

**UNIVERSIDAD DE CUENCA**



**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**  
**MAESTRÍA EN REPRODUCCIÓN ANIMAL**

**Tema:**

**“Efecto del extracto del *Aloe vera (Aloe barbadensis miller)* en la congelabilidad del semen porcino”**

Tesis previa a la obtención del título de  
Magíster en reproducción animal.

**AUTOR:** MVZ. Manuel Humberto Guachún Yanza.

**DIRECTOR:** MVZ. Diego Valdez Jojoa. Mg.Sc.

CUENCA, ECUADOR

2017



## RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la adición del extracto de Aloe vera en un medio de criopreservación sobre la congelabilidad del semen porcino. Se utilizaron 16 eyaculados de 4 verracos sexualmente maduros, de 1 a 3 años, adaptados y mantenidos en una granja en el cantón Guachapala, los análisis seminales y la congelación se realizó en el laboratorio de Biotecnologías de la Reproducción Animal de la Universidad de Cuenca; los eyaculados fueron divididos en dos alícuotas para los tratamientos: T1.- Congelación de semen porcino en diluyente a base de citrato de sodio y yema de huevo; y, T2.- Congelación de semen porcino en diluyente a base de citrato de sodio, yema de huevo más 10% v/v de Aloe Vera del agua de preparación. Se valoró posdescongelación parámetros de: motilidad individual progresiva, vitalidad e integridad de membrana (HOS Test). Se utilizó un diseño completamente al azar. El análisis estadístico se realizó con prueba *t* de student y U de Mann-Whitney. No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos ( $P > 0,05$ ) sobre las variables: motilidad, vitalidad y anormalidades; sin embargo, en HOS Test se obtuvo porcentajes más altos ( $P < 0,05$ ) en T2 en comparación con T1 (respectivamente:  $15,54 \pm 0,50\%$  y  $13,89 \pm 0,65\%$ ). Se concluye que la adición del extracto de Aloe vera al 10% v/v del agua de preparación de los medios no produjo diferencia en los parámetros de motilidad, viabilidad; no obstante, disminuyó los efectos deletéreos de la crioconservación sobre la integridad de la membrana plasmática del espermatozoide porcino.

**Palabras claves:** SEMEN PORCINO, CRIOPRESERVACIÓN, ADITIVOS, ALOE VERA.



## ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the effect of the addition of Aloe vera extract in a cryopreservation medium on the freezing of porcine semen. We used 16 ejaculates of 4 sexually mature boars, from 1 to 3 years, adapted and maintained in a farm in the Guachapala canton, the seminal analyzes and the freezing was carried out in the laboratory of Biotechnologies of the Animal Reproduction of the University of Cuenca; The ejaculates were divided into two aliquots for the treatments: T1.- Freezing of porcine semen in diluent based on sodium citrate and egg yolk; And, T2.- Freezing of porcine semen in diluent based on sodium citrate, egg yolk plus 10% v / v of Aloe Vera in the preparation water. Post-freeze parameters were: progressive individual motility, vitality and membrane integrity (HOS Test). A completely random design was used. Statistical analysis was performed with Student's t test and Mann-Whitney U test. There were no significant differences between the treatments ( $P > 0.05$ ) on the variables: motility, vitality and abnormalities; However, HOS Test showed higher percentages ( $P < 0.05$ ) in T2 compared to T1 (respectively:  $15.54 \pm 0.50\%$  and  $13.89 \pm 0.65\%$ ). It is concluded that the addition of the Aloe vera extract to 10% v / v of the media preparation water produced no difference in the parameters of motility, viability; However, decreased the deleterious effects of cryopreservation on the integrity of the plasma membrane of porcine spermatozoa.

Keywords: PORCINE SEMEN, CRYOPRESERVATION, ADDITIVES, ALOE VERA.



## INDICE

RESUMEN.....	2
ABSTRACT .....	3
LISTA DE CUADROS.....	6
ABREVIATURAS Y SIMBOLOGIA .....	11
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....	12
1.1    Hipótesis. ....	15
1.2    Objetivos. ....	15
1.2.1    Objetivos General. ....	15
1.2.2    Objetivos específicos. ....	15
CAPÍTULO II: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	16
2.1    Criopreservación de semen porcino.....	16
2.1.1    Diluyentes de criopreservación porcino. ....	17
2.1.2    Aditivos en la criopreservación espermática porcina. ....	19
2.1.3    Antioxidantes.....	19
2.2    Aloe Vera ( <i>Aloe Barbadensis miller</i> ).....	22
2.2.1    Gel de Aloe Vera.....	23
2.2.2    Aloe Vera en la criopreservación seminal. ....	25
2.3    Procedimientos para la crio preservación seminal porcina. ....	26
2.3.1    Extracción, predilucción y enfriamiento. ....	26
2.3.2    Evaluación inicial.....	26
2.3.3    Dilución y enfriamiento.....	27
2.3.4    Congelación. ....	27
2.3.5    Almacenamiento. ....	29
2.4    Evaluación seminal pos congelación.....	30
CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
3.1.    Materiales.....	32
3.1.1.    Físicos.....	32
3.1.2.    Químicos.....	32
3.1.3.    Biológicos.....	32
3.2.    Métodos. ....	33
3.2.1.    Ubicación de la investigación. ....	33
3.2.2.    Descripción de las unidades de análisis. ....	33
3.2.3.    Evaluación, procesamiento y criopreservación del semen de verraco. ....	34



3.2.4.	Diseño experimental. ....	37
3.2.5.	Tratamientos. ....	38
3.2.6.	Variables de la investigación.....	38
3.2.7.	Análisis estadístico.....	39
CAPÍTULO IV: RESULTADOS .....		40
4.1.	Efecto generado por los tratamientos.....	40
CAPÍTULO V: DISCUSIÓN .....		41
CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....		43
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....		44
ANEXOS.....		52



## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1.- Componentes químicos del gel de aloe vera.....	23
Cuadro 2.-Concentración compuestos activos/ml presentes en el gel de aloe vera.	35
Cuadro 3. Comportamiento de las variables de evaluación seminal frente al efecto generado por los tratamientos.....	40



### CLÁUSULA DE DERECHOS DE AUTOR.

Manuel Humberto Guachún Yanza autor de la tesis "Efecto del extracto del Aloe vera (*Aloe barbadensis miller*) en la congelabilidad del semen porcino", reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito previo a la obtención del título de Magister en Reproducción Animal. El uso que la Universidad de Cuenca hiciera de este trabajo, no implica afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autor.

Cuenca, a 18 de Noviembre de 2016.

Manuel Humberto Guachún Yanza

CI: 0104296074

-



## CLÁUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL.

Manuel Humberto Guachún Yanza autor de la tesis "Efecto del extracto del Aloe vera (Aloe barbadensis miller) en la congelabilidad del semen porcino", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, a 18 de Noviembre de 2016.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Manuel Humberto Guachún Yanza".

Manuel Humberto Guachún Yanza

CI: 0104296074





## AGRADECIMIENTO

A mis padres Luis Alberto Guachún y María Angeles Yanza quienes fueron las personas que me dieron el respaldo para llegar a ser un profesional en el área de Medicina Veterinaria, con su esfuerzo y empeño en verme un profesional.

A mi esposa Bertha Rocano que desde que he formado una familia me ha apoyado incondicional y siempre ha sido mi mano en el caminar de la vida.

Quiero expresar mi más sinceros agradecimiento a mi Director de tesis el MVZ. Diego Valdez Jojoa. Mg.Sc. Por apoyarme en este proyecto de investigación.

Manuel Humberto



## DEDICATORIA

Dedico este trabajo primero a Dios, luego a mi esposa Bertha Rocano quien es mi apoyo incondicional para poder lograr estos objetivos.

A mis hijos Jefferson Emmanuel y Nathaly Belén que son la inspiración de lucha y esfuerzo para alcanzar todas las metas planteadas, con el fin de brindarles un mejor porvenir.

Manuel Humberto



## ABREVIATURAS Y SIMBOLOGIA

<b>AC</b>	Agua de coco
<b>AE</b>	Anormalidad espermática
<b>AG</b>	Ácidos grasos
<b>AV</b>	Aloe vera
<b>BHT</b>	Hidroxitolueno Butilado
<b>BSA</b>	Albúmina sérica bovina
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>EG</b>	Etilenglicol
<b>ERO</b>	Elementos reactivos al oxígeno
<b>GSH</b>	Glutación
<b>HEPES</b>	Acido N-2hidroxiethylpiperazina-N-2-etanosulfónico
<b>HOS</b>	Solución hipoosmótica
<b>HOST</b>	Test de solución hipoosmótica
<b>H2O2</b>	Peróxido de hidrógeno
<b>MIP</b>	Motilidad individual progresiva
<b>MOPSn</b>	Acido 2-N-morfolino etanosulfónico
<b>NADH</b>	Nicotina-adenina-dinucleótido
<b>ORT</b>	test de resistencia osmótica
<b>P</b>	Significancia
<b>PG</b>	Propilenglicol
<b>PVP</b>	Polivinil pirrolidona
<b>R</b>	Repetición
<b>ROS</b>	Radicales del estrés oxidativo
<b>SE</b>	Error estándar
<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa
<b>TRIS</b>	Tris-hidroximetil aminometano
<b>VE</b>	Vitalidad espermática



## CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

La criopreservación de semen es una biotecnología importante para el mantenimiento y la diversidad genética de muchas especies animales. A pesar de los avances alcanzados hasta el momento en la criopreservación de semen, se evidencia la necesidad de nuevos estudios vislumbrando el uso de otras sustancias que pueden ofrecer mayor protección a la célula espermática (Souza *et al.*, 2014). El proceso de crioconservación reduce la capacidad fecundante del semen porcino debido a la alta sensibilidad del espermatozoide al choque por frío y al daño peroxidativo por la composición de la membrana plasmática (niveles elevados de fosfolípidos insaturados y bajos niveles de colesterol); el proceso de enfriamiento, congelación y descongelación inducen cambios de la membrana espermática desestabilizándola y alterando la homeostasis del calcio, dañando el acrosoma y ocasionando trastornos lipídicos (Yeste, 2015). En definitiva, el estrés que el proceso de congelación causa a la estructura de la célula está relacionado con la circulación del agua a través de la membrana y la deshidratación, así como con la posibilidad de que se forme hielo intracelular si el enfriamiento es rápido (González, 2010).

Se han realizado diferentes intentos para contrarrestar los efectos detrimentales generados por los protocolos de criopreservación, entre los cuales destacan la búsqueda de marcadores de congelabilidad, la selección y preparación de espermatozoides y la suplementación de los medios de congelación y descongelación con plasma seminal, antioxidantes y otros aditivos (Yeste, 2015).

Los protocolos de criopreservación de semen porcino requieren centrifugar la parte rica de espermatozoides del semen; con lo que se pierde enzimas responsables de la metabolización de los Radicales del Estrés Oxidativo (ROS) y la disminución de los compuestos antioxidantes en el medio extracelular (Williams, 2013). Los daños espermáticos causados por los ROS se generan durante la congelación y descongelación e incluso en el almacenamiento en nitrógeno líquido. Para reducir el efecto de los ROS se ha empleado desde el suministro de dietas alimenticias a los verracos suplementadas con selenio para mejorar la viabilidad espermática en



semen fresco y refrigerado, hasta la suplementación de antioxidantes a los medios de congelación-descongelación como la vitamina E, Glutation reducido, Ácido ascórbico (Bathgate, 2011), así como el uso de extracto de plantas como el de hinojo, aceite de salvado de arroz, romero, Te verde, agua de coco y otros (Yeste, 2015).

Domínguez *et al.*, (2012) indican que el extracto de Aloe vera contiene sustancias químicas como vitaminas, minerales, enzimas, lípidos, compuestos orgánicos y aminoácidos; los fitoquímicos activos del mucílago (gel) como el ácido ascórbico, tocoferoles (Vitamina E) y compuestos fenólicos son capaces de reducir los radicales libres que causan las reacciones de oxidación, dándole al aloe vera la propiedad de antioxidante.

En estudios realizados sobre la criopreservación espermática empleando Aloe Vera como aditivo o como crioprotector en diluyentes de congelación para espermatozoides de otras especies de animales, se determinó que en los ovinos al congelar semen con diluyentes en combinación con el extracto señalado y yema de huevo se pudo obtener una tasa de motilidad progresiva de hasta 20% superior al testigo (60% vs 40%) al emplear una concentración de 1:1 con el medio a base de agua de coco y citrato de sodio antes de ser adicionado yema de huevo. Valores superiores al 50% de aloe vera resultaron nocivos. Al emplear el extracto de Aloe vera al 20% en la criopreservación de semen ovino como crioprotector en reemplazo de la yema de huevo en diluyentes a base de agua de coco, fue ineficaz como crioprotector externo debido probablemente a la viscosidad del gel mucilaginoso de esta planta de modo que para obtener los beneficios del aloe vera, el diluyente a preparar debe contener yema de huevo (Gutiérrez *et al.*, 2006).

La información existente del uso de Aloe vera en la criopreservación de semen porcino es escasa. Sin embargo, su empleo en la criopreservación espermática de otras especies a resultado beneficioso, probablemente, debido a las glicoproteínas presentes en su estructura y a que su actividad biológica estimula la proliferación celular, además de actuar como antioxidante al disminuir las concentraciones de peróxidos lipídicos de alto nivel (Toledo, 2003).



Investigaciones realizadas demostraron que las defensas propias de los espermatozoides porcinos contra los ROS están mucho más reducidas que en otras especies y que el refuerzo de estas defensas mediante la adición de antioxidantes a los diluyentes tiene un mayor efecto en el esperma porcino (Bathgate, 2011), al emplear el extracto gel de Aloe Vera, gracias a algunos de sus compuestos con propiedades antioxidantes, se esperó mejorar la calidad esperma porcino posdescongelación; con el propósito probar lo expuesto, en esta investigación se analizó la adición de aloe vera que sustituye el 10% del volumen total de agua utilizado en la preparación de un diluyente de congelación seminal a base de citrato de sodio y yema de huevo.



## **1.1 Hipótesis.**

La adición del gel de Aloe vera, que sustituye un 10% del volumen total de agua utilizado para la preparación de un diluyente de congelación a base de citrato de sodio y yema de huevo, genera una variación positiva en los parámetros de viabilidad de los espermatozoides porcinos descongelados.

## **1.2 Objetivos.**

### **1.2.1 Objetivos General.**

Evaluar el efecto de la adición del extracto del Aloe vera (*Aloe barbadensis miller*), que sustituye un 10% del volumen total de agua necesario para la preparación de un medio de congelación a base de citrato de sodio y yema de huevo, sobre la congelabilidad del semen porcino.

### **1.2.2 Objetivos específicos.**

Evaluar la viabilidad espermática pos-descongelación de semen porcino criopreservado mediante la vitalidad, motilidad e integridad de la membrana plasmática.



## CAPÍTULO II: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Criopreservación de semen porcino.

La criopreservación de semen de verraco permite preservar a los espermatozoides por un período de tiempo indefinido si es mantenido en nitrógeno líquido a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Cosme, 2005) en la que se interrumpe el metabolismo celular, lo que permite mantener indefinidamente el estado celular y la capacidad fecundante de los espermatozoides una vez descongelados, proporcionando al porcicultor mejores opciones para un adecuado manejo reproductivo (Córdova *et al.*, 2005; Mercado, 2011).

Los procedimientos de criopreservación y descongelación infligen daños que reducen la capacidad fecundante del espermatozoide y el comportamiento reproductivo del verraco, daños que se deben en gran parte a la alta sensibilidad de los espermatozoides de cerdo al choque por frío y al desbalance en la relación colesterol\_fosfolípidos de la membrana espermática que se desestabiliza por los procesos de criopreservación, afectando la homeostasis del calcio así como la integridad del acrosoma y del ADN (Mercado, 2011; Yeste, 2015). Posiblemente estas serían las causas de una baja supervivencia espermática y una fertilidad menor en comparación con el semen fresco o refrigerado, conllevando a una utilización reducida de semen congelado de verraco en la inseminación (Córdova *et al.*, 2005).

Medrano, (2005) indica que la exposición del espermatozoide porcino a bajas temperaturas, genera una capacitación espermática con cambios en la estructura lipídica de la membrana, provocando cambios en su permeabilidad, así como una reducción en la eficiencia de las enzimas homeostáticas y la presencia de una osmolaridad inadecuada durante los procesos de enfriamiento, congelación y descongelación.

Se ha observado en la congelación espermática del porcino una reducida formación de gotas hiperosmóticas no congeladas dentro de la célula, que son las encargadas





de minimizar los daños intracelulares provocados por la formación de cristales de hielo intracelular, esto implica que la presencia de agua osmóticamente inactivada formadora de cristales de hielo intracelular sea incluso el doble en el esperma porcino que las observadas en otras especies (humanos y bovinos), de esa manera aumentando el daño espermático en la congelación del semen porcino (Medrano, 2005).

Cifras recientes indican que la tasa de parición tras la IA con semen congelado-descongelado está entre 75-80% empleando IA intrauterina profunda y una doble inseminación con una buena tasa de preñez, supervivencia de los embriones y número de fetos normales (Yeste, 2015).

### **2.1.1 Diluyentes de criopreservación porcino.**

Los diluyentes protegen a los espermatozoides durante el enfriamiento, congelación y descongelación (Cosme, 2005). Estos diluyentes deben proporcionar acción tampón, ser de bajo costo, así como de prestar protección contra los cambios de temperatura y estabilidad de los sistemas enzimáticos e integridad de la membrana espermática; por lo que los diluyentes de congelación son uno de los factores que afectan de manera determinante la calidad espermática post-descongelación (Mercado, 2011; Souza *et al.*, 2014)

Los diluyentes para criopreservar el semen porcino contienen citrato de sodio, bicarbonato de sodio, tris-hidroximetil aminometano (TRIS); ácido 2-N-morfolino etanosulfónico (MOPSn) y el ácido N-2hidroxietilpiperazina-N-2-etanosulfónico (HEPES) que son sustancias amortiguadoras o Búfer que permiten controlar el pH y mantenerlo entre 6.4 a 6.8. Estos compuestos pueden combinarse y titularse en rangos más amplios de pH y osmolaridad y son relativamente inocuos para los espermatozoides (Ochoa & Ortega , 2008).

Comúnmente, se agregan azúcares a los diluyentes como la lactosa, sucrosa, rafinosa, fructosa, trehalosa y glucosa, este último es el más utilizado habitual en los diferentes diluyentes para semen porcinos, los azúcares funcionan como fuente de



energía para la motilidad y reservas energéticas para el espermatozoide, además contribuyen en la osmolaridad del diluyente; así, azúcares como la glucosa, lactosa y en menor medida la fructosa, del mismo modo como el polivinil pirrolidona (PVP) forman moléculas que ejercen su efecto crioprotector sin necesidad de traspasar al interior de la célula espermática (Rodríguez, 2005; Ochoa & Ortega, 2008; Duran *et al.*, 2009; González, 2010; Williams *et al.*, 2015).

Proteínas como la albúmina sérica bovina (BSA) adicionado a los diluyentes de criopreservación, tendrían efectos estimulantes de la motilidad espermática, propiedades antiperoxidantes, útil como sustrato energético e incluso inactivaría los subproductos del metabolismo espermático y bacteriano al combinarse con ellos (Ochoa & Ortega, 2008). Así también se han venido utilizando con continuidad la yema de huevo para el control de los daños ocasionados en el plasmolema espermático y prevenir su desestabilización durante la criopreservación, se considera un componente indispensable en los diluyentes crioprotectores del semen del verraco, empleando comúnmente en un 20% (González, 2010).

Por la presencia tanto de agentes microbianos patógenos exógenos así como la microbiota propia del divertículo prepucial, uretra y pene que produce toxinas y la consiguiente putrefacción de los componentes de origen biológico del diluyente, afectando negativamente en la fertilidad del semen, por lo que es necesario la inclusión de antibióticos en los diluyentes seminales (penicilina, estreptomycin, lincomicina, espectinomycin, gentamicina, polimixina, ceftiofur, amikacina y dibekacina) para la inhibición del crecimiento bacteriano, pero sin afectar la motilidad y morfología acrosomal del espermatozoide (Rodríguez, 2005; Ochoa & Ortega, 2008)

Además de los antibióticos y proteínas, se ha venido usando en los diluyentes de congelación, crioprotectores que penetran el espermatozoide como es: el glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), etilenglicol (EG) y propilenglicol (PG), los mismos que minimizan los daños causados por congelación, interviniendo en la formación de hielo extracelular, deshidratación del esperma y en la hiperconcentración tóxica de solutos dentro de la célula espermática después de la descongelación (Rodríguez,



2013). De todos estos crioprotectores mencionados, el glicerol es el crioprotector más utilizado para los espermatozoides porcinos; no obstante, el espermatozoide es muy sensible a los efectos tóxicos del glicerol por lo que se ha establecido una concentración óptima que está entre 2 a 4%, que debe ser añadido a los espermatozoides a los 5°C para obtener mejores resultados (Juárez, 2009).

### **2.1.2 Aditivos en la criopreservación espermática porcina.**

Con base en el principio, de que la adición de solutos en agua reduce la temperatura de congelación retardando la aparición de cristales de hielo (Souza *et al.*, 2014), y que la presencia de los antioxidantes frente a los sustratos oxidables, retrasan o anulan la oxidación de dicho sustrato (Williams S, 2013), se hace necesario el uso de los crioprotectores adicionales que modifiquen los componentes en los diluyentes de criopreservación con el fin de mejorar la viabilidad espermática post descongelación; una serie de compuestos como es: el hinojo, aceite de salvado de arroz, cafeína, romero, té verde y agua de coco han sido adicionados a los diluyentes con buenos resultados en la criopreservación espermática; así también se informa sobre el uso de otros aditivos crioprotectores como: vitamina E, glutatión reducido, ácido ascórbico que mejorarían la viabilidad espermática (Bathgate, 2011; Yeste, 2015).

Se ha realizado investigaciones suplementando a los medios de congelación y descongelación plasma seminal, con mejoras en la motilidad, integridad de la membrana y controlando la precapacitación del espermatozoide tras los procesos de congelación-descongelación (Okazaki *et al.*, 2014). La adición de plasma seminal en un 10% (v/v) en la solución de descongelación para la IA, generó una tasa de concepción del 80,2% y un tamaño de la camada de 10,1 lechones (Bathgate, 2011; Okazaki *et al.*, 2014).

### **2.1.3 Antioxidantes.**

Los procesos de dilución y/o centrifugación previa a la congelación disminuye la concentración de compuestos antioxidantes como alfa-tocoferol, ácido ascórbico,



taurina, hipotaurina, entre otros presentes en el plasma y que junto con los procesos de enfriamiento que provocan alteraciones estructurales, reduciendo la permeabilidad selectiva de la membrana espermática; esto induce que se pierda en el espermatozoide enzimas intracelulares responsables de la metabolización de las ROS (Radicales del estrés oxidativo), así como trastornos en el balance iónico, con una consecuentes trastornos en el metabolismo aeróbico y anaeróbico del glucógeno, comprometiendo todas aquellas funciones celulares energético-dependientes como la motilidad; de igual manera por lo expuesto anteriormente se ocasiona pérdida del balance iónico del sodio, zinc y calcio, que se acumulan en el espacio intracelular, y del potasio y magnesio que salen masivamente de la célula en detrimento de una adecuada criopreservación del semen porcino (Dominguez *et al.*, 2010).

Se sabe que parte de la reducción en la motilidad y fertilidad espermática asociada con la criopreservación podría ser debido al daño oxidativo por una excesiva e inapropiada formación de ROS, que potenciará el fenómeno de peroxidación lipídica en los espermatozoides funcionales, lo cual da lugar al “envejecimiento prematuro”, que provocará la muerte espermática en corto período de tiempo, que a su vez induciría un estrés funcional que terminará a corto plazo con la muerte de los espermatozoides (Vasco *et al.*, 2007).

Para controlar los efectos de los ROS en la lipoperoxidación que podría ser uno de los mecanismos bioquímicos responsables de los cambios espermáticos durante la criopreservación, se ha venido utilizando antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos que actúan mediante diferentes mecanismos, pues los antioxidantes cuando se encuentran presentes en bajas concentraciones respecto a los sustratos oxidables, retrasan o anulan la oxidación de dicho sustrato (Williams, 2013); no obstante, los ROS son producidas por todas las células vivas bajo condiciones aeróbicas y en los espermatozoides requieren de este proceso fisiológico para que tenga lugar la capacitación y reacción acrosómica necesarios para la fertilización de los ovocitos. (Vasco, *et al.*, 2007; Bathgate, 2011).

Los ácidos grasos poli-insaturados son abundantes en la membrana plasmática de los espermatozoides porcinos, por lo que se tornan muy susceptibles al ataque de



los radicales del estrés oxidativo (ROS) y que se ve agravado por los mismos procesos de maduración espermática por la cual pierden una gran parte de su citoplasma, y con ello el conjunto de defensas enzimáticas que los protegen de los daños peroxidativos. Buscando reducir los daños por oxidación en el espermatozoide criopreservado se han utilizado algunos elementos como: Plasma seminal, sustancias con actividad similar a la superoxidodismutasa o catalasa,  $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico, glutatión, piruvato, taurina, hipotaurina, y albumina (Henaó, 2008; Bathgate, 2011).

Hay dos métodos para la suplementación de los antioxidantes que tienden a utilizarse en el intento de mejorar la calidad de los espermatozoides posdescongelación; la primera es la suplementación dietética añadiendo antioxidantes no enzimáticos en el alimento del verraco, buscando aumentar los niveles de antioxidante en el plasma seminal y espermatozoides, que posteriormente irá a proteger al espermatozoide durante los procesos de criopreservación; y el segundo método es la suplementación con antioxidantes directamente a los medios de refrigeración, congelación y descongelación (Bathgate, 2011), como se ha observado con el licopeno extraído de tomate y que ejerce un efecto protector de los principales Ácidos grasos (AG) no saturados de la membrana espermática frente a los procesos de lipoperoxidación espermática (Holt *et al.*, 2005; Williams, 2013).

Los antioxidantes enzimáticos utilizados en la suplementación de medios de criopreservación son: el superóxido dismutasa (SOD) neutraliza el anión superóxido y la convierte en  $H_2O_2$  y oxígeno. El  $H_2O_2$  a partir de esta reacción es atrapado por la catalasa y la peroxidasa, para convertirlos en agua y oxígeno (Bathgate, 2011).

Se han utilizado sustancias antioxidantes como el Hidroxitolueno Butilado (BHT) que adicionado al medio de dilución espermática, incrementó la movilidad e integridad acrosómica tras un choque por frío a  $5\text{ }^\circ\text{C}$  y redujo considerablemente la peroxidación lipídica del semen criopreservado, permitiendo un mayor desarrollo embrionario; así también se han adicionado otras sustancias antioxidantes en el medio de enfriamiento, congelación y descongelación como son la el  $\alpha$ -Tocoferol (Vitamina E), el Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid),



glutación (GSH) y el superóxido dismutasa con resultados satisfactorios (González, 2010; Bathgate, 2011).

Se han probado también antioxidantes naturales tales como tocoferoles, ácido ascórbico, ácido docosahexaenoico y otros aditivos como el extracto de romero, aceite de salvado de arroz, extractos de té verde y algunos flavonoides que a pesar de no ser definidos como antioxidantes, que al ser añadidos a los medios de congelación ejercen un efecto protector sobre la membrana plasmática de los espermatozoides, conservando tanto su actividad metabólica, funcionalidad y supervivencia al disminuir el estrés oxidativo, contrarrestan las crio lesiones y aumentando el sistema de defensa de los espermatozoides contra los procesos oxidativos producto de la criopreservación espermática (Henao, 2008; Williams, 2013; Yeste, 2015). Por otro lado se ha encontrado que algunos polisacáridos del gel de sábila poseen propiedades antioxidantes y efectos protectores en células de origen animal (Dominguez *et al.*, 2012).

## **2.2 Aloe Vera (*Aloe Barbadensis miller*).**

De la especie Aloe Vera la variedad *Barbadensis Miller* es la más activa biológicamente entre 400 especies, es una planta perenne con hojas verdes turgentes unidas en el tallo en un patrón de roseta, estas hojas en su madures llegan a tener más de 63 cm de largo con picos de sierra a lo largo de sus márgenes (Gupta *et al.*, 2012; Dominguez *et al.*, 2012).

La hoja de Aloe Vera proporciona dos fuentes principales de secreción, el látex amarillo (exudados) y el gel transparente (mucílago) que proviene del parénquima o pulpa localizada en la parte central de la hoja y representa del 65 al 80 % del peso total de la planta (Gupta *et al.*, 2012). Posee propiedades antiinflamatorias inmunoestimulante, antioxidante, antitumoral, Anti-úlceras incluso antidiabética (Dominguez *et al.*, 2012; Shahzada *et al.*, 2013).

### 2.2.1 Gel de Aloe Vera.

Aspectos importantes de la planta de Aloe Vera en cuanto a sus componentes actividad y procesamiento se detallan a continuación:

- **Ingredientes activos.-** El mucílago de Aloe Vera (*Aloe Barbadensis miller*) contiene 98,5 % de agua y una fracción sólida del gel en 0,8 a 1,5%; de esta fracción sólida está compuesta por: azúcares en un 25% (glucosa, fructuosa, manosa, sacarosa y galactosa), saponinas en un 3%, enzimas (fosfatasa alcalina y ácida, amilasa, lactato deshidrogenasa, lipasa, catalasa, peroxidasa y oxidasa), ácidos salicílicos, aminoácidos (proporciona 17 de los 22 aminoácidos necesarios para el hombre y 7 de los 8 aminoácidos esenciales), esteroides (colesterol, campesterol, lupeol y B-sitosterol), vitaminas (B1, B2, B6, niacinamida y colina) (Vega *et al.*, 2005; Sanches & Santa, 2009; Dominguez *et al.*, 2012; Sahu *et al.*, 2013). El Aloe vera tiene otros compuestos con propiedades activas a los que se ha podido cuantificar en el siguiente cuadro.

**Cuadro 1.-** Componentes químicos del gel de aloe vera.

Compuestos	Concentración	Referencia
Humedad	98,5 %	(Miranda <i>et al.</i> , 2009; Hernández & Giraldo, 2011; Dominguez <i>et al.</i> , 2012)
Sólidos totales	085 – 1,55 %	
Ph	5,0	
Calcio	0,78 mg/100ml	
Fósforo inorgánico	14 mg/100ml	
Sodio	436,81 mg/100ml	
Potasio	840,65 mg/100ml	
Calcio	0,378 mg/ml	
Magnesio	3,95 mg/100ml	
Manganeso	16,92 ppm	
Hierro	75,53 ppm	
Zinc	10,44 ppm	
Cobre	9,95 ppm	
*Vitamina C (Ácido ascórbico)	127,6 ± 5,5 mg/100g	(Miranda <i>et al.</i> , 2009; Dominguez <i>et al.</i> , 2012)
*Vitamina E (Tocoferoles)	0,217 ± 0.003 mg/100g	
*Fenoles totales(Acido gálico)	79,2 mg/100g	
*Vitamina A (Carotenoides)	-----	

\*.- Con propiedades antioxidantes.



- **Actividad biológica del gel.-** Se ha reportado que el Aloe vera proporciona un alto nivel de capacidad antioxidante dependiendo del estado de madurez, lo que sugiere que la planta posee diferentes concentraciones en sus compuestos activos y diversos grados de capacidad antioxidante con relación a su fase de desarrollo fenológico (Miranda *et al.*, 2009). Para fines medicinales se emplean plantas de 3 a 5 años de edad de las que se toman las hojas inferiores por ser las más maduras y las que tienen mayor cantidad de principio activo (Quiroz, 2013). Las propiedades antisépticas del Aloe vera se deben a la presencia de agentes como: lupeol, ácido salicílico, nitrógeno ureico, ácido cinnamónico, fenoles, azufres erpenoides, flavonoides, taninos glucomanano y el acemanano antraquinona, estos compuestos tienen acción inhibitoria sobre hongos, virus y bacterias como son: Streptococcus, Shigella, Trichophyton mentagrophytes, Pseudomonas aeruginosa y Candida albicans (Sahu *et al.*, 2013; Shahzada *et al.*, 2013). El papel exacto del gel de Aloe vera no se conoce pero después de la administración en la piel, se genera una proteína antioxidante, la metalotioneína, que limpia los radicales hidroxilo e impide la supresión de superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa (Sahu *et al.*, 2013). Varios compuestos de bajo peso molecular como las Vitaminas C, E y A que están presentes en el gel de Aloe, y que son capaces de comportarse como antioxidantes que neutralizan los ROS e inhibiendo su liberación (Mejía, 2011).
- **Procesamiento del gel.-** Existen varios métodos para la obtención del gel, tales como: escurrimiento simple, escurrimiento con adición de calor, separación mecánica por prensado, separación mecánica manual por frotación de las hojas, separación manual por fileteado y licuado; fileteado y triturado (Dominguez *et al.*, 2012). Se ha observado que el gel de Aloe Vera, al ser estabilizado con otras sustancias, genera citotoxicidad a las células normales (Sahu *et al.*, 2013); el uso y procesamientos que implica calefacción, deshidratación, estrujado y los inadecuados procesos durante la preparación o estabilización del gel, causa modificaciones irreversibles que afectan la estructura original y que promueven cambios importantes en las





propiedades bioquímicas de los componentes bioactivos del gel, como en los polisacáridos y compuestos antioxidantes. Esto hace que muchos de los productos procesados contengan muy poco o casi ningún ingrediente activo comparado con lo encontrado en un gel de reciente extracción, inclusive cuando el gel de Aloe vera se expone al aire, este se oxida rápidamente y se descompone perdiendo gran parte de su actividad biológica (Dominguez *et al.*, 2012), por lo que es preferible que las hojas se procesen inmediatamente después del corte para evitar las modificaciones expuestas anteriormente que probablemente son debida a reacciones enzimáticas y a la actividad de las bacterias normalmente presentes en las hojas (Marquez, 2012).

### **2.2.2 Aloe Vera en la criopreservación seminal.**

El extracto gel de Aloe Vera se ha venido utilizando en los diluyentes de preservación y congelación de semen de algunas especies, como las observadas en la dilución del semen de ganado ovino, así como en su congelación (Sahu *et al.*, 2013; Shahzada *et al.*, 2013). Se ha demostrado que el gel de aloe vera en un 40 % en combinación con un diluyente de citrato de sodio al 3%, obtuvo 49.5% de motilidad progresiva en semen descongelado de ovino con tasas satisfactorias de fertilidad con inseminación intrauterina, recomendando no utilizar más de 50% de gel de Aloe Vera por reducir la motilidad a niveles inferiores a las requeridas para células espermáticas criopreservadas (Cosme, 2005; Gutiérrez *et al.*, 2006).

Souza en el 2010 indica que la adición del extracto puro de Aloe Vera en un 5% a un diluyente empleado para semen de caprino, fue capaz de mantener los parámetros espermáticos por un período de 48 horas a 4°C, considerado como un crio protector eficiente en la conservación de células espermáticas de los machos caprinos. En publicaciones recientes se ha asociado el uso de Aloe Vera con trabajos en semen de canino, peces y cerdos salvajes (Souza *et al.*, 2014; Souza, 2015).



## 2.3 Procedimientos para la crío preservación seminal porcina.

En el proceso de criopreservación del semen porcino se hace necesario conocer informaciones básicas sobre los procedimientos para la congelación seminal, que permitirán tener un conocimiento más amplio desde la extracción hasta la evolución espermática pos descongelación.

### 2.3.1 Extracción, predilución y enfriamiento.

La colección del semen se lo hace en una sala de colección e incluso en el corral del verraco, para lo cual se puede utilizarse una vagina artificial (VA) o hacerlo manualmente con mano enguantada (el llamado método japonés) o introduciendo el pene en un cilindro de goma descartable (IMV, Francia) (Rodríguez, 2005), tardándose entre 5 y 15 minutos dependiendo del verraco. El eyaculado que se obtiene es fraccionado y consiste de una primera fracción que solo contiene secreciones prostáticas y algo de gel de las glándulas bulbouretrales (acuosa, translúcida a opaca en color); la segunda porción de color blanco a lechoso que es la fracción rica en espermatozoides con una concentración de entre  $5 \cdot 10^8$  a  $13 \cdot 10^8$  espermatozoides/ml el que es colectado y procesado y por ultimo esta la una tercera fracción llamada post-espermática donde el número de espermatozoides es reducida, el plasma en esta fracción contiene una alta concentración iónica que es estimulante del metabolismo espermático (Rodríguez, 2005; Leon, 2006; Ochoa & Ortega, 2008).

### 2.3.2 Evaluación inicial.

La evaluación inicial del semen del verraco es de vital importancia pues representa el 50 % del éxito en los resultados productivos de las hembras, e implicando un aspecto relevante y punto crítico en el proceso de la inseminación artificial, puesto que mediante este examen rutinario del eyaculado se puede detectar alteraciones seminales y sementales con fertilidad reducida (Almaguer *et al.*, 2015).



En la evaluación inicial se incluyen varios parámetros como: volumen, concentración, movilidad, vitalidad y morfología, asumiendo que estas medidas proveerán información de la calidad del eyaculado y de la espermatogénesis (Leon, 2006; Hernandez & Carrillo, 2015). Estos parámetros obtenidos permiten implementar criterios de selección de eyaculados para la incorporación en programas de criopreservación; los eyaculados debería tener las siguientes características: Motilidad total superior al 80%, calidad de movimiento de 4 o más en un rangos de (1-5), positivos al test de endósmosis celular > 80% (HOST y ORT) y número de espermatozoides normales/eyaculado > 85% ( Quintero, 2012).

### **2.3.3 Dilución y enfriamiento.**

Se recomienda que la temperatura del semen al momento de la dilución deberá estar entre 30°C, y la disminución de ésta a 15-18°C, tendrá que realizarse lentamente durante un lapso de 3 a 10 horas previo al procesamiento de criopreservación para permitir incrementar la criotolerancia espermática y mantenimiento de la arquitectura lipídica de la membrana (Ochoa & Ortega , 2008; Yeste, 2015), no obstante, una incubación por más tiempo reduce la viabilidad espermática (Okazaki *et al.*, 2014); el enfriamiento por debajo de los 15 °C, el esperma porcino demuestran ser extremadamente sensible en cuanto a su integridad estructural y homeostática (Mercado, 2011).

La centrifugación, necesaria para concentrar los espermatozoides previo al proceso de congelación tiene un impacto nocivo en la calidad del esperma post-descongelación (Bathgate, 2011); sin embargo, estudios demostraron que el uso de sustancias como iodixanol y percoll en la centrifugación permiten separar espermatozoides muertos o no funcionales de los viables, mejorando las tasas de recuperación espermática (Yeste, 2015).

### **2.3.4 Congelación.**

A pesar de los avances en la metodología de criopreservación y descongelación, los espermatozoides porcinos aún sufren una serie de cambios en el proceso que



comprometen la estructura y capacidad funcional de la membrana, cabeza y pieza intermedia que están relacionados con la disminución en la movilidad y viabilidad de los espermatozoides; sin embargo, los espermatozoides criopreservados son capaces de fertilizar los ovocitos, pero su esperanza de vida del esperma en el tracto reproductor de la hembra es más corto, en comparación a los espermatozoides recién eyaculados (Leon, 2006).

Cuando tienen lugar descensos rápidos de temperatura en la criopreservación el fenómeno físico más notable es la formación de cristales de hielo en el espacio intracelular, hecho que induce la aparición de severas lesiones o incluso la muerte del espermatozoide; sin embargo, la severidad de este fenómeno dependen del tamaño de los cristales de hielo que se formen, lo que depende a su vez del ritmo de enfriamiento mantenido, así por ejemplo: si el enfriamiento es lento lleva a la formación de cristales voluminosos que está asociada potencialmente a alteraciones importantes en la célula dando lugar a bajos índices de supervivencia espermática; a diferencia con lo anterior el enfriamiento muy rápido forma cristales de tamaño pequeño (microcristales), que probablemente no causen daño al esperma, es así que la velocidad óptima de enfriamiento recomendado oscila entre 30 y 50°C/min para el semen de verraco (González, 2010; Mercado, 2011).

Al alcanzar la temperatura de -5 °C, el agua extracelular e intracelular, a pesar de estar por debajo de su punto de congelación, no está solidificada y se mantiene en un estado de equilibrio débilmente estable llamado sobrefusión o superenfriamiento. Es entre los -5 °C y -10 °C, cuando se produce la formación de cristales de hielo extracelulares, permaneciendo el espacio intracelular en sobrefusión. Esto hace que el agua del interior de la célula espermática salga al exterior y la célula se deshidrate, y dependiendo de la velocidad de deshidratación la célula sufrirá daño en mayor o menor grado en relación a la cantidad de cristales de hielo presente dentro de la célula espermática (Mercado, 2011).

Más concretamente, se considera que el verdadero desafío al que se enfrenta la célula en el proceso de criopreservación se encuentra en superar con éxito una franja de temperaturas de -15 a -60 °C que afecta muy negativamente a su



integridad, y por la que debe pasar en dos ocasiones, una vez durante el enfriamiento y otra durante la descongelación (González, 2010).

Durante el proceso de congelación de semen porcino, el descenso de la temperatura, induce una inevitable reducción de la integridad de la membrana espermática que está compuesta de una ultra estructura y una composición bioquímica muy susceptible al descenso de la temperatura en comparación con otras especies (Mercado, 2011), para reducir las alteraciones en el esperma en la criopreservación, se utiliza una serie de crioprotectores como el glicerol que penetra rápidamente en el espermatozoide y que se puede añadir momentos antes de la congelación sin necesidad de periodos de equilibrado, puesto que el glicerol penetra en los espermatozoides en segundos, alcanzando el equilibrio a los 30 segundos, aumentando la concentración total de todos los solutos en el sistema celular espermático, reduciendo así la cantidad de hielo formado a cualquier temperatura por debajo de cero (Mercado, 2011; Rodríguez, 2013; Williams, 2013).

Se ha descrito que el glicerol actúa disminuyendo el punto de congelación del espermatozoide y que consecuentemente minimiza los efectos nocivos que podría tener los solutos en el esperma durante la criopreservación, estos solutos intervendrían en el estrés osmótico del esperma, perjudicial para la viabilidad del mismo (Mercado, 2011).

Los crioprotectores no penetrantes constituidos por azúcares como: glucosa, lactosa, fructuosa y otros; que se utilizan normalmente en los diluyentes de criopreservación que intermedian en la deshidratación celular disminuyendo la concentración de sales en la fracción acuosa extracelular del semen que sería necesario para inducir una deshidratación en la célula espermática (Williams, 2013).

### **2.3.5 Almacenamiento.**

Los espermatozoides en la criopreservación se envasan en pajuelas de 0,5 ml o en pajuelas planas de 5ml. Se ha reportado que tanto en laboratorio como en campo no existen diferencias estadísticas en cuanto a eficiencia reproductiva en estas



pajuelas, a pesar de estos hallazgos no ha cambiado la preferencia por usar pajuelas de 0,5ml como medio de empaquetamiento de los espermatozoides porcinos en la criopreservación (Galo & Uclés , 2003; Yeste, 2015).

## **2.4 Evaluación seminal pos congelación.**

Como consecuencia de la amplia gama de alteraciones que tienen lugar durante el proceso de criopreservación, el 40 a 50% de las células espermáticas no consiguen sobrevivir, inclusive utilizando protocolos optimizados para intentar minimizar los daños por la criopreservación, la mayoría de los espermatozoides sobrevivientes van a presentar propiedades distintas a las que tenían con anterioridad al proceso de congelación/descongelación que repercutirán en su capacidad fecundante (González, 2010).

En la evaluación pos descongelación del semen porcino, se utiliza los métodos más simples, sencillos y rápidos para obtener parámetros que permitan determinar el grado de daño celular del espermatozoides luego de los procedimientos de enfriamiento, congelación y descongelación (Rodríguez, 2005).

La supervivencia de las células al proceso de criopreservación implica superar con éxito no sólo la etapa de congelación, sino también otra de descongelación, puesto que durante esta última también pueden producirse efectos con consecuencias letales para la célula, por lo que la efectividad de una congelación bien llevada a la práctica podría quedar anulada si no se realiza la descongelación de forma adecuada (González, 2010).

El análisis de la viabilidad se puede hacer usando colorantes observables en microscopia de campo claro, siendo la más usada la tinción supravital de eosina-nigrosina, empleada para diferenciar y determinar el porcentaje de espermatozoides vivos de una muestra seminal al teñir de rosa los espermatozoides muertos o con membrana alterada (Leon, 2006; Jara, 2012; Montenegro & Chimarro, 2013; Corona, 2014).



La evaluación de la motilidad morfología de la célula espermática es un parámetro esencial en la evaluación de la calidad seminal y en el establecimiento de las correlaciones entre la calidad seminal y la fertilidad (Juárez, 2009), pero sólo un 20 o 30% de los verracos son donantes satisfactorios de semen para congelación con un mínimo exigible de motilidad espermático de 30 a 40% (Galo *et al.*, 2003). Se analiza subjetivamente en un microscopio a 10 o 20X mediante un frotis húmedo proporcionándole valores porcentuales a lo observado; sin embargo, los resultados dependen enteramente de la habilidad y experiencia del evaluador (Leon, 2006) (Almaguer *et al.*, 2015).

Las observaciones en forma subjetiva son de validez limitada, pues existe una gran variabilidad en la estimación de los parámetros de motilidad de los mismos eyaculados, por lo que se ha hecho necesario aumentar la objetividad del análisis de motilidad espermática, utilizando analizadores de movilidad espermática computarizados (sistema CASA); no obstante, esta forma de evaluación de la motilidad es la más utilizada para las muestras seminales debido a su sencillez (Juárez, 2009).

La morfología espermática es usada como indicador de la habilidad de los espermatozoides para sobrellevar los procesos de almacenaje, enfriado, congelado y descongelado, evaluando aspectos de la cabeza y cola que indica daños a nivel de membrana, acrosoma y flagelos, evitando el uso de semen inadecuado para la inseminación artificial (Rodríguez, 2005; Corona, 2014).

La evaluación de la integridad de la membrana plasmática se incluye hoy como un parámetro valioso por su relación con la fertilidad, el método más simple de análisis consiste en exponer a los espermatozoides a una solución hipoosmótica (HOS) por 30 a 45 minutos a 37°C y analizar su respuesta endosmótica que en el porcino se han encontrado desde un 17 hasta 53% posdescongelación (Jara, 2012). Esta prueba de hipoosmosis se usa para la evaluación de la integridad y funcionalidad de la membrana espermática para transportar fluidos y está asociada a su capacidad de penetración en el ovulo, convirtiéndose en una herramienta adicional en el análisis de semen (Rodríguez, 2005; Hernández, 2013).



## CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. Materiales.

#### 3.1.1. Físicos.

Balanza analítica de precisión (Boeco BPS Modelos 40 / 41) , Baño maría (Memert® 10Lts.), estufa (Memert®), microscopio olimpus (Cx31RBSFA), cámara para microscopio HD, placa calefactora (Premiere *Slides Warmer* XH-2001), fotómetro SMD1 (Minitube®) para muestra de semen, refrigerador, unidad térmica de congelación, Caballete metálico de extracción, pajuelas de 0,5 ml, centrífuga, empaquetador manual de pajuelas, marcador permanente de pajuelas, termo recolector de semen, caja de transporte de espuma expandible, vasos de precipitación de 50 y 100 ml, bolsas de colección de semen, guantes de polivinilo, termómetro de mercurio (Promo Lab), tijeras, gradillas, tubos de centrífuga de 15 ml, tubos eppendorf, pipetas de 10 - 100-1000 µl, porta y cubre objetos; gasas estériles, hojas de campo, materiales de escritorio (papel bond, calculadora, lápiz, esferos) y un computador.

#### 3.1.2. Químicos.

Eosina-nigrosina, glicerol, diluyente de predilucción (Androhep® Plus), diluyente de enfriamiento y congelación (Androstar® CryoPlus), diluyente de refrigeración (Androstar® Plus), citrato de sodio, fructuosa, agua bidestilada estéril y alcohol polivinilico, nitrógeno líquido y alcohol 72% GL.

#### 3.1.3. Biológicos.

Se utilizó 16 eyaculados de semen porcino, 128 ml de yemas de huevo fresco y 32 ml del gel puro de Aloe vera.





## **3.2. Métodos.**

### **3.2.1. Ubicación de la investigación.**

La granja en la que se alojaron y adaptaron los verracos, usados para colectar los eyaculados requeridos en la investigación, se encuentra ubicado en el sector Gullancay del cantón Guachapala perteneciente a la provincia del Azuay con altitud de 2200, con las siguientes coordenadas: longitud 75°38'00" latitud 96°05'30" y con una temperatura templada de 18°C promedio (GAD Guachapala, 2016).

La congelación y evaluación del semen se realizó en el laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal de la granja Irquis de la Universidad de Cuenca, ubicado en el Km 23 de la vía Cuenca– Girón, perteneciente a la parroquia Victoria del Portete, perteneciente al cantón Cuenca, provincia del Azuay, con una altitud 2663 msnm; se localiza en las siguientes coordenadas 79° 03' 42" longitud w y 3° 03' 36" latitud sur; con un clima templado a frío de entre 9,8 a 12,8°C; Con una pluviometría de 800 - 2000 mm anual y humedad relativa 80%.

### **3.2.2. Descripción de las unidades de análisis.**

Se utilizaron los eyaculados de 4 verracos de líneas sintéticas especializadas en la producción de carne, entrenados, sexualmente maduros, de 1 a 3 años de edad, con pesos entre los a 187 Kg de peso vivo, clínicamente sanos, alimentados con 2,5 Kg/día (3.200 Kcal de energía digestible/Kg y de un 14% de proteína cruda) más 2 Kg de forraje verde de alfalfa.

Los eyaculados que se utilizaron en la investigación tuvieron un volumen no < a 20 ml de la fracción rica en espermatozoides con características de: Color.- blanco a blanco cremoso; olor suigéneris, concentración superiores a 400 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/ml, motilidad individual progresiva >80%, espermatozoides anormales <15% y vivos > a 90% (Duran, 2009).



### 3.2.3. Evaluación, procesamiento y criopreservación del semen de verraco.

- **Extracción y predilución.-** Previo a la extracción seminal, a los verracos se aseó la zona prepucial con agua para luego secarlo con toallas desechables; como montadero del verraco se utilizó un maniquí metálico, extrayendo el eyaculado mediante la técnica de mano enguantada como lo describe Rueda et al., (2009). Se recolectó 20 a 30 ml de la fracción rica en espermatozoides (tonalidad más blanquecina o lechosa) del eyaculado, en un termo a 37°C recubierto con una bolsa de recolección y provisto de dos capas de gasa estéril como filtro, al eyaculado se agregó el prediluyente Androhep® Plus en proporción 1:1,5 (V/V), a una temperatura aproximada de +30°C, de inmediato se trasladando al laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal de la granja Irquis de la Universidad de Cuenca, manteniendo en una temperatura entre 15 a 17°C durante 3 horas.
- **Evaluación inicial.-** En el laboratorio se determinó la concentración con un fotómetro (SMD1) calibrado para proporcionar resultados en millones por milímetro ( $\times 10^6/\text{ml}$ ); se evaluó subjetivamente la motilidad en masa con el lente 10X del microscopio de campo claro en una gota de semen puro a 37°C designado valores en una escala de (1-5); de igual manera se realizó la evaluación de la motilidad individual progresiva del semen prediluido observando con (lente 20X) 10 $\mu\text{l}$  entre porta y cubreobjetos temperados a 37°C expresando sus resultados en porcentaje; la vitalidad del espermatozoides fue expresada porcentualmente al contar 200 espermatozoides con el lente 40X del microscopio en un frotis seco realizado en un porta objetos con una mezcla de 5 $\mu\text{l}$  de semen prediluido con 10 $\mu\text{l}$  de la tinción supravital de eosina\_nigrosina (1 parte de eosina + 2 partes de nigrosina).
- **Extracción del gel de Aloe vera.-** Las hojas de Aloe Vera utilizadas en la investigación procedieron de la misma planta, la cual estaba en un estado de desarrollo fenológico mayor a 3 años (en floración); las que fueron cortadas a las mismas horas de la mañana, descartando las hojas basales por su envejecimiento y las hojas más nuevas por su falta de madurez. El gel se



obtuvo mediante la técnica de raspado, para lo cual se lavó las hojas con abundante agua y se desinfectó externamente con alcohol 72° GL, luego de evaporarse el alcohol se procedió a eliminar la corteza para exteriorizar la pulpa inmediatamente procediendo a extraer el gel que para ser utilizado fue filtrado con 3 capas de gasas estériles, obteniendo la cantidad suficiente para sustituir el 10% del volumen de agua necesario para preparar el diluyente de enfriamiento y congelación utilizados en el tratamiento 2. La muestra del aloe vera fue enviado al laboratorio bromatológico de Multianalityca Cia. Ltda. de la ciudad de Quito para el análisis de antioxidantes (vitaminas A, E y C), lo cual se detalla en el cuadro 2.

Cuadro 2.-Concentración compuestos activos/ml presentes en el gel de aloe vera.

<b>Compuestos activos</b>	<b>mg/100g del gel de Aloe vera</b>
Vitamina C (Ácido ascórbico)	126,67
Vitamina E (Tocoferoles)	---
Vitamina A (Carotenoides)	---

- **Preparación de los diluyentes, enfriamiento y centrifugación.-** La preparación de los diluyentes se lo realizó siguiendo los procesos recomendados por la casa fabricante (Minitube). En la preparación del diluyente de predilución se agregó 4,65 g de Androhep® Plus por cada 100 ml de agua bidestilada a una temperatura de 32 °C; de la misma manera se realizó la preparación del diluyente Androstar® Plus. Para someter a congelación y previo conocimiento de la concentración por ml de los eyaculados prediluidos, se tomaron dos alícuotas para cada tratamiento en cantidad suficiente que permita congelar 20 pajuelas por cada uno con una concentración de  $0.5 \cdot 10^6$  espermias/pajuela (0,5ml). Estas alícuotas se centrifugaron por 10 minutos a 800 G, eliminándose el sobrenadante para obtener el pellet de espermias, al que se añadió el diluyente A de enfriamiento hasta alcanzar el 50% del volumen calculado para las 20 pajuelas



procediendo a bajar la temperatura de 17°C hasta alcanzar los 5°C en un período de 2 horas; para lo cual se preparó 100ml del diluyente “A” que consistía en adicionar 8,5 g de Androstar Crio Plus + 20 ml de yema de huevo en 77 ml de agua bidestilada con una temperatura de 32°C. Adicionalmente, se preparó 50 ml del diluyente B de congelación para el tratamiento testigo T1 (4,25 g de Androstar Crio Plus + 10 ml de yema de huevo + 3ml de glicerol, en 38,5 ml de Agua bidestilada a 32°C); Así también se preparó 50 ml de un diluyente B2 para el tratamiento T2 (4,25 g de Androstar Crio Plus + 10 ml de yema de huevo + 3ml de glicerol + 7,7 ml de gel de Aloe Vera en 30,8 ml de Agua bidestilada a 32°C). Ambos diluyentes fueron enfriados a 5°C.

- **Empaquetado, congelación y almacenaje.**- El semen de los tratamientos T1 y T2 suspendido en el diluyente A y enfriado a 5°C; se les agregó los diluyentes de congelación B y B2 respectivamente, hasta alcanzar el volumen total a congelar, de inmediato se empacó en las pajuelas de 0,5 ml identificadas y temperadas previamente a 5°C para cada tratamiento. En la unidad de congelación se expuso a vapores de nitrógeno a 4 cm sobre el nivel del nitrógeno líquido por un periodo de 10 minutos antes de ser sumergidos en el mismo. Una vez congeladas las pajuelas se procedió a almacenarlas en un termo de criopreservación con nitrógeno líquido para su posterior evaluación.
- **Descongelación y Evaluación.**- Para evaluar el semen criopreservado, 10 días después de la congelación, las pajuelas fueron descongeladas en baño maría a una temperatura de 37°C por 30 segundos, Se diluyo el contenido de cada pajuela en 3 ml de Androstar® Plus e inmediatamente se procedió al análisis de la motilidad individual progresiva (MIP) efectuando estimaciones visuales subjetivas y designándole una calificación porcentual de los espermias motiles, usando una gota de semen delgada y uniforme que fue colocada entre porta y cubreobjetos temperados para evaluar con lente 20X del microscopio siempre sobre la platina térmica a 37°C tomando como



referencia el campo con mayor porcentaje de espermatozoides que se mueven en forma rectilínea; al espermatozoide se realizó una tinción supravital de eosina-nigrosina (1 parte de eosina + 2 partes de nigrosina), para estimar el porcentaje de vivos-muertos (VE) y anomalías (AE), la observación se lo hace en un frotis a 40X aumentos, se contó 200 células entre vivos y muertos, los muertos se observaron de color rosado mientras que los vivos no se tiñeron, en el mismo campo que se determinó la vitalidad espermática, se estableció el porcentaje de espermatozoides anormales que consistía principalmente de colas desprendidas de las cabezas, macrocabezas, microcabezas y colas dobladas. Para medir la integridad de la membrana con el test de solución hipo osmótico (HOST), se tuvo que elaborar la solución hipoosmótica (100 mOsm/ L), Para lo cual se utilizó 100 ml de agua bidestilada a 37°C en la que se añadió 490mg de citrato de Sodio + 900mg de fructosa (González *et al.*, 2013), de este preparado se tomó 4 partes y se adiciono 1 parte semen descongelado, procediendo a incubándose en una estufa a 37°C por 30 a 45 minutos, observándose con el microscopio (40X) en un porta y cubreobjetos templados, se contó un total 200 espermatozoides, considerando como membrana plasmática íntegra a los espermatozoides que presentan una reacción de la cola, doblándola o enrollándola a distinto grado.

- **Recolección de datos.**- Los datos se levantaron 10 días posteriores a la criopreservación del semen, descongelado y evaluado 3 pajuelas por cada unidad experimental bajo los parámetros de motilidad individual progresiva, vitalidad espermática y test de hipoosmosis (HOST), obteniéndose la media porcentual por cada tratamiento.

#### 3.2.4. Diseño experimental.

Se planteó un diseño completamente al azar con dos tratamientos y dieciséis repeticiones, de las que se analizaron por cada repetición 3 pajuelas descongeladas.



### 3.2.5. Tratamientos.

Se evaluaron dos tratamientos a continuación detallados:

- **T1.-** Congelación de semen porcino en diluyente a base de citrato de sodio y yema de huevo.
- **T2.-** Congelación de semen porcino en diluyente a base de citrato de sodio y yema de huevo más extracto de Aloe vera al 10% v/v del agua de preparación del medio.

### 3.2.6. Variables de la investigación.

Las variables de la investigación planteada fueron evaluadas y cuantificadas mediante diferentes técnicas para cada variable a estudiar en el laboratorio.

- **Variables independientes.-**
  - o Congelación de semen porcino en diluyente a base de citrato de sodio y yema de huevo.
  - o Congelación de semen porcino en diluyente a base de citrato de sodio y yema de huevo más extracto de Aloe vera al 10% v/v del agua de preparación del medio.
- **Variables dependientes.-** las variables dependientes fueron:
  - o Vitalidad espermática.- media en % de espermias vivos;
  - o Motilidad Individual Progresiva.- medida en % de espermias que se mueven con dirección lineal progresiva.
  - o Integridad de la membrana plasmática.- medida en % espermia con reacción positiva al test HOST.



### **3.2.7. Análisis estadístico.**

Las variables de motilidad individual, vitalidad espermática, anormalidad espermática e integridad de membrana plasmática fueron evaluadas con las pruebas de t de student y U de Mann-Whitney empleando el paquete estadístico SPSS Statistics Versión 20.0.



## CAPÍTULO IV: RESULTADOS

### 4.1. Efecto generado por los tratamientos.

La prueba de Kolmogorov-Smirnov (Anexo 1) comprobó normalidad en los datos para dos variables: vitalidad espermática y test de HOST, por lo que, para su análisis se empleó la prueba de t de student al presentar homogeneidad en las varianzas (Anexo 2); mientras que para las variables: motilidad individual progresiva y anormalidad espermática, al no mostrar normalidad en sus datos se procedió a analizarlos con la prueba de U Mann-Whitney (Anexo 3) para datos no paramétricos.

La adición del extracto del Aloe vera en un 10% del volumen total de agua necesario para la preparación de un medio de criopreservación para semen porcino no indujo diferencias significativas frente al tratamiento testigo en las variables: motilidad, vitalidad y anormalidad; sin embargo, en la prueba de endosmosis (HOS Test) el T2 indujo significativamente mejores resultados, (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Comportamiento de las variables de evaluación seminal frente al efecto generado por los tratamientos.

	T1		T2	
	Media	SE	Media	SE
Motilidad (MIP)*	43,85	±1,90	44,69	±1,65
Vitalidad (VE)**	45,27	±1,94	41,15	±1,74
Anormalidad (AE)*	8,50	±0,60	11,39	±1,33
Test HOST**	13,89	±0,50 <sup>b</sup>	15,54	±0,65 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup> las letra diferentes en filas indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ); SE.- Error Estándar; \*.- Variables analizadas con Prueba de U de Mann Whitney. \*\*.- Variables analizadas con Prueba de T de Student.





## CAPÍTULO V: DISCUSIÓN

La adición del extracto del Aloe vera (*Aloe barbadensis miller*) en un 10% del volumen total de agua necesario para la preparación de un medio a base de citrato de sodio y yema de huevo, sobre la congelabilidad del semen porcino, generó efectos similares ( $p > 0,05\%$ ) sobre los parámetros porcentuales de motilidad ( $43,85 \pm 13,14$ ) y viabilidad ( $45,27 \pm 13,42$ ) con respecto al medio de congelación convencional (testigo). Aunque no se han reportado datos sobre el uso de este aditivo en la especie porcina, se han podido obtener resultados positivos en la motilidad al criopreservar semen en otras especies: En el ovino generó una motilidad entre 60% al agregar aloe vera en un 40% (Gutiérrez *et al.*, 2006), en el Caprino 47% de motilidad usando aloe vera en un 20% del diluyente de congelación (Duenhas *et al.*, 2015).

En esta investigación, en las variable motilidad y vitalidad del semen porcino congelado no se encontró diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre los tratamientos planteados, Similar efecto obtuvieron cuando congelaron semen del *Pecarí tajacu* (cerdo salvaje americano), adicionando Aloe vera en 5, 10 y 20%, en sustitución a la yema de huevo (Suaza, 2016); así también, no presento diferencias con respecto al testigo, al congelar semen de bovino adicionando el 10 y 15% de aloe vera en el diluyente de congelación (Espinosa, 2012). Sin embargo, en la congelación del semen de Tambaqui (*Colossoma macropomum*), utilizando Aloe vera en 5 a 10% redujo los parámetros de viabilidad en comparación al tratamiento testigo (Melo *et al.*, 2016); de la misma manera se observó parámetros reducidos cuando se utilizó Aloe Vera en un 5% como aditivo en un diluyente de agua de coco, para refrigerar semen canino (Souza, 2015).

Posiblemente, las concentraciones de vit. C con 1,27mg/ml y de vit. E con 0,00217/ml de gel Aloe vera (Miranda, 2009; Dominguez *et al.*, 2012), y que fue adicionado en el T2 no suministraría la cantidad suficiente de estas vitaminas (con propiedades antioxidante) como para que genere diferencias significativas en la motilidad y vitalidad del esperma porcino, como las observadas en investigaciones realizadas por: Satorre en el 2007 que adiciono al medio de congelación seminal



200mg de Vit.E/ml de diluyente y Membrillo et al., (2011) adiciono 5 mg de Vit. C 5 mg Vit E/ml de diluyente de congelación.

Los parámetros que miden la integridad de la membrana espermática (HOST), reflejo resultados diferentes entre los dos tratamiento planteados en la investigación ( $P < 0,05$ )  $T1 = 13,89 \pm 0,50$  y  $T2 = 15,54 \pm 0,65$ ; este resultado podría deberse al efecto de los antioxidantes presentes y otros compuestos activos que componen el gel de Aloe vera. La vitamina C (ácido ascórbico) encontrada en el gel de aloe vera empleado en esta investigación, se ha reconocido como el principal antioxidante presente en el plasma y en la célula, que además de bloquear los ROS actuando independientemente, donaría electrones al radical tocoperoxil de la vitamina E oxidada, y de esta manera reciclaría la función antioxidante del  $\alpha$ -tocoferol, ayudando a proteger a los compuestos lipídicos de la membrana de la per-oxidación, por efecto de la vitamina E (May, 1999). Este mismo autor indica que la Vitamina E actuaría de manera más efectiva cuando está en combinación con la vitamina C, conclusión corroborada por Membrillo *et al.*, (2011), que combino 5mg/ml de vitamina C + 5 mg/ml de Vitamina E como aditivo al congelar semen de caprino, obteniendo una sustancial reducción en el grado de oxidación de la membrana espermática, en comparación al ser utilizado individualmente. Esto sugiere que los efectos benéficos de los compuestos activos del Aloe vera como la vitamina C y otros compuestos que no se pudieron determinar en esta investigación sobre la integridad de la membrana espermática posiblemente se debería al poder sinérgico de sus compuestos.



## CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En conclusión, la adición del extracto del Aloe vera puro (*Aloe barbadensis miller*) en un 10% del volumen total de agua necesario para la preparación de un medio a base de citrato de sodio y yema de huevo usado para congelar semen porcino, no produjo diferencia significativa en los parámetros de motilidad, viabilidad y anormalidad; sin embargo, el aditivo estudiado influyó positivamente en los resultados de la integridad de la membrana espermática reduciendo los efectos detrimentales de la congelación-descongelación evaluado por HOST .

Se recomienda profundizar el estudio sobre el efecto que pudiere generar el gel de Aloe Vera en la conservación del semen porcino, ya sea en fresco, refrigerado o congelado.



## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Almaguer, Y., Puente, H., Rosel, R., Quirino, C., & Montes, I. (2015). Evaluación de la calidad seminal en sementales porcinos un Centro de Inseminación Artificial. *Revista Electrónica de Veterinaria*, vol. 16(5), 7pp: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63638742006>
- Bathgate, R. (2011). Antioxidant mechanisms and their benefit on post-thaw boar sperm quality. *PubMed Journals*, Vol. 43(2), pp 43-45, The University of Sydney, Australia: [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21884272](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21884272)
- Córdova, A., Córdova Jiménez, S., Córdova Jiménez, A., Pérez Gutiérrez, J., & Martín Rillo, S. (2005). Congelación de semen de verraco en dos tipos de pajillas y capacidad fecundante in vitro de los espermatozoides. Recuperado de Redalyc.org, vol. 12(3), pp. 271-274, Universidad Autónoma del Estado de México: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=10412306>
- Corona, J. M. (2014). Determinación de la distribución de balsas lipídicas (lipid rafts) y cuantificación del colesterol de la membrana de espermatozoides criopreservados de cerdo. Tesis de Posgrado, 53pp, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. Obtenido de: <http://148.206.32.94/posgrados/docs/maestria-bra/tesis-jany.pdf>
- Cosme, W. (2005). Agua de coco (*Cocus nucifera*), suero fetal bovino, aloe vera y sus combinaciones para la criopreservación de semen ovino. Obtenido de Dialnet, Vol. 55, pp 101-104, Universidad Autónoma de Chihuahua, México: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=1430499>
- Dominguez, j., Cisale, H., Kirkwood, R., Breininger, E., & Gonzalez, R. (2010). La criopreservación del semen porcino. Albeitar Portal Veterinario, Disponible en: <http://albeitar.portalveterinaria.com/noticia/729/articulos-porcino-archivo/la-criopreservacion-del-semen-porcino.html>
- Dominguez, R., Arzate, I., Chanona, J., & Welti, J. (2012). El gel de aloe vera: estructura, composición química, procesamiento, actividad biológica e importancia en la industria farmacéutica y alimentaria. *Publicado por la Academia Mexicana de Investigacion y Docencia en Ingenieria Quiimica*, Extraído de: [www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1665](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665).
- Duenhas, A., Souza, A., Camaralac, S., & Gilberti, M. (2015). *Homeopathic Medicine Improves the Motility and Vigor of Semen in Rams*. *International Journal of Veterinary Science and Research*, Vol. 1(1): 003-007 pp, Recuperado de: <https://www.peertechz.com/Veterinary-Science-Research/pdf/IJVS-1-102.pdf>



- Duran, F., Zambrano, E., Delgado, E., & Latorre, D. (2009). *Inseminación y transferencia de embriones en animales de granja*. Colombia: Grupo Latino Editores, Primera edición, 326-331 pp.
- Espinosa, W. (2012). "Efecto de la adición de un surfactante natural (aloe vera) al diluyente triladyl® para crioconservación de semen bovino en toros reproductores de agso-genes, quito-pichincha", Tesis de grado, pp154, Universidad técnica de Cotopaxi. Sacado de: <http://docplayer.es/25625245-Universidad-tecnica-de-cotopaxi-unidad-academica-de-ciencias-agropecuarias-y-recursos-naturales-carrera-de-medicina-veterinaria-y-zootecnia.html>
- Galo, O., Harold, T., Uclés, R., Dennis, R., Hincapié, J., Castillo, R., & Matamoros, I. (2003). *Congelación de semen de cerdo y evaluación de la calidad biológica pos descongelado*. Tesis de grado, Zamorano; p. 29, Recuperado de <https://bdigital.zamorano.edu/handle/11036/2130>
- González, L., Fischman, M., Boquet, M., Acerbo, M., Miguez, M., Cisale, H., & Ferrari, M. (2013). Boar semen: complementary techniques for its evaluation. *Scielo, InVet. vol.15 (1), 37-46pp*, Extraído de: [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1668-34982013000100004](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1668-34982013000100004)
- González, R. (2010). *Valoración de la capacidad de criopreservación espermática del semen porcino mediante técnicas de choque a frio y termoresistencia*. Tesis doctoral, 416p. Universidad de león, Leon, España: <https://buleria.unileon.es/handle/10612/843?show=full>
- Gupta, S., Pereira, L., Dugar, R., & Patil, R. (2012). Polysaccharides from aloe leaf mucilage as potential immunological-based anti-fertility agents. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. Vol. 4(1) 440-444*: <https://doaj.org/article/15488b93032449b1abc9358ef5639188>
- Gutiérrez, A., Cosme, R., Jiménez, J., & Ramírez, G. (2006). *Agua de coco, suero fetal bovino, aloe vera y sus combinaciones para criopreservar semen ovino*. Arch. Zootec. 55: 101-104pp, Recuperado de: <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=1430499>
- Henao, G. (2008). *Efecto del antioxidante trolox sobre la integridad de membrana de espermatozoides porcinos congelados*. Tesis de grado, 36 pp. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Universidad Nacional de Colombia: [http://bdigital.ces.edu.co:8080/dspace/bitstream/123456789/486/1/Efecto\\_antioxidantetrolox.pdf](http://bdigital.ces.edu.co:8080/dspace/bitstream/123456789/486/1/Efecto_antioxidantetrolox.pdf)



- Hernández, A. (2013). *Viabilidad y función espermática de semen*. Tesis de grado, p.77, Universidad Veracruzana, recuperado de: <http://cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/33713/1/hernandezdominguezana.pdf>
- Hernández, D., & Carrillo, D. (2015). *Aplicación del test hipoosmótico (host) en la evaluación de calidad seminal en ovinos criollos de pelo colombiano*. aicarevista.es, Vol.6, pp.165-171 Recuperado de: <https://aicarevista.jimdo.com/n%C3%BAmeros/vol%C3%BAmen-6-2015/>
- Hernández, J., & Giraldo, J. (2011). *Estudio bromatológico y microbiológico al mucilago de aloe vera y fertilidad de los suelos de cultivos de los municipios de Guática y Mistrató del departamento de Risaralda*. Tesis de grado, 97pp. Obtenido de: <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/handle/11059/2365/6314H557.pdf>
- Holt, W., Thurston, L., Watson, P., & Medrano, A. (2005). *The significance of cooling rates and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope*. Recuperado el 22 de Diciembre de 2015, de: [https://www.researchgate.net/profile/William\\_Holt/publication/8105378\\_The\\_significance\\_of\\_cooling\\_rates\\_and\\_animal\\_variability\\_for\\_boar\\_sperm\\_cryopreservation\\_insights\\_from\\_the\\_cryomicroscope/links/0912f5102cc6fe7ab0000000.pdf](https://www.researchgate.net/profile/William_Holt/publication/8105378_The_significance_of_cooling_rates_and_animal_variability_for_boar_sperm_cryopreservation_insights_from_the_cryomicroscope/links/0912f5102cc6fe7ab0000000.pdf)
- Jara, R. (16 de Abril de 2012). *Estrés hiperosmóticas durante los procesos de congelación de semen porcino*. Tesis de grado, pp.3-33, Universidad politécnica de Chimborazo, Ecuador.
- Juárez, J. D. (2009). "Efecto de la velocidad de enfriamiento en la congelabilidad de los espermatozoides de porcino". Tesis de Maestría, 98pp. Universidad Politécnica de Valencia: [https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/14361/TesinaMaster\\_JorgeJuarez.pdf?sequence=1](https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/14361/TesinaMaster_JorgeJuarez.pdf?sequence=1)
- Leon, C. E. (2006). *Elaboración de diluyente de semen porcino*. Tesis de grado, pp122: <http://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/2640>
- Marquez, R. (2012). *Obtención del gel de Aloe Vera*. Universidad de los Andes Venezuela Recuperado el 2016, de.: <http://webdelprofesor.ula.ve/ingenieria/marquezronald/wp-content/uploads/primer-entrega.pdf>
- May, J. (1999). *Is ascorbic acid an antioxidant for the plasma membrane*. FASEB Journal, Ed (Vol. 1 (1). Extraído de: <http://www.fasebj.org/content/13/9/995.short>



- Medrano, A. (2005). *Estudio del metabolismo energético de los espermatozoides porcinos y su repercusión en el diseño de diluyentes optimizados para la conservación del semen refrigerado*. Tesis doctoral, 257pp, Universidad Autónoma de Barcelona: <https://ddd.uab.cat/pub/tesis/2005/tdx-0627106-150205/aamd1de1.pdf>
- Medrano, A., & Holt, W. (1998). Variación individual en la susceptibilidad del semen porcino al congelado-descongelado. *Dialnet, Archivos de zootecnia*, 47(178); pp.319-327.) Extraído de: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=278132>
- Mejía, A. (2011). *Efecto de la deshidratación por radiación infrarrojo sobre algunas características fisicoquímicas de interés comercial del Aloe vera (Aloe barbadensis)*. Tesis de grado, pp10-11, Universidad de La Sabana: <http://intellectum.unisabana.edu.co/bitstream/handle/10818/1249/Adriana%20Luzely%20Mejia%20Ter%C3%A1n.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Melo, C. (2015). *Avaliação da eficácia dos diluidores tris ou água de coco em pó (ACP-106®), associado à Aloe vera (Aloe barbadensis Miller), na conservação de sêmen canino*. Dialnet; Tesis, pp.18 – 83, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil, Recuperado el 20 de Octubre de 2016, de <http://www.tede2.ufrpe.br:8080/tede2/handle/tede2/4694>
- Membrillo, O., Cordova, I., Hicks, J., Valencia, J., & Castillo, H. (2011). *Efecto de la adición de antioxidantes en el diluyente de semen de macho cabrío antes de congelar y después de descongelar*. *Rev. vet.* 22: 2, 85-90, 2011. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. Recuperado de: [http://produccionbovina.com.ar/produccion\\_caprina/inseminacion\\_transferencia\\_caprino/38-antioxidantes.pdf](http://produccionbovina.com.ar/produccion_caprina/inseminacion_transferencia_caprino/38-antioxidantes.pdf)
- Mercado, E. (2011). *Caracterización de la congelabilidad y mejora de los diluyentes de crioconservación espermática en porcino ibérico*. E-Prints Complutense; Tesis de posgrado, pp 245; Universidad Computense de Madrid: <http://eprints.ucm.es/14442/1/T33326.pdf>
- Miranda, M., Maureira, H., Rodriguez, K., & Vega, A. (Marzo de 2009). *Influencia de la temperatura en la cinética de secado, propiedades fisicoquímicas y capacidad antioxidante del gel de Aloe Vera (Aloe Barbadensis Miller)*. Obtenido de Journal of Food Engineering; Volume 91(2), Pages 297–304: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877408004482>
- Montenegro, V. A., & Chimarro, M. R. (2013). *Evaluación del efecto de dos tipos de diluyentes comerciales en semen porcino para inseminación artificial en reproductoras de tercer y cuarto parto en el cantón Ibarra*. Tesis de grado, Universidad técnica del norte facultad de ingeniería en ciencias agropecuarias y



- ambientales, Ecuador, Obtenido de:  
<http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/2652/2/03%20AGP%20162%20ART%C3%8DCULO%20CIENT%C3%8DFICO.pdf>
- Ochoa, G., & Ortega, R. (2008). *evaluacion in vitro e in vivo de semen porcino conservado en diluyentes de larga duracion*. Revista Computadorizada de producción Porcina, Vol. 15 (4) pp 298-306, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Mexico.
- Okazaki, T., Akiyoshi, T., Sato, K., & Kawabe, T. (2014). *cryopreservation of boar spermatozoa: the curious functions of seminalplasma during freezing or thawing*. Recuperado el 26 de Diciembre de 2015, de *University Kagamiyama Higashi Hiroshima*: <http://www.angrin.tlri.gov.tw/English/2014NARO/p12-22.pdf>
- Oyewopo, A., Oremosu, A., Akang, E., Noronha, C., & Okanlawon, A. (2011). *Effects Of Aloe Vera (Aloe Barbadensis) Aqueous Leaf Extract On Testicular Weight, Sperm Count And Motility Of Adult Male Sprague-Dawley Rats*. . Obtenido de Department of Anatomy, College of Health Sciences, University of Ilorin : <http://www.americanscience.org>
- Pulgarin, D. (2010). *Estudio bromatológico, microbiológico, foliar y de fertilidad de los suelos en los cultivos de Aloe vera Barbadensis Miller en tres fincas del departamento de Risaralda*. Tesis de grado, 151p Universidad Tecnológica de Pereira <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/handle/11059/1798>
- Quintero, A. (2012). *Criopreservación de semen porcino - realidad o ficción*. XVI Congreso Venezolano de Producción e Industria Animal - La Universidad del Zulia Obtenido de: [http://www.avpa.ula.ve/congresos/xvi\\_congreso/xvi\\_cpia\\_memorias/armando\\_quintero.pdf](http://www.avpa.ula.ve/congresos/xvi_congreso/xvi_cpia_memorias/armando_quintero.pdf)
- Quiroz, R. E. (2013). *“evaluación de la actividad cicatrizante de un gel elaborado a base de los extractos de nogal Juglans neotrópica Diels, ORTIGA (Urtica dioica L.), SÁBILA (Aloe vera), EN RATONES (Mus musculus)”*. Tesis de Grado, Escuela superior politécnica de Chimborazo, Recuperado el 20 de Octubre de 2016, de: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/2568/1/56T010335.pdf>
- Rodríguez, H. (2005). *Evaluación de la calidad seminal en el verraco*. *Avances en tecnología porcina*, (2), 43-53pp, Universidad Sueca de Ciencias Agrícolas, Suecia Obtenido de: <http://www.avparagon.com/docs/reproduccion/ponencias/21.pdf>





- Rodríguez, H. (13 de Junio de 2013). Sperm biotechnologies in domestic species: state of the art., *Anim. Reprod.*, v.10, n.3, p.268-276, Recuperado de: [http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v10n3/p268-276%20\(AR620\).pdf](http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v10n3/p268-276%20(AR620).pdf)
- Rueda, M., Perdigón, R., Arias, T., Mendoza, D., J, B., & Lemus, C. (2009). *Optimización de la conservación del semen porcino con el diluyente cubano dicip*. Revista Computadorizada de Producción Porcin; Vil.16 (1); pp26-30  
Obtenido de: [file:///C:/Users/Manuel/Downloads/OPTIMIZACION\\_DE\\_LA\\_CONSERVACION\\_DEL\\_SEMEN\\_PORCINO\\_.pdf](file:///C:/Users/Manuel/Downloads/OPTIMIZACION_DE_LA_CONSERVACION_DEL_SEMEN_PORCINO_.pdf)
- Sahu, P... Deen, G., Ritu, S., Priyanka, P., Atul Kumar, S., Ajay, K., & Kapil Dev, P. (2013). Therapeutic and Medicinal Uses of Aloe vera: *Review Pharmacology & Pharmacy. Scientific research, Vol.4, 599-610* Obtenido de: [http://file.scirp.org/pdf/PP\\_2013110815081192.pdf](http://file.scirp.org/pdf/PP_2013110815081192.pdf)
- Sanches, V., & Santa, J. (Mayo de 2009). *Estudios de antraquinonas presente en el extracto mucilago y hojas de Aloe vera cultivadas en la región cafetera*. Tesis, 66pp, repositorio.utp.edu.co. Universidad Tecnológica de Pereira: Obtenido de: <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/handle/11059/1818/5428S211.pdf;jsessionid=7F198F9C2C04C3ACB62F4E00C5B25BB8?sequence=1>
- Satorre, M; Breininger, E, Beconi, M; Beorlegui, N (2007). *α-Tocopherol modifies tyrosine phosphorylation and capacitation-like state of cryopreserved porcine sperm*. Theriogenology, Volume 68(7), Pages 958–965, Tomado de: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.06.021>
- Shahzada, S., Shireen, F., & Fida, S. (28 de Diciembre de 2013). *Biological evaluation of efficacy of aloe barbadensis l. extract* Center of Biotechnology and Microbiology, University of Peshawar, KPK. Pakistan. Recuperado el 15 de Octubre de 2016, de: <http://www.researchgate.net/publication/267926332>
- Souza, A., Lima, G., & Silva, A. (2014). Alternativas para o aperfeiçoamento dos protocolos de criopreservação de sêmen de animais selvagens. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, vol 38, n.2, pp 98-102, Universidade Federal Rural do Semiárido Recuperado: [http://cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v38n2/pag98-102%20\(RB497\).pdf](http://cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v38n2/pag98-102%20(RB497).pdf)
- Souza, C. (2010). *Conservação de sêmen caprino a 4°C utilizando a cp-101 com duas concentrações de aloe vera ou gema de ovo*. Tesiis de pos grado, universidad de estadual do Ceará obtenido de: [http://www.uece.br/ppgcv/dmdocuments/cibele\\_melo.pdf](http://www.uece.br/ppgcv/dmdocuments/cibele_melo.pdf)



- Souza, C. (Febrero de 2015). Evaluación de la eficacia de dos dilutores TRIS y Agua de coco en asociación con Aloe Vera (*Aloe Barbadensis* Miller) en la conservación de semen canino. Tesis Doctoral, pp 88, Universidad Federal Rural de Pernambuco, Brasil, Obtenido de: <http://www.tede2.ufrpe.br:8080/tede/handle/tede2/4694>
- Souza, C., Santos, É., Pinto, R., Freire, C., & Silva, A. (2014). Renovação do diluidor tris com gema de ovo ou aloe vera sp. na viabilidade do sêmen canino refrigerado a 5°C –resultados preliminares. *Anais do VII CONERA – Caninos* Obtenido de: <http://periodicos.ufersa.edu.br/revistas/index.php/acta/article/viewFile/3963/5437>
- Suaza, A., Lima, G., Peixoto, G., Silva, A., & Olivera, M. (2016). *Use of Aloe vera–based extender for chilling and freezing collared peccary (*Pecari tajacu*) semen*. *Theriogenology*; Vol.(8); pp.1432-1438 Recuperado el 5 de Noviembre de 2016, de [http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X\(16\)00008-X/abstract](http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X(16)00008-X/abstract)
- Toledo, F. J. (2003). Los polisacáridos mucilaginosos de aloe vera (avmp): estabilidad. *Researchgate.net*; pp 1-29, Las Palmas de Gran Canaria Obtenido de: <http://www.researchgate.net/publication/266794505>
- Vasco, D., Hernández Meroño, M., Vásquez, J. M., Martínez, E., & Roca, J. (Noviembre de 2007). *Sustancias reactivas al oxígeno (ROS) en semen congelado-descongelado de Porcino*. Recuperado el 10 de Octubre de 2016, de: [www.uteq.edu.ec: http://www.uteq.edu.ec/revistacyt/publico/archivos/C2\\_articulo5.pdf](http://www.uteq.edu.ec/revistacyt/publico/archivos/C2_articulo5.pdf)
- Vega, A., Ampuero, N., & Díaz, L. (2005). El aloe vera (*aloe barbadensis miller*) como componente de alimentos funcionales. *Departamento de Ingeniería en Alimentos*, Universidad de La Serena, La Serena, Chile. Obtenido de: <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182005000300005>
- Williams, S. (2013). Criopreservación de semen porcino: desafíos y perspectivas., de *Rev. bras. reprod. anim*, 37(2), pp 207-212, Universidad Nacional de La Plata, Argentina, Recuperado el 18 de Diciembre de 2015: [http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v37n2/pag207-212%20\(RB474\).pdf](http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v37n2/pag207-212%20(RB474).pdf)
- Williams, S., Fernández, V., Gavazza, M., Marmunti, M., Zeinsteger, P., & Prena, G. (2015). *Congelación de semen porcino: resultados y avances en la técnica*, Universidad Nacional de La Plata. Recuperado el 9 de Enero de 2016: [http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/47888/Documento\\_completo.pdf?sequence=1](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/47888/Documento_completo.pdf?sequence=1)



Yeste, M. (2015). Recent Advances in Boar Sperm Cryopreservation: State of the Art and Current Perspectives. *Reproduction in Domestic Animals, Vol 50(2)*, pp71-79. Recuperado el 16 de Diciembre de 2015, de:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26174922>



## ANEXOS

### Anexo 1. Prueba de normalidad para las variables.

Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra

		Motilidad Individual Progresiva (%)	Vitalidad Espermática (%)	Anormalidad Espermática (%)	Test HOST (%)
N		96	96	96	96
Parámetros normales <sup>a,b</sup>	Media	44,2708	43,2083	9,9427	14,7135
	Desviación típica	12,26847	12,86870	7,25000	4,08769
Diferencias más extremas	Absoluta	,190	,083	,170	,122
	Positiva	,128	,083	,170	,122
	Negativa	-,190	-,082	-,126	-,071
Z de Kolmogorov-Smirnov		1,863	,813	1,661	1,192
Sig. asintót. (bilateral)		,002	,523	,008	,117

a. La distribución de contraste es la Normal.

b. Se han calculado a partir de los datos.

La prueba de Kolmogorov-Smirnov establece normalidad en los datos para vitalidad espermática y Test HOST, mientras que los datos de las variables motilidad individual progresiva y anomalidad espermática no muestran normalidad.



**Anexo 2.** Prueba de T de student para las variables Vitalidad espermática y Test HOST.

**Prueba de muestras independientes**

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
Vitalidad Espermática (%)	Se han asumido varianzas iguales	0,713	0,401	1,583	94,000	0,117	4,125	2,606	-1,050	9,300
	No se han asumido varianzas iguales			1,583	92,983					
Test HOST (%)	Se han asumido varianzas iguales	0,952	0,332	-2,017	94,000	0,047	-1,656	0,821	-3,287	-0,026
	No se han asumido varianzas iguales			-2,017	88,363					

La prueba de Levene determina varianzas iguales para las variables analizadas ( $p > 0,05$ ) permitiendo validar la prueba de T la cual establece que existe diferencias significativas entre tratamientos con respecto a la variable Test HOST ( $p < 0,05$ ), mientras que para la variable Vitalidad espermática no se observa diferencia estadística.



**Anexo 3.** Prueba de Mann-Whitney para las variables motilidad individual progresiva y anomalías espermáticas.

**Resumen de prueba de hipótesis**

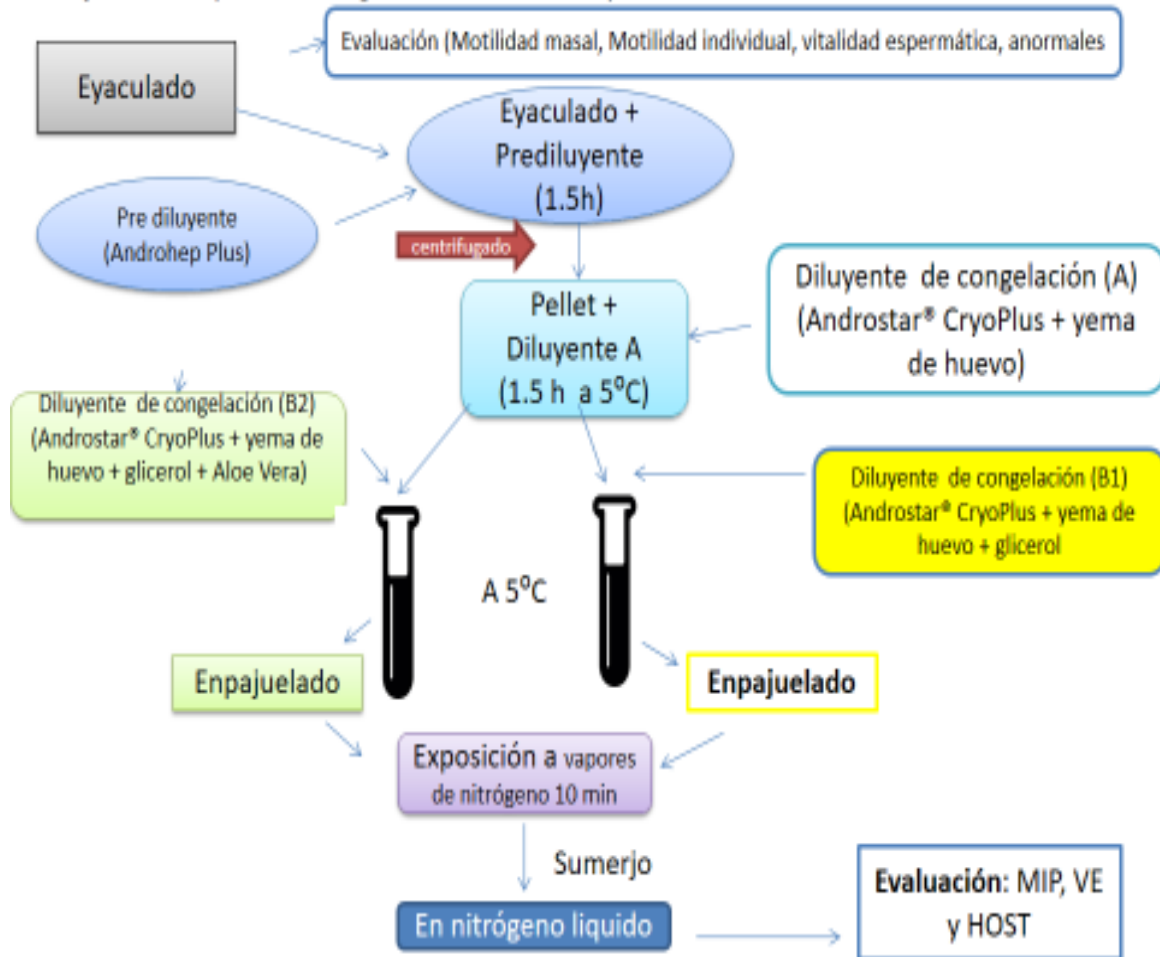
	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
<b>1</b>	La distribución de Motilidad Individual Progresiva (%) es la misma entre las categorías de Tratamientos.	Prueba U de Mann-Whitney de muestras independientes	,864	Retener la hipótesis nula.
<b>2</b>	La distribución de Anormalidad Espermática (%) es la misma entre las categorías de Tratamientos.	Prueba U de Mann-Whitney de muestras independientes	,245	Retener la hipótesis nula.

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es ,05.

La prueba U de Mann-Whitney establece que no existe diferencias estadísticas entre los tratamientos con respecto a las variables Motilidad individual progresiva y anomalía espermática.

### ANEXO 4. Organigrama del proceso de crioconservación del semen porcino.

Hoja de ruta para la congelación de semen porcino con Aloe Vera.



## Anexo 5. Extracción seminal de los verracos.



Fotografía 1. Extracción seminal.



Fotografía 2. Filtración del eyaculado.



### Anexo 6. Materiales.



Fotografía 3. La fracción raza del semen porcino.



Fotografía 4. Materiales utilizados en la investigación.

## Anexo 7. Aloe Vera.



Fotografía 5. Planta de aloe vera utilizada para la extracción del gel.



Fotografía 6. Extracción del gel de Aloe Vera.

## Anexo 8. Proceso de congelación de semen.



Fotografía 7. Preparación para la prueba de HOST.



Fotografía 8. Centrifugación del eyaculado prediluido.

### Anexo 9. Proceso de congelación de semen.

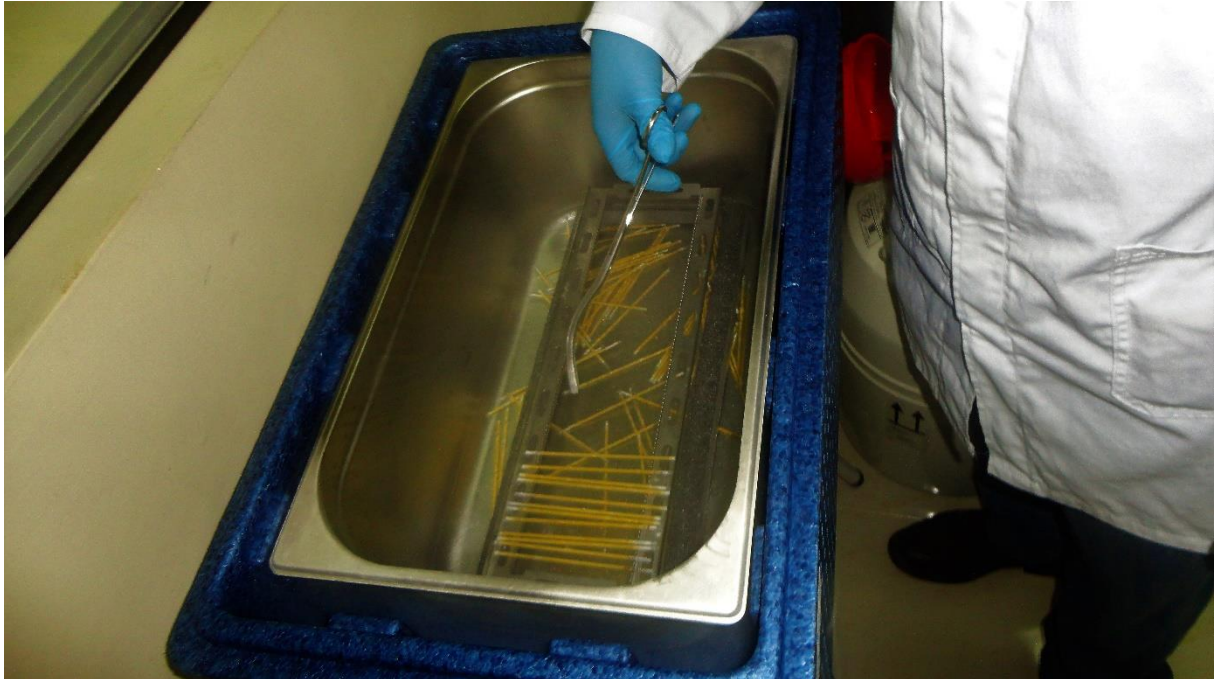


Fotografía 9. Preparación del diluyente para congelación.



Fotografía 10. Extracción de Aloe Vera.

## Anexo 10. Proceso de congelación de semen.



**Fotografía 11.** Congelación de pajuelas.

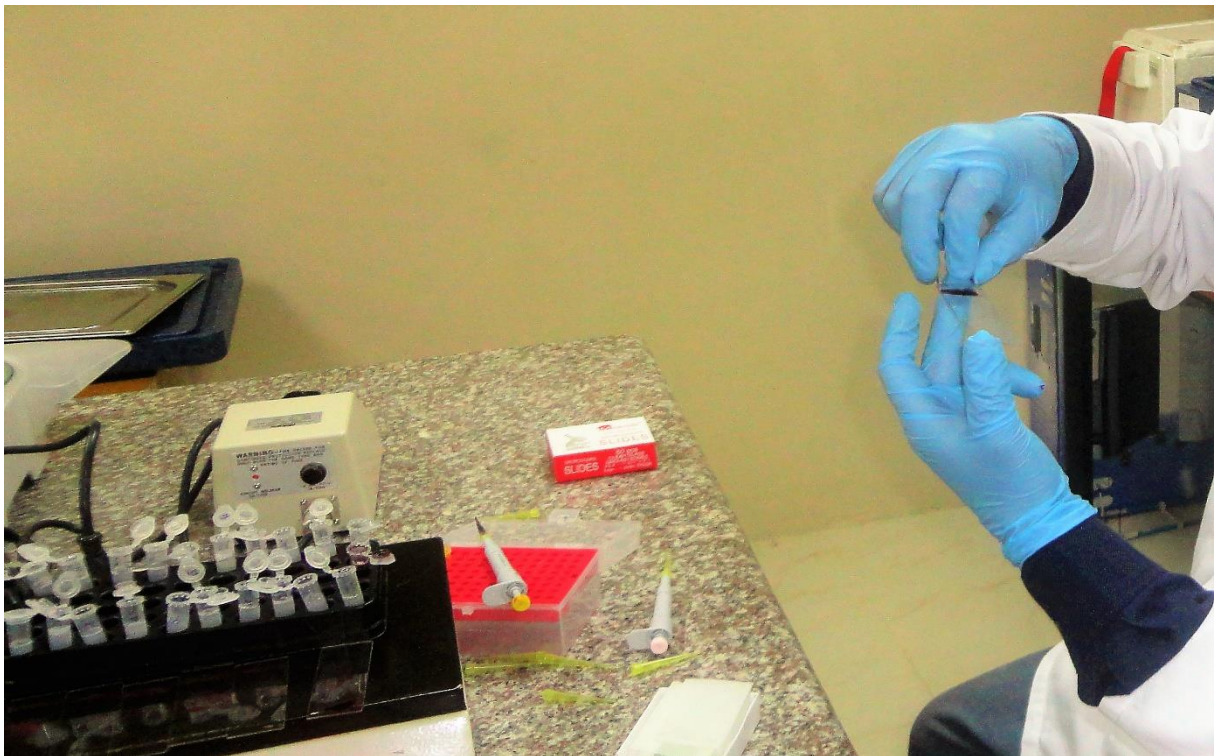


**Fotografía 12.** Almacenaje de las pajuelas en un termo con nitrógeno líquido.

### Anexo 11. Descongelación y evaluación.



Fotografía 13. Descongelación de pajuelas para evaluación.



Fotografía 14. Elaboración de frotis espermático con tinción de Eosina – nigrosina.

## Anexo 12. Descongelación y evaluación.

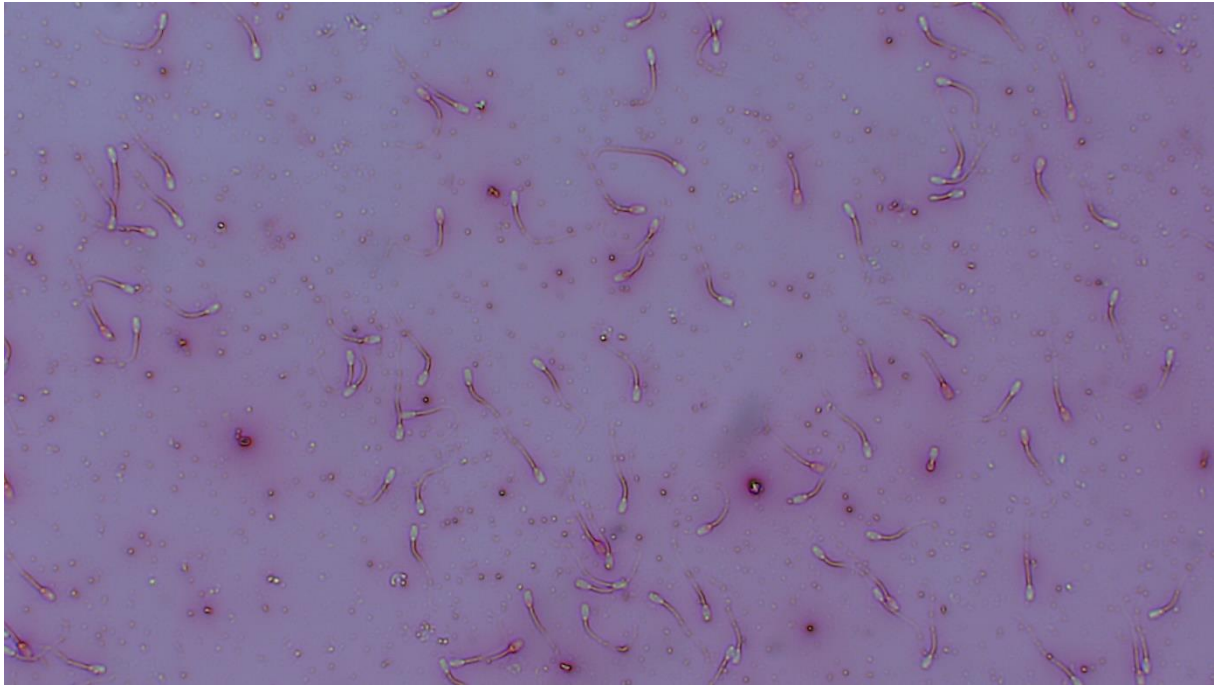


**Fotografía 15.** Frotis en placas con tinción supravital.

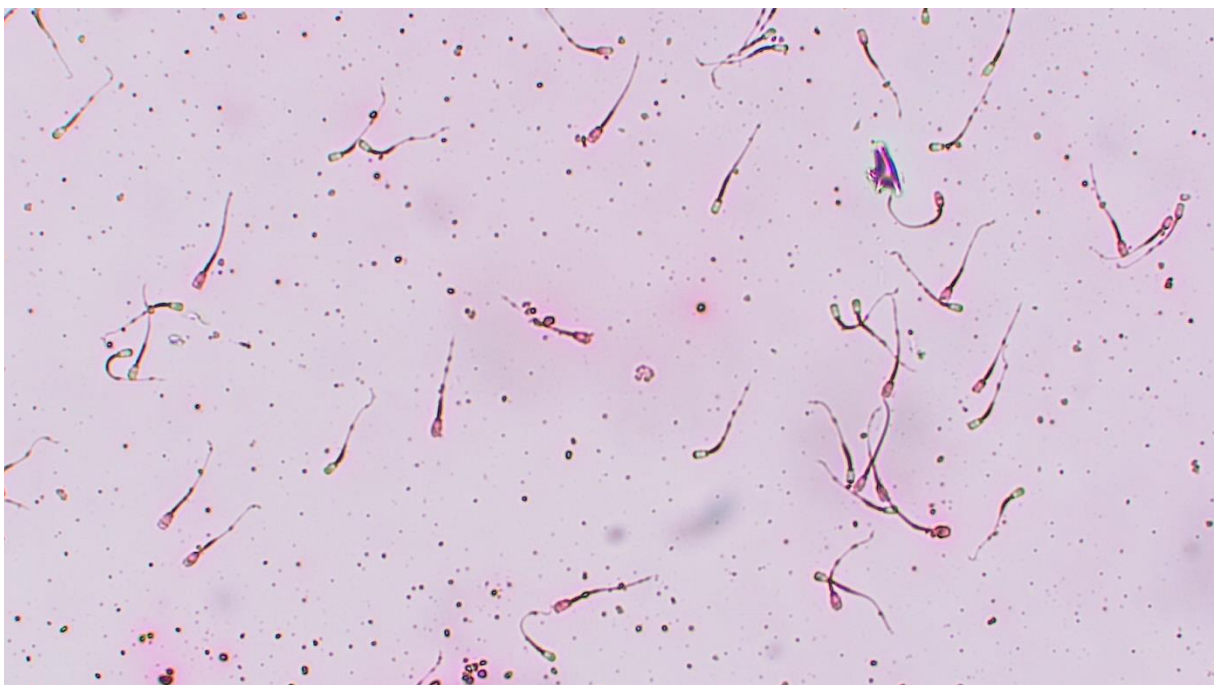


**Fotografía 16.** Evaluación en el microscopio de las pajuelas descongeladas.

### Anexo 13. Evaluación seminal.



**Fotografía 17.** Tinción de eosina – nigrosina de semen fresco.



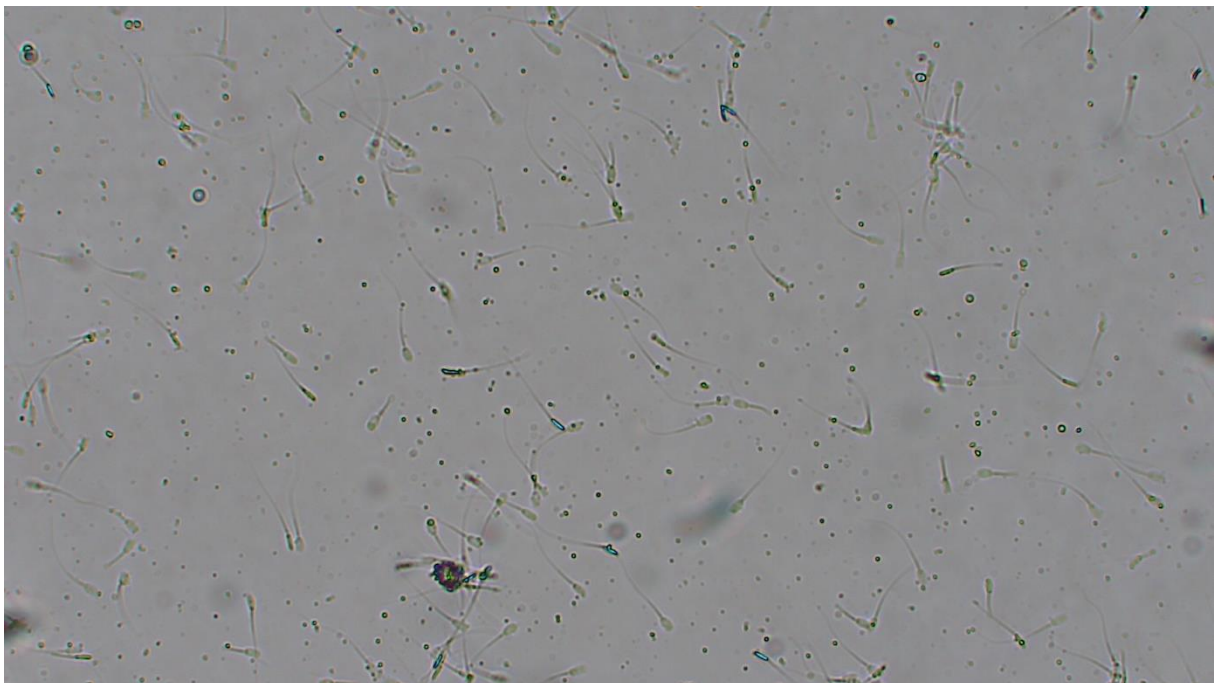
**Fotografía 18.** Tinción eosina-nigrosina de esperma porcino descongelado.



## Anexo 14. Evaluación seminal.



**Fotografía 19.** Anormalidades de cola con tinción eosina-nigrosina en esperma porcino criopreservado.



**Fotografía 20.** Espermias porcinos en un medio hipoosmótico (HOST).



Anexo 15. Análisis químico de los antioxidantes en el gel Aloe Vera.



**Multianalityca** Cía.Ltda  
Laboratorio de Análisis y Aseguramiento de Calidad

**INFORME DE RESULTADOS**

**INF.DIV-IN.20697**

SA 32371a

Cliente:	GUACHUN YANZA MANUEL HUMBERTO	Lote:	---
Dirección:		Fecha Elaboración:	---
		Fecha Vencimiento:	---
Muestreado por:	El Cliente	Fecha Recepción:	05/12/2016
Muestra de:	SABILA	Hora Recepción:	11:34
Descripción:	SÁBILA	Fecha Análisis:	05/12/2016
		Fecha Entrega:	19/12/2016
		Código:	-----

Características Muestra	
Color:	Característico
Olor:	Característico
Estado:	Sólido
Contenido Declarado:	300g
Contenido Encontrado:	-----
Observaciones:	Los resultados reportados en el presente informe se refieren a las muestras entregadas por el cliente a nuestro laboratorio

**RESULTADO INSTRUMENTAL**

PARÁMETROS	UNIDAD	RESULTADO	MÉTODO INTERNO	MÉTODO DE REFERENCIA
VITAMINA A	UI/100g	0.00	MIN-07	AOAC 992.06
VITAMINA C	mg/100g	126.67	MIN-10	AOAC 967.21
VITAMINA E	UI/100g	0.00	MIN-09	HPLC



**Multianalityca**  
Cía. Ltda.  
Quito - Ecuador



Ing. Teresa Ramirez  
DIRECTORA DE CALIDAD

Dirección: Cap. Edmundo Chiriboga N47-154 y Jorge Anibal Páez Telf.: 2267895 - 2269743 - 2444670 Cel.: 0958850754 - 0998281144  
 EDICION RG: 01      www.multianalityca.net      Quito - Ecuador      RIN-4.1-6      Página 1/1

Scanned by CamScanner