

## Adición de metil- $\beta$ -ciclodextrina cargada de colesterol sobre la criopreservación de semen de toros Holstein Friesian

### Addition of methyl- $\beta$ -cyclodextrin loaded with cholesterol (CLC) on the cryopreservation of semen of Holstein Friesian bulls

Hugo Paúl Viñán Díaz<sup>1</sup>, Juan Enrique Paucar Espinoza<sup>2,4</sup>, Enrique Alvarado Malca<sup>3</sup>

#### RESUMEN

Se evaluó el efecto de la adición de metil- $\beta$ -ciclodextrina cargada con colesterol (CLC) sobre la criopreservación de semen de toros Holstein Friesian a través de la valoración de las características seminales pre y pos-congelación. Se utilizaron cuatro toros de 3-4 años, obteniéndose 28 eyaculados, que fueron divididos en tres alícuotas, donde se agregó el CLC: 0, 1.5 y 2 mg de CLC por cada 120 millones de espermatozoides (T1, T2 y T3, respectivamente) a 37 °C y fueron incubados por 15 minutos. Las muestras fueron refrigeradas a 5 °C durante 18 horas para su estabilización. La congelación del semen se hizo en pajillas de 0.5 ml usando vapores de nitrógeno por 7 minutos y luego sumergidas en nitrógeno líquido. No se encontraron diferencias estadísticas entre tratamientos en todas las características del semen refrigerado. Los resultados pos-descongelación revelaron mejoras significativas en los tratamientos con colesterol, obteniendo una motilidad total del 67.73, 79.59 y 74.73%; integridad de membrana de 46.89, 60.43 y 55.06% y vitalidad de 63.26, 75.84 y 70.53% para T1, T2 y T3, respectivamente ( $p < 0.05$ ). No hubo diferencias significativas entre tratamientos con respecto a las anomalías morfológicas.

**Palabras clave:** toro; ciclodextrina; colesterol; criopreservación; semen

#### ABSTRACT

The effect of the addition of cholesterol-loaded methyl- $\beta$ -cyclodextrin (CLC) on the semen cryopreservation of Holstein Friesian bulls was assessed through the assessment of pre and post-freezing seminal characteristics. Four bulls of 3-4 years of age were used and 28 ejaculates were collected. The ejaculates were divided into three aliquots, where

<sup>1</sup> Facultad de Zootecnia, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú

<sup>2</sup> Banco Nacional de Semen, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú

<sup>3</sup> Departamento de Producción Animal, Facultad de Zootecnia, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú

<sup>4</sup> E-mail: [epaucar@lamolina.edu.pe](mailto:epaucar@lamolina.edu.pe)

Recibido: 18 de enero de 2019

Aceptado para publicación: 1 de octubre de 2019

the CLC was added: 0, 1.5 and 2 mg of CLC per 120 million sperm cells (T1, T2 and T3 respectively) at 37 °C and incubated for 15 minutes. The samples were refrigerated at 5 °C for 18 hours for stabilization. Semen was frozen in 0.5 ml straws using nitrogen vapours for 7 minutes and then immersed in liquid nitrogen. No statistical differences were found between treatments in all the characteristics of the refrigerated semen. The post-thawing results revealed significant improvements in the cholesterol treatments, obtaining a total motility of 67.73, 79.59 and 74.73%; membrane integrity of 46.89, 60.43 and 55.06%, and vitality of 63.26, 75.84 and 70.53% for T1, T2 and T3, respectively ( $p < 0.05$ ). There were no significant differences between treatments with respect to morphological abnormalities.

**Key words:** bull; cyclodextrin; cholesterol; cryopreservation; semen

## INTRODUCCIÓN

La inseminación artificial (IA) es una técnica que facilita el mejoramiento genético. Según el último censo nacional agropecuario de 2012, se tiene 36 982 unidades agropecuarias que utilizan la IA para el manejo reproductivo del ganado (SENAGRO, 2012). La criopreservación es una pieza clave en el procesamiento seminal que permite conservar semen, ovocitos y embriones durante tiempo indefinido. Sin embargo, durante la criopreservación se produce una disminución de la calidad seminal con respecto a la del semen fresco o refrigerado debido al shock térmico, pues se presentan daños bioquímicos y estructurales, especialmente a nivel de membrana plasmática (Hummersted *et al.*, 1990). Estas lesiones provocan la pérdida de componentes intracelulares como enzimas metabólicas y reducción de la motilidad, vitalidad espermática y la capacidad fertilizante del espermatozoide.

El tratamiento con colesterol incorporado a la membrana espermática por medio de ciclodextrinas podría disminuir estos daños, ayudando a preservar la viabilidad del semen pos-descongelación, mejorando la fluidez y estabilidad de la membrana en bajas temperaturas. En vacunos, Purdy y Graham (2004a) observaron diferencias significativas en viabilidad y motilidad entre espermatozoides tratados con ciclodextrinas cargadas de colesterol y sin ellas. Las ciclodextrinas

pueden saturarse previamente con colesterol, y van a servir como medio de transporte para incorporarlo a las membranas plasmáticas (Purdy y Graham, 2004b).

Este trabajo tuvo como objetivo determinar el efecto de la adición de metil- $\beta$ -ciclodextrina cargada con colesterol sobre la criopreservación de semen de toros Holstein Friesian, a través de la evaluación de las características seminales pre y pos-congelación del semen (motilidad total y progresiva, vitalidad, anomalías morfológicas e integridad y funcionalidad de membrana).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Lugar del Estudio

El trabajo de investigación se realizó en las instalaciones del laboratorio del Banco Nacional de Semen de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), ubicado en el distrito de la Molina, Lima-Perú. La zona presenta temperaturas mínimas promedio de 16.2 °C y máximas de 22.5 °C, humedad relativa promedio de 81% y precipitación anual de 10 mm.

### Animales Experimentales

Se trabajó con cuatro toros jóvenes Holstein Friesian que se encontraban en servicio en el Banco Nacional de Semen. Los

animales eran de fertilidad comprobada y estaban sujetos a un régimen de colección de semen de una vez por semana. Estaban alojados en corrales independientes, con piso de concreto y tierra, cercos de madera, provisto de sombras, comedero y bebedero, y con adecuada iluminación y ventilación. Todos los animales tenían un régimen de paseo semanal por 60 minutos. La alimentación fue en base de maíz chala (*Zea mays*) fresco y picado, suplementado con concentrado (14% proteína, 17.5% fibra y 68.5% NDT). El forraje se ofreció dos veces al día y el concentrado por las mañanas.

### **Ciclodextrinas Cargadas de Colesterol (CLC)**

La solución de CLC fue preparada según lo descrito por Purdy y Graham (2004). En un tubo de ensayo se disolvieron 200 mg de colesterol en 1 ml de cloroformo. En otro tubo de ensayo se diluyó 1 g de metil- $\beta$ -ciclodextrina en 2 ml de metanol. Se adicionó 450  $\mu$ l de la solución de colesterol a la solución de ciclodextrina y se mezcló hasta que la solución estuvo homogénea. En una caja Petri, se removió el solvente usando una corriente de nitrógeno gaseoso. Los cristales resultantes se dejaron secar 24 h, se pasaron a un recipiente de vidrio y se almacenaron a 22 °C. La solución de CLC se preparó agregando 50 mg de CLC a 1 ml de medio de dilución TRIS (300 mM Tris, 94.7 mM de ácido cítrico, 27.75 mM de glucosa y 100 ml de agua desionizada y esterilizada, pH próximo a 7 y osmolaridad cercana a 330 mOsm/l), se mezcló con un vórtex y se incubó en baño maría a 37 °C hasta el momento de ser utilizado.

### **Evaluación del Semen**

El semen fue colectado una vez por semana, utilizando un toro como *teaser*, fijado en una guillotina, bajo sombra, y con piso adecuado para evitar deslizamientos. A los toros, previo a la colección, se les dio un paseo y se les hizo realizar falsas montas. Se utilizó una

vagina artificial (IMV, Francia). Los resultados de las evaluaciones del semen se presentan en porcentaje.

#### *Concentración y motilidad espermática*

La concentración espermática y la motilidad fueron determinadas en el módulo de Motilidad y Concentración del Sistema Computarizado (CASA) AndroVision® con microscopio Zeiss AxioScope de Minitube.

#### *Vitalidad espermática*

Para el conteo de los espermatozoides vivos se utilizaron las tinciones de eosina y nigrosina al 2%. Se colocó una gota de 5  $\mu$ l de semen a un extremo de una lámina portaobjeto precalentada a 37 °C y dos gotas de 5  $\mu$ l de cada colorante. Se homogenizó la gota de semen con la gota de eosina durante 20 s para que el colorante penetre en los espermatozoides. Luego, esta mezcla se combinó con la nigrosina que sirvió de contraste. Se realizó el frotis y se dejó secar a temperatura ambiente de laboratorio. Las láminas fueron observadas al microscopio con un aumento de 40x.

#### *Anormalidades espermáticas*

Se utilizó la lámina anterior y se observó al microscopio a 400x. Se contabilizaron 200 espermatozoides por conteo y se realizaron tres conteos por muestra.

#### *Funcionalidad de la membrana espermática*

Se utilizó la prueba de HOST (*Hypo Osmotic Swelling Test*), siguiendo el protocolo de Correa y Zavos (1994). Se contaron 200 espermatozoides en el microscopio de contraste de fase a 40X. Se consideraron espermatozoides con membrana funcional (+) los que reaccionaron al estrés hiposmótico mediante la hinchazón de la parte distal de la cola espermática.

## Procesamiento del Semen

Luego de obtenido el semen se tomó una alícuota para las evaluaciones seminales. El semen fue prediluido (1/1) con el dilutor Andromed® (Minitube). La muestra de semen se dividió en tres alícuotas a las que se agregó a cada tratamiento 0, 1.5 y 2 mg de CLC por cada 120 millones de espermatozoides, se incubaron por 15 min a temperatura ambiente de laboratorio (22 °C) como describe Purdy y Graham (2004a). Se añadió el dilutor restante para ser envasado con una concentración de  $30 \times 10^6$  millones de espermatozoides/ml por dosis en pajillas de 0.5 ml (IMV, Francia) y selladas con alcohol polivinílico.

Para la congelación, se hizo un descenso de la temperatura desde 20 °C hasta 5 °C en 3 h y luego se estabilizó durante 18 horas en refrigeradora. La congelación de las pajuelas se hizo por medio de vapores de nitrógeno líquido en 7 min descender a -140 °C y luego se sumergieron directamente en el nitrógeno líquido. El descongelamiento de las pajillas se realizó a 38 °C durante 15-25 s y se evaluó la motilidad, vitalidad, anormalidades y funcionalidad de la membrana espermática.

## Análisis Estadístico

Para la determinación del efecto de las CLC se realizó un análisis de diseño en bloques completamente al azar con submuestreos. Para la comparación múltiple de medias se aplicó la prueba de Tukey. Además, fue necesario la transformación arcoseno de los porcentajes de motilidad e integridad de membrana para proceder al análisis estadístico.

Se utilizó el modelo aditivo lineal  $Y_{ijk} = \mu + T_i + B_j + E_{ij} + d_{ijk}$ , donde:  $Y_{ijk}$  = Es la motilidad de la  $j$ -ésima repetición al aplicarse el  $i$ -ésimo tratamiento de CLC;  $\mu$  = Media general;  $T_i$  = Efecto del  $i$ -ésimo tratamiento de CLC;  $B_j$  = Efecto del  $j$ -ésimo genotipo;  $E_{ij}$  = Error experimental, y  $d_{ijk}$  = Error del muestreo.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Efecto del CLC sobre el Semen Refrigerado

No hubo diferencias significativas entre los tratamientos para las variables de evaluación espermática (Cuadro 1), posiblemente a que la adición de CLC solo tiene un efec-

Cuadro 1. Efecto de la adición de ciclodextrinas cargadas de colesterol (CLC) sobre las características microscópicas de semen refrigerado de toros Holstein Friesiar (media  $\pm$  error estándar)

	0 mg CLC (T1)	1.5 mg CLC (T2)	2 mg CLC (T3)
Motilidad total (%)	92.65 $\pm$ 0.84 <sup>a</sup>	94.27 $\pm$ 0.94 <sup>a</sup>	93.67 $\pm$ 0.99 <sup>a</sup>
Motilidad progresiva (%)	89.74 $\pm$ 0.91 <sup>a</sup>	91.16 $\pm$ 1.05 <sup>a</sup>	90.04 $\pm$ 1.07 <sup>a</sup>
Vitalidad (%)	89.01 $\pm$ 0.65 <sup>a</sup>	90.85 $\pm$ 0.67 <sup>a</sup>	90.15 $\pm$ 0.68 <sup>a</sup>
Host (%)	84.78 $\pm$ 0.67 <sup>a</sup>	88.14 $\pm$ 0.68 <sup>a</sup>	86.99 $\pm$ 0.74 <sup>a</sup>
Morfología (%)	5.04 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	4.57 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	4.86 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>
Espermios inmóviles (%)	7.35 $\pm$ 0.84 <sup>a</sup>	5.73 $\pm$ 0.94 <sup>a</sup>	6.33 $\pm$ 0.99 <sup>a</sup>

Superíndices diferentes dentro de filas indican diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ )

Cuadro 2. Efecto de la adición de de ciclodextrinas cargadas de colesterol (CLC) sobre las características microscópicas de semen pos-descongelación de toros Holsteir Friesian (media  $\pm$  error estándar)

	0 mg CLC (T1)	1.5 mg CLC (T2)	2 mg CLC (T3)
Motilidad total (%)	67.73 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	79.59 $\pm$ 0.77 <sup>b</sup>	74.73 $\pm$ 0.79 <sup>c</sup>
Motilidad progresiva (%)	54.73 $\pm$ 0.72 <sup>a</sup>	63.42 $\pm$ 0.83 <sup>b</sup>	55.83 $\pm$ 0.85 <sup>a</sup>
Vitalidad (%)	63.26 $\pm$ 0.68 <sup>a</sup>	75.84 $\pm$ 0.76 <sup>b</sup>	70.53 $\pm$ 0.87 <sup>c</sup>
Host (%)	46.89 $\pm$ 0.59 <sup>a</sup>	60.43 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup>	55.06 $\pm$ 0.63 <sup>c</sup>
Morfología (%)	5.14 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>	4.54 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>	4.75 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>
Espermios inmóviles (%)	32.27 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	20.41 $\pm$ 0.77 <sup>b</sup>	25.27 $\pm$ 0.79 <sup>c</sup>

Superíndices diferentes dentro de filas indican diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ )

to pos-descongelación del semen (Moce y Graham, 2014).

La motilidad total inicial fue superior a la reportada por Bach (2009) de 67.9% con 0 y 2 mg de CLC, posiblemente debido a que el espermia tuvo un mayor tiempo de estabilización (18 horas) durante la fase de refrigeración. La motilidad progresiva tampoco presentó diferencias significativas entre tratamientos; por otro lado, Rajoriya *et al.* (2014) trabajando con búfalos obtuvieron motilidades progresivas de 76.1 y 77.6% utilizando 0 y 2 mg de CLC.

No se encontró diferencia significativa entre tratamientos para la prueba de vitalidad espermática, resultado similar al reportado por Rajoriya *et al.* (2014), aunque con valores inferiores con 0 mg de CLC (80.6%) y con 2 mg de CLC (82.0%). Tampoco hubo diferencia significativa en la prueba de integridad de membrana citoplasmática entre tratamientos. Por otro lado, Madrid-Bury *et al.* (2005) reportaron valores Host entre 70.2 y 73.5%.

Los valores de espermatozoides anormales fueron de 5.0, 4.6 y 4.9% para T1, T2 y T3, respectivamente, no existiendo diferencias significativas entre tratamientos; no obs-

tante, fueron valores inferiores al 10.3 y 9.7% reportados por Mejía (2017) y Ramonez (2013), respectivamente, en semen refrigerado. Tampoco se registraron diferencias significativas entre tratamientos en la variable de espermios inmóviles (Cuadro 1); resultados que difieren con Gallardo y Vargas (2015), quienes evaluaron semen bovino en la etapa de precongelación utilizando los dilutores AndroMed (Minitube), BioXcell (MV Technologies) y Triladyl (Minitube) obteniendo 17, 25 y 32% de espermatozoides inmóviles, respectivamente.

### Efecto del CLC sobre el Semen Pos-Descongelación

T2 presentó una mayor motilidad que T3 y T1 ( $p < 0.05$ ; Cuadro 2), logrando una diferencia porcentual de 11.86% frente a T1; lo cual concuerda con Mocé *et al.* (2014), quienes obtuvieron 78.4% de motilidad total utilizando 2 mg de CLC frente al control con 75.2%. Otros autores obtuvieron motilidades más bajas que el presente estudio, aunque siempre superiores a los tratamientos control (Purdy y Graham, 2004; Moraes *et al.*, 2010; Amorim *et al.*, 2009). Así mismo, Mocé y Graham (2006) no encontraron diferencias significativas entre el control y el tratamiento con 2 mg de CLC (58% de motilidad total).

Estos resultados permiten indicar que los tratamientos con CLC en el semen fresco redujeron el daño del esperma producido por los cambios de temperatura durante la criopreservación, posiblemente debido a una mayor estabilización de la membrana plasmática, producto del ingreso de colesterol a la misma (Purdy y Graham, 2004a; Moore *et al.*, 2005; Mocé *et al.*, 2010). La concentración más utilizada en los trabajos revisados en la literatura científica se sitúa entre 1 y 2.5 mg para 120 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/ml, correlacionándose negativamente con la fertilidad en concentraciones inferiores a 0.5 mg o superiores a 4 mg de CLC (Mocé *et al.*, 2010).

Se observaron diferencias significativas entre T1 y T2 y entre T2 y T3 en motilidad progresiva ( $p < 0.05$ ; Cuadro 2). Datos similares fueron reportados por Rajoriya *et al.* (2014) con 66.4% para el tratamiento con 2 mg de CLC y de 5.9% para el control, y muy superiores al 32% reportado por Mocé *et al.* (2014) utilizando 2 mg de CLC, al 18 y 6% con 2 mg y 4 mg de CLC reportado por Moce y Graham (2014) y al 16% reportado por Moraes *et al.* (2010) utilizando 1.5 mg de CLC. Catena y Cabodevila (1999) indican que el semen de buena calidad recientemente descongelado presenta una motilidad progresiva de 40-50%, mientras que Awad y Graham (2002) indican que con el tratamiento con CLC se obtiene una mayor proporción de espermatozoides viables y progresivamente móviles después de la criopreservación. No obstante, con base a los resultados obtenidos, se deduce que a mayor cantidad de CLC por tratamiento, la motilidad total y progresiva tiende a disminuir, posiblemente debido a la saturación de la membrana plasmática con colesterol, lo cual afectaría su normal funcionamiento (Purdy y Graham, 2004b).

La viabilidad espermática fue significativamente diferente entre los tres tratamientos, siendo mejor en T2 (75.84%) ( $p < 0.05$ ). Otros autores indican una mayor vitalidad (72-74%) utilizando 2 mg de CLC (Mocé *et al.*,

2014; Rajoriya *et al.*, 2014). Así mismo, Mocé y Graham (2014) encontraron una viabilidad espermática en la descongelación de 38% en el tratamiento control y de 61 y 48% con 2 mg y 4 mg de CLC, respectivamente, mientras que Bach (2009) obtuvo una viabilidad de 48.4 y 50.4% para el grupo control y el de 2 mg de CLC, respectivamente. La disminución encontrada en este estudio fue, sin embargo, menor a la reportado por Thomas *et al.* (1998), quienes afirman que se produce una disminución del 50% de viabilidad espermática durante el proceso de criopreservación, debido principalmente al efecto de la temperatura y la presión osmótica, que ocasionan cambios en la permeabilidad, composición lipídica de las membranas espermáticas y en el líquido intracelular. Esto permite suponer que los espermatozoides tratados con CLC tienen una mayor tolerancia a la criopreservación, ya que aumentan su ratio colesterol: fosfolípidos, producto del ingreso de colesterol a la membrana, volviéndose resistentes a los efectos de la transición de fase lipídica causado por el shock térmico.

La reacción a la prueba de endosmosis (HOST) indicó diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0.05$ ; Cuadro 2), en concordancia con resultados reportados por otros autores (Purdy y Graham, 2004; Amorim *et al.*, 2009), mientras que Mocé y Graham (2006) obtuvieron una integridad de membrana de 62% con 2 mg de CLC y Moncayo (2016) reportó valores de 68.7 y 61.8% para toros Holstein utilizando los dilutores Triladyl y Andromed, respectivamente. No obstante, Purdy *et al.* (2005) obtuvieron mayores valores HOST (76% con 1.5 mg de CLC y 60% para el grupo control). Las membranas íntegras permiten la capacitación espermática, la penetración de los revestimientos del ovocito, la unión con la zona pelúcida y la fusión de la membrana (Rodríguez *et al.*, 1997). Las membranas celulares son las estructuras celulares que sufren mayor daño en los procesos de congelación, debido a la pérdida de fluidez de sus componentes lipídicos (Parks y Graham, 1992).

Hubo diferencia significativa en la morfología espermática entre T1 y T2 y entre T1 y T3 ( $p < 0.05$ ; Cuadro 2). Palacios (2015), por otro lado, encontró una mayor presencia de anomalías (11%). Los resultados obtenidos indican que la inclusión de CLC en el semen no tuvo relación directa con el porcentaje de anomalías presentes en el espermatozoa.

Por último, se observó diferencia significativa entre tratamientos con relación a los porcentajes de espermios inmóviles ( $p < 0.05$ ; Cuadro 2). Por otro lado, Mejía (2017) reportó un porcentaje de inmovilidad extremo del 60.8%. El valor de espermio inmóvil se relaciona directamente con el porcentaje de motilidad total (79.59%).

## CONCLUSIONES

- La adición de metil- $\beta$ -ciclodextrina cargada de colesterol previa a la congelación del semen bovino mejoró todos los parámetros espermáticos pos-descongelación (motilidad total, motilidad progresiva, vitalidad e integridad de membrana), con excepción de la morfología.
- Los mejores resultados se observaron con la adición de 1.5 mg de CLC en 120 millones de espermatozoides/ml).

## LITERATURA CITADA

1. **Amorim EA, Graham JK, Spizziri B, Meyers M, Torres CA. 2009.** Effect of cholesterol or cholesteryl conjugates on the cryosurvival of bull sperm. *Cryobiology* 58: 210-214. doi: 10.1016/j.cryobiol.2008.12.007
2. **Awad MM, Graham JK. 2002.** Effect of adding cholesterol to bovine spermatozoa on motility parameters and cell viability after cryopreservation. *Cryobiology* 45: 256-257.
3. **Bach KD. 2009.** Effects of cholesterol on bovine sperm survival during cooling & freezing. MSci Thesis. USA: Cornell University. 84 p.
4. **Catena M, Cabodevila J. 1999.** Evaluación de semen bovino congelado. En: Simposio Internacional de Reproducción Bovina (UNCPBA). Tandil, Argentina.
5. **Correa JR, Zavos PM. 1994.** The hypoosmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. *Theriogenology* 42: 351-360. doi: 10.1016/0093-691X(94)-90280-1
6. **Gallardo J, Vargas C. 2015.** Evaluación de tres diluyentes para criopreservar semen bovino de toros cruce Sahiwal (*Bos taurus*) en el trópico húmedo. Tesis de Ingeniero Agropecuario. Santo Domingo de los Tsáchilas, Ecuador: Univ. de las Fuerzas Armadas. 70 p.
7. **Hummerstedt RH, Graham JK, Nolan JP. 1990.** Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl* 11: 73-88. doi: 10.1002/j.1939-4640.1990.tb01583.x
8. **Madrid-Bury N. 2005.** ¿Es posible predecir la fertilidad en los toros? En: González-Stagnaro C, Soto-Belloso E (eds). Manual de ganadería doble propósito. Maracaibo, Venezuela: Astro Data. p 631-635.
9. **Mejía E. 2017.** Evaluación pre y post congelación del semen obtenido con vagina artificial y electroeyaculador en el ganado criollo. Tesis de Magíster. Cuenca, Ecuador: Univ. de Cuenca. 54 p.
10. **Mocé E, Graham JK. 2006.** Cholesterol-loaded cyclodextrins added to fresh bull ejaculates improve sperm cryosurvival. *J Anim Sci* 84: 826-833. doi: 10.2527/2006.844826x
11. **Mocé E, Purdy PH, Graham JK. 2010.** Treating ram sperm with cholesterol loaded cyclodextrins improves cryosurvival. *Anim Reprod Sci*

- 118: 236-247. doi: 10.1016/j.anire-prosci.-2009.06.013
12. **Mocé E, Graham J.K. 2014.** Cholesterol-loaded cyclodextrins added to fresh bull ejaculates improve sperm cryosurvival. *J Anim Sci* 84: 826-833.
  13. **Mocé E, Tomás C, Blanch E, Graham JK. 2014.** Effect of cholesterol-loaded cyclodextrins on bull and goat sperm processed with fast or slow cryopreservation protocols. *Animal* 8: 771-776. doi: 10.1017/S175173111-4000226
  14. **Moore AI, Squires EL, Graham JK. 2005.** Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryobiology* 51: 241-249. doi: 10.1016/j.cryobiol.2005.07.004
  15. **Moncayo S. 2016.** Evaluación de la calidad seminal de reproductores bovinos antes y después del proceso de criopreservación. Tesis de Ingeniero en Biotecnología de los Recursos Naturales. Quito, Ecuador: Univ. Politécnica Salesiana. 69 p.
  16. **Moraes EA, Graham JK, Torres CA, Meyers M, Spizziri B. 2010.** Delivering cholesterol or cholestanol to bull sperm membranes improves cryosurvival. *Anim Reprod Sci* 118: 148-154. doi: 10.1016/j.anireprosci.2009.08.002
  17. **Palacios L. 2015.** Evaluación de dos diluyentes caseros y un diluyente comercial para criopreservar semen bovino de las razas Brown Swiss y Patua (*Bos taurus*) en el trópico húmedo. Tesis de Ingeniero Agropecuario. Santo Domingo, Ecuador: Univ. de las Fuerzas Armadas. 90 p.
  18. **Parks J, Graham J. 1992.** Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 38: 209-222. doi: 10.1016/0093-691x(92)90231-f
  19. **Purdy PH, Graham JK. 2004.** Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. *Cryobiology* 48: 36-45. doi: 10.1016/j.cryobiol.-2003.12.001
  20. **Purdy PH, Graham JK. 2004.** Effect of cholesterol to bull sperm membranes on sperm capacitation, the acrosome reaction, and fertility. *Biol Reprod* 71: 522-527. doi: 10.1095/biolreprod.-103.025577
  21. **Purdy PH, Fox MH, Graham JK. 2005.** The fluidity of Chinese hamster ovary cell and bull sperm membranes after cholesterol addition. *Cryobiology* 51: 102-112. doi: 10.1016/j.cryobiol.-2005.05.004
  22. **Rajoriya J, Prasad J, Ghosh S, Snehal S, Ramteke N, Barik G, Das Y, et al. 2014.** Cholesterol loaded cyclodextrin increases freezability of buffalo bull (*Bubalus bubalis*) spermatozoa by increasing cholesterol to phospholipid ratio. *Vet World* 7: 702-706. doi: 10.14202/vetworld.2014.702-706
  23. **Ramón J. 2013.** Evaluación de dos agentes crioprotectores no permeables y un diluyente comercial (triladyl) en la congelación de semen bovino. Tesis de Magister. Cuenca, Ecuador: Univ. de Cuenca. 89 p.
  24. **Rodríguez H, Larsson B, Perstoft H. 1997.** Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. *Reprod Fert Develop* 9: 297-308. doi: 10.1071/r96081
  25. **Thomas CA, Garner DL, DeJarnette JM, Marshall CE. 1998.** Effect of cryopreservation of bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. *Biol Reprod* 58: 786-793. doi: 10.1095/biolreprod58.3.786