



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

**UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES**

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

**TESIS DE GRADO PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE MÉDICO
VETERINARIO**

TEMA

**“EVALUACIÓN EN LA CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN COLECTADO
DIRECTAMENTE DE EPIDÍDIMOS EN BOVINOS POR DOS MÉTODOS
(LAUNDERING - EPIDIDYMISS, SLICING -TESTICLES) EN EL
LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA EN REPRODUCCIÓN DE LA
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA”**

AUTORES

Erika Vanessa Cuaran Calva

Joel Levi Burbano Coral

DIRECTOR

Dr. Cristian Arcos

Latacunga, 2014

AUTORIA

Nosotros, Erika Vanessa Cuaran Calva y Joel Levi Burbano Coral, declaramos que el trabajo aquí descrito, la responsabilidad de la investigación, ideas expuestas, resultados y conclusiones de la presente tesis es de nuestra autoría y que no ha sido presentado para ningún grado o calificación profesional y que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Universidad Técnica de Cotopaxi puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido con la ley de propiedad intelectual, por su reglamentó y por la normativa institucional vigente.

Erika Vanessa Cuaran Calva
1718445149

Joel Levi Burbano Coral
0401221148

CARTA DE APROBACION DEL DIRECTOR DE TESIS

En mi calidad de director de tesis titulada **“EVALUACIÓN EN LA CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN COLECTADO DIRECTAMENTE DE EPIDÍDIMOS EN BOVINOS POR DOS MÉTODOS (LAUNDERING - EPIDIDYMIS, SLICING -TESTICLES) EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA EN REPRODUCCIÓN DE LA CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA”** Propuesto por los egresados, Erika Vanessa Cuaran Calva y Joel Levi Burbano Coral como requisito previo a la obtención del título de Médico Veterinario , de acuerdo con el Reglamento de Títulos y Grados, considero que el trabajo mencionado reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la presentación pública y evaluación por parte del Tribunal Examinador que se designe.

.....
Dr. Cristian Arcos

CARTA DE APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DE TRIBUNAL

En calidad de miembros del tribunal de la tesis de grado titulada **“EVALUACIÓN EN LA CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN COLECTADO DIRECTAMENTE DE EPIDÍDIMOS EN BOVINOS POR DOS MÉTODOS (LAUNDERING - EPIDIDYMIS, SLICING -TESTICLES) EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA EN REPRODUCCIÓN DE LA CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA”**, Propuesto por los egresados, Erika Vanessa Cuaran Calva y Joel Levi Burbano Coral como requisito a la obtención de título de Médico Veterinario, de acuerdo con el Reglamento de títulos y grados, consideramos que el trabajo mencionado reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la presentación pública .

Dra. Nancy Cueva

PRESIDENTE

Mvz. Paola Lascano

MIEMBRO

Dra. Blanca Villavicencio

OPOSITOR

DECLARACIÓN EXPRESA

La responsabilidad del contenido de esta tesis, corresponde exclusivamente y el patrimonio intelectual del mismo a la “UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI”

Erika Vanessa Cuaran Calva

1718445149

Joel Levi Burbano Coral

0401221148

AGRADECIMIENTO

En primer lugar agradezco a Dios porque me supo guiar en el camino correcto en mi vida estudiantil, por darme salud y vida, sobre todo agradecerle por la oportunidad de culminar con éxito este proceso.

A la Universidad Técnica de Cotopaxi por acogerme en sus aulas y brindarme la formación profesional con la cual seguiré adelante en mi vida profesional.

Al Dr. Cristian Arcos por haberme apoyado desinteresadamente en el presente trabajo. A la Dra. Paola Lascano por la orientación profesional y el tiempo dedicado a lo largo del mismo.

A mis padres por el apoyo emocional y su esfuerzo, que lograron que concluya esta etapa de mi vida.

Erika Vanessa Cuaran Calva

AGRADECIMIENTO

Mi sincera expresión de gratitud, para mis distinguidos maestros, que con nobleza y entusiasmo vertieron en mí sus vastos conocimientos, Y, a mi querida Universidad porque en sus aulas recibí los más bellos e inolvidables recuerdos, y siempre los llevaré en mí.

Joel Levi Burbano Coral

DEDICATORIA

A DIOS

Por concederme la oportunidad de culminar con éxito el esfuerzo de todos mis años de estudio.

A MIS PADRES

Yolanda y Leonardo.

Porque fueron las personas que me incentivaron a estudiar y seguir adelante en mi vida, por todo su apoyo sentimental y económico lo que hizo posible el éxito profesional alcanzado. Para ellos mi AMOR Y RESPETO.

A MI ABUELITA

Baldemira Vega

Quien fue una de las personas más importantes en mi vida ya que me ayudo espiritualmente a seguir estudiando y concluir con esta meta.

A LA UNIVERSIDAD TECNICA DE COTOPAXI

Que fue mi casa durante algunos años, ya que en sus instalaciones pude lograr finalizar mi carrera.

Erika Vanessa Cuaran Calva

DEDICATORIA

A mis Padres

Que con infinito amor supieron Guiarme en el camino de estudio para
alcanzar a base de él, una profesión que me permita ser un hombre
de bien y útil en la sociedad a ellos dedico este trabajo fruto
de su sacrificio y esfuerzos constantes.

Joel Levi Burbano Coral

INDICE

INTRODUCCION.....	1
OBJETIVOS.....	3
CAPITULO I.....	4
1.1 Anatomía y fisiología del aparato reproductor del toro.....	4
1.1.1 Testículo.....	4,5,6
1.1.2 Epidídimo.....	7
1.1.2.1 Convencionalmente está dividido en tres regiones.....	7
1.1.2.2 Examen de epidídimos.....	8
1.1.2.3 Funciones del epidídimo.....	8,10
1.1.2.4 Órganos de evacuación del semen.....	10,11
1.3 Escroto.....	12
1.3.1 Examen del escroto.....	13
1.4 Endocrinología del aparato reproductor del toro.....	14
1.4.1 Sistema endocrino.....	15
1.4.2 Compartimientos testiculares.....	16
1.4.3 Función testicular.....	16
1.4.4 Esteroidogénesis.....	17
1.5 Espermatogénesis.....	18
1.5.1 Espermiogénesis.....	19,20,21
1.6 Tipos de colección de semen.....	22
1.6.1 Vagina artificial.....	22,23
1.6.2 Electro eyaculación.....	24
1.6.2.1 Efectos de una estimulación con electroyaculador rápida.....	24
1.6.2.2 Preparación del toro para la recolección de semen con electroyaculador.....	25
1.6.2.3 Recolección de semen por electro eyaculación.....	25
1.6.3 Masajes de las glándulas genitales accesorias.....	26

1.6.4 Lavado de epidídimo.....	27, 28
1.6.5 Corte de epidídimo.....	29,30
1.7 Observación macroscópica	31,32
1.8 Observación microscópica.....	33.34.35
1.9 Diluyente andromed.....	36,37
1.10 Criopreservación.....	38
1.11 Cálculo del número de dosis seminales por eyaculado.....	39,40,41,42

CAPITULO II

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Ubicación.....	44
2.1.1 Situación Política.....	44
2.1.2 Situación geográfica.....	44
2.1.3 Datos meteorológicos.....	44
2.2 Materiales.....	45,46
2.3 Métodos.....	47,48
1. Recolección de testículos en el camal.....	48
2. Colecta de semen y evaluación seminal.....	48
3. Examen macroscópico valoración en semen fresco.....	50,51
4. Examen microscópico valoración de semen fresco.....	52,53
5. Diluyente Andromed y congelación.....	54
6. Evaluación post descongelado.....	55

CAPITULO III

resultados y discusiones.....	56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70
CONCLUSION.....	71
RECOMENDACIONES.....	72
ANEXOS	

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.- anatomía del testículo.....	pg3
Figura 2.- Aparato reproductor del macho partes y funciones.....	pg4
Figura 3.- Concentración espermática en toros adultos.....	pg9
Figura 4.- Anatomía del aparato reproductor del toro.....	pg12
Figura 5 .- Medida de circunferencia escrotal acuerdo a la edad.....	pg13
Figura 6.- Espermatogénesis.....	pg18
Figura 7.- Espermatogenesis mitosis.....	pg19
Figura 8.- Espermatogénesis meiosis I y II.....	pg20
Figura 9.- Espermiogénesis meiosis I y II.....	pg21
Figura 10.- Transición de los espermatozoides.....	pg21
Figura 11.- Clasificación de motilidad en masa del semen.....	pg33
Figura 12.- Evaluación de la motilidad individual (A, B, C.).....	pg34
Figura 13.- Vitalidad coloraciones vitales.....	pg 35

INDICE DE CUADROS DE RESULTADOS

CUADRO 1.- características macroscópicas del semen fresco por la técnica de laudering epididimys.....	57
CUADRO 2.- características macroscópicas del semen fresco por la técnica de slicing testicles.....	58
CUADRO 3.- Características microscópicas del semen fresco por la técnica de laudering epididimys.....	59
CUADRO 4.- características microscópicas del semen fresco por la técnica de slicing testicles.....	60
CUADRO 5.- características microscópicas del semen post descongelado por la técnica de laudering epididimys.....	61
CUADRO 6.- características microscópicas del semen post descongelado por la técnica de slicing testicles.....	62
CUADRO 7.- características microscópicas del semen por las dos técnicas en el parámetro morfología.....	63,64
CUADRO 8.- características microscópicas del semen por las dos técnicas en el parámetro motilidad en masa.....	65,66
CUADRO 9.- características microscópicas del semen por las dos técnicas en el parámetro motilidad individual.....	67,68
CUADRO 10.- características microscópicas del semen por las dos técnicas en el parámetro vivos y muertos.....	60,70

INDICE DE IMÁGENES

IMAGEN 1.- Recolección de testículos en el camal de saquisili.

IMAGEN 2 .- colección de los testículos en fundas herméticas.

IMAGEN 3 - limpieza de líquidos y sangre.

IMAGEN 4.- corte de facias y túnicas que recubren al testículo.

IMAGEN 5.preparacion del diluyente andromed.

IMAGEN 6.- técnica de Slicing testicles.

IMAGEN 7.- lavado retrogrado en la técnica de Slicing testicles.

IMAGEN 8.- técnica de laudering epididimys

IMAGEN 9.- contenido espermático sobre la placa térmica.

IMAGEN 10.- examen microscópico del semen.

IMAGEN 11.- conteo espermático en la cámara de Neubauer.

IMAGEN 12.- llenado de pajuelas.

IMAGEN 13.- pajuelas listas para crioconservar

IMAGEN 14.- enfriamiento de las pajuelas.

IMAGEN 15.- proceso de congelamiento.

IMAGEN 16.-control de la temperatura.

IMAGEN 17.- observación por parte del tribunal

RESUMEN

La presente investigación se llevó a cabo en los laboratorios de biotecnología de la reproducción, de la carrera de medicina veterinaria en la Universidad Técnica de Cotopaxi

El objetivo principal de dicho estudio fue evaluar la crioconservación de semen colectado directamente del epidídimo en bovinos por dos técnicas (Laundering - epididymis, Slicing -testicles) lo que permitió conocer por cuál de las dos técnicas se obtiene mayor número de espermatozoides y mejor calidad en la evaluación microscópica.

Para evaluar estos parámetros se realizó la extracción del semen por la técnica de slicing –testicles, este proceso consistió en realizar una limpieza externa del testículo dejándolo libre de las capas que lo recubren, se prosiguió con la identificación del epidídimo y posterior corte en líneas transversales y longitudinales de la cola del epidídimo sobre una caja petri, anteriormente se preparó el diluyente andromed, el cual nos ayudó a recolectar los espermatozoides por medio de un pequeño lavado.

El método Laundering – epididymis consistió en realizar cortes desde la cabeza del epidídimo hasta la cola para luego proseguir con el lavado usando diluyente andromed.

Luego de la extracción se continuó con el análisis macroscópico y microscópico.

El análisis dio como resultado que los espermatozoides obtenidos por la técnica de Slicing testicles presentan mejores características microscópicas.

En el análisis que se hizo post- congelación los resultados siguieron siendo los mejores, en comparación a los espermatozoides obtenidos por la técnica de Laundering – epididymis ya que aquí disminuyó la movilidad espermática.

ABSTRAC

This research was carried out in the laboratories of reproduction biotechnology , career of veterinary medicine at the Technical University of Cotopaxi . The main objective of this study was to evaluate the collected sperm cryopreservation in cattle directly from the epididymis by two techniques (Laundering - epididymis , Slicing - testicles) which allowed to know which of the two technical higher sperm count and better quality is obtained microscopic evaluation . To evaluate these parameters extraction cum - slicing technique testicles was performed , this process consisted of an external cleaning ---- testicle leaving the layers that cover , she went to the identification of the epididymis and subsequent court in transverse and longitudinal tail of the epididymis on a petri dish lines above the andromed diluent , which helped us collect sperm through a small laundering was prepared.

The method Laundering - epididymis was to make cuts from head to tail of the epididymis and then proceed with washing using andromed diluent . After the extraction was continued with the macroscopic and microscopic analysis. The analysis resulted in sperm obtained by the technique of Slicing testicles have better microscopic features .

The analysis was made after freezing results remained the best , compared to sperm obtained by the technique of Laundering - epididymis here decreased sperm motility .

INTRODUCCION

La importancia de conservar recursos genéticos durante el presente milenio es ampliamente reconocido, considerando que la conservación de espermatozoides es de gran importancia, ya que contribuye con grandes aplicaciones potenciales en biotecnología como: conservación de especies y medicina clínica, apoyando las técnicas de reproducción asistida que presentan numerosas posibilidades para ser empleadas en la propagación y conservación de las distintas especies animales, aunque todavía no se dispone de ningún método o procedimiento que permita determinar por medición directa el poder fecundante de los espermatozoides, se conocen algunas de las características que debe de exhibir el semen de buena calidad, entre estas se encuentran las características morfológicas, los que resultan importantes dentro del análisis seminal, de igual forma lo son la motilidad y la concentración espermática, ya que de ello dependerá el poder fecundante de los gametos. Los espermatozoides están entre las células más frágiles, y estas no sobreviven por largos periodos fuera del tracto reproductivo del macho, hay que recordar que el epidídimo sirve para la maduración de los espermatozoides, por lo que deben pasar por un período dentro de este para poder adquirir el poder de fecundar al óvulo.

La obtención de espermatozoides de animales muertos es una posibilidad de gran importancia para la preservación de animales en peligro de extinción, como también de animales de alto valor genético o de laboratorio. Para prevenir un deterioro en más especies de animales es necesario implementar o crear bancos de recursos genéticos de animales en vías de extinción o de alto valor genético para la reproducción de éstos, ligados con técnicas como: Maduración *in vitro* (IVM), Fertilización *in vitro* (IVF), Cultivo *in vitro* (IVC), e Inyección Intra citoplasmática de Espermatozoides (ICSI).

Los espermatozoides epididimales han sido crío conservados exitosamente en rumiantes silvestres como por ejemplo: el Ciervo Ibérico, Antílopes Africanos; sin embargo, existen pocos reportes en cuanto a los espermatozoides obtenidos de epidídimos y crío preservados en toros domésticos. Por lo que el objetivo de la siguiente investigación fue el obtener, evaluar y congelar espermatozoides recuperados de colas de epidídimos de toros.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la crioconservación de semen colectado directamente del epidídimo en bovinos por dos técnicas en el laboratorio de biotecnología en reproducción de la carrera de Medicina Veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi.

OBJETIVO ESPECIFICO

Conocer las particularidades macroscópicas que presenta el semen extraído del testículo de toro.

Analizar la morfología y características que presentan los espermatozoides microscópicamente

Calcular el número de espermatozoides obtenidos mediante las dos técnicas comparando en cual se obtienes más semen.

HIPOTESIS

H₀. Existe diferencia en las características macroscópicas y microscópicas con el empleo de las dos técnicas de colección de espermatozoides.

H₁. No existe diferencia en las características macroscópicas y microscópicas con el empleo de las dos técnicas de colección de espermatozoides.

CAPITULO I

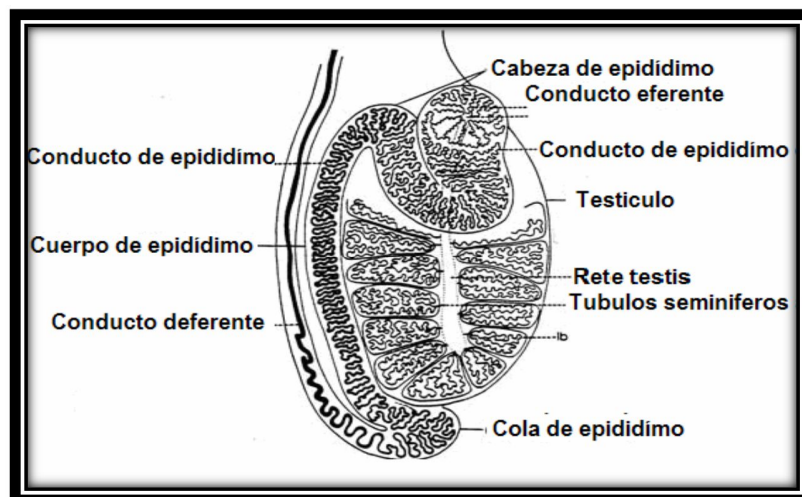
REVISIÓN DE LITERATURA

1.1 ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DEL APARATO REPRODUCTOR DEL TORO

Los órganos reproductivos del macho comprenden:

- Testículos
- Epidídimos
- Conductos deferentes
- Órganos accesorios

Figura 1: anatomía del testículo



(Splancnologia2000).

Figura 2. Aparato reproductor del macho partes y funciones

Partes	Características.	Funciones
Testículos	Órganos primarios de la reproducción del macho	<ul style="list-style-type: none"> ○ Gametogénica (espermatoz.), ○ Hormonal (endocrina), andrógeno o testosterona
Escroto	Bolsa exterior que recubre los testículos.	<ul style="list-style-type: none"> ○ Sirve de sostén y protección a los testículos. ○ Regula la temperatura de los testículos.
Conductos eferentes	Son conductos que unen la ret testis y al epidídimo	<ul style="list-style-type: none"> ○ Conducto de transporte de espermatozoides
Epidídimo	Conductos largo y tortuoso alargados, recorren en forma paralela a los testículos	<ul style="list-style-type: none"> ○ Transporte, maduración, concentración y conservación de espermatozoides
Conductos deferentes	Conecta el epidídimo de la uretra.	<ul style="list-style-type: none"> ○ Transporte y almacenamiento de espermatozoides.
Próstata	Evacua su secreción dentro de la uretra.	<ul style="list-style-type: none"> ○ Contribuye con fluido al semen
Glandulas vesiculares.	Tienen la forma de sacos alargados.	<ul style="list-style-type: none"> ○ Contribuye con fluido al semen
Glandulas de cowper o bulbouretrales	Son dos glándulas que vuelca sus secreciones en la uretra.	<ul style="list-style-type: none"> ○ Produce un lubricante viscoso que interviene en la limpieza de la uretra como preparación para el pasaje de espermatozoides.
Uretra	Órgano común al sistema urinario y genital	<ul style="list-style-type: none"> ○ Sirve para evacuar la orina y el semen.
Pene	Es un órgano eréctil con un extremo libre o terminal llamado glande.	<ul style="list-style-type: none"> ○ Órgano de copula ○ Depositar el semen en la vagina de la hembra. ○ Pasaje de la orina al exterior.
Prepucio	Invaginación de la piel.	<ul style="list-style-type: none"> ○ Protege y cubre el conducto de salida del pene ○ Tienen numerosas glándulas que secretan esmegma prepucial

(E. Mellisho 2010)

1.1.1 Testículo

En el bovino los testículos están colocados en la región inguinal, en posición vertical. Presentan una forma oval, bastante alargada, de alrededor de 10 a 15 cm de largo y 5 a 8,5 cm de diámetro. Su peso se estima individualmente en 250 a 300 g y en conjunto unos 500 g (Hafez, 2002).

El tamaño del testículo depende de la edad, de la raza y del desarrollo corporal. Se estima aproximadamente en un 0,09% del peso vivo del animal Su eje longitudinal es vertical, y sus funciones pueden resumirse: *(Albarran 2001)*.

a) Producción de espermatozoides (EZ) o espermatogénesis

b) Producción de andrógenos

En los animales mamíferos, el escroto se ubica entre los muslos y encierra a los testículos. Debido a su inserción pendulosa sirve para mantener a los mismos a varios centígrados menos que la temperatura corporal. Si no fuese así, la alta temperatura abdominal alteraría la espermatogénesis, y volvería al animal temporariamente sub fértil *(Amann R.P., Schanbacher B.D 2000)*.

La superficie testicular está recubierta por una fina lámina, la túnica vaginal propia. Ésta se extiende por encima de una capa fibrosa llamada túnica albugínea, que envuelve todo el parénquima testicular y es la responsable de su forma ovoidea que lo caracteriza *(Axner E., Linde-Forsberg C., Einarsson S. 2007)*.

El parénquima testicular está formado principalmente por los túbulos seminíferos (90% del órgano). Estos son convolutados, cilíndricos, y están estrechamente unidos de manera tal que dejan entre sí sólo pequeños espacios de tejido intersticial. Se anastomosan hacia el centro y se toman rectos, y luego se anastomosan formando una red (rete testis) a partir de la cual emergen los conductos eferentes atravesando la túnica albugínea. Se reúnen en un número de 10 a 15 y dan lugar de esta manera al epidídimo *(Baracaldo MI, Barth AD and Bertrand W. 2006)*.

En un corte transversal del túbulo seminífero podrá observarse, desde la pared hacia la luz de los mismos, una membrana basal, rodeada de células mioides, que actúa a modo de barrera hemato-testicular; las células de sostén o Células de Sertoli y las células germinales en sus distintos estadios, ubicadas entre los citoplasmas de las anteriores. Las espermatidas y los espermatozoides se ubican con sus colas hacia la luz de los túbulos (*Barrios,2002*).

Las células de Sertoli poseen el citoplasma extendido, de forma piramidal, y sostienen el epitelio germinativo constituyendo el armazón del túbulo seminífero. Descansan sobre la membrana basal y se adosan unas a otras por especializados complejos de unión que se localizan en la porción basal de las células y evitan que los diferentes estratos celulares penetren en la luz del túbulo, a menos que lo hagan a través del citoplasma de las células. Las células de Sertoli son necesarias para la nutrición de las células germinales a medida que se desplazan desde la membrana basal hacia la luz del túbulo (*Barth2008*).

De esta manera, el cordón espermático actúa como refrigerante o enfriador, intercambiando temperatura en la forma de un mecanismo de contracorriente.

Examen de testículos.

Los testículos varían en cierto modo respecto a tamaño, consistencia, desplazabilidad, aumento de temperatura, sensibilidad a la presión, forma y situación, aunque su estructura fundamental es la misma. Se les examina por inspección y

palpación para esto se rodea la base del saco escrotal desde atrás con una mano y luego con la otra se hace presión con los pulgares se desplaza el testículo hacia abajo hasta que el escroto esté tenso y sin pliegues. La consistencia o tono testicular (TT) se puede palpar con la yema de los dedos y calificarla por una combinación de firmeza y elasticidad en una escala de 1 a 4 (*Gazitúa., 2006*).

1. Muy firme y muy elástico.
2. Firme y elástico (el promedio).
3. Blando y esponjoso.
4. Muy blando y muy esponjoso.

1.1.2 Epidídimo

En el toro el epidídimo es muy desarrollado y se encuentra adherido al borde posterior del testículo. La cabeza es de forma ovoide y ocupa la extremidad superior. El cuerpo tiene forma de cilindro reprimido y recorre el borde posterior. La cola es de forma ovoide y ocupa la extremidad inferior del testículo (*Balbuena 2009*)

Consiste en un único, largo y compacto tubo arrollado, con un soporte de elementos de tejido conjuntivo que lo fija al testículo. Presenta un diámetro que varía entre 70 y 500 mm; Su peso es diverso en función de las grandes diferencias existentes entre los tamaños de los animales, siendo de 40 m en el toro. (*Bermúdez V. 2002*)

1.1.2.1 Convencionalmente está dividido en tres regiones

Cabeza: ubicada en el polo proximal del testículo y formada por 13 a 15 conductos eferentes.

Cuerpo: corre por el borde medial y posterior del testículo.

Cola: situada en el polo distal del mismo y almacena una importante cantidad de espermatozoides.

Los conductos eferentes y el canal epididimario están completamente rodeados por fibras musculares lisas circulares que se engruesan a nivel de la cola y comprenden también fibras longitudinales del mismo tipo. Esta musculatura presenta contracciones peristálticas regulares cada 2-10 segundos que aseguran el transporte de los EZ en el epidídimo. (*Hidalgo Ordóñez 2003*).

La inervación es abundante a nivel de la cola; la de tipo nor-adrenérgica proviene de neuronas ganglionares locales que reciben aferencias de los nervios hipogástricos y pelvianos, existiendo también una inervación de tipo colinérgica. En general, todas estas ramas nerviosas participan en la relajación (que permite el almacenamiento de los EZ en la cola del epidídimo) y en la contracción, que permite la expulsión de una fracción espermática durante la eyaculación (*Monforte 2003*).

La vascularización corre por cuenta de tres troncos arterio-venosos. Dos de ellos pertenecen al sistema “Arterio – Espermático – Plexo Pampiniforme” que irrigan la cabeza y la cola. El tercero proviene del sistema iliaco e irriga cola y canal deferente (*Tamargo 2005*).

1.1.2.2 Examen de epidídimos

El examen por inspección y palpación de los epidídimos que sirven para el transporte y maduración de los espermatozoides, se realiza también tomando manualmente un testículo deslizándolo hacia arriba y palpando el epidídimo que se desplaza a lo largo del testículo por la parte medial del mismo, por motivos prácticos se examina la cabeza, cuerpo y cola comparativamente entre ambos lados y luego en conjunto ya que forma una unidad funcional. (*Gazitúa., 2006*)

1.1.2.3 Funciones del epidídimo

Transporte, sobrevivencia y la maduración funcional de los EZ. Los cambios en la maduración incluyen:

- Adquisición de la capacidad de motilidad progresiva
- Condensación final del núcleo y modificaciones en la forma del acrosoma.
- Formación de puentes disulfuro en las estructuras proteicas
- Alteraciones en la naturaleza de la membrana plasmática
- Migración de la gota citoplasmática proximal a una posición distal de la pieza intermedia
- Disminución en la concentración de O₂ para inhibir el metabolismo de los EZ
- Reabsorción, fagocitosis y licuefacción de EZ deficientes
- Almacenamiento de EZ(*Monforte 2003*.)

Figura 3. Concentración espermática en toros adultos

RAZA	EPIDIDIMO			CONDUCTO DEFERENTE Y AMPOLLA	TOTAL
	CABEZA	CUERPO	COLA		
Hereford	11	1	21	6	40
Charolais	18	4	35	7	64
Holstein	20	5	39	8	72

(*Adaptado de Amann y Schanbacher, 2006*).

Los EZ son producidos en forma regular y expulsada continuamente de los túbulos seminíferos, pero son inmóviles en el líquido testicular. Las ciliadas del epitelio de los canales eferentes contribuyen a su progresión hacia la cabeza. En el epidídimo las contracciones rítmicas aseguran su desplazamiento. La duración del tránsito por el epidídimo varía según las distintas especies animales (*Chacón J., y H. Rodríguez-Martínez. 2002*).

Esta duración en la cabeza y el cuerpo no depende de la frecuencia de la actividad sexual de los animales. La cola, en cambio, actúa como reservorio en la cual los EZ pueden sobrevivir durante tres semanas (*Chung J 2009*).

Es importante puntualizar que los espermatozoides inmóviles que son transportados al lumen del tubo seminífero, una vez separados de la célula de Sertoli, tienen una cantidad de citoplasma residual de las espermatidas retenida por las células de Sertoli, y otra porción se queda unida al espermatozoide emergente y forma la “gota citoplasmática” (*Cisale, H., 2003*).

El tiempo requerido para la movilización de los espermatozoides por la cabeza y el cuerpo del epidídimo no es afectado por la eyaculación frecuente; es decir toros que eyaculan diariamente o tres veces a la semana mantienen un tiempo promedio de trayecto que dura aproximadamente 2.5 días en el toro adulto (*Dyce K.M. Sack W.O. y Wensing C.J.G 2007*)

En cambio, en la cola del epidídimo los movimientos peristálticos son menos frecuentes y los conductos deferentes son inactivos, excepto cuando la musculatura es estimulada a contraerse por lo que el tránsito en esta porción del epidídimo sí es

afectado por la eyaculación. El número de espermatozoides en la cola del epidídimo es máximo cuando los animales no han eyaculado en 7 días, pero se reduce en al menos. 25% en animales que eyaculan diariamente o con un día de por medio (*Fernandez 2009*).

Los espermatozoides son producidos continuamente a pesar de la eyaculación frecuente y entran al epidídimo a una tasa constante; sin embargo, si no son eyaculados, algunos son eliminados periódicamente con la orina (*Frandsen-Spurgeon 2000*).

Un solo epidídimo tiene capacidad para almacenar 4 ml de fluido rico en espermatozoides, con una concentración de 3.55×10^9 espermatozoides/ml, que ocupa la mitad del volumen total (*Galina C y Valencia J. 2006*).

1.1.2.4 Órganos de evacuación del semen

Conducto deferente: Comunica la cola del epidídimo con la uretra pelviana. Ascende por la cara medial de la binza, acompañando a la arteria y vena espermática, músculo cremáster externo y tunicas vaginales derivadas del peritoneo. Penetra al abdomen por el trayecto inguinal; a nivel de la cada dorsal de la vejiga urinaria se dilata formando la ampolla del conducto deferente (*Hafez, 2004*). Desemboca en la uretra pelviana cerca de la próstata. Su función es la de contribuir en la emisión de semen durante la eyaculación, transportando EZ mediante ondas peristálticas desde la cola del epidídimo hasta su desembocadura (*Hafez, 2004*).

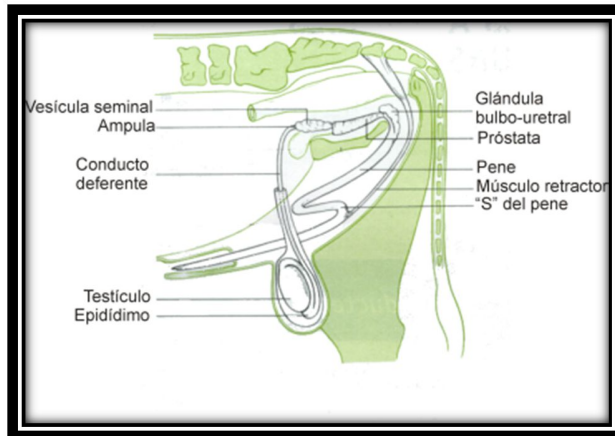
Uretra: Se divide en dos porciones, la pelviana y la peneana . La primera recibe todas las secreciones de las glándulas anexas y a los EZ desde el conducto deferente. Durante la eyaculación, el esfínter vesical cierra toda comunicación con la vejiga urinaria, de modo tal que el semen no refluya dentro de la misma, ni la orina contamine al mismo, ya que tiene propiedades espermicidas (*Hewitt D, Leahy R, England G, 200*).

Pene: Es el órgano copulador del macho. Posee una forma cilíndrica, y mide 90 cm de largo y de ancho 3 a 4 cm. Presenta tres porciones: raíz, cuerpo y glande. Dos raíces que se insertan en la base de la tuberosidad isquiática dan origen al pene y convergen para formar la porción dorsal del cuerpo del mismo. En ventral se ubica la uretra, rodeada de tejido eréctil (cuerpo cavernoso). La porción fija del pene se pliega sobre sí misma formando en los animales rumiantes una curvatura en forma de S, conocida como flexura o “S” sigmoidea (*KastelicM, Coulter G 2004*).

En resumen, el pene está formado por los cuerpos cavernosos (de naturaleza fibro elástica y fuertemente irrigados), la uretra con su cuerpo esponjoso y las membranas que lo recubren concéntricamente (*M. Kaproth, H. Rycrof, G. Gilbert , G. Abdel-Azim, B. Putnam , S. Schnell, R. Everett and Parks. 2005*).

La raíz se localiza en la región del musculo bulbo esponjoso. El toro tiene un pene fibroelástico, dada su estructura, su tamaño durante la erección varia tanto en diámetro y longitud. A medida que se sigue en dirección ventral, este forma una curva en forma de “S” o flexura sigmoide. La función de este segmento de unos 25 cm de largo es doblarse cuando el pene esta relajado, lo que permite retraerlo y mantenerlo protegido. Durante la erección, la flexura se endereza y el pene se extiende a los fines de la cópula (*Galina et al., 2006*).

Figura 4. Anatomía del aparato reproductor del toro.



(Cañibano 2002)

1.3 ESCROTO

Es un tejido que cubre y protege a los testículos en las especies que los muestran expuestos. Es una estructura termo reguladora que mantiene una temperatura entre 4 y 7 ° C menor que la corporal, cuando el animal es expuesto a bajas temperaturas el escroto se retrae acercando los testículos al cuerpo (*Maddocks, S Kern S Setchell B, 2006*).

1.3.1 Examen del escroto

El escroto y su contenido se observan y palpan exhaustivamente desde atrás con el toro bien sujeto para evitar accidentes, hay que prestar atención a eventuales asimetrías, al desplazamiento de testículos y a la superficie de la piel y pelos del

escroto. Se mide la circunferencia escrotal ya que existe una correlación positiva entre la circunferencia escrotal y la producción de espermatozoides (*Silva 2007.*)

Figura 5 . Medida de circunferencia escrotal acuerdo a la edad.

Circunferencia escrotal mínima recomendada por edad	
SC (CM)	
≤ 15 meses *	30
> 15 ≤ 18 meses	31
> 18 ≤ 21 meses	32
> 21 ≤ 24 meses	33
> 24	34

(*Spitzer., 2000*)

La función de estas glándulas es la de producir el líquido seminal donde se conservan los espermatozoides y les sirve a su vez de vehículo para su salida a través de la uretra. Estos líquidos le dan volumen al semen y además le aportan nutrientes y protección (*Mariani, A.R., Billi, A.M., 2000*).

Próstata: Esta glándula está ubicada cerca del cuello de la vejiga, y su función consiste en producir líquidos alcalinos con el fin de neutralizar la condición ácida de la uretra y de la vagina.

Glándulas bulbo uretrales o de cowper: Están situadas a lado y lado de la uretra; su función es similar a la de la próstata y los líquidos secretados por ellas sirven de vehículo al esperma (*Gómez A.*)

Se encuentra en posición dorsal a la uretra. Cerca de su terminación de su parte pélvica. En el toro está casi oculta por el músculo bulbo esponjoso. La secreción de estas glándulas no forman parte del eyaculado, ya que sus funciones son básicamente limpiar y lubricar la uretra para el paso del eyaculado (*Galina et al., 2006*).

Vesículas seminales: Son dos y están situadas a ambos lados del cuello de la vejiga, sobre la próstata y dirigidas hacia adelante. Tienen una longitud aproximada de 8 a 10 centímetros, son de forma lobulada y secretan un líquido rico en azúcares como fructuosa y ácido cítrico (*Reyes-Moreno 2002*).

1.4 ENDOCRINOLOGÍA DEL APARATO REPRODUCTOR DEL TORO

Los criterios de evaluación andrológica en el Toro se establecen desde las etapas de la pubertad, la madurez sexual, la conformación corporal, aplomos, caracteres de heredabilidad, evaluación del semen y el desarrollo del aparato reproductor(*Rodríguez, G. 2007*).

La endocrinología es la rama de la medicina que estudia las glándulas de secreción interna, sus secreciones específicas llamadas hormonas y sus enfermedades. La endocrinología conoce de la biosíntesis, el almacenamiento, la función de las hormonas y de las células de las glándulas endocrinas y de los tejidos que las secretan (*Rodríguez,2000*).

En los mamíferos hay dos sistemas que regulan el proceso reproductivo: el endocrino y el nervioso, cada uno desempeña un papel específico. Es necesario que haya una interrelación entre ambos para que el proceso reproductivo llegue a buen término. Esta regulación se lleva cabo mediante una compleja cascada de actividades combinadas del Sistema Nervioso Central- SNC - los tejidos secretores, las hormonas y los órganos blanco (*Rodríguez ,G 2007*).

1.4.1 Sistema endocrino

Representado por un conjunto de órganos y tejidos que liberan un tipo de sustancias llamado hormonas. Los órganos endocrinos también se denominan glándulas sin conducto o glándulas endocrinas, debido a que sus secreciones se liberan directamente en el torrente sanguíneo, mientras que las glándulas exocrinas liberan sus secreciones sobre la superficie interna o externa de los tejidos cutáneos, la mucosa del estómago o el revestimiento de los conductos pancreáticos (*Rivera Miguel 2011*).

Las hormonas secretadas por las glándulas endocrinas regulan el crecimiento, el desarrollo y las funciones de muchos tejidos, y coordinan los procesos metabólicos del organismo (*Rivera Miguel 2011*).

Los tejidos que producen hormonas se pueden clasificar en tres grupos:

- Glándulas endocrinas: Producen hormonas, carecen de conductos excretorios y por ello vierten sus secreciones al torrente sanguíneo.

- Glándulas endo-exocrinas: Producen también otro tipo de secreciones además de hormonas.
- Tejidos no glandulares: Como el tejido nervioso del sistema nervioso autónomo que produce sustancias parecidas a las hormonas, es decir, no tienen una estructura glandular definida pero vierten sus productos al torrente sanguíneo ejerciendo mecanismos de regulación en el individuo (*Rivera Miguel 2011*).

Las hormonas controlan cuatro áreas básicas del organismo:

- 1.- Crecimiento y desarrollo.
- 2.- Mantenimiento del medio interno.
- 3.- Diferenciación celular y reproducción.
- 4.- Regulación del metabolismo y del aporte nutricional.

1.4.2 Compartimientos testiculares:

El testículo tiene tres compartimientos funcionales

- a) El compartimiento intersticial, contiene las células de Leydig (que rodean cada túbulo seminífero y lo bañan con un fluido rico en testosterona) y vasos sanguíneos y linfáticos (*Jonson, 2008*).
- b) El compartimiento basal (separado del anterior por la lámina propia testicular), que incluye la base de las células de Sertoli (células de sostén), y las espermatogonias (células espermáticas precursoras, que se dividirán por mitosis);
- c) El compartimiento adluminal, que incluye la porción apical de las células de Sertoli, y los espermatoцитos y espermátides. Aquí ocurre la espermiogénesis (*Arthur 2003*).

El compartimiento basal y el compartimiento adluminal están separados fisiológicamente en el animal adulto por la “barrera hemotesticular” conformada por

“uniones gap” entre las células de Sertoli Esta barrera afecta el libre intercambio de sustancias hidrosolubles, por lo cual la composición del fluido que se encuentra dentro del túbulo seminífero es diferente al fluido extra tubular (*Bracket, 2005*).

1.4.3 Función testicular:

El testículo tiene dos funciones principales que son: a la esteroidogénesis o secreción de hormonas masculinas, como la testosterona y androstenediona a través del proceso de esteroidogénesis, en las células de Leydig (*M. Orsi, 2007*).

La gametogénesis o producción de espermatozoides a través del proceso de espermatogénesis, en los túbulos seminíferos (*Franco Ayala 2007*).

1.4.4 Esteroidogénesis:

Las células de Leydig producen hormonas masculinas como respuesta a su estimulación por parte de la hormona luteinizante (LH), liberada por la hipófisis, a su vez estimulada por la GnRH secretada por el hipotálamo. La testosterona producida por las células de Leydig es necesaria, entre otras cosas, para la función de las células de Sertoli y la producción de espermatozoides (*Tamayo 2011*).

Las células de Leydig se localizan en el tejido intersticial en estrecha aposición con los vasos sanguíneos y linfáticos. Son células poliédricas cuyo citoplasma contiene numerosas vacuolas lipídicas y abundante retículo endoplásmico liso (*Chenoweth, 2000*). Los productos de secreción de estas células son los andrógenos, más la inhibina, la activina y el “factor de crecimiento parecido a insulina” o IGF-I (*Palma 2001*).

La producción de esteroides está directamente relacionada con la cantidad de retículo endoplásmico liso presente en la célula de Leydig, ya que allí se produce colesterol a partir del acetato y se almacena libre o en compuestos esterificados La

formación de pregnenolona ocurre en las mitocondrias como consecuencia de la escisión enzimática del colesterol, y pasa al retículo endoplásmico liso donde es rápidamente metabolizada a testosterona a través de la ruta intermediaria D y D por la 3 β -hidroxi-esteroide-deshidrogenasa (*Salisbury 2001*).

La secreción de testosterona está controlada por la LH, y el mecanismo por el cual ésta estimula las células de Leydig incluye un incremento en la formación de cAMP o AMP cíclico (*Arthur , 2004*).

La actividad esteroidogénica de las células de Leydig es inhibida por: a) estrógenos producidos en la célula de Sertoli; b) un factor parecido a GnRH, que ha sido reportado en el testículo y en cultivo de dichas células (*Bracket,., 2005*).

Los “factores de crecimiento parecidos a insulina” (IGF-I e IGF-II), y la inhibina estimulan la esteroidogénesis inducida por la LH (*Cole, 2006*).

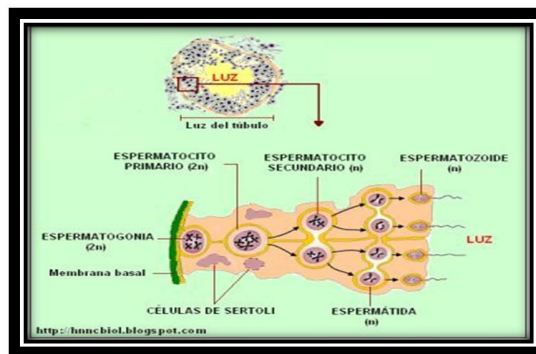
Además se ha demostrado que la presencia de macrófagos testiculares estimulan la actividad esteroidogénica en las células de Leydig in vitro (*Dukes, 2007*)

1.5 .ESPERMATOGÉNESIS.

Es el proceso biológico de la transformación gradual de las células germinales en espermatozoides, durante un periodo de tiempo dentro de los límites de los túbulos seminíferos de los testículos. Este proceso involucra la proliferación celular por divisiones mitóticas, duplicación de cromosomas, recombinación genética, reducción y división meiótica, hasta producir espermátides haploides y la diferenciación terminal de las espermátides en espermatozoides (*Knobil 2003*).

La espermatogénesis incluye dos fases: la espermatocitogénesis, en la cual las espermatogonias sufren división celular hasta transformarse en espermátides y la espermiogénesis, en la que las espermátides sufren cambios morfológicos progresivos y se transforman en espermatozoides completamente formados (Hafez., 2000).

Figura 6. Espermatogénesis



(elaborado por :Bruce 2003)

Es el proceso por el cual las células madre desarrollan hasta espermatozoides maduros.

Tiene tres fases:

(1)Espermatocitogénesis (Mitosis),

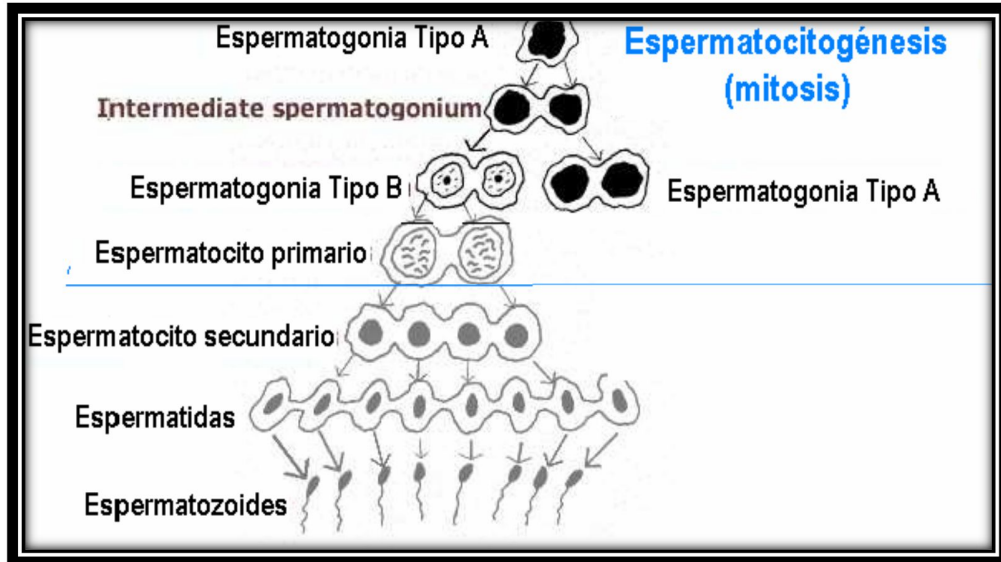
(2)Meiosis.

(3)Espermiogénesis.

1.5.1 Espermatocitogénesis (Mitosis)

Las células madre (Espermatogonia Tipo A) se divide por mitosis para remplazar a las células que inician diferenciación (Espermatogonia Tipo B). La espermatogonia presenta un núcleo de forma esférica u ovalada (Evans.2005).

Figura 7. Espermatogénesis mitosis

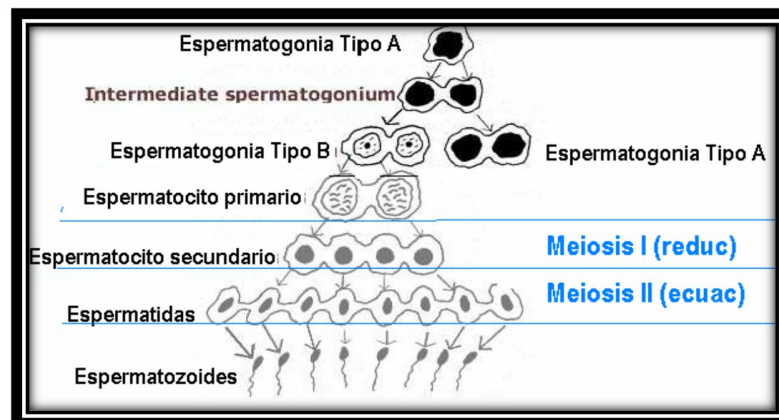


(Langman, 2000)

Meiosis

Las células en Profase de Meiosis I son espermatocitos primarios. El producto de la culminación de meiosis I, se denomina espermatocito secundario, la cual es un paso muy rápido. El producto de la segunda división meiótica se denomina espermatida *(Berdugo J., Avella F 2006.)*

Figura 8. Espermatogénesis meiosis I y II

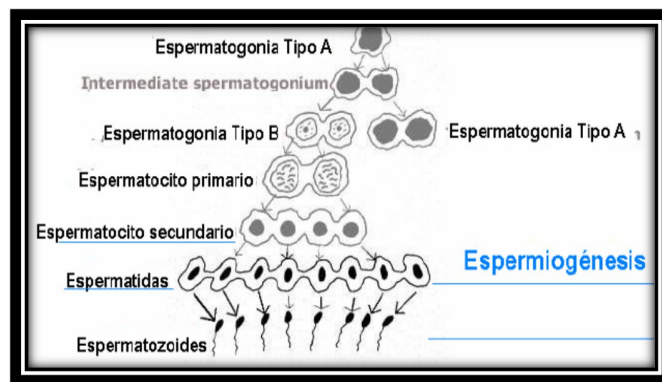


(Langman, 2000).

1.5.2 Espermatogénesis

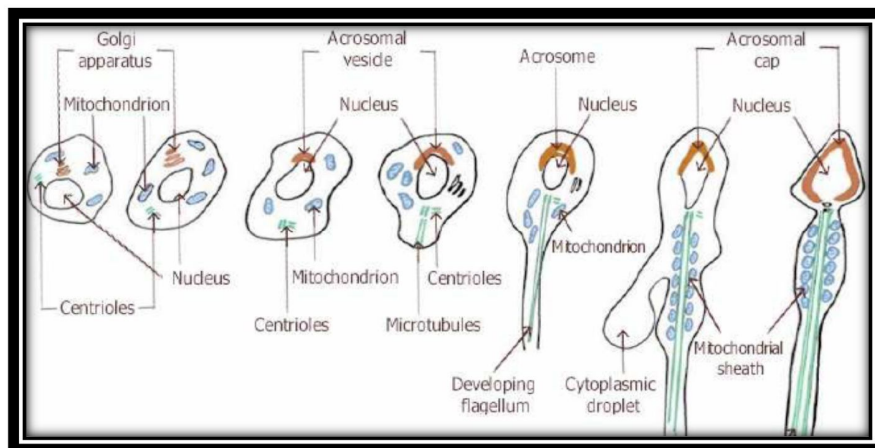
Es la metamorfosis de espermatidas esféricas a espermatozoides elongados. Durante esta etapa se forma el acrosoma, el flagelo y el exceso del citoplasma (cuerpo residual) es separado debajo de las células de Sertoli (*Bidot A 1990*)

Figura 9. Espermiogénesis meiosis I y II



(Langman, 2000).

Figura 10. Transición de los espermatozoides



(Langman, 2000).

Fases

- A) Fase de Golgi, formación del granulo acrosomico asociado a la membrana nuclear de la fusión de aparato de golgi y retículo endoplasmatico (1 a 3)
- B) Fase del Capuchón, crecimiento del capuchón acrosomico, el centriolo y el cuerpo de la cromatina migra hacia el polo posterior y se inicia la formación del flagelo (4 a 7)
- C) Fase del acrosoma, transformaciones morfológicas drásticas, condensación, elongación y cambios de forma.
- D) Fase de maduración, las espermatidas completan su diferenciación, formación del flagelo, cuello o pieza media (*Ducan 2005*).

1.6 TIPOS DE COLECCIÓN DE SEMEN

Colección de Semen

Existen diferentes métodos para la recolección de semen en los bovinos, entre los cuales tenemos:

- La vagina artificial
- Electro eyaculación
- Masajes de las glándulas genitales accesorias.
- Lavado de epidídimo
- Corte de epidídimo (*Cook B 2004*).

1.6.1 Vagina artificial

Es el método de elección en el bovino, ya que el eyaculado obtenido es normal y representativo del toro en ese momento (*Martínez, 2004*).

La vagina artificial consta de un tubo rígido de hule, con una válvula exterior; por el lumen del tubo se introduce una manga de látex, la que se dobla sobre los extremos del tubo creando así una recámara de aire (*Galina et al., 2006*).

Después, un cono de látex con un tubo de centrifuga graduado se fija a uno de los extremos y al tubo de hule se le introduce agua caliente; Para efectuar la colección de semen, los toros requieren que la VA tenga una temperatura entre 42 y 50°C. Para la monta se utiliza un señuelo que puede ser una vaca, un macho o un maniquí. Antes de colectar el semen se debe de tener en cuenta dos aspectos importantes: la higiene y el estímulo del semental (*Galina et al., 2006*).

Antes de la monta se deberá lavar con agua y secar perfectamente el vientre y la zona del prepucio; el mechón de pelos del orificio prepucial estará limpio y los pelos se cortaran a una longitud de aproximadamente 2cm (*Galina 2006*).

En el momento de recoger el semen, la temperatura óptima en el interior de la vagina debe ser de 38 a 39°C. Sin embargo, existen toros que exigen una mayor temperatura para eyacular. Luego se procede a la toma del eyaculado, sujetando una hembra en celo u otro macho o un maniquí. El técnico encargado de la recolección se coloca a la derecha del toro y mantiene la vagina artificial en la mano derecha, con la abertura dirigida hacia el pene, mientras que con la mano izquierda colocada sobre el prepucio lo dirige hacia la abertura de la vagina. (*Martínez, 2004*).

Debe evitarse tocar directamente el pene, ya que la erección puede ser inhibida y el toro negarse a montar. Es recomendable practicar la falsa monta, con la finalidad de que el toro alcance el máximo grado de erección y de esta manera obtener un semen de buena calidad. Luego de practicar la falsa monta, se procede a efectuar la recolección, mediante la introducción del pene en la vagina artificial hasta lograr la eyaculación; después el operador retira la vagina artificial y el eyaculado o semen se deposita en el tubo colector (*Hellemann, 2006*).

1.6.2 Electro eyaculación

Los electro eyaculadores están indicados para estimular los nervios pélvicos simpáticos y parasimpáticos con impulso de bajo voltaje de esta forma pueden inducir erección peneana y eyaculación. El cilindro electro eyaculador se lubrica y se introduce por el ano en la región rectal ocupando la cavidad pélvica, la emisión del semen se logra al estimular los nervios simpáticos lumbares(hipogástrico) en la parte más anterior de la cavidad pélvica. Los nervios sacros que causan erección y eyaculación están localizados en una zona posterior ,al aplicar el estímulo este debe ser intermitente ,rítmico y su intensidad deberá aumentarse paulatinamente hasta que se produzca la eyaculación el semen se recoge colocando el embudo con el tubo colector en la punta del glande del pene (*Cruz, 2004*)

La primera consideración es el tiempo que el toro necesita para eyacular. Nunca debemos apresurar este evento. Debemos simular lo mejor posible el tiempo que tarda la reacción natural. Esto se logra con paciencia, observación cuidadosa, y correcta interpretación de las reacciones del toro (*Barrios 2006*).

1.6.2.1 Efectos de una estimulación con electroyaculador rápida

El resultado es una falla "involuntaria" por parte del toro. Las reacciones fisiológicas y bioquímicas que deben sucederse en un orden definido son alteradas en su secuencia (*Barrios 2006*)

- 1) Los músculos retractores no se relajen antes de la erección del pene;
 - 2) Se llena de sangre la porción anterior del cuerpo cavernoso, antes que la flexura sigmoidea se enderece;
 - 3) Sobre-estimulación de los músculos retractores antes que desaparezca la flexura sigmoidea;
 - 4) Liberación prematura de la fracción espermática, que resulta en una mezcla incompleta de espermatozoides y el producto de las glándulas sexuales accesorias
 - 5) Estimulación del sistema urinario antes que los mecanismos eyaculatorios.
- (*Barrios Diego 2006*)

1.6.2.2 Preparación del toro para la recolección de semen con electroyaculador

- a) Se debe estimular el reflejo de orinar mediante masajes en la zona del prepucio.
- b) Se debe lavar el prepucio con agua (idealmente con manguera) y secar muy bien, la piel y mucosa, con toallas de papel.
- c) Se debe cortar sólo el exceso de pelos demasiado largos y muy contaminados del prepucio. Recordemos que los pelos del prepucio tienen una función protectora de la mucosa. (*C. And Jara, C 2006*).

1.6.2.3 Recolección de semen por electro eyaculación

- a) El brete debe ser ancho en la base. Se deben evitar bretes muy estrechos en la base que obliguen al toro a colocar sus patas una delante de la otra.
- b) La base del brete debe tener pequeñas barras transversales que impidan que el toro resbale al moverse.
- c) La "tijera" para la cabeza del toro debe permitir que el cuello pueda deslizar libremente hasta el piso.
- d) Debe tener barras laterales verticales (no inclinadas) que permitan hacer ligera presión por ambos lados del toro, desde el "encuentro" hasta la "punta de anca".
- e) Debe permitir colocar una barra de hierro, mecate, o correa de cuero detrás del toro.
- f) Debe permitir colocar una "cincha" para prevenir que el toro se pueda caer dentro del brete.
- g) Además, y aunque parezca obvio, debemos asegurarnos que el brete esté en buenas condiciones, y en un sitio adecuadamente techado. Se debe evitar recolectar semen bajo el sol (*Watson P.F 2005*).

1.6.3 Masajes de las glándulas genitales accesorias

El método del masaje: este método es mucho más simple. Muller y Evans describieron en 1934 la técnica del método para su aplicación al toro; consiste, en esencia, en practicar un masaje en la terminación de los canales deferentes, de las vesículas seminales y de la región de la próstata, introduciendo la mano y el antebrazo en el recto del animal. Este estimula la salida del semen, que otra persona recoge con una probeta de vidrio, por lo que el método resulta menos recomendable que el anterior. Tiene además, el inconveniente de que la cantidad de semen es menor

y éste es menos concentrado; que el semen puede contaminarse con relativa facilidad y que es muy frecuente que se mezcle con él alguna cantidad de orina, que es suficiente para matar los espermatozoides (*Konig H.E. y Liebich H.G. 2002*).

Esta técnica requiere de dos personas una para realizar el masaje rectal y otra para recolectar el semen, del toro se ubica en una manga, se remueve todas las heces que se encuentran en el recto ,se aplica un masaje longitudinal repetitivo hacia adelante y hacia atrás principalmente sobre las ampollas deferentes ocasionando que el semen fluya hacia la uretra pélvica, al iniciarse la pulsación del musculo uretral el masaje debe hacerse al ritmo de las pulsaciones ,al mismo tiempo la otra persona debe recoger el semen que gotee en un recipiente precalentado (*Hafez ,2000*).

Durante el masaje rectal, a persona que hace la colección puede sujetar el pene extendido por el glande, para facilitar la colección de una muestra seminal libre de contaminantes (*Hafez., 2000*).

1.6.4 Lavado de epidídimo

Los espermatozoides de epidídimo pueden obtenerse post mortem o tras una castración, de hecho, el primer ternero nacido de semen congelado se obtuvo a partir de espermatozoides de epidídimo se sabe que después de la muerte de un semental los espermatozoides del epidídimo permanecen viables durante un tiempo antes de que les afecte la descomposición (24 horas tras castración a T° ambiente) (*Braun, 2000*).

Para la obtención de los espermatozoides se disecciona el epidídimo y se coloca una cánula en el conducto deferente, posteriormente se secciona el epidídimo en la zona de unión entre el cuerpo y la cola del epidídimo y se realiza un lavado retrógrado de la cola del epidídimo con un diluyente adecuado. Hay que tener en cuenta que en la

cabeza del epidídimo se eliminación de fluidos sobrantes del espermatozoide inmaduro, en el cuerpo los espermatozoides comienzan a tener capacidad fecundante y cola donde fundamentalmente se almacenan espermatozoides maduro (*Muradas 2006*).

Los espermatozoides obtenidos mediante este sistema pueden presentar un cierto grado de inmadurez, se caracterizan por la presencia de un gran número de gotas citoplasmáticas y una baja motilidad. Cuando la recolección se realiza postmortem el estado de las células suele ser muy deficiente, ya que los espermatozoides son especialmente sensibles a la hipoxia, la acción de los fármacos y la endotoxemia, por ello la obtención de semen en animales muertos por enfermedades que han precisado tratamientos farmacológicos puede no obtener buenos resultados. (*Muradas 2006*)

Para realizar el lavado epididimario por flujo retrógrado se siguieron los siguientes pasos y en cada caso se anotó la hora de inicio de la recolección de espermatozoides del epidídimo:

1. Los vasos deferentes y la cola del epidídimo se disecaron mediante el uso de implementos y técnicas asépticas. Se removió la túnica serosa testicular y los vasos sanguíneos con un bisturí con hojilla N° 10 y tijera recta. (*Chacón J., E. Pérez y H. Rodríguez-Martínez. 2002.*).
2. Se localizó el *septum* del epidídimo, correspondiente a la porción cercana de la zona media de la cola del epidídimo. Allí se realizó un corte transversal con el bisturí, justo antes que el diámetro del epidídimo se reduce, para obtener la mayor cantidad de espermatozoides posibles (*Chacón J., E. Pérez y H. Rodríguez-Martínez. 2002.*).

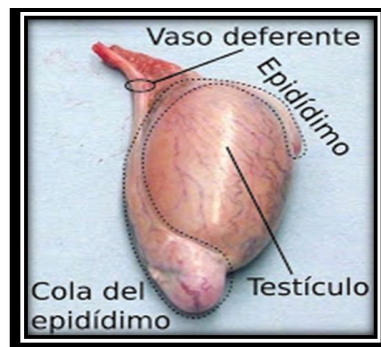
3. La porción disecada de la cola del epidídimo se colocó en una placa de Petri precalentada a 37°C (en una platina calentadora) y se mantuvo la porción libre de los vasos deferentes firmemente sujeta con los dedos pulgar e índice (*Chacón J., E. Pérez y H. Rodríguez-Martínez. 2002*).
4. Las agujas para el lavado (de diferentes calibres) fueron preparadas limándole las puntas para hacerlas "romas". Se colocó una de esas agujas (calibre 20, 21, 22, o 23, según el diámetro interno de cada vaso deferente) dentro del lumen de la porción libre del vaso deferente. Se adaptó una jeringa (tipo "air-tite" de 5 mL) llena con "medio de lavado" (medio de congelación Tris yema glicerol) y con esta jeringa se perfundió lentamente dentro del lumen de cada vaso deferente. Las paredes de los vasos deferentes se pinzaron con una pinza "mosquito" contra la aguja para evitar pérdida del líquido de lavado. (*Chacón J., E. Pérez y H. Rodríguez-Martínez. 2002*).
5. A medida que se perfundían los vasos deferentes con el medio de lavado se observó un abultamiento visible de la cola del epidídimo. Al continuar con presión suave y continua con la jeringa, apareció en el extremo cortado de la cola del epidídimo el contenido epididimario, representado por un líquido espeso y de un color crema pálido o blanco cremoso, dependiendo de la concentración espermática obtenida (*Chacón J., E. Pérez y H. Rodríguez-Martínez. 2002*).
6. Se hicieron dos lecturas de la movilidad individual espermática: una post lavado, inmediatamente después de recobrado el fluido (movilidad individual 1 o MI1), y otra post incubación, dentro de la hora post-recolección (movilidad individual 2 o MI2). Esto se fundamentó en que los parámetros de movilidad individual y movimientos progresivos espermáticos epididimario adquieren su mejor expresión después de 40 minutos a una hora. La razón por la que después de ese tiempo hay una mejor medida de movilidad espermática epididimaria se estima que sea debido a una disminución del efecto supresorio que ejercen los fluidos epididimarios sobre esos espermatozoides, y la re oxigenación y dilución durante el proceso de recolección espermática (*Chacón J., E. Pérez y H. Rodríguez-Martínez. 2002*).

1.6.5 Corte de epidídimo



La obtención de espermatozoides de animales muertos es una posibilidad de gran importancia para la preservación de animales en peligro de extinción, como también de animales de alto valor genético o de laboratorio (*Muradas 2006*).

Se recoge el genital cuanto antes, para evitar la pérdida de calidad de los espermatozoides. Se lleva al laboratorio y se disecciona el genital, aislando los testículos. Sin embargo, no se extraen los espermatozoides de los testículos, son demasiado inmaduros y no nos sirven si no del epidídimo, donde maduran los espermatozoides en la parte final "cola", y allí se acumulan miles de millones de espermatozoides maduros. Se realiza cortes en la cola del epidídimo y recuperamos la masa espermática (*Muradas 2006*).



Esquema de un testículo y localización del epidídimo .La cola del epidídimo se puede apreciar fácilmente incluso en el animal vivo, ya que se engrosa por la acumulación de espermatozoides. A la derecha se muestra la extracción de esperma realizando unos cortes en la cola del epidídimo (*Muradas 2006*).

El principal problema de la recogida post-mortem es que transcurra demasiado tiempo y los espermatozoides mueran la calidad de los espermatozoides comienza a decaer con el tiempo, según avanza la degradación de los tejidos. Lo que se suele hacer, si no es posible utilizar la muestra inmediatamente (por ejemplo, para preparar dosis seminales e inseminar), es colocar los testículos a 5 °C, con lo cual el proceso de degradación se ralentiza (*Muradas 2006*).

- Los genitales se mantuvieron a 5 °C y cada 24 h extrajimos espermatozoides y los analizamos.
- Extrajimos masa espermática tras la muerte del macho y la mantuvimos a 5 °C, analizándola cada 24 h.

Nuestros resultados indicaron que la calidad espermática se conserva mejor dejando las muestras en el epidídimo. Por ejemplo, en el siguiente gráfico se aprecia que la movilidad cae más rápidamente si se extraen los espermatozoides y se dejan en un tubo: Por lo tanto, para un ganadero o veterinario que se encuentre con un macho muerto y que quiera utilizar los espermatozoides de ese macho, lo más aconsejable es que recoja los testículos y los guarde en un frigorífico a unos 5 °C (*Muradas 2006*).

Los espermatozoides se mantendrán en buena forma al menos durante un par de días. Como conservar la calidad espermática lo mejor es cortar el escroto cerca del cuerpo, para mantener los testículos bien cubiertos con el escroto. Se puede limpiar el escroto

de restos de tierra y suciedad y guardar la muestra en una bolsa con cierre si la temperatura de almacenamiento debe ser baja, pero no se debe congelar no se debe guardar en un congelador y si se guarda en contacto con acumuladores de frío, conviene rodear las muestras con papel, para que no haya un contacto directo con las muestras el hielo es el peor enemigo de los espermatozoides (*Muradas 2006*).

1.7 PROCESAMIENTO DEL SEMEN

1.7.1 Observación macroscópica

La primera evaluación a realizar es la macroscópica, que consta de los siguientes pasos:

Volumen: se observa directamente sobre el tubo graduado, teniendo en cuenta que un toro mayor de 2 años debe tener un eyaculado de no menos de 4ml. El volumen puede variar entre 2 y 12ml (*Rodríguez2003*).

Color: se consideran normales los colores que van del blanco al amarillento, siendo patológicos, los colores rosado, amarronado y verdoso (*Martínez 2002*).

Densidad: la densidad del semen varía desde un semen acuoso, lechoso, lechoso-cremoso, hasta un cremoso, estando directamente relacionada con la concentración. (*Gómez 2000*).

Muy Bueno = Cremoso, espeso 750.000 esp/mm³

Bueno = lechoso, 400 a 750.000 esp/mm³

Regular = leche aguachenta, 250 a 400.000 esp/mm³

Pésimo = traslucido, menos de 250.000 esp/mm³

M.M.Ma (Motilidad en Masa Macroscópica): se evalúa observando el tubo de recolección y detectando la presencia o no de movimiento en masa o de remolinos. Se considera como positiva o negativa (*Martínez 2002*).

pH: se evalúa extrayendo una gota de semen del tubo y colocándola sobre una tira indicadora de pH. Se considera un pH normal, entre 6.2 y 6.8 (*Martínez 2002*).

Cuerpos Extraños: se evalúa observando el fondo del tubo para detectar la presencia de algún cuerpo extraño, se considera como positivo o negativo. (*Rodríguez2003*).

1.8 OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA

Motilidad en Masa Microscópica (M.M.Mi): se coloca una gota del semen puro sobre un portaobjetos atemperado a 36-37°C, sobre una platina térmica de microscopio, y se lo observa a 40 aumentos (lupa), evaluando la presencia de ondas omega. Se debe evaluar cerca del borde de la gota, donde la profundidad de la misma es menor y es más fácil de observar. (*Tamargo2008*).

La escala que se toma es de 1 a 5, evaluando como 1 al semen que no presenta ondas y 5 cuando las ondas se mueven rápidamente formando remolinos. Dentro de esos parámetros se consideran los puntos intermedios. Se considera como valor mínimo de aceptación 3 de MMMi (*Tamargo2008*).

Figura 11. Clasificación de motilidad en masa del semen

Muy bueno	Movimientos masivo muy marcado y rápidos	70-100%
Bueno	Movimientos en masa aparente, pero moderados	50-69%
Suficiente	Ondas en movimientos apenas apreciables	30-49%
Pobre	No hay ondas, semen sin movimiento	Menos De 30%

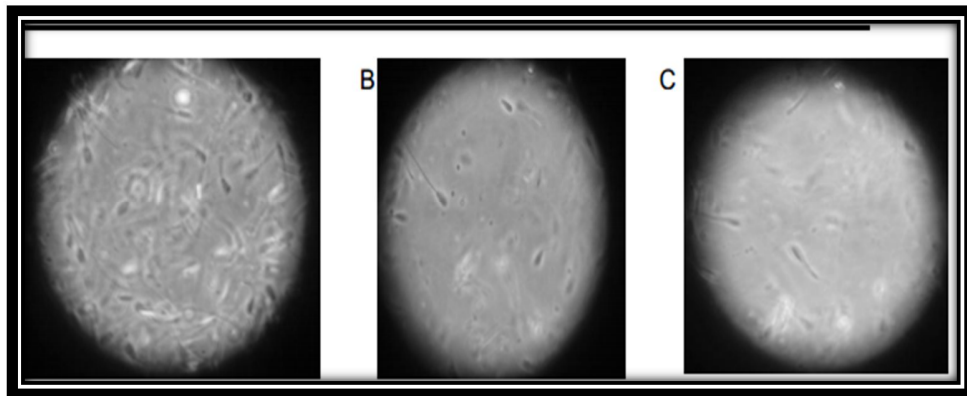
(GENE H. Deutscher 2002)

Motilidad individual (M.I.): para realizar esta evaluación se debe diluir el semen en Citrato de Na 2.92% .Se coloca una gota gruesa de semen, de aproximadamente 30 ó 40 microlitros en un tubo con unos 2ml. de la solución de Citrato que debe estar a la misma temperatura del semen, ya en el Baño María. Una vez diluido el semen se extrae una gota de la dilución y se la coloca sobre un portaobjetos atemperado a 36-37°C y se coloca sobre ésta un cubreobjetos, también a la misma temperatura *(Larson. 2008)*.

Se observa al microscopio, siempre sobre la platina térmica, a 400 aumentos. Se debe observar un campo y valorar subjetivamente los espermatozoides que se mueven en forma rectilínea progresiva, siendo éstos los que atraviesan el campo de observación. Los espermatozoides que giran en círculo o avanzan en forma oscilatoria, .se consideran que tienen movimientos anormales. El porcentaje que se indica es el de los espermatozoides con movimiento rectilíneo progresivo del total de espermatozoides aceptados, siendo el valor mínimo aceptable del 50 % *(Avila 2005)*.

- Muy Bueno = 80-100% de células móviles.
- Bueno = 60-79%
- Regular= 40-59%
- Pésimo = menos de 40%

Figura 12. Evaluación de la motilidad individual (A, B, C.)



(GENE H. Deutscher 2002)

Vigor: se evalúa el vigor, al mismo tiempo que la MI, teniendo en cuenta la velocidad con la que estos espermatozoides atraviesan el campo. La escala que se utiliza es de 0 a 4, evaluando como 0 los espermatozoides inmóviles y como 4 los que avanzan *(Barth 2006)*.

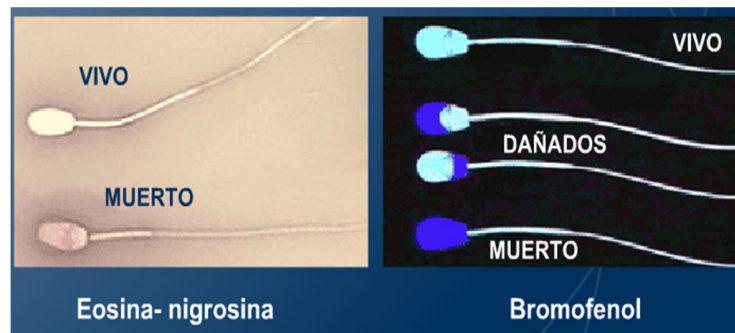
Morfología

Para observar la cantidad de espermatozoides vivos las anomalías, generalmente se mezcla el semen con colorantes y se realiza un frotis *(Gene H. Deutscher 2002)*.

Existen gran cantidad de tinciones, como: eosina-nigrosina, rojo de Bengala, Azul de Victoria, Wells, Williams, Giemsa, tinta china, Fuchina Fenicada, violeta de metilo,

anilina y coloración de Karras, preparaciones líquidas (solución de Hancock mezcladas con el semen y observarlas al microscopio de contraste de fase. Por lo común, se cuenta 300espermatozoides en varios campos y se anotan los alterados y el tipo de alteración. (*Gene H. Deutscher 2002*)

Figura 13. Vitalidad coloraciones vitales



(*Palma Gustavo 2011*)

Cualidades que deben tener los espermatozoides de un eyaculado fecundante

- Motilidad progresiva
- Morfología normal
- Metabolismo energético activo
- Capacidad para desarrollar una
- motilidad hiperactivada
- Integridad estructural y funcionalidad de la membrana (Rodríguez, 2006)

1.9 Diluyente andromed

Diluyente sin yema de huevo para la conservación de semen bovino. Es un concentrado estéril para la preparación de un diluyente libre de yema de huevo para eyaculados bovinos. Es apropiado para la congelación de semen y para la conservación de semen en fresco. Andromed® también se utiliza para semen caprino, ovino y ciervo. Su contenido en antibióticos corresponde al estándar de la UE: EC norma 88/407 (*Mahabir 2007*).

Beneficios

- Sin ingredientes de origen animal
- Sin riesgo de contaminación microbiológica
- Formulación antibiótica acorde a la directiva Europea
- Altas tasas de fertilidad
- Fácil preparación, economiza el tiempo
- Estándar GMP de producción (*Aires 2003*)

Composición

AndroMed contiene fosfolípidos, TRIS, ácido cítrico, azúcares, antioxidantes, tampones, glicerina, agua de altísima pureza y antibióticos, de acuerdo a la Directiva de CE 88/407 (Tilosina, Gentamicina, Lincomicina).(*Herold,2002*)

Preparación del diluyente final: El contenido (200 ml) de un frasco de Andromed debe diluirse con 800 ml de agua destilada estéril previamente temperada a +30°C

hasta +35°C. Es posible preparar volúmenes menores, siempre que se mantenga la proporción de 4 partes de agua con 1 parte de concentrado. (*Fuschini 2005*)

Importante: Para lograr las propiedades óptimas de conservación de Andromed®, la cantidad requerida de agua debe agregarse al concentrado y no viceversa. El diluyente preparado Andromed® debe temperarse antes de su uso en un baño-maría entre +30°C y +32°C (*Müller 2001*).

Pre-dilución y análisis de semen: Inmediatamente tras su llegada al laboratorio, el eyaculado debiera ser evaluado (concentración, motilidad) y entonces pre diluido 1+1. El eyaculado debiera mantenerse en el baño-maría entre +30°C y +32°C. Al momento de la dilución, el diluyente debe tener la misma temperatura que el eyaculado (+/-1°C). El semen no debiera permanecer en el baño-maría por más de 10 minutos. Una vez evaluado debe efectuarse la dilución final. El eyaculado ha alcanzado hasta entonces la temperatura de laboratorio (+20°C a +23°C), y a esa temperatura es envasado en pajuelas. En forma alternativa, Andromed® puede utilizarse para el envasado de las pajuelas a +5°C. Para ello, el semen diluido debe ser equilibrado por al menos 2 a 3 horas a +5°C. (*Nabiev 2003*).

Amplio rango de aplicación

AndroMed® también es apropiado para la preservación de semen fresco a +5°C hasta +10°C. En la investigación celular, AndroMed® es recomendable cuando se utilizan los espermatozoides como modelo, debido a que su composición estandarizada lo hace apto para el análisis computacionalmente asistido (CASA – computer-assisted semen analysis) de semen.

AndroMed® es también utilizado exitosamente con semen de especies no bovinas, especialmente ovina y caprina (*Mahabir, E 2007*).

1.10 CRIOPRESERVACIÓN

El proceso de congelación de semen bovino incluye los siguientes pasos: colecta, evaluación del semen, cálculo del número de pajillas posibles, dilución del semen al volumen requerido y finalmente el proceso de criopreservación. El proceso de colecta debe ser higiénico y evitando el shock térmico de los espermatozoides (*Hinsch, 2003*)

La evaluación del semen incluye la determinación del volumen, color, la motilidad (masal e individual progresiva) y la morfología. Con esta información se calcula el número de espermatozoides viables en la muestra. Después se divide este número por el número deseado por pajilla (generalmente de 20 millones) y se calculan el total de pajillas posibles con el semen obtenido. También se calcula el volumen de diluyente que se requiere para ese número de pajillas (*Barth. 2006*).

1.10.1 Formas de crio preservar el semen del epidídimo

Existen varios protocolos de criopreservación de esperma a partir del epidídimo. Muchos de ellos son aún experimentales y en su mayoría están dirigidos a preservar gametos de especies en vía de extinción (*Hewitt et al., 2001*).

En general los testículos pueden ser transportados en soluciones de PBS (phosphate buffered saline) a temperatura ambiente hasta el laboratorio el tejido debe ser procesado por lo menos 2 a 4 horas después de la recolección; el transporte puede realizarse en bolsas plásticas o cualquier otro medio que impida que se seque la muestra (*Hewitt et al., 2001*).

En caso de permanecer aún en el saco escrotal, los testículos deben ser removidos de él. A continuación debe separarse la cola del epidídimo, y hacer varias incisiones. Hecho esto deben enjuagarse con una solución de **Tris-glucosa-ácido cítrico** que consiste en 198 mM de Citrato Trisódico (Sigma, St. Louis, Mo), 44 mM de Glucosa (Sigma), 67 mM de Acido Cítrico (Sigma) y 50 µg/ml de Gentamicina (Sigma). Los espermatozoides que son obtenidos del lavado deben incubarse a 37oC por 15 minutos (*Hewitt et al., 2001*).

La suspensión obtenida se diluye en una nueva solución de **Tris-glucosa-ácido cítrico** que contiene además de lo anterior 10% de yema de huevo (v/v) y 8% de glicerol. Una vez llenas, las pajillas son pasadas por los vapores del nitrógeno líquido (LN2) por 10 min. (Aproximadamente -5oC/min. hasta -20oC/min., -130oC), posteriormente se introducen en el nitrógeno líquido. La descongelación debe hacerse a 34oC por 40s (*Hishinuma et al., 2003*).

1.11 Cálculo del número de dosis seminales por eyaculado

Llenado de pajillas

Parámetros

Volumen: 3 a 6 cc

Olor: Suigeneris

pH: 6,4 a 6,9

Apariencia:

Cremosa Muy buena mayor a 750 x 106

Lechosa	Buena	400 a 750 x 106
Blanquecina lechosa	Regular	250 a 400 x 106
Traslúcida	Mala	menor a 200 x 106

Motilidad masal (4x o 10x)

- Semen muy bueno: ondas oscuras marcadas con rápido movimiento.
- Semen bueno: ondas menos oscuras que el anterior, marcadas con movimiento moderado.
- Semen regular: ondas claras con movimiento muy ligero.
- Semen malo: no hay ondas, se observan los espermatozoides inmóviles
(*E.Pérez2003*)

Motilidad individual: diluido (400x)

- Muy bueno: > 80 %
- Bueno: 60 – 79%
- Regular: 40 – 59%
- Malo: < al 40%

Morfología Anormalidades Primarias Total

Muy bueno <10 < 25%

Bueno 10 - 19% 26-39%

Regular 20 - 29% 40-59%

Malo > 29% >59%

EJEMPLO

Volumen: 10 ml

Concentración 800 millones

Morfología normal 80%

Motilidad 80%

$$\text{N}^\circ \text{ de dosis (N)} = \text{dosis (N)} = \frac{A \times 10^7 \times V}{3 \times 10^9} = \frac{A \times V}{300}$$

V = Volumen del eyaculado en cc

A = Espermatozoides contados en 40 cuadrados (0,01 mm)

Número de espermatozoides totales por eyaculado:

$$\text{en } 1 \text{ mm}^3 = A \times 100$$

$$\text{en } 1 \text{ cc} = (A \times 100) \times 1.000$$

$$\text{en semen puro (dilución } 1/100\text{): } (A \times 100) \times 1.000 \times 100 = A \times 10^5$$

$$\text{Totales en el eyaculado} = A \times 10^5 \times V$$

El cálculo de la cantidad de diluyente necesario para la preparación de las dosis seminales (para dosis seminales de 100 cc) (*E.Pérez2003*):

$N \times 100 = \text{Volumen total (volumen de diluyente + volumen de eyaculado)}$

$NN \times 100 \times 100 - VV = \text{Volumen del diluyente necesario a añadir} = \text{Volumen del diluyente necesario a añadir}$

Título de la dilución (1/10 – 1/25): $\text{volumen total (N x 100)/Volumen del eyaculado}$

TOTAL DE ESPERMATOZOIDES VIABLES

$10 \times 800 \times 0.8 \times 0.8 = 5120$ millones totales

TOTAL DE PAJILLAS

$5120 \text{ millones} / 20 \text{ millones} = 256$ pajillas

VOLUMEN FINAL PARA PAJILLAS DE 0.5 ML

$256/2 = 128$ ml

VOLUMEN DE DILUYENTE

$128 - 10$ (del semen) = 118ml

Los diluyentes deben cumplir dos objetivos principalmente:

- aumentar el volumen del eyaculado, sin afectar la calidad seminal, para aumentar el número de inseminaciones
- conservar la capacidad fecundante de los espermatozoides durante mayor tiempo posible(*Cardona 2005*).

Congelación de pajuelas: La congelación de pajuelas se efectúa sobre rampas en vapor de Nitrógeno, a una altura de 4 cm sobre el nivel del Nitrógeno líquido, o en un congelador de semen profesional con una temperatura inicial de -120°C. El proceso de congelación en un congelador automático debiera extenderse por al menos 7 minutos con mini-pajuelas (0,25 ml) y 10 minutos con pajuelas medianas (0,5 ml). (Van 2000).

Post descongelación

Este proceso se realiza después de ocho días de almacenadas las pajillas para evaluar post descongelación la viabilidad y motilidad de los espermatozoides en cada tratamiento y así determinar la influencia de cada diluyente sobre la misma muestra de un mismo toro (Pérez 2000).

El protocolo a seguir para llevar a cabo la descongelación es:

- Extraer la pajuela del nitrógeno líquido.
- Descongelar en agua a 37 °C durante 45 segundos.
- Cortar el extremo donde se encuentra en tapón.
- Colocar el material en porta objetos.
- Observar al microscopio la motilidad de los espermatozoides post descongelación.

Finalmente así obtuvimos los resultados de las diferentes evaluaciones que se realizó a cada muestra antes y después de la criopreservación. (Pérez 2000).

CAPITULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Características del lugar

2.1.1 Situación Política

- ✓ **Provincia:** Cotopaxi.
- ✓ **Cantón:** Latacunga.
- ✓ **Parroquia:** Eloy Alfaro.
- ✓ **Barrio:** Salache Bajo.

2.1.2 Situación Geográfica

- ✓ **Latitud:** 00° 59'47.68"S.
- ✓ **Longitud:** 78° 3'19.16"W.
- ✓ **Altitud:** 2757.591 m.s.n.m.

2.1.2.1 Datos Meteorológicos

- ✓ **Temperatura promedio:** 10.7 °C
- ✓ **Pluviosidad:** 175 mm (anuales)
- ✓ **Horas luz/día:** 12 horas.
- ✓ **Viento:** Sureste – Noreste.
- ✓ **Nubosidad anual:** 4.7/8.

Fuente: registro administrativo CEASA 2013.

2.2 MATERIALES

Los materiales más relevantes de la investigación fueron los siguientes

2.2.1 Implementos para la recolección de testículos.

Fundas herméticas

Suero fisiológico

Bisturís

Caja térmica

2.2.2 Diluyente

Andromed

2.2.3 Implementos para la preparación del diluyente.

Agua destilada

Andromed

Jeringuillas nuevas

Placa térmica

2.2.4 Materiales para la extracción de semen por las dos técnicas

Placas Petri

Jeringuillas con Andromed

Tubos vacutainer

Bisturís

Guantes quirúrgicos

Papel secante

2.2.5 Material para análisis macroscópico y microscopio del semen

Microscopio

Plancha térmica.

Porta y cubre objetos.

Micro-pipetas.

Tubos de ensayo.

Cámara de Neubauer

Sustancias químicas: tinción vital eosina-nigrosina, tinta china.

2.2.6 Materiales para la congelación de semen.

Jeringuilla de insulina

Pajuelas de 0.25 ml.

Termo de nitrógeno líquido para mantenimiento de pajuelas.

Rack de 0.50 para 50, 100, 500 pajuelas.

Nitrógeno líquido.

2.2.7 Animales

30 testículos de toro

2.2.8 Varios.

Cámara fotográfica.

Computadora.

Material de papelería.

2.3 MÉTODOS

2.3.1 Método estadístico.

El tipo de investigación es de tipo experimental aplicando el método hipotético-deductivo ya que a través de las hipótesis planteadas se esperó demostrar con cuál de los dos métodos Laundering epididymis- Slicing testicles se obtuvo mejor viabilidad post descongelado de espermatozoides.

2.3.1.1 Investigación experimental

Posibilita examinar el comportamiento de una variable cada vez que se producen cambios en otra que está asociada a la primera; los parámetros son evaluados en el método estadístico chi al cuadrado.

2.4 METODOLOGIA

El método de estudio que se empleó en la investigación es de tipo EXPERIMENTAL aplicando el método HIPOTETICO-DEDUCTIVO ya que a través de las hipótesis planteada se demostró cuál de los dos métodos laudering epididymis- slicing testicles dieron mejor viabilidad post descongelado de espermatozoides. En el ámbito experimental se obtuvo resultados que benefician a los ganaderos que utilicen la inseminación artificial ya que si logramos comprobar por medio de las dos técnicas una alta viabilidad espermática se podrá rescatar el valor genético de los reproductores que hayan muertos por diferentes causas .

Manejo del ensayo

T1	T2
Laudering epididymis	Slicing Testicles

Los animales utilizados en el experimento fueron faenados a la tres de la mañana, momento en el que se realizó la recolección de los testículos.

Se continuó con las técnicas de la siguiente manera:

- a) La recolección se realizó un día en la mañana en el camal se saquisili
- b) Se dividió el total de testículos: la mitad para una técnica (laudering epididimys) y lo demás para la otra técnica (Slicing testicles)
- c) Se preparó el diluyente antes de comenzar el proceso.
- d) Se limpió todas las facias y túnicas que recubren al testículo y se limpió con papel secante antes de realizar el proceso de extracción de semen.
- e) Se recolecto el semen de todos los testículos en una misma caja Petri dependiendo la técnica.
- f) Se mantuvo en la placa térmica, mientras se realizó el examen microscópico.
- g) Se procedió al envasado en pajillas de 0.25 y se empezó el proceso de enfriamiento para luego introducir las en el nitrógeno líquido.
- h) se evaluó las pajuelas post-descongelación.

Los métodos que se utilizaron para este estudio se los dividió en las siguientes partes:

7. Recolección de testículos en el camal.
8. Colecta de semen y evaluación seminal.
 - a) Colecta.
 - b) Evaluación
9. Examen macroscópico valoración en semen fresco.
 - a) Aspecto

- b) Color
- c) pH.
- d) Volumen

10. Examen microscópico valoración de semen fresco

- a) Motilidad masal
- b) Motilidad individual
- c) Concentración
- d) Porcentaje de espermatozoides con anomalías.
- e) Porcentaje de espermatozoides vivos y muertos.

11. Diluyente Andromed y congelación.

12. Evaluación post descongelado:

- a) Motilidad en masa

a) Recolección de testículos en el camal.

Se Recolecto los testículos de toros faenados lo más pronto posible en el camal de Saquisilí. Limpiamos cada testículo con toallas de papel y colocamos cada una de ellas dentro de bolsas plásticas selladas con cierre hermético, posteriormente adicionamos suero fisiológico e introducimos en un culer para mantener la temperatura hasta llegar al laboratorio.

Identificamos las muestras especificando fecha, hora, raza y lugar procedencia de los testículos.

b) Colecta de semen y evaluación seminal.

Slicing testicles

- a) Disolución de Andromed, en jeringuillas nuevas se recoge 2ml de diluyente y 4 de agua bidestilada y se deja que se caliente en la placa térmica, posteriormente se une

estos dos líquidos en un tubo vacutainer y se comienza el proceso de recolección de semen.

b) En la parte sucia del laboratorio de desempaca los testículos y se procede a la disección de facias y tejidos (membrana albugínea, facias).

c) Se limpia todos los líquidos y sangre de los testículos.

d) Se identifica el epidídimo y todas sus partes,(cabeza ,cuerpo, cola).

e) Se realizó el corte de la cola del epidídimo (Slicing testicles), con ayuda de un bisturí se realizan cortes transversales evitando que salga sangre

f) Con una jeringa con el diluyente Andromed listo realizamos la colección de semen, dejando que el líquido baje a la placa Petri para luego llevamos la muestra a la placa térmica donde se realizó el examen macro y microscópico.

g) Proseguimos a envasar el semen en pajillas de 0.25 para posteriormente comenzar el proceso de enfriamiento y congelación.

h) Descongelamos y observamos el movimiento en masa de los espermatozoides.

Laudering epididimys

a) Disolución de Andromed, en jeringuillas nuevas se recoge 2ml de diluyente y 4 de agua bidestilada y se deja que se caliente en la placa térmica, posteriormente se une estos dos líquidos en un tubo vacutainer y se comienza el proceso de recolección de semen.

b) En la parte sucia del laboratorio de desempaca los testículos y se procede a la disección de facias y tejidos (membrana albugínea, facias).

c) Se limpia todos los líquidos y sangre de los testículos.

d) Se identifica el epidídimo y todas sus partes,(cabeza ,cuerpo, cola).

e) Posteriormente realizamos el lavado del epidídimo el cual consiste en hacer un lavado desde la cabeza hasta la cola del epidídimo

f) Con un bisturí hicimos cortes longitudinales desde la cabeza hasta la cola del epidídimo.

g) Con una jeringuilla con Andromed vamos haciendo un lavado desde arriba hasta terminar en la cola del epidídimo dejando caer el semen en una caja Petri.

h) Se procede a realizar el examen macro y microscópico con el semen sobre la placa térmica para evitar un shok térmico.

i) Proseguimos a envasar el semen en pajillas de 0.25 para posteriormente comenzar el proceso de enfriamiento y congelación.

h) Descongelamos y observamos el movimiento en masa de los espermatozoides.

c) Examen macroscópico valoración en semen fresco.

Apariencia

Volumen

pH. 6.5 – 7

Parámetros normales en el examen macroscópico

Categorías			
Criterios	I Bueno	II Regular	III malo
Volumen	3-5	2-4	Menos de 2
Apariencia	Crema	Lechoso	Acuoso, con sangre, pus o grumoso
Concentración ml	$>0.8 \times 10^9$	$> 0.5 \times 10^9$	$< 0.5 \times 10^9$

Fuente: Kause & Dittmar 1962

El primer examen a realizarse para valoración seminal el examen macroscópico el cual consiste:

a.- Aspecto: se valora según una escala previamente realizada del grado de opacidad: 1 regular, 2 bueno, 3 muy bueno.

b.- Color: al igual que el aspecto tiene una escala de valoración 1 lechoso, 2 blanco, 3 blanco amarillento, pudiendo adoptarse valores intermedios, siendo el mejor el blanco cremoso.

c.- pH: se determinó basándose en el indicador universal siendo lo óptimo 6.5.

d.- Volumen: obtenido por la graduación del tubo colectado en la vagina artificial.

e) Parámetros normales examen microscópico del semen .

Categorías			
Criterios	I Bueno	II Regular	III malo
Motilidad individual	5	4	Menos de 2
Motilidad en masa	90 – 95%	80 – 90 %	70 - 80%
Concentración ml	>0.8 x 10 ⁹	> 0.5 x 10 ⁹	< 0.5 x 10 ⁹
Morfología celular	< 5%	5 – 10 %	> 15%
Vivos muertos	< 10%	10 – 15 %	>15 – 20 %

Fuente: Kause & Dittmar 1962

a.- Motilidad en Masa: Para la valoración se utilizó la técnica de gota gruesa, la cual consistió en colocar una gota del tamaño de una lenteja de semen fresco puro, sobre un porta objetos previamente calentado, se evaluó a una escala subjetiva del 1 a 5 evaluando las ondas y oleaje espermático esto fue posible observándolas al microscopio con un lente de menor aumento y calificando el movimiento de 0- 100%

b.- Motilidad individual: Se coloca el semen fresco diluido en un suplemento caliente o solución salina fisiológica, se coloca una lámina cubre objetos y se mira a 20 X evaluando el porcentaje de espermatozoides móviles, movimiento hacia el frente, el número de espermatozoides con movimiento al frente se divide entre el número de células totales (móviles e inmóviles)

El examen consistió en evaluar el porcentaje de espermatozoides con:

- Movimiento progresivo rectilíneo rápido y lento.
- Movimiento en el lugar (circular, ondulatorio).
- Espermatozoides inmóviles (muertos o en estado de anabiosis).

Se anotó los conteos en porcentaje y en término de decenas, calificándolas de la siguiente manera:

10% Movilidad progresiva rápida

70% Movilidad progresiva lenta.

10% Movilidad en un mismo lugar.

10% Inertes.

c.- Contaje Espermático: Se utilizó la cámara de Neubauer

d.- Morfología: Se examinó en semen fresco y post descongelado. Evaluando el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos, anormalidades primarias y secundarias. Se colocó una placa porta objetos sobre la plancha térmica en la que se coloca una gota de eosina-nigrosina sobre un extremo de la placa luego se coloca una gota de semen al lado del colorante, se procedió a mezclar con movimientos oscilatorios suaves y con otra placa se realizó un frotis, se deja secar la muestra al ambiente y luego se observa al microscopio(40X–100X).

El conteo de 100 espermatozoides entre vivos y muertos dará el porcentaje de cada uno de ellos, solamente se tiñen los espermatozoides que están muertos al momento de tener contacto con el colorante, aquellos que estén vivos permanecen blancos y no se tiñen. Los primeros, muertos, si lo hacen ya que la alteración de su membrana plasmática permite al colorante ingresar en el interior de la célula.

e) Diluyente Andromed y congelación.

Preparación del diluyente

En una jeringuilla nueva se extrae 4 ml de diluyente Andromed y en otra jeringuilla se extrae 8 ml de agua bidestilada, estas dos se colocan en la plancha térmica y se espera hasta que se vea vapor en la jeringa se debe estar rotando estos líquidos para que el calor este en todo el espacio luego en un tubo vacutainer se procede a unir las mezclas colocando en primer lugar el diluyente Andromed y luego el agua bidestilada, el tubo vacutainer también debe permanecer en la placa térmica por un determinado tiempo.

El diluyente ya fue previamente mezclado cuando se realizó la colección de semen por las dos técnicas.

f) Congelamiento y almacenamiento en nitrógeno líquido.

Una vez terminado el envasado y sellado de las pajuelas, colocamos las pajuelas en el congelados para que su temperatura baje a 4°C por dos horas, luego colocamos las pajuelas en los rack de congelación en un culer con nitrógeno líquido en el cual vamos bajando el rack cada 10 minutos hasta llegar a una temperatura de menos 8 ,este es una congelación rápida ,Luego pasamos las pajuelas al termo de nitrógeno . esperamos un determinado tiempo y descongelamos para observar al microscopio

g)Post descongelación

Este proceso se realiza después de ocho días de almacenadas las pajillas para evaluar post descongelación la viabilidad y motilidad de los espermatozoides en cada tratamiento y así determinar la influencia de cada diluyente sobre la misma muestra de un mismo toro.

El protocolo a seguir para llevar a cabo la descongelación es:

- Extraer la pajuela del nitrógeno líquido.
- Descongelar en agua a 37°C durante 45 segundos.
- Cortar el extremo donde se encuentra en tapón.
- Colocar el material en porta objetos.
- Observar al microscopio la motilidad de los espermatozoides post descongelación.

CAPITULO III

3.1 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

En este capítulo se presenta los resultados obtenidos en las características que identifican al semen antes de la congelación, en función de las dos técnicas de colección. Se incluyen análisis estadísticos

Se utilizó en esta investigación un Diseño estadístico de chi al cuadrado, en el cual se comparó el efecto de la colección de semen por las dos técnicas. El desarrollo del trabajo consistió en evaluar con cuál de las dos técnicas de extracción de semen se obtiene mayor número de espermatozoides viables

**EVALUACION DE SEMEN OBTENIDO DE LAS TECNICAS LAUDERING
EPIDIDIMYS –SLICING TESTICLES.**

**CUADRO 1. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DEL SEMEN
FRESCO POR LA TECNICA DE LAUDERING EPIDIDIMYS.**

Animales	Apariencia	Concentración	Ph	Criterio de calidad
1	Lechoso	> 0.5 x 10 ⁹	7.1	III
2	Lechoso	> 0.5 x 10 ⁹	7.1	III
3	Lechoso	> 0.5 x 10 ⁹	7.0	II
4	Acuoso	>0.8 x 10 ⁹	7.0	I
5	Acuoso	>0.8 x 10 ⁹	7.0	I
6	Lechoso	< 0.5 x 10 ⁹	7.1	III
7	Acuoso	>0.8 x 10 ⁹	7.0	I
8	Lechoso	> 0.5 x 10 ⁹	7.1	III
9	Lechoso	> 0.5 x 10 ⁹	7.0	II
10	Cre moso	>0.8 x 10 ⁹	7.0	I
11	Lechoso	> 0.5 x 10 ⁹	7.0	II
12	Acuoso	>0.5 x 10 ⁹	7.1	III
13	Lechoso	> 0.5 x 10 ⁹	7.0	II
14	Cre moso	>0.5 x 10 ⁹	7.2	III
15	Lechoso	> 0.5 x 10 ⁹	7.0	II

FUENTE: Investigación directa

ELABORACIÓN: CUARAN ,Erika-BURBANO Joel.

CUADRO 2. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DEL SEMEN FRESCO POR LA TECNICA DE SLICING TESTICLES.

Animales	Apariencia	Concentración	Ph	Criterio de calidad
1	Cre moso	>0.8 x 10 ⁹	6.9	I
2	Cre moso	>0.8 x 10 ⁹	6.9	I
3	Le choso	> 0.5 x 10 ⁹	6.5	II
4	Cre moso	>0.8 x 10 ⁹	6.9	I
5	Le choso	> 0.5 x 10 ⁹	6.5	II
6	Cre moso	>0.8 x 10 ⁹	6.9	I
7	Cre moso	>0.8 x 10 ⁹	6.9	I
8	Le choso	> 0.5 x 10 ⁹	6.5	II
9	Cre moso	>0.8 x 10 ⁹	6.9	I
10	Cre moso	>0.8 x 10 ⁹	6.9	I
11	Cre moso	>0.8 x 10 ⁹	6.9	I
12	Le choso	>0.5 x 10 ⁹	6.5	II
13	Cre moso	>0.8 x 10 ⁹	6.9	I
14	Cre moso	>0.8 x 10 ⁹	6.9	I
15	Le choso	> 0.5 x 10 ⁹	6.5	II

FUENTE: Investigación directa

ELABORACIÓN: CUARAN ,Erika-BURBANO Joel.

CUADRO 3. CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DEL SEMEN FRESCO POR LA TECNICA DE LAUDERING EPIDIDIMYS.

animales	Morfología %	Concentración	Motilidad masa%	Motilidad individual	Vivos – muertos %	Criterio
1	5	> 0.5 x 10 ⁹	85	4	11	II
2	5	> 0.5 x 10 ⁹	90	4	13	II
3	7	> 0.5 x 10 ⁹	75	4	12	III
4	7	> 0.5 x 10 ⁹	75	4	12	III
5	6	> 0.5 x 10 ⁹	86	4	11	II
6	6	< 0.5 x 10 ⁹	80	4	11	II
7	5	>0.8 x 10 ⁹	95	5	10	I
8	5	>0.8 x 10 ⁹	95	5	10	I
9	8	> 0.5 x 10 ⁹	80	2	13	II
10	8	> 0.5 x 10 ⁹	80	2	12	II
11	10	> 0.5 x 10 ⁹	70	4	15	III
12	10	> 0.5 x 10 ⁹	70	4	15	III
13	5	>0.8 x 10 ⁹	90	5	10	I
14	5	>0.8 x 10 ⁹	90	5	10	I
15	7	> 0.5 x 10 ⁹	85	4	12	II

FUENTE: Investigación directa

ELABORACIÓN: CUARAN ,Erika-BURBANO Joel.

CUADRO 4. CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DEL SEMEN FRESCO POR LA TECNICA DE SLICING TESTICLES.

animales	Morfología %	Concentración	Motilidad masa%	Motilidad individual	Vivos – muertos %	criterio
1	5	> 0.8 x 10 ⁹	90	5	10	I
2	5	> 0.8 x 10 ⁹	90	5	10	I
3	6	> 0.5 x 10 ⁹	80	4	15	II
4	6	> 0.5 x 10 ⁹	80	4	15	II
5	5	> 0.8 x 10 ⁹	95	5	10	I
6	5	> 0.8 x 10 ⁹	95	5	10	I
7	5	>0.8 x 10 ⁹	90	5	10	I
8	5	>0.8 x 10 ⁹	90	5	10	I
9	5	> 0.8 x 10 ⁹	90	5	10	I
10	6	> 0.5 x 10 ⁹	80	4	12	II
11	7	> 0.5 x 10 ⁹	80	4	12	II
12	7	> 0.5 x 10 ⁹	80	4	15	II
13	5	>0.8 x 10 ⁹	90	5	10	I
14	5	>0.8 x 10 ⁹	90	5	10	I
15	6	> 0.5 x 10 ⁹	85	4	12	II

FUENTE: Investigación directa

ELABORACIÓN: CUARAN ,Erika-BURBANO Joe

CUADRO 5. CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DEL SEMEN POST DESCONGELADO POR LA TECNICA DE LAUDERING EPIDIDIMYS.

animales	Morfología %	Concentración	Motilidad masa%	Motilidad individual	Vivos – muertos %	Criterio
1	10	< 0.5 x 10 ⁹	70	2	15	III
2	10	< 0.5 x 10 ⁹	70	2	15	III
3	15	< 0.5 x 10 ⁹	75	2	20	III
4	15	< 0.5 x 10 ⁹	70	2	20	III
5	15	< 0.5 x 10 ⁹	80	2	20	III
6	10	< 0.5 x 10 ⁹	80	2	15	III
7	10	< 0.5 x 10 ⁹	70	2	15	III
8	15	< 0.5 x 10 ⁹	75	2	20	III
9	15	< 0.5 x 10 ⁹	80	2	20	III
10	15	< 0.5 x 10 ⁹	80	2	20	III
11	15	< 0.5 x 10 ⁹	70	2	20	III
12	15	< 0.5 x 10 ⁹	70	2	15	III
13	15	< 0.5 x 10 ⁹	75	2	20	III
14	15	< 0.5 x 10 ⁹	75	2	20	III
15	15	< 0.5 x 10 ⁹	75	2	20	III

FUENTE: Investigación directa

ELABORACIÓN: CUARAN ,Erika-BURBANO Joel.

CUADRO 6. CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DEL SEMEN POST DESCONGELADO POR LA TECNICA DE SLICING TESTICLES.

animales	Morfología %	Concentración	Motilidad masa%	Motilidad individual	Vivos – muertos %	Criterio
1	5	> 0.8 x 10 ⁹	90	5	10	I
2	5	> 0.8 x 10 ⁹	90	5	10	I
3	6	> 0.5 x 10 ⁹	80	4	15	II
4	6	> 0.5 x 10 ⁹	80	4	15	II
5	5	> 0.8 x 10 ⁹	95	5	10	I
6	5	> 0.8 x 10 ⁹	95	5	10	I
7	5	>0.8 x 10 ⁹	90	5	10	I
8	5	>0.8 x 10 ⁹	90	5	10	I
9	5	> 0.8 x 10 ⁹	90	5	10	I
10	6	> 0.5 x 10 ⁹	80	4	12	II
11	7	> 0.5 x 10 ⁹	80	4	12	II
12	7	> 0.5 x 10 ⁹	80	4	15	II
13	5	>0.8 x 10 ⁹	90	5	10	I
14	5	>0.8 x 10 ⁹	90	5	10	I
15	6	> 0.5 x 10 ⁹	85	4	12	II

FUENTE: Investigación directa

ELABORACIÓN: CUARAN ,Erika-BURBANO Joel.

CUADRO 7. CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DEL SEMEN POR LAS DOS TECNICAS EN EL PARAMETRO MORFOLOGÍA.

MORFOLOGIA		
Animales	Morfología T1	Morfología T2
1	5	5
2	5	5
3	7	6
4	7	6
5	6	5
6	6	5
7	5	5
8	5	5
9	8	5
10	8	6
11	10	7
12	10	7
13	5	5
14	5	5
15	7	6

FUENTE: Investigación directa

ELABORACIÓN: CUARAN ,Erika-BURBANO Joel.

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas		
	<i>Tratamiento1</i>	<i>Tratamiento2</i>
Media	6,6	5,533333333
Varianza	3,114285714	0,552380952
Observaciones	15	15
Coefficiente de correlación de Pearson	0,882243373	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	14	
Estadístico t	3,552424286	
P(T<=t) una cola	0,001592777	
Valor crítico de t (una cola)	1,761310136	
P(T<=t) dos colas	0,003185554	
Valor crítico de t (dos colas)	2,144786688	

Los datos obtenidos en el cuadro nos ayudan a realizar la comparación de las dos técnicas de extracción de semen. se puede observar la comparación del Valor calculado o (p-valor) que es de 0,03 y 0,05 que es el valor tabulado una constante en el método estadístico, lo que demuestra 0,05 es mayor que 0,03 por lo cual existe significancia entre los dos métodos, demostrando que T2 (técnica de Slicing testicles) es mejor que T1 (técnica de laudering epididimys) en el parámetro morfología

CUADRO 8. CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DEL SEMEN POR LAS DOS TÉCNICAS. EN EL PARÁMETRO MOTILIDAD EN MASA.

MOTILIDAD EN MASA		
animales	Motilidad en masa %	Motilidad en masa %
	T1	T2
1	85	90
2	90	90
3	75	80
4	75	80
5	86	95
6	80	95
7	95	90
8	95	90
9	80	90
10	80	80
11	70	80
12	70	80
13	90	90
14	90	90
15	85	85

FUENTE: Investigación directa

ELABORACIÓN: CUARAN ,Erika-BURBANO Joel.

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas		
	<i>Tratamiento1</i>	<i>Tratamiento2</i>
Media	83,06666667	87
Varianza	67,4952381	31,42857143
Observaciones	15	15
Coefficiente de correlación de Pearson	0,687031743	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	14	
Estadístico t	-2,55181473	
P(T<=t) una cola	0,011518085	
Valor crítico de t (una cola)	1,761310136	
P(T<=t) dos colas	0,023036169	
Valor crítico de t (dos colas)	2,144786688	

En el parámetro motilidad en masa observamos la comparación del Valor calculado o (p-valor) que es de 0,02 y 0,05 que es el valor tabulado una constante en el método estadístico, lo que demuestra 0,05 es mayor que 0,02 por lo cual existe significancia entre los dos métodos, demostrando que T2 (técnica de Slicing testicles) es mejor que T1(técnica de laudering epididimys) concordando con los datos obtenidos .en la práctica de los mismos.

CUADRO 9. CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DEL SEMEN POR LAS DOS TECNICAS. EN EL PARAMETRO MOTILIDAD INDIVIDUAL

MOTILIDAD INDIVIDUAL		
animales	Motilidad individual T1	Motilidad Individual T2
1	4	5
2	4	5
3	4	4
4	4	4
5	4	5
6	4	5
7	5	5
8	5	5
9	2	5
10	2	4
11	4	4
12	4	4
13	5	5
14	5	5
15	4	4

FUENTE: Investigación directa

ELABORACIÓN: CUARAN, Erika-BURBANO Joel.

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas		
	<i>Tratamiento1</i>	<i>Tratamiento2</i>
Media	4	4,6
Varianza	0,857142857	0,25714286
Observaciones	15	15
Coefficiente de correlación de Pearson	0,30429031	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	14	
Estadístico t	-2,55288883	
P(T<=t) una cola	0,011494112	
Valor crítico de t (una cola)	1,761310136	
P(T<=t) dos colas	0,022988225	
Valor crítico de t (dos colas)	2,144786688	

En el parámetro motilidad individual observamos la comparación del Valor calculado o (p-valor) que es de 0,02 y 0,05 que es el valor tabulado una constante en el método estadístico, lo que demuestra 0,05 es mayor que 0,02 por lo cual existe significancia entre los dos métodos, demostrando que T2 (Slicing testicles) muestra mejores resultados que T1 (técnica de laudering epididimys) .

**CUADRO 10. CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DEL SEMEN
POR LAS DOS TÉCNICAS . EN EL PARAMETRO VIVOS Y
MUERTOS.**

VIVOS Y MUERTOS		
animales	Vivos y muertos	Vivos y muertos
	T1	T2
1	11	10
2	13	10
3	12	15
4	12	15
5	11	10
6	11	10
7	10	10
8	10	10
9	13	10
10	12	12
11	15	12
12	15	15
13	10	10
14	10	10
15	12	12

FUENTE: Investigación directa

ELABORACIÓN: CUARAN ,Erika-BURBANO Joel.

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas		
	<i>Tratamiento1</i>	<i>Tratamiento2</i>
Media	11,8	11,4
Varianza	2,742857143	4,11428571
Observaciones	15	15
Coefficiente de correlación de Pearson	0,535825881	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	14	
Estadístico t	0,858395075	
P(T<=t) una cola	0,202565752	
Valor crítico de t (una cola)	1,761310136	
P(T<=t) dos colas	0,405131505	
Valor crítico de t (dos colas)	2,144786688	

En el parámetro vivos y muertos observamos la comparación del Valor calculado o (p-valor) que es de 0,41 y 0,05 que es el valor tabulado una constante en el método estadístico, lo que demuestra 0,41 es mayor que 0,05 por lo cual no existe significancia entre los dos métodos en este parámetro, resultando que T2 (Slicing testicles) es igual a T1 (técnica de laudering epididimys)

CONCLUSIONES

- A. La técnica por la cual se extrajo mejor calidad de semen en testículos postmortem fue la extracción por Slicing testicles se realizó el corte de la cola del epidídimo en la cual se encontraron espermatozoides viables para la crioconservación, ya que como se indica en la teoría los espermatozoides se encuentran maduros y almacenados en la cola del epidídimo, estos espermatozoides presentaron las mejores características microscópicas antes y después de la congelación.
- B. En los testículos en los que se realizó la técnica de laudering epididimys, los espermatozoides se presentaron de mala calidad, la mayoría resultaron muertos o débiles ya que la extracción se realizó a lo largo del epidídimo (cabeza, cuerpo, cola), por lo cual encontramos espermatozoides inmaduros o muy débiles, lo mismo se observó después de la congelación.
- C. El número de espermatozoides se presentó mayor en la técnica de Slicing testicles ya que fue de 135.500.000 millones de espermatozoides en comparación a la técnica de laudering epididimys la cual se presentaron 114.000.000 millones de espermatozoides, estos datos se obtuvieron mediante el análisis microscópico con la cámara de Neubauer.

RECOMENDACIONES

1. Se recomienda que se realice una investigación en la que se compruebe la fertilidad de las pajuelas obtenidas por el método de Slicing testicles, previamente seleccionado toros de la misma raza para la extracción de semen.
2. Es una buena alternativa el uso de esta técnica para rescatar la genética de toros y las buenas características ya que existen casos de muertes por diferentes causas que no afectan el aparato reproductor de este ejemplar las cuales pueden ser: edad, enfermedades degenerativas, accidentes traumatológicos, muerte de animales taurinos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. ALBARRAN, Gonzalo. Inseminación artificial y Andrología Veterinaria. Tomo I, La Habana, Editorial “Félix Varela”, 2001 Cuba ISBN 84-7114-448-4.
2. AMANN R.P., Schanbacher B.D 2000 endocrinología en toros Holstein .J Dairy B.D 2000 E.E.U.U ISSN 1817-7433 .
3. ARTHUR , g.h.; noakes, d.e.; pearson, h..Reproducción y Obstetricia en veterinaria. Editorial Interamericana. 2003 McGraw-Hill. ISBN 84-341-0792-9
4. AIRES, V., MÜLLER-Schlös. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. (2003): Theriogenology, 60, 269–279.E.E.U. ISBN 19989-3620
5. ÁVILA D., Alfonso, RODRÍGUEZ R., Oscar , SÁNCHEZ A. Rafael, VÁSQUEZ P. Carlos. Influencia de la temperatura ambiental sobre la calidad del semen en tres razas de bovinos productores de carne. Tec. Pecuaria en Tijuana, julio - diciembre 2005. Clave R84003 Mexico. ISSN: 1695.
6. AXNER E., LINDE Forsberg . morfología y crecimiento de del espermatozoide en diferentes regiones del epidídimo en animales domesticos. 2007 Canada. ISBN 92-5-303441-6.

7. BALBUENA Osvaldo Reproducción en Bovinos Cena Popayan Colombia 2011 ISSN 1014-6423.
8. BARACALDO MI, Barth. 2006. Steps for Freezing Bovine Semen: From Semen Collection to the Liquid Nitrogen Tank. IVIS Reviews in Veterinary Medicine, I.V.I.S. (Ed.) 2006. International Veterinary Information. Canada ISBN 1135-6030.
9. . BARRIOS Diego R M.V., Msc., Phd. Consideraciones básicas acerca de la extracción de semen de toros mediante electroeyaculador . Venezuela 2006 ISBN 970-10-3719-7.
10. BARRIOS, DA. Evaluación de la calidad y capacidad fecundante de espermatozoides de la cola del epidídimo de toros Post-Mortem. IX Congreso venezolano de Producción e Industria Animal. 2005 Valera ISBN: 978-607-0033-9.
11. BRAUN, J.; SAKAI, N. Preservación eyaculado y epidídimo seminal espermatozoide por coolingand congelación. Therigenology 2000 E.E.U.U ISBN: 675-765-9876-9.
12. BARTH, A. Abnormal morfology of bovine espermatozoa. Iowa St. University Press. 2008 E.E.U.U ISBN: 84200-0090-6.
13. BERDUGO J., Avella F .Produccion espermática en toros en el tropic- revista el cebú 2006 Canada ISBN 978-84-7841-079-8.

14. BERMÚDEZ V. Patología de la reproducción en el semental bovino de doble propósito Avances en la Ganadería Bovina de Doble Propósito. Ediciones Astro Data. Maracaibo 2008, Venezuela. ISBN: 722034
15. BIDOT Albert 1990. Características Biológicas de la esperma de sementales bovinos en condiciones subtropicales .instituto de biología y patología de la reproducción edición I 2003 .ciudad de la habana ISBN: 968-426-569-7
16. BRACKET, g.b., siedel, g.e., siedel, s.m. 2005. avances en zootecnia. nuevas técnicas de reproducción animal. ed. acribia, zaragoza. ISBN: 9681856945
17. CARDONA –Toro LE ,espermograma: indicaciones e interpretación mediana y la boratorio 2005 España ISBN 950-24-1044-0.
18. CHACÓN Jorge. Seasonal variations in testicular consistency, scrotal circumference and spermiogramme parameters of extensively reared Brahman (Bos indicus) bulls in the tropics. Theriogenology 2006 Canada ISBN 978-84-7841-079-8.
19. CISALE, H., : [Comunicación Personal] Laboratorio de Espermatología, Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires 2003 [Argentina]. E-mail: cisale@fvet.uba.ar ISBN: 84200-0090-6
20. COLE, H.. 2006. Reproduccion de los Animales Domésticos. Tercera Edición. Editorial Acribia. 2006 Zaragoza, España. ISBN: 968-426-569-7.
21. CRUZ, A.. Evaluación De Machos Y Diluyentes Para Semen Refrigerado En La Inseminación Artificial De Ovejas De Pelo. Tesis De Maestría En Ciencias. Instituto Tecnológico De Conkal, Conkal, 2004 Yucatán, México.

22. CHUNG J formacion de espermatozoides en tratamientos de fertilización Emb,TransVol 12. 2009 ISBN: 8486892341
23. DÍEZ Carmen Monforte. Área de Genética y Reproducción Animal. mcdiez@serida.org 2003Argentina. ISBN: 9788486892340
24. DUCAN Watson 2005 lavado de espermatozoides durante la criopreservacion Edicion II 2005 E.E.U.U ISBN 0-683-30577-8.
25. DUKES Swenson, .Fisiología de los Animales Domésticos.Cuarta Edición. Tomo II. Editorial Aguilar.2007 Madrid, España. ISBN: 84-7903-990-6.
26. DYCE Wensing 2007.Aparato urogenital anatomía veterinaria ed.Manual Moderno 2007 .Mexico.D.F ISBN: 987-43-3779-6
27. EVANS, Maxwell, .2005. Inseminación artificial en bovinos Ed. Acribia.2005 Zaragoza. España. ISBN 92-4-354650-3
28. FERNANDEZ de Córdova y de la Barrera, Luis. Reproducción aplicada en el ganado bovino lechero. Segunda edición.. Editorial Trillas, 2009. México ISBN: 950-06-2538-5,
29. FRANDSON- Spurgeon .Anatomia del sistema Reprodutor del Macho .Anatomia y Fisiologia de los animales domésticos ,5 ed. Graw- Hill interamericana.2008 E.E.U.U ISBN: 84-7903-547-1
30. FUSCHINI, Janett, Comparación de AndroMed y TRIS-huevo extendedor yema para la crioconservación semen de ciervo. ESDAR Conferencia 2007, Murcia.

31. GALINA C y VALENCIA J. 2006. Colección del semen bovino. Reproducción de animales domésticos, II edición. Limusa, Noriega 2006 México.
32. GAZITÚA R., Examen de los genitales masculinos y próstata. Editorial Agrarias. Edición 1 Medellín Colombia 2006 ISBN 112: 1782-178.
33. GENE H. Deutscher. Manual de evaluación de *semen* en bovinos Universidad de Nebraska 2002 E.E.U.U ISBN 63:890-901.
34. GÓMEZ Ma. Lorena Cátedra Reproducción Animal Facultad de Cs. Veterinarias 2004 Colombia ISBN 59:939-949.
35. HAFEZ, E.S.E. Anatomía Funcional de la Reproducción. En: Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. Interamericana. Sexta edición, 2004 México D.F ISBN 27-401-415.
36. HAFEZ. ESE. Reproducción e Inseminación artificial en animales. México D.F séptima edición. Editorial . 2005, México D.F ISBN 84-306-0267-4.
37. HELLEMANN Jara, . Efecto De Un Surfactante Sobre La Integridad De Espermatozoides Ovinos Crioconservados. Arch. Med. Vet. V.29 N.12006 México D.F ISBN 45: 943-956.
38. HEROLD, Gerber, Influencia del plasma seminal en semen bovino homólogo epidídimo congelado con Triladyl, AndroMed Wiener Tierärztliche Monatsschrift, 2008 E.E.U.U

39. HEWITT, DA, Leahy, R. Sheldon, GCW Criopreservación de espermatozoides del epidídimo del toro. Reproducción Animal Science 2001, Inglaterra ISBN 40, 57-60.
40. HISHINUMA, M., Susuki, K., y Sekine, J. Recuperación y criopreservación de los espermatozoides de epidídimos almacenadas a 4 ° C. Theriogenology 2003. ISBN 142: 447-451.
41. JANETT, F. Comparación de AndroMed® y Tris-yema de huevo para la crioconservación de dinero semen. ESDAR Conferencia, Murcia 2005 España
42. JONSON M., Everitt B.. reproducción esencial. Blackwell publicación, I edición 2006 E.E.U.U ISBN 78: 2308-2313.
43. KASTELIC M., Cook ,escroto-testicular termoregulacion y el efecto de la temperatura testicular en el toro. 2004 Canada ISBN 81:261-268.
44. Knobil E-Neil J.D. 2003. Spermatogenesis, Overview. Encyclopedia of reproduction vol.4. M – Pri. San Diego California. ISBN 3661:779-788.
45. Konig H.E. y Liebich H.G.. Organos Genitales Masculinos pag. 119-134. Anatomia de los Animales Domesticos 2 ed. Editorial Medica Panamericana. 2002 Buenos aires Argentina. ISBN 1158-1164
46. LARSON Bob. Revista Angus, Bs. As., 241:43-44. Profesor de Medicina Veterinaria, Kansas State University. Traducido del "Angus Journal" (Mayo 2007),

47. MADDOCKS ,S investigación local de los testículos de rumiantesd.reproduccion y fertilidad.2006 Canada ISBN 3511: 231
48. MARIANI, A.R., Billi, A.M., Anatomia Microscópica. Istituto Di Anatomia Umana Normale. Universita' Degli Studi Di Bologna2006. ISBN 2734:765-788.
49. MARTÍNEZ Pastor Felipe, Obención Postmortem Y Calidad De Los Espermatozoides De La Cola Del Epidídimo Del Ciervo Rojo Iberico, Tesis Doctor, Universidad De León, España. 2005 ISBN 92: 1896-1902
50. MAHABIR criopreservación de semen de toro: Efecto de diferentes medios de preservación de la IVP en el ganado.Proc. 29a Reunión Anual de la Asociación Alemana de la transferencia de embriones (AET d), Bad Waldsee 2007 Alemania ISBN 51: 1027-1043
51. MÜLLER-Schlösser, Evaluación de la calidad de una nueva generación de yema de huevo libre diluyentes de semen para la criopreservación de semen bovino. 34^a Conferencia sobre la fisiología y patología de la reproducción, 2008 Bogota
52. MURADAS Lista de parámetros de viabilidade de espermatozoides bovinos colhidos porción vaginal artificia correo porción lavagem da cauda hacer epidídimo. Arco. Vet. Ciencia. 2006; E.E.U.U
53. NABIEV, D. Gilles, AndroMed ® frente Triladyl ® - influencia en funcional in vitro de los parámetros de fertilidad y IVP congelado de semen

- descongelado bovino. Vet. Med. 2003 Austria 90, Suppl. 1. ISBN 70:3994-4005.
54. OLEGARIO Carlos. Área de Selección y Reproducción Animal. cohidalgo@serida.org 2003 Colombia ISBN 6735-8652-699.
55. OLIVERA José Nicolás Manual de Evaluación de Semen en bovinos
Universidad Veracruzana Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Veracruz, Venezuela 2009 ISBN 7845-987-722.
56. PALMA Gustavo Atlas de esquemas en 3D Med,Vet., PhD 2012 Argentina
57. PALMA Gustavo, Biotecnología de la reproducción, primera edición,
Editorial INTA, 2007, Argentina ISBN 288-9524-753.
58. REYES-MORENO, C., Boilard, . Characterization and identification of
epididymal factors that protect ejaculated bovine sperm during in vitro storage.
Biology of Reproduction 2005 E.E.U.U ISBN 3526-876-915.
59. RIVERA GAONA MIGUEL Manual de
Reproduccion bovina: Endocrinologia Facultad Medicina Veterinaria y
Zootecnia Universidad del Tolima 2011 Colombia
60. RODRÍGUEZ, J., Madrid-Bury, N., Urdaneta, A., Aranguren, J., Quintero,
A. Análisis morfométrico del epidídimo en toros jóvenes mestizos 5/8 Holstein
y 5/8 Pardo Suizo con testículos pequeños. Revista Científica, FCV-LUZ,
2006; Voumen. 10 Canada ISBN 623-1832-716.

61. RODRÍGUEZ, G. Anatomía del Aparato Reproductor del macho Bovina. Documento de estudio. Universidad Nacional Agraria La Molina. 2007 Lima Peru. ISBN 218-0986-432.
62. Silva C. Anomalías del desarrollo testicular y escrotal en toros de tres razas en el sureste de México Facultad de Medicina Veterinaria Y Zootecnia Universidad Autónoma de Yucatán. 2009 Mérida México ISBN 675-742-826.
63. TAMARGO Carolina. Área de Selección y Reproducción Animal. ctamargo@serida.org 2005 Colombia ISBN 635-9641-544.
64. VAN Demark, Curso de Posgrado en Reproducción Bovina. Módulo II Capacidad Reproductiva del toro, 2001 Salisbury Irac ISBN 852-5628-234..

CITAS WEB

- a) http://www.produccionbovina.com/informacion_tecnica/inseminacion_artificial/45-mantenimiento_semen_congelado.pdf **30/09/2013 11:30 am**
- b) [http://www.reprobovitec.com/gustavo-palma-malformaciones espermaticas-primarias-secundarias](http://www.reprobovitec.com/gustavo-palma-malformaciones_espermaticas-primarias-secundarias) **30/09/2013 11:30 am**
- c) <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=8961110801> **10/2013 12:0 pm.**
- d) <http://www.conciencia-animal.cl/paginas/temas/temas.php?d=75301> **10/2013 14:00 pm**
- e) <http://redalyc.uaemex.mx/pdf/730/73000311.pdf> **05/10/2013 16:00 pm**
- f) <http://www.latinpedia.net/Ciencia/animal/Examen-de-la-calidad-del-semen-para-su-uso-en-inseminacion-artificial-ad498.htm> **05/11/2013 14:00 pm**

- g) <http://www.agrarias.unlz.edu.ar/files/anatomia/programas.htm> **05/11/2013 13:00 pm**
- h) www.produccion-animal.com.ar FERNÁNDEZ Mariano American Angus Association, por Alt **30/10/2013-16:00pm**
- i) www.bioline.org.br/request?zt06022:María I. Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad Central de Venezuela. Maracay, estado Aragua Recibido y aceptado dentro del contexto del XIII congreso de Producción e Industria Animal **2006.30/10/2013. 17:00pm**
- j) hnnbiol.blogspot.com/2008/01/sistema-reproductor-masculino.html**18/11/2012 – 10:00am**
- k) <http://www.engormix.com/MA-ganaderia-carne/genetica/articulos/criopreservacion-semen-tomado-epididimo-t1876/p0.htm>Publicado el: 31/12/2007Autor: Juan Carlos Franco Ayala - Médico Veterinario y Zootecnista de la Universidad del Tolima, Colombia. Diplomado en Biotecnología Reproductiva y Transferencia de Embriones Bovinos; Universidad del Tolima-CGR Biotecnología, Ibagué, Tolima-Colombia.**18/11/2012 – 13:00pm**

ANEXOS

IMAGEN 1. RECOLECCION DE TESTICULOS EN EL CAMAL DE SAQUISIL.

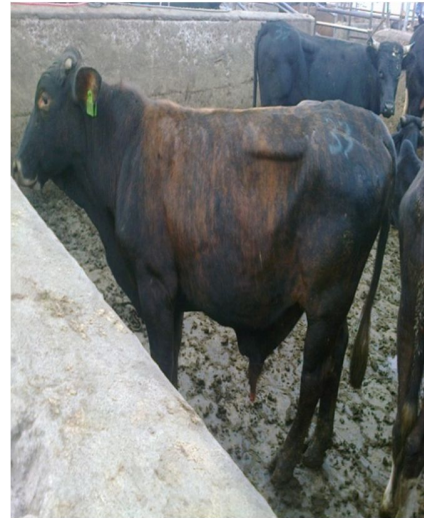


IMAGEN 2 .- COLECCIÓN DE LOS TESTICULOS EN FUNDAS HERMETICAS.



IMAGEN 3 - LIMPIEZA DE LIQUIDOS Y SANGRE.



IMAGEN 4.- CORTE DE FACIAS Y TUNICAS QUE RECUBREN AL TESTICULO.



IMAGEN 5.PREPARACION DEL DILUYENTE ANDROMED.

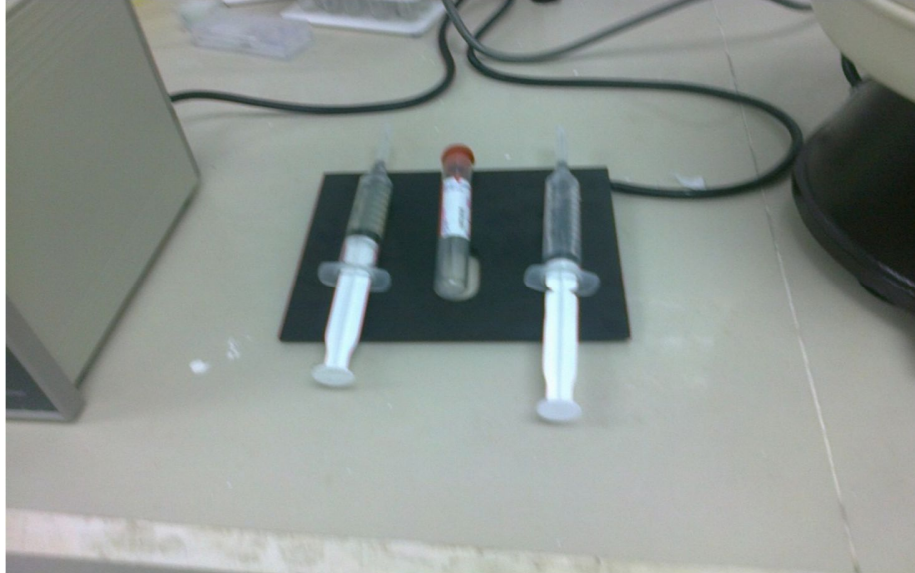


IMAGEN 6.- TECNICA DE SLICING TESTICLES.



IMAGEN 7.- LAVADO RETROGRADO EN LA TECNICA DE SLICING TESTICLES.



IMAGEN 8.- TECNICA DE LAUDERING EPIDIDIMIS



IMAGEN 9.- CONTENIDO ESPERMATICO SOBRE LA PLACA TERMICA.



IMAGEN 10.- EXAMEN MICROSCOPICO DEL SEMEN.



IMAGEN 11.- CONTEO ESPERMATICO EN LA CAMARA DE NEUBAUER.

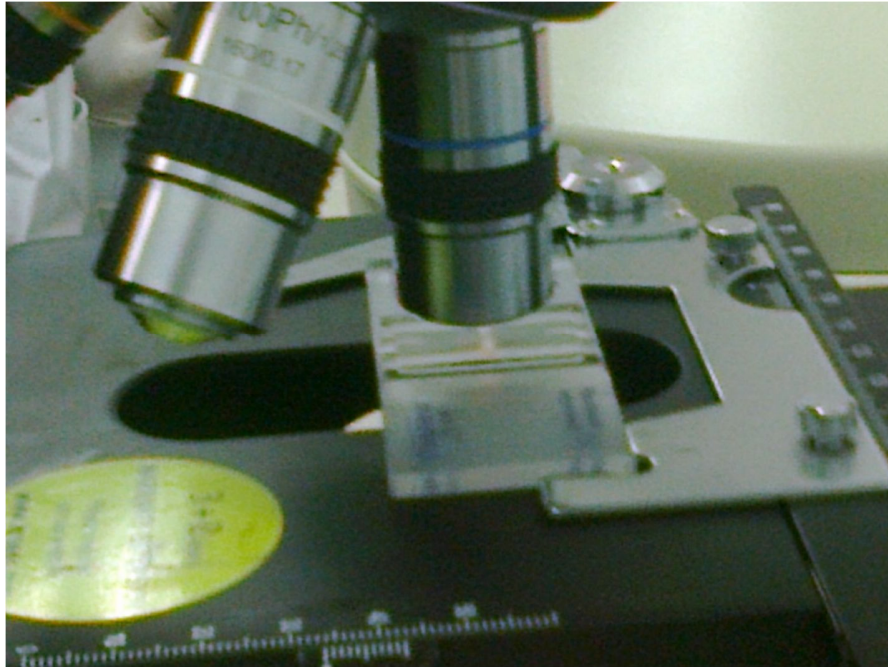
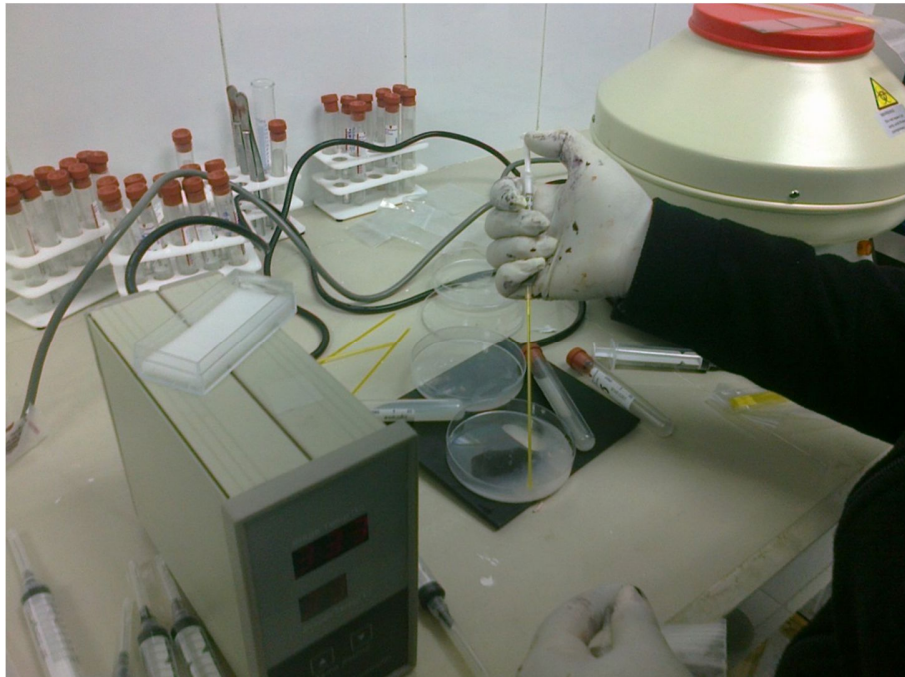


IMAGEN 12.- LLENADO DE PAJUELAS.



MAGEN 13.- PAJUELAS LISTAS PARA CRIOCONSERVAR.



IMAGEN 14.- ENFRIAMIENTO DE LAS PAJUELAS.



IMAGEN 15.- PROCESO DE CONGELAMIENTO.

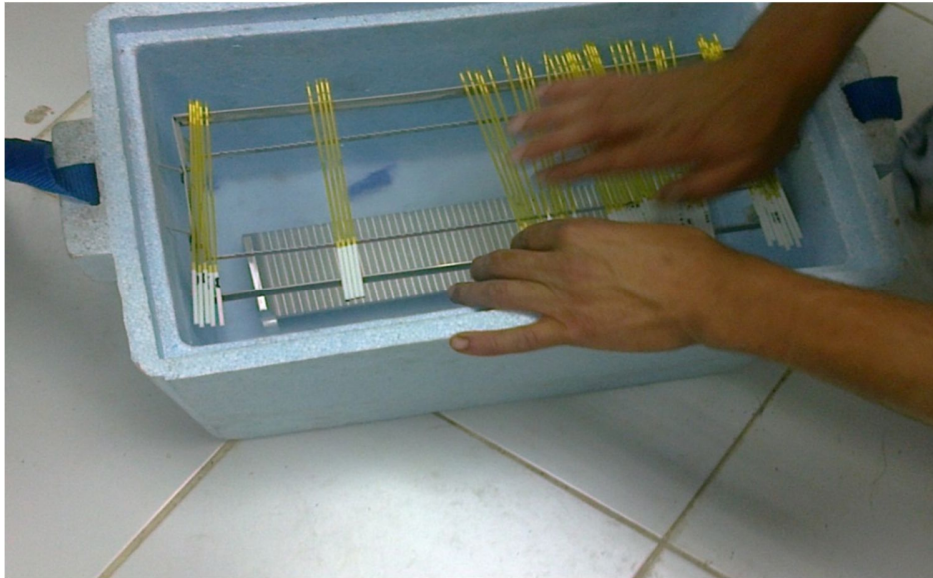


IMAGEN 16.-CONTROL DE LA TEMPERATURA.



IMAGEN 17.- OBSERVACION POR PARTE DEL TRIBUNAL.

