

**Universidad Católica de Santa María  
Facultad de Ciencias e Ingenierías Biológicas y Químicas  
Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia**



**“Evaluación de Crioprotectores no Penetrantes: Proteínas de Baja Densidad (LDL) y Yema de Huevo de Gallina, en Calidad de Semen Refrigerado y Congelado de Caballos Peruano de Paso”**

**“Evaluation of Non-Penetrating Cryoprotectants: low Density Proteins and Hen Egg Yolk, in quality of Refrigerated and Frozen Semen Of Caballos Peruano De Paso”**

**Tesis presentada por la Bachiller:**

**Barriga Marcapura, Ximena Jennifer**

**Para optar el Título Profesional de:  
Médico Veterinario y Zootecnista**

**Asesor:**

**Dr. Cs. MVZ. Reátegui Ordoñez Juan Eduardo**

**Arequipa – Perú**

**2018**



*Universidad Católica de Santa María*

(51 54) 382038 Fax:(51 54) 251213 ✉ [ucsm@ucsm.edu.pe](mailto:ucsm@ucsm.edu.pe) <http://www.ucsm.edu.pe> Apartado: 1350

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERIAS BIOLÓGICAS Y QUÍMICAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DICTAMEN PASE A SUSTENTACIÓN

El jurado dictaminador presidido por el DR. SANTIAGO CUADROS MEDINA e integrado por el vocal MGTER. FERNANDO FERNANDEZ FERNANDEZ y secretario el MGTER. CARLO SANZ LUDEÑA;

DICTAMINA:

Que el Borrador de tesis titulado:

“EVALUACION DE CRIOPROTECTORES NO PENETRANTES: PROTEINAS DE BAJA DENSIDAD (LDL) Y YEMA DE HUEVO DE GALLINA EN CALIDAD DE SEMEN REFRIGERADO Y CONGELADO DE CABALLOS PERUNO DE PASO”.

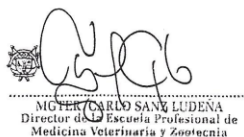
presentado por (la) Sr.(s)(ita):

**BARRIGA MARCAPURA, XIMENA JENNIFER**

Puede ser sustentado públicamente después de tener en cuenta las observaciones del dictamen adjunto. Caso contrario, el (la) Bachiller asume la responsabilidad que pudiera derivarse.

Asesor: DR. JUAN REATEGUI ORDOÑEZ

Arequipa, 03 de enero del 2018



MIGUEL ÁNGEL SANZ LUDEÑA  
Director de la Escuela Profesional de  
Medicina Veterinaria y Zootecnia

CSL/DEPMVZ  
JL



Universidad Católica de Santa María

(51 54) 382038 Fax:(51 54) 251213 ✉ ucsm@ucsm.edu.pe 🌐 http://www.ucsm.edu.pe Apartado: 1350

AREQUIPA - PERU

“IN SCIENTIA ET FIDE EST FORTITUDO NOSTRA”  
(En la Ciencia y en la Fe está nuestra fuerza)

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DICTAMEN BORRADOR DE TESIS

Señor Magíster

CARLO SANZ LUDEÑA

Director de la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Presente-

Mediante el presente, comunicamos a usted que se ha procedido a revisar el Borrador de Tesis titulado:

“EVALUACION DE CRIOPROTECTORES NO PENETRANTES: PROTEINAS DE BAJA DENSIDAD (LDL) Y YEMA DE HUEVO DE GALLINA EN CALIDAD DE SEMEN REFRIGERADO Y CONGELADO DE CABALLOS PERUNO DE PASO”.

presentado por:

**BARRIGA MARCAPURA, XIMENA JENNIFER**

Asesorado (a) por el DR. JUAN REATEGUI ORDOÑEZ

El jurado dictaminador presidido por el DR. SANTIAGO CUADROS MEDINA, e integrado por la vocal MGTER. FERNANDO FERNANDEZ FERNANDEZ y secretario el MGTER. CARLO SANZ LUDEÑA;

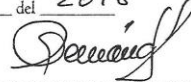
DICTAMINA:

*apta para sustentación*

OBSERVACIONES

Arequipa, 03 de Enero del 2018

  
DR. SANTIAGO CUADROS MEDINA  
Presidente

  
MGTER. FERNANDO FERNANDEZ FERNANDEZ  
Vocal

  
MGTER. CARLO SANZ LUDEÑA  
Secretario



*Universidad Católica de Santa María*

(51 54) 382038 Fax:(51 54) 251213 ✉ ucsm@ucsm.edu.pe <http://www.ucsm.edu.pe> Apartado: 1350

AREQUIPA - PERÚ

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERIAS BIOLÓGICAS Y QUÍMICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

AMPLIACION DE PLAZO PARA DESARROLLO DE  
BORRADOR DE TESIS

Bachiller: BARRIGA MARCAPURA, XIMENA JENNIFER;

Visto el Expediente N° 20170000029432, presentado por el señor Bachiller de Medicina Veterinaria y Zootecnia Bachiller: BARRIGA MARCAPURA, XIMENA JENNIFER, quien está solicitando la ampliación del plazo para el desarrollo de su Borrador de Tesis, ya que por motivos personales no ha podido cumplir con su trabajo;

De acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos, Título III del Título Profesional de Primera Especialidad, Capítulo III, de la Elaboración, Presentación y Aprobación de un Trabajo de Tesis, art. 20; y por razones de equidad, la Dirección de la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria


RESUELVE:

Autorizar la ampliación y validez de la inscripción del Tema de Tesis,

“EVALUACION DE CRIOPROTECTORES NO PENETRANTES: PROTEINAS DE BAJA DENSIDAD (LDL) Y YEMA DE HUEVO DE GALLINA EN CALIDAD DE SEMEN REFRIGERADO Y CONGELADO DE CABALLOS PERUNO DE PASO”.

por un período de (6) meses, a partir del 30 de junio al 30 de diciembre del 2017 debiendo el (la) señor (ita) culminar el desarrollo del mismo, teniendo en cuenta las observaciones del jurado dictaminador del Borrador de Tesis.

Arequipa, 03 de julio del 2017



MAG. CARLO SANZ LUDENA  
Director de la Escuela Profesional de  
Medicina Veterinaria y Zootecnia

CSL/DEPMVZ  
JL



Universidad Católica de Santa María

(51 54) 382038 Fax: (51 54) 251213 ✉ ucsm@ucsm.edu.pe 🌐 http://www.ucsm.edu.pe Apartado: 1350

AREQUIPA - PERÚ

“IN SCIENTIA ET FIDE EST FORTITUDO NOSTRA”  
(En la Ciencia y en la Fe está nuestra fuerza)

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DICTAMEN DE PLAN DE TESIS

Señor Doctor:

OVIDIO VELASCO VELASQUEZ

Director de la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Presente.-

Mediante el presente, comunicamos a usted que se ha procedido a revisar el plan de Tesis Titulado:

“EVALUACION DE CRIOPROTECTORES NO PENETRANTES: PROTEINAS DE BAJA DENSIDAD (LDL) Y YEMA DE HUEVO DE GALLINA EN CALIDAD DE SEMEN REFRIGERADO Y CONGELADO DE CABALLOS PERUNO DE PASO”.

presentado por el (la) Sr.(s)(ita):

BARRIGA MARCAPURA, XIMENA JENNIFER

Asesor: DR. JUAN REATEGUI ORDOÑEZ

El jurado dictaminador presidido por el DR. SANTIAGO CUADROS MEDINA e integrado por el MGTER. FERNANDO FERNANDEZ FERNANDEZ y el MGTER. CARLO SANZ LUDEÑA

DICTAMINA:

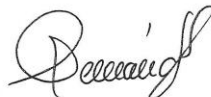
*apto para ejecución*

OBSERVACIONES

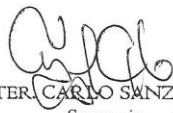
Arequipa, 21 de diciembre de 2016



DR. SANTIAGO CUADROS MEDINA  
Presidente



MGTER. FERNANDO FERNANDEZ F.  
Vocal



MGTER. CARLO SANZ LUDEÑA  
Secretario



*Universidad Católica de Santa María*

(51 54) 382038 Fax:(51 54) 251213 ✉ ucsm@ucsm.edu.pe 🌐 http://www.ucsm.edu.pe Apartado: 1350

AREQUIPA - PERÚ

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍAS BIOLÓGICAS Y QUÍMICAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

### INSCRIPCIÓN PLAN DE TESIS 2016

Bachiller: BARRIGA MARCAPURA, XIMENA JENNIFER

El jurado dictaminador presidido por el DR. SANTIAGO CUADROS MEDINA e integrado por el DR. FERNANDO FERNANDEZ FERNANDEZ y el MGTER. CARLO SANZ LUDENA; de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos, Título III del Título Profesional de Primera Especialidad, Capítulo III, de la Elaboración, Presentación y Aprobación de un Trabajo de Tesis, Art. 20; el Director de la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia;

#### DICTAMINA:

Autorizar la inscripción del Plan de Tesis titulado

“EVALUACION DE CRIOPROTECTORES NO PENETRANTES: PROTEINAS DE BAJA DENSIDAD (LDL) Y YEMA DE HUEVO DE GALLINA EN CALIDAD DE SEMEN REFRIGERADO Y CONGELADO DE CABALLOS PERUNO DE PASO”.


presentado por el (la) Sr.(ita) Alumno(a) de la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia;

BARRIGA MARCAPURA, XIMENA JENNIFER

por un período de seis (06) meses a partir de la fecha; debiendo el (la) recurrente proceder al desarrollo del mismo, teniendo en cuenta las observaciones del jurado dictaminador del Plan de Tesis.

ASESOR: DR. JUAN REATEGUI ORDOÑEZ

Arequipa, 30 de diciembre del 2016

  
DR. OVIDIO VELASCO VELASQUEZ  
Director de la Escuela Profesional de  
Medicina Veterinaria y Zootecnia

OVV/DEPMVZ

JL

## DEDICATORIA

Mi tesis va dedicada a Dios, quien supo guiarme por el camino enseñándome a encarar las adversidades sin desfacellular en el intento.

A mis padres Willy Nestor Barriga Cervantes, Dina Marcapura y hermanos Christian Barriga Marcapura y Katherine Barriga Marcapura, por apoyarme en mis estudios, que con sus palabras de aliento no me dejaban decaer, para que siguiera adelante y cumpla con mis ideales.

A mis dos madres María Elena Marcapura Zevallos y Elva Gabriela Marcapura Zevallos, quienes me apoyaron en toda mi carrera universitaria, brindándome su apoyo en todo momento.

A Alejandro C. por su apoyo incondicional, que con su compañía me alentó a seguir adelante en todo momento brindándome su cariño y comprensión.

A mis amigos Arturo y Omar, por su amistad desinteresada durante todos los años de carrera.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Católica de Santa María, Vicerrectorado de Investigación, Laboratorio de Biotecnología Animal proyecto “Determinación de la calidad del semen criopreservado comercial utilizado en hatos lecheros, implicancia en la fertilidad e impacto en variables productivas”. Resolución Nro. 24157-R-2017. Por el financiamiento de la presente investigación mediante fondos propios concursables

A la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia

A mis maestros, que con sus enseñanzas de temas que corresponden a mi profesión han sabido encaminarme para lograr mis metas.

A mi asesor Dr. Cs. MVZ. Juan Reátegui Ordóñez por su comprensión en su labor como asesor de la presente investigación.

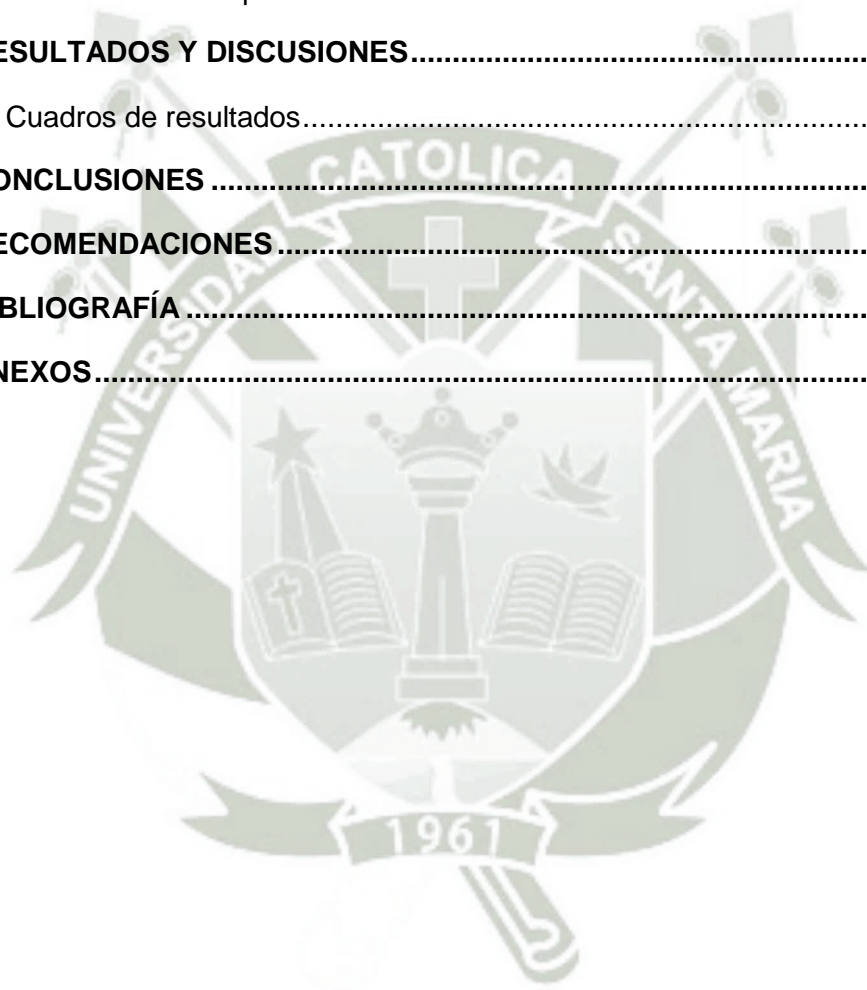
A mi jurado de tesis Dr. Cs. MVZ Santiago Cuadros Medina, M. Sc. MV Fernando Fernández Fernández y Mg. MVZ Carlo Sanz Ludeña por el aporte, consejos y críticas constructivas para mejorar mi trabajo de investigación.

Al Dr. Ing. Víctor Pacheco Sánchez que se tomó el tiempo correspondiente para guiarme durante todo el proceso de investigación y realización de mi trabajo de investigación.

## INDICE DE CONTENIDOS

<b>DEDICATORIA .....</b>	<b>vii</b>
<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>viii</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>xv</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xvi</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN: .....</b>	<b>1</b>
1.1. Enunciado del Problema .....	1
1.2. Descripción del Problema .....	1
1.3.- Justificación del problema:.....	2
1.3.1. Aspecto General .....	2
1.3.2. Aspecto Tecnológico.....	2
1.3.3. Aspecto Social .....	2
1.3.4. Aspecto Económico .....	3
1.3.5. Importancia del trabajo.....	3
1.4.- Objetivos .....	4
1.4.1.- Objetivo general.....	4
1.4.2. Objetivos específicos .....	4
1.5.- Planteamiento de la hipótesis .....	4
<b>II. MARCO TEÓRICO O CONCEPTUAL .....</b>	<b>5</b>
2.1.- Análisis bibliográfico .....	5
2.1.1.- Material principal.....	5
2.2.- Antecedentes de investigación .....	36
2.2.1.- Revisiones de tesis universitarias .....	36
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
3.1.- Materiales .....	41
3.1.1.- Localización del trabajo .....	41
3.1.2.- Materiales biológicos .....	41

3.1.3.- Materiales de laboratorio .....	41
3.1.4.- Materiales de campo.....	43
3.1.5.- Equipos y maquinaria .....	43
3.1.6.- Material de escritorio y Redacción .....	44
3.2.- Métodos:.....	44
3.2.1.- Muestreo.....	44
3.2.2.- Métodos de evaluación .....	45
3.2.3.- Variables de respuesta .....	52
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....</b>	<b>53</b>
4.1.- Cuadros de resultados.....	53
<b>V. CONCLUSIONES .....</b>	<b>70</b>
<b>VI. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>71</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>72</b>
<b>VIII. ANEXOS.....</b>	<b>76</b>

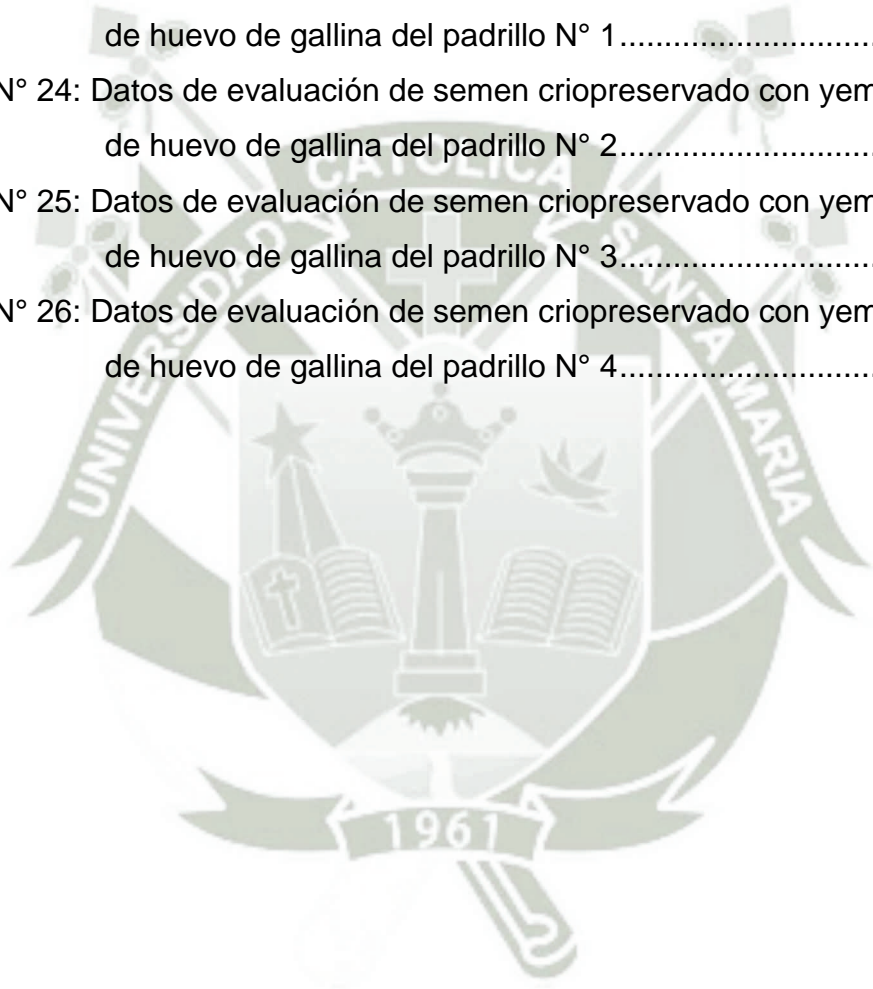


..

## INDICE DE CUADROS

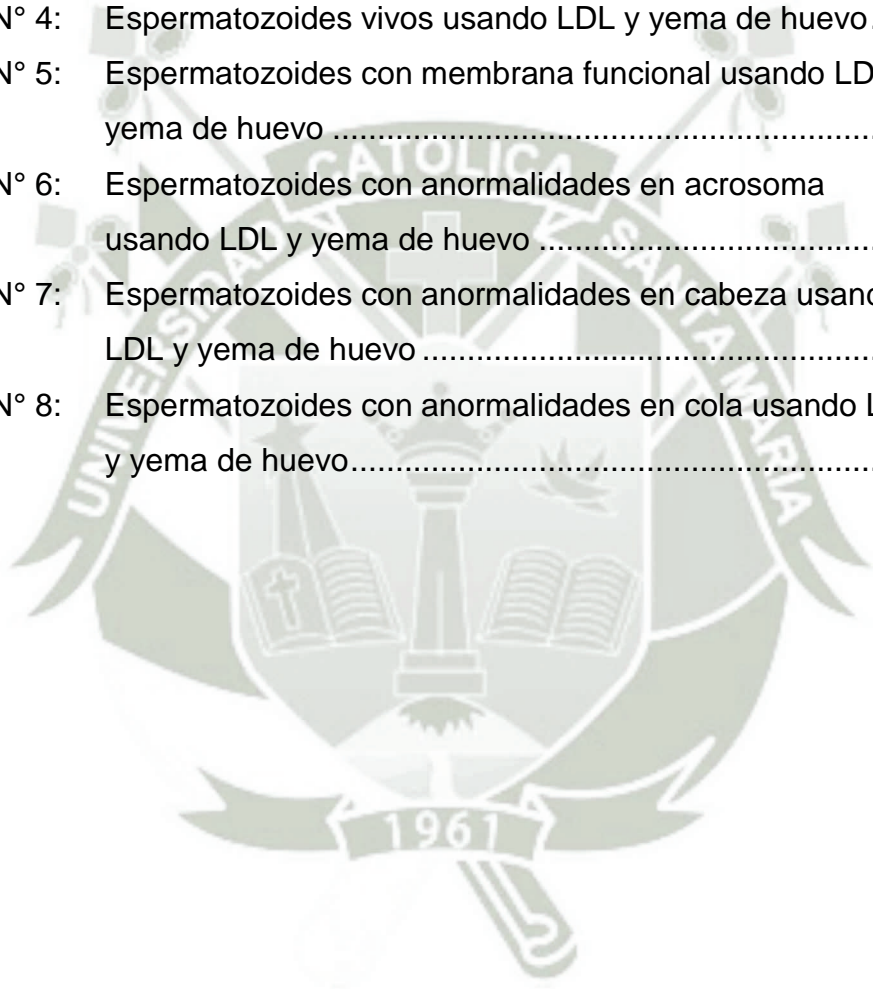
Cuadro N° 1: Características Bioquímicas de fracciones seminales del garañón. <sup>1</sup> .....	16
Cuadro N° 2: Medidas de valores seminales equinos, según varios autores. <sup>12</sup> .....	26
Cuadro N° 3: Unidades experimentales de estudio .....	45
Cuadro N° 4: Valores de motilidad del espermatozoide. ....	49
Cuadro N° 5: Operalización de Variables .....	52
Cuadro N° 6: Motilidad espermática usando LDL y yema de huevo a las 0 horas .....	53
Cuadro N° 7: Motilidad espermática usando LDL y yema de huevo a los 20 minutos .....	55
Cuadro N° 8: Motilidad espermática progresiva usando LDL y yema de huevo .....	57
Cuadro N° 9: Espermatozoides vivos usando LDL y yema de huevo ....	59
Cuadro N° 10: Espermatozoides con membrana funcional usando LDL y yema de huevo .....	61
Cuadro N° 11: Espermatozoides con anomalías en acrosoma usando LDL y yema de huevo .....	63
Cuadro N° 12: Espermatozoides con anomalías en cabeza usando LDL y yema de huevo .....	65
Cuadro N° 13: Espermatozoides con anomalías en cola usando LDL y yema de huevo.....	67
Cuadro n°. 14: Concentración espermática progresiva mediante crioprotectores no penetrantes ldl y yema de huevo.....	69
Cuadro N° 15: Datos de colección y evaluación de semen fresco de padrillo 1 .....	91
Cuadro N° 16: Datos de colección y evaluación de semen fresco de padrillo 2 .....	91
Cuadro N° 17: Datos de colección y evaluación de semen fresco de padrillo 3 .....	92
Cuadro N° 18: Datos de colección y evaluación de semen fresco de padrillo 4 .....	92

Cuadro N° 19: Datos de evaluación de semen criopreservado con (LDL) del padrillo N° 1.....	94
Cuadro N° 20: Datos de evaluación de semen criopreservado con (LDL) del padrillo N° 2.....	94
Cuadro N° 21: Datos de evaluación de semen criopreservado con (LDL) del padrillo N° 3.....	95
Cuadro N° 22: Datos de evaluación de semen criopreservado con (LDL) del padrillo N° 4.....	95
Cuadro N° 23: Datos de evaluación de semen criopreservado con yema de huevo de gallina del padrillo N° 1.....	96
Cuadro N° 24: Datos de evaluación de semen criopreservado con yema de huevo de gallina del padrillo N° 2.....	96
Cuadro N° 25: Datos de evaluación de semen criopreservado con yema de huevo de gallina del padrillo N° 3.....	97
Cuadro N° 26: Datos de evaluación de semen criopreservado con yema de huevo de gallina del padrillo N° 4.....	97



## INDICE DE GRAFICAS

Gráfico N° 1:	Motilidad espermática usando LDL y yema de huevo a las 0 horas .....	54
Gráfico N° 2:	Motilidad espermática usando LDL y yema de huevo a los 20 minutos .....	56
Gráfico N° 3:	Motilidad espermática progresiva usando LDL y yema de huevo .....	58
Gráfico N° 4:	Espermatozoides vivos usando LDL y yema de huevo...	60
Gráfico N° 5:	Espermatozoides con membrana funcional usando LDL y yema de huevo .....	62
Gráfico N° 6:	Espermatozoides con anomalías en acrosoma usando LDL y yema de huevo .....	64
Gráfico N° 7:	Espermatozoides con anomalías en cabeza usando LDL y yema de huevo .....	66
Gráfico N° 8:	Espermatozoides con anomalías en cola usando LDL y yema de huevo.....	68



## INDICE DE ANEXO

Anexo N° 1: Mapa de Ubicación.....	76
Anexo N° 2: POE'S y Otros .....	79
Anexo N° 3: Matriz y Sistematización.....	90
Anexo N° 4: Cuadro de Resultados.....	93
Anexo N° 5: Secuencia Fotográfica.....	98
Anexo N° 6: Constancia .....	106



## RESUMEN

Teniendo como objetivo la evaluación de la calidad de semen de Caballo Peruano de Paso criopreservado con LDL y yema de huevo de gallina, como crioprotectores no penetrantes específicos, se realizó la colección de semen de 4 caballos Peruanos de Paso. Las muestras colectadas mediante vagina artificial fueron evaluadas macroscópicamente para los indicadores de; volumen, color, densidad, pH. Luego adicionadas con preservante de la actividad espermática, se trasladaron al laboratorio para ser criopreservadas mediante la técnica convencional planteada por Moussa y col, 2002<sup>29</sup> divididas en dos alícuotas adicionando a una Lipoproteínas de baja densidad (LDL) y a la otra yema de huevo de gallina como crioprotectores no penetrantes. Posterior a la criopreservación se realizó las evaluaciones microscópicas de; test de HOST, motilidad, concentración, integridad de membrana y morfología. Los parámetros macroscópicos observados obtuvieron como resultado, volumen promedio 41,5 ml; color y aspecto blanco lechoso; y pH 7,46 promedio, estos valores no mostraron diferencia estadística ( $p>0,05$ ) entre garañones. Se observó mejor calidad seminal en pajillas criopreservadas con lipoproteínas de baja densidad (LDL) frente a semen criopreservado con yema de huevo de gallina, existiendo diferencia estadística ( $p<0,05$ ), para las variables: Motilidad 48,9% y 27,5%, motilidad a los 20 min. 38,2% y 19,3%; motilidad progresiva 38,3% y 21,5%; viabilidad 45,9% y 31,7% y membrana funcional 59,3% y 41,6% para LDL y yema de huevo respectivamente. No observando diferencia significativa para la variable morfología ( $p>0,05$ ). Podemos concluir que hay una mejora de la calidad del semen criopreservado con lipoproteínas de baja densidad frente a semen criopreservado con yema de huevo entera de gallina, esto por el aislamiento de la LDL de la yema entera.

Palabras clave: semen, crioprotector, Caballo Peruano de Paso.

## ABSTRACT

With the objective of evaluating, the semen quality of Caballo Peruano de Paso cryopreserved with LDL and chicken egg yolk, as specific non-penetrating cryoprotectants, the semen collection of 4 Caballos Peruano de Paso were carried out. The samples collected by artificial vagina were evaluated macroscopically for the indicators of; volume, color, density, pH. Then added with preservative of sperm activity, they were transferred to the laboratory to be cryopreserved using the conventional technique proposed by Moussa et al, 2002<sup>29</sup> divided into two aliquots adding to a low-density lipoprotein (LDL) and the other hen egg yolk as non-penetrating cryoprotectants. After the cryopreservation the microscopic evaluations of; HOST test, motility, concentration, membrane integrity and morphology. The observed macroscopic parameters resulted, average volume 41.5 ml; color and milky white appearance; and average pH 7.46, these values showed no statistical difference ( $p > 0.05$ ) between stallions. We observed better seminal quality in cryopreserved straws with low-density lipoproteins (LDL) against cryopreserved semen with hen egg yolk, there being statistical difference ( $p < 0.05$ ), for the variables: Motility 48.9% and 27, 5%, motility at 20 min. 38.2% and 19.3%; Progressive motility 38.3% and 21.5%; viability 45.9% and 31.7% and functional membrane 59.3% and 41.6% for LDL and egg yolk respectively. Not observing significant difference for the variable morphology ( $p > 0.05$ ). We can conclude that there is an improvement in the seminal quality of the cryopreserved semen with low-density lipoproteins against semen cryopreserved with whole hen egg yolk, this by the isolation of the LDL of the whole yolk.

Keywords: semen, cryoprotective, Caballo Peruano de Paso.

## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Enunciado del Problema

Evaluación de crioprotectores no penetrantes: proteínas de baja densidad (LDL) y yema de huevo de gallina, en calidad de semen refrigerado y congelado de Caballos Peruano de Paso.

### 1.2. Descripción del Problema

En la actualidad la Inseminación Artificial (IA) con semen congelado está tomando cada vez más importancia en nuestro país, es por eso que existen varios protocolos de congelación que requieren estudios comparativos, que nos permiten identificar el diluyente más eficiente ya que una de las limitantes de la criopreservación del semen equino es conocida como factor diluyente o extender.

Trabajos recientes coinciden en que el mayor y más preocupante inconveniente de la Criopreservación es el choque térmico al cual están expuestos los espermatozoides durante el proceso de congelación y descongelación, reduciendo así en gran medida la capacidad de fertilización y la calidad de semen criopreservado. Es por esta razón que varios autores y especialistas en el área de reproducción equina coinciden en la necesidad de utilizar y comparar crioprotectores que aporten lipoproteínas y energía que protejan al espermatozoide del choque térmico; dado que, es el crioprotector el que durante el proceso de congelación lleva la mayor importancia, motivo por el cual es necesario la Evaluación de Crioprotectores no Penetrantes: Proteínas de Baja Densidad (LDL) y Yema de Huevo de gallina en Calidad de Semen Refrigerado y Congelado de Caballos Peruano de Paso.

### **1.3.- Justificación del problema:**

#### **1.3.1. Aspecto General**

El caballo Peruano de Paso se origina de la razas Española y Árabe, todas estas, comparten la característica general de ser reproductores complicados en el caso de congelamiento de semen, el presente trabajo de investigación tuvo a bien investigar y poner a prueba durante el proceso de criopreservación una nueva sustancia crioprotectora no penetrante como es el caso de LDL de la yema de huevo, con la finalidad de mejorar las características del semen refrigerado y congelado, permitiendo esto poder usar con mejores características de criopreservación de semen de ejemplares de Caballo Peruano de Paso en las técnicas de inseminación artificial en yeguas.

#### **1.3.2. Aspecto Tecnológico**

Mejorar la tecnología y la técnica de criopreservación de semen de equino mediante la utilización de nuevos tipos de diluyentes que contengan agentes crioprotectores no penetrantes, que mejore las características seminales desde el punto de vista microscopio y funcional en el proceso de la criopreservación para la utilización de semen congelado, permitiendo el uso de semen criopreservado con mayor frecuencia, mayor facilidad y difusión a lo largo de nuestro país logrando la expansión y extensión de la técnica de criopreservación e inseminación artificial entre los criadores de Caballo Peruano de Paso. Al mismo tiempo lograr la obtención en laboratorio de lipoproteína de baja densidad a partir de la yema de huevo para su posterior uso en criopreservación

#### **1.3.3. Aspecto Social**

El caballo peruano de paso es un animal de afición de muchos criadores y aficionados de la región y el país, produciendo animales de cría y exposición donde la mejora genética se basa en cruce dirigida de ejemplares elite.

El uso de la técnica de inseminación artificial con semen criopreservado permitirá incrementar la ganancia genética en los programas de mejoramiento

difundiendo las características de los sementales y permitiendo mayores ingresos económicos para los criadores. Asimismo permitirá exportar material genético propagando un producto bandera del Perú y a la vez promoviendo nuestra identidad y cultura

Asimismo la presente investigación aporta conocimiento en la técnica de criopreservación de semen equino y permite la capacitación de personal en el aspecto biotecnológico y profesional mediante charlas, cursos y talleres para la formación y obtención de competencias en técnicas de criopreservación espermática.

#### **1.3.4. Aspecto Económico**

El uso de biotecnologías para la criopreservación de gameto macho permitirá la venta de pajillas de semen criopreservado de ejemplares elites entre regiones sin la necesidad de la movilización de los garañones.

Se logrará contar con material genético criopreservado, lo que permitirá la utilización de semen por un largo periodo de ejemplares reconocidos a pesar de que estos hayan muerto o estén incapacitados para la monta, además permitirá exportar semen criopreservado de Caballo Peruano de Paso a diferentes países, permitiendo obtener valores agregados por la venta de material genético.

#### **1.3.5. Importancia del trabajo**

- Nueva alternativa para mejorar el proceso de criopreservación y mantener el material genético deseado por más tiempo.
- Realizar envíos a diferentes países de semen criopreservado.
- Obtener crías de ejemplares valiosos muertos por edad, accidentalmente o impedidos mecánicamente de realizar la monta.
- Mejorar la calidad genética y el avance genético de los ejemplares.

## 1.4.- Objetivos

### 1.4.1.- Objetivo general

Evaluar la calidad de semen criopreservado con LDL y yema de huevo de gallina, como crioprotectores no penetrantes específicos.

### 1.4.2. Objetivos específicos

- Evaluar microscópicamente y macroscópicamente el semen fresco de equino.
- Evaluar microscópicamente el semen criopreservado con LDL y yema de huevo como crioprotectores no penetrantes específicos.
- Determinar cuál de los dos crioprotectores no penetrantes como el LDL y yema de huevo mejora la calidad de semen criopreservado.

## 1.5.- Planteamiento de la hipótesis

Dado que la yema de huevo de gallina y las LDL son agentes criopreservantes no penetrantes, es probable que utilizándolos en criopreservación, pueda mejorar la calidad de semen congelado en Caballo de la raza Peruano de Paso.

## II. MARCO TEÓRICO O CONCEPTUAL

### 2.1.- Análisis bibliográfico

#### 2.1.1.- Material principal

#### Parámetros reproductivos en equinos

##### Madurez sexual

Los testículos del equino descienden entre la primera y tercera semana de edad. En algunos casos dichos órganos ya se encuentran en el saco escrotal desde el nacimiento. El crecimiento posnatal comienza en el mes 11 y el testículo izquierdo se desarrolla antes y crece más rápido que el derecho. En este momento también hay un desarrollo gradual de los túbulos seminíferos hacia afuera, alrededor del testículo derecho. La edad a la cual los garañones se usan por vez primera para apareamiento natural o artificial está determinada principalmente por las condiciones de manejo.<sup>1</sup>

##### Anatomía del aparato reproductor del macho

##### Pene

El pene del caballo mide unos 50 cm cuando permanece relajado, unos 15 a 20 cm del mismo permanecen en el prepucio. Durante la erección el tamaño aumenta dos veces. Se divide en cabeza, cuerpo y glande. El glande o extremo libre del pene tiene forma de bellota, particularmente durante la erección y el proceso vietal se prolonga unos 2,5 cm desde la superficie de la depresión profunda o fosa del glande.<sup>2</sup>

##### Cuerpo cavernoso

Constituye la porción más voluminosa del pene. Son acúmulos alargados de tejido eréctil, envueltos en una capsula fibroelástica gruesa, denominada túnica albugínea. De ella parten hacia el interior un septo mediano y numerosas trabéculas que forman una malla interna de sostén para los espacios cavernosos del tejido eréctil. Cerca de la arcada isquiática, los cuerpos cavernosos se separan entre sí y se unen a ella mediante los pilares del pene. A medida que avanza hacia

el vértice del pene, los cuerpos cavernosos se fusionan más y más uno al otro en el plano medio de forma que solo persiste un fino septo que los separa. A lo largo de la cara ventral del cuerpo cavernoso hay un surco profundo, el surco uretral, que aloja la uretra y su cuerpo esponjoso. Caudalmente el cuerpo del pene está sujeto a la cara ventral de la pelvis mediante dos láminas de tejido conjuntivo denominado ligamento suspensorio del pene. También irradian de la línea alba unas láminas fibroelásticas que a modo de cincha, lo rodean y fijan, el ligamento fundiforme. Según la cantidad relativa de tejido conjuntivo presente en los cuerpos cavernosos del pene se pueden distinguir los tipos fibroelásticos y musculocavernosos. Los penes fibroelásticos presentan un gran predominio de las trabéculas conjuntivas sobre los espacios cavernosos, lo que les confiere una consistencia dura, incluso cuando no están en erección. Los penes musculocavernosos presentan grandes espacios en cuyas paredes abundan las fibras musculares lisas en vez de las trabéculas conjuntivas. Por tanto, cuando el pene está flácido es menor y ofrece una consistencia blanda y compresible.<sup>3</sup>

### **Uretra del macho**

Comienza en el orificio uretral interno y termina en el orificio uretral externo, situado en el vértice del pene. Se considera dividida en dos partes: pélvica y peniana, en la uretra pélvica ya conocemos la parte pre-prostática, situado entre la vejiga y la próstata, que solo transporta orina, el resto lleva orina durante la micción o semen en la eyaculación.<sup>3</sup>

Alrededor de la porción pélvica se disponen las glándulas genitales accesorias, cuyos conductos excretores abocan a ella. Su mucosa aparece plegada y el epitelio es de transición. Por fuera de ella hay un estrato vascular (estrato cavernoso), cubierto por una fina capa de tejido muscular liso, alrededor del cual se dispone el músculo uretral, gruesa capa circular de tejido muscular estriado. Cuando da la vuelta alrededor de la arcada isquiática su luz se estrecha y forma el ístmus de la uretra, a partir del cual comienza la uretra peniana.<sup>3</sup>

Pasada la pelvis comienza la parte peniana, que se dirige ventrocranealmente pasando entre los pilares del pene para situarse en el surco uretral del cuerpo cavernoso. La uretra peniana está rodeada por una formación tubular impar de tejido eréctil, el cuerpo esponjoso. Su mucosa forma pliegues

longitudinales y está cubierta por un epitelio de transición que a nivel del orificio uretral externo cambia a escamoso estratificado.<sup>3</sup>

### **Cuerpo esponjoso**

Envuelve completamente la uretra, continuándose proximalmente con la capa vascular de la porción pélvica. A nivel de la arcada isquiática forma un abultamiento, el bulbo del pene, dividido en dos mitades por un septo medio. El bulbo se aplica a las caras caudal y lateral de la uretra, estando cubierto por una gruesa capa circular de tejido muscular estriado, que forma el musculo bulboesponjoso. Se denomina raíz del pene al conjunto del bulbo del pene y a los dos pilares del pene.<sup>3</sup>

El bulbo contacta directamente con la piel de la región perineal e incluso se proyecta dorsalmente hacia la cavidad pelviana, relacionándose con las glándulas bulbouretrales.<sup>3</sup>

### **Prepucio**

Cuando no está en erección, el glande y la porción libre del pene están en el interior de la vaina cutánea, el prepucio. Consta de una lámina externa que se continúa con la piel de la pared abdominal y una lámina interna en contacto con el pene y que a nivel del extremo caudal de la cavidad prepucial se continúa con la piel que recubre la porción libre del pene. Las láminas interna y externa se unen a nivel del orificio prepucial.<sup>3</sup>

La lámina externa del prepucio tiene la misma estructura que la piel circundante, estando cubierta de pelo. Su cara ventral presenta el rafe prepucial, continuación del rafe escrotal y más o menos marcado, según las especies.<sup>3</sup>

### **Escroto**

El escroto del caballo semental, es un divertículo del abdomen, es algo asimétrico y menos colgante que el del toro. El escroto es asimétrico porque un testículo es algo mayor y colgado un poco mas hacia atrás que el otro. Los testículos se encuentran horizontalmente en el escroto cuando esta relajado el musculo cremaster.<sup>3</sup>

Cuando aparece relajado, el músculo es suave y se estrecha posteriormente cerca del abdomen. Expuesto al frío, se contraen los músculos cremaster externo y la túnica dartos, por lo que el escroto es atraído hacia arriba, y se arruga. La relajación y contracción de estos músculos es necesaria para la función termorreguladora. La pared del escroto está constituida por varias capas en las que se incluyó la piel, la túnica dartos muscular, la fascia del escroto, y la capa parietal de la túnica vaginal propia.<sup>2</sup>

El escroto aloja a dos testículos, está constituido en su parte externa por una piel fina y elástica que contiene glándulas sebáceas y sudoríparas.<sup>4</sup>

### **Testículos**

Los testículos del caballo son de forma ovoide y permanecen en posición horizontal, están suspendidos hacia los lados del pene, pesan de 250 a 300gramos. Miden de 10 a 12cm de largo y 5 cm de ancho. Generalmente el testículo izquierdo es más grande. Los tabiques con estructura de túbulos de tejido conjuntivo se proyectan hacia el interior del tejido glandular y subdividen el parénquima testicular en lóbulos. Cada lóbulo contiene túbulos seminíferos, células intersticiales o de Leydig y tejido conjuntivo laxo.<sup>2</sup>

Durante las primeras etapas de vida del feto, los testículos se desarrollan cerca de la bóveda de la cavidad abdominal. En las proximidades del riñón del lado correspondiente. Más tarde los testículos abandonan la posición inicial, y se alojan en la bolsa escrotal. En su desplazamiento, cada testículo va precedido de un pliegue de peritoneo que desciende a través del canal inguinal junto con el músculo, existente en el cordón espermático.<sup>4</sup>

Los testículos son órganos pares ovoides capsulados formados por túbulos seminíferos separados por el tejido intersticial. Los testículos se envuelven por una capsula densa de tejido conjuntivo. La túnica albugínea, se lleva fibras de músculo liso que responden a estímulos adrenérgicos. En gran parte de los animales, los testículos migran de su origen en el abdomen a una envaginación subcutánea del peritoneo, el escroto.<sup>5</sup>

## Epidídimo

Consta de cabeza, cuerpo y cola. Es alargado y está fijo al borde epididimario del testículo. Su cola se une al polo caudado por el ligamento propio del testículo. La serosa que envuelve al testículo envuelve también al epidídimo, pero deja entre ambas estructuras un receso denominado seno del epidídimo (bursa testicularis). La cabeza del epidídimo consta de un número variable de conductos eferentes dispuestos de forma tortuosa en el interior de lobulillos separados por tejido conjuntivo, constituyendo los conos eferentes. Su unión forma el conducto del epidídimo, que también de forma tortuosa ocupa el cuerpo y se dirige hacia la cola, aumentando progresivamente de diámetro. Es un conducto largo pudiendo medir hasta 10 m en bovinos y entre 70 y 80 m en equinos.<sup>3</sup>

Posee células musculares lisas cuyas contracciones peristálticas hacen progresar los espermatozoides hacia el conducto deferente a un ritmo constante, que no depende de la edad, la época del año o la frecuencia de eyaculaciones.

Las células del epitelio de su mucosa ejercen funciones de secreción y absorción con un múltiple cometido:

- Concentran los espermatozoides
- Mantienen su vitalidad
- Contribuyen a su maduración, induciendo cambios morfológicos (pérdida de la gota citoplasmática), estructurales (estabilización del acrosoma y membrana plasmática) y metabólicos.
- Les confieren motilidad y plena capacidad fecundante.
- Los convierten en inaptos para la fecundación por medio de un factor “factor de descapacitación”, para evitar que estos penetren las células epiteliales de la mucosa de los órganos que han de recorrer hasta llegar al tracto genital femenino. Este factor solo se neutraliza cuando los espermatozoides se ponen en contacto durante un cierto tiempo con la mucosa uterina y tubárica, las cuales liberan un “factor de capacitación”. Con ello los espermatozoides se hacen fecundantes y además penetran en la mucosa del tracto femenino, favoreciendo su eliminación por fagocitosis.

La cola del epidídimo es una zona de almacenamiento de los espermatozoides. Los espermatozoides que permanecen mucho tiempo en la cola del epidídimo muestran signos de envejecimiento, con alteraciones morfológicas, pérdida de motilidad y capacidad fecundante. Por eso se piensa que los que no se renuevan por eyaculación se hacen progresar hacia la uretra y se eliminan con la orina.<sup>3</sup>

### **Conductos deferentes**

Conecta la cola del epidídimo con la uretra pélvica. Su porción extra abdominal va inicialmente paralela al epidídimo, en un pliegue propio de la serosa que lo engloba también en su trayecto a lo largo del cordón espermático, donde va acompañado por la arteria y vena testiculares, nervios simpáticos y parasimpáticos y vasos linfáticos, situándose casi siempre medialmente a todos ellos. Su porción intramural es la que se encuentra en el trayecto inguinal, por el que penetra en el abdomen. Se dirige después hacia la pelvis, describiendo una trayectoria curva (porción pélvica), sujeta por el pliegue genital. Cerca de su desembocadura forma un asa alrededor del uréter, situándose medialmente a las vesículas seminales y discurrendo sobre el cuello de la vejiga. El pliegue genital es una capa horizontal de peritoneo que va de un conducto a otro y se sitúa entre el recto y la vejiga. La pared de la última porción de los conductos deferentes se engruesa por la presencia de glándulas ramificadas y constituye las ampollas de los conductos deferentes muy juntas en los rumiantes y pueden ser fácilmente reconocidas por la palpación rectal.<sup>6</sup>

Pasadas las ampollas, los conductos se adelgazan y en los rumiantes se unen al conducto excretor de las glándulas vesiculosas, formando un conducto común (conducto eyaculador) que desemboca en los orificios eyaculadores, abiertos en la pared dorsal de la uretra a nivel de un relieve de la misma, el colículo seminal, prolongado hacia el cuello de la vejiga por la cresta uretral. La última porción del conducto deferente perfora la próstata en todas las especies y es en el espesor de esta glándula donde se encuentra el conducto eyaculador en las especies que lo poseen.<sup>6</sup>

## Parénquima testicular

### Sistema tubular

Comprende los túbulos seminíferos y las vías seminales intersticiales, en los túbulos es donde se produce los gametos masculinos o espermatozoides, cada lobulillo contiene un número variado de estos túbulos, el grosor oscila entre 150 y 250  $\mu$  y la longitud es muy variable. En general los testículos poseen aproximadamente de 50 a 100 túbulos seminíferos en cada lóbulo, pero en el toro se ha estimado que la longitud total tubular es de unos 5000 mts en las porciones terminales se adelgazan considerablemente para formar los tubos rectos que desembocaran en la rete testis o de Haller, la luz "in vivo", se llena de líquido que transporta los espermatozoides recién formados, se mueve en parte por la presión vis a tergo (fuerza de propulsión) y por los movimientos peristálticos de las paredes de los túbulos. El espesor de los túbulos esta tapizado por el epitelio estratificado denominado epitelio seminífero, integrado por células germinales y no germinales, este epitelio descansa en la lámina propia.<sup>7</sup>

La luz de los túbulos seminíferos, aparecen en los animales a partir del año de vida.

El epitelio seminífero o germinativo presenta lo siguiente:

- Células germinales: son las espermogonias, espermatoцитos de primer orden o primario, espermatoцитos de segundo orden o secundario, espermátides, espermatozoides.
- Células de sostén, sustentaculares o de Sertoli
- Lámina propia formada por tejido conectivo<sup>7</sup>

La lámina propia formada por una membrana basal con 1 o más capas de células y material intercelular con fibras colágenas, microfibrillas puede presentarse multilaminar con 8 o 10 estratos en rumiantes con prominencias periódicas en el toro.<sup>7</sup>

Las capas más externas de la lámina propia son células bastante indiferenciadas parecidas a fibroblastos que se encargan de reemplazar a las células más internas, las peritubulares dependen tanto de su estructura como en su función del nivel de andrógenos de la sangre. Los filamentos otorgan capacidad

contráctil a la propia de lo que dependerá el movimiento del líquido tubular, en el mecanismo de espermiación, las células derivan del mesénquima y se diferencia muy temprano en la vida fetal.<sup>7</sup>

El epitelio seminífero comprende:

Las células de sertoli o sustentaculares aunque este último nombre es para referirse a las células prepuberales y la sertoli para el animal sexualmente maduro.

Las células de sertoli se mantienen unidas por complejos de unión, ocurren a nivel de la porción basal de las mismas y ofrecen fuerte unión de tipo ocluyente en las porciones más apicales, estas uniones son la base estructural de la barrera hematotesticular, considerada como una barrera fisiológica de difusión para mantener las diferencias de microambiente entre el espacio intersticial y el tubular para permitir los delicados procesos de la espermatogénesis, los complejos de unión también se encuentra relacionado el citoplasma de las células de sertoli y las espermatídes.<sup>7</sup>

Esta barrera hematotesticular impide que las células germinales entren en contacto con el sistema inmunitario del macho, por lo que este último siempre reconoce los antígenos espermáticos como proteínas extrañas, se piensa que es una de las más fuertes de todo el organismo y que consta de:

- Células mioides y células de sertoli, estas últimas permite el paso de proteínas fijadoras de andrógenos e inhibina, importantes en el mantenimiento de altas concentraciones de andrógenos en el epidídimo, estos se vierten hacia la luz de los túbulos seminíferos junto con otras secreciones de las células de sertoli y que en conjunto constituyen el líquido testicular en el cual flotan los espermatozoides y progresan hacia el epidídimo.<sup>7</sup>

Las células de sertoli también protegen del ataque de inmunoglobulinas de la sangre periférica.

Las funciones de las células de sertoli son:

Solo se pensó que era mecánico pero ahora se tiene información fisiológica abundante, se halla implicada en el mantenimiento y control de la espermatogénesis.

- **Mecánica:** sostiene a las células germinales
- **Fagocitaria:** Pero queda limitada a los espermatozoides que sufren degeneración y a los cuerpos residuales de las espermatídes poco antes de la espermiación.
- **Transporte selectivo:** Actúa como una verdadera nodriza al seleccionar y transportar las sustancias que accederán a dicho epitelio.
- **Espermiación:** El espermatozoide se desprende de la pared del túbulo seminífero, el citoplasma apical sufre una serie de modificaciones que culmina con la liberación de los espermatozoides.
- **Secreción de inhibina:** Actúa sobre la adenohipófisis inhibiendo la liberación de FSH.
- **Secreción de ABP (androgen Bindig Protein):** es una proteína, sintetizada que tiene la capacidad de ligar andrógenos u que pueda ejercer su acción sobre la espermatogénesis, el ABP sería posibilitada por la acción de FSH sobre las células de sertoli.
- **Líquido testicular:** es el resultado de la acción selectiva del citoplasma sertoliano sobre el líquido peritubular, se suma a ello la propia secreción sertoliana mediados por la FSH hipofisiaria.
- **Regulación de la meiosis:** a través de una serie de sustancias sintetizadas en su citoplasma, se aislaron dos factores MIS y MPS. Que actuarían estimulando e inhibiendo respectivamente el proceso meiótico, otro hallazgo fue el de un polipéptido LH-RF (factor de liberación de LH) que hablaría en favor de una autorregulación territorial por parte de la célula de sertoli.<sup>7</sup>

Las células de sertoli tienen altamente elevadas su resistencia ante sustancias toxicas, radiaciones, hipofisectomía y envejecimiento, no sufre mitosis en el animal sexualmente maduro, a estas células se les llama de pie, candelabro, etc.<sup>7</sup>

### **Glándulas genitales accesorias**

Se agrupan alrededor de la uretra pélvica. Presentan variaciones según la especie. Su crecimiento y funcionalidad está ligada a la presencia de las hormonas sexuales masculinas. Pueden palparse por vía rectal, sin embargo el mejor método de exploración consiste en el examen ultrasonográfico con una sonda transrectal.<sup>6</sup>

### **Glándulas vesiculares**

Son pares y se sitúan dorsolateralmente al cuello de la vejiga, introduciéndose entre las dos hojas del pliegue genital pero lateralmente al conducto deferente, en los rumiantes son compactas y su superficie es lobulada. Su secreción constituye la fracción post espermática del eyaculado y contiene ácido ascórbico, fructosa, ácido cítrico, fosforilcolina y prostaglandinas.<sup>6</sup>

### **Próstata**

Existe en todos los animales, íntimamente relacionada con la primera porción de la uretra, consta de un cuerpo y una porción diseminada (capa glandular dispuesta alrededor de la uretra y solo visible si esta se secciona). La glándula vierte su producto por numerosos conductillos prostáticos que se abren en el seno prostático, a ambos lados del colículo seminal. El líquido prostático es rico en aminoácidos, ácido cítrico y enzimas. Constituye la fracción espermática del eyaculado, junto con la secreción testicular y, contra lo que pudiera pensarse por el nombre, no contiene prostaglandinas.<sup>6</sup>

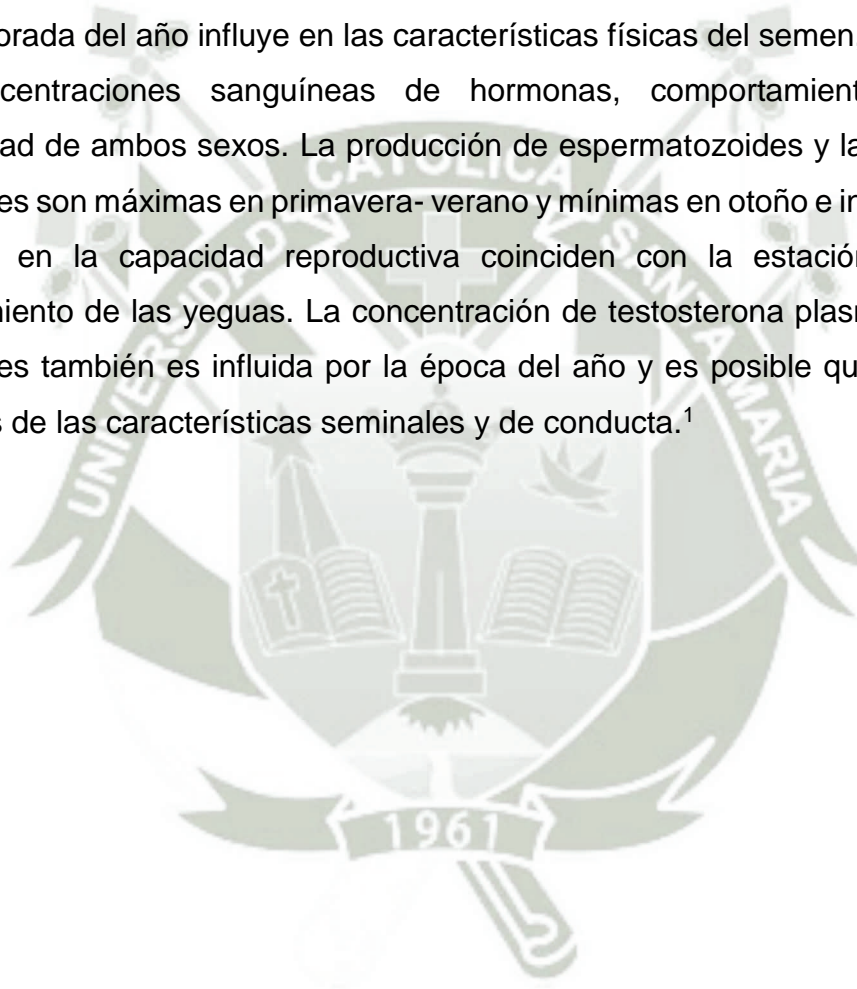
### **Glándulas bulbouretrales**

Son pares y se encuentran dorsalmente a la porción caudal de la uretra pélvica. Su conducto excretor es único en todas las especies, su secreción es filante y mucosa y constituye la fracción pre espermática del eyaculado.<sup>6</sup>

### **Producción de semen**

El ciclo del epitelio seminífero puede dividirse en ocho etapas con base en las divisiones meióticas, forma de los núcleos de las espermátides y localización de las espermátides con núcleos alargados. El eyaculado compone de 6 a 8 chorros resultantes de las concentraciones de la uretra. El volumen de cada chorro sucesivo se reduce alrededor de 50% del valor inicial: 70% o más de los espermatozoides y

de los constituyentes bioquímicos básicos está contenido en los tres primeros chorros. El material gelatinoso en el semen, secretado por las vesículas seminales, carece de efecto sobre la motilidad o la capacidad fecundante de los espermatozoides. El volumen de gel, que constituye alrededor de un tercio del eyaculado, varía considerablemente y no es característico del garañón individual. Al parecer, cuando los eyaculados contienen gel se requieren menos montas, el tiempo de reacción es menor y el volumen de semen sin gel es ligeramente mayor. Las características del semen son influidas por el grado de estimulación sexual, frecuencia de eyaculación, edad, tamaño testicular y método de colecta del semen. La temporada del año influye en las características físicas del semen, así como en las concentraciones sanguíneas de hormonas, comportamiento sexual y fecundidad de ambos sexos. La producción de espermatozoides y la libido de los garañones son máximas en primavera- verano y mínimas en otoño e invierno. Estos cambios en la capacidad reproductiva coinciden con la estación natural de apareamiento de las yeguas. La concentración de testosterona plasmática de los garañones también es influida por la época del año y es posible que module los patrones de las características seminales y de conducta.<sup>1</sup>



**Cuadro N° 1: Características Bioquímicas de fracciones seminales del  
garañón. <sup>1</sup>**

FRACCION SEMINAL	ORIGEN	CARACTERISTICAS FISICAS	CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS
<b>PREESPERMATICA</b>	Glándulas uretrales	Acuosa	Alto contenido de NaCl, sin ergotioneina, ácido cítrico o GPC
<b>RICO EN ESPERMATOZOIDES</b>	Glándulas epidimarias y ampulares	Lechosa, no viscosa	Elevada concentración de espermatozoides, ergotioneina y GPC; NaCl y ácidos cítricos escasos.
<b>POSESPERMATICA</b>	Vesícula seminal	Muy viscosa	Baja concentración de espermatozoides, alto contenido de ácido cítrico, Ergotioneina y GPC bajas.
<b>GOTEO PENEANO</b>	Muestra del extremo de la cola del epidídimo	Acuosa	Sin espermatozoides ni productos secretorios de epidídimo, ámpula o vesículas seminales (como GPC y ácido cítrico)

GPC: Diesterasa de glicerilfosforilcolina.

### Características del semen en equinos

El semen es el producto eliminado a través de la uretra durante la eyaculación; está formado por una fracción celular, compuesta por los espermatozoides, y una porción líquida (plasma seminal) que actúa como vehículo de los espermatozoides y está producida por las glándulas sexuales accesorias y una pequeña porción de fluidos procedentes del testículo, epidídimo y conducto deferente.<sup>8</sup>

#### Células germinales

Representan fases diferentes en el proceso de formación del espermatozoide orientándose las más jóvenes cerca de la membrana basal y las más diferenciadas cerca de la luz tubular.<sup>6</sup>

La cinética del epitelio germinal se llama espermatogénesis, la espermatogénesis, parece seguir un curso ondulante o por oleadas, las fases no son iguales en todos los planos transversales de cada canalículo testicular, la

duración del ciclo se estima en general aproximadamente en 19 – 20 días, que clásicamente se lo divide en tres fases:

### **1. Espermatocitogenesis**

Es la proliferación de las espermatogonias para dar origen a los espermatoцитos de primer orden o primarios, la proliferación asegura el mantenimiento del número original de espermatogonias es decir la renovación para que no se agoten en el proceso de diferenciación, hay que tener en cuenta que la espermatogénesis ya se está preparando en la vida embrionaria, mediante la multiplicación de los gonocitos de este proceso resulta la formación de espermatogonias.<sup>6</sup>

Esta multiplicación se realiza por mitosis normales, se realizan aceleradamente a partir de la pubertad y no cesara hasta la muerte del animal. Ha diferencia de lo que ocurre con otras estirpes celulares, es que las espermatogonias no doblan su volumen, después de cada mitosis, de manera que cuantas más divisiones han sufrido, menor su tamaño.<sup>6</sup>

Las espermatogonias se describen en tres tipos diferentes, el tipo polvoso por el aspecto nuclear, dado que su cromatina se dispone en gránulos finos y pálidos, el otro tipo costroso de gránulos gruesos.<sup>6</sup>

La primera se designa espermatogonia tipo A (EGA), la segunda como espermatogonia tipo B (EGB) y el tercer tipo es la espermatogonia intermedia (EGI) con cromatina en delicados copos.<sup>6</sup>

En todos los mamíferos la población de espermatogonias está compuesta por dos clases celulares, las células madre definidas, como no especializadas que no tienen habilidad para dividirse originando otras células madres y además células en diferenciación.<sup>6</sup>

Las células en diferenciación incluyen las células que poseen diversos grados de especialización, ósea son células especializadas que pueden dividirse para originar nuevas células en diferenciación pero no células madres, de modo las EGI y EGB parecen irreversiblemente dedicadas a producir espermatoцитos y deben clasificarse como células en diferenciación, las EGA pueden clasificarse como células madre, pueden dividirse y originar EGI y EGb y nuevas células madre,

de esas células madre se produce dos nuevas, aquellas que periódicamente a intervalos fijos y regulares se dividen y luego de una o más mitosis se renuevan así mismas y simultáneamente producen espermatogonias en diferenciación.<sup>6</sup>

Los espermatoцитos se originan por división del EGB, el núcleo del espermatoцитo primario en interfase muestra cuerpos gruesos de cromatina, y se resuelve hasta adoptar el aspecto leptoténico (Primer estadio de la profase de la primera división meiótica) de la profase.<sup>6</sup>

## 2. Meiosis

En la meiosis, se realiza la fase de reducción cromosómica y conduce a la diferenciación genética de los espermatozoides en machos u hembras, es decir que son portadores del cromosoma “Y” o del “X”, en el caso de los mamíferos, 50% “X” y 50% “Y”, hacen que los espermatozoides con “X” sean menos móviles que los “Y”.

El espermatoцитo primario da origen por la primera división meiótica en dos espermatoцитos secundarios a partir de un primario. Contiene gránulos de cromatina bastante pálidos y glóbulos cromáticos fuertemente teñidos, el diámetro total de la célula suele ser de 12  $\mu$  los primarios de 18 o 20  $\mu$  los espermatoцитos secundarios originan las espermátides, recién formadas poseen un núcleo esférico pequeño, el diámetro total no sobrepasa las 8 $\mu$  tienen un contenido haploide de cromosomas.<sup>6</sup>

## 3. Espermiogénesis

El espermátide por una serie de procesos complejos se diferencia en la célula germinal altamente especializada, el espermatozoide, el aparato de Golgi está bien diferenciado en las espermátides, estos se ubican cerca del núcleo, comienza a secretar material en forma de gránulos envueltos por vesículas de membrana lisa, son los gránulos proacrosómicos y las vesículas se llaman vesículas proacrosómicas estos se fusionan para formar un gránulo único el acrosómico rodeado de su vesícula, todo esto corresponde a la fase Golgi, para proseguir con la fase de casquete, aquí la vesícula crece y de esférica que era se aplanan al apoyarse sobre la superficie del núcleo, el material PAS positivo se coloca sobre la membrana de la vesícula adyacente al núcleo, formando una capa única,

luego las partículas PAS positivas se fusionan para dar lugar a una delgada capa supra nuclear y el granulo acrosómico no sufre ninguna modificación, la superficie externa de la vesícula se aplanan más para adherirse firmemente al granulo y a la placa a modo de sombrero llamándose casquete o caperuza, crece deslizándose sobre la superficie nuclear hasta cubrir los 2/3 de la misma, empieza después de la fase acrosómica en granulo y el casquete se orientan hacia la lámina propia del túbulo. La masa citoplasmática se desplaza hacia el lado opuesto del núcleo donde se halla el granulo y el casquete, estos dos se conocen como sistema acrosómico. El aparato de Golgi se separa del sistema acrosómica y se pierde el citoplasma, el núcleo comienza a alargarse y se aplanan en sentido opuesto, el granulo acrosómico experimenta una saliencia al que se le llama acrosoma.<sup>6</sup>

Luego sigue la fase de maduración en donde el sistema acrosómico se hace más débil mientras que la célula se libera del exceso de citoplasma.<sup>6</sup>

Los cambios a nivel del sistema acrosómico se ha estudiado mucho en el macho cabrío, toro y padrillo, demostrando pocas diferencias con referencia al cerdo. En el equino es casquete se fija fuertemente al ápice nuclear pero tiene unión poco laxa sobre el último tercio de la superficie, los centriolos están en el polo opuesto del núcleo, la cromatina se condensa y se tiñe cada vez más fuerte y hace que el núcleo tome el tamaño y forma típica para cada especie, un centriolo se orienta perpendicularmente a la superficie celular y se encarga de formar el flagelo y se constituye en el cuerpo basal, posteriormente se forma el anillo a partir del material del cuerpo acrosómico rodean al flagelo y se desplaza a lo largo del mismo, delimitando la futura pieza intermedia, las mitocondrias migran y se disponen a su alrededor para formar una vaina, el exceso del citoplasma forma el cuerpo residual, pequeña esfera sin organelos que existe hasta poco antes de la espermiación.<sup>6</sup>

El acrosoma tiene dos funciones: disolver las envolturas ovulares para facilitar la penetración del espermatozoide y adherirse a la membrana ovular en el momento de la fecundación, para lo cual cuenta con proteínas específicas llamadas Bindinas.<sup>6</sup>

#### **4. Espermiación**

Es la liberación del espermatozoide del epitelio seminífero en los mamíferos, durante la espermiogénesis existe estrecha asociación entre los espermatozoides

y el citoplasma de las células de Sertoli, estas emiten láminas de citoplasma que envainan a grupos de espermatídes por las etapas similares de desarrollo hallándose generaciones de espermatídes y en el túbulo hay varias de estas generaciones cada una en una etapa diferente de la espermiogénesis, las espermatídes se encuentran ligadas entre sí por medio de puentes citoplasmáticos que permiten que se muevan en masa desde basal a luminal a medida que se diferencian cuando se desarrolla el sistema acrosómico, las espermatídes se orientan hacia la membrana basal del túbulo seminífero, las más jóvenes profundizan más en el túbulo relacionándose en las prolongaciones sertolianas, cuando maduran solo la mantiene un puente de citoplasma que ancla en la pieza intermedia.<sup>6</sup>

En la espermiación se produce la ruptura del puente citoplasmático que une el cuerpo residual, la célula de Sertoli se encarga de fagocitar el cuerpo residual.<sup>6</sup>



## Espermatozoides

Las células sexuales masculinas fueron descubiertas por Ham (1677), son células altamente especializadas después de la espermiación, es prácticamente inmóvil arrastrado por el líquido testicular, se advierte que consta de una cabeza con un sistema acrosómico, el cuello, flagelo pieza móvil esta posee una porción engrosada anterior que es la pieza intermedia. Los gametos poseen un nivel metabólico bajo y no se multiplican. <sup>6</sup>

## Dimensiones

El núcleo presenta la información haploide del gameto aproximadamente 2500 millones de unidades de información para poder originar un feto, la membrana más externa de la cabeza es la plasmática que rodea toda la célula, por fuera posee un glucocalix con grupos ácidos cuya distribución varía con la especie y que se relaciona con la penetración del ovulo, por dentro esta la carioteca sin tener ningún poro, interesa especialmente la acumulación anterior en forma de cuña o cuerpo apical y que se encuentra entre el núcleo y el acrosoma, esta especie de sombrero nuclear contiene enzimas necesarias para el pasaje de espermatozoides a través de las envolturas ovulares. Entre las enzimas más conocidas se hallan la acrosina, hialuronidasa y el factor mucolítico<sup>6</sup>

El flagelo es la porción móvil y se subdivide en tres segmentos: la pieza intermedia, pieza principal y pieza terminal, todas tienen el complejo axonemico central del tipo 9 más dos filamentos. <sup>6</sup>

El movimiento de los espermatozoides es Reotactico es decir contra la corriente vibrátil del oviducto y cuernos uterinos. <sup>6</sup>

Ya madurado el espermatozoide adquiere una velocidad del movimiento de progresión en promedio óptimo de 5 mm por minuto en el equino. <sup>6</sup>

La mayor parte de los espermatozoides, sucumben a las 12 – 24 horas, pero es posible encontrarlos aun móviles en el útero y oviductos hasta 40 horas después de la copula. En el tracto genital femenino, los espermatozoides, son fagocitados por los leucocitos, como también las células del fondo glandular endometrial son capaces de fagocitarlos. <sup>6</sup>

## Viabilidad de los espermatozoides

Es el lapso durante el cual, el espermatozoide mantiene su capacidad de unirse al óvulo y activarlo, en el conejo tiene espermatozoides con su capacidad móvil, después de 60 días de retención en los conductos sexuales masculinos, mientras que resulta fecundante solo hasta el día 38, en el tracto femenino pierde su capacidad fecundante en un lapso de 30 horas y los espermatozoides no utilizados mueren en 2 días.

En el tracto femenino el espermatozoide es fértil en 6 días (yegua) y 6 horas (ratona). En la oveja es de aproximadamente 30 – 48 horas, en la vaca 28 – 50 horas y superior a una semana en la perra.<sup>6</sup>

### Capacitación espermática

En los mamíferos se registra los siguientes fenómenos: Eliminación de un factor de descapacitación (rico en grupos N-Acetil-glucosamina) presente en el fluido epididimario, plasma seminal, suero homólogo yema de huevo y otros líquidos fisiológicos, que se reúnen a receptores específicos de las membranas de espermatozoides, impidiendo que libere las enzimas acrosómicas, se puede eliminar por centrifugación o por acción de macromoléculas similares a la beta-amilasa.<sup>6</sup>

Cambio de estructura de los lípidos de la membrana del espermatozoide, por efecto de las albúminas presente en el tracto genital de la hembra, que son capaces de extraer el colesterol que contiene y que ablanda la membrana,

Activación de la acrosina por acción de una glucoproteína:

Reacción acrosómica:

- Lisina como la hialuronidasa capaz de dispersar la corona radiada.
- Acrosina denominada lisina de zona pelucida es del tipo de la tripsina.
- Fosfolipasa A, desestabiliza los fosfolípidos de la membrana del ovocito.<sup>6</sup>

Vías seminales intratesticulares

Para llegar los espermatozoides liberados al epidídimo tiene que pasar por los tubos rectos estos están revestidos de células de Sertoli modificadas, sentadas

en la lámina basal que es muy plegada por las numerosas fibras colágenas y células mioideas. En los rumiantes son relativamente largos, en el verraco muy cortos, en los tubos rectos hay la presencia de tapón celular formada por las células sertolianas modificadas que se especula que impiden el reflujó del líquido tubular, actuando como válvula. En el equino es muy corto y no se describe un tapón, pero sí una constricción muy marcada.<sup>6</sup>

Los tubos rectos en equinos es solo una porción medía; el epitelio de estas porciones es en el proximal o receptáculo, simple cúbico bajo, en el segmento terminal es cilíndrico y cubico, en el distal el epitelio es muy plegado esto descansan sobre la membrana basal gruesa en los rumiantes y delgada en el cerdo, el epitelio tiene capacidad fagocitaria.<sup>6</sup>

### **Red de Testis**

Aquí desembocan los tubos rectos, el epitelio va desde plano a cilíndrico, en el toro es cilíndrico pseudoestratificado hay un 25% de células como linfocitos y macrófagos.

La composición de los líquidos es diferente al de los túbulos seminíferos, tienen proteínas distintas, además tiene alto contenido de K, es pobre en proteínas y azúcares reductoras, en las aves el epitelio es simple y plano.<sup>7</sup>

### **Espermatozoides de equinos:**

Son células haploides con la única función de fecundación. Para llevarla a cabo, las células espermáticas tienen que iniciar y mantener el metabolismo para producir energía, la motilidad progresiva y las enzimas esenciales acrosomales para penetrar a través de las estructuras que envuelven al ovocito. También es necesaria una adecuada distribución de lípidos en la membrana plasmática y el acrosoma, los cuales estabilizan esas estructuras al momento de la fecundación y permiten también la fusión de las membranas en el momento adecuado, además de esto, el mantenimiento de las proteínas de la membrana plasmática, es esencial para la sobrevivencia de los espermatozoides durante su transporte en el tracto genital femenino. Las proteínas suprimen la inmunidad local, proporcionan interacciones con las células epiteliales en determinadas regiones anatómicas y la adherencia de los espermatozoides a la membrana del ovocito en el momento de la fecundación.<sup>9</sup>

La célula espermática se divide en cabeza, cuello, pieza intermedia y cola. En la cabeza está localizado el núcleo, compuesto de cromatina altamente condensada que tiene el material genético. Los 2/3 anteriores de la cabeza están cubiertos por el acrosoma que posee las porciones apical, principal y ecuatorial. El acrosoma contiene glicopéptidos y enzimas hidrolíticas, como hialuronidasa, proacrosina/acrosina y lipasas que son liberadas en el momento de la reacción acrosómica. El cuello conecta a la pieza intermedia con la cabeza. Aproximadamente 50% de los padrillos (Morel, 1999) presentan una posición abaxial de la pieza intermedia (DOTT, 1975). En el centro de la pieza intermedia localizado el axonema, rico en ATPasa, que transforma la energía química en acción mecánica. Circundando longitudinalmente al axonema están las fibras densas que dan estabilidad a la estructura. Envolviendo las fibras densas que disponen las mitocondrias en forma helicoidal y alta concentración. Son las responsables de la alta producción de ATP. La cola está compuesta de una pieza principal y otra terminal. La pieza principal es una continuación de la pieza intermedia donde las fibras densas y el axonema presentan el menor diámetro. Las mitocondrias ausentes en la cola son sustituidas por una vaina fibrosa.<sup>9</sup>

La membrana plasmática envuelve todo el espermatozoide y está fija en puntos específicos. Permanece intacta con excepción del acrosoma, durante la reacción acrosómica, como resultado de la senilidad o muerte celular. La membrana plasmática está formada por una doble capa de lípidos, una interfase de fosfolípidos agua y glicocaliz. Los principales lípidos concentrados en la membrana son fosfolípidos y colesterol. La proporción de ambos determina de fluidez de la membrana. Cuanto mayor es la cantidad de fosfolípidos, más fluida es la membrana. El colesterol, justamente con las proteínas estabiliza la membrana. El 50% del peso de la membrana está compuesto de otras proteínas con función estructural o de ligación para otras proteínas. Las proteínas estructurales pueden actuar como canales o poros para permitir el pasaje de pequeñas moléculas.<sup>9</sup>

Bajo ciertas circunstancias, como el enfriamiento o congelación, ocurre una transición de fase en la cual una porción líquida de la membrana plasmática se transforma en gel, pudiendo causar alteraciones estructurales irreversibles o disturbios metabólicos y muerte celular. En espermatozoides equinos, la temperatura en que este cambio de fase ocurre de forma más intensa es a 20,7°C,

mas baja que la genera el mismo fenómeno en las especies porcina y bovina. Esto puede reflejar una variación en la tolerancia a caídas bruscas de la temperatura.<sup>9</sup>

El eyaculado contiene subpoblaciones específicas y bien definidas de espermatozoides, de acuerdo con las características de su motilidad. La estructura específica de las subpoblaciones está relacionada con las diversas variables como el individuo (padrillo), motilidad total y el número total de espermatozoides.<sup>9</sup>

### **Metabolismo del espermatozoide**

En 1983 se afirma que la principal fuente de energía disponible para los espermatozoides eyaculados son los carbohidratos de sustrato extracelular. Y que los espermatozoides equinos metabolizan rápidamente los monosacáridos como la glucosa, pero tienen capacidad muy limitada para utilizar otros azúcares o carbohidratos más complejos. La glucosa se liga a proteínas de transporte para atravesar la membrana plasmática.<sup>8</sup>

### **Sistema de recolección del semen**

La vagina artificial (VA) es el sistema óptimo de recogida de semen en los équidos. Existen varios modelos de vaginas artificiales: Nikishawa, Missouri, Hannover o el modelo Colorado; todas ellas están creadas bajo el mismo principio y constan de una doble camisa dentro de la cual se introduce agua caliente y en ocasiones aire con el fin de aportar la temperatura y presión adecuadas para estimular la eyaculación. Tischner desarrolló en Polonia un modelo de vagina artificial "abierta", que es empleada en muchos laboratorios debido a que permite la recogida selectiva de las distintas fracciones del eyaculado.<sup>9</sup>

Últimamente se han descrito técnicas alternativas de recolección de semen, Love en 1992 determina que la recolección de semen con vagina artificial es sin duda el método más eficaz para la obtención de un eyaculado. Cuando, debido a lesiones músculo-esqueléticas o neurológicas, el padrillo no logra hacer el salto o alcanzar la erección se puede intentar la recolección con Vagina Artificial en estación o utilizando métodos alternativos.<sup>10</sup>

## Evaluación de calidad del semen

La evaluación de semen se realiza como parte del examen andrológico para verificar la potencia que genera en la compra y venta de reproductores, antes del inicio de la temporada de monta e inseminación artificial. El análisis clásico comprende la evaluación de la concentración, número total de espermatozoides en el eyaculado, motilidad y morfología. Los valores fisiológicos se muestran en la Cuadro N° 2. El análisis aislado de los valores espermáticos no presenta alta correlación con la fertilidad del padrillo. Sin embargo, el porcentaje de espermatozoides viables, espermatozoides con motilidad presentan alta correlación con la fertilidad del macho. El semen equino presenta grandes diferencias en la calidad entre los eyaculados de un mismo individuo, por ello es necesario realizar el examen de varios eyaculados para determinar la calidad del semen, analizando dos eyaculados obtenidos con una hora de intervalo o estableciendo la media de una serie de eyaculados.<sup>11</sup>

**Cuadro N° 2: Medidas de valores seminales equinos, según varios autores.**<sup>12</sup>

Valores seminales	AUTORES			
	Pickett y col (1975)	Dowsett y Pattie(1982)	Klug (1982)	Mattos y Col (1989)
Volumen total (ml)	66	63.6	-	-
Volumen sin gel (ml)	52	45.3	75.6	60.0
Volumen de gel (ml)	7	16.8	-	-
Concentración (10 <sup>6</sup> /ml)	281	178.0	304.5	250.0
Nº Total de Espermatozoides	15	7.2	21.6	12.0
Motilidad total (%)	73	72.1	63.1	50.0
Movimiento Progresivo (%)	-	-	35.6	25.0
Epz Vivos (%)	-	-	69.5	75.0
Epz sin alteraciones morfológicas (%)	-	-	55.6	50.0

## Examen Macroscópico

Después de retirado el recipiente recolector de la vagina artificial (VA), se debe tomar precaución de no someter el semen a cambios bruscos de temperatura. La fracción gel, producida por las vesículas seminales, debe ser separada lo más

rápido posible, debido al efecto negativo que tiene sobre los espermatozoides. Algunas vaginas artificiales poseen filtros descartables, cuando eso no ocurre es posible adaptarles un filtro. Amann y col. en 1983 reportan que los filtros de nylon con poros de  $37\mu\text{m}$  son los más indicados porque retienen un número menor de espermatozoides. <sup>12</sup>

- **Volumen.** El volumen del eyaculado es la suma del volumen del semen y el gel. El volumen del semen sin el gel es determinado a través de la lectura de la probeta graduada, después de la filtración. <sup>13</sup>

- **Aspecto.** Después de la separación del gel el aspecto del semen es evaluado, teniendo en cuenta como base su coloración y consistencia. La coloración del semen varía de gris ceniza a blanco y la consistencia puede variar de acuoso a lechoso. El aspecto del semen da una idea de la concentración espermática. Cuanto más blanco lechoso, mayor es su concentración. Además de eso, la apariencia permite establecer la presencia de urospermia y hemospermia. En caso de urospermia, su presencia puede ser detectada por el olor a orina en el semen. <sup>13</sup>

- **pH.** El pH del semen equino varía entre 6,2 y 7,8 esto es un reporte de Amann y col en 1993. Sin embargo, otros autores como Kenney y col en 1983; reportan que el pH del semen equino se sitúa entre 7,2 y 7,6. Pickett en 1993, afirma que el pH está inversamente correlacionado con la concentración, de manera que con concentraciones menores el pH tiende a ser mayor. El pH puede ser medido por medio de un potenciómetro o de manera menos exacta, a través de cintas indicadoras de pH. Este debe ser determinado inmediatamente después de la recolección porque el reposo genera la formación de ácido láctico. <sup>14</sup>

## Examen Microscópico

### - Pruebas de motilidad

Tras la recogida del eyaculado el primer parámetro que debemos analizar es la motilidad, debido a que ésta se altera por los cambios de temperatura y el tiempo de incubación. Después de la recolección se inicia una disminución progresiva de la motilidad espermática. Por eso la evaluación de la motilidad debe ser determinada inmediatamente o como máximo, 5 minutos después de la recolección. La motilidad será evaluada tanto en el semen in natura como en el diluido. Para el estudio de la motilidad en este momento se pueden usar soluciones diluyentes como aquellas utilizadas para el enfriamiento del semen preferentemente aquellas con yema de huevo porque esta torna la solución ópticamente opaca; sin embargo, el semen puro tiende a aglutinarse lo que dificulta la estimación. Para una mejor evaluación el semen debe diluirse en un medio adecuado a una concentración constante entre 25 y 50 x 10<sup>6</sup> spz/ml. Generalmente esta evaluación se realiza mediante la estimación subjetiva y se debe estimar el porcentaje de células móviles o motilidad total (MT) y el porcentaje de células con motilidad progresiva (MP).<sup>12</sup>

La motilidad del semen presenta una correlación escasa con la fertilidad, tanto con el empleo de semen fresco como descongelado reporta Samper y col en 1991; En un estudio reciente Bedford y col. en 1995 compararon la motilidad y fertilidad del semen refrigerado a 4°C en un diluyente de leche desnatada con o sin yema de huevo, a pesar de que la motilidad fue significativamente mejor en el diluyente conteniendo yema de huevo la fertilidad obtenida con este diluyente (17%) fue inferior a la obtenida con el diluyente sin yema de huevo de gallina (58%). Sin embargo, la estimación de la motilidad continúa siendo el parámetro más empleado para la predicción de la capacidad fecundante del semen.<sup>15</sup>

## Coloración supravital

La coloración supravital se realiza con Eosina- Nigrosina, que determina de forma más objetiva las células viables para determinar la integridad de la membrana plasmática. Cuando las células sufren una lesión de la membrana, absorben el colorante. La coloración se lleva a cabo depositando en una extremidad del

portaobjetos entibiado 1 gota de semen y 2 de colorante. Con ayuda de un cubreobjetos la gota de semen es mezclada con las gotas de colorante y se hace el extendido, el cual será secado durante 30 segundos sobre la platina térmica. La lámina puede ser almacenada en un lugar fresco. Los espermatozoides coloreados y sin colorear se cuentan con un aumento de 400X hasta un total de 200 células. El resultado es expresado en porcentaje. Los espermatozoides no coloreados representan a las células viables y los coloreados a las células muertas.<sup>12</sup>

### **Concentración**

La concentración se establece a través del número de espermatozoides por unidad de volumen. Puede ser medida a través del recuento en cámaras (Neubauer, Burker).<sup>12</sup>

### **Funcionalidad de la membrana plasmática**

Se realiza con el Test de endosmosis (HOS). Se coloca en un tubo de ensayo 125  $\mu$ l de solución HOS a 37°C y 12.5  $\mu$ l de semen, incubándolo a 37°C durante 10 minutos, se detiene la reacción agregando 25  $\mu$ l de Solución HOS Formol y se coloca entre porta y cubreobjetos 5  $\mu$ l de la muestra observando con microscopio de contraste de fase a 400X. Los espermatozoides con cola enrollada totalmente, parcialmente, o simplemente acodada se consideraron vivos (reaccionados) y el resultado final se expresará porcentualmente. En cada muestra seminal debe observarse un mínimo de 40% de reaccionados para considerarla adecuada.<sup>12</sup>

### **Morfología espermática**

Este examen determina el porcentaje de espermatozoides con o sin alteraciones morfológicas. Existen diversas clasificaciones para las alteraciones morfológicas, sin embargo la suma de las alteraciones de acrosoma y cabeza no deben pasar del 5% y 10 % respectivamente y el número total de las alteraciones no debe ser superior al 30%. Hay, sin embargo, una cierta flexibilidad de los porcentajes.<sup>12</sup>

La morfología puede ser analizada diluyendo una alícuota de semen en solución fijadora y examinando la muestra entre el porta u cubreobjetos en el

microscopio de contraste de fase con un aumento de 1000X. Esta técnica sin embargo no permite una buena evaluación del acrosoma con una lente de inmersión. Existen diferentes coloraciones para acrosoma. <sup>12</sup>

Existe la tinción de Rosa de bengala, el cual se realiza un frotis sobre portaobjetos atemperado a 37 °C con una alícuota de 5 µl de semen y 5 µl de solución acuosa de Rosa de Bengala al 3% (m/v) atemperado, dejando secar el portaobjetos a temperatura ambiente durante 20 minutos. <sup>12</sup>

### **Choque térmico**

El enfriamiento del semen disminuye la actividad metabólica de los espermatozoides, reduce el crecimiento bacteriano y de esa manera, prolonga la viabilidad de los espermatozoides afirma Katila en 1997. El choque térmico, en equinos es el conjunto de alteraciones que los espermatozoides sufren cuando son sometidos a un enfriamiento rápido de 20° C a 5°C. Esas alteraciones están representadas por la pérdida rápida de motilidad, la alteración del tipo de motilidad con un movimiento retrogrado y circular, reducción del metabolismo, lesión del acrosoma y de la membrana plasmática, acompañada de pérdida de los componentes intracelulares. Estas alteraciones son en parte irreversibles. Con el enfriamiento, los lípidos sufren una transición a la fase líquida cristalina y posteriormente a una de gel. Una vez que se encuentran en estado de gel, los lípidos tienden a agregarse, además de volverse más permeables a los iones. Cuando los espermatozoides están alterados, los iones Na<sup>+</sup> y Ca<sup>++</sup> que entran a las células espermáticas son retirados por medio de transporte activo. A 5°C la permeabilidad al Ca<sup>++</sup> crece significativamente, superando la capacidad de eliminación de los iones por medio de las bombas de Ca<sup>++</sup>. Así el Ca<sup>++</sup> se acumula en el espermatozoide alcanzando niveles tóxicos. <sup>16</sup>

Es posible que el acrosoma sufra más, con estas alteraciones, una pérdida mayor de capacidad fecundante de la que sería esperado de la reducción de la motilidad. Los efectos del choque térmico son más evidentes en el congelamiento de semen, cuando los espermatozoides sufren alteraciones más semejantes a la capacitación y al envejecimiento. La severidad del efecto del choque térmico depende del grado de enfriamiento, intervalo entre temperaturas y la variación de

la temperatura. Estos efectos pueden ser reducidos a través del enfriamiento controlando los intervalos críticos de temperatura entre 19°C y 8°C y por medio de la adición de lípidos (yema de huevo) o proteína (leche) en el diluyente del semen. También fue sugerido que la variación de la composición y la concentración de NaCl son responsables de la variación de la tolerancia del semen de diferentes padrillos al enfriamiento y la congelación.<sup>9</sup>

Los espermatozoides de algunos padrillos parecen ser más sensibles que otros a la presencia de plasma seminal, en estos animales más sensibles, disminuye el mantenimiento de la motilidad. La centrifugación y eliminación parcial del plasma seminal beneficia a los machos cuyos eyaculados presentan baja tolerancia al enfriamiento, almacenamiento, dilución del semen y acondicionamiento de rutina.<sup>17</sup>

Esto es válido en particular para semen almacenado por más de 24h. Este procedimiento, sin embargo, no se justifica para el semen de padrillos, cuyos eyaculados toleran el enfriamiento y almacenaje usando procedimientos de rutina.<sup>18</sup>

### **Criopreservación**

La criopreservación tiene como objetivo el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad celular a temperaturas bajas. La criobiología se basa en entender los efectos de las temperaturas bajas sobre los sistemas celulares ya que el tiempo biológico es una consecuencia de determinadas reacciones bioquímicas y el frío prolonga el tiempo biológico, puesto que se hacen lentas estas reacciones. Sin embargo, este no es un proceso exento de problemas ya que puede inducir variaciones extremas en las propiedades químicas, térmicas y eléctricas las cuales pueden alterar las membranas celulares, los organelos y la delicada interacción célula-célula inherente en las células y tejidos a criopreservar (Woods, 2004).

Existen hasta el momento nuevas propuestas sobre la criopreservación de semen con diferentes tiempos de congelación, diferentes diluyentes y diferentes crioprotectores, muchas de estas técnicas en la actualidad son tan complicadas

que cada casa comercial especialmente aquellas multinacionales que distribuyen semen las consideran como verdaderos secretos industriales.<sup>13</sup>

A lo largo de 15 años de estudio él observó una marcada mejoría en la resistencia del semen de caballos al proceso de congelación y descongelación esto ocurrió con la sustitución del glicerol por crioprotectores alternativos. Alvarenga M. en 2005 también observó una disminución acentuada de la fertilidad del semen de caballos refrigerado en medios de dilución que contenía glicerol por un periodo de 2 horas. Tselutin y col. en 1999 determinó que para varios tipos de aves el glicerol también es altamente contraceptivo. Para estas especies de animales, principalmente las aves, que son sensibles al glicerol los crioprotectores a base de amidas han sido mostradas menos tóxicos y más eficientes en la capacidad de preservar el potencial de fertilización después de congelado. Recientemente estudios de laboratorio demostraron que determinado tipo de amidas posibilitan una mejor significancia de resistencia a la congelación del semen de la mayoría de los caballos principalmente considerados malos congelantes.<sup>19</sup>

### **Diluyentes**

Los diluyentes de semen contienen componentes protectores que permiten la sobrevivencia espermática fuera de tracto reproductivo. Además de esto aumentan el volumen de la dosis inseminante. Yema de huevo, leche y glicerol son los componentes más adicionados para la protección de los espermatozoides frente al descenso de temperatura. Las lipoproteínas presentes en la leche y la yema de huevo protegen a los espermatozoides del choque térmico. Substratos metabolizables como glucosa constituyen la fuente de energía para las células espermáticas. Los diluyentes deben contener sustancias con alta capacidad tampón para neutralizarlos. Los antibióticos son adicionados en forma rutinaria a los diluyentes para retardar o eliminar el crecimiento de bacterias que invariablemente contaminan el semen como consecuencia de la recolección.<sup>20</sup>

Las desventajas de estos extensores que utilizan toda la yema de huevo, atribuyen a la opacidad con gránulos formados, lo que dificulta el examen inmediato de evaluación microscópica, causando daño a la respiración de los espermatozoides.<sup>21</sup> La disminución de la motilidad también puede llevar a microorganismos patógenos.<sup>22</sup>

La supervivencia de los espermatozoides después del proceso de criopreservación requiere la solución de una ecuación multifactorial que implica variables tales como la integridad de cada compartimento de células, la membrana plasmática, acrosoma, mitocondrias, citoesqueleto, núcleo y glucocalyx.<sup>23</sup>

La evidencia indica, que de acuerdo con la caracterización bioquímica hecha por Banaszak y col., 1992, la acción protectora del óvulo utilizando diluyentes de fracciones de yema, se atribuye a las lipoproteínas de baja densidad (LDL).<sup>24</sup> LDL está compuesta de 12% de proteína, 87% de lípidos y tiene una forma esférica que mide aproximadamente 35µm. LDL es altamente soluble en medios a base de agua, debido a su baja densidad no precipita después de unas horas, proporcionando una película interfacial entre el ácido graso y el agua.<sup>25</sup> Bergerom A., y col., 2004, mostraron que el LDL promueve la incorporación de fosfolípidos de la membrana y el colesterol, y también evita la salida del fosfolípido y el colesterol de la membrana de los espermatozoides, mediante la formación de un complejo con las proteínas en el plasma seminal.<sup>24</sup>

### **Yema de huevo: componentes químicos**

La yema de huevo se compone principalmente de LDL en un 68%, lipoproteínas de alta densidad de 16%, 10% y 4% livetinas, fosvitinas ubicadas en dos fracciones fácilmente separables, gránulos y plasma. El plasma correspondiente al 78% de materia seca de yema, mientras que los gránulos representan el 22%. En la materia seca de la yema, se pueden encontrar 33% de proteínas y 63% de lípidos, divididos en triglicéridos con el 43%, colesterol 2,6% y fosfolípidos 18%, que se componen de 16% de fosfatidilcolina y 2% fosfatidiletalonamida.<sup>25 26</sup>

### **Efecto de la yema de huevo como crioprotector**

El efecto crioprotector de yema de huevo, se ha atribuido principalmente a las LDL presentes en la fracción plasmática.<sup>27</sup> Varios estudios han sustituido a la yema de huevo de los medios de refrigeración / la congelación de estas lipoproteínas.<sup>28</sup> Las obtenciones de resultados son satisfactorios en el

mantenimiento de la viabilidad del espermatozoides en varias especies domésticas.<sup>29</sup> La posibilidad de sustitución es interesante para la comercialización internacional de semen congelado, se puede eliminar el riesgo para la salud asociado con la yema de huevo, que se considera un portador potencial de patógenos.<sup>29</sup>

Además, otras ventajas del uso de LDL en sustitución de la yema de huevo son la estandarización y el dominio de los componentes presentes en extensores producidos, puesto que la composición de la proteína y la lipoproteína de yema de huevo puede variar dependiendo de la genética de alimentación y la eliminación de los componentes no deseados de la yema de huevo puede reducir la viabilidad del espermatozoides durante y después de la congelación, como es el caso de las lipoproteínas de alta densidad presentes en una porción granular.<sup>10 30</sup>

### **Métodos de extracción de las lipoproteínas de baja densidad de la yema de huevo de gallina**

Algunos métodos de extracción de lipoproteínas de baja densidad implican etapas de ultracentrifugación por gradiente de densidad, que consumen largos períodos y tienen baja tasa de recuperación, lo que les hacen poco atractivo para el uso industrial.<sup>27 31</sup> Cuyo proceso es:

- Se coloca un huevo en el separador de yema y retiramos la clara.
- Se coloca en el extremo de una servitoalla haciéndolo rodar suavemente para retirar los residuos de clara
- Se coloca las yemas de los huevos en la probeta y se mide la cantidad obtenida.
- Se realiza la dilución 1:1 con la dilución fisiológica 0,17 Molar.
- Se segrega la cantidad restante de solución salina fisiológica para recuperar los residuos de yema que quedan en la probeta.
- Se coloca la dilución en un vaso precipitado y se cubre con papel aluminio.
- Se lleva al cuarto frío donde se homogeniza en el agitador magnético por una hora.
- Se llena los tubos de la centrifuga con la misma cantidad de yema de huevo y se sella con parafilm.

- Se centrifuga a 13000 rpm a 1000 gravedades con 4°C en 45 minutos.
- Se retira los tubos de la centrifuga y se coloca en hielo frappé.
- Recuperando el sobrenadante en un vaso de precipitado se coloca en el agitador magnético en el cuarto frio por 15 minutos.
- De nuevo se realiza la centrifugación el sobrenadante a 13000 rpm a 1000 gravedades con 4°C en 45 minutos.
- Se recupera el sobrenadante en un vaso de precipitado sellando con papel aluminio y se coloca en el agitador magnético en una cama de hielo frappé.
- Calibra el potenciómetro con agua desionizada luego secar.
- Introducir el potenciómetro en el sobrenadante y se ajusta el pH a 8.7 con hidróxido de Sodio.
- Se realiza una dilución 1:1 con el Sulfato de Amonio para obtener una solución Sulfurada de amonio al 50%.
- El sulfato de amonio se agrega lentamente con ayuda de una venocllisis y el pH se mantiene a 8,7 agregando hidróxido de sódio.
- Se lleva la dilución al cuarto frio y se homogeniza durante una hora.
- Se centrifuga con 13000 rpm a 1000 gravedades con 4°C en 45 minutos.
- Se coloca las bolsas de diálisis para que se hidraten y después se realiza el enjuague con agua desionizada.
- Transcurridos los 45 minutos, se retira los tubos de la centrifuga y se recupera el sobrenadante.
- Se coloca en las bolsas de diálisis con aire dentro de ellas sellandolas con pinzas.
- Se introduce las bolsas en una cubeta con agua desionizada, la cual esta con una bomba para mantener el agua circulando.
- La cubeta se deja en el cuarto frio cubierta de papel aluminio, para evitar que las superficies de las bolsas de diálisis se resequen.
- El agua desionizada de la cubeta se cambia cada 2 o 3 horas evaluando el color del contenido que pasa de turbio a traslucido lo que indica que se há eliminado el sulfato de amonio, (aprox dos días).
- Recuperacion el contenido de las bolsas de diálisis.

- Centrifugamos a 13000 rpm a 1000 gravedades con 4°C en 45 minutos.<sup>32</sup>

## **Congelación de semen usando las lipoproteínas de baja densidad para sustituir la yema de huevo**

Las primeras pruebas utilizando yema de huevo fraccionado mostraron que la porción rica en lipoproteínas de baja densidad fue más eficiente en las porciones de espermatozoides que la conservación en otras proteínas tales como livetinas, fosvitinas y lipoproteínas de alta densidad. A partir de ahí, varias hipótesis se formularon con el fin de tratar de aclarar el posible mecanismo de acción de las lipoproteínas de baja densidad.<sup>24 27 28 33</sup> Al mismo tiempo, había preocupación en la determinación de la concentración ideal de lipoproteínas para la adición en el medio más delgado, con el fin de garantizar el éxito de la técnica de congelación y descongelación de semen.

Se encontró que las concentraciones superiores a 10% pueden ser perjudiciales para los espermatozoides, presumiblemente debido a la mayor presión osmótica.<sup>29</sup>

Recientemente, varios estudios han demostrado que la sustitución de la yema de huevo en extensores con lipoproteínas de baja densidad (LDL) mejorada motilidad, integridad de la membrana, y la capacidad de fertilización del espermatozoides congelado de varias especies en comparación con el uso de extensores comerciales que contienen yema total de huevos.<sup>29</sup>

Se ha sugerido que los fosfolípidos presentes en LDL protegen los espermatozoides mediante la formación de una película en la interfase entre los ácidos grasos y de agua, que conduce a la estabilización física de la membrana. También se ha indicado que el LDL se adhiere a la membrana de los espermatozoides causando afluencia de fosfolípidos en la membrana.<sup>25 28</sup>

## **2.2.- Antecedentes de investigación**

### **2.2.1.- Revisiones de tesis universitarias**

En la revisión bibliográfica de antecedentes de investigación no se encontró reportes respecto al tema a tratar en la presente investigación, por lo que analizamos en siguiente reporte.

Restrepo G. y col.<sup>34</sup>, en el artículo de **“EVALUACIÓN DE DOS DILUYENTES PARA LA CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN DE CABALLOS DE LA RAZA CRIOLLO COLOMBIANO”** se reporta que: La composición de los diluyentes para la criopreservación del semen equino es determinante en la criotolerancia y la capacidad fecundante post-descongelación de las células espermáticas.

Objetivo. Evaluar dos diluyentes para la congelación de semen de caballos de la raza criollo colombiano. Materiales y métodos. El semen de cuatro caballos de la raza criollo colombiano fue criopreservado mediante un protocolo de congelación rápida con los diluyentes Equipro® y Gent®. La evaluación de la movilidad del semen posdescongelación se realizó mediante un sistema de análisis computarizado de clase (SCA®), con el cual se analizaron la movilidad total (MT), la movilidad progresiva (MP), la velocidad curvilínea (VCL), la velocidad lineal (VSL) y la velocidad media (VAP). La vitalidad espermática (VE) y la morfología normal (MN) se evaluaron mediante tinción con eosina-nigrosina; la integridad de la membrana plasmática se determinó mediante la prueba hipo-osmótica (HOS). Para la evaluación estadística se ajustaron modelos lineales generalizados (GLM) y las medias entre los tratamientos se compararon por la prueba de Tukey.

Las asociaciones entre las variables estudiadas se evaluaron mediante un análisis de correlación de Pearson. Resultados. Se halló diferencia estadística significativa ( $P \leq 0.05$ ) para la MT con medias de  $50.9 \% \pm 19.4 \%$  y  $42.2 \% \pm 15.1 \%$ , para Equipro® y Gent®, respectivamente. A excepción de la VSL no se encontró diferencia entre los demás parámetros evaluados. Se encontró una alta correlación entre los parámetros de movilidad, vitalidad e integridad de membrana.<sup>34</sup>

Lozano B. y col.<sup>35</sup>, realizaron un artículo sobre: **“EFECTO DE LA ADICIÓN DE PLASMA SEMINAL EN EL SEMEN EQUINO DESCONGELADO”** donde el resumen consta de Antecedentes y objetivos: El semen criopreservado ofrece beneficios adicionales no presentes en el semen refrigerado. Sin embargo, varios factores afectan al éxito en la inseminación artificial con semen congelado de caballos. El objetivo del trabajo es evaluar si la adición de plasma seminal a

diferentes concentraciones, sobre espermatozoides equinos descongelados, afecta a la motilidad espermática, viabilidad y a nivel de membrana. Material y métodos: Se utilizaron diferentes razas, cuatro sementales de silla, y dos sementales de tiro. En un primer experimento el semen descongelado se centrifugó, mientras en el segundo no se centrifugó. A continuación, se adicionó el plasma seminal al 10, 20, 30% suspendido en solución tampón fosfato y plasma seminal puro (100%).

Resultados: En los caballos de silla el plasma seminal no afectó a los parámetros estudiados ( $p > 0,05$ ), pero se apreció un posible efecto tóxico del plasma seminal puro sobre las características espermáticas. En las muestras con plasma seminal de los caballos de tiro, se observaron unos índices mejores en espermatozoides vivos con acrosoma intacto que en las muestras control. Asimismo se obtuvo un porcentaje menor en espermatozoides reaccionados que en las muestras control, encontrando en esta categoría una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ). Conclusiones: La incubación de los espermatozoides descongelados con plasma seminal puede frenar la reacción acrosómica, reflejado este hecho, en los bajos porcentajes de espermatozoides que han sufrido la verdadera reacción acrosómica.<sup>35</sup>

Vaz, M.,<sup>36</sup> en su trabajo de investigación: “**USO DE LIPOPROTEINAS DE BAJA DENSIDAD Y DE YEMA DE HUEVO EN LA PRESERVACION DE SEMEN ASNAL REFRIGERADO A 6°C**” Plantearon como objetivo evaluar el esperma asnal frío mantenido en diferentes diluyentes. Fueron utilizados en este experimento seis asnos de la raza PEGA. El semen se diluyó 1: 3 en extensores: D1 - Botusêmen®; D2 - Botusêmen® + 10% de yema de huevo; D3 - Botusêmen® + 10% de yema de huevo, se centrifugaron a 800 X g durante 15 minutos; D4 - Botusêmen® + 6,8% LDL. Cada muestra de semen diluido fue sometido a enfriamiento curva 0,65°C / min para llegar a 5 ° C. Fue transportado y guardado en un refrigerador comercial a 6 ° C durante tres días. Se utilizó el sistema computarizado CASA (análisis de esperma asistido por ordenador) para evaluar las características del semen de cada período de enfriamiento de 24 horas. El dilutivo 3 (Botusêmen + yema de huevo - se centrifuga) sobre otros extendedores estudió la conservación de características de los espermatozoides, la medida en que aumenta el tiempo de almacenamiento, destacando principalmente en el porcentaje

de espermatozoides con movimiento de desplazamiento de velocidad rápida y curvilínea y la velocidad de desplazamiento rectilíneo. <sup>36</sup>

M.M. Neves, y M. Henry <sup>37</sup> con la investigación titulada: **“YEMA DE HUEVO DE GALLINA Y LA ACCION PROTECTORA Y LA ACCION DE SUS LIPOPROTEINAS DE BAJA DENSIDAD EN LA CRIOPRESERVACION DE SEMEN”**, analizaron que la yema de huevo se ha utilizado en biotecnología de la reproducción como un ingrediente esencial en extensores de refrigeración y congelación de espermatozoides en varias especies domésticas. La yema se forma por las lipoproteínas, y livetinas fosvitinas, que se encuentran en dos fracciones fácilmente separables por el método de centrifugación: el gránulo y plasma. Se cree que las lipoproteínas de baja densidad presentes en el plasma, es responsable de su acción crioprotectora. Esta revisión se centra en la composición química de huevo de gallina y su yema muestran cronológicamente, como el desarrollo de hipótesis existentes sobre su mecanismo de acción en la congelación de semen. <sup>37</sup>.

Ávila, L.; Bacter, J. <sup>38</sup> En un artículo de revisión sobre **“FUNDAMENTOS DE CRIOPRESERVACIÓN”**, donde reportan que: El entender y aplicar adecuadamente la criopreservación de material biológico es fundamental en laboratorios y bancos de células. Sin embargo aunque se han implementado protocolos para criopreservación, aún no se tienen los ideales en la mayoría de los casos. El objetivo de esta revisión es dar a conocer ciertos parámetros inherentes al proceso de criopreservación y la importancia de conocer ciertas características de la célula que pueden incidir con la viabilidad del producto congelado para lograr la técnica adecuada. Para alcanzar este propósito, el documento se basará en el conocimiento de las propiedades fisicoquímicas de la célula y/o el tejido, pues este proceso es afectado por diferentes variables como permeabilidad celular, volumen osmóticamente inactivo y relación superficie/área de la célula, la cual es variable de acuerdo a la especie, tipo y estadio de la célula a congelar. La estructura y composición de las membranas plasmáticas determinan los principales eventos celulares que tienen lugar durante los procesos de criopreservación; las bajas temperaturas afectan la difusión y ósmosis a través de las membranas y cada célula maneja su propio perfil biofísico el cual interactúa con diferentes criopreservantes

celulares. El hallar el protocolo adecuado será lo que garantice la viabilidad y  
funcionabilidad celular. <sup>38</sup>



### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1.- Materiales

##### 3.1.1.- Localización del trabajo

###### a.- Localización espacial

La toma de muestras en campo se realizó en la localidad de Yumina, distrito de Sabandia, región de Arequipa, el trabajo de gabinete se realizó en el laboratorio de investigación en Biotecnología Animal de la Universidad Católica de Santa María, geográficamente ubicado en: Latitud Sur:  $16^{\circ} 23' 55,19''$ , longitud Oeste:  $71^{\circ} 3' 12,81''$ . Altitud: 2328, msnm con una temperatura promedio de  $15,8^{\circ}\text{C}$  con una variabilidad de  $8,2^{\circ}\text{C}$  a  $25,6^{\circ}\text{C}$ , con una humedad relativa mayor a 27% y menor a 70% y una precipitación promedio de 78 mm.<sup>39</sup>

###### b.- Localización temporal

La investigación se desarrolló en Abril del 2017 a Diciembre del 2017 para el desarrollo del trabajo de gabinete y de campo.

##### 3.1.2.- Materiales biológicos

- Semen fresco colectado mediante vagina artificial de garañones de la raza Caballo Peruano de Paso.
- Huevos de gallinas de crianza de Campo.

##### 3.1.3.- Materiales de laboratorio

###### Reactivos

- Solución salina fisiológica al 0,7 molar: (9.93g de ClNa aforar con agua destilada)
- Sulfato de Amonio: (76g de Sulfato de Amonio en 100ml de agua desionizada)
- Agua desionizada

- Tinción Eosina- nigrosina
- Hidróxido de sodio
- Nitrógeno líquido
- Hielo frappe
- Alcohol polivinílico
- Solución fisiológica temperada
- Dilutor de semen Botucurio® BotuPharma
- Dilutor de semen Equipro ® Minitube. Alemania
- Solución salina formolada al 0.3%
- Glutaraldeido

### **Materiales de colección y evaluación**

- Termómetro.
- Pipetas Pasteur
- Micropipetas
- Crioviales (1,5, 2 y 5 ml).
- Bureta de titulación
- Venoclisis
- Pinzas
- Papel parafilm
- Tips
- Porta y cubreobjetos
- Hielo
- Bolsas de diálisis
- Tubos Falcon de 50 ml
- Sistema de Sifonaje
- Peine para burbuja de aire de pajillas
- Termo para descongelación de semen
- Pinza para pajillas
- Cortador de pajillas
- Cámara de Burker
- servitoalla toalla
- Rampa de congelamiento de pajillas

- Caja de tecnophor para humeo de pajillas
- Cronometro
- Papel aluminio
- Vaso precipitado
- Cubeta
- Jeringas de 1cc

#### 3.1.4.- Materiales de campo

- Anexos
- Cámara digital
- Vagina artificial tipo colorado para equinos
- Termómetro
- cubeta
- Filtro para semen
- Lubricante para semen no espermicida
- Bolsa willpack
- Bolsa de diálisis
- Pajuelas de 0,5 cc
- POE'S

#### 3.1.5.- Equipos y maquinaria

- Microscópio óptico a 4, 10, 40 y 100x
- Agitador magnético
- Microscópio de contraste de fases.
- Equipo de baño María Húmedo
- Termoplatina
- Centrifuga de semen para tubos de 50 cc
- Refrigeradora.
- Equipo de cómputo portátil

### 3.1.6.- Material de escritorio y Redacción

- Material de escritorio
- Equipo de cómputo
- Materiales de impresión

### 3.2.- Métodos:

#### 3.2.1.- Muestreo

- Universo

Se trabajó con cuatro sementales de la raza Caballo Peruano de Paso del criadero bajo estudio.

- Tamaño de muestras:

La muestra estuvo constituida por los mismos cuatro animales que conforman el universo, la colecta de semen se realizó en 5 repeticiones.

Cada colecta fue dividida en 2 tratamientos, totalizando 10 unidades experimentales dando como resultado 40 muestras de semen a evaluar.

- Procedimiento de muestreo

Mediante un muestreo aleatorio simple se asignó las muestras para el tratamiento respectivo.

**Cuadro N° 3: Unidades experimentales de estudio**

	Padrillo 1		Padrillo 2		Padrillo 3		Padrillo 4	
Repeticiones	1	2	1	2	1	2	1	2
Tratamientos								
<b>1</b>	C. con YH1	C. con LDL 1	C. con YH1	C. con LDL 1	C. con YH1	C. con LDL 1	C. con YH1	C. con LDL 1
<b>2</b>	C. con YH2	C. con LDL 2	C. con YH2	C. con LDL 2	C. con YH2	C. con LDL 2	C. con YH2	C. con LDL 2
<b>3</b>	C. con YH3	C. con LDL 3	C. con YH3	C. con LDL 3	C. con YH3	C. con LDL 3	C. con YH3	C. con LDL 3
<b>4</b>	C. con YH4	C. con LDL 4	C. con YH4	C. con LDL 4	C. con YH4	C. con LDL 4	C. con YH4	C. con LDL 4
<b>5</b>	C. con YH5	C. con LDL 5	C. con YH5	C. con LDL 5	C. con YH5	C. con LDL 5	C. con YH5	C. con LDL 5

C: crioprotector  
YH: yema de huevo

### 3.2.2.- Métodos de evaluación

#### a.- Metodología de la experimentación

##### EXTRACCIÓN DE LDL

- Se colocó un huevo en el separador de yema y retiramos la clara.
- Se colocó en el extremo de una servitoalla haciéndolo rodar suavemente para retirar los residuos de clara
- Se colocó las yemas de los huevos en la probeta y se midió la cantidad obtenida.
- Se realizó la dilución 1:1 con la dilución fisiológica 0,17 Molar.
- Se agregó la cantidad restante de solución salina fisiológica para recuperar los residuos de yema que quedaron en la probeta.
- Se colocó la dilución en un vaso precipitado y cubrimos con papel aluminio.
- Se llevó al cuarto frío donde se homogenizó en el agitador magnético en una hora.

- Se llenó los tubos de la centrifuga con la misma cantidad de yema de huevo y sellamos con parafilm.
- Centrifugamos a 13000 rpm a 1000 gravedades con 4°C en 45 minutos.
- Se retiró los tubos de la centrifuga y se colocó en hielo frappé.
- Se recuperó el sobrenadante en un vaso de precipitado y colocamos en el agitador magnético en el cuarto frio por 15 minutos.
- Se centrifugó el sobrenadante a 13000 rpm a 1000 gravedades con 4°C en 45 minutos.
- Se recuperó el sobrenadante en un vaso de precipitado sellando con papel aluminio y se colocó en el agitador magnético en una cama de hielo frappé.
- Se calibró el potenciómetro con agua desionizada y secar.
- Se introdujo el potenciómetro en el sobrenadante y se ajustó el pH a 8,7 con hidróxido de Sodio.
- Se realizó una dilución 1:1 con el Sulfato de Amonio para obtener una solución Sulfurada de amonio al 50%.
- El sulfato de amonio se agregó lentamente con ayuda de una venocllisis y el pH se mantuvo a 8,7 agregando hidróxido de sódio.
- Se llevó la dilución al cuarto frio y se homogenizó durante una hora.
- Se centrifugó a 13000 rpm a 1000 gravedades con 4°C en 45 minutos.
- Se colocó las bolsas de diálisis para que se hidraten y después las enjuagamos en agua desionizada.
- Transcurridos los 45 minutos, se retiró los tubos de la centrifuga y se recuperó el sobrenadante.
- Se colocó en las bolsas de diálisis con aire dentro de ellas y las cerramos con pinzas.
- Se introdujo las bolsas en una cubeta con agua desionizada, la cual estaba con una bomba para mantener el agua circulando, las bolsas estaban flotando.

- La cubeta se dejó en el cuarto frío cubierta de papel aluminio, para evitar que las superficies de las bolsas de diálisis se resequen.
- El agua desionizada de la cubeta se cambió cada 2 ó 3 horas evaluando el color del contenido que paso de turbio a translucido lo que indicó que se ha eliminado el sulfato de amonio, (aprox dos días).
- Se recuperó el contenido de las bolsas de diálisis.
- Se centrifugó a 13000 rpm a 1000 gravedades con 4°C en 45 minutos.<sup>32</sup>

### COLECCION DE SEMEN

- Para la recolección del semen fue necesario la presencia de una yegua en celo.
- Las yeguas fueron debidamente aseguradas por medio de trabones.
- Una vez que el equipamiento para evaluación macroscópica, manipulación del semen (baño María, platina térmica), la yegua en celo y la vagina artificial montada estuvieron preparados, el reproductor fue conducido al lugar de la recolección que en este caso es al aire libre.
- Cuando el semental salto, el operador con la vagina artificial se aproximó, tomando el pene y desviándolo con la mano.
- Para la desviación fue importante dirigir la mano sobre el pene y desviarlo ligeramente, sin fijarlo, porque se podrían interrumpir los reflejos de la cópula; además, la válvula de la vagina artificial fue removida y se retiró una parte del agua.
- La válvula se volvió a poner nuevamente y fue mantenida abierta, de esta forma se obtuvo el eyaculado en el tubo colector.<sup>40</sup>

## EVALUACIÓN MACROSCÓPICA DEL SEMEN

### Aspecto y coloración del semen

- Después de la separación del gel el aspecto del semen fue evaluado, teniendo en cuenta como base su coloración y consistencia.
- La coloración del semen varía de gris cenizo a blanco y la consistencia varia de acuoso a lechoso.
- El aspecto del semen da una idea de la concentración espermática. Cuanto más blanco lechoso, mayor es su concentración.<sup>12</sup>

### pH del semen

- Una vez evaluado el aspecto se procedió a realizar la medición de los valores de pH.
- La medición en este caso se llevó a cabo con cintas indicadoras de pH, para esto, se introdujo la cinta indicadora de pH, dentro del semen fresco hasta que la cinta quedó completamente humedecida.
- Se comparó el color que tomo la cinta, con los colores encontrados en la tabla que indican los valores de pH. El pH se determinó inmediatamente después de la recolección por que el reposo genera la formación de ácido láctico.<sup>12</sup>

## EVALUACIÓN MICROSCÓPICA DEL SEMEN

### Motilidad:

- En cuanto al examen microscópico de la muestra, el primer parámetro que se evaluó fue la motilidad.
- Dicho parámetro se determinó inmediatamente después de la colección debido a que la demora disminuye la motilidad espermática.

- La motilidad espermática progresiva fue estimada mediante el método visual, subjetivo.
- Para la motilidad se colocaron 2 pequeñas gotas de semen puro homogeneizado sobre una lámina portaobjetos limpia y recalentada en platina térmica.
- Se cubrió con lámina cubreobjetos.
- La motilidad se determinó con un aumento de 100X, observando varios campos de cada gota.
- Se expresó el resultado en porcentaje.<sup>12</sup>
- El movimiento de los espermatozoides es Reotactico. El espermatozoide adquiere una velocidad del movimiento de progresión en promedio óptimo de 5 mm por minuto en el equino.<sup>6</sup>

**Cuadro N° 4: Valores de motilidad del espermatozoide.**<sup>12</sup>

MOTILIDAD PROGRESIVA	PORCENTAJE
Muy bueno	80-100%
Bueno	60-79%
Regular	40-59%
Malo	<40%.

**Concentración:**

- La concentración se determinó mediante la solución 2,5 ml de solución salina formolada y 50 µl de semen. La lectura se realizó mediante la cámara de Burker.<sup>12</sup> Para realizar la lectura nos guiamos de la hoja POE (anexo) que es de igual forma para semen fresco y descongelado.

### Viabilidad:

- La viabilidad se determinó mediante 5µl de semen y 5 µl de solución de Eosina Nigrosina sobre un portaobjetos precalentado a 37°C y luego de 15 a 20 seg., realizar el frotis. <sup>12</sup>

### EVALUACIÓN FUNCIONAL

- Se colocó en un tubo de ensayo 125 µ de solución de HOST a 37°C y 12,5µ de semen.
- Se incubó a 37°C durante 10 minutos.
- Se detuvo la reacción agregando 25 µ de solución de HOST Formol.
- Se colocó entre porta y cubreobjetos 5 µ de la muestra.
- Se observó con microscopio de contraste de fase a 400 aumentos. <sup>41</sup>

### CONGELACIÓN DE PAJUELAS

- Centrifugar a 2250 rpm el tubo falcon que contienen el semen con el Dilutor de transporte durante 12 minutos.
- Se retiró el sobrenadante y se agregó el Butocrio que fue descongelado 12 horas antes.
- Se realizó la evaluación microscópica
- Rotulado de pajillas
- Empajillar:
  - ✓ Se retiró la cámara de aire
  - ✓ Se selló con alcohol polivinílico.
  - ✓ Luego se selló con agua
- Estabilización en refrigeración por 20 minutos hasta 5 °C.
- Se preparó de la caja de tecnopor con marcado de la altura para el nitrógeno líquido 4 cc y la altura de la rampa de pajillas.

- Se ordenó las pajillas en la rampa de congelación
- Humeo en nitrógeno líquido por 12- 18 minutos.<sup>29</sup>
- Se retiró las pajillas de la parrilla y se colocó en contacto directo con el nitrógeno líquido.
- Se sacó las pajillas con pinza colocándolas en globers para conservarlas en el tanque con nitrógeno líquido a -196°C.

## EVALUACIÓN SEMINAL POS CRIOPRESERVACION

- Se preparó del baño maría a 37 °C
- Se descongeló por 30 segundos
- Se sacó la pajilla y volteamos para cortar debajo de burbuja de aire
- Corte de la pajilla
- Se evaluó microscópicamente: motilidad, concentración, morfología
- Funcionalmente: pruebas hiposmótica y tinción no fluorescente<sup>29</sup>
- Evaluación se realizó de acuerdo a los POE'S establecidos.<sup>41</sup>

### b.- Recopilación de la información

- **En el campo**  
Se obtuvo la muestra de semen mediante vagina artificial en caballos peruano de paso.
- **En el laboratorio**  
Se realizó la evaluación macroscópica, microscópica y funcional de las muestras de semen colectadas en campo. (POE).

➤ **En la biblioteca**

Revisión bibliográfica de libros, tratados y revistas del tema en mención

➤ **En otros ambientes generadores de la información científica**

Se consultó con expertos en el tema, revisión de páginas web, revistas indexadas y otros.

**3.2.3.- Variables de respuesta**

**Cuadro Nº 5: Operalización de Variables**

	<b>VARIABLES</b>	<b>INDICADOR</b>	<b>SUBINDICADOR</b>
<b>INDEPENDIENTE</b>	Semen fresco de equino	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Macroscópico</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Color, aspecto</li> <li>• Olor.</li> <li>• Volumen.</li> <li>• Ph.</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Microscópico</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Motilidad</li> <li>• viabilidad</li> <li>• Concentración</li> <li>• Morfología</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Funcional</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• HOST</li> </ul>
<b>DEPENDIENTE</b>	Calidad de semen criopreservado	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Semen criopreservado con yema de huevo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Motilidad</li> <li>• Viabilidad</li> <li>• Concentración</li> <li>• Morfología</li> <li>• Funcionabilidad</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Semen criopreservado con LDL</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Motilidad</li> <li>• Concentración</li> <li>• Morfología</li> <li>• Funcionabilidad</li> </ul>

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 4.1.- Cuadros de resultados

En el cuadro N° 6, se muestra la comparación de los crioprotectores no penetrantes conjunto con los datos obtenidos de la evaluación del semen criopreservado de 0 horas.

**Cuadro N° 6: Motilidad espermática usando LDL y yema de huevo a las 0 horas**

Motilidad 0hrs	Crioprotectores	
	LDL	Yema de huevo
Media	48.95	27.5
Desviación estándar	3.720	8.243
Mínimo	40	10
Máximo	55	42
N	20	20

t=10.60

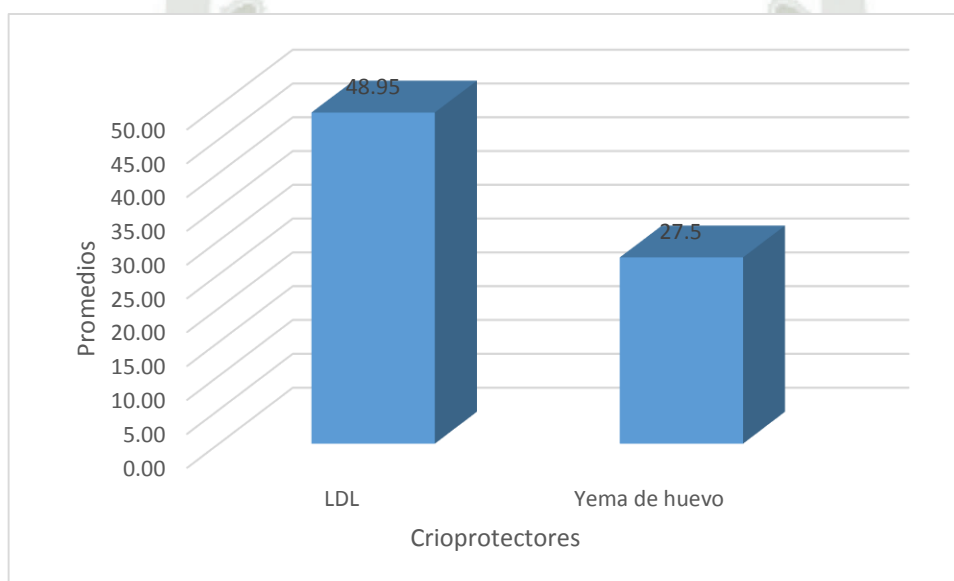
P<0.05

En la cuadro N°6 se observa el resultado de 48.95 % de motilidad con el crioprotector de proteína de baja densidad de yema de huevo de gallina (LDL) a las 0 horas versus a 27.5% de motilidad con el crioprotector de yema de huevo de gallina a las 0 horas. Porcentualmente se visualiza una mayor motilidad con el crioprotector de proteína de baja densidad de yema de huevo de gallina (LDL), lo que afirma que dicho crioprotector (LDL) contribuye a mantener mayor motilidad espermática.

Según la t de student, muestra que la motilidad espermática a la 0 horas con los crioprotectores LDL y la yema de huevo presento diferencias estadísticas significativas (P<0.05).

Los datos del Cuadro N° 6 se ven expresados en el gráfico N° 1, la cual muestra comparación de las de los crioprotectores no penetrantes conjunto con el porcentaje de motilidad espermática obtenidos de la evaluación del semen criopreservado.

**Gráfico N° 1:**  
**Motilidad espermática usando LDL y yema de huevo a las 0 horas**



En el gráfico N° 1, se muestra que la motilidad espermática con el crioprotector LDL fue de 48.95% y con la yema de huevo fue de 27.5%.

La motilidad del semen presenta una correlación escasa con la fertilidad, tanto con el empleo de semen fresco como descongelado.<sup>42</sup> Nuestro resultado obtenido de la muestra con LDL, comparando con el de Squieres (2004) que utilizó como diluyente la metilformamida, quien obtuvo una motilidad de 38% a las 0 horas, el resultado de Restrepo (2014) en la motilidad fue de 42.2% utilizando Gent® como diluyente para criopreservación, el cual contiene entre su composición el glicerol. Nuestros resultados fueron mayores probablemente por el aislamiento de (LDL) de la yema de huevo de gallina, ya que las LDL están libres de patógenos a comparación de la yema de huevo.

En el cuadro N° 7, se muestra la comparación de los crioprotectores no penetrantes conjunto con los datos obtenidos de la evaluación de motilidad espermática del semen criopreservado a los 20 minutos.

**Cuadro N° 7: Motilidad espermática usando LDL y yema de huevo a los 20 minutos**

Motilidad 20 min	Grupo	
	LDL	Yema de huevo
Media	38.2	19.3
Desviación estándar	5.247	6.122
Mínimo	30	10
Máximo	45	30
N	20	20

t=10.48

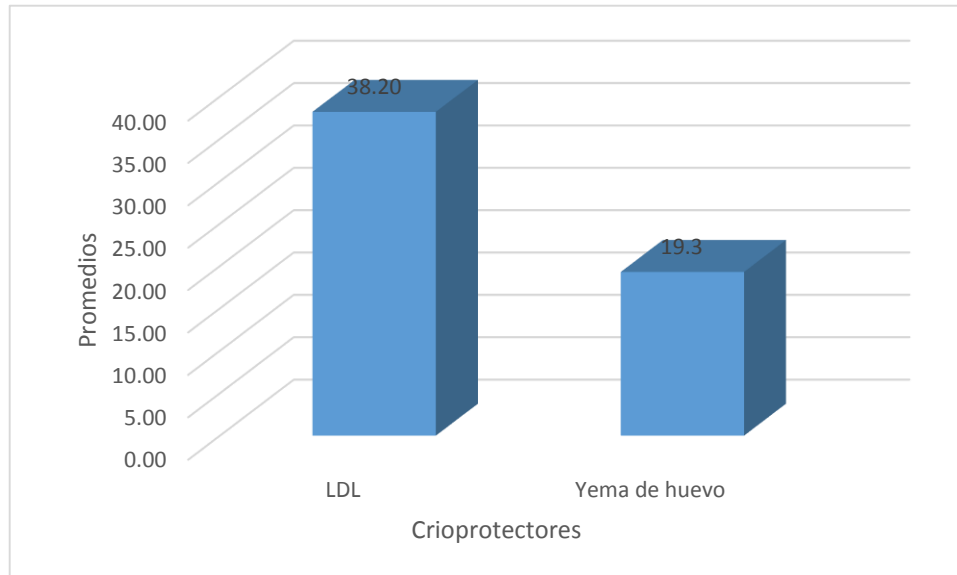
P<0.05

En el cuadro N°7 se observa el resultado de 38.2% de motilidad con el crioprotector de proteína de baja densidad de yema de huevo de gallina a los 20 minutos versus a 19.3% de motilidad con el crioprotector de yema de huevo entera a los 20 minutos.

Según la t de student, muestra que la motilidad espermática a la 2 horas con los crioprotectores LDL y la yema de huevo presento diferencias estadísticas significativas (P<0.05).

Los datos del Cuadro N° 7 se ven expresados en el gráfico N° 2, la cual muestra comparación de las de los crioprotectores no penetrantes conjunto con el porcentaje de motilidad espermática obtenidos de la evaluación del semen criopreservado a los 20 minutos.

**Gráfico N° 2: Motilidad espermática usando LDL y yema de huevo a los 20 minutos**



Asimismo se muestra que la motilidad espermática con el crioprotector LDL fue de 38.2% y con la yema de huevo fue de 19.3%.

Comparando nuestro resultado de LDL con el de Squieres (2004),<sup>42</sup> que utilizó como diluyente el etilenglicol obtuvo una motilidad de 35% a los 20 minutos. Nuestros resultados son mayores, pero sin mostrar mucha diferencia entre ambos resultados, probablemente porque los espermatozoides de equino son muy sensibles a la temperatura y después de ser descongelados con el transcurso del tiempo la motilidad es cada vez menos. Se podría decir que en esta variable, los crioprotectores no influyen tanto como el tiempo después de descongelar las pajillas a evaluar.

En el cuadro N° 8, se muestra la comparación de los crioprotectores no penetrantes conjunto con los datos obtenidos de la evaluación de motilidad progresiva del semen criopreservado.

**Cuadro N°. 8: Motilidad espermática progresiva usando LDL y yema de huevo**

Motilidad progresiva	Grupo	
	LDL	Yema de huevo
Media	38.35	21.5
Desviación estándar	3.543	5.862
Mínimo	29	10
Máximo	45	37
N	20	20

t=11

P<0.05

En el cuadro N°8 se observa el resultado de 38.35% de motilidad progresiva con el crioprotector de proteína de baja densidad de yema de huevo de gallina versus a 21.5% de motilidad progresiva con el crioprotector de yema de huevo entera.

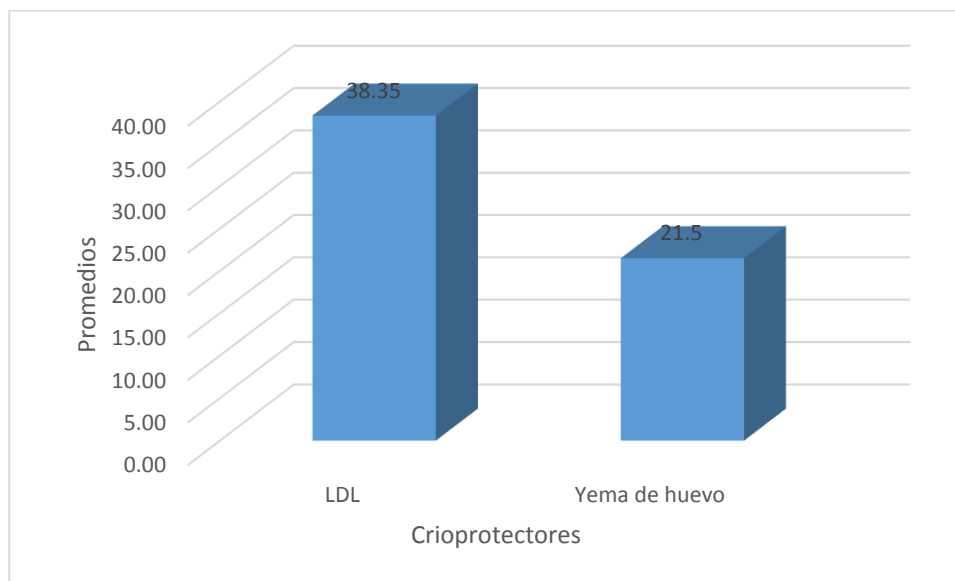
Porcentualmente se visualiza una mayor motilidad progresiva con el crioprotector de proteína de baja densidad de yema de huevo de gallina, lo que afirma que dicho crioprotector (LDL) mantiene una mejor motilidad espermática progresiva a comparación del crioprotector de yema de huevo.

Según la t de student muestra que la motilidad espermática progresiva con los crioprotectores LDL y la yema de huevo presento diferencias estadísticas significativas (P<0.05).

Los datos del Cuadro N° 8 se ven expresados en el gráfico N° 3, la cual muestra comparación de las de los crioprotectores no penetrantes conjunto con el

porcentaje de motilidad espermática progresiva obtenidos de la evaluación del semen criopreservado.

**Gráfico N° 3: Motilidad espermática progresiva usando LDL y yema de huevo**



Asimismo se muestra que la motilidad espermática progresiva con el crioprotector LDL fue 38.35% y con la yema de huevo fue de 21.5%

Comparando nuestro resultado que obtuvimos con LDL con el de Squieres (2004)<sup>42</sup> que utilizó como diluyente el Dimetilformamida con yema de huevo obtuvo una motilidad progresiva de 24%. Por otro lado, Restrepo y col. (2014)<sup>34</sup> obtuvo una motilidad progresiva de 23.6% con el dilutor que contenía glicerol. Nuestro resultado es mayor, probablemente a que las LDL es un crioprotector no penetrante en cambio las utilizadas por los autores mencionados son penetrantes, lo que da lugar a una mayor probabilidad de daño celular.

En el cuadro N° 9, se muestra la comparación de los crioprotectores no penetrantes conjunto con los datos obtenidos de la evaluación de espermatozoides vivos del semen criopreservado.

**Cuadro N°. 9: Espermatozoides vivos usando LDL y yema de huevo**

Espermatozoides vivos	Grupo	
	LDL	Yema de huevo
Media	45.9	31.7
Desviación estándar	8.783	10.916
Mínimo	30	15
Máximo	62	58
N	20	20

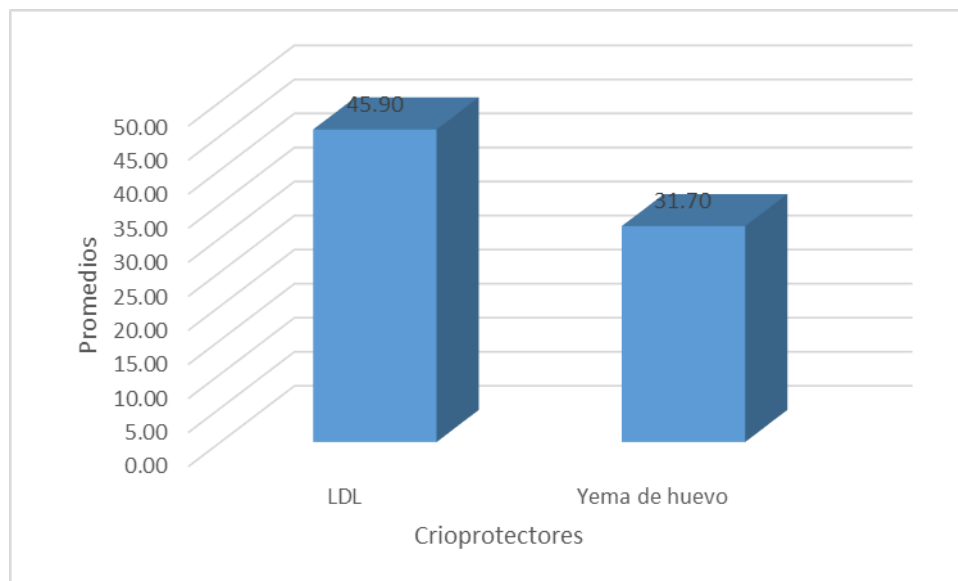
t=4.53

P<0.05

En el cuadro N°9 se observa el resultado de 45,9% de espermatozoides vivos con el crioprotector de proteína de baja densidad de yema de huevo de gallina versus a 31,70% de espermatozoides vivos con el crioprotector de yema de huevo entera. Porcentualmente se visualiza un mayor número de espermatozoides vivos con el crioprotector de proteína de baja densidad de yema de huevo de gallina.

Según la t de student, muestra que el promedio de espermatozoides vivos con los crioprotectores LDL y la yema de huevo presento diferencias estadísticas significativas (P<0.05).

Los datos del Cuadro N° 9 se ven expresados en el gráfico N° 4, la cual muestra comparación de las de los crioprotectores no penetrantes conjunto con los datos de espermatozoides vivos obtenidos de la evaluación del semen criopreservado.

**Gráfico N° 4: Espermatozoides vivos usando LDL y yema de huevo**

Asimismo se muestra que el promedio de espermatozoides vivos con el crioprotector LDL fue de 45.90% y con la yema de huevo fue de 31.70%.

Es importante señalar que, existe un alto grado de variabilidad en la calidad del semen entre los machos e incluso entre los eyaculados de un mismo animal.<sup>11</sup> como también en resistir los procesos de congelación-descongelación, en términos de supervivencia de los espermatozoides después de la descongelación.<sup>12</sup>

Comparando nuestros resultados con LDL con Squieres (2004) ,<sup>42</sup> quien obtuvo una vitalidad de 33% con dimetilformamida. Restrepo y col (2014) <sup>34</sup> obtuvieron con el dilutor de Glicerol una viabilidad de 53.8%. Nuestro resultado es mayor que el de Squieres (2004) y menor que de Restrepo y col. (2014) probablemente a que el (LDL) está libre de lipoproteínas de alta densidad el cual reduce la viabilidad de los espermatozoides.<sup>10 30</sup> También se pueden considerar factores como el manejo de la muestra a evaluar después de descongelado, la temperatura, y la tinción utilizada.

En el cuadro N° 10, se muestra la comparación de los crioprotectores no penetrantes conjunto con los datos obtenidos de la evaluación de espermatozoides con membrana funcional del semen criopreservado.

**Cuadro N°. 10: Espermatozoides con membrana funcional usando LDL y yema de huevo**

Espermatozoides con membrana Funcional	Grupo	
	LDL	Yema de huevo
Media	59.3	41.6
Desviación estándar	12.819	12.617
Mínimo	40	22
Máximo	84	70
N	20	20

t=4.40

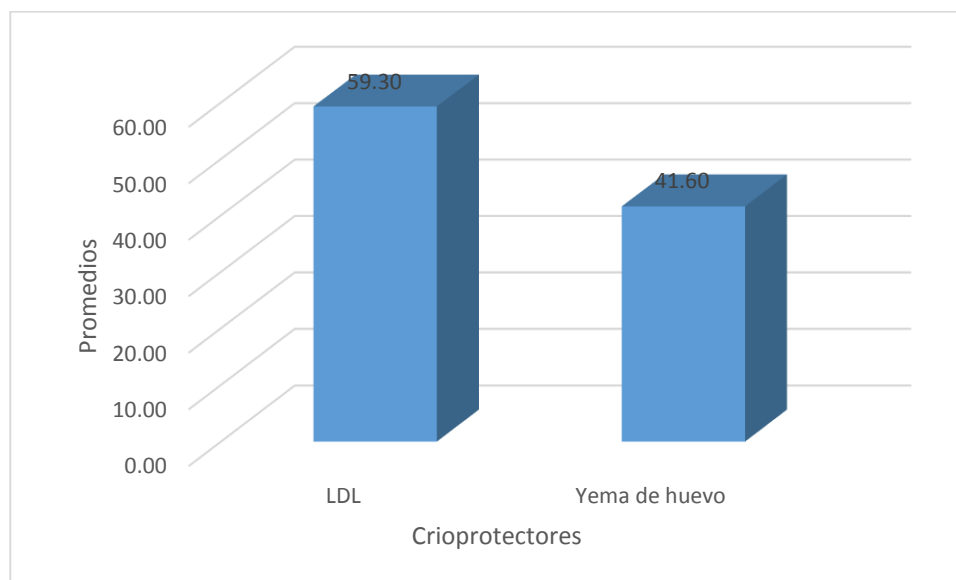
P<0.05

En el cuadro N°10 se observa el resultado de 59,30% de espermatozoides con membrana funcional con el crioprotector de proteína de baja densidad de yema de huevo de gallina versus a un 41,60% de espermatozoides con membrana funcional con el crioprotector de yema de huevo entera. Porcentualmente se visualiza un mayor número de espermatozoides con membrana funcional con el crioprotector de proteína de baja densidad de yema de huevo de gallina.

Según la t de student, muestra que el promedio de espermatozoides con membrana funcional con los crioprotectores LDL y la yema de huevo presento diferencias estadísticas significativas (P<0.05).

Los datos del Cuadro N° 10 se ven expresados en el gráfico N° 5, la cual muestra comparación de las de los crioprotectores no penetrantes conjunto con los datos de espermatozoides con membrana funcional obtenidos de la evaluación del semen criopreservado.

**Gráfico N° 5: Espermatozoides con membrana funcional usando LDL y yema de huevo de huevo**



Asimismo se muestra que el promedio de espermatozoides con membrana funcional con el crioprotector LDL fue de 59,30% y con la yema de huevo fue de 41,60%

Los espermatozoides equinos sufren mayor sobrecarga osmótica en soluciones de 50 a 100 mOsmol.<sup>12</sup>

Es importante señalar que, existe un alto grado de variabilidad en la calidad del semen entre los machos e incluso entre los eyaculados de un mismo animal.<sup>12</sup>

En el cuadro N° 11, se muestra la comparación de los crioprotectores no penetrantes conjunto con los datos obtenidos de la evaluación de espermatozoides con anomalías en acrosoma del semen criopreservado.

**Cuadro N°. 11: Espermatozoides con anomalías en acrosoma usando LDL y yema de huevo**

Espermatozoide con anomalías en acrosoma	Grupo	
	LDL	Yema de huevo
Media	0.55	1.05
Desviación estándar	0.759	1.234
Mínimo	0	0
Máximo	2	3
N	20	20

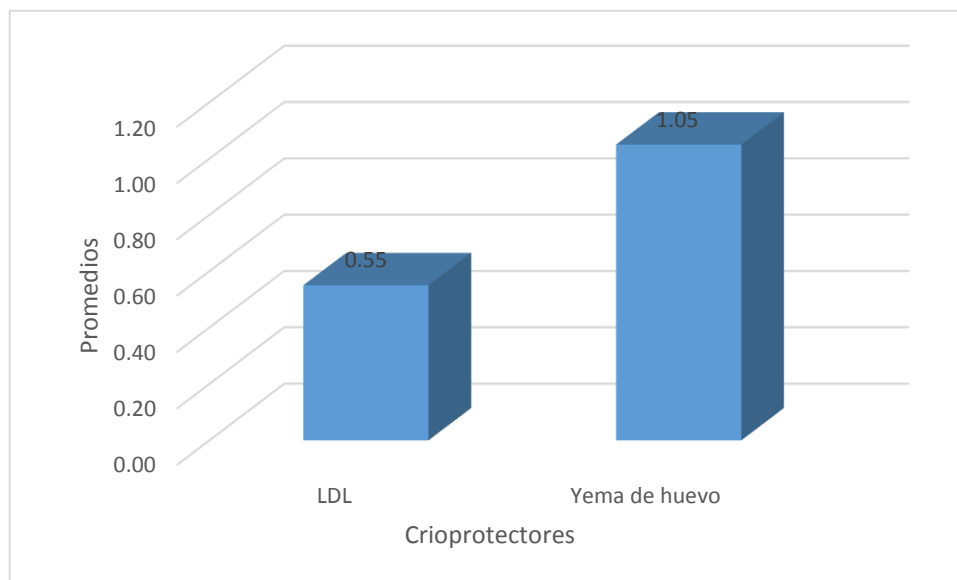
t= -1.54                      P>0.05

En el cuadro N°11 se observa el resultado de 0.55% de espermatozoides con anomalías en acrosoma mediante el crioprotector de proteína de baja densidad de yema de huevo de gallina versus a un 1.05% de espermatozoides con anomalías en acrosoma con el crioprotector de yema de huevo entera. Porcentualmente se visualiza un mayor número de espermatozoides con anomalías en acrosoma con el crioprotector de yema de huevo de gallina.

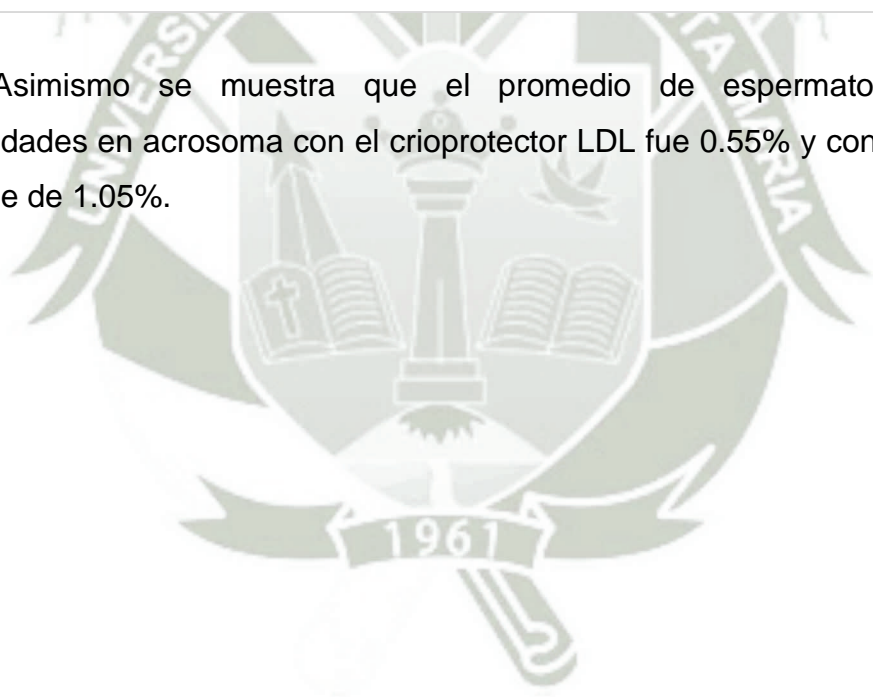
Según la t de student, muestra que el promedio de espermatozoides con anomalías en acrosoma con los crioprotectores LDL y la yema de huevo no presento diferencias estadísticas significativas (P>0.05).

Los datos del Cuadro N° 11 se ven expresados en el gráfico N° 6, la cual muestra comparación de las de los crioprotectores no penetrantes conjunto con los datos de espermatozoides con anomalías en acrosoma obtenidos de la evaluación del semen criopreservado.

**Gráfico N° 6: Espermatozoides con anomalías en acrosoma usando LDL y yema de huevo**



Asimismo se muestra que el promedio de espermatozoides con anomalías en acrosoma con el crioprotector LDL fue 0.55% y con la yema de huevo fue de 1.05%.



En el cuadro N° 12, se muestra la comparación de los crioprotectores no penetrantes conjunto con los datos obtenidos de la evaluación de espermatozoides con anomalías en cabeza del semen criopreservado.

**Cuadro N°. 12: Espermatozoides con anomalías en cabeza usando LDL y yema de huevo**

Espermatozoide con anomalías en cabeza	Grupo	
	LDL	Yema de huevo
Media	0.5	0.95
Desviación estándar	0.827	1.317
Mínimo	0	0
Máximo	3	3
N	20	20

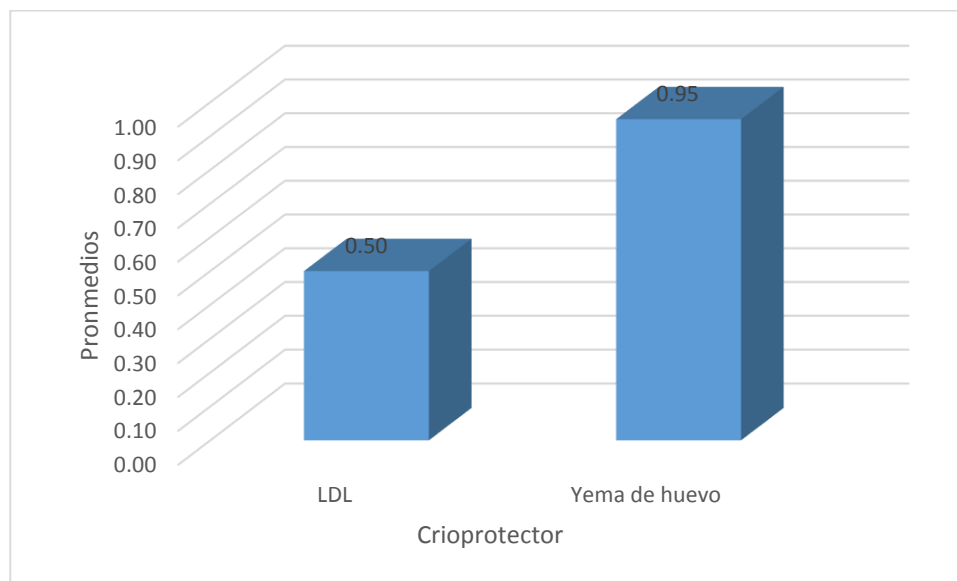
t= -1.29                      P>0.05

En el cuadro N°12 se observa el resultado de 0.5% de espermatozoides con anomalías en cabeza mediante el crioprotector de proteína de baja densidad de yema de huevo de gallina versus a un 0.95% de espermatozoides con anomalías en cabeza con el crioprotector de yema de huevo entera. Numéricamente se visualiza un mayor número de espermatozoides con anomalías en cabeza con el crioprotector de yema de huevo de gallina, obteniendo un valor máximo de espermatozoides con anomalías en cabeza en un 3% con crioprotector de yema de huevo de gallina, lo que de cierta manera nos indica que estos espermatozoides no podrían ser fértiles.

Según la t de student, muestra que el promedio de espermatozoides con anomalías en cabeza con los crioprotectores LDL y la yema de huevo no presento diferencias estadísticas significativas (P>0.05).

Los datos del Cuadro N° 12 se ven expresados en el gráfico N° 7, la cual muestra comparación de las de los crioprotectores no penetrantes conjunto con los datos de espermatozoides con anomalías en cabeza obtenidos de la evaluación del semen criopreservado.

**Gráfico N° 7: Espermatozoides con anomalías en cabeza usando LDL y yema de huevo**



Asimismo se muestra que el promedio de espermatozoides con anomalías en cabeza con el crioprotector LDL fue de 0.5% y con la yema de huevo fue de 0.95%.

En el cuadro N° 13, se muestra la comparación de los crioprotectores no penetrantes conjunto con los datos obtenidos de la evaluación de espermatozoides con anomalías en cola del semen criopreservado.

**Cuadro N°. 13: Espermatozoides con anomalías en cola usando LDL y yema de huevo**

Espermatozoides con anomalías en cola	Grupo	
	LDL	Yema de huevo
Media	1.35	2,45
Desviación estándar	1.598	2,564
Mínimo	0	0
Máximo	5	8
N	20	20

t= -1.62

P>0.05

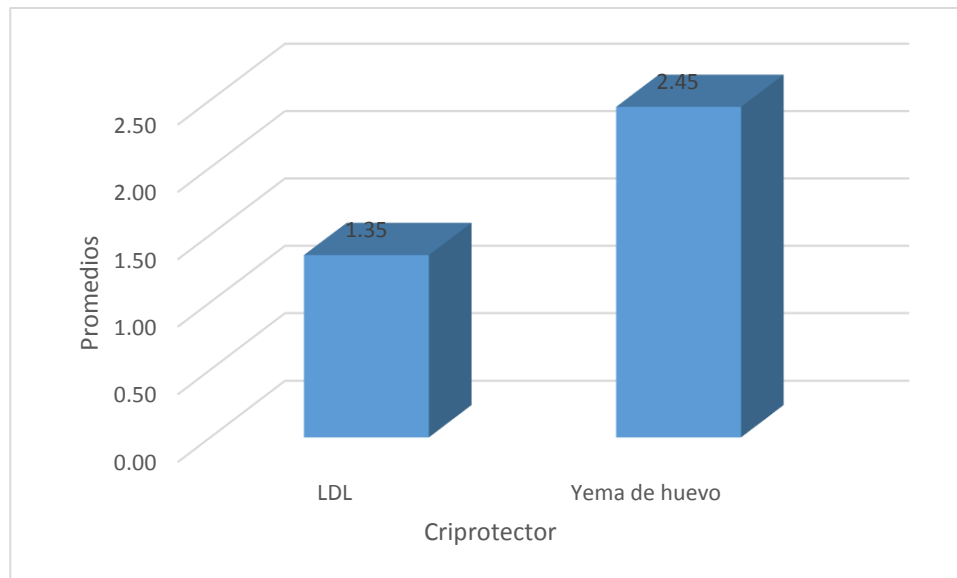
En el cuadro N°13 se observa el resultado de 1.35% de espermatozoides con anomalías en cola mediante el crioprotector de proteína de baja densidad de yema de huevo de gallina versus a un 2.45% de espermatozoides con anomalías en cola con el crioprotector de yema de huevo entera. Numéricamente se visualiza un mayor número de espermatozoides con anomalías en cola con el crioprotector de yema de huevo de gallina, obteniendo un valor máximo de espermatozoides con anomalías en cola en un 8% con crioprotector de yema de huevo de gallina, lo que de cierta manera nos indica que estos espermatozoides no podrían ser fértiles.

Según la t de student, muestra que el promedio de espermatozoides con anomalías en cola con los crioprotectores LDL y la yema de huevo no presento diferencias estadísticas significativas (P>0.05).

Los datos del Cuadro N° 13 se ven expresados en el gráfico N° 8, la cual muestra comparación de las de los crioprotectores no penetrantes conjunto con los

datos de espermatozoides con anomalías en cola obtenidos de la evaluación del semen criopreservado.

**Gráfico N° 8: Espermatozoides con anomalías en cola usando LDL y yema de huevo**



Asimismo se muestra que el promedio de espermatozoides con anomalías en cola con el crioprotector LDL fue de 1.35% y con la yema de huevo fue de 2.45%.

Es importante señalar que, existe un alto grado de variabilidad en la calidad del semen entre los machos e incluso entre los eyaculados de un mismo animal.<sup>11</sup>

Agrupando las anomalías en acrosoma, anomalías en cabeza y cola se obtuvo una media de 2,4% de anomalías, es decir 97.76% de morfología normal. Comparando nuestros resultados de morfología obtenidos con las LDL con el de Restrepo y col. (2014)<sup>34</sup> quienes obtuvieron una morfología normal de 84.4%. En este resultado no influyen los tipos de crioprotectores, ya que la morfología no se modifica por el agregado de los crioprotectores.

En el cuadro N° 14, se muestra la concentración espermática mediante los crioprotectores no penetrantes.

**Cuadro n°. 14: Concentración espermática progresiva mediante crioprotectores no penetrantes ldl y yema de huevo**

Concentración	Grupo	
	LDL	Yema de huevo
Media	208000000,00	190500000,00
Desviación estándar	74875334,987	72654553,956
Mínimo	100000000	110000000
Máximo	430000000	380000000
N	20	20

$t=0.75$

$P>0.05$

El cuadro N°. 14, según la t de student ( $t=0.75$ ) muestra que la concentración espermática con los crioprotectores LDL y la yema de huevo no presento diferencias estadísticas significativas ( $P>0.05$ ).

Asimismo se muestra que la concentración espermática con el crioprotector LDL fue de 208000000,00 y con la yema de huevo fue de 190500000,00.

## V. CONCLUSIONES

- Primero** Los parámetros macroscópicos observados mediante las variables de: volumen, color, aspecto y pH no mostraron diferencia estadística ( $p > 0,05$ )
- Segundo** Se aprecia mejor calidad seminal en pajillas criopreservadas con lipoproteínas de baja densidad (LDL) frente a semen criopreservado con yema de huevo de gallina, existiendo diferencia estadística ( $p < 0,05$ ), para las variables: Motilidad 0 h, motilidad a los 20 min., motilidad progresiva, viabilidad y membrana funcional. No observando diferencia significativa para la variable morfología ( $p > 0,05$ )
- Tercero** Hay una mejora de la calidad seminal del semen criopreservado con lipoproteínas de baja densidad frente a semen criopreservado con yema de huevo entera de gallina, esto por el aislamiento de la LDL de la yema entera.

## VI. RECOMENDACIONES

1. Para mejorar la calidad de semen congelado en Caballo Peruano de Paso, utilizar las lipoproteínas de baja densidad (LDL) como crio protector no penetrante en el proceso de criopreservación y así mantener el material genético por el tiempo deseado.
2. Existe poca tolerancia de los espermatozoides al enfriamiento, es por ello que se debe controlar adecuadamente la temperatura para congelamiento y descongelación de las pajillas del material genético no sometiéndolos a un enfriamiento rápido.
3. Al momento de realizar la evaluación microscópica de las pajillas descongeladas se deben realizar con las cantidades indicadas para obtener buenos resultados y con las diluciones a la misma temperatura de los espermatozoides para no provocar un shock térmico.
4. Seguir con los estudios de aislamiento de lipoproteínas de baja densidad a partir de yema de huevo de gallina, afianzando la técnica propuesta por Gonzales R.<sup>32</sup>, y así lograr su uso masivo en la criopreservación de gameto masculino.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

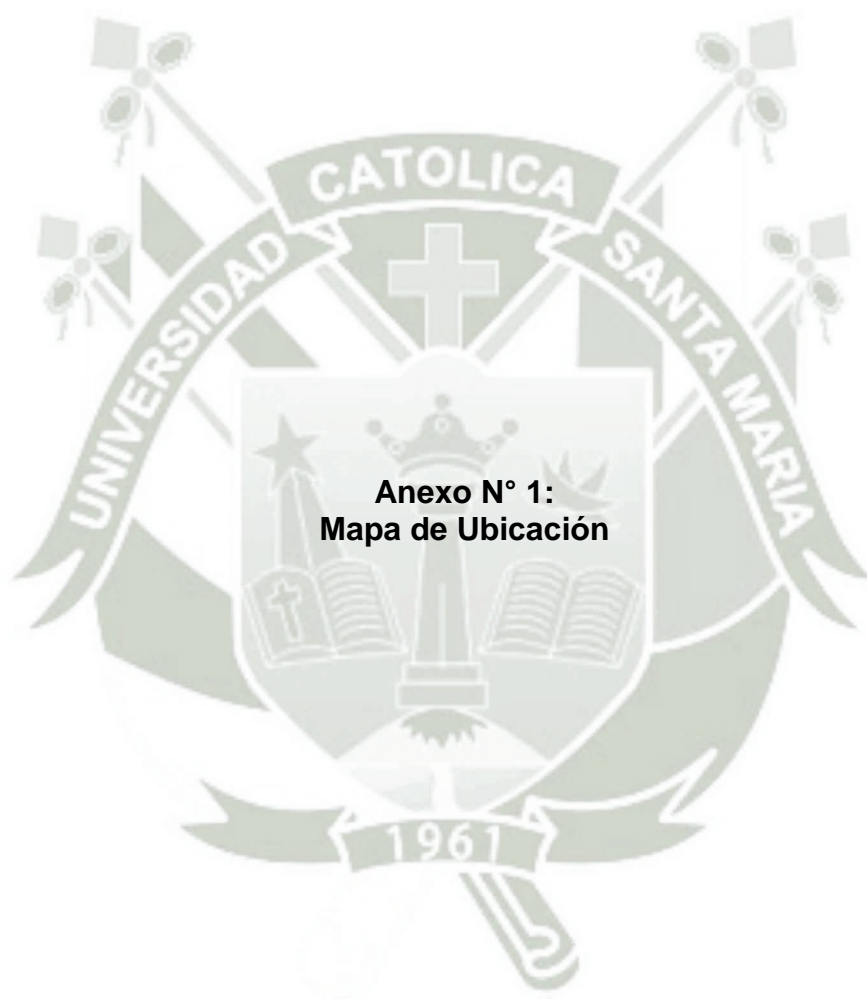
1. Hafez, E; Hafez, B. E. S. E. Reproducción e inseminación artificial en animales. Séptima edición. (2007).
2. Evans, J. W., y col. El caballo. Edet. Acriba. Zaragoza, España. (1979).
3. Climent S., y col. Embriología y anatomía veterinaria. Vol. II. Zaragoza, España. (2013).
4. Rossdale, P. Cria y reproducción del caballo, Ed. Acribia. Zaragoza, España. (1991)
5. Ruckebush, Y., PHANEUF I. p. Y Dunlop. R. Fisiología de pequeñas y grandes especies. Ed. El manual moderno. Mexico. (1994).
6. Zegarra J., Embriología normal Veterinaria, Arequipa Peru, 2017.
7. Zegarra J., Histología normal Veterinaria, Arequipa Perú, 2017.
8. Kenney, R.M.; Hurtgen, J; Pierson, R; Witherspoon, D.; Simons, J. Clinical fertility evaluation of the stallion society for theriogenology Manual.(1983).
9. Amann, R.P.; Graham, J.K .Spermatozoal function En: Equine Reproduction. Ed. McKinnon, Febiger, Pennsylvania (1995).
10. MacDonald BJ, Foulkes JA. A spectrofluorometric investigation, using 1-anilino-naphthalene-8-sulphonate, of the interaction between washed bovine spermatozoa and seminal plasma or egg-yolk lipoprotein. J Reprod Fertil, v.63, p.407-414, (1981).
11. Pattie W.A.; Dowset, K.F.The repeatability of seminal characteristics of stallions. En: Journal Reproduction fertility. Vol. 32, p. 9 -13, (1982).
12. Palma, A. Gustavo, Biotecnología de la Reproducción. Balcarce, Argentina, p. 527, (2001).
13. Pineda S., y Pinilla S., 2007, Comparación de dos diluyentes (lactosa-glicerol-yema de huevo; inra-dformamida-yema de huevo) en la preservación de semen equino, Universidad de la Salle Facultad de Medicina Veterinaria Bogotá D.C., (2007).

14. Pickett, B.W. Factors affecting sperm production and output. En: Equine reproduction. Ed. McKinnon,, Pennsylvania, (1993).
15. Boyle, M.S. Artificial insemination: assessing stallion seminal quality after freezing. En: Equine Veterinary Journal.Vol.28. no (1), p. 5-6. (1996).
16. Hammerstedt, R.H.; Graham, J. | an, J.P. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. En: Journal of Andrology. Vol.11, no1, p. 73-88. (1990).
17. Aurich, J.E.; Kühne, A.; Hoppe, H.; Aurich,C. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. En: Theriogenology, Vol.46, p. 791-797, (1996).
18. Nishikawa, Y. Studies on the preservation of raw and frozen equine semen. En: Journal Reproduction Fertility, Vol.23, p.99-104, (1975).
19. Alvarenga M.A. Novos Conceitos relacionados a congelacão de sēmen de garanhões. M.A. Alvarenga, Departamento de Reprodução Animal e Radiología Veterinaria. Facultad de Medicina Veterinaria e Zootecnia-UNESP. Campus de Botucatu-SP-Brasil. (2005)
20. Brinsko, S.P.; Varner, D.D .Artificial insemination. Equine Reproduction. Ed. McKinnon. Pennsylvania. (1993).
21. Totic PH, Walton A. Effects of egg yolk and its constituents on the respiration and fertilizing capacity of spermatozoa. J Agric Sci (1946).
22. Bosseau S, Brillard JP, Marquant-le guienne B, Guérin B, Camus A, Lechat M. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. Theriogenology (1998).
23. Arruda, R.P. Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide eqüino pelo uso de microscopia de epifluorescencia, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade CASA e da morfometria ASMA. UNESP, Tese para obtenção do título de Livre Docente UNESP- Botucatu (2000).

24. Manjunath, P.; Nauc, V.; Bergeron, A.; Ménard, M. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biology of Reproduction*, Madison, v. 67, n. 4, p. 1250-1258, (2002).
25. Anton M, Gandemer G. Composition, solubility and emulsifying properties of granules and plasma of egg yolk. *J Food Sci*, v.62, p.484-487, (1997).
26. Jolivet P, Boulard C, Beaumal V, Chardot T, Anton M. Protein components of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk. *J Agric Food Chem*, v.54, p.4424-4429, (2006).
27. Pace MM, Graham EF. Components in egg yolk, which protect bovine spermatozoa during freezing. *J Anim Sci*, v.39, p.1144-1149, (1974).
28. Foulkes JA. The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. *J Reprod Fertil*, v.49, p.277-284, (1977).
29. Moussa M, Martinet V, Trimeche A, Tainturier D, Anton M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, v.57, p.16951706, (2002).
30. Dong Q-X, Rodenburg SE, Hill D, VandeVoort CA. The role of low-density lipoprotein (LDL) and highdensity lipoprotein (HDL) in comparison with whole egg yolk for sperm cryopreservation in rhesus monkeys. *Asian J Androl*, v.13, p.459-464, (2011).
31. Gornall DA, Kuksis A. Alterations in lipid composition of plasma lipoproteins during deposition of egg yolk. *J Lipid Res*, v. 14, p. 197-205, (1973).
32. Gonzales, R.. Extracción de lipoproteínas de baja densidad de yema de huevo. [Internet]. 2015. [Citado 24 Mayo, 2017]. Disponible en: [https://www.youtube.com/watch?v=iEiH6Lf3\\_QA](https://www.youtube.com/watch?v=iEiH6Lf3_QA)
33. Bergeron A, Crête M, Brindle Y, Manjunath P. Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. *Biol Reprod*, v.70, p.708-717, (2004).

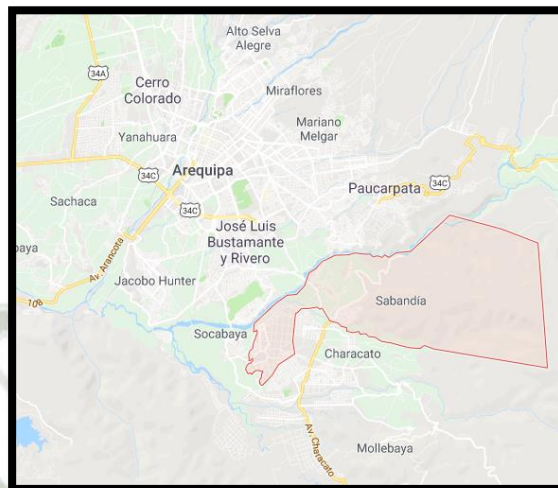
34. Restrepo G. y col. Evaluación de dos diluyentes para la criopreservación de semen de caballos de la raza criollo colombiano. Corporación Universitaria Lasallista Antioquia, Colombia. 2014.
35. Lozano, D. y col. Efecto de la adición de plasma seminal en el semen equino descongelado. Sanidad Militar, España. 2011.
36. Vaz, M., y col., Rev. Brasil. Medicina. Veterinaria., out/dez 2012.
37. Neves MM, Henry M, Heneine LGD. Effects of the association of low-density lipoproteins to several cryoprotectants on post-thaw canine sperm viability. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 18, Belo Horizonte. Anais... Belo Horizonte: CBRA, p.457. Resumo. CD-ROM., (2009).
38. Ávila L., y col., Revista de Obstetricia y Ginecología Vol. 57 No. 4, Colombia, 2006.
39. SENAMHI. Delimitación de la cuenca atmosférica de Arequipa. Servicio nacional de Meteorología e Hidrología Arequipa. (2016).
40. Malmgren, L. Assessing the quality of raw semen: A review. En: Theriogenology. Vol. 48, p. 530-532, (1997).
41. Reategui J. Determinación de la calidad de semen criopreservado. Vicerrectorado de Investigación. Universidad Católica de Santa María. Arequipa, Perú. 2015.
42. Squires EL, Pickett BW, Graham JK, Vanderwall DK, McCue PM, Brummer JE. Cooled and frozen stallion semen, Fort Collins: Animal Reproduction Biotechnology Laboratory, Colorado State University. Bulletin 9. 2004
43. Samper, J.C.; Morris, C.A. Current methods for stallion semen cryopreservation. En: Theriogenology Vol .49, p. 895-903, (1998).





**Figura N° 1:**

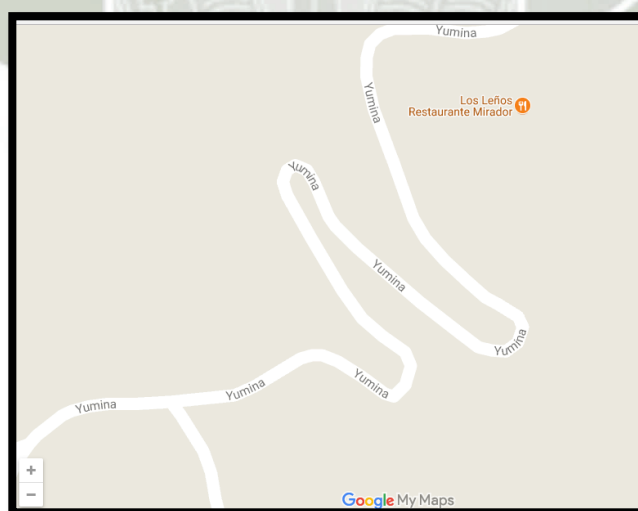
**Mapa en donde se ubica geográficamente el distrito de Sabandía, en la Región Arequipa.**



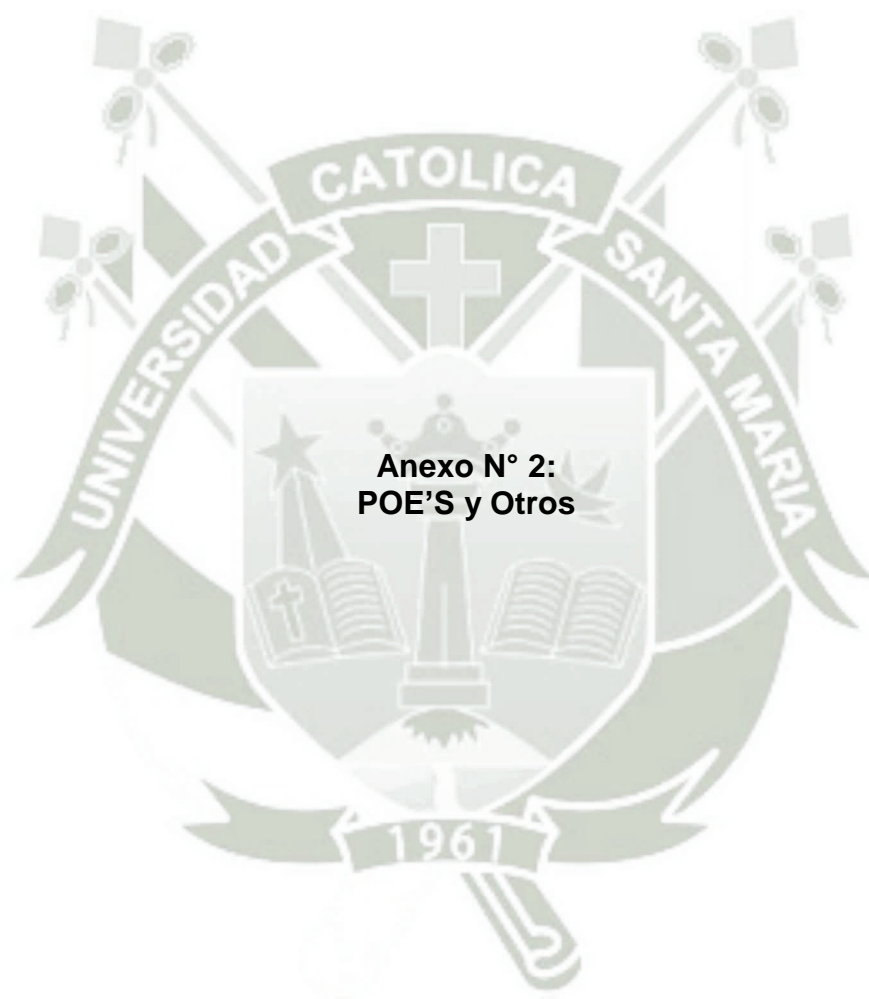
**Fuente:**  
(<https://www.google.com/maps/place/Saband%C3%ADa/@-16.4542227,-71.5372421,12z/data=!3m1!4m5!3m4!1s0x9143b4a654d92473:0x6543f676a8e7a0c7!8m2!3d-16.4544375!4d-71.4655565>).

**Figura N°2:**

**Mapa en donde se ubica geográficamente Yumina, en el distrito de Sabandia**



**Fuente:** ([https://www.google.com/maps/d/viewer?mid=1j8MBTJsS\\_WI6LQhIL-oCPCdms&hl=en\\_US&ll=-16.4510853864%2C-7&z=18](https://www.google.com/maps/d/viewer?mid=1j8MBTJsS_WI6LQhIL-oCPCdms&hl=en_US&ll=-16.4510853864%2C-7&z=18))





VICERRECTORADO  
DE INVESTIGACIÓN

## PROCEDIMIENTO DE OPERACIÓN ESTANDAR (POE)

PREPARACION DE SOLUCION DE SULFATO DE AMONIO AL 100%

Nro.: L- 001

Fecha de Elaboración: MAYO / 2017      Fecha Última Revisión: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

(Mes)

(Año)

(Mes)

(Año)

### DESCRIPCIÓN DE LA TAREA

<b>Lugar donde se realizará:</b> Laboratorio de Biotecnología	
<b>Número de personas que participaron:</b> <input type="checkbox"/> 1 (Una)      X 2 (Dos) <input type="checkbox"/> 3 (Tres) <input type="checkbox"/> 4 (Cuatro)	
<b>Nivel de experiencia:</b> Avanzado	
Equipos y accesorios utilizados:	
<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Agua desionizada</li> <li>✓ Sulfato de amonio</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ vaso precipitado</li> <li>✓ Balanza de precisión</li> </ul>
<b>Personal:</b> Adecuado para la preparación de esta solución.	
<b>Otros equipos requeridos:</b> Campana	

### PRODUCTO TERMINADO O RESULTADO ESPERADO

Obtención de solución de sulfato de amonio al 100%.

### ALCANCE DE ESTE POE

Es necesario obtener esta solución para regular el Ph del proceso en la extracción de lipoproteínas de baja densidad (LDL) de la yema de huevo de gallina.

**HABILIDADES ESPECÍFICAS, ENTRENAMIENTO, CERTIFICACIONES Y  
PERMISO REQUERIDO**

Para realizar la preparación de esta solución es necesario estar capacitado para no ocasionar accidentes y poder obtener las soluciones en las cantidades adecuadas para que puedan ser utilizadas.

**PROTOCOLOS POE Nro. 001**

Nro.	Pasos y procedimientos comprendidos en esta tarea o proceso	✓
	PREPARACION DE SOLUCION DE SULFATO DE AMONIO AL 100%.	
1	Pesar en la balanza de precisión 76 gr de sulfato de Amonio.	
2	Extraer 100ml de agua desionizada.	
3	Agregar el sulfato de amonio en el agua desionizada colocada en un vaso precipitado.	
4	Es necesario realizarlo en una campana.	
5	Agregar poco a poco para evitar que se precipite.	





**PROCEDIMIENTO DE OPERACIÓN ESTANDAR (POE)  
EXTRACCION DE LDL DE YEMA DE HUEVO DE GALLINA**

Nro.: L- 002

VICERRECTORADO  
DE INVESTIGACION

Fecha de Elaboración: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

Fecha Última Revisión: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

(Mes) (Año)

(Mes) (Año)

**DESCRIPCIÓN DE LA TAREA**

<b>Lugar donde se realizará:</b> Laboratorio de Biotecnología Animal F- 405	
<b>Número de personas que participaron:</b> <input type="checkbox"/> 1 (Una) <input type="checkbox"/> 2 (Dos) <input type="checkbox"/> 3 (Tres) <input type="checkbox"/> 4 (Cuatro)	
<b>Nivel de experiencia:</b>	
Equipos y accesorios utilizados:	
<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Solución Salina Fisiológica al 0.17 Molar</li> <li>✓ Solución de Sulfato de Amonio al 100%</li> <li>✓ Agua desionizada</li> <li>✓ Agua destilada</li> <li>✓ Huevos de gallina</li> <li>✓ Servitoallas</li> <li>✓ Parafilm</li> <li>✓ Hielera</li> <li>✓ Pipetas pasteur</li> <li>✓ potenciometro</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ hielo frappe</li> <li>✓ venocllisis</li> <li>✓ bolsas de diálisis</li> <li>✓ pinzas</li> <li>✓ separador de yemas</li> <li>✓ Probeta</li> <li>✓ Vaso precipitado</li> <li>✓ Agitador magnetico</li> <li>✓ Centrifuga</li> </ul>
<b>Personal:</b>	
<b>Otros equipos requeridos:</b>	

**PRODUCTO TERMINADO O RESULTADO  
ESPERADO**

Solución de LDL de yema de huevo de gallina.

**ALCANCE DE ESTE POE**

Validación de la técnica de obtención de proteínas de baja densidad de yema de huevo de gallina como crioprotectores de semen de caballo peruano de paso, basado en procedimientos los cuales nos guían al producto objetivo final.

**HABILIDADES ESPECÍFICAS, ENTRENAMIENTO, CERTIFICACIONES Y  
PERMISO REQUERIDO**

- ✓ Habilidad para el manejo de los equipos a utilizar.
- ✓ Habilidad y destreza para calcular las cantidades necesarias de soluciones a preparar para la obtención de LDL.

PROTOSCOLOS POE Nro. 002

Nro.	Pasos y procedimientos comprendidos en esta tarea o proceso	✓
1	Colocar un huevo en el separador de yema y retirar la clara.	
2	Colocar en el extremo de una servitoalla haciéndolo rodar suavemente para retirar los residuos de clara.	
3	Colocar las yemas de los huevos en la probeta y medir la cantidad obtenida.	
4	Realizar la dilución 1:1 con la dilución fisiológica 0,17 Molar.	
5	Segregar la cantidad restante de solución salina fisiológica para recuperar los residuos de yema que quedan en la probeta.	
6	Colocar la dilución en un vaso precipitado y colocar papel aluminio	
7	Llevar al cuarto frío donde se homogenizara en el agitador magnético en una hora	
8	Llenar los tubos de la centrifuga con la misma cantidad de yema de huevo y sellamos con parafilm.	
9	Centrifugar a 13000 rpm a 1000 gravedades con 4°C en 45 minutos.	
10	Retirar los tubos de la centrifuga y colocar en hielo frappe.	
11	Recuperar el sobrenadante en un vaso de precipitado y colocar en el agitador magnético en el cuarto frío por 15 minutos.	
12	Centrifugar el sobrenadante a 13000 rpm a 1000 gravedades con 4°C en 45 minutos	
13	Recuperar el sobrenadante en un vaso de precipitado sellar con papel aluminio y colocar en el agitador magnético en una cama de hielo frappe.	
14	Calibrar el potenciómetro con agua desionizada y secar.	
15	Introducir el potenciómetro en el sobrenadante y se ajusta el pH a 8.7 con hidróxido de Sodio.	
16	Realizar una dilución 1:1 con el Sulfato de Amonio para obtener una solución Sulfurada de amonio al 50%.	
17	El sulfato de amonio se debe agregar lentamente con ayuda de una venoclis y el pH se deberá mantener a 8,7 agregando hidróxido de sodio.	
18	Llevar la dilución al cuarto frío y se homogeniza durante una hora.	
19	Centrifugar a 13000 rpm a 1000 gravedades con 4°C en 45 minutos.	
20	Colocar las bolsas de diálisis para que se hidraten y después enjuagarlas en agua desionizada.	
21	Transcurridos los 45 minutos, se extrae los tubos de la centrifuga y se recupera el sobrenadante.	
22	Colocar en las bolsas de diálisis con aire dentro de ellas y cerrarlas con pinzas.	
23	Introducir las bolsas en una cubeta con agua desionizada, la cual deberá estar con una bomba para mantener el agua circulando, las bolsas deben estar flotando.	
24	La cubeta se dejara en el cuarto frío cubierta de papel aluminio, para evitar que las superficies de las bolsas de diálisis se resequen.	
25	El agua desionizada de la cubeta se debe cambiar cada 2 o 3 horas evaluando el color del contenido que debe pasar de turbio a traslucido lo que indica que se ha eliminado el sulfato de amonio, (aproximadamente dos días).	
26	Recuperar el contenido de las bolsas de diálisis.	
27	Centrifugar a 13000 rpm a 1000 gravedades con 4°C en 45 minutos.	
28	Ya obtenido el producto final, se debe conservar en el cuarto frío a una temperatura de 4°C.	



**PROCEDIMIENTO DE OPERACIÓN ESTANDAR (POE)  
ANÁLISIS DE PAJILLAS DE SEMEN CRIOPRESERVADO**

Nro.: L-003

**Fecha de Elaboración:** Marzo / 2017      **Fecha Última Revisión:** \_\_\_\_ / \_\_\_\_  
(Mes)      (Año)

**DESCRIPCIÓN DE LA TAREA**

<b>Lugar donde se realizará:</b> Laboratorio de Biotecnología Animal F-405	
<b>Número de personas que participaron:</b> <input checked="" type="checkbox"/> 1 (Una) <input type="checkbox"/> 2 (Dos) <input type="checkbox"/> 3 (Tres) <input type="checkbox"/> 4 (Cuatro)	
<b>Nivel de experiencia:</b> Avanzado en el protocolo para evaluar la calidad de muestra de semen criopreservado (pajilla) en Bovinos	
<b>Equipos y accesorios utilizados:</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Solución salina formolada</li> <li>✓ Solución formol salino bufferada</li> <li>✓ Eosina - Nigrosina</li> <li>✓ Coloración Giemsa</li> <li>✓ Rosa de Bengala al 3%</li> <li>✓ Solución HOS</li> <li>✓ Solución HOS Formol</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Platina térmica</li> <li>✓ Cámara de Nuebauer</li> <li>✓ Porta y cubre objetos</li> <li>✓ Microscopio de contraste de fase con platina térmica</li> <li>✓ Microscopio trinocular</li> <li>✓ Cámara digital</li> </ul>
<b>Personal:</b> De laboratorio encargado de la evaluación de semen criopreservado.	
<b>Otros equipos requeridos:</b> Termo de nitrógeno líquido para almacenamiento de semen a -196°C, equipo de descongelar semen POE L-001.	

**PRODUCTO TERMINADO O RESULTADO ESPERADO**

Informe de Calidad seminal con el uso de las técnicas validadas de evaluación y análisis de semen criopreservado.
---

**ALCANCE DE ESTE POE**

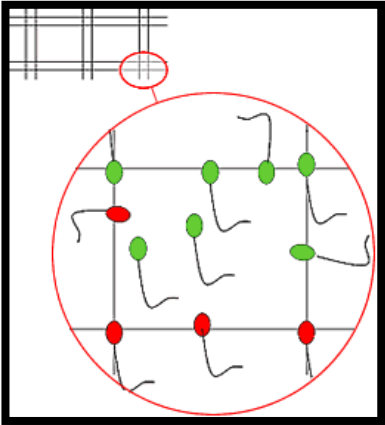
Validación de las técnicas de rutina para la determinar la calidad seminal y funcional de semen criopreservado a partir de las técnicas de: volumen, concentración espermática, motilidad total y progresiva, Número de espermatozoides por dosis, Número de espermatozoides motiles progresivos por dosis, porcentaje de espermatozoides vivos, porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto, mediante tinción Giemsa, porcentaje de espermatozoides con membrana funcional, anomalidades morfológicas (tinción de Rosa de Bengala), porcentaje de espermatozoides con anomalidades de cabeza y anomalidades de cola.
--

**HABILIDADES ESPECÍFICAS, ENTRENAMIENTO, CERTIFICACIONES Y**

**PERMISO REQUERIDO**

<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Habilidad y destreza en descongelamiento de pajillas de semen congelado</li> <li>✓ Habilidad para el manejo de tanques de nitrógeno líquido para el almacenamiento de semen</li> <li>✓ Entrenamiento y habilidades en el análisis de laboratorio con técnicas de rutina para determinar calidad seminal y funcional.</li> </ul>
--

**PROTOCOLOS POE Nro. L-003**

<b>CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA</b>		
La concentración de una pajuela de 0,25ml ó 0,5ml varía de 20 – 30 millones de espermatozoides totales por pajuela. De los cuales al descongelado deben existir un mínimo de 10 millones de células motiles por pajuela.		
1	Realizar una dilución 1:50 (2,5 ml de solución salina formolada y 50 µl semen)	
2	Cargar la cámara de Burker. Dejar decantar 2-3 minutos	
3	<p>Contar los espermatozoides de 40 cuadrados: Contar a partir del margen superior izquierdo y desplazarse hacia la derecha, al final de hilera pasar a la inferior desplazándose hacia la izquierda.</p>  <p>Fórmula:  <math display="block">N^{\circ} \text{ epz./ml} = n^{\circ} \times 1:100 \times 4000 \times 100 / 40</math></p> <p><i>El recuento celular sigue siendo el método de referencia.</i></p>	

<b>MOTILIDAD ESPERMÁTICA</b>		
El porcentaje de motilidad progresiva y el vigor serán determinados inmediatamente después de descongelado el semen y luego de 2 horas de incubación.		
1	Colocar una gota (15µl) de semen entre porta y cubre (20 x 20 mm) atemperados en platina térmica a 37 °C	
2	Evaluar la movilidad total con objetivo de 10x y 20x, contraste de fase y platina térmica del microscopio atemperada a 37 °C. La evaluación se realiza de manera subjetiva	
3	Evaluar la movilidad progresiva con objetivo de 10x y 20X y platina térmica del microscopio atemperada a 37°C. La evaluación se realiza de manera subjetiva	

<b>TECNICAS DE COLORACIÓN VITAL</b>		
Se contará un total de 100 espermatozoides indicando el número de espermatozoides blancos o sin colorante (vivos) respecto de los que se observan coloreados o rojos (muertos). El fondo del preparado se observará grisáceo o negrozco haciendo contrastar a los espermatozoides.		
<b>Tinción con Eosina-Nigrosina (Tamuli et al., 1988)</b>		
1	Colocar 5µl de semen y 5 µl de solución de Eosina Nigrosina sobre un portaobjetos precalentado a 37°C y luego de 15 a 20 seg., realizar el frotis.	
2	Secar y observar con microscopio de campo claro y objetivo de inmersión. Recuento mínimo: 200 espermatozoides por frotis.	
<b>Tinción con Eosina</b>		
1	Colocar sobre un portaobjetos precalentado a 37°C una gota de semen y una gota de eosina.	

2	Homogenizar y a los 15-20 segundos extender.	
3	Secar y observar con objetivo de inmersión.	
4	Recuento mínimo: 200 espermatozoides por frotis.	

#### TEST DE ENDOSMOSIS (HOS)

Los espermatozoides con cola enrollada totalmente, parcialmente, o simplemente acodada se consideraron vivos (reaccionados) y el resultado final se expresará porcentualmente. En cada muestra seminal debe observarse un mínimo de 40% de reaccionados para considerarla adecuada.

1	Colocar en un tubo de ensayo 125 $\mu$ l de solución HOS a 37°C y 12.5 $\mu$ l de semen.	
2	Incubar a 37°C durante 10 minutos.	
3	Detener la reacción agregando 25 $\mu$ l de Solución HOS Formol.	
4	Colocar entre porta y cubreobjetos 5 $\mu$ l de la muestra.	
5	Observar con microscopio de contraste de fase a 400 aumentos.	
6	Realizar el conteo de 100 células.	

#### MORFOLOGÍA E INTEGRIDAD ACROSÓMICA

El resultado final se expresará en porcentaje e indica la proporción de malformaciones aceptándose no más del 25%. De los espermatozoides con malformaciones un máximo de 8% de anomalías deberán ser de cabeza y un 17% de anomalías de cola.

##### Tinción con Rosa de Bengala

1	Realizar frotis sobre portaobjetos atemperado a 37 °C con una alícuota de 5 $\mu$ l de semen y 5 $\mu$ l de solución acuosa de Rosa de Bengala al 3% (m/v) atemperado	
2	Dejar secar a temperatura ambiente durante 20 minutos.	
3	Observar con objetivo de inmersión	
4	Realizar el conteo de 400 células.	

FICHA DE CAMPO Y LABORATORIO

FICHA DE EVALUACIÓN ESPERMÁTICA



**“EVALUACIÓN DE CRIOPROTECTORES NO PENETRANTES:  
PROTEINAS DE BAJA DENSIDAD (LDL) Y YEMA DE HUEVO DE  
GALLINA EN CALIDAD DE SEMEN REFRIGERADO Y  
CONGELADO DE CABALLOS PERUANO DE PASO”**

**DATOS DEL SOLICITANTE**

Fecha:

---

Nombre y apellido del propietario:

---

Establecimiento:

---

**EXTRACCION DE SEMEN**

Identificación del animal:

---

Nombre del animal:

---

Método de extracción: Vagina Artificial

**EVALUACION DE SEMEN FRESCO**

**EXAMEN MACROSCOPICO**

Volumen:

---

Color:

---

Olor:

---

Aspecto:

---

Ph:

---

EXAMEN MICROSCOPICO

Concentración:

\_\_\_\_\_

Motilidad total:

\_\_\_\_\_

Motilidad progresiva:

\_\_\_\_\_

Espermatozoides vivos:

\_\_\_\_\_

Morfología (tinción Rosa de Bengala):

\_\_\_\_\_

FUNCIONALIDAD

Espermatozoides con membrana funcional:

\_\_\_\_\_

Espermatozoides con acrosoma intacto:

\_\_\_\_\_

VALUACION DE SEMEN CRIOPRESERVADO

Datos de la pajilla:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

EXAMEN MICROSCOPICO

	MUESTRA N°1 (LDL)	MUESTRA N°2 (Yema de huevo)
Motilidad (%):	0 hras. _____	_____
	20 min. _____	_____
Motilidad progresiva (%):	_____	_____
Concentración (ml):	_____	_____
Espermatozoides vivos (%):	_____	_____
(Conteo de 200 células)		
Espermatozoides con membrana funcional (%):	_____	_____
(Conteo de 100 células)		

Morfología: espermatozoides con anomalías: \_\_\_\_\_

(Conteo de 400 células)

- Espermatozoides con anomalías

En acrosoma (max. 5%):

\_\_\_\_\_

- Espermatozoides con anomalías

En cabeza (max. 10%):

\_\_\_\_\_

Espermatozoides con anomalías

en cola (max 17%):

\_\_\_\_\_





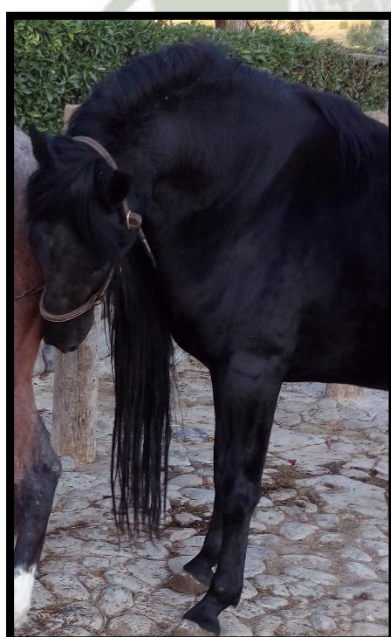
Cuadros de ejemplares seleccionados donde se ubica la evaluación de semen fresco para ser posteriormente criopreservado

**Cuadro N° 15: Datos de colección y evaluación de semen fresco de padrillo 1**



<b>Fecha</b>	<b>27/05/2017</b>
<b>Número</b>	<b>1</b>
<b>Identificación</b>	<b>P1</b>
<b>Volumen</b>	<b>39ml</b>
<b>Color, aspecto</b>	<b>Blanco lechoso</b>
<b>Ph</b>	<b>7,5</b>
<b>Motilidad total</b>	<b>73%</b>
<b>Motilidad progresiva</b>	<b>31%</b>
<b>Concentración</b>	<b>270000000ezp/ml</b>
<b>Espermatozoides vivos</b>	<b>71%</b>
<b>Morfología</b>	<b>51%</b>
<b>Ezp. con membrana funcional</b>	<b>48%</b>
<b>Ezp. con acrosoma intacto</b>	<b>51%</b>

**Cuadro N° 16: Datos de colección y evaluación de semen fresco de padrillo 2**



<b>Fecha</b>	<b>11/06/17</b>
<b>Número</b>	<b>2</b>
<b>Identificación</b>	<b>P2</b>
<b>Volumen</b>	<b>42ml</b>
<b>Color, aspecto</b>	<b>Blanco lechoso</b>
<b>Ph</b>	<b>7,4</b>
<b>Motilidad total</b>	<b>60%</b>
<b>Motilidad progresiva</b>	<b>32%</b>
<b>Concentración</b>	<b>310000000ezp/ml</b>
<b>Espermatozoides vivos</b>	<b>69%</b>
<b>Morfología</b>	<b>50%</b>
<b>Ezp. con membrana funcional</b>	<b>47%</b>
<b>Ezp. con acrosoma intacto</b>	<b>49%</b>

**Cuadro N° 17: Datos de colección y evaluación de semen fresco de padrillo 3**



<b>Fecha</b>	<b>21/06/17</b>
<b>Número</b>	<b>3</b>
<b>Identificación</b>	<b>P3</b>
<b>Volumen</b>	<b>45ml</b>
<b>Color, aspecto</b>	<b>Blanco lechoso</b>
<b>Ph</b>	<b>7,5</b>
<b>Motilidad total</b>	<b>65%</b>
<b>Motilidad progresiva</b>	<b>31%</b>
<b>Concentración</b>	<b>230000000ezp/ml</b>
<b>Espermatozoides vivos</b>	<b>67%</b>
<b>Morfología</b>	<b>41%</b>
<b>Ezp. con membrana funcional</b>	<b>38%</b>
<b>Ezp. con acrosoma intacto</b>	<b>40%</b>

**Cuadro N° 18: Datos de colección y evaluación de semen fresco de padrillo 4**



<b>Fecha</b>	<b>09/08/17</b>
<b>Número</b>	<b>4</b>
<b>Identificación</b>	<b>P4</b>
<b>Volumen</b>	<b>40ml</b>
<b>Color, aspecto</b>	<b>Blanco lechoso</b>
<b>Motilidad total</b>	<b>70%</b>
<b>Motilidad progresiva</b>	<b>32%</b>
<b>Concentración</b>	<b>270000000ezp/ml</b>
<b>Espermatozoides vivos</b>	<b>68%</b>
<b>Morfología</b>	<b>41%</b>
<b>Ezp. con membrana funcional</b>	<b>51%</b>
<b>Ezp. con acrosoma intacto</b>	<b>49%</b>



**EVALUACION DE SEMEN CRIOPRESERVADO**

Evaluación de las pajillas criopreservadas con lipoproteína de baja densidad (LDL)

**Cuadro N° 19: Datos de evaluación de semen criopreservado con (LDL) del padrillo N° 1**

Identificación de caballo	P1				
	P1 R1	P1 R2	P1 R3	P1 R4	P1 R5
Identificación de pajilla					
Motilidad a las 0 hrs.	51%	49%	48%	40%	45%
Motilidad a los 20 min.	44%	35%	45%	30%	32%
Motilidad progresiva	45%	37%	41%	38%	29%
Concentración	18000000	27000000	23000000	22000000	11000000
Espermatozoides vivos	55%	41%	48%	61%	62%
Ezp. Con membrana funcional	61%	51%	47%	57%	56%
Ezp. Con anomalías en acrosoma	0%	1%	0%	1%	0%
Ezp. Con anomalías en cabeza	1%	0%	2%	0%	1%
Ezp. Con anomalías en cola	5%	3%	2%	2%	0%

**Cuadro N° 20: Datos de evaluación de semen criopreservado con (LDL) del padrillo N° 2**

Identificación de caballo	P2				
	P2 R1	P2 R2	P2 R3	P2 R4	P2 R5
Identificación de pajilla					
Motilidad a las 0 hrs.	55%	45%	49%	53%	55%
Motilidad a los 20 min.	32%	38%	36%	45%	35%
Motilidad progresiva	38%	41%	38%	40%	35%
Concentración	10000000	1900000	18000000	31000000	43000000
Espermatozoides vivos	41%	48%	47%	61%	42%
Ezp. Con membrana funcional	53%	52%	48%	55%	52%
Ezp. Con anomalías en acrosoma	1%	1%	0%	0%	2%
Ezp. Con anomalías en cabeza	3%	0%	0%	1%	0%
Ezp. Con anomalías en cola	0%	0%	3%	0%	2%

**Cuadro N° 21: Datos de evaluación de semen criopreservado con (LDL) del padrillo N° 3**

Identificación de caballo	P3				
	P3 R1	P3 R2	P3 R3	P3 R4	P3 R5
Identificación de pajilla					
Motilidad a las 0 hrs.	49%	45%	50%	48%	49%
Motilidad a los 20 min.	35 %	38%	36%	45%	30%
Motilidad progresiva	38%	40%	45%	39%	35%
Concentración	19000000	18000000	28000000	25000000	15000000
Espermatozoides vivos	41%	49%	43%	40%	44%
Ezp. Con membrana funcional	84%	52%	60%	46%	40%
Ezp. Con anomalías en acrosoma	1%	0%	2%	0%	0%
Ezp. Con anomalías en cabeza	0%	1%	0%	0%	0%
Ezp. Con anomalías en cola	0%	0%	0%	1%	0%

**Cuadro N° 22: Datos de evaluación de semen criopreservado con (LDL) del padrillo N° 4**

Identificación de caballo	P4				
	P4 R1	P4 R2	P4 R3	P4 R4	P4 R5
Identificación de pajilla					
Motilidad a las 0 hrs.	45%	53%	50%	52%	47%
Motilidad a los 20 min.	45%	38%	45%	40%	40%
Motilidad progresiva	39%	37%	40%	35%	37%
Concentración	18000000	18000000	22000000	17000000	14000000
Espermatozoides vivos	44%	30%	44%	30%	47%
Ezp. Con membrana funcional	71%	82%	82%	64%	73%
Ezp. Con anomalías en acrosoma	0%	0%	0%	2%	0%
Ezp. Con anomalías en cabeza	0%	0%	0%	0%	1%
Ezp. Con anomalías en cola	0%	3%	0%	2%	4%

**EVALUACION DE SEMEN CRIOPRESERVADO**

**Evaluación de las pajillas criopreservadas con yema de huevo de gallina**

**Cuadro N° 23: Datos de evaluación de semen criopreservado con yema de huevo de gallina del padrillo N° 1**

Identificación de caballo	P1				
	P1 R1	P1 R2	P1 R3	P1 R4	P1 R5
Identificación de pajilla					
Motilidad a las 0 hrs.	30	20%	38%	30%	10%
Motilidad a los 20 min.	15	18%	10%	26%	15%
Motilidad progresiva	25	16%	26%	21%	10%
Concentración	13000000	23000000	18000000	12000000	12000000
Espermatozoides vivos	30	34%	31%	45%	30%
Ezp. Con membrana funcional	40	45%	41%	41%	39%
Ezp. Con anomalías en acrosoma	0	0%	3%	0%	2%
Ezp. Con anomalías en cabeza	3	0%	0%	3%	0%
Ezp. Con anomalías en cola	4	1%	3%	5%	0%

**Cuadro N° 24: Datos de evaluación de semen criopreservado con yema de huevo de gallina del padrillo N° 2**

Identificación de caballo	P2				
	P2 R1	P2 R2	P2 R3	P2 R4	P2 R5
Identificación de pajilla					
Motilidad a las 0 hrs.	37%	35%	20%	35%	20%
Motilidad a los 20 min.	18%	26%	25%	10%	16%
Motilidad progresiva	26%	28%	20%	18%	15%
Concentración	11000000	15000000	22000000	28000000	38000000
Espermatozoides vivos	31%	31%	31%	52%	58%
Ezp. Con membrana funcional	30%	39%	28%	30%	48%
Ezp. Con anomalías en acrosoma	0%	2%	0%	2%	0%
Ezp. Con anomalías en cabeza	0%	0%	2%	0%	1%
Ezp. Con anomalías en cola	5%	8%	7%	0%	2%

**Cuadro N° 25: Datos de evaluación de semen criopreservado con yema de huevo de gallina del padrillo N° 3**

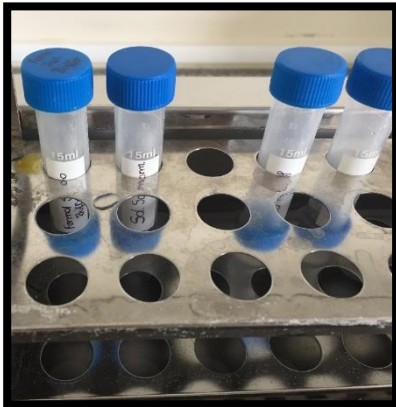
Identificación de caballo	P3				
	P3 R1	P3 R2	P3 R3	P3 R4	P3 R5
Identificación de pajilla					
Motilidad a las 0 hrs.	30%	20%	30%	30%	42%
Motilidad a los 20 min.	24%	17%	24%	25%	16%
Motilidad progresiva	26%	20%	25%	20%	37%
Concentración	17000000	20000000	30000000	28000000	11000000
Espermatozoides vivos	36%	42%	20%	15%	30%
Ezp. Con membrana funcional	50%	50%	57%	22%	30%
Ezp. Con anomalías en acrosoma	2%	3%	0%	0%	0%
Ezp. Con anomalías en cabeza	0%	0%	1%	0%	0%
Ezp. Con anomalías en cola	4%	2%	0%	0%	4%

**Cuadro N° 26: Datos de evaluación de semen criopreservado con yema de huevo de gallina del padrillo N° 4**

Identificación de caballo	P4				
	P4 R1	P4 R2	P4 R3	P4 R4	P4 R5
Identificación de pajilla					
Motilidad a las 0 hrs.	20%	20%	33%	30%	20%
Motilidad a los 20 min.	18%	16%	30%	27%	10%
Motilidad progresiva	18%	18%	18%	25%	18%
Concentración	19000000	17000000	18000000	16000000	13000000
Espermatozoides vivos	28%	20%	30%	20%	20%
Ezp. Con membrana funcional	62%	30%	70%	51%	29%
Ezp. Con anomalías en acrosoma	2%	0%	0%	3%	2%
Ezp. Con anomalías en cabeza	0%	3%	0%	3%	3%
Ezp. Con anomalías en cola	0%	0%	0%	0%	4%



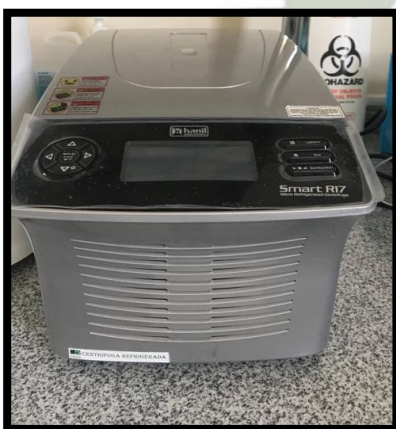
## MATERIALES



**Foto N° 1:** Soluciones de HOST, HOST formol y salina formolada



**Foto N° 2:** Pipetas y tips para la evaluación



**Foto N° 3:** Centrifugadora para la separación de líquido seminal y espermatozoides



**Foto N° 4:** Pajillas de 0,5 ml y alcohol polivinilico para sellar las pajillas



**Foto N° 5:** Caja de tecnopor para la criopreservación de pajillas



**Foto N° 6:** Tanque de Nitrógeno líquido de 20 litros.

## PROCEDIMIENTO DE COLECCIÓN DE SEMEN, EVALUACIÓN DE SEMEN FRESCO, EMPAJILLADO, CRIOPRESERVACIÓN DE PAJILLAS Y EVALUACIÓN DE SEMEN CRIOPRESERVADO



**Foto N° 7:** Preparación de dilutor de transporte de semen con agua destilada.



**Foto N° 8:** Reacción de Flehmen al detectar feromonas sexuales y oler la orina de la yegua en celo.



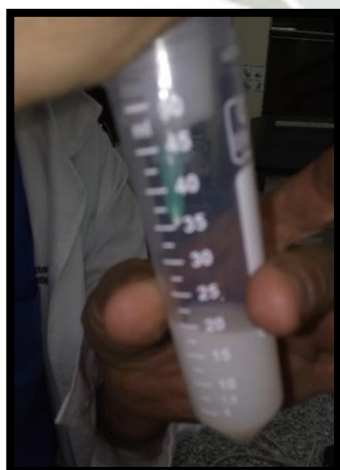
**Foto N° 9:** Monta del padrillo para la recolección de semen.



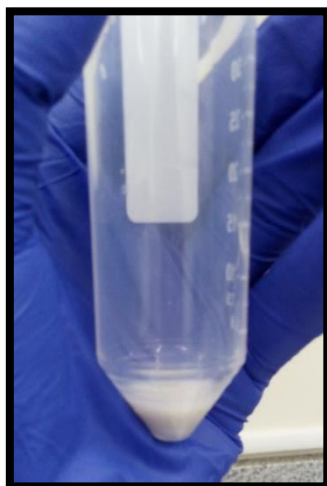
**Foto N° 10:** Después de la colección de semen, mezclamos con el dilutor de transporte de semen



**Foto N° 11:** Separación de muestra para agregar en un tubo falcon LDL y en otro yema de huevo de gallina.



**Foto N° 12:** Retiramos el diluyente de transporte después del centrifugado para solo utilizar los espermatozoides



**Foto N° 13:** Espermatozoides separados de diluyente de transporte



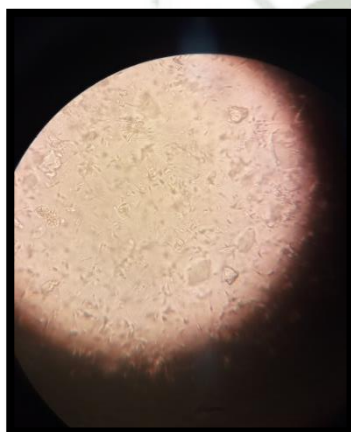
**Foto N° 14:** Colocamos en Congelador de semen de equino Butocrio.



**Foto N° 15:** Luego a un tubo falcon le colocamos LDL y al otro yema de huevo de gallina



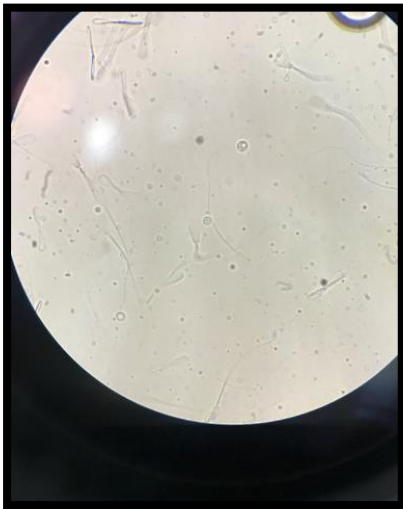
**Foto N° 16:** Tubo falcon de la mezcla de espermatozoides con Butocrio y LDL



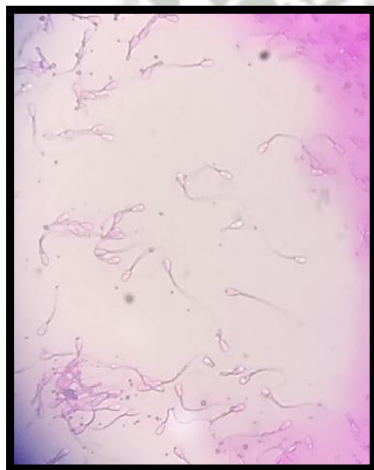
**Foto N° 17:** Evaluación de espermatozoides con los criopreservantes



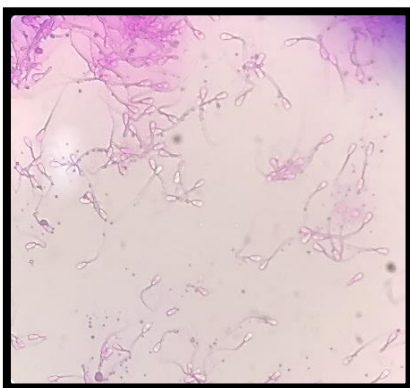
**Foto N° 18:** Evaluación de semen descongelado después de la criopreservación



**Foto N° 19:** Evaluación de motilidad en espermatozoides descongelados



**Foto N° 20:** En esta foto observamos evaluación de morfología con coloración de rosa de bengala



**Foto N° 21:** Observamos tinción Eosina-Nigrosina





*Universidad Católica de Santa María*

☎ (51 54) 382038 Fax:(51 54) 251213 ✉ [ucsm@ucsm.edu.pe](mailto:ucsm@ucsm.edu.pe) <http://www.ucsm.edu.pe> Apartado: 1350

AREQUIPA - PERÚ



VICERRECTORADO  
DE INVESTIGACIÓN

## CONSTANCIA

El que suscribe, Vicerrector de Investigación de la Universidad Católica de Santa María, hace constar que:

La Srta **XIMENA JENNIFER BARRIGA MARCAPURA**

Ha participado como tesista de pregrado en el proyecto de investigación **“Determinación de la calidad del semen crio preservado comercial utilizado en hatos lecheros, implicancia en la fertilidad e impacto en variables productivas”** financiado por el Fondo para la Investigación UCSM, durante el año 2017 en laboratorio de investigación “Biotecnología Animal”.

Se expide la presente a solicitud del interesado para los fines que considere pertinentes.

Arequipa, 27 de diciembre de 2017.

  
Dr. Gonzalo H. Dávila Del Carpio  
VICE RECTOR DE INVESTIGACIÓN  
Universidad Católica de Santa María