

Recibido: 20 de Marzo 2021 / Aceptado: 18 de mayo 2021 / Publicado: 01 de Julio 2021

Zootecnia

Artículo de Investigación Original

Efecto de la adición de metil - β -ciclodextrina en medios de congelación espermática para bovinos de leche

Effect of the addition of methyl- β -cyclodextrin in sperm freezing media for dairy cattle

Silvia Patarón Andino¹[0000-0001-7434-4162], Nelson Duchi Duchi¹, Pablo Andino Nájera¹[0000-0002-0515-5330], Edgar Hernández Cevallos¹

¹Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador

¹pataronsilvia@yahoo.com, nelduchi@yahoo.com, pablор.andino@esPOCH.edu.ec

Resumen. Se investigó el efecto de la adición de metil - β -ciclodextrina cargada de colesterol en medios de congelación con el objetivo de evaluar la calidad espermática post descongelación. Previo a la evaluación se realizó la pre dilución 1:1 dividiéndola en 3 alícuotas, para la inclusión de CLC (T0:0 mg, T1:1,5 mg, T2:3,0 mg) las cuales fueron incubadas a 37°C por 15 minutos, pasado este tiempo se realizó la dilución final empajillándolas inmediatamente en pajuelas de 0,5 ml, llevándolas al congelador automático, descendiendo la temperatura progresivamente hasta los -196°C y almacenándolas en el tanque de nitrógeno líquido, las pajuelas fueron descongeladas cada 7 días para su respectiva valoración. Para el análisis estadístico se utilizó un Diseño Completamente al Azar, obteniendo diferencias significativas $P(<0,01)$ para la viabilidad, motilidad, vitalidad e integridad de la membrana con medias de 56,00%; 63,50%; 75,36%; 60,08% respectivamente pertenecientes al T1, en cuanto, a las morfoanomalias no se encontraron diferencias estadísticas sin embargo el T2 presentó mayor porcentaje con una media de 5,40%; siendo el mejor nivel de utilización el T1, recomendando la adición de 1,5 mg CLC en medios de crioconservación ya que de acuerdo a los resultados obtenidos se espera obtener mejores parámetros reproductivos.

Palabras Clave: Membrana plasmática, ciclodextrina, colesterol, parámetros reproductivos.

Abstract. The effect of the addition of cholesterol-loaded methyl - β -cyclodextrin in freezing media was investigated in order to evaluate post-thaw sperm quality. Prior to the evaluation, the pre-dilution was carried out 1: 1 dividing it into 3 aliquots, for the inclusion of CLC (T0: 0 mg, T1: 1.5 mg, T2: 3.0 mg) which were incubated at 37°C for 15 minutes, after this time the final dilution was made by immediately soaking them into 0.5 ml straws, taking them to the automatic freezer, gradually lowering the temperature to -196°C and storing them in the liquid nitrogen tank, the straws were defrosted every 7 days to their respective valuation. For the statistical analysis, a Completely Randomized Design was used, obtaining significant differences $P (<0.01)$ for viability, motility, vitality and integrity of the membrane with means of 56.00%; 63.50%; 75.36%; 60.08% respectively belonging to T1, in terms of morphoanomalies, no statistical differences were found, however T2 presented a higher percentage with a mean of 5.40%; the best level of use being T1, recommending the addition of 1.5 mg CLC in cryopreservation media since, according to the results obtained, better reproductive parameters are expected to be obtained.

Keywords: Plasma membrane, cyclodextrin, cholesterol, reproductive parameters.



Los contenidos de este artículo están bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 4.0
Los autores conservan los derechos morales y patrimoniales de sus obras.

INTRODUCCIÓN

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

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

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

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

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del área de estudio

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Pecuarias de la ESPOCH, utilizando un solo reproductor Jersey de la Ganadería “San Diego” ubicada en el Cantón Riobamba, Provincia de Chimborazo.

Unidades Experimentales

El número de unidades experimentales fue de 150 pajillas divididas en 3 tratamientos y 5 repeticiones con un tamaño de unidad experimental de 10 pajillas.

Tratamiento y diseño experimental

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

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

Dónde:

Y_{ij} = Valor de la variable dependiente

μ = Media general

τ_i = Efecto del nivel de inclusión de ciclodextrina cargada con colesterol (0; 1,5 y 3,0 mg CLC)

ε_{ij} = Efecto del error Experimental

Análisis estadístico y pruebas de significancia

Los resultados numéricos de laboratorio determinados en la presente investigación, fueron procesados usando el programa estadístico Spss (versión 2010), Excel 2008 (Microsoft Office®) e Infostat (versión 2018), realizando los siguientes análisis estadísticos: Estadística descriptiva, Análisis de varianza, análisis de correlación y regresión al igual que la separación de medias usando la prueba de Waller Duncan con nivel de significancia de $P < 0,05$ y $P < 0,01$.

Procedimiento experimental

Colección de semen. Se usó un reproductor Jersey de 3 años, los siguientes criterios de inclusión para el procesamiento de cada eyaculado fueron: coloración y consistencia cremosa

libre de partículas extrañas. Las muestras de semen fueron colectadas utilizando el método de vagina artificial con la ayuda de una hembra en estro.

Preparación de ciclodextrina cargada con colesterol. La preparación de CLC fue realizada según lo descrito por (Purdy & Graham, 2004), en donde, se disolvió 200 mg de colesterol en 1 ml de cloroformo. En un tubo de ensayo se diluyó 1 g de β -ciclodextrina en 2 ml de metanol. Se adicionó una alícuota de 450 μ l de la solución de colesterol a la solución de ciclodextrina y se mezcló hasta que la solución sea homogénea. La solución fue vertida en una caja Petri de vidrio y secada a 37°C por dos días, pasado este tiempo los cristales fueron removidos con vapores de nitrógeno y almacenados en un tubo de vidrio tapado a 22°C hasta su uso. Una vez cargada la ciclodextrina con colesterol se preparó la solución de trabajo para lo cual se tomó 50 mg de CLC a 1 ml de medio TALP (Tyrode's-Albumina-Lactato Piruvato).

Tratamientos. Una vez evaluada la concentración del eyaculado se realizó una pre dilución en relación 1:1 (semen: diluyente) misma que fue dividida en tres alícuotas numeradas al azar según el tratamiento a realizar. T0 sin la adición de CLC/120 millones spz, el T1 tuvo la adición de 1,5 mg de CLC/120 millones de spz/ml, y al T2 se adicionó 3,0 mg de CLC por cada 120 millones de spz/ml, cada alícuota fue incubada por 15 minutos en baño maría a 37°C (Mesa & Henao, 2012). Pasado los 15 minutos se agregó el total del diluyente AndroMed, estabilizando las muestras durante 10 minutos en temperatura ambiente, procediendo a empajillar. (Viñán, 2017).

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

Congelación, descongelación y evaluación. Una vez selladas las pajuelas fueron colocadas en la rampa de refrigeración y estabilización del congelador automático, con una temperatura inicial de 17 °C estabilizando la temperatura de las pajillas antes del proceso de congelación, temperatura que desciende hasta llegar a la temperatura de refrigeración 5°C manteniéndola por un lapso de 3 horas y 30 minutos, pasado este tiempo conocido como periodo de estabilización las pajuelas fueron colocadas en el rack de congelación para su posterior congelación. Para descongelar las pajillas se utilizó un termo con agua templada de (35-36°C)

manteniendo la pajuela sumergida durante 30-40 segundos para su posterior evaluación, procedimiento que se llevo a cabo cada semana durante el periodo de la investigación.

RESULTADOS

En la Tabla 1 se muestran la valoración de la calidad seminal previa congelación mediante estadística descriptiva.

Tabla 1: Valoración de la calidad seminal previa congelación

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

EE: Error estándar

Prob: Probabilidad.

Elaborado por: Patarón, S (2021).

3.1. Volumen del eyaculado (ml)

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

Para (Rutter & Russo, 2006), el volumen tiene un rango de entre 2 y 12 ml y que, en toros mayores de 2 años debería ser superior a 4 ml; otros factores que influyen en el volumen es la frecuencia de la eyaculación, estado nutricional, ubicaciones geográficas, estaciones del año, método de recolección del semen y manipulación de toros durante la extracción. (Lemma & Shemsu, 2015).

3.2. Morfología normal (%)

El porcentaje de espermatozoides normales durante las cinco extracciones fue del 87% $\pm$ 0,07 dato que es superior al reportado por (López & Rivera, 2015), con el 80,2% mismos que a su vez concuerdan con (Rutter & Russo, 2006), quien menciona, que un semen debe contener mínimo un 70 % de espermatozoides con morfología normal; la disminución de la fertilidad de un toro no siempre está dado por el porcentaje de morfoanomalías presentes en el semen, ya

que existen alteraciones que se encuentran en el núcleo y el acrosoma de células aparentemente normales causando anomalías citogenéticas que disminuyen la fertilidad del toro, teniendo que recurrir a técnicas especiales para su evaluación.

3.3. Motilidad individual (%)

Los resultados obtenidos durante la evaluación en semen fresco, mostraron ser superiores con una media de $87 \% \pm 0,02$ a los obtenidos por (Lemma & Shemsu, 2015) quienes evaluaron la motilidad individual en reproductores de raza Jersey obteniendo el 79,41%, mientras que, (López & Rivera, 2015) reportan el 95% de motilidad individual en semen fresco de reproductores Jersey dato que es superior al encontrado en la presente investigación. La motilidad está asociada al aumento de carnitina intracelular en los espermatozoides así como al aumento intracelular de AMP cíclico y de proteínas-quinasas dependientes de AMP cíclico y a la disminución de Ca^{++} y de calmodulina. (Suárez, et al 1984, citados por Saavedra, 2018).

3.4. Concentración (spz/ml)

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

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

3.5. Motilidad masal (pts)

La motilidad masal de las cinco extracciones expresadas mediante una escala de calificación subjetiva, registro una media de 4 pts, el cual indica que la actividad cinética es muy buena, con remolinos intensos y ondas espermáticas apreciables, valor que supera al evaluado por (Lemma & Shemsu, 2015) con un promedio de 3,51 pts.

La motilidad masal depende de tres factores tales como, la concentración, porcentaje de células con movimiento progresivo y velocidad de movimiento de los espermatozoides; los

movimientos en ondas vigorosas y en remolinos rápidos se ven afectadas o eliminadas cuando estos tres factores o uno de estos se encuentra disminuido (Veloz, 2017).

3.6. Ph

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

En la Tabla 2 se muestran la valoración seminal post descongelación mediante Análisis de varianza.

3.7. Viabilidad, %

La viabilidad espermática post descongelación presentó diferencias estadísticas ($P < 0,01$), así, el mayor porcentaje de viabilidad se registró en pajuelas cargadas con el T1 (1,5 mg CLC) con el 56%; seguido por el tratamiento testigo con una media de 42,60% siendo el T2 (3,0 mg CLC) quien presentó el menor porcentaje de viabilidad espermática con un promedio de 38% con una dispersión para cada media de 0,6037% como se muestra en la tabla 2.

Respecto a estos resultados (Purdy & Graham, 2003), obtuvieron el 55% de espermatozoides viables con el 1,5 mg CLC en muestras incubadas a 37°C, mientras que para aquellas muestras incubadas a 22°C registraron una viabilidad del 43%; en tanto que, para muestras sin la adición de ciclodextrina a 37°C y 22°C alcanzaron el 18% y el 38% respectivamente, mostrando así un efecto contrario en cada uno de los tratamientos debido a que la fluidez de las moléculas, proteínas e iones a través de la membrana plasmática es menor a temperaturas inferiores a 37°C. (Correa, Heersche, & Zavos, 1997).

Tabla 2: Evaluación post descongelación previa adición de ciclodextrina más colesterol en medios de congelación

VARIABLES	NIVELES DE CLC (mg)				Prob.
	0	1,5	3,0	EE	
Viabilidad (%)	42,60 b	56,00 a	38,00 c	0,6037	0,001
Motilidad (%)	57,10 b	63,50 a	54,90 c	0,6893	0,001
Vitalidad (%)	54,13 b	75,36 a	52,00 b	0,9239	0,001

Morfoanomalías (%)	5,21 a	5,01 a	5,40 a	0,2418	0,537
Integridad de la membrana (%)	46,77 c	60,08 a	55,06 b	1,2943	0,001
Letras iguales no difieren estadísticamente					
EE: Error estándar					
Prob: Probabilidad					

Elaborado por: Patarón, S (2021)

3.8. Motilidad individual, %

Una vez realizado el proceso de descongelación los resultados mostraron diferencias altamente significativas ($P < 0,01$), cuyos porcentajes de motilidad individual fueron superiores cuando se utilizó 1,5 mg CLC (T1) con una media de 63,50 %, en tanto que, para el tratamiento testigo y para el T2 (3,0 mg CLC) se registraron promedios de 57,10 y 54,90% respectivamente siendo la dispersión de cada media de $\pm 0,6893\%$ mostrando variabilidad debido a la sobresaturación de colesterol en la membrana, afectando la fluidez de la misma, existiendo así, una relación inversa entre el aumento en la cantidad de CLC y la motilidad individual.

Los resultados reportados por (Purdy & Graham, 2003), establecieron porcentajes del 60, 57 y 54% correspondientes al 1,5; 3,0 y 4,5mg CLC respectivamente cuando utilizaron un diluyente a base de huevo, mientras que, al diluir el semen en citrato de sodio obtuvieron 53 y 50% perteneciente al 1,5 y 3,0 mg CLC datos que son inferiores a los hallados en esta investigación.

Mediante el análisis de regresión se pudo determinar que la motilidad se encuentra relaciona significativamente ($P < 0,01$) con la integridad de la membrana a una regresión positiva de primer orden cuyo coeficiente de correlación es de $r = 0,4697$ y con un coeficiente de determinación de $R^2 = 0,2206$ señalando que la motilidad depende en un 22,06% de la integridad de la membrana, ver gráfico 1

El modelo de regresión obtenido es el siguiente:

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

Dónde:

MIPD: Motilidad individual post descongelación, (%).

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

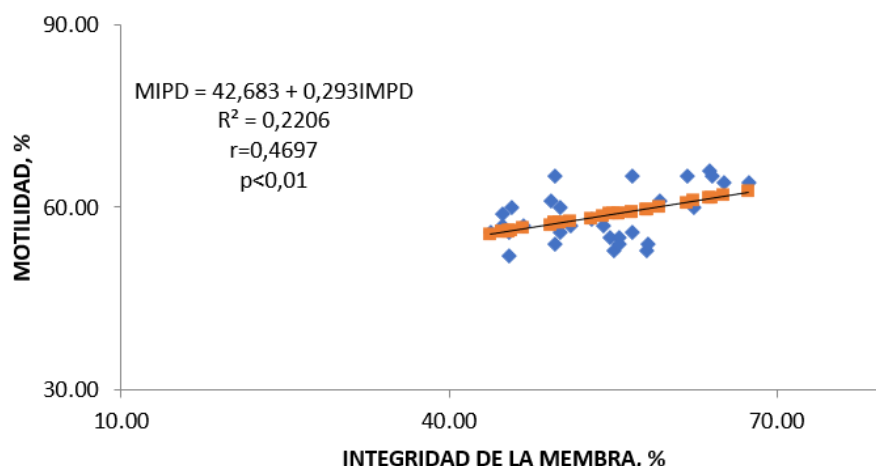


Gráfico 1. Tendencia de la regresión para la motilidad espermática asociada a la integridad de la membrana post descongelación

Elaborado por: Patarón, S (2021)

3.9. Vitalidad espermática, %

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

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

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

Dónde:

VEPD: Vitalidad espermática post descongelación, (%).

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

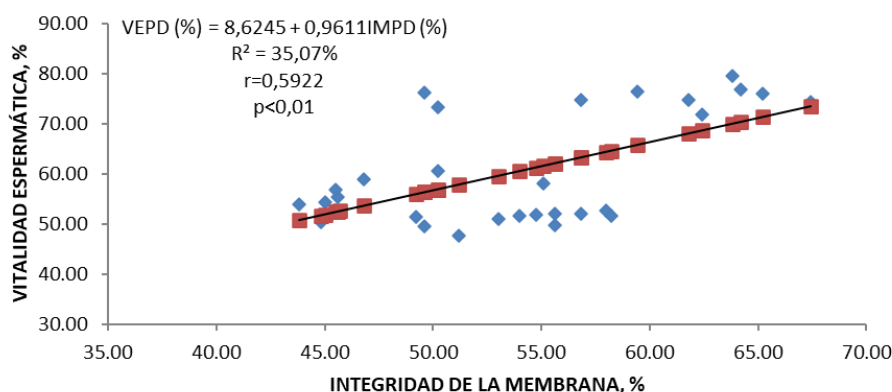


Gráfico 2. Tendencia de la regresión para la vitalidad espermática asociada a la integridad de la membrana post descongelación

Elaborado por: Patarón, S (2021)

3.10. Morfoanomalías, %

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

Resultados que son superiores a los presentados por (Viñan, H 2017) quien registra el 4,54 y 4,75% de morfoanomalías al utilizar 1,5 y 2,0 mg CLC respectivamente; a su vez, estos resultados son inferiores a los reportados por (Mejía, J 2017) quien registra un 15% de morfoanomalías con el método de colecta de la vagina artificial.

El efecto de la adición de metil - β - ciclodextrina cargada de colesterol en medios de crioconservación para bovinos sobre el porcentaje de morfoanomalías cuyo resultado posiblemente se encuentre asociado al correcto funcionamiento testicular. (De Alba, 2014).

3.11. Integridad de la membrana, %

Las pajuelas que no fueron cargadas con ciclodextrina más colesterol presentan el promedio más bajo en cuanto a la integridad de la membrana con 46,77%, mismas que difieren estadísticamente ($P < 0,01$) del resto de tratamientos, siendo el T1(1,5 mg CLC) quien registro el mejor porcentaje con una media de 60,08% seguido por el T2(3,0 mg CLC) con $55,06 \pm 1,2943$ % respectivamente.

Resultados que, al ser comparados con (Quispe, S 2019) en su estudio al utilizar distintos dilutores como el Tris-YH, Triladyl-YH y AndroMed reporto 51,5; 53,8 y 44,4% respectivamente; para (Bedoya, et al, 2003) encontraron espermatozoides que reaccionaron al test

Efecto de la adición de metil - β -ciclodextrina en medios de congelación espermática para bovinos de leche

hipoosmótico en un 53,40% en su estudio sobre la integridad funcional de la membrana plasmática de espermatozoides bovinos para lo cual utilizaron Tris-YH como diluyente, resultados que son inferiores a los encontrados en la presente investigación.

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

El modelo de regresión obtenido es el siguiente:

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

Donde:

IMPD: Integridad de la membrana, %

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

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

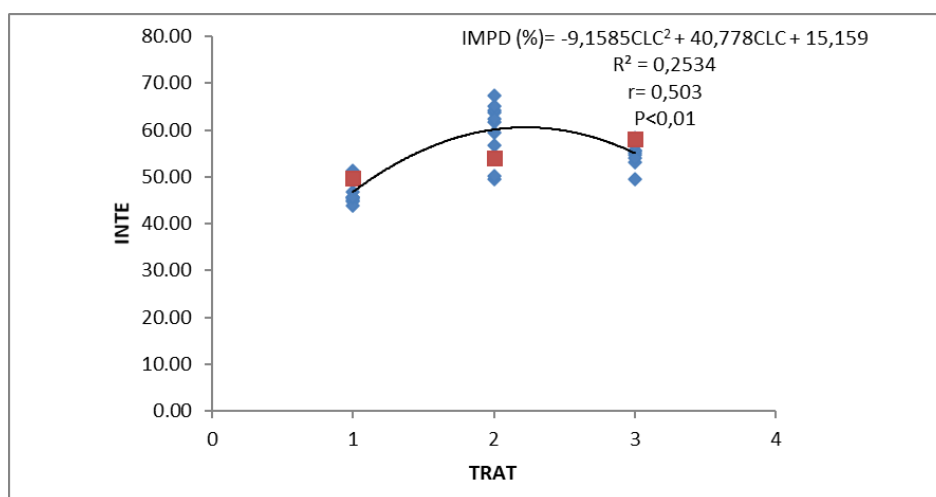


Gráfico 3. Integridad de la membrana post descongelación previa adición de ciclodextrina más colesterol en medios de congelación.

CONCLUSIONES

Mediante la evaluación de parámetros reproductivos se determinó que el semen fresco presenta una alta capacidad inicial de refrigeración y crioconservación debido a que los valores

son aceptables tanto para el volumen, morfología normal, concentración espermática, motilidad individual y masal.

En la evaluación seminal post descongelación se encontró que el mejor nivel de utilización de ciclodextrina cargada con colesterol en medios de congelación fue para aquellas pajuelas del T1 a las cuales se les añadió el 1,5mg CLC ya que presentaron los mejores porcentajes de viabilidad, motilidad individual progresiva, vitalidad e integridad de la membrana.

En función a los resultados alcanzados en la presente investigación se recomienda: Establecer protocolos de congelación considerando la adición del 1,5 mg de ciclodextrina cargada con colesterol en medios de crioconservación ya que de acuerdo a los resultados obtenidos se espera obtener mejores parámetros reproductivos.

Dado que el colesterol puede sustituir los fosfolípidos perdidos en el proceso de congelación es preciso continuar con estudios sobre la actividad bioquímica de la membrana.

REFERENCIAS

- Aguilar, G. (2016). *Determinación de la fertilidad potencial de toros reproductores bos taurus en la Hacienda El Rosario mediante la evaluación de parámetros reproductivos* (Universidad de las Américas). Retrieved from <http://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/5386>
- Bedoya, N., Araque, N., Rivera, M., Londoño, G., & Trujillo, L. (2003). Evaluación de la integridad de la membrana plasmática de espermatozoides mediante test Hipoosmótico (HOST). *Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 56, 1983–1997. Retrieved from <https://docplayer.es/85710666-Evaluacion-de-la-integridad-funcional-de-la-membrana-plasmatica-de-espermatozoides-bovinos-mediante-el-test-hipoosmotico-host-resumen.html>
- De Alba, C. (2014). Jornada ANEMBE Problemas reproductivos de las vacas nodrizas. *Valoración de La Calidad Del Semen Bovino*, 40–44. Retrieved from <http://anembeformacion.es/libro ponencias jornadas vacas nodrizas 2014.pdf>
- Díaz, N., & López, P. (2018). *Protocolos de criopreservación de semen bovino* (Universidad Tecnológica de Pereira). Retrieved from <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/handle/11059/9496/T636.08245D542.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Lemma, A., & Shemsu, T. (2015). Effect of Age and Breed on Semen Quality and Breeding Soundness Evaluation of Pre-Service Young Bulls. *Reproduction and Infertility*, 6(2), 35–40. <https://doi.org/10.5829/idosi.jri.2015.6.2.94131>
- López, N., & Rivera, D. (2015). *Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la*

- membrana plasmática en espermatozoides de toro* (Zamorano). Retrieved from <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/4596/1/CPA-2015-049.pdf>
- Mackinnon, M. (2016). *Estudio de las variaciones estacionales de la calidad espermática en toros de un centro comercial de procesamiento de semen* (Universidad de la República). Retrieved from <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/19698>
- Mejía, J. (2017). *Evaluación pre y post congelación del semen obtenido con vagina artificial y electroeyaculador en el ganado criollo* (Universidad de Cuenca). Retrieved from <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/26940/1/Tesis.pdf>
- Mesa, A. ., & Henao, G. (2012). Efecto del colesterol y la dimetilformamida sobre parámetros posdescongelación en espermatozoides de caballos criollos colombianos. *Revista MVZ Cordoba*, 17(1), 2908–2915. Retrieved from <https://www.uco.es/ucopress/az/index.php/az/%0AEfecto>
- Mocé, E., & Graham, J. K. (2006). Cholesterol-loaded cyclodextrins added to fresh bull ejaculates improve sperm cryosurvival. *American Society of Animal Science*, 84(4), 826–833. Retrieved from https://scholar.google.com/ec/scholar?hl=es&as_sdt=0%2C5&as_vis=1&q=Cholesterol-loaded+cyclodextrins+added+to+fresh+bull+ejaculates+improve+sperm+cryosurvival+E.+Moce'+and+J.+K.+Graham2+Department&btnG=
- Mocé, Eva, Purdy, P. H., & Graham, J. K. (2010). Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival. *Animal Reproduction Science*, 118(2–4), 236–247. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.06.013>
- Moncayo, S. (2016). *Evaluación de la calidad seminal de reproductores bovinos antes y después del proceso de criopreservación* (Politécnica Salesiana). Retrieved from <https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/11654>
- Purdy, P., & Graham, J. (2004). Effect of Adding Cholesterol to Bull Sperm Membranes on Sperm Capacitation , the Acrosome Reaction , and Fertility 1. *Biology of Reproduction*, 71(April), 522–527. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.025577>
- Purdy, P. H., Fox, M. H., & Graham, J. K. (2005). The fluidity of Chinese hamster ovary cell and bull sperm membranes after cholesterol addition. *Cryobiology*, 51(1), 102–112. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2005.05.004>
- Purdy, P. H., & Graham, J. K. (2003). Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm q. *Cryobiology*, 48, 36–45. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2003.12.001>
- Quispe, S. (2019). *Evaluación de tres dilutores sobre características espermáticas antes y después de la congeación de semen bovino Holstein* (Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac). Retrieved from <http://repositorio.unamba.edu.pe/handle/UNAMBA/836>
- Rutter, B., & Russo, A. (2006). *Bases para la evaluación de la aptitud reproductiva* (Segunda; E. Capdevielle, Ed.). Retrieved from <https://docplayer.es/55664957-Bases-para-la->

- evaluacion-de-la-aptitud-reproductiva-del-toro-bruno-rutter-angel-russo-buenos-aires-2006-prologo-a-la-segunda-edicion.html
- Saavedra, D. (2018). *Conservación seminal en toros Cebú. Efecto dela retirada del plasma y su posterior incorporación sobre la calidad espermática en los protocolos de criopreservación* (Universidad de Zaragoza). Retrieved from <https://zaguan.unizar.es/record/69214/files/TESIS-2018-020.pdf>
- Vallecino, A. (2011). *Departamento de genética* (Unversidad de Córdoba). Retrieved from <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=56759>
- Veloz, D. (2017). *Facultad de Ciencias Agropecuarias MAESTRIA EN REPRODUCCIÓN ANIMAL TITULO: "Evaluación de la calidad espermática de reproductores bovinos mediante el uso de sistemas de evaluación seminal convencional y sistema CASA (análisis seminal asistido por computa* (Universidad de Cuenca). Retrieved from <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/28466>
- Viñán, H. (2017). *Adicion De Metil Ciclodextrina Cargada De Colesterol Sobre La Criopreservacion De Semen De Toros Holstein Friesian* (Universidad Nacional Agraria La Molina). Retrieved from https://scholar.google.es/scholar?hl=es&as_sdt=0%2C5&q=ADICIÓN+DE+METIL-+β-CICLODEXTRINA+CARGADA+DE+COLESTEROL+SOBRE+LA+CRIOPRESERVACIÓN+DE+SEMEN+DE+TOROS+HOLSTEIN+FRIESIAN%22+TESIS&btnG=