalización de macromoléculas y una reducción excesiva del tamaño celular hasta el colapso irreversible de la membrana plasmática (Mazur, 1984). Por tanto, la velocidad de congelamiento debe ser lo suficientemente rápida para reducir el tiempo de exposición del espermatozoide a condiciones hiperosmóticas y al mismo tiempo, debe ser lo suficientemente lenta para permitir que ocurra la deshidratación celular.

La supervivencia celular será máxima a una velocidad de congelamiento adecuada, que es específica para cada tipo celular. (Holt, 2000). La velocidad de congelamiento es de considerable importancia durante el “rango crítico de temperatura”, definido como el período donde ocurre la formación de cristales de hielo y la consecuente deshidratación celular (Kumar et al., 2003). Mazur (1984) postula que la lesión celular crioinducida podría explicarse también por la acción combinada de factores físicos. Los factores físicos a los que se refiere son el estrés osmótico y la presión que sufren las células en sus membranas por la expansión del hielo. Esta presión produce una deformación celular que a bajas temperaturas resulta letal. Las membranas celulares son las estructuras que sufren mayor daño en los procesos de criopreservación, debido a la pérdida de fluidez de sus componentes lipídicos. La transición de lípidos fluidos a sólidos se presenta a temperaturas entre 10 y 16°C alterando todas las



Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias
funciones de la membrana y confiriéndole un alto grado de fragilidad
(Grossmann y Santaló, 1991).

2.3.2. Métodos de criopreservación. No puede quedar un título al final de una hoja, pase a la siguiente

De acuerdo a la velocidad de enfriamiento y descongelación los métodos de congelación pueden clasificarse en protocolos de congelación lenta con descongelación rápida, congelación rápida con descongelación lenta, congelación ultrarápida y vitrificación (Boiso, 2001).

En los dos primeros, la adición del crioprotector suele hacerse por pasos, y el descenso de la temperatura se realiza lentamente, en un congelador programable. La descongelación lenta se lleva a cabo también mediante el uso del congelador programable, mientras que la descongelación rápida se hace rápidamente a temperatura ambiente o en un baño maría a 30°C, para evitar la recrystalización (Boiso, 2001).

La congelación ultrarápida fue originalmente descrita para la congelación de embriones, por Trounson (1986). Implica la rápida deshidratación celular, utilizando altas concentraciones de crioprotector, seguida de la inmersión en nitrógeno líquido. La vitrificación (Rall y Fahy, 1985) se basa en la congelación rápida en una mezcla de crioprotectores utilizados en muy altas concentraciones que a bajas temperaturas aumentan su viscosidad formando un vidrio, sin formación de hielo.

2.3.3. Efectos dañinos de la criopreservación sobre el espermatozoide.

La reducción de la capacidad fecundante está relacionada a dos razones puntuales, una baja viabilidad posdescongelamiento y un trastorno subletal en una proporción de espermatozoides sobrevivientes (Watson, 2000). La baja viabilidad se debe a factores como: cambio de temperatura, estrés osmótico, la formación de hielo intracelular y la toxicidad. El cambio de temperatura produce



Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias
un estrés en la membrana, posiblemente relacionado con un cambio de fase en los lípidos (Watson, 2000). Las lesiones producidas por el congelamiento de las membranas antes y durante el congelamiento sólo se invierten parcialmente después del descongelamiento. Las proteínas integrales de la membrana son agrupadas por la separación de la fase lipídica, y esto puede alterar su función, especialmente la función de las proteínas de canales iónicos. Es por eso que la permeabilidad de la membrana aumenta después del congelamiento (Watson, 2000). La regulación de calcio es claramente afectada y altera la función celular. En casos severos, es incompatible con la viabilidad celular (Bailey y Buhr, 1994). Como ya se mencionó anteriormente el estrés osmótico y la formación de hielo intracelular producen una disminución de la viabilidad espermática. Finalmente la toxicidad de algunas sustancias como el glicerol también producen la muerte de los espermatozoides (Watson, 2000). Un porcentaje de los espermatozoides sobrevivientes presenta un daño funcional que está relacionado con la calidad de la membrana, daños oxidativos, integridad de los receptores de membrana e integridad de la estructura nuclear (Watson, 2000). Esto se ve reflejado en la motilidad, capacitación espermática e integridad acrosomal.

Una de las principales características de los espermatozoides criopreservados es la disminución de la proporción de células móviles (Watson, 2000). La motilidad posdescongelamiento se reduce a valores entre 40 a 50% (Molinia et al., 1994a; 1994b; Hellemann y Jara, 1997; El-Alamy y Foote, 2001; Salamon y Maxwell, 2000).

Se especula que los espermatozoides en semen fresco (8% -24%) tienen membranas plasmáticas débiles o con fugas y se someten a fragmentación durante la congelación y descongelación de los procesos, lo que resulta en una disminución de su número. (Muhammadet al. 2002).



Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

2.3.4. Función de los diluyentes en la criopreservación del semen bovino.

Para llevar a cabo su misión, el diluyente debe aportar los nutrientes necesarios para el mantenimiento metabólico de la célula espermática (azúcares), la protección frente al shock térmico por frío (BSA (albúmina sérica bovina) controlar el pH del medio (Bicarbonatos, TRIS-hidroximetilmetil amina, HEPES-ácido 4-2-hidroxietil-1 piperazina etanosulfónico, la presión osmótica (sales de NaCl, KCl) y la inhibición del desarrollo microbiano (antibióticos) Gadea et al., 2003.

2.3.5. Nutrientes.

La célula espermática tiene la capacidad de producir la energía necesaria para mantener su metabolismo celular y generar movimiento del flagelo, principalmente a través de las vías glicolíticas. Estos procesos se desarrollan en las mitocondrias localizadas en la porción intermedia del espermatozoide. La fuente de energía más frecuentemente utilizada en la composición de los diluyentes es la glucosa, aunque se han usado otros como la galactosa, fructosa, ribosa o trehalosa, sin que los resultados hayan superado a la glucosa (Gadea et al., 2003).

2.3.6. Azúcares.

Los más comunes agregados a los diluyentes, son la fructosa y glucosa, siendo generalmente esta última la más utilizada. La inclusión de azúcares en los diluyentes para semen puede desempeñar diferentes funciones, se emplean como fuente de energía, ya que las células espermáticas la requieren para su motilidad y conservación y aunque los espermatozoides presentan metabolismo propio, lo que se intenta es proteger sus reservas intracelulares. Además, contribuyen a la osmolaridad del diluyente, ejerciendo una fuerza



Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias
osmótica sobre la membrana celular del espermatozoide, dependiendo de su permeabilidad (Watson, 1990).

2.3.7. Agentes crioprotectores.

Los agentes crioprotectores son sustancias hidrosolubles y de baja toxicidad que disminuyen el punto eutéctico de una solución dada (García y Vila, 1984), previniendo de esta forma el estrés osmótico. El descenso del punto eutéctico implica que se alcanzará la máxima concentración de solutos a una menor temperatura, de forma que los espermatozoides estarán más deshidratados y el estrés osmótico al que estarán sometidos será menor (Boiso, 2001). De esta manera, los agentes crioprotectores previenen la formación de hielo intracelular debido a la mayor deshidratación celular (Medeiros et al., 2002). Los crioprotectores se clasifican en dos grandes grupos: crioprotectores permeables y no permeables, de acuerdo a la permeabilidad a través de la membrana plasmática del espermatozoide (Boiso, 2001).

2.3.7.1. Agentes crioprotectores permeables.

Son sustancias permeables a través de la membrana debido a su bajo peso molecular. Protegen a la célula de las lesiones producidas por las congelaciones a velocidad lenta (García y Vila, 1984). Si bien el espermatozoide es permeable a estos agentes, su permeabilidad no es de la misma magnitud a la del agua. Sin embargo, atraviesan la membrana plasmática reemplazando el volumen de agua que se encuentra dentro de la célula. Consecuentemente, evitan los daños producidos por la formación de cristales de agua en el interior de la célula y mantienen el volumen celular, evitando el colapso de los espermatozoides por una deshidratación excesiva (Medeiros et al., 2002). Por otro lado, los crioprotectores permeables pueden ser tóxicos para los espermatozoides, induciendo alteraciones en la membrana plasmática y disminuyendo la motilidad espermática (Medeiros et al., 2002).



Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias
Entre los más utilizados están el glicerol, el etilenglicol, el propanediol y el dimetilsulfóxido (Boiso, 2001).

- Glicerol.

El glicerol es el agente crioprotector permeable más usado en los protocolos de criopreservación de semen en las diferentes especies (Maxwell y Watson, 1996; Curry, 2000; Salamon y Maxwell, 2000; Bittencourt et al., 2004). Su bajo peso molecular le permite ingresar a la célula y reemplazar osmóticamente el agua intracelular durante el proceso de congelamiento. Esto combinado con una velocidad de congelamiento lenta disminuye la formación de cristales de hielo intracelulares (Salamon y Maxwell, 2000). El ingreso del glicerol al espermatozoide se realiza mediante los canales aquaporin 7 (Ishibashi et al., 1997).

La mayoría de trabajos utilizan el glicerol en concentraciones entre 6 a 8% (Hellemann y Jara, 1997; Gil et al., 2000, 2003a, 2003b; El-Alamy y Foote, 2001).

En un diluyente en base a Tris, la mejor motilidad post descongelamiento se obtiene con 6% de glicerol (Molinia et al., 1994a). Se ha sugerido que la concentración óptima de glicerol en el diluyente está relacionada a su concentración final en el espermatozoide (Salamon y Maxwell, 2000).

La sensibilidad de espermatozoides a los efectos tóxicos varía en cada especie (Curry, 2000; Bittencourt et al., 2004). Algunos efectos atribuidos al glicerol son cambios en la estructura bioquímica de la membrana plasmática del espermatozoide relacionados a la capacitación y reacción del acrosoma (Watson y Martín, 1975; Salamon y Maxwell, 2000). Se presenta mayor reacción del acrosoma y mayor cantidad de espermatozoides capacitados cuando el glicerol se adiciona a los 15°C en comparación con la adición a los 5°C (Gil et al., 2003b). Por esta razón, el diluyente es dividido en dos



Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias
fracciones, en donde la segunda fracción contiene el doble de la concentración deseada de glicerol, para que al ser mezclado con igual volumen del semen diluido en la primera fracción, se obtenga la concentración deseada de dicho agente crioprotector.

- Etilenglicol.

Es un agente crioprotector permeable, de bajo peso molecular que se ha usado en los protocolos de criopreservación de semen en las diferentes especies (Molinia et al., 1994b; Salamon y Maxwell, 2000; Bittencourt et al., 2004). El etilenglicol puede ser una alternativa para los protocolos de criopreservación de semen (Bittencourt et al., 2004).

Se ha demostrado un mejor efecto protector del etilenglicol en comparación con el glicerol en otras especies como humanos (Gilmore et al., 2000; Deppe et al., 2003), equinos (Ball y Vo, 2001), bovinos (Guthrie et al., 2002) y chinchillas (Carrascosa et al., 2001). Así mismo otros estudios indican que el etilenglicol tiene un efecto similar al glicerol y por lo tanto puede sustituirlo (Mantovani et al., 2002, Pereira et al., 2002).

2.3.7.2. Agentes crioprotectores no permeables.

Son sustancias de alto peso molecular que no puede atravesar la membrana plasmática y que son efectivas cuando se emplean altas velocidades de congelación. Como no penetran en la célula, no son crioprotectores propiamente dichos, pero ejercen su acción promoviendo la deshidratación celular. Estos agentes suelen usarse en combinación a los agentes permeables (Boiso, 2001).

Su mecanismo de acción consiste en estimular osmóticamente una rápida deshidratación celular y de esta manera disminuir el volumen de agua intracelular que podría formar cristales de hielo (Medeiros et al., 2002). También aumentan la viscosidad del medio extracelular a bajas temperaturas.



Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias
Por lo tanto, reducen la formación de cristales de hielo (De Leeuw et al., 1993). Además estos azúcares pueden interactuar con la membrana formando puentes de hidrógeno entre sus grupos hidroxilo y los grupos fosfato de los fosfolípidos de membrana plasmática.

Al remplazar el agua alrededor de los fosfolípidos, previenen el daño a la membrana durante la deshidratación celular (De Leeuw et al., 1993). Los más utilizados son la sacarosa, la trehalosa, etc. (Boiso, 2001).

- Trehalosa.

La trehalosa es un disacárido no permeable de alto peso molecular, es un disacárido sintetizado naturalmente por plantas y animales expuestos a bajas temperaturas. Es responsable de la sobrevivencia invernal de algunos batracios (Aisen et al., 2000). Ha sido utilizada en la criopreservación de semen de caprino (Aboagla y Terada, 2004), de toro (Foote et al., 1993) y de carnero (Aisen et al., 1990; 1995; 2000; 2002).

Posee una acción crioprotectora relacionada al efecto osmótico y a su interacción con la membrana, confiriendo una protección adicional contra la deshidratación. La trehalosa puede unirse con el hidrógeno del grupo de cabezas fosfolípídicas de una manera más fuerte que el glicerol (Foote et al., 1993). Finalmente, se ha demostrado que la adición simultánea de EDTA más trehalosa al dilutor base resulta en la crioprotección óptima, probablemente porque es eliminada la competencia del Ca^{2+} con el disacárido, y porque el disacárido puede remplazar el ión en la estabilización de la membrana (Aisen et al., 2000).

- Sacarosa.

Es un disacárido no permeable de alto peso molecular, conocido también como O- α -D-glucopiranosil-(1-2)- β -D-fructuofuranosido (Mayes, 1997b). En diluyentes sin glicerol, la motilidad después del descongelamiento de los



Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias

espermatozoides de carnero fue más alta en presencia de sacarosa que en presencia de glucosa, indicando un efecto crioprotector de los disacáridos (Aisen et al., 2000). La sacarosa protege la integridad de la membrana y la estructura proteica durante la deshidratación y rehidratación celular (Leslie et al., 1995). Aparentemente no existen diferencias entre el tipo de azúcar (sacarosa, trehalosa) utilizado en el diluyente sobre la motilidad posdescongelamiento de espermatozoides ovinos (Molinia et al., 1994b). En espermatozoides de ratones, la adición de trehalosa confiere un mayor efecto protector que los monosacáridos (Storey et al., 1998; An et al., 2000; Thompson et al., 2001) ó agentes permeables (De Leeuw et al., 1993; Sztejn et al., 2001). Sin embargo, Sánchez-Partida et al., (1998) no encuentran efecto de la trehalosa en la motilidad de espermatozoides ovinos post descongelamiento. Molinia et al., (1994c) indican que la motilidad es superior en diluyentes con monosacáridos en comparación con diluyentes que contienen trehalosa y sacarosa. Finalmente el dilutor debe mantener una adecuada presión osmótica y balance electrolítico. Por tal motivo se debe tener en cuenta la osmolaridad del diluyente porque esta afecta a la calidad espermática luego del descongelamiento. Se han obtenido buenos resultados posdescongelamiento en medios con una osmolaridad entre 300 a 360 mOsm/kg (Molinia et al., 1994c) ó entre 450 a 750mOsm/kg (Fiser et al., 1981). La integridad de la membrana plasmática resiste hasta 1000 mOsm/kg en condiciones hiperosmóticas. No obstante, la motilidad y la integridad de membranas de los espermatozoides descongelados se alteran aniveles superiores a 600 mOsm/kg (Curry y Watson, 1994).

- Triladyl.

El uso de Triladyl ha demostrado dar mejores resultado después de la descongelación de semen comparando los parámetros con otros diluyentes. Al evaluar los tratamientos entre 2 y 9 horas se demostró que los parámetros de motilidad total y progresiva, la longevidad y la integridad acrosomal fueron



Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias
mejor con el uso de triladyl frente a otros diluyentes comerciales. (Herold et al, 2004). Después de la descongelación la motilidad fue mayor utilizando el diluyente Triladyl que con el diluyente AndroMed, pero se debe tener en cuenta si el plasma seminal es mayor al 10% es perjudicial en la motilidad pos descongelación en donde el Andromed tiene la ventaja de menor riesgo de contaminación. (Herold et al, 2003).

2.4. REGULACIÓN DEL PH.

El pH de semen tiene un valor normalmente entre 6 y 7, cualquier elevación es un indicio de contaminación con orina o de afecciones inflamatorias del aparato genital. (Hernández y Zavala, 2007). El metabolismo glicolítico que desarrolla el espermatozoide (carbohidrato principal es la glucosa) hace que el pH intracelular disminuya y el metabolismo celular quede reducido. El ácido láctico es el principal metabolito de este proceso y ha sido utilizado como un indicativo del índice de calidad seminal (Rigau et al., 1996).

La adición de agentes tamponadores ayudan, por lo tanto, a controlar el pH del medio. Entre estos agentes los más simples son el bicarbonato y el citrato sódico que presentan una capacidad de tamponar limitada, mientras que otros más complejos como el TES ácido 2-tris hidroximetilmetil amina etanosulfónico, HEPES, MOPS (ácido 3-N-morpholino propanosulfónico), TRIS, pueden regular el pH en un rango más amplio y no son dependientes de la temperatura (MOPS y HEPES). El pH de los diluyentes normalmente utilizados oscila entre 6.8 y 7.2, pero se debe de considerar que el pH de estos medios no se estabiliza hasta pasado unos 60-90 minutos del inicio de la dilución en agua y que los distintos diluyentes presentan un diferente patrón de cambio de su pH a lo largo del tiempo.

Por lo que se han de tomar las medidas oportunas en el proceso de conservación (Newth y Levis, 1999).



Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

2.5. PRESIÓN OSMÓTICA.

El espermatozoide de toro presenta una presión osmótica de 220-345 mOsm y es capaz de tolerar un rango de presiones osmóticas bastante amplio. Diversos estudios han evaluado la tolerancia a diversas presiones osmóticas, llegando a la conclusión que ni la motilidad ni la viabilidad espermática se ve afectada por la presión osmótica en rangos comprendidos entre 250 y 290 mOsm (Fraser et al., 2001), mientras que cuando se reduce por debajo de 200 mOsm se detecta una reducción significativa de la motilidad (Gilmore et al., 1996; Fraser et al., 2001).

2.6. AMINOÁCIDOS.

Algunos diluyentes producidos con base en subproductos lácteos, se les ha agregado, la cisteína, para obviar la necesidad de hervir la leche e inactivar un factor tóxico, la lactenina. Sin embargo este aminoácido se ha incorporado aun en ausencia de leche, sin justificación aparente. Quizás su incorporación se deba al hecho de que es un elemento abundante en las protaminas (proteínas básicas), las cuales proporcionan un grado de condensación estable de la cromatina, parámetro valioso en la maduración espermática y el desarrollo embrionario (Watson, 1995).

2.7. AGENTES ANTIMICROBIANOS.

Debido a tantos agentes patógenos exógenos, así como la microflora propia del divertículo prepucial, la uretra y pene pueden afectar negativamente la fertilidad del semen, es necesaria la inclusión de antibióticos en los diluyentes. La flora bacteriana produce toxinas y estas a su vez, putrefacción de los componentes de origen biológico del diluyente. Algunos de los antibióticos más utilizados son: penicilina, estreptomycin, lincomicina, espectinomycin, gentamicina y polimixina B. también se han incluido modernos antibióticos como la amikacina y la dibekacina, este último se ha señalado como de mayor



Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias
efectividad en la inhibición del crecimiento bacteriano, sin afectar la motilidad y morfología acrosomal. Recientemente se ha admitido que el ceftiofur sódico además de suprimir el crecimiento bacteriano, no posee efectos espermicidas (Gadea et al., 2003).

2.8. OTROS COMPUESTOS Y ADITIVOS.

Muchos de los diluyentes contienen agentes protectores como el EDTA-ácido etilendiamino tetra acético. Este compuesto desempeña un papel quelante para iones-divalentes, limitando el movimiento a través de la membrana plasmática, lo cual ocurre con la dilución y el enfriamiento. El EDTA, también protege contra la enzima aminoácido-oxidasa liberada por los espermatozoides muertos. Otros aditivos en los diluyentes para la criopreservación de semen son el Orvus Es Paste (OEP) y/o el Equex STM, que son detergentes sintéticos.

El efecto de algunos surfactantes sobre las membranas de las células espermáticas parece estar ligado a la constitución del diluyente, particularmente a la presencia de lecitina aportada por la yema de huevo. N-dodecil-sulfato (SDS) componente surfactante, causa la completa inhibición de la fructolisis y abolición de la motilidad del semen ovino en concentraciones de 0.0015 m (0.043/p/v). (Mann, 1964).

2.8.1. Yema de huevo.

Un importante componente de los medios de refrigeración y congelación para la criopreservación de semen de diversas especies. Las propiedades protectoras de la yema de huevo sobre los espermatozoides durante la congelación fueron descubiertas por primera vez por Philips en 1939. Posteriormente se encontró que la yema de huevo tenía al menos dos factores activos, proteger contra el daño al enfriamiento y ayuda manteniendo la viabilidad (Bathgate, et al., 2006).



Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Las lipoproteínas de baja densidad (LDLs) contenidas en la yema de huevo fueron definidas como ingredientes activos. La adición de LDLs de otras fuentes fracaso por no producir la misma protección que la yema de huevo. Esto fue probablemente porque las LDLs de la yema de huevo contienen componentes, proteínas particularmente que trabajan en conjunto para proporcionar protección a los espermatozoides (Watson, 1981). La yema de huevo de gallina ha sido utilizada convencionalmente en medios de criopreservación de semen, probablemente por su amplia disponibilidad (Bathgate et al., 2006).

2.8.2. Leche.

Específicamente, leche de vaca, es utilizada para diluir semende diferentes especies (Foote et al., 1993; 2002; Salamon y Maxwell, 2000; El-Alamy y Foote, 2001; Paulenz et al., 2002; Gil et al., 2000; 2003a, 2003b; Santiani, 2003). Las proteínas de la leche actúan como amortiguadores contracambios de pH y como agentes quelantes contra cualquier metal pesado presente (Salamon y Maxwell, 2000). La caseína, la principal proteína de la leche, también tiene un efecto antioxidante (Foote et al., 2002), y por tanto confiere protección a los espermatozoides durante la reducción de temperatura (Salamon y Maxwell, 2000). Sin embargo, otra proteína presente en la leche, la lactenina, es tóxica para los espermatozoides (Salamon y Maxwell, 2000), es por lo que se recomienda calentar la leche previamente a temperaturas superiores a los 90°C, lo cual inactiva a esa proteína (Salamon y Maxwell, 2000; El-Alamy y Foote, 2001; Paulenz et al., 2002; Gil et al., 2003a, 2003b).

La leche puede ser usada en forma entera (El-Alamy y Foote, 2001), reconstituida (Fiser y col., 1981; Salamon y Maxwell, 2000; Paulenz et al., 2002) o descremada (Gil et al., 2000; El-Alamy y Foote, 2001; Gil et al., 2003a, 2003b). El uso de leche tratada con altas temperaturas (UHT) es muy recomendado por su condición de esterilidad y por no requerir calentamiento



Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias
previo (SalamonyMaxwell, 2000). Algunos estudios indican que no existen diferencias entre utilizar leche entera pasteurizada y leche descremada (Gil et al., 2000; El-Alamy y Foote, 2001; Paulenz et al., 2002; Gil et al., 2003a, 2003b).

2.8.3. Agua

Aunque esta constituye el mayor elemento de un diluyente ha tenido poca consideración. Actualmente no se encuentra cabalmente delimitadas las pautas de su calidad; sin embargo se ha encontrado que al comparar el uso de diversas fuentes de ésta, el agua con un pre-tratamiento por medio de un sistema de ósmosis inversa produjo los más altos índices de motilidad de los espermatozoides de hámster (Flowers y Esbenshade, 1993).

En general, en los Estados Unidos de América, la calidad de agua se clasifica en tres clases: tipo I, que es de la más alta pureza y se obtiene por una combinación de desionización, destilación, filtración y ósmosis inversa; tipo II, es producida por doble destilación y tipo III, que se elabora por simple destilación. En un estudio realizado con diluyentes de corta duración preparados en los tres tipos de agua, mencionados anteriormente, se presentaron los promedios más altos de viabilidad y fertilidad en los tipos I y II, cuando el periodo de conservación fue mayor a tres días poscolección, los parámetros de viabilidad y fertilidad, no se afectaron significativamente, con ninguno de los tres tipos de agua. Lo anterior puede evidenciar que cuando se va a conservar el semen por periodos prolongados (más de 72 horas), la calidad del agua resulta fundamental (Flowers y Esbenshade, 1993).



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

3.1.1. Físicos

- 1 Vagina artificial.
- 1 Microscopio.
- 1 Platina térmica.
- 1 Balanza analítica.
- 4 tubos de ensayo capacidad para 10 ml.
- 4 vasos de precipitación capacidad para 50 ml.
- 4 vasos de precipitación de 250 ml.
- 2 matraces Erlenmeyer de 250 ml.
- 1 cámara de Neubauer.
- 1 pipeta para glóbulos rojos.
- 2 pipetas de 1 ml de capacidad.
- 2 pipetas de 10 ml de capacidad
- 1 baño maría de 5 litros de capacidad.
- 2 cajas de portaobjetos.
- 2 cajas de cubreobjetos.
- 1 paquete por 500 pajuelas de 0,5 ml.
- 1 caja térmica de poliuretano 40 cm x 25 cm x 30 cm.
- 1 tanque de nitrógeno capacidad para 20 kg.
- 1 computador portátil para procesamiento de datos.

3.1.2. Químicos.

- 50 mOsm de Trehalosa.



Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias

- 40 mOsmol de Sacarosa.
- 2,4 gr de Tris.
- 1 gr de fructuosa.
- 1,48 gr de ácido cítrico.
- 26 mg de gentamicina.
- 50000 UI de penicilina
- 15 ml de glicerol.
- 1 frasco de 50 ml de tinción de eosina.
- 1 frasco de 50 ml de tinción de nigrosina..
- 1 frasco de 240 g de diluyente seminal Triladyl®.
- 100 g de alcohol polivinilico.
- 1 galón de agua destilada estéril.
- 20 kg de nitrógeno líquido.

3.1.3. Biológicos

- 6 eyaculados provenientes de un toro de raza Limousin.
- 6 vacas de raza mestiza, sincronizadas, empleadas como maniquí.
- 5 yemas de huevos frescos.

3.2. Métodos.

3.2.1. Ubicación geográfica.

El estudio se realizó en el sector El Tesoro, en la parroquia Huambi, a 15 minutos del Cantón Sucúa, en la provincia de Morona Santiago, ubicada a 800 msnm, con una temperatura promedio de 23°C.



Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias
3.2.2. Diseño experimental.

Se evaluaron 6 eyaculados de un mismo semental, dos eyaculados por cada tratamiento, (Trehalosa con glicerol), (Sacarosa con glicerol) y Triladyl. Utilizándose 10 pajillas por cada eyaculado en cada tratamiento.

Para todos los análisis se utilizó el programa estadístico SPSS Statistics 19.

Para la realización del presente estudio de investigación se utilizó el siguiente modelo matemático.

Análisis de Varianza bajo un modelo de bloques al azar para cada tratamiento (ANOVA) y prueba de Tukey para la evaluación de diferencias estadísticas entre tratamiento en base a la calidad espermática.

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + E_j(T_j) + e_{ijk}$$

Dónde:

Y = Son las variables medidas.

μ = Media general.

T = Los tratamientos.

E = Eyaculados.

e = error aleatorio.

Previamente, todos los porcentajes fueron transformados a valores angulares $\text{ángulo} = \arccos(\sqrt{x})$ para acercar los datos a la distribución normal.

3.2.2.1 Descripción del diseño experimental

- Tipo de diseño.- Diseño de Bloques al Azar (DBA).
- Tratamientos:



Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias

- Tratamiento A.- Trehalosa con glicerol.
- Tratamiento B.- Sacarosa con glicerol.
- Tratamiento C.- Triladyl ®.

- Repeticiones: 2
- Número de U. Experimentales: 6
- Muestras de semen por U. Exp.: 10
- Total de muestras para DBA: 60

3.2.3. Caracterización de la unidad de análisis.

Las unidades de análisis estuvieron compuestas por pajuelas de 0,5ml de capacidad cargadas de semen bovino procesado en los 3 tratamientos a una concentración de 100 millones de espermatozoides/ml en un total de 60 pajillas para el experimento.

3.2.3.1. Variables a analizar

Se evaluó y comparó la calidad espermática en el proceso de criopreservación mediante la determinación de:

- Motilidad progresiva espermática.
- Porcentaje de espermatozoides vivos/muertos.
- Porcentaje de espermatozoides normales/anormales (morfo-anomalías).

3.2.4. Raza del semental

La raza empleada en este estudio fue la Limousin, que se caracteriza por tener un pelaje de color rojo alazán, con gran desarrollo muscular y una alta producción de semen.



Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

3.2.5. Criterios de selección

Se tomó en cuenta los siguientes parámetros para la selección del semental:

- De 2 a 4 años de edad.
- Condición corporal de 3 a 4 en escala de 1 a 5.
- Sin patologías reproductivas.
- Sin anomalías físicas.
- Con buen estado de salud.

3.2.6. Preparación del semental para la colecta de semen.

La preparación del reproductor empezó 15 días antes de la primera colecta junto con la aplicación de reconstituyentes vitamínicos. Posteriormente se tomó el eyaculado cada 15 días durante 3 meses. La alimentación del animal consistió en pasto gramalote (*Axonopus Scoparius*), durante todo el experimento, es importante señalar que el animal estuvo separado del resto de animales, para evitar montas no dirigidas o peleas con otros toros.

3.2.7. Criterios de inclusión.-

Se incluyeron en la investigación, eyaculados de coloración y consistencia cremosa con calificación 4 y 5 (en escala de 0 a 5), y libre de partículas extrañas.

3.2.8. Criterios de exclusión

No se excluyeron de la investigación ningún eyaculado, sin embargo cabe recalcar que los criterios de exclusión de los eyaculados fueron: eyaculados de coloraciones: cremosa pálida, lechosa, nublosa y claras (calificación de menores o iguales a 3 en escala de 0 a 5), con tonalidades rosáceas, grises. También eyaculados amarillentos diluidos, y con presencia de partículas extrañas.



Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

3.2.9. Preparación de los diluyentes.

Para el proceso de congelamiento del semen, se emplearon tres diluyentes que fueron diferentes en su composición, cada uno fue subdividido en dos fracciones, que se identificaron como fracción A (diluyente de refrigeración sin glicerol) y fracción B (diluyente de congelación con glicerol).

- Preparación de trehalosa con glicerol.

Fracción A:

- Trehalosa 25mM
- Tris 0.60 g
- Fructosa 0.25 g
- Ácido cítrico 0.37 g
- Yema de huevo 5 ml
- Gentamicina 13 mg
- Penicilina 25000 UI
- Agua bidestilada y desionizada ajustar a 50 ml

Fracción B:

- Trehalosa 25mM
- Tris 0.60 g
- Fructosa 0.25 g
- Ácido cítrico 0.37
- Yema de huevo 5 ml
- Glicerol 6.6 ml

- Preparación de sacarosa con glicerol.

Fracción A:



Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

- Sacarosa 20 mM
- Tris 0.60 g
- Fructosa 0.25 g
- Ácido cítrico 0.37 g
- Yema de huevo 5 ml
- Gentamicina 13 mg
- Penicilina 25000 UI
- Agua bidestilada y desionizada ajustar a 50 ml

Fracción B:

- Sacarosa 20 mM
- Tris 0.60 g
- Fructosa 0.25 g
- Ácido cítrico 0.37 g
- Yema de huevo 5 ml
- Glicerol 6.6 ml
 - Preparación de Triladyl®.

Se adicionaron 3 partes de agua destilada estéril previamente temperada a +30°C hasta +35°C, y esta solución se adicionará a 1 parte de yema de huevo.

3.2.10. Colección de Semen.

Para la colección de semen se utilizó un semental adulto en la obtención de 6 eyaculados.

La vagina artificial que se empleó para la colección del semen mide 40 x 7 cm, la cual al momento de la colecta fue mantenida a una temperatura entre 42 a 45 °C y en uno de sus extremos se colocó un tubo colector graduado en mililitros el mismo que estuvo a una temperatura entre 30 a 37 °C al momento de recibir el eyaculado. El tubo fue cubierto con una película protectora oscura



Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias
para evitar los rayos del sol. Luego de la colecta el semen fue colocado en baño María a 37 °C, para igualar su temperatura con la de sus diluyentes previamente ubicados en baño María.

3.2.11. Evaluación del semen.-

Esta prueba se realizó con el fin de predecir la fertilidad del macho. Una vez colectado el semen, se determinó cuidadosamente tanto la cantidad como la calidad del eyaculado, dependiendo éste de algunos factores tales como la edad, temperatura, estado corporal, tamaño de los testículos y la raza.

3.2.12. Evaluación macroscópica

El objetivo de esta evaluación, fue determinar las características organolépticas del semen, las cuales proporcionaron información muy general de la calidad del mismo.

- **Volumen.** Se determinó mediante la utilización de un tubo graduado en el cual se observó el volumen completo, el cual sirvió para calcular la concentración total de espermatozoides en el eyaculado y posteriormente, para determinar el número de dosis que se prepararon. El volumen completo de un toro semental varía entre 3 y 6 cc, por lo que esto puede variar dependiendo de las condiciones individuales y ambientales. (Hafez, 2000).
- **Color.** El semen se clasificó en sus diferentes tonalidades dependiendo de su concentración espermática.
- **pH.** Es una medida del grado de acidez o alcalinidad y en consecuencia es un indicador de actividad metabólica de los



Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias
espermatozoides. Conforme envejece el eyaculado aumenta la producción de ácido láctico y desciende el pH, el cual se determinó con tiras reactivas. El pH del semen de toro debe mantenerse entre 6,4 a 6,9.

3.2.13. Preparación de los diluyentes

El objetivo de esta evaluación fue reunir los elementos necesarios para el cálculo de dosis, además de que permitió determinar si el semen era viable para su uso en la congelación. Las características del eyaculado se determinaron mediante microscopio y tuvieron mayor valor que las obtenidas macroscópicamente.

- **Motilidad en masa.-** Se evaluó en la periferia de una gota gruesa de 5 μ l, sobre un portaobjetos sin cubreobjetos en platina térmica a 37 °C.
- **Motilidad.-** Para este punto se colocó una gota de semen sobre un portaobjetos previamente calentado a temperatura de 37 °C y se cubrió con un cubreobjetos precalentado a la misma temperatura sobre la gota de semen. Enseguida se observó al microscopio con el objetivo seco débil de 10x y seco fuerte de 40x, para estimar la motilidad según la rapidez con la que se muevan los espermatozoides hacia adelante y en línea recta.
 - a) **Concentración.-** Para su determinación se utilizó la cámara de Neubauer, con una solución de formalina más eosina en una dilución 1:200 (semen: solución).
 - b) **Morfología.-** Para la realización de esta prueba se colocó una gota de semen fresco sobre un portaobjetos calentado a la misma temperatura del semen, y se aplicó una gota de tinción vital eosina/nigrosina (Evans y Maxwell 1987), a la misma temperatura con el objeto de colorear y fijar los espermatozoides; posteriormente se ubicó un segundo portaobjetos



Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias
en un ángulo de 45° con el primero, se deslizó suavemente a lo largo del primero para extender la gota de semen teñida. Se esperó un minuto a que se seque la muestra a temperatura ambiente para posteriormente observar la morfología espermática normal y anormal. Se contaron 200 espermatozoides en diferentes campos del microscopio clasificando a las células en normales y anormales (con base a anomalías primarias y secundarias). En un eyaculado normal no debe admitirse una cifra superior al 20% de morfo anomalías espermáticas, considerándose una cifra media normal de 10% de anomalías primarias (de origen testicular). Generalmente, cuando se realizó el examen morfológico, se contaron de 100 a 200 espermatozoides, y se tomó el porcentaje de espermatozoides normales contra espermatozoides anormales.

c) Relación de espermatozoides vivos/muertos.- Para la realización de esta evaluación se depositó una gota de semen fresco sobre un portaobjetos previamente calentado a 37° C y se colocó una gota de eosina/nigrosina para colorear los espermatozoides, posterior a esto se aplicó un segundo portaobjetos en un ángulo de 45° con el primero, deslizándolo suavemente a lo largo del primero para extender la gota de semen teñida.

Se esperó un minuto para que se seque la muestra a temperatura ambiente a continuación se observó los espermatozoides para determinar si están vivos o muertos durante la tinción. Se contaron 200 espermatozoides en diferentes campos del microscopio. Para diferenciar si un espermatozoide está vivo o muerto antes de la tinción, se tomó como base lo siguiente: se ha demostrado que las cabezas de los espermatozoides muertos o en fase letal, tienen la propiedad de dejar pasar los colorantes a través de su membrana, esto se debe a la perturbación de la permeabilidad de la membrana de la cabeza, mientras



Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias
que los espermatozoides vivos no permiten el paso de colorantes, por lo que permanecen sin coloración, un eyaculado de buena calidad y para poder ser procesado no debe presentar un número menor de 80% de células espermáticas vivas.

3.2.14. Método de criopreservación

Una vez terminado el proceso de evaluación de semen se procedió a seguir el siguiente esquema de enfriamiento y congelación.

- Semen con el diluyente a 4-5°C durante 40 minutos.
- Empaquetado de pajillas.
- Pajillas colocadas a vapor del nitrógeno líquido a -70° C durante 15 minutos
- Introducción de las pajillas dentro de nitrógeno líquido (N²) a -190° C durante 5 minutos.
- Colocación de las pajillas en los goblet luego en los bastones y posteriormente en las canastillas.
- Introducción de las canastillas al tanque que contiene nitrógeno líquido.

3.2.15. Evaluación de las variables

Para la evaluación del semen ya congelado en nitrógeno líquido se tomaron 10 pajillas de cada eyaculado de los tres tratamientos; se consideraron las variables como porcentaje de motilidad progresiva (individual), porcentaje de espermatozoides vivos/muertos al descongelar y porcentaje de anormalidades.

La descongelación se realizó utilizando un baño María que estuvo a una temperatura entre 35-37 °C y se dejó durante 20 a 30 segundos. Posterior a esto el porcentaje de espermatozoides con movimiento lineal se examinó visualmente con cada diluyente. Las muestras de semen se colocaron en un portaobjetos calentado previamente a 37° C en una termo-platina, para evitar variaciones en la temperatura antes de ser observado y evaluado al



Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias
microscopio; las estimaciones de la motilidad del esperma se realizaron en 3 campos distintos del microscopio y se tomaron la media de estas tres estimaciones las cuales fueron a los registros como una puntuación de motilidad final.

Para la evaluación del porcentaje de espermatozoides vivos/muertos se realizó lo siguiente: se depositó una gota de semen de las pajillas descongelaadas sobre un portaobjetos previamente calentado a 37° C y se colocó una gota de eosina/nigrosina para colorear los espermatozoides; posteriormente a esto se colocó un segundo portaobjetos en un ángulo de 45° con el primero, deslizándolo suavemente a lo largo del primero para extender la gota de semen teñida. Después de un minuto de secada la muestra a temperatura ambiente se observó los espermatozoides y se determinó si están vivos o muertos durante la tinción. Se contaron 200 espermatozoides en diferentes campos del microscopio. Para diferenciar si un espermatozoide está vivo o muerto antes de la tinción.

3.2.16. Análisis estadístico.

El análisis estadístico consistió en una comparación de medias entre grupos mediante análisis de la varianza (ADEVA) y, cuando las diferencias fueron significativas se empleó la prueba de significación de Tukey al 5%. Los resultados se expresaron en media (\bar{X}) \pm desviación típica (s), así como se establecieron los Coeficientes de Variación ($CV=s/\bar{X}$) para los grupos y para las muestras. Los resultados obtenidos se evaluaron empleando el diseño estadístico planteado “DBA” y el análisis de los mismos mediante los paquetes informáticos SPSS, versión 19 y Minitab versión 15.



4. RESULTADOS

4.1. Análisis Estadístico de las variables estudiadas

Según el análisis estadístico de las variables de estudio del semen post-descongelación se obtuvieron los siguientes resultados en: Motilidad Progresiva (MP), relación espermatozoides vivos/muertos y anomalías espermáticas.

4.1.1. Características seminales generales.

CUADRO N° 1.- Valores globales para las variables motilidad progresiva, espermatozoides vivos/muertos y anomalías de seis eyaculados de un toro antes de la congelación.

N° de eyaculaciones	Variable	Mediana	Desviación estándar	Valor mínimo	Valor máximo
6	Motilidad progresiva individual	83	3,098	80	88
	Espermatozoides vivos/muertos	84,67	1,36	83	87
	Espermatozoides normales/anormales	90,33	1,36	88	92

El cuadro N° 1 se muestra los resultados obtenidos para las variables motilidad progresiva 83%, la cual se encuentra por encima de los valores de referencia que son entre 80-100%, espermatozoides vivos/muertos de 84,67% y en la variable anomalías una media de 90,33%, la que está por encima de lo recomendado que es del 85% de espermatozoides normales.



Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias
Con base a los resultados obtenidos en la evaluación de las variables seminales se procedió a criopreservar los 6 eyaculados, ya que se encontraron dentro de los rangos establecidos.

CUADRO N° 2.- Valores globales para las variables motilidad progresiva, espermatozoides vivos/muertos y anomalías del semen descongelado de todos los tratamientos.

N° de pajillas evaluadas totales	Variable	Media	Desviación estándar	Valor mínimo	Valor máximo
60	Motilidad progresiva individual %	35,98	8,44	25	55
	Espermatozoides vivos/muertos %	39,17	9,94	25	62
	Espermatozoides normales/anormales %	85,97	3,47	77	92

El cuadro N° 2 muestra los valores medios de las muestras evaluadas (60 pajillas) de semen descongelado, para la variable motilidad progresiva, se encontraron valores de 35,98%, en la variable espermatozoides vivos/muertos de 39,17 % y en la variable anomalías una media de 85,97%, en comparación con los valores de semen fresco.



CUADRO N° 3. Diferencias de medias generales para las diferentes variables evaluadas entre semen fresco y semen descongelado.

Variable	No de eyaculaciones	Semen antes de congelar	No de pajillas	Semen descongelado	Diferencia
Motilidad progresiva %	6	83 ^a	60	35,98 ^b	47,02
Espermatozoides vivos/muertos %		84,67 ^a		39,17 ^b	45,5
Espermatozoides normales/anormales %		90,33 ^a		85,97 ^a	4,36

a,b, literales diferentes entre filas indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

El cuadro N° 3. Comparando las variables analizadas, motilidad progresiva y espermatozoides vivos/muertos, se observa diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre el semen fresco y semen descongelado, mientras que para la variable anormalidades no se encuentra diferencia estadística significativa ($p > 0.05$) a antes y después de la congelación.



Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias
4.1.2. Análisis estadístico de la Motilidad Progresiva “MP”.

CUADRO N° 4. Comparación de medias para la variable motilidad espermática progresiva entre semen antes de la congelación y el semen congelado-descongelado con los diferentes diluyentes empleados para la criopreservación

Diluyente	Semen sin congelar	N° de pajillas	Semen congelado-descongelado
Trehalosa con glicerol %	84,00a	20	32,00 b
Sacarosa con glicerol %	81,50a	20	29,45 c
Triladyl %	83,50a	20	46,50 a

a,b,c, literales diferentes en las columnas indican diferencias estadísticas significativas entre medias de los tratamientos ($p < 0.05$)

b,c, literales diferentes en las columnas indican diferencias estadísticas significativas entre medias de los tratamientos ($p < 0.09$)

En el cuadro N° 4 comparando la variable motilidad espermática progresiva en el semen congelado/descongelado mediante el análisis ANOVA se encontró diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre los tres tratamientos, presentándose el valor más altos para el diluyentes **(a)** Triladyl, seguido por el diluyente **(b)** Trehalosa con glicerol y el valor más bajo para **(c)** Sacarosa con glicerol, observándose una pérdida de la motilidad de 52, 52,05 y 37 respectivamente; igualmente se encontró diferencias estadística significativas ($p < 0.09$) entre los diluyentes **(b)** Trehalosa con glicerol y **(c)** Sacarosa con glicerol.



Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

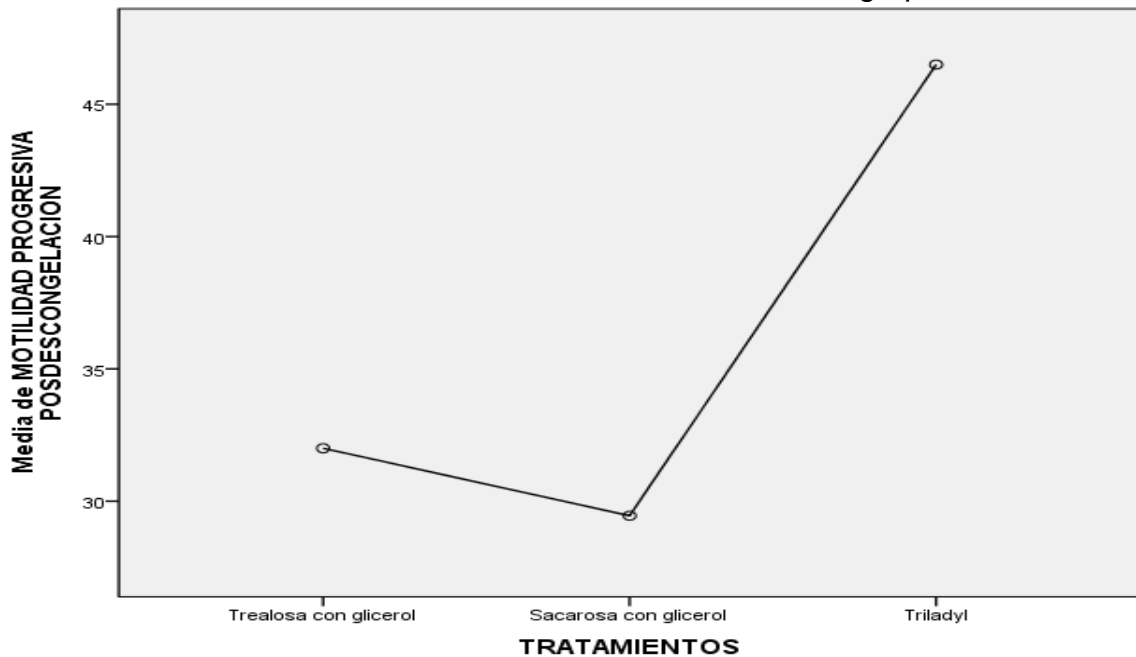


Gráfico N° 1. Representación lineal de las medias de la variable “MOTILIDAD PROGRESIVA”.

Tratamiento A.- Trehalosa con glicerol; Tratamiento B.- Sacarosa con glicerol; Tratamiento C.- Triladyl®.

El gráfico N° 1 muestra como mejor tratamiento al C “Triladyl®”, seguido del A “Trehalosa con glicerol” y el B “Sacarosa con glicerol”. El análisis estadístico permitió establecer diferencias estadísticas significativas por lo que se recomendó hacer la prueba de significancia establecida (Tukey 5%).



Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias
CUADRO N° 5.- Prueba de significancia de Tukey al 5% para la variable
 MOTILIDAD PROGRESIVA ESPERMÁTICA.

(I) Tratamientos	(J) Tratamientos	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%
					Límite inferior
Trehalosa con glicerol	Sacarosa con glicerol	2,550	1,201	,094	-,34
	Triladyl	-14,500*	1,201	,000	-17,39
Sacarosa con glicerol	Trehalosa con glicerol	-2,550	1,201	,094	-5,44
	Triladyl	-17,050*	1,201	,000	-19,94
Triladyl®	Trehalosa con glicerol	14,500*	1,201	,000	11,61
	Sacarosa con glicerol	17,050*	1,201	,000	14,16

Tratamiento A.- Trehalosa con glicerol; Tratamiento B.- Sacarosa con glicerol;
 Tratamiento C.- Triladyl®

En la prueba de significancia de Tukey al 5% se establece que existe diferencias entre los tres tratamientos (Trehalosa con glicerol; Sacarosa con glicerol y Triladyl®) sobre la “MOTILIDAD PROGRESIVA ESPERMÁTICA” congelación-descongelación.



Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias
CUADRO N° 6.- Resultados de la prueba de Tukey al 5% para MOTILIDAD PROGRESIVA ESPERMÁTICA.

HSD de Tukey

TRATAMIENTOS	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Sacarosa con glicerol	20	29,45	
Trehalosa con glicerol	20	32,00	
Triladyl®	20		46,50
Sig.		,094	1,000

Tratamiento A.- Trehalosa con glicerol; Tratamiento B.- sacarosa con glicerol; y Tratamiento C.- Triladyl®.

La prueba de Tukey al 5% para la variable MOTILIDAD PROGRESIVA ESPERMÁTICA, establece que de todos los tratamientos el que genera una mejor motilidad progresiva es el tratamiento C: “Triladyl®” (46,50%) (**p<0.05**), seguido del tratamiento A “Trehalosa con glicerol” (32%) y el tratamiento B “Sacarosa con glicerol” (29,45%) (**p=0.09**), después del proceso de congelación-descongelación.



Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias
4.1.3. Análisis estadístico de la variable ESPERMATOZOIDES VIVOS/MUERTOS.

CUADRO 7. Comparación de medias para la variable espermatozoides vivos/muertos entre semen antes de la congelación y semen congelado-descongelado con los diferentes diluyentes empleados para la criopreservación

Diluyente	Semen sin congelar	N° de pajillas	Semen congelado-descongelado
Trehalosa con glicerol	83,5 a	20	33,85 b
Sacarosa con glicerol	84,5 a	20	31,85 b
Triladyl	86 a	20	51,80 a

a,b, literales diferentes entre filas indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

En el cuadro N° 7 al realizar el análisis de varianza (ANOVA) en la variable espermatozoides vivos muertos en semen congelado/descongelado se encontró diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) entre tratamiento; el resultado más al alto de espermatozoides vivos se presentó en el diluyente Triladyl, y no encontrándose diferencias estadísticas entre el diluyente trehalosa con glicerol y sacarosa con glicerol. no existe diferencias estadísticas entre tratamientos en semen antes de la congelación ($p > 0.05$)



Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias
GRÁFICO 2. Medias de espermatozoides vivos.

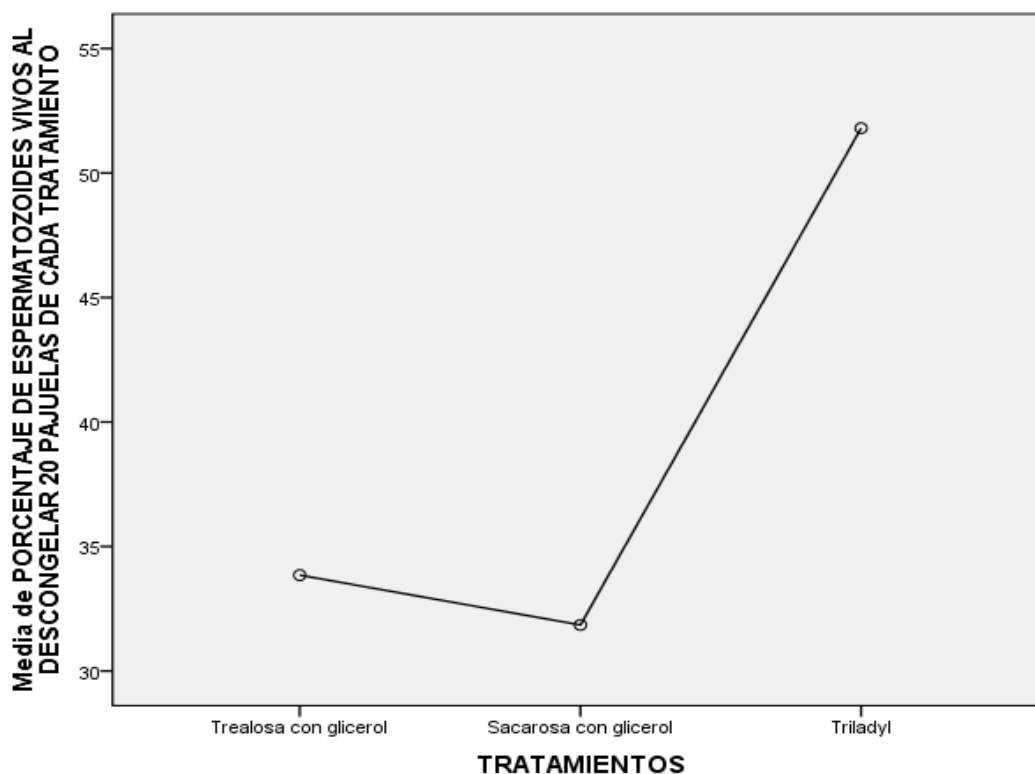


Gráfico N° 2.- Representación lineal de las medias de la variable “ESPERMATOZOIDES VIVOS/MUERTOS”.

Tratamiento A.- Trehalosa con glicerol; Tratamiento B.- Sacarosa con glicerol; Tratamiento C.- Triladyl®.

El gráfico N° 2 muestra como mejor tratamiento al C “Triladyl®”, seguido del A “Trehalosa con glicerol” y el B “Sacarosa con glicerol”. El análisis estadístico permitió establecer diferencias significativas entre tratamientos por lo que se procedió a realizar la prueba de significancia establecida (Tukey 5%).



Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias
CUADRO N° 8.- Prueba de significación de Tukey al 5% para la variable
 RELACIÓN ESPERMATOZOIDES VIVOS/MUERTOS.

(I) TRATAMIENTOS	(J) TRATAMIENTOS	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%
					Límite inferior
Trealosa con glicerol	Sacarosa con glicerol	2,000	1,331	,297	-1,20
	Triladyl	-17,950*	1,331	,000	-21,15
Sacarosa con glicerol	Trealosa con glicerol	-2,000	1,331	,297	-5,20
	Triladyl	-19,950*	1,331	,000	-23,15
Triladyl	Trealosa con glicerol	17,950*	1,331	,000	14,75
	Sacarosa con glicerol	19,950*	1,331	,000	16,75

En la prueba de significación de Tukey al 5% se establece que existe diferencias entre los tres tratamientos (Trealosa con glicerol; Sacarosa con glicerol y Triladyl®) sobre la “RELACIÓN ESPERMATOZOIDES VIVOS/MUERTOS” después de la congelación-descongelación.



Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias
CUADRO N° 9.- Resultados de la prueba de Tukey al 5% para la variable
 ESPERMATOZOIDES VIVOS/MUERTOS

HSD de Tukey

TRATAMIENTOS	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Sacarosa con glicerol	20	31,85	
Trealosa con glicerol	20	33,85	
Triladyl	20		51,80
Sig.		,297	1,000

La prueba de Tukey al 5% para la variable RELACIÓN ESPERMATOZOIDES VIVOS/MUERTOS, establece que de todos los tratamientos el que genera una mejor relación espermatozoides vivos/muertos, es el tratamiento C: “Triladyl®” (51,80%) (**p<0.05**), seguido del tratamiento A “Trehalosa con glicerol” (33,85%) y el tratamiento B “Sacarosa con glicerol” (31,85%) (**p=0.297**), después del proceso de congelación-descongelación de semen.



Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

4.1.4. Análisis estadístico de la variable ESPERMATOZOIDES NORMALES/ANORMALES.

CUADRO 10. Comparación de medias para la variable de la variable espermatozoides normales/anormales entre semen antes de la congelación y el semen congelado-descongelado con los diferentes diluyentes empleados para la criopreservación.

Diluyente	Semen sin congelar	No de pajillas	Semen congelado-descongelado
Trehalosa con glicerol	90,5 a	20	86,2 a
Sacarosa con glicerol	89,0 a	20	84,85 a
Triladyl	91,5 a	20	86,85 a

Las diferencias entre semen antes de la congelación y descongelado para espermatozoides normales/anormales no son significativas ($p > 0.05$).

a, Literales iguales en columnas indican que no hay diferencias estadísticas entre medias de los tratamientos ($p > 0.05$).

En el cuadro N° 10 al realizar el análisis de varianza (ANOVA) no se denotó diferencias estadísticas significativas en la variable espermatozoides normales/anormales ($p > 0,05$) en semen sin congelar y los que fueron sometidos al proceso de congelación/descongelación. así también para esta misma variable, no hubo diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($p > 0.05$).



Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias
GRÁFICO 3. Medias de espermatozoides normales.

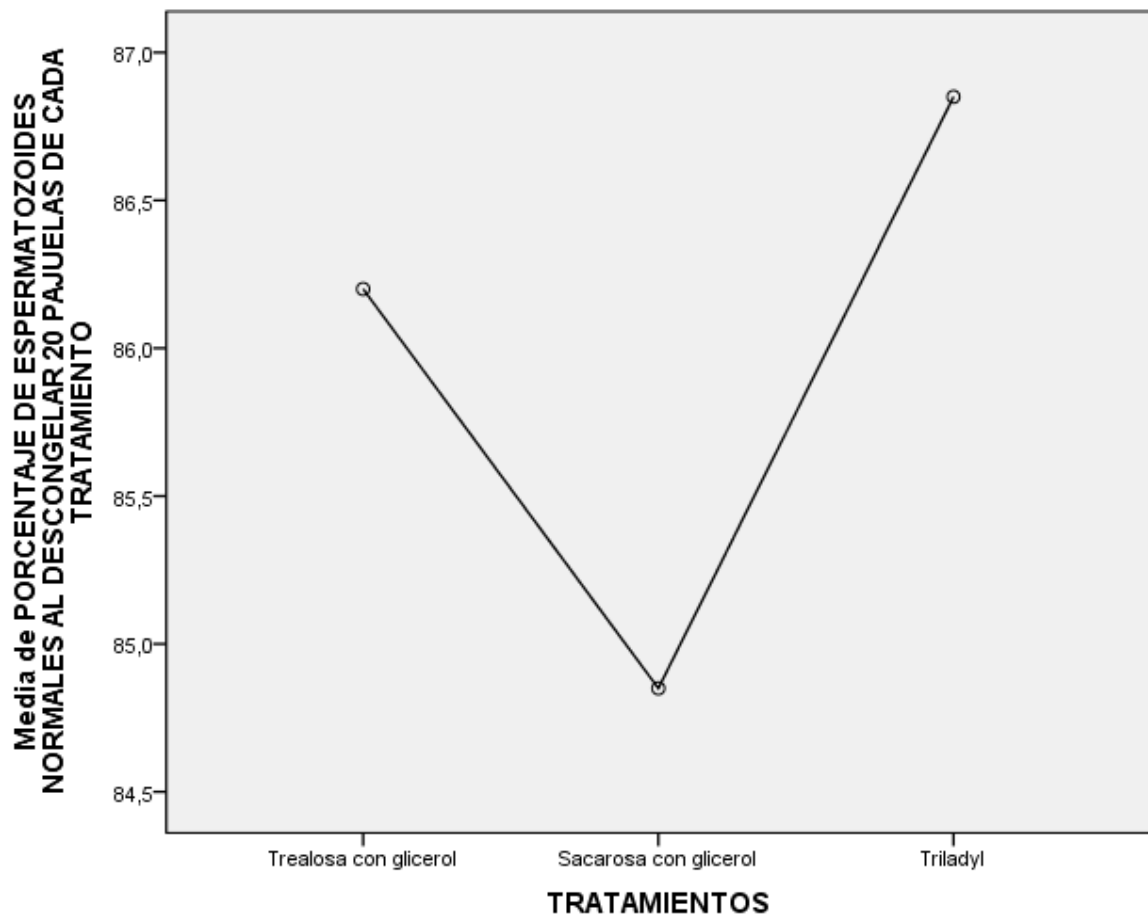


Gráfico N° 3.- Representación lineal de las medias de la variable “ESPERMATOZOIDES normales/anormales”.

Tratamiento A.- Trehalosa con glicerol; Tratamiento B.- Sacarosa con glicerol; Tratamiento C.- Triladyl®.

En el gráfico N° 3 se puede apreciar como mejor tratamiento en la variable espermatozoides normales/anormales, luego de la descongelación del semen al tratamiento C “Triladyl®”, seguido del A “Trehalosa con glicerol y B “Sacarosa con glicerol”. Sin embargo, en el análisis estadístico no se



Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias
encontraron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos por lo
que no se pudo aplicar la prueba de significación de Tukey al 5%.



5. DISCUSIÓN

El proceso de criopreservación de semen conduce a una pérdida de aproximadamente el 50% de los mismos, es por tal motivo que los protocolos de congelación deben ser realizados de acuerdo a la especie doméstica.

Los parámetros de caracterización seminal hallados en las muestras del reproductor eyaculado se encuentran dentro de los valores normales reportados por Medina et al., 2007.

Los resultados encontrados en la presente investigación indican que el uso de la Trehalosa con glicerol y Sacarosa con glicerol para la congelación del semen de toro de razas cárnicas, muestra una tendencia estadística ($p = 0,09$), esto sugiere que la combinación de la Trehalosa con glicerol da una mejor motilidad posdescongelación 32% con respecto a la Sacarosa con glicerol de 29,45%. No así con respecto al crioprotector comercial Triladyl encontrándose diferencias estadísticas significativas con respecto a los otros dos crioprotectores ($p < 0,05$), demostrándose que el crioprotector comercial es mejor para conservar la motilidad progresiva individual post-descongelación (46,50%).

Resultados similares fueron encontrados por Tonieto et al., 2010 quien reporta que la adición de Trehalosa conjuntamente con lipoproteínas de baja densidad sin la adición de glicerol mejora la calidad espermática en semen de carnero post-descongelación en relación a la integridad de la membrana 36,5% y la integridad acrosomal 65.3%, no así para la motilidad espermática 49,2%. Por lo tanto el uso de Trehalosa representa una alternativa al glicerol que este último es potencialmente citotóxico (Gutiérrez-Pérez et al., 2009).



Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Se ha sugerido que el principal efecto crioprotector de la Trehalosa en los diluyentes de congelación es la preservación de las estructuras de la membrana como el acrosoma. En este al respecto en toro (Serpil et al., 2009), cabra

(Aboagla et al., 2004) sugiriendo que la integridad del acrosoma aumenta cuando la Trehalosa es añadida a los medios de criopreservación.

Se ha informado que la protección de la Trehalosa durante la curva de frío se incrementa en combinación con glicerol esto se puede deber a un efecto sinérgico (Gutiérrez-Pérez et al., 2009).

La inclusión de Trehalosa y otros azúcares como crioprotectores en extensores de semen congelado pueden beneficiarse post-descongelación en cuanto a la viabilidad espermática (Matsuoka et al., 2006). La calidad del esperma después de la descongelación puede ser similar para los extensores que incluyen Trehalosa o glicerol (Moura et al., 1995) y la inclusión Trehalosa en extensores a base de glicerol no tiene un efecto post-descongelación sobre la motilidad espermática (Sánchez-Partida et al., 1998). Sin embargo, la inclusión de Trehalosa en extensores sin glicerol puede mejorar la motilidad de los espermatozoides (Molinia et al., 1994). El efecto crioprotector de la Trehalosa se puede atribuir a su actividad antioxidante (Aisen et al., 2005) además esta favorece la deshidratación celular e influye en el patrón de cristalización de los canales de soluto presentes en porciones de agua no congelada del extensor (Nicolajsen y Hvidt, 1994), que contribuye a la reducción de cristales de hielo (Aisen et al., 2005). Aisen et al., 2002 sugiere que un medio extensor hipertónico mejora la movilidad espermática en semen de carnero.



Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

En un estudio de Khalili et al., 2009 demostró que la adición de Trehalosa a un diluyente, fue estadísticamente superior a la Sacarosa ($p > 0.05$).

Además los valores reportados en la investigación citada anteriormente, Trehalosa (39.22 ± 0.62), Sacarosa (32.54 ± 0.75) son similares a los encontrados en la investigación realizada en este trabajo: Trehalosa (32,0%) y Sacarosa (29.45%), en relación a la motilidad progresiva.

El uso de crioprotectores comerciales como el Triladyl objeto de nuestro estudio, empleado en la refrigeración o congelación de semen en las diferentes especies domesticas ha tenido realce con respecto a ingredientes tradicionales, esto se puede deber a la eficacia y la facilidad en los diferentes protocolos de los usos de estos. Los resultados de la investigación realizada con relación a la utilización del crioprotector comercial Triladyl versus los azúcares trehalosa y sacarosa muestra diferencia estadística significativa ($p > 0.05$) en las siguientes características seminales: motilidad espermática Triladyl (46,5%) Trehalosa con glicerol (32%) y Sacarosa con glicerol (29.45%) y viabilidad espermática Triladyl (51,8%) Trehalosa con glicerol (33.85%) y Sacarosa con glicerol (31.85%) y no encontrándose diferencias en relación al porcentaje de espermatozoides normales ($p > 0.05$) Trehalosa con glicerol (86.2%); Sacarosa con glicerol (84.85%) y Triladyl (86.85%). Similares resultados fueron reportados por (Villa, 1996) quien comparó un protocolo tradicional tris-yema de huevo contra Triladyl y demostró que la movilidad espermática post-descongelación mejora con la utilización del crioprotector comercial ($p < 0.05$) todo esto bajo condiciones ambientales tropicales.

Sin embargo, Janett et al., 2005 compararon tres diluyentes comerciales Andromed, Bioxell y Triladyl reportaron que la motilidad post-descongelación del AndroMed® ($67.7 \pm 1.9\%$) fue estadísticamente diferente ($p < 0.05$) en comparación con Bioxcell® ($60.9 \pm 1.9\%$) y Triladyl® ($52.4 \pm 1.9\%$).



Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias
Comparando estos valores obtenidos por estos autores a los realizados en esta presente investigación no hay muchas diferencias entre los mismos.

Los resultados de la presente investigación son superiores a los encontrados por Amirat et al., 2005 quien comparó tres extender Biociphos, proteínas de baja densidad y Triladyl donde reportó valores para la motilidad progresiva espermática de 64.1 ± 1.7 , 61.00 ± 1.5 y 31.8 ± 1.2 respectivamente.

Los cambios de temperatura como el enfriamiento rápido y lento de semen entre 30°C y 0°C induce estrés en los espermatozoides y debe ser realizado cuidadosamente, además esto se relaciona con los cambios de la fase lipídica, la cual alteraría el estado funcional de la membrana (Meyers et al 2005). Mientras que el descenso de la temperatura por debajo de los 0°C , a un ritmo lento promueve una mayor salida de agua de la célula que conlleva a la deshidratación celular muy marcada, pero un enfriamiento rápido no es suficiente para permitir la salida de agua, lo que conduce a una formación de cristales de hielo intracelular (Celeghini et al., 2007)



6. CONCLUSIONES

- El tratamiento de Trehalosa con glicerol alcanzó porcentualmente una media de (32,00%) de motilidad progresiva, con una ligera tendencia al tratamiento de Sacarosa con glicerol (29,45%), pero en comparación con el tratamiento con el diluyente comercial Triladyl (46,50%), este último mostró estadísticamente ser mejor.
- En relación con la variable espermatozoides vivos/muertos, el tratamiento a base de Trehalosa con glicerol (33,85%), no presentó diferencia significativa frente a Sacarosa con glicerol (31,85%): mientras que el diluyente comercial Triladyl (51,80%), tuvo un resultado significativo frente a los dos tratamientos.
- Para la variable espermatozoides normales/anormales, los resultados obtenidos con los tratamientos Trehalosa con glicerol (86,2%), Sacarosa con glicerol (84,85%) y Triladyl (86,85%), no tuvieron diferencias significativas, no afectando los tratamientos a esta variable.



7. RECOMENDACIONES

- Tener presente la temperatura de la vagina artificial en el momento de la colecta ya que esto puede afectar el eyaculado del semental
- Es importante tener en cuenta para futuras investigaciones la edad de los animales para conseguir otros azúcares que puedan mejorar la calidad del semen a costos más económicos.
- Se recomienda seguir investigando en base a otros azúcares no permeables en lo referente a la congelación de semen.



8. BIBLIOGRAFÍA

1. **ABOAGLA, E. Y TERADA, T. 2004**, Effects of the supplementation of trehalose extender containing egg yolk with sodium dodecyl sulfate on the freezability of goat spermatozoa, *Theriogenology* 62 (2004) 809–818. <http://www.bioreprod.org/content/69/4/1245.full.pdf+html>
2. **AISEN, EG.; et al. 2000**. Effect of trehalosa and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology*. 53, 1053-1061. Obtenida de <http://www.academicjournals.org/ajar/pdf/pdf2011/18%20Feb/Yamashiro%20et%20al.pdf>
3. **AN, TZ.; et al. 2000**. Factors affecting the survival of frozen-thawed mouse spermatozoa. *Cryobiology*. 40, 237- 249. Obtenida de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0011224000922454>.
4. **AISEN, et al., 2005**. Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. *Cryobiology*, 50 (2005), pp. 239–249. Obtenido de <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=16845802>.
5. **AISEN, et al., 2002**, Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology*, 57 , pp. 1801–1808. Obtenido de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X02006532>.
6. **AITKEN, R.J.; et al. 1998**. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *BiolReprod*; 59:1037–46. Obtenido de <http://www.bioreprod.org/content/59/5/1037.short>.



- Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias
7. **BAILEY, J. Y BUHR, M. 1994.** Cryopreservation alters the Ca⁺⁺ flux of bovine spermatozoa. *Can. J. Anim. Sci.* 74, 45-51. Obtenida de <http://pubs.aic.ca/doi/abs/10.4141/cjas94-007>.
 8. **BALL, BA. Y VO, A. 2001.** Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potential. *J Androl.* . 22, 1061-1069. Obtenida de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.1939-4640.2001.tb03446.x/abstract>
 9. **BATHGATE, R.; MAXWELL, WMC. Y EVANS, G. 2006.** Studies on the effect of supplementing boar semen cryopreservation media with different avian egg yolk types on in vitro on post-thaw sperm quality. *Reprod. Dom. Anim.* 41: 68-73. Obtenida de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0531.2006.00623.x/abstract?deniedAccessCustomisedMessage=&userIsAuthenticated=false>.
 10. **BITTENCOURT, R. 2004.** Freezing goat semen with glycerol and ethylene glycol as the cryoprotective agents. 15th International Congress on Animal Reproduction, Porto Seguro, Brazil. 487p.
 11. **BOISO, I. 2001.** Principios básicos de criobiología. *Revista Iberoamericana de Fertilidad.* 18, 127-131.
 12. **BHUR, M.; et al. 2001.** Cryopreservation in different concentrations of glycerol alters boar sperm and their membranes, *J. Androl.* 22: (6) 961–969. Obtenida de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.1939-4640.2001.tb03436.x/pdf>.
 13. **BWANGA, CO. 1991.** Cryopreservation of boar semen. IA literature review, department of Obstetrics and Gynecology. Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala, Sweden. *Acta Vet Scand.* 32, 4: 431-453. Obtenida de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1818503>.
 14. **CARRASCOSA, RE.; et al. 2001.** Storage of Chinchilla lanigera semen at 4 degrees C for 24 or 72 h with two different cryoprotectants.



- Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias
Cryobiology. 42, 301-306. Obtenida de
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Carrascosa%2C+RE.%3B+e+t+al.+2001>.
15. **CURRY, MR. Y WATSON, PF. 1994.** Osmotic effects on ram and human sperm membranes in relation to thawing injury. *Cryobiology*. 31, 39-46. Obtenida de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0011224084710054>.
16. **CURRY M. 2000.** Criopreservación de semen de ganado doméstico. *Reviews of Reproduction*. 5, 46-52. Obtenida de <http://ror.reproduction-online.org/cgi/reprint/5/1/46>
17. **EL-ALAMY, M. Y FOOTE, RH. 2001.** Freezability of spermatozoa from Finn and Dorset rams in multiple semen extenders. *Anim. Repro. Sci.* 65, 245-254. Obtenida de [http://www.animalreproductionscience.com/article/S0378-4320\(00\)00230-X/abstract](http://www.animalreproductionscience.com/article/S0378-4320(00)00230-X/abstract).
18. **F. Chen, T. Nakamura, H. Wada,** Development of new organ preservation solutions in Kyoto University, *Yonsei Med. J.* 45 (6) (2004) 1107–1114. <http://ymj.kr/Synapse/Data/PDFData/0069YMJ/ymj-45-1107.pdf>
19. **CHATTERJEE, S.; DE LAMIRANDE, E. Y GAGNON C. 2001;** Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: protection by oxidized glutathione. *MolReprodDev* 60: 498-06. Obtenida de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mrd.1115/abstract>.
20. **Chaveiro A, Machado L, Frijters A, Engel B, Woelders H. 2006.** Improvement of parameters of freezing medium and freezing protocol for bull sperm using two osmotic supports. *Theriogenology* 65. 1875-1890. <http://www.angra.uac.pt/MPA/MPA/P%C3%A1ginas%20do%20Mestrado/Mestrado/Reprodu%C3%A7%C3%A3o/Antonio%20Chaveiro/Improvement.pdf>



Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias

21. **DEPPE, M.; et al 2003.** Efecto de agentes crioprotectores sobre la preservación del acrosoma. II Reunión Anual Sociedad de Andrología y Gametología de Chile. IV Jornadas Internacionales de Medicina Reproductiva y Biología de la Reproducción, Temuco, Chile. Obtenida de http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-95022003000200012.
22. **FISER, PS.; AINSWORTH, L. Y LANGFORD GA. 1981.** Effect of osmolarity of skim milk diluents and thawing rate on cryosurvival of ram spermatozoa. *Cryobiology*. 18, 399-403. Obtenida de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0011224081901139>.
23. **FOOTE, RH.; BROCKETT, CC. Y KAPROTH, MT. 2002.** Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. *Anim. Repro. Sci.* 71, 13-23. Obtenida de [http://www.animalreproductionscience.com/article/S0378-4320\(02\)00018-0/abstract](http://www.animalreproductionscience.com/article/S0378-4320(02)00018-0/abstract).
24. **FRASER, L.; GORSZCZARUK, K. Y AND STRZEZEK, J. 2001.** Relationship between motility and membrane integrity of boar spermatozoa in media varying in osmolality. *Reprod. Domest. Anim.* 36: 325-329. Obtenida de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1439-0531.2001.00310.x/full>.
25. **FLOWERS, WL. Y ESBENSHADE KL. 1993.** Optimizing management of natural and artificial matings in swine. *J. ReprodFert. Supp.* 48: 217-228. Obtenida de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8145206>.
26. **GARNER, D.L. Y HÁFEZ E.S.E 2000.** Spermatozoa and Seminal Plasma. En: Háfes, E.S.E. and Háfes. B (eds)., *Reproduction in farm animals*, 7th edition. Lippincott Williams & Wilkins Company, Philadelphia, pp 96-109.
27. **GARCÍA J. Y VILA L. 1984.** Criopreservadores: concepto y manejo. *Biología y Clínica Hematológica*. 6, 219-225.



- Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias
28. **GADEA, J.; et al. 2003.** Factores que afectan a la capacidad de congelación del semen porcino ITEA. 24: 330-332. Obtenida de <http://www.vet-uy.com/articulos/cerdos/050/0007/porc007.htm>.
29. **GILMORE, JA.; et al. 1996.** Osmotic properties of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation. J. Reprod. Fertil. 107: 87-95. Obtenida de <http://www.reproduction-online.org/content/107/1/87.long>.
30. **GILMORE, JA.; et al. 2000.** Cryoprotective agent and temperature effects on human sperm membrane permeabilities: convergence of theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods. Human Reproduction. 15, 335-343. Obtenida de <http://humrep.oxfordjournals.org/content/15/2/335.long>.
31. **GIL, J.; SÖDERQUIST L. Y RODRIGUEZ-MARTÍNEZ H. 2000.** Influence of centrifugation and different extenders on post-thaw sperm quality of ram semen. Theriogenology. 54, 93-108. Obtenida de [http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X\(00\)00328-9/abstract](http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X(00)00328-9/abstract).
32. **GIL J.; et al. 2003.** Fertility of ram semen frozen in Bioexcell® and used for cervical artificial insemination. Theriogenology. 59, 1157-1170. Obtenida de [http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X\(02\)01178-0/abstract](http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X(02)01178-0/abstract).
33. **GIL, J.; et al. 2003b.** Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. Theriogenology. 59, 1241-1255. Obtenida de [http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X\(02\)01177-9/abstract](http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X(02)01177-9/abstract).
34. **GUTHRIE, HD.; LIU, J. Y CRITSER JK. 2002.** Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. BiolReprod. 67, 1811-1816. Obtenida de <http://www.biolreprod.org/content/67/6/1811.long>.



Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

35. **Gutiérrez-Pérez O, Juárez-Mosqueda, M, Uribe Carvajal S, Trujillo**

Ortega M. Boar spermatozoa cryopreservation in low glycerol/trehalose enriched freezing media improves cellular integrity. *Cryobiology* 58 (2009) 287–292

http://scholar.google.com.ec/scholar?q=Boar+spermatozoa+cryopreservation+in+low+glycerol/trehalose+enriched+freezing+media+improves+cellular+integrity&hl=es&as_sdt=0&as_vis=1&oi=scholart&sa=X&ei=bL8XUp6ulaXQ2AW6l4CgBw&ved=0CCoQgQMwAA

36. **GROSSMANN, M. Y SANTALÓ, J. 1991.** Aspect esteòrics de la congelació de gàmetes In embrions. *TrebSocCatBiol.* 42, 87-108.

37. **HAFEZ, E.S.E.** Reproducción e inseminación artificial en animales. [ed.] b hafez. [trad.] Elia Olvera Martínez Guillermina Féher de la Torre. Séptima. México : Mc Graw Hill interamericana, 2002. pág. 375.

38. **HEROLD, F.C.; AURICH, J.E. Y GERBER, D. 2003.** Epididymal sperm from African buffalo (*synceruscaffer*) can be frozen successfully with Andro- Med® and with Triladyl® but the addition of bovine seminal plasma is detrimental. *Therioenology*, in press. Obtenida de [http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X\(03\)00256-5/abstract](http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X(03)00256-5/abstract).

39. **HEROLD, FC. 2004.** Comparison of three different media for freezing of epididymal sperm from the African buffalo (*Synceruscaffer*) and influence of equilibration time on the post-thaw sperm quality. *Onderstepoort J Vet Res.* Obtenida de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15580769>.

40. **HERNÁNDEZ, J. Y ZAVALA J. 2007.** Reproducción Bovina. Primera. México DF: Universidad Nacional Autónoma de México, pág. 307.

41. **HELLEMAN C, Y JARA C. 1997.** Efecto de un surfactante sobre la integridad de espermatozoides ovinos crioconservados. *Archivos de medicina veterinaria.* 29, 153-160. Obtenida de



Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias
http://mingaonline.uach.cl/scielo.php?pid=S0301-732X1997000100019&script=sci_arttext.

42. **HOSKINS, D. Y CASILLAS E. 1973.** Function of cyclic nucleotides in mammalian spermatozoa. En: Handbook of Physiology, Section 7, Endocrinology, Vol. V, Male Reproductive System. R.O. Greep y E.B. Astwood (eds.). Washington D.C., American Physiological Society, pp. 453-460.
43. **HOLT. 2000.** Basic aspects of frozen storage of semen. Anim. Reprod. Sci., 62 (2000), pp. 3–22. Obtenida de www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10924818.
44. **HOLT, WV. 2000.** Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. Theriogenology 53, 47-58. Obtenida de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10735061>.
45. **ISHIBASHI, K.; et al. 1997.** Cloning and functional expression of a new water channel abundantly expressed in the testis permeable to water, glycerol and urea. Journal of Biological Chemistry. 272, 20782–20786. Obtenida de <http://www.jbc.org/content/272/33/20782.long>.
46. **JANETT, F.; et al. 2005.** Comparison of AndroMed®, Bioxcell® and Triladyl® extender for cryopreservation of bull semen. 147: 62 (Abstract, Poster). Obtenida de <http://www.research-projects.uzh.ch/p5601.htm>.
47. **KHALILI B.; et al. 2009.** Effects of sucrose and trehalose on the freezability of Markhoz goat spermatozoa. Asian-Australasian Journal Animal Science, 22, 1614-1619. Obtenido de <http://www.ajas.info/Editor/manuscript/upload/22-208.pdf>.
48. **KUMAR, S.; MILLAR, JD. Y WATSON, PF. 2003.** The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. Cryobiology. 46, 246-253. Obtenida de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0011224003000403>.



- Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias
49. **LAMIA, AMIRAT.; et al. . 2005.** Modifications of bull spermatozoa induced by three extenders: Biociphos, low density lipoprotein and Triladyl, before, during and after freezing and thawing 2Reproduction129 535–543. Obtenida de <http://www.reproduction-online.org/content/129/4/535.long>.
50. **MANN T. (1975).** Biochemistry of semen. En: Handbook of Physiology, Section7, Endocrinology, Vol. V, Male Reproductive System. R.O. Greep y E.B. Astwood(eds.). Washington, DC, American Physiological Society. Obtenida de http://archive.org/stream/biochemistryofse00mann/biochemistryofse00mann_djvu.txt
51. **MATSUOKA, H.; et al. 2006.** Effects of bovine serum albumin and trehalose in semen diluents for improvement of frozen-thawed ram spermatozoa. J. Reprod. Dev., 52 (2006), pp. 675–683. Obtenida de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16905877>.
52. **MANTOVANI, R.; et al. 2002.** Comparison between glycerol and ethylene glycol for the cryopreservation of equine spermatozoa: semen quality assessment with standard analyses and with the hypoosmotic swelling test. Reproduction, Nutrition, Development. 42, 217-226. Obtenida de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12405450>.
53. **MAYES, P. 1997b.** Carbohidratos de importancia fisiológica. En: Murray R, Granner, D., Mayes, P. y Rodwell, V. (eds)., Bioquímica de Harper, 24ª edición. Editorial Manual Moderno, Mexico, D.F., Mexico. pp 165-176.
54. **MAZUR, P. 1984.** Freezing of living cells: mechanism and implications. The American Journal of Physiology. 247, 125-142. Obtenido de <http://ajpcell.physiology.org/content/247/3/C125.reprint>.
55. **MAXWELL, W. Y WATSON, P. 1996.** Recent progress in the preservation of ram semen. Anim. Repro. Sci. 42, 55-65. Obtenida de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378432096015448>.



56. **MEDEIROS, CM.; et al. 2002.** Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better?. *Theriogenology*. 57, 327-344. Watson PF. 1981. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5° C by egg-yolk lipoprotein. *J. Rep Fert.* 62: 483-492. Obtenida de [http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X\(01\)00674-4/abstract](http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X(01)00674-4/abstract).
57. **MEDINA-ROBLES V.M, SANCHEZ-CARVAJAL Y.M, CRUZ CASALLAS P.E.** Criopreservacion de semen bovino usando un congelador programable *CL-8800) y determinacion de su calidad postdescongelacion por medio un sistema de analisis espermatico asistido por computadora (CASA). *Revista Orinoquia* 11: 1.2007 http://orinoquia.unillanos.edu.co/index2.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=249&Itemid=35
58. **MOLINIA, FC.; EVANS, G. Y MAXWELL, WM. 1994a.** Incorporation of penetrating cryoprotectants in diluents for pellet-freezing ram spermatozoa. *Theriogenology*. 42, 849-858. Obtenida de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0093691X9490453P>.
59. **MOLINIA FC. et al. 1994b.** Effect of monosaccharides and disaccharides in Tris-based diluent on motility, acrosome integrity and fertility of pellet frozen ram spermatozoa. *Anim. Repro. Sci.* 36, 113- 122. Obtenida de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378432094900582>.
60. **MOURA, J.C.; DESCHAMPS Y J.C.F. MORAES. 1995.** Effect of the concentration and addition temperature of trehalose in extenders on freezing ram semen in straws. *Ciência Rural*, 25 (1995), pp. 105–109. Obtenido de http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84781995000100020&script=sci_arttext.
61. **MOLINIA, FC.; EVANS, G. Y MAXWELL, WM. 1994c.** In vitro evaluation of switterion buffers in diluents for freezing ram spermatozoa.



Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias
Reproduction, Nutrition, Development. 34, 491-500. Obtenido de
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7802941>.

62. **MUHAMMAD, AR.; et al. 2002.** Sperm Apoptosis in Fresh and Cryopreserved Bull Semen Detected by Flow Cytometry and Its Relationship with Fertility, *Biology of Reproduction*. 66: 354-360. Obtenido de <http://www.biolreprod.org/content/66/2/354.long>.
63. **MURDOCH, RN. Y JONES, RC. 1978.** The effects of glycerol on the metabolism and ultrastructure of boar spermatozoa, *J. Reprod. Fert.* 54: 419–422. Obtenida de <http://www.reproduction-online.org/content/54/2/419.long>.
64. **NICOLAJSEN Y HVIDT. 1994,** Phase behavior of the system trehalose–NaCl–water. *Cryobiology*, 31 (1994), pp. 199–205. Obtenido de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0011224084710248>
65. **NEWTH, MS. Y LEVIS DG. 1999.** Change in pH boar semen extenders. *Nebraska Swine Report*. 3-6. Obtenida de <http://digitalcommons.unl.edu>.
66. **PAULENZ, H.; et al. 2002.** Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. *Theriogenology*. 57, 823-836. Obtenida de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X01006835>.
67. **PEREIRA, SM.; et al. 2002.** Ethylene glycol on canine semen cryopreservation. *Ciencia Rural*. 32, 649-655. Obtenida de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16879862>.
68. **POLGE, C.; SALAMON, S. Y WILMUT. 1970.** Fertilizing capacity of frozen boar semen following surgical insemination. *Vet Rec*; 87: 424-428. <http://www.cabdirect.org/abstracts/19710100816.html;jsessionid=E34FD F0A9421BCE6340158C9E1EC1EA8>.
69. **QUINN, P.J.; WHITE IG. Y CLELAND RW. 1969.** Chemical and ultrastructural changes in ram spermatozoa after washing, cold shock and freezing. *J ReprodFertil.* 18, 209-220. Obtenida de <http://www.reproduction-online.org/content/18/2/209.short>.



70. **RALL, WF. Y FAHY, GM. 1985.** Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature*. 313, 573-575. Obtenida de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Rall+WF%2C+Fahy+GM.+1985.+Ice-free+cryopreservation+of+mouse+embryos+at+-196%C2%B0C+by+vitrification>.
71. **RIGAU, T.; et al. 1996.** The rate of L-lactate production: a feasible parameter for the fresh diluted boar semen quality analysis. *Anim. Reprod, Sci.* 43: 161-172. Obtenida de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378432096014960>.
72. **SALAMON, S. Y MAXWELL WMC. 1995a.** Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Anim ReprodSci* 37: 185-249. Obtenida de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378432094013271>.
73. **SALAMON, S. Y MAXWELL, W. 2000.** Storage of ram semen. *Anim. Repro. Sci.* 62, 77-111. Obtenida de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037843200000155X>.
74. **SANTIANI, A. 2003.** Criopreservación de semen ovino: efecto de la adición de antioxidantes al diluyente. Tesis para obtener el grado de Magíster en Ciencias mención en Biología de la reproducción. Facultad de Medicina-Universidad de la Frontera. Temuco-Chile.
75. **SÁNCHEZ-PARTIDA, LG.; SETCHELL, BP. Y MAXWELL, WM. 1998.** Effect of compatible solutes and diluent composition on the post-thaw motility of ram sperm. *Reproduction, Fertility, and Development*. 10, 347-357. Obtenida de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10355687>.
76. **SÁNCHEZ-PARTIDA, GL.; et al. 1999.** Fertility and its relationship to motility characteristics of spermatozoa in ewes after cervical, transcervical, and intrauterine insemination with frozenthawed ram semen. *J Androl* 20: 280-288. Obtenida de



Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.1939-4640.1999.tb02519.x/abstract>.

77. **Serpil Sariözkan, Mustafa Numan Bucak, Pürhan Barbaros Tuncer, Pınar Alkım Ulutaş, Ali Bilgen. 2009.** The influence of cysteine and taurine on microscopic–oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. 58, 2, , 134–138
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0011224008003040>
78. **STEWART, DL. 1951.** Store of bull spermatozoa at low temperatures. Vet Rec; 63: 65-66.
79. **SZTEIN, J.; et al. 2001.** Comparison of permeating and non-permeating cryoprotectants for mouse sperm cryopreservation. Cryobiology. 42, 28-39. Obtenida de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=SZTEIN%2C+J.%3B+et+al.+2001>.
80. **TONIETO, RA.; et al 2010.** Cryoprotectant effect of trehalose and low-density lipoprotein in extenders for frozen ram semen. Small Ruminant Research, 93, 206-209. Obtenida de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921448810001537>.
81. **THOMPSON, K.; et al. 2001.** Dialysis addition of trehalosa/glycerol cryoprotectant allows recovery of cryopreserved mouse spermatozoa with satisfactory fertilizing ability as assessed by yield of live young. JAndrol. 22, 339-244. Obtenida de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.1939-4640.2001.tb02187.x/abstract>.
82. **TROUNSON, A. 1986.** Preservation of human eggs and embryos. FertilSteril. 4, 1-12. Obtenida de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3522279>.
83. **VILA, L. Y GARCÍA, T. 1983.** Revisión de los aspectos termodinámicos y cinéticos implicados en un proceso de criopreservación biológica. BiolClinHematol. 5, 135-142.



- Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias
84. **Vila L. 1984.** Principios químico-físicos de la criopreservación de material biológico. *BiolClinHematol.* 6, 227-236.
85. **Vila L. y Carretero F. 1985.** Manejo de congeladores programables. *BiolClinHematol.* 7, 61-67.
86. **Villa LG. 1996.** Tesis efecto de diferentes tratamientos en el procesamiento y en la movilidad pos descongelación de espermatozoides criopreservados de bovino ¿. Veracruz, MÉxico Universidad Veracruzana.
87. **WATSON, P. Y MARTIN, I. 1975.** Effects of egg yolk, glycerol and the freezing rate on the viability and acrosomal structures of frozen ram spermatozoa. *Australian Journal of Biological Science.* 28, 153-159. Obtenida de <http://www.publish.csiro.au/paper/BI9750153>.
88. **WATSON, PF. 1990.** Artificial insemination and the preservation of semen. En: Lamming GE. (ed). *Marshals Physiology of Reproduction 2. Reproduction in the male.* Churchil Livingstone. Edinburgo. 747-869. Obtenida de <http://europepmc.org/abstract/MED/1576550/reload=0;jsessionid=E8BUz3KdyYVhBfYHNuUZ.8>.
89. **WATSON, PF. 1995.** Recent developments and concepts in the criopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertile. Dev.* 7: 871-891. Obtenida de <http://www.publish.csiro.au/?paper=RD9950871>.
90. **WATSON, P. 2000.** The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Repro. Sci.* 60-61, 481-492. Obtenida de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432000000993>.
91. **WHITE, I. 1980.** Secretion of the male reproductive tract and seminal plasma. En: *Reproduction in Farm Animals.* 4th ed. E.S.E. Hafez (ed.). Philadelphia, Lea &Febiger.



Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

ANEXOS



ANEXO N° 1.

Sistema de valoración visual de la concentración espermática, consistencia y onda de movimiento del semen de carnero (Evans, et. al., 1990; Hafez, et. al., 2004; Melling, et. al., 2000).

Puntuación y Calificación		Consistencia	Descripción*	Número de espermatozoides ($n \times 10^9$)	
				Media	Rango
5	Muy buena	Creimoso espeso	Denso, ondas de movimiento muy rápidas. No se puede observar las células individuales. El 90% o más de los espermatozoides son activos.	5,0	4,5-6
4	Buena	Creimoso	Movimiento vigoroso, pero las ondas y los remolinos no son rápidos como los de valor 5. Alrededor de 70 a 85% de células activas.	4,0	3,5- 4,5
3	Regular	Creimoso liviano o diluido	Sólo aparecen ondas de movimiento lento. Se pueden ver espermatozoides aislados. El 45 a 65% de las células son activas.	3,0	2,5-3,5
2	Pobre	Lechoso	No aparecen ondas. Existe algún movimiento de espermatozoides. 20 a 40% están vivos pero su movilidad es pobre.	2,0	1,0-2,5
1	Muy pobre	Nublado o brumoso	Muy pocos espermatozoides muestran signos de vida (10%) y con movimientos débiles.	0,7	0,3-1,0
0	Muertos	Ac uoso claro o transparente	Ningún espermatozoide presenta movimiento.	Insignificante	




















Universidad de Cuenca
* Observadas al microscopio.

Facultad de Ciencias Agropecuarias






Alteraciones morfológicas de los espermatozoides de acuerdo a la región:
Acrosoma, Cabeza, Pieza intermedia y Cola.

Acrosoma	 normal	 pequeño	 disuelto	 deformado	
	 torcido				
Cabeza	 normal	 microcéfalo	 macrocéfalo	 angosta	 deformada
	 piriforme				
Pieza intermedia	 normal	 paraxial	 retroaxial	 deformada	 fibrilar
	 gota citoplasmática				



Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Cola	 normal	 rudimentaria	 doble	 doble con dos cabezas	 moño
	 retorcida	 retroaxial con gota			



Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias
ANEXO N° 3.

Resultados de las muestras de semen fresco en el experimento por tratamiento.

ANEXO 3.1. Volumen

Tratamiento	Eyaculado 1 Volumen (ml)	Eyaculado 2 Volumen (ml)
Trehalosa	4	5
Sacarosa	7	6
Triladyl	4	6

ANEXO 3.2. Características visuales del semen.

Tratamiento	Color	Calificación	Referencia
Trehalosa	Cre moso	Muy buena	mayor a 750×10^6
Sacarosa	Cre moso	Muy buena	mayor a 750×10^6
Triladyl	Cre moso	Muy buena	mayor a 750×10^6

ANEXO 3.3. ph del eyaculado.

Tratamiento	pH
Trehalosa	6,5
Sacarosa	7,5
Triladyl	7,2



ANEXO 3.4. Motilidad progresiva individual y concentración.

Tratamiento	Motilidad % Eyaculado 1	Motilidad % Eyaculado 2	Media
Trehalosa	85	86	85,50
Sacarosa	80	85	82,50
Triladyl	85	88	86,50
Tratamiento	Espermatozoides por ml (10⁶) Eyaculado 1	Espermatozoides por ml (10⁶) Eyaculado 2	Media
Trehalosa	850	900	875
Sacarosa	850	870	860
Triladyl	800	850	825

ANEXO 3.5. Motilidad progresiva inicial y motilidad al descongelado.

Tratamientos	Motilidad Inicial %	Motilidad al descongelado %
Trehalosa con glicerol	84	32
Sacarosa con glicerol	81,5	29,45
Triladyl	83,5	46,50



Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias
ANEXO N° 4.

Evaluación estadística de MOTILIDAD PROGRESIVA
POSDESCONGELACIÓN.

ANEXO 4.1. MOTILIDAD PROGRESIVA POSDESCONGELACIÓN

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%
					Límite inferior
Trealosa con glicerol	20	32,00	3,061	,684	30,57
Sacarosa con glicerol	20	29,45	3,154	,705	27,97
Triladyl	20	46,50	4,894	1,094	44,21
Total	60	35,98	8,442	1,090	33,80

ANEXO 4.2. MOTILIDAD PROGRESIVA POSDESCONGELACIÓN VALORES MÁXIMOS Y MÍNIMOS

	Intervalo de confianza para la media al 95%	Mínimo	Máximo
	Límite superior		
Trealosa con glicerol	33,43	27	38
Sacarosa con glicerol	30,93	25	35
Triladyl	48,79	40	55
Total	38,16	25	55

ANEXO 4.3. PRUEBA DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS



Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
3,162	2	57	,050

ANEXO 4.4. ANOVA DE UN FACTOR

	Suma de cuadrados	GI	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	3383,033	2	1691,517	117,302	,000
Intra-grupos	821,950	57	14,420		
Total	4204,983	59			

ANEXO 4.5. COMPARACIONES MÚLTIPLES DE MOTILIDAD PROGRESIVA POSDESCONGELACIÓN.

HSD de Tukey

(I) TRATAMIENTOS	(J) TRATAMIENTOS	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%
					Límite inferior
Trealosa con glicerol	Sacarosa con glicerol	2,550	1,201	,094	-,34
	Triladyl	-14,500*	1,201	,000	-17,39
Sacarosa con glicerol	Trealosa con glicerol	-2,550	1,201	,094	-5,44
	Triladyl	-17,050*	1,201	,000	-19,94
Triladyl	Trealosa con glicerol	14,500*	1,201	,000	11,61
	Sacarosa con glicerol	17,050*	1,201	,000	14,16



Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias



Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias
 ANEXO 4.6. DIFERENCIA DE MEDIAS, COMPARACIONES MÚLTIPLES.

HSD de Tukey

(I) TRATAMIENTOS	(J) TRATAMIENTOS	Intervalo de confianza al 95%
		Límite superior
Trealosa con glicerol	Sacarosa con glicerol	5,44
	Triladyl	-11,61*
Sacarosa con glicerol	Trealosa con glicerol	,34
	Triladyl	-14,16*
Triladyl	Trealosa con glicerol	17,39*
	Sacarosa con glicerol	19,94*

ANEXO 4.7. DIFERENCIA ENTRE LOS TRATAMIENTOS

HSD de Tukey

TRATAMIENTOS	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Sacarosa con glicerol	20	29,45	
Trealosa con glicerol	20	32,00	
Triladyl	20		46,50
Sig.		,094	1,000



Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias
ANEXO N° 5.

Evaluación estadística de ESPERMATOZOIDES VIVOS/MUERTOS POSDESCONGELACIÓN.

ANEXO 5.1. PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES VIVOS/MUERTOS POSDESCONGELACIÓN.

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%
					Límite inferior
Trehalosa con glicerol	20	33,85	2,996	,670	32,45
Sacarosa con glicerol	20	31,85	3,829	,856	30,06
Triladyl	20	51,80	5,435	1,215	49,26
Total	60	39,17	9,948	1,284	36,60

ANEXO 5.2. PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES VIVOS/MUERTOS POSDESCONGELACIÓN VALORES MÁXIMOS Y MÍNIMOS.

	Intervalo de confianza para la media al 95%	Mínimo	Máximo
	Límite superior		
Trehalosa con glicerol	35,25	29	40
Sacarosa con glicerol	33,64	25	39
Triladyl	54,34	44	62
Total	41,74	25	62

ANEXO 5.3. PRUEBA DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS.

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
-----------------------	-----	-----	------



Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

3,925	2	57	,025
-------	---	----	------



Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias
 ANEXO 5.4. ANOVA DE UN FACTOR.

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	4828,033	2	2414,017	136,196	,000
Intra-grupos	1010,300	57	17,725		
Total	5838,333	59			

ANEXO 5.5. COMPARACIONES MÚLTIPLES DE ESPERMATOZOIDES VIVOS/MUERTOS POSDESCONGELACIÓN.

HSD de Tukey

(I) TRATAMIENTOS	(J) TRATAMIENTOS	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%
					Límite inferior
Trealosa con glicerol	Sacarosa con glicerol	2,000	1,331	,297	-1,20
	Triladyl	-17,950*	1,331	,000	-21,15
Sacarosa con glicerol	Trealosa con glicerol	-2,000	1,331	,297	-5,20
	Triladyl	-19,950*	1,331	,000	-23,15
Triladyl	Trealosa con glicerol	17,950*	1,331	,000	14,75
	Sacarosa con glicerol	19,950*	1,331	,000	16,75



Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias
 ANEXO 5.6. DIFERENCIA DE MEDIAS, COMPARACIONES MÚLTIPLES.

HSD de Tukey

(I) TRATAMIENTOS	(J) TRATAMIENTOS	Intervalo de confianza al 95%
		Límite superior
Trealosa con glicerol	Sacarosa con glicerol	5,20
	Triladyl	-14,75*
Sacarosa con glicerol	Trealosa con glicerol	1,20
	Triladyl	-16,75*
Triladyl	Trealosa con glicerol	21,15*
	Sacarosa con glicerol	23,15*

ANEXO 5.7. DIFERENCIA ENTRE LOS TRATAMIENTOS

HSD de Tukey

TRATAMIENTOS	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Sacarosa con glicerol	20	31,85	
Trealosa con glicerol	20	33,85	
Triladyl	20		51,80
Sig.		,297	1,000



Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias
ANEXO N° 6.

Evaluación estadística de ESPERMATOZOIDES NORMALES/ANORMALES POSDESCONGELACIÓN.

ANEXO 6.1. PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES NORMALES/ANORMALES POSDESCONGELACIÓN

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%
					Límite inferior
Trehalosa con glicerol	20	86,20	4,561	1,020	84,07
Sacarosa con glicerol	20	84,85	3,297	,737	83,31
Triladyl	20	86,85	1,899	,425	85,96
Total	60	85,97	3,474	,448	85,07

ANEXO 6.2. PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES NORMALES/ANORMALES POSDESCONGELACIÓN, VALORES MÁXIMOS Y MÍNIMOS

	Intervalo de confianza para la media al 95%	Mínimo	Máximo
	Límite superior		
Trealosa con glicerol	88,33	77	92
Sacarosa con glicerol	86,39	78	89
Triladyl	87,74	82	89
Total	86,86	77	92



Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias



Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias
 ANEXO 6.3. PRUEBA DE HOMOGENEIDAD DE LAS VARIANZAS

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
7,588	2	57	,001

ANEXO 6.4. ANOVA DE UN FACTOR

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	41,633	2	20,817	1,770	,180
Intra-grupos	670,300	57	11,760		
Total	711,933	59			

ANEXO 6.5. COMPARACIONES MÚLTIPLES DE ESPERMATOZOIDES NORMALES/ANORMLES POSDESCONGELACIÓN.

HSD de Tukey

(I) TRATAMIENTOS	(J) TRATAMIENTOS	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%
					Límite inferior
Trealosa con glicerol	Sacarosa con glicerol	1,350	1,084	,432	-1,26
	Triladyl	-,650	1,084	,821	-3,26
Sacarosa con glicerol	Trealosa con glicerol	-1,350	1,084	,432	-3,96
	Triladyl	-2,000	1,084	,165	-4,61
Triladyl	Trealosa con glicerol	,650	1,084	,821	-1,96



Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Sacarosa con glicerol	2,000	1,084	,165	-,61
-----------------------	-------	-------	------	------



Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias
 ANEXO 6.6. DIFERENCIA DE MEDIAS, COMPARACIONES MÚLTIPLES.

HSD de Tukey

(I) TRATAMIENTOS	(J) TRATAMIENTOS	Intervalo de confianza al 95%
		Límite superior
Trealosa con glicerol	Sacarosa con glicerol	3,96
	Triladyl	1,96
Sacarosa con glicerol	Trealosa con glicerol	1,26
	Triladyl	,61
Triladyl	Trealosa con glicerol	3,26
	Sacarosa con glicerol	4,61

ANEXO 6.7. DIFERENCIA ENTRE LOS TRATAMIENTOS

HSD de Tukey

TRATAMIENTOS	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1
Sacarosa con glicerol	20	84,85
Trealosa con glicerol	20	86,20
Triladyl	20	86,85
Sig.		,165



Universidad de Cuenca
ANEXO N° 7.

Facultad de Ciencias Agropecuarias

MATERIALES UTILIZADOS



Vagina artificial, cubre y porta objetos, diluyentes seminales, caja de poliuretano para congelación de semen, vasos de precipitación, microscópio y plancha térmica.



Universidad de Cuenca
ANEXO N° 8

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Semental Raza Limousin.





Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

ANEXO N° 9.

Preparación de diluyentes en laboratorio





Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias
ANEXO N° 11.

Refrigeración y congelación de semen.

