

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI



UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
RECURSOS NATURALES.

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA.

TESIS PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE MÉDICO
VETERINARIO.

TEMA:

**Evaluación de la crioconservación del semen de Cobayo (*Cavia Porcellus*)
en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la Carrera de
Medicina Veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi.**

POSTULANTE:

Mayra Nataly Mise Chango.

DIRECTORA DE LA TESIS:

Dra. Paola Lascano.

Latacunga - 2014

AVAL DEL DIRECTOR DE TESIS

En mi calidad de director de tesis titulada **“EVALUACIÓN DE LA CRIOCONSERVACIÓN DEL SEMEN DE COBAYO EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN DE LA CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI.”** Propuesto por la egresada Mayra Mise, 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.

Particular que pongo en su conocimiento para los fines legales pertinentes.

Atentamente,

Dra. Paola Lascano.
Directora de Tesis

CARTA DE APROBACION DEL TRIBUNAL DE TESIS.

En calidad de miembros del tribunal de grado aprueban el presente informe de investigación de acuerdo a las disposiciones reglamentarias emitidas por la Universidad Técnica de Cotopaxi y CAREN por cuanto, el postulante con el tema de tesis **“EVALUACIÓN DE LA CRIOCONSERVACIÓN DEL SEMEN DE COBAYO EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN DE LA CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI.”** ha considerado las recomendaciones emitidas oportunamente y reúne los méritos suficientes para ser sometido al acto de defensa de tesis.

Por lo antes expuesto se autoriza realizar los empastados correspondientes, según la normativa institucional.

Atentamente,

Presidente: Dr. Enrique Estupiñan

Miembro de tribunal: Dra. Mg. Marcela Andrade

Opositora: Dra. Cristina Bejarano

AUTORÍA.

Yo, Mayra Mise, declaro bajo juramento que el presente documento aquí descrito, fue elaborado de forma teórica y práctica bajo mi responsabilidad, 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.

A través de la presente declaración, el presente trabajo puede ser utilizado como una fuente de consulta bibliográfica.

Mayra Nataly Mise Chango

C.I. 0503634727

AUTORA.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por darme salud y vida para alcanzar mis metas.

Mis sinceros agradecimientos y gratitud para mis distinguidos maestros quienes con nobleza y entusiasmo depositaron en mí sus vastos conocimientos.

Un agradecimiento especial para la Doctora Paola Lascano por brindarme su ayuda durante toda la tesis.

Gracias a la prestigiosa Universidad Técnica de Cotopaxi y a la carrera de Medicina Veterinaria por haberme Abierto sus puertas generosamente y convertirme en una profesional.

DEDICATORIA

A Mis Padres

Que con entero sacrificio y abnegación supieron entregar todo de si para
hacer de mí un ser útil a la patria y a la sociedad

Y así poder obtener mi anhelado título.

GRACIAS POR CREER SIEMPRE EN MÍ LOS AMO MUCHO

A la memoria de mi querido padre Segundo Raúl Mise.

MAYRA NATALY MISE CHANGO

ÍNDICE DE PRELIMINARES

PORTADA	i
CARTA DE APROBACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS	ii
CARTA DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE TESIS	iii
AUTORÍA	iv
AGRADECIMIENTO	v
DEDICATORIA	vi
ÍNDICE DE CONTENIDO	vii
RESUMEN	xiii
SUMMARY	xiv
INTRODUCCIÓN	xvi

INDICE DE CONTENIDO

CAPÍTULO I

1.	Revisión bibliográfica.	1
1.1	Anatomía del Cuy.	1
1.1.1	Anatomía del aparato reproductor del macho.	1
1.1.2	Órganos que forman el aparato reproductor del macho	3
1.1.2.1	El epidídimo.	3
1.1.2.2	Conducto deferente.	4
1.1.2.3	Las glándulas accesorias.	4
1.1.2.4	Colector seminal.	4
1.1.2.5	Conducto eyaculador.	4
1.1.2.6	Uretra.	4
1.2	Recolección de semen directamente del epidídimo.	5
1.2.1	Características del semen.	5
1.2.1.1	Plasma Seminal.	5

1.2.2	Morfología del espermatozoide.	6
1.2.2.1	La cabeza espermática.	6
1.2.2.2	Flagelo.	7
1.3	Crioconservación de semen.	7
1.3.1	Principios básicos de la crioconservación.	7
1.3.2	Factores que determinan el éxito en la congelación del semen.	9
1.3.3	Dosis de semen.	10
1.3.4	Soluciones amortiguadoras comúnmente utilizadas en la dilución de semen.	11
1.3.5	Sustancias protectoras contra el desarrollo microbiano.	11
1.3.6	Crioprotectores.	12
1.3.7	Almacenamiento.	12
1.4	Evaluación del semen.	13
1.4.1	Examen macroscópico.	13
1.4.1.1	Volumen.	13
1.4.1.2	Color.	13
1.4.1.3	Densidad.	14
1.4.1.4	Ph.	14
1.4.1.5	Impurezas.	14
1.4.2	Examen microscópico del semen.	15
1.4.2.1	Motilidad espermática.	15
1.4.2.2	Concentración espermática.	15
1.4.2.3	Morfología espermática.	16

INDICE DE CONTENIDO

CAPÍTULO II

2.	Materiales y métodos.	18
2.1	Características del lugar.	18
2.1.1	Situación política.	18
2.1.2	Situación geográfica.	18
2.1.3	Datos meteorológicos.	18
2.2	Materiales y equipos.	19
a)	Materiales de oficina.	19
b)	Recursos tecnológicos.	19
c)	Materiales de Laboratorio.	19
d)	Reactivos.	20
e)	Equipos.	20
f)	Otros.	20
2.3	Diseño metodológico.	21
2.3.1	Tipos de investigación.	21
2.3.1.1	Descriptiva.	21
2.3.1.2	No experimental.	21
2.3.2	Técnicas de Investigación.	21
2.3.2.1	Técnica documental.	21
2.3.2.2	Técnicas de campo.	21
2.3.3	Análisis estadístico.	22
2.4	Unidad de estudio.	22
2.5	Variables evaluadas.	22
2.5.1	Calidad de los espermatozoides.	22
2.5.1.1	Macroscópicas.	22
2.5.1.2	Microscópicas.	22
2.6	Manejo del ensayo.	23
2.6.1	Recolección de testículos.	23
2.6.1.1	Manejo de los testículos antes de la recolección del semen.	23

2.6.2	Preparación del diluyente.	23
2.6.3	Recolección de semen.	23
2.6.3.1	Pruebas macroscópicas y microscópicas.	24
2.6.3.1a)	Color.	24
2.6.3.1b)	Ph.	24
2.6.3.1c)	Mortalidad.	24
2.6.3.1d)	Movilidad.	24
2.6.3.1e)	Morfología.	25
2.6.3.1f)	Concentración.	25
2.6.4	Protocolo de llenado, congelación y almacenamiento.	25
2.6.4.1	Llenado y Sellado.	25
2.6.4.2	Refrigeración.	26
2.6.4.3	Congelación con vapores de nitrógeno.	26
2.6.4.4	Crioconservación.	26
2.6.5	Descongelado.	26

INDICE DE CONTENIDO

CAPÍTULO III

3.	Análisis y discusión de los resultados.	27
3.1	Evaluación de semen antes de la crioconservación.	27
3.2	Evaluación del semen post- crioconservación.	36
	CONCLUSIONES.	
	RECOMENDACIONES.	
	BIBLIOGRAFÍAS.	
	ANEXOS.	

ÍNDICE DE CUADROS.

Cuadros		Página
Nº 1	Factores que ayudan a la crioconservación exitosa de semen.	10
Nº 2	Protocolo de crioconservación.	27
Nº 3	Color y ph del semen fresco diluido	28
Nº 4	Mortalidad del semen fresco diluido.	29
Nº 5	Movilidad individual del semen fresco diluido.	31
Nº 6	Morfología del semen fresco diluido.	33
Nº 7	Valor normal de la concentración espermática del semen del cuy.	35
Nº 8	Mortalidad del semen descongelado.	36
Nº 9	Movilidad individual del semen descongelado.	38
Nº 10	Morfología del semen descongelado.	40

ÍNDICE DE GRÁFICOS.

Gráfico		Página
Nº 1	Porcentaje de mortalidad espermática antes de la crioconservación.	30
Nº 2	Porcentajes de movilidad individual espermática antes de la crioconservación.	32
Nº 3	Porcentaje de morfología espermática antes de la crioconservación.	34
Nº 4	Porcentaje de mortalidad espermática post-crioconservación.	37
Nº 5	Porcentajes de movilidad individual espermática post-crioconservación.	39
Nº 6	Porcentaje de morfología espermática post-crioconservación.	41

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figuras	Tema	Página
N° 1	Estructura reproductiva del macho.	1
N° 2	Sistema tubular del testículo y epidídimo.	3
N° 3	Anatomía del espermatozoide.	6
N° 4	Alteraciones morfológicas de los espermatozoides de acuerdo a la región: Acrosoma, Cabeza, Pieza intermedia y Cola.	17

RESUMEN.

La evaluación de la criopreservación del semen de cobayo se llevó a cabo en el laboratorio de biotecnología de la reproducción de la carrera de Medicina Veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi.

El objetivo principal fue establecer y evaluar un protocolo de criopreservación que permita mantener la viabilidad y la funcionalidad celular por un periodo prolongado de tiempo.

Para realizar la evaluación de las muestras se realizaron pruebas de valoración seminal tanto para el semen fresco y post-descongelado, se evaluó los siguientes parámetros: Color, pH, concentración, mortalidad, movilidad y morfología.

Se utilizaron 10 cuyes machos adultos, quienes fueron evaluados físicamente y luego sacrificados, media hora después se procedió a realizar la extracción de los testículos por castración, el semen fue colectado por el método de disección y lavado de testículos, para luego ser llenado en pajuelas y congelado en nitrógeno líquido a -196°C .

Finalizada la investigación se concluyó que luego de la descongelación de pajuelas los espermatozoides sufrieron alteraciones causadas por shock térmico, las alteraciones encontradas fueron: daños en la cabeza y colas dobladas.

El análisis estadístico dio como resultado de la evaluación post-criopreservación pajuelas de buena calidad, mostrando valores altos en los porcentajes de los parámetros microscópicos tomando en cuenta el método de extracción y que fue realizado luego de la muerte del animal.

ABSTRACT

The evaluation of the cryopreservation semen from Guinea pig was conducted in the laboratory of biotechnology of reproduction of the career of veterinary medicine of the Technical University of Cotopaxi.

The main objective was to establish and evaluate a cryopreservation protocol that maintains cell viability and functionality for an extended period of time.

To perform the evaluation of the test samples for both seminal assessment cool and post-thawed semen was performed, was valued following parameters: color, pH, concentration, mortality, mobility and morphology.

10 guinea pigs adult males who were physically and then slaughtered evaluated half hour then proceeded to perform the removal of testicles castration, semen was collected by the method of dissection and washing testes were used to then be filled in straws and frozen in liquid nitrogen at -196°C .

After the investigation concluded that after thawing the sperm straws suffered disturbances caused by thermal shock, the alterations found were: head injury and bent tails.

The statistical analysis resulted in the post-cryopreservation straws of good quality, showing higher values in percentages of microscopic parameters taking into account the extraction method and was performed after the death of the animal evaluation.



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
CENTRO CULTURAL DE IDIOMAS



AVAL DE TRADUCCIÓN

En calidad de Docente del Centro Cultural de Idiomas de la Universidad Técnica De Cotopaxi, yo MS.c. Marcia Chiluisa Ch. con la C.C. 050221430-7 CERTIFICO que he realizado la respectiva revisión de la Traducción del Abstract; con el tema: Evaluación de la criopreservación del semen de Cobayo (*Cavia Porcellus*) en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la Carrera de Medicina Veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi” cuya autora es: Mayra Nataly Mise Chango y directora de tesis Dra. Paola Lacano.

Latacunga, 28 de febrero del 2014

Docente:

MS.c. Marcia Chiluisa Ch.
C.C. 050221430-7

INTRODUCCIÓN

El cuy es un mamífero roedor originario de la zona Andina Bolivia, Colombia, Ecuador y Perú en los cuales se encuentran más de 35 millones de cuyes. Por su capacidad de adaptación a diversas condiciones climáticas los cuyes pueden encontrarse desde la costa hasta lugares fríos con una altura de 4500 metros sobre el nivel del mar. (29)

La producción de cuy en el Ecuador especialmente en la región sierra es extensa y distribuida en distintos sistemas los cuales se identifican como familiar, familiar-comercial y comercial. (29)

La población estimada es de 15 millones de cabezas de cuy, la misma que por muchos años ha tenido un crecimiento muy lento debido a la poca importancia que el estado ecuatoriano ha dado a esta producción pecuaria, por lo que la producción de cuyes ha sufrido de carencia de soporte técnico, falta de recursos para realizar investigación y por lo tanto generar tecnología apropiada para poder sustentar y mejorar los índices de productividad. (25)

En una explotación de cobayocultura poseen cuyes macho reproductores de alta calidad genética que solo los podrán explotar durante el periodo de vida reproductiva o hasta su retiro para dar paso a un nuevo macho con alto valor genético, en pocos porcentajes se podrá mantener parte de estas características a través de su descendencia hasta la predominancia genética de otro animal.

La crioconservación pretende obtener una alternativa reproductiva para la cobayocultura al congelar semen de reproductores y mantener la descendencia por años e incluso se podrá trasladar el material genético a sitios lejanos y sin el temor de que el animal muera por el estrés o que proliferen enfermedades que afecte a toda la producción. (4)

OBJETIVOS.

a) Objetivo General.

EVALUAR LA CRIOCONSERVACIÓN DEL SEMEN DE COBAYO EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN DE LA CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI.

b) Objetivos Específicos.

- Establecer un protocolo de criopreservación para el semen de cobayo.
- Identificar las alteraciones que se presentan en los espermatozoides durante el descenso de temperatura.
- Determinar los parámetros macroscópicos y microscópicos del semen.
- Determinar problemas post-crio conservación del semen.

HIPÓTESIS

H1: Se logró criopreservar semen de cobayo con material post- mortem.

H2: No se logró criopreservar semen de cobayo con material post- mortem.

CAPÍTULO I

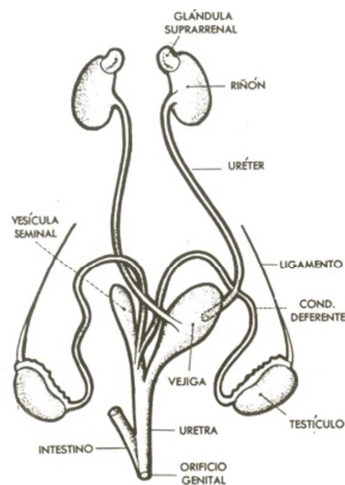
1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. ANATOMÍA DEL CUY

1.1.1 Anatomía del aparato reproductor del macho.

La estructura reproductiva de macho está constituida principalmente por dos testículos, conductos deferentes, pene y tres glándulas sexuales accesorias: las vesículas seminales, la próstata y la glándula de Cowper. (9)

FIGURA 1. ESTRUCTURA REPRODUCTIVA DEL MACHO.



Fuente: <http://www.infogranja.com.ar/conejos/genitales%20macho%201224.JPG>

El testículo tiene dos funciones muy vitales:

1. Producción de espermatozoides.
2. Producción de la hormona masculina específica, la testosterona.

Están situados fuera del cuerpo, encerrados en el escroto, esto es esencial para la formación normal del esperma, que solamente puede producirse a unos grados por debajo de la temperatura normal del cuerpo.

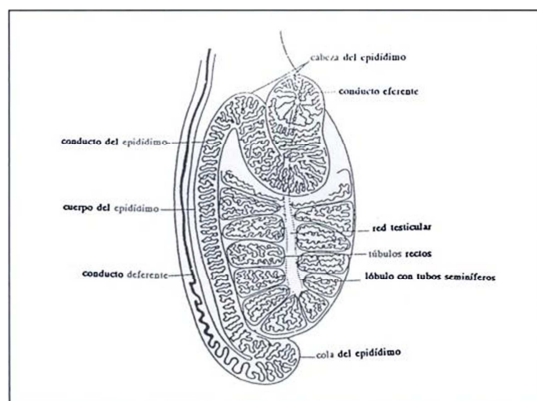
El escroto ayuda a proteger al testículo contra ambos extremos de temperatura y lo hace mediante capas musculares sensible a la temperatura y el músculo cremaster, localizado en la pared del escroto, que se relaja cuando hace calor y se contrae cuando hace frío. (3)

Los testículos están recubiertos por dos capas serosas de la túnica vaginalis y una capa de tejido conectivo denso e irregular, que constituye la túnica albugínea.

De la túnica albugínea emergen trabéculas de tejido conectivo que convergen en el mediastino ubicado en el centro del parénquima testicular y dividen al testículo en número variable de lobulillos testiculares que contiene de uno a cuatro túbulos seminíferos contorneados. (26)

Los túbulos seminíferos se unen, a la salida de cada lobulillo y forman los túbulos rectos agrupados en el mediastino que a su vez conforman la rete testis. De la rete testis sale una docena de túbulos llamados vasos eferentes que convergen en la porción dorsal del mediastino para luego llegar a la cabeza del epidídimo. (26)

FIGURA 2. SISTEMA TUBULAR DEL TESTÍCULO Y EPIDÍDIMO.



Fuente: http://www.uam.es/departamentos/ciencias/biologia/citologia/Descargas/guion_practica2.pdf

1.1.2 Órganos que forman el aparato reproductor del macho.

1.1.2.1 El epidídimo.

El epidídimo es una estructura larga, compacta y plana, es el tubo que sirve de salida a todo el esperma que se produce en los testículos, éste sale por movimientos del epitelio ciliar mantenido por las contracciones de la musculatura de la pared del ducto. (3)

El epidídimo constituye una estructura formada por una gran cantidad de conductos enrollados los cuales se adhieren estrechamente a la superficie de los testes, el mismo consiste de cabeza, cuerpo y cauda.

Los ductos epididimales sirven como un sitio de almacenamiento del material genético en el cual los espermatozoides recibirán capacitación y a su vez les permitirá alcanzar el grado de maduración y llegar a ser viables. (18)

1.1.2.2 Conducto deferente.

Los conductos deferentes continúan el canal del epidídimo como un tubo sumamente enrollado paralelo al cuerpo del epidídimo que desemboca en la uretra, en un gran arco situado caudalmente con respecto al esfínter vesicular. (18)

1.1.2.3 Las glándulas accesorias.

Están conformadas por la vesícula seminal, glándula vesicular, próstata, glándulas para-prostáticas y glándula bulbouretral.

Estas glándulas producen la mayor parte del líquido seminal el cual sirve como medio de suspensión y sobrevivencia de los espermatozoides. (6)

1.1.2.4 Colector seminal.

Es un conducto recto, situado en la misma base del pene; recibe a los espermatozoides que llegan por el conducto deferente y las secreciones de las glándulas vesiculares y próstata situadas sobre él. (6)

1.1.2.5 Conducto eyaculador.

Sigue a continuación del colector seminal y recoge las secreciones de las glándulas bulbouretral. (6)

1.1.2.6 Uretra.

Se refiere a la prolongación del conducto eyaculador y es la porción que corresponde al cuerpo del pene. Sirve como conducto tanto para la orina como para el semen. (6)

1.2 RECOLECCIÓN DE SEMEN DIRECTAMENTE DEL EPIDÍDIMO.

Se realiza en animales muertos recientemente puede plantearse también la recogida de semen de la cola y porción distal del cuerpo del epidídimo.

El semen obtenido puede ser de gran calidad y ser perfectamente útil para la congelación. Aunque para realizar las técnicas de recolección se necesita centros capacitados y de experiencia. (24)

1.2.1 Características del semen.

El semen está conformado por una fracción líquida o plasma seminal y una fracción celular que la conforman los espermatozoides. (14)

1.2.1.1 Plasma Seminal.

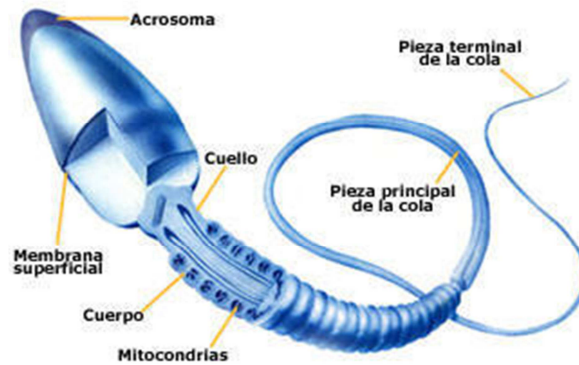
El plasma seminal está compuesto por las secreciones provenientes de la próstata y de las glándulas vesiculares y bulbouretrales. Durante la eyaculación, dichas secreciones son vertidas hacia la uretra generándose así una mezcla con la suspensión de espermatozoides y las secreciones ampulares del conducto deferente. (16)

La importancia funcional del plasma seminal es cuestionable, dado que es posible inducir la preñez por inseminación, empleando espermatozoides colectados del epidídimo. Sin embargo, el plasma seminal sí muestra ser un componente esencial en el apareamiento natural porque actúa como portador y protector de los espermatozoides. (8)

1.2.2 Morfología del espermatozoide.

Los espermatozoides maduros son célula alargadas conformadas por una cabeza aplanada portadora del núcleo y una cola que contiene el aparato necesario para la motilidad celular, que le permite moverse en la vagina hasta alcanzar el óvulo en el útero. Los testículos producen entre 50 y 250 millones de espermatozoides diarios. (11)

FIGURA 3. ANATOMÍA DEL ESPERMATOZOIDE.



Fuente: http://www.avizora.com/atajo/secciones/textos/0019_cuide_su_semen.htm

1.2.2.1 La cabeza espermática.

La cabeza del espermatozoide contiene el material genético, se encuentra el núcleo y el acrosoma. El núcleo es ovalado, aplanado y la cromatina está compactada y conformada por ADN unido a histonas espermáticas.

El acrosoma tiene forma de capuchón y cubre el polo anterior de la cabeza, contiene varias enzimas hidrolíticas (acrosina, hialuronidasa, esterasas e hidrolasa ácidas) que participan activamente en el proceso de la fecundación. (19)

1.2.2.2 Flagelo.

El flagelo que es normalmente la parte más larga del espermatozoide, mediante sus movimientos hace que el espermatozoide nade con la cabeza en primer término. La cola está dividida en 3 partes bien diferenciadas: la pieza media, la pieza principal, y la pieza terminal. (30)

1.3 CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN.

La crioconservación de semen de animales domésticos ofrece muchas ventajas en los sistemas de producción, particularmente en los programas de mejoramiento genético. El proceso de crioconservación produce un daño celular que disminuye el porcentaje de espermatozoides viables. (13)

Consecuentemente, es de esperar que cuando se utiliza la inseminación artificial con semen congelado la fertilidad obtenida es menor en comparación a cuando se utiliza semen fresco. (27)

1.3.1 Principios básicos de la crioconservación.

El objetivo principal de la crioconservación es el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad celular por un período prolongado de tiempo. Para lo cual, es necesario mantener el semen a temperaturas inferiores a -130°C para detener completamente los procesos metabólicos. (10)

La supervivencia a la congelación es el producto de numerosos factores que interaccionan entre sí. La crioconservación de cualquier material biológico se efectúa indispensablemente dentro de una solución que otorgue propiedades físico-químicas favorables para la sobrevivencia durante la congelación y descongelación. (17)

Cuando la suspensión alcanza temperaturas entre -5 y -10°C se forman núcleos de hielo, que se distribuyen aleatoriamente en el medio extracelular. La membrana plasmática del espermatozoide constituye una barrera que detiene la formación de hielo dentro de la célula. (21)

La cristalización en el medio extracelular da lugar a hielo puro, dejando lo solutos progresivamente más concentrados en la fracción líquida. Este proceso recibe el nombre de crioconcentración. La fracción líquida se hace hipertónica y en respuesta a la diferencia de gradientes de concentración, la célula se deshidrata. (31)

El punto eutéctico refleja la máxima concentración de solutos que puede alcanzarse justo antes de que el agua y los solutos se solidifiquen conjuntamente. Cuando la temperatura baja hasta alcanzar el punto eutéctico, la fracción no congelada y los solutos se solidifican. (5)

Al ocurrir la cristalización, hay una liberación de energía en forma de calor latente de solidificación. Esto eleva transitoriamente la temperatura de la solución. Este proceso de aumento y disminución rápida de la temperatura es perjudicial para las células. (12)

La velocidad de congelamiento es un factor importante en la crioconservación, cuando la velocidad de congelamiento es muy rápida, la célula no es capaz de deshidratarse lo suficiente consecuentemente, se produce una inadecuada deshidratación y el agua que aún se encuentra en el interior de la célula forma cristales de hielo, que tienen un efecto letal para la célula. Por el contrario, si la velocidad es demasiado lenta, la deshidratación será extrema pudiendo llegar al colapso celular. (20)

La deshidratación severa produce la desnaturalización de macromoléculas y una reducción excesiva del tamaño celular hasta el colapso irreversible de la membrana

plasmática. Por tanto, la velocidad de congelamiento debe ser lo suficientemente rápida para reducir el tiempo de exposición del espermatozoide a condiciones híper osmóticas y al mismo tiempo, debe ser lo suficientemente lenta para permitir que ocurra la deshidratación celular. La supervivencia celular será máxima a una velocidad de congelamiento adecuada, que es específica para cada tipo celular. (23)

La velocidad de congelamiento es de considerable importancia durante el “rango crítico de temperatura”, definido como el período donde ocurre la formación de cristales de hielo y la consecuente deshidratación celular. (22)

Los factores físicos a los que se refiere son el estrés osmótico y la presión que sufren las células en sus membranas por la expansión del hielo. Esta presión produce una deformación celular que a bajas temperaturas resulta letal.

Las membranas celulares son las estructuras que sufren mayor daño en los procesos de crioconservación, debido a la pérdida de fluidez de sus componentes lipídicos. La transición de lípidos fluidos a sólidos se presenta a temperaturas entre 10 y 16 °C alterando todas las funciones de la membrana y confiriéndole un alto grado de fragilidad. (27)

1.3.2 Factores que determinan el éxito en la congelación del semen.

La crioconservación del semen ha sido ampliada exitosamente en otras especies, sin embargo existen variaciones en la calidad del semen descongelado entre individuos.

Entre los diferentes factores que influyen en la fertilidad de la congelación y descongelación del semen en diferentes especies se encuentran: La naturaleza de los crio protectores, la temperatura en la descongelación, concentración espermática y variaciones en la metodología. (28)

**CUADRO 1. FACTORES QUE AYUDAN A LA CRIOPRESERVACIÓN
EXITOSA DE SEMEN.**

FACTOR IMPORTANTE EN CRIOPRESERVACIÓN	SUSTANCIAS O CONDICIONES USUALMENTE UTILIZADAS
Procesamiento de semen	Inmediatamente después de la recolección.
Macromoléculas para proteger al esperma contra el shock-frio de la pre congelación	Yema de huevo buferizada. Leche caliente.
Tasa de enfriamiento y tiempo de pre-congelación	Enfriar en 1-2 hrs El tiempo de pre congelación varía con el diluyente y la especie.
Crio protector especial	Usualmente glicerol.
Tasa de congelación	Varia: de + 5 °C a – 100 °C en 10 minutos
Temperatura de almacenamiento	-196 °C Nitrógeno líquido
Tasa o temperatura de descongelamento	Usualmente se descongela de 30-37 °C

Fuente: Stornelli.2006.

1.3.3 Dosis de semen.

El volumen de eyaculado varía según la especie de animal o el método de colecta. En explotaciones comerciales, los eyaculados son inmediatamente diluidos y crean pajuelas con una cantidad espermática mayor a los 16 millones. (32)

1.3.4 Soluciones amortiguadoras comúnmente utilizadas en la dilución de semen.

Los dilutores de semen para la crioconservación están compuestos por diferentes sustancias que cumplen las siguientes funciones:

- a) Proveer nutrientes como fuente de energía.
- b) Proteger a los espermatozoides del efecto dañino del enfriamiento.
- c) Mantener un adecuado equilibrio del pH.
- d) Mantener una adecuada presión osmótica y balance electrolítico.
- e) Inhibir el crecimiento bacteriano.
- f) Incrementar el volumen del semen para que pueda ser usado para múltiples inseminaciones.
- g) Proteger a los espermatozoides durante el congelamiento evitando la formación de cristales dentro de la membrana espermática.
- h) Protege la membrana del descongelamiento. (15)

1.3.5 Sustancias protectoras contra el desarrollo microbiano.

La contaminación microbiana y de los agentes patógenos se pueden evitar con la adición de antibióticos en los diluyentes, más comúnmente utilizada la penicilina, la estreptomycinina y la sulfonamidas. (33)

1.3.6 Crioprotectores.

Durante el proceso de congelación, las sustancias crioprotectoras son esenciales para disminuir el daño espermático ocasionado por el descenso de temperatura.

Ya que estos remplazan el agua intracelular durante la congelación, permitiendo que el fluido intracelular pueda ser súper enfriado a temperaturas entre -5 y -15 °C sin que ocurra la formación de cristales de hielo, debido a que estas sustancias disminuyen el punto de congelación por medio de la reducción en la interacción entre las moléculas de agua.(14)

Algunos de los crioprotectores utilizados son: dimetilsulfoxido (DMSO), glicerol, metanol, propanediol, etyl glicol, acetamida, tetralosa, metil celulosa, yema de huevo y leche descremada.

Estos crioprotectores funcionan ya que son de bajo peso molecular y penetran la membrana del esperma, durante el congelamiento de las células en suspensión: el hielo se encuentra en el espacio extracelular causando un gradiente osmótico. (28)

1.3.7 Almacenamiento.

El semen se puede congelar empleando la metodología convencional (congelación lenta) o la metodología rápida (congelación rápida) pudiendo emplearse para el efecto pajuelas de plástico, ampollitas o pellets; el semen congelado con la metodología rápida mejora la supervivencia de los espermatozoides. (22)

Originalmente se utilizan pajillas de 0.5 ml de capacidad, pero se usan más las de 0.25 ml de capacidad. El almacenamiento se da en nitrógeno líquido a una temperatura segura de -196 °C. (23)

1.4 EVALUACIÓN DEL SEMEN.

Una vez realizada la recolección del eyaculado, se debe poner a 32-37°C, evitando exponerlo a la luz del sol.

Los recipientes a usar deben estar atemperados y estériles; en caso de que no puedan esterilizarse, se lavarán y enjuagarán muy bien en el propio diluyente (nunca en agua común, pues se corre el riesgo de provocar un choque iónico), las mismas condiciones deben prevalecer durante la evaluación del semen. (32)

La evaluación del semen se hace de forma macroscópica y microscópica. Esta evaluación permite asignar un valor de calidad al eyaculado; dicho valor determina el grado de dilución al que será sometido el esperma. (32)

1.4.1 Examen macroscópico.

1.4.1.1 Volumen.

El volumen del semen depende del método de recolección, la edad, estado del animal, tamaño y habilidad del recolector.

La medida del volumen se hace para calcular posibles diluciones del semen para su posterior procesamiento (1).

1.4.1.2 Color.

La evaluación del color es dada por observación subjetiva y se clasifica en cremoso, lechoso y acuoso, teniendo el color una correlación positiva con la concentración espermática de la muestra. (7)

Otra forma de clasificar el semen según su color, que establece los siguientes criterios:

- Código 3 Blanco nacarado o marfil.
- Código 2 Blanco lechoso.
- Código 1 Blanco acuoso.
- Código 0 Anulado semen con orina o sangre. (1)

1.4.1.3 Densidad.

Sabemos que el color normal del semen debe ser blanco nacarado o blanco lechoso; no obstante, será más denso, es decir, más opaco, mientras más espermatozoides contenga. Por el contrario, mientras más reducida sea la concentración, el aspecto será más acuoso. (26)

1.4.1.4 pH.

La medición del potencial de hidrógeno es realizada mediante un ph-metro o bien con cintas tornasol en una pequeña muestra de semen. La cuantificación del grado de acidez o alcalinidad de una muestra de semen aporta información respecto a la calidad del mismo. (2)

1.04.1.5 Impurezas.

La cantidad mínima de impurezas es de 0.72%, las cuales pueden ser evaluadas de la siguiente manera:

- Código 3 Ausencia total de sustancias y cuerpos extraños.
- Código 2 Algunas sustancias y cuerpos extraños.

- Código 1 Presentes sustancias y cuerpos extraños.
- Código 0 Gran cantidad de sustancias y cuerpos extraños.(1)

1.4.2 Examen microscópico del semen.

1.4.2.1 Motilidad espermática.

Incluye la motilidad masal y progresiva, se utiliza una gota de semen, que se coloca entre un portaobjetos y un cubreobjetos a 37°C y se observa a un aumento de 400x. La determinación de movilidad se realiza por observación subjetiva.

La motilidad puede ser evaluada por medio de una escala de puntos de la siguiente forma:

- 0 Ausencia de motilidad.
- 1 Muy poca motilidad.
- 2 Poca motilidad. Se mueve solo un 25% de espermatozoides.
- 3 Buena motilidad. Se mueve el 25 al 75% de espermatozoides.
- 4 Muy buena motilidad. Se mueve el 75 al 95% de espermatozoides con desplazamientos amplios. (14)

1.4.2.2 Concentración espermática.

Se puede valorar mediante cámara de Neubauer o en forma subjetiva se observa una gota de semen entre porta y cubre objeto a 400 aumentos. Generalmente, este parámetro se expresa en espermatozoides/ml. Para su determinación, se pipetea 0.05 ml de semen mediante una pipeta cuenta glóbulos blancos. (2)

A continuación, se añaden 0.06 ml de una solución tinte (eosina amarillenta al 1/500). Se agita el conjunto y, depositando una gota en la cámara de Neubauer, se observa en el microscopio. (2)

Al igual que las otras características, la concentración se evalúa y registra mediante códigos como sigue:

- Código 4: 450 x 10 a la 6 potencia de espermatozoides/ml.
- Código 3: 450 x 10 a la 6 potencia al 250 x 10 a la 6 potencia de espermatozoides/ml.
- Código 2: 250 x 10 a la 6 potencia al 150 x 10 a la 6 potencia de espermatozoides/ml.
- Código 1: 150 x 10 a la 6 potencia al 50 x 10 a la 6 potencia de espermatozoides/ml.
- Código 0: 50 x 10 a la 6 potencia de espermatozoides/ml.(2)

1.4.2.3 Morfología espermática.

Se coloca una gota de semen en un cubreobjetos y se tiñe con gota de eosina-nigrosina, la muestra teñida se extiende a lo largo del cubreobjetos con la ayuda de otro portaobjetos: cuando el frotis se seca, se observa con aumento de 400x y se cuentan 100 espermatozoides, registrando los normales y los anormales. (19)

Las anormalidades morfológicas se clasifican en: anormalidades primarias (subdesarrollo, doble acrosoma, cabeza pequeña, cabeza en forma de pera, contorno anormal, pieza media anormal, cola enrollada, 2 o más colas, implantación abaxial) y anormalidades secundarias (cabezas desprendidas, gota citoplasmática, capuchón desprendido, cola quebrada, cola con dobles simples). (20)

CAPÍTULO 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° 31'16"W.
- **Altitud:** 2757.591 m.s.n.m.

2.1.3. Datos meteorológicos.

- **Temperatura promedio:** 10.7°C
- **Pluviosidad:** 175 mm(anuales)
- **Viento:** Sureste- Noreste.
- **Nubosidad anual:** 4.7/8.

Fuente: Registros administración CEYPSA (2005)

2.2. MATERIALES Y EQUIPO.

a) Materiales de oficina.

- Papel Bond.
- CDS.
- Libreta.
- Copias.
- Anillados.
- Empastados.
- Impresiones.
- Material bibliográfico

b) Recursos tecnológicos.

- Calculadora.
- Cámara fotográfica.
- Flash Memory.
- Internet/horas.
- Computadora.

c) Materiales de laboratorio.

- Tubos de ensayo.
- Bisturís.
- Caja de pajillas.
- Caja de guantes.
- Caja de tapones de embriones.
- Caja jeringas.
- Frasco de clorhexidina.

- Porta y cubre objetos.
- Caja de gasas.
- Rollo de toallas de papel.
- Caja Petri.
- Recipiente.
- Pinzas.

d) Reactivos.

- Agua bi destilada.
- Tinta china.
- Eosina.
- AndroMed.
- Hielo.

e) Equipos.

- Plancha térmica.
- Micro pipeta.
- Microscopio.
- Cámara de Newbauer.
- Refrigerador.
- Termo de nitrógeno.
- Termo cupla.

f) Otros.

- Material biológico (semen de cuy).

2.3. DISEÑO METODOLÓGICO

2.3.1 Tipo de investigación.

2.3.1.1 Descriptiva.

Consiste en la caracterización de un hecho, fenómeno, individuo o grupo, con el fin de establecer su estructura o comportamiento.

2.3.1.2 No Experimental.

Se presenta mediante la manipulación de una variable experimental no comprobada, en condiciones rigurosamente controladas, con el fin de describir de qué modo o por qué causa se produce una situación o acontecimiento particular.

2.3.2 Técnicas de investigación.

2.3.2.1 Técnica documental.

Empleamos las diferentes fuentes primarias de información: libros monografías, tesis, internet, Etc.

2.3.2.2 Técnica de campo.

Las técnicas de campo utilizadas en la investigación son:

- a) La observación.- Para determinar los fenómenos que ocurren en el transcurso y desarrollo del proyecto.

2.3.3 Análisis estadístico.

Se utilizó cuadros y gráficos para evaluar el semen del cuy y determinar las características macroscópicas y microscópicas antes y después la de crioconservación.

2.4. UNIDAD DE ESTUDIO.

La presente investigación se realizó en 20 testículos.

2.5. VARIABLES EVALUADAS.

2.5.1. Calidad de los espermatozoides.

La calidad se evaluó las siguientes características:

2.5.1.1 Macroscópicas:

Ph: siete.

Concentración espermática: Blanco nacarado o blanco lechoso.

2.5.1.2 Microscópicas:

Movilidad: si hay movimiento.

Mortalidad: si hay espermatozoides muertos.

Morfología: hay malformaciones típicas de la especie.

Calidad espermática Pos-descongelado: si hay funcionalidad celular.

2.6 MANEJO DEL ENSAYO.

2.6.1 Recolección de testículos.

La investigación se realizó en 20 pares de testículos sexualmente maduros de 10 cuyes sacrificados. Los testículos fueron colectados intactos de su cavidad.

2.6.1.1 Manejo de los testículos antes de la recolección del semen.

Se colocó los testículos en un termo sin ningún tipo de solución. Los espermatozoides pueden vivir hasta 3 horas en este tipo de conservación.

2.6.2 Preparación del diluyente.

Se realizó una dilución de AndroMed y agua bi destilada en una relación de (2:8) para 20 testículos, es decir se utilizó 8 ml de agua bi destilada pre calentada a 32 ° C y 2 ml de AndroMed, la dilución permaneció sobre la plancha térmica.

2.6.3 Recolección de semen.

Para la recolección del semen se diseccionó la cola del epidídimo con varios cortes profundos, luego se realizó un lavado con 0.5 ml de diluyente.

La solución debe caer sobre una caja Petri previamente temperada a 32 °C y permanecer sobre la plancha térmica.

2.6.3.1 Pruebas macroscópicas y microscópicas.

Se realizó el examen macroscópico de pH, color y los exámenes microscópicos de concentración, mortalidad, movilidad y morfología.

2.6.3.1.a) Color.

Se evaluó observando el semen diluido detenidamente en donde se determinó el color blanco lechoso.

2.6.3.1.b) Ph.

En una gota de semen se colocó una tira para medir el pH dejar actual varios segundos y se observó la coloración que nos indicó un ph de 7.

2.6.3.1.c) Mortalidad.

Se colocó una gota de semen fresco y una gota se eosina en un porta objetos luego se miró al microscopio a 40X, se observó que los muertos se encuentran teñidos ya que su membrana permite el paso a la eosina mientras que los vivos no adoptan dicha coloración.

2.6.3.1.d) Movilidad.

Se apreció los espermatozoides en el microscopio a 40X con claridad y se determinó sus ligeros movimientos uno por uno. En esta placa no se pudo determinar la evaluación de movilidad masal ya que observada a 4X o 10X la oleada espermática no es visible por motivo a que los espermatozoides no tienen mucho movimiento. Por el sitio donde se extrajo el semen.

2.6.3.1.e) Morfología.

Se colocó 1 gota de semen y una gota de tinta china en un porta objetos. Se fijó la placa en el ambiente y se observó en el microscopio a 40X, se identificó los espermatozoides y anotamos aquellos que poseen alteraciones en su anatomía.

2.6.3.1.f) Concentración.

Se colocó con una micro pipeta cantidad suficiente de semen sobre la cámara de Newbauer, se observó en el microscopio a 40X en el cual se debe contar 5 casillas pre-seleccionadas en forma de L donde se procedió a contar los espermatozoides dentro de las casillas incluyendo los espermatozoides que sobresalgan de 2 bordes.

Luego se aplicó la siguiente formula: número de espermatozoides de 5 casilleros, por 10 ya que cada cuadrado tiene 1 mm de profundidad Y por 10 nuevamente que es la dilución, y multiplicas por 1000 y se obtiene el número de espermatozoides por ml.

2.6.4 Protocolo de llenado, congelación y almacenamiento.

2.6.4.1 Llenado y Sellado.

Una vez que el semen pasó las pruebas de calidad se realizó el llenado de pajuelas por absorción, cada pajuela debe tener una burbuja de aire por el cual si este está demasiado lleno se debe extraer el semen con una micropipeta.

Se procedió a sellar con un tapón de embriones en un extremo y se colocó la gota de aire en medio de la pajuela con ayuda de una fuerte agitación de la pajuela (de arriba hacia abajo).

2.6.4.2 Refrigeración.

Se procedió a colocar las pajuelas en refrigeración para alcanzar una temperatura de 5°C y una manera práctica de conseguir esta temperatura es colocar las pajuelas en un recipiente con agua y hielo durante 2 horas.

2.6.4.3 Congelación con vapores de nitrógeno.

Se colocó nitrógeno en un recipiente de espuma flex luego se incorporó la varilla de pajuelas sobre los vapores de nitrógeno a una temperatura de -120°C. La temperatura se monitorea con la termo cupla una vez alcanzada la temperatura deseada la varilla seguirá descendiendo conforme el nitrógeno siga evaporando, una vez que la pajillas cambia de coloración más opaco es que está congelada.

2.6.4.4 Crioconservación.

Se colocó las pajuelas en el nitrógeno líquido de igual manera la punta de una pinza una vez congeladas se procedió a reubicar en el cubile del tanque de nitrógeno previamente nombrado.

2.6.5 Descongelado.

El descongelado se realizó el mismo día, se sacó la pajuela del termo de nitrógeno se sumergió la pajuela en agua a 35°C durante 15 segundos. Seguido se colocó una gota de semen en una porta objetos y una gota de eosina donde se evaluó la mortalidad post-crioconservación seguido de la movilidad. En otra placa se preparó otra gata de semen y una de tinta china para evaluar la morfología.

CAPÍTULO III

3. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.

3.1 EVALUACIÓN DE SEMEN ANTES DE LA CRIOCONSERVACIÓN.

CUADRO 2.- PROTOCOLO DE CRIOCONSERVACIÓN.

Pasos	Características
1	Extracción testículos post- mortem y Preparación (secos y sin membranas).
2	Preparación de 10 ml de diluyente en una relación (2:8).
3	Colocar el diluyente y una caja Petri en la placa térmica a 32°C.
4	Lavado del epidídimo diseccionado con 0.5 ml de diluyente cada uno.
5	Pruebas para evaluar características macro y microscópicas.
6	Llenado y sellado de pajuelas, refrigeración a 5°, congelación a -120°C.
7	Crioconservación y almacenamiento a -196° C.
8	Descongelación a 35°C.
9	Pruebas para evaluar características macro y microscópicas post-descongelado.

Fuente: Directa
Elaborado por: Mayra Mise

En el cuadro número 2 se observa los pasos del protocolo de crioconservación de semen, en el cual nos indica el manejo de los testículos, disección y lavado con diluyente sobre una caja Petri, se especifica la temperaturas exactas de 32° C ya que estas variables son de suma importancia en el éxito de la crioconservación. También nos indica los exámenes para evaluar el semen antes y después de la crioconservación finalizando así con el llenado, sellado y crioconservación de pajuelas.

CUADRO 3.- COLOR Y PH DEL SEMEN FRESCO DILUIDO.

Muestras	Color	pH
1	Blanco cremoso	7
2	Blanco cremoso	7
3	Blanco cremoso	7
4	Blanco cremoso	7
5	Blanco cremoso	7
6	Blanco cremoso	7
7	Blanco cremoso	7
8	Blanco cremoso	7
9	Blanco cremoso	7
10	Blanco cremoso	7

Fuente: Directa

Elaborado por: Mayra Mise

El cuadro número 3 nos da a conocer las características macroscópicas de coloración típico blanco lechoso con pH 7.

CUADRO 4.- MORTALIDAD DEL SEMEN FRESCO DILUIDO.

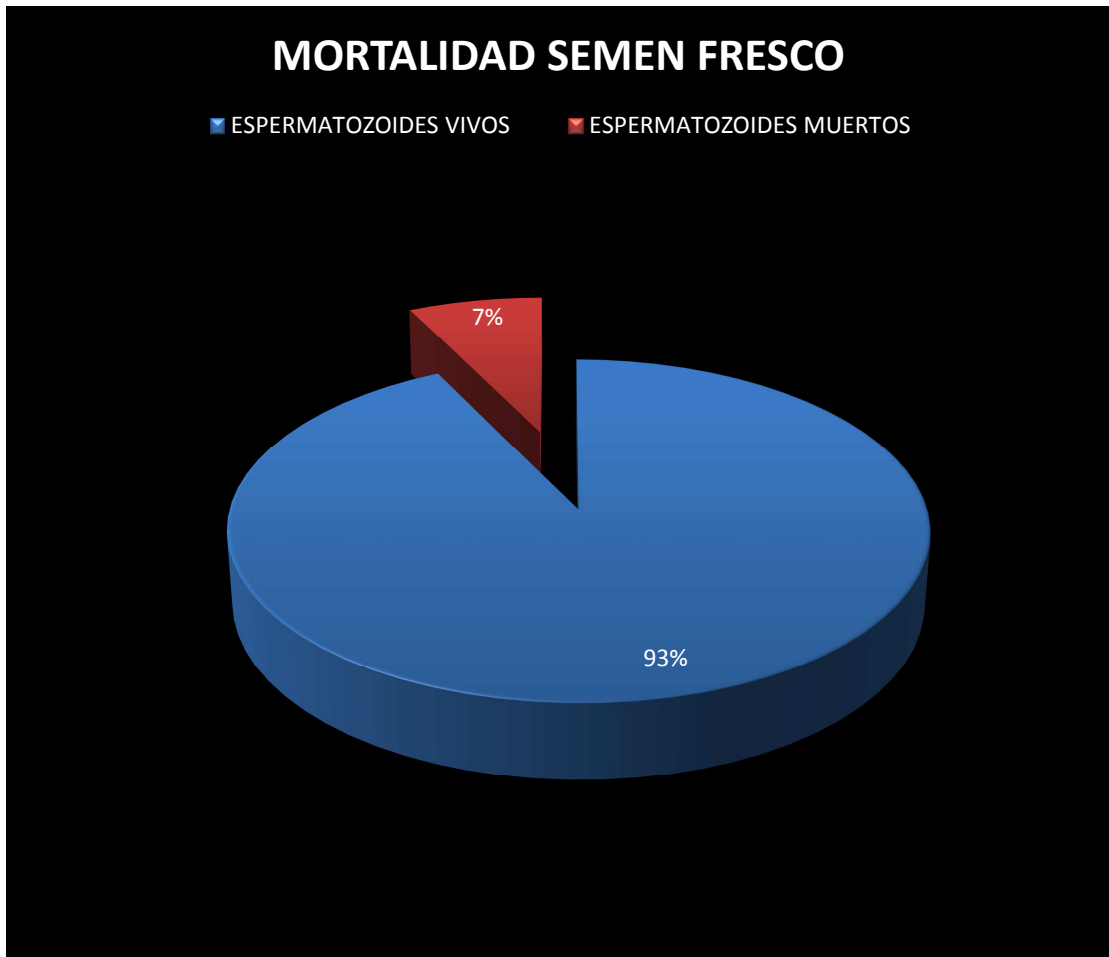
Características en 100 espermatozoides		
Muestras	Vivos	Muertos
1	95	5
2	99	1
3	94	6
4	92	8
5	94	6
6	92	8
7	85	15
8	87	13
9	98	2
10	91	9
TOTAL	927	73

Fuente: Directa

Elaborado por: Mayra Mise

En el cuadro número 4 nos indica la mortalidad de semen fresco en el cual obtenemos como resultado 927 espermatozoides vivos y 73 muertos de un total de 1.000 espermatozoides que corresponden a 10 muestras.

GRÁFICO 1. PORCENTAJE DE MORTALIDAD ESPERMÁTICA ANTES DE LA CRIOCONSERVACIÓN.



Fuente: Directa

Elaborado por: Mayra Mise

El gráfico número 1 se representa el porcentaje de mortalidad de semen fresco diluido en el cual nos indica un 93 % de espermatozoides vivos y el 7 % de espermatozoides muertos.

CUADRO 5.- MOVILIDAD INDIVIDUAL DEL SEMEN FRESCO DILUIDO.

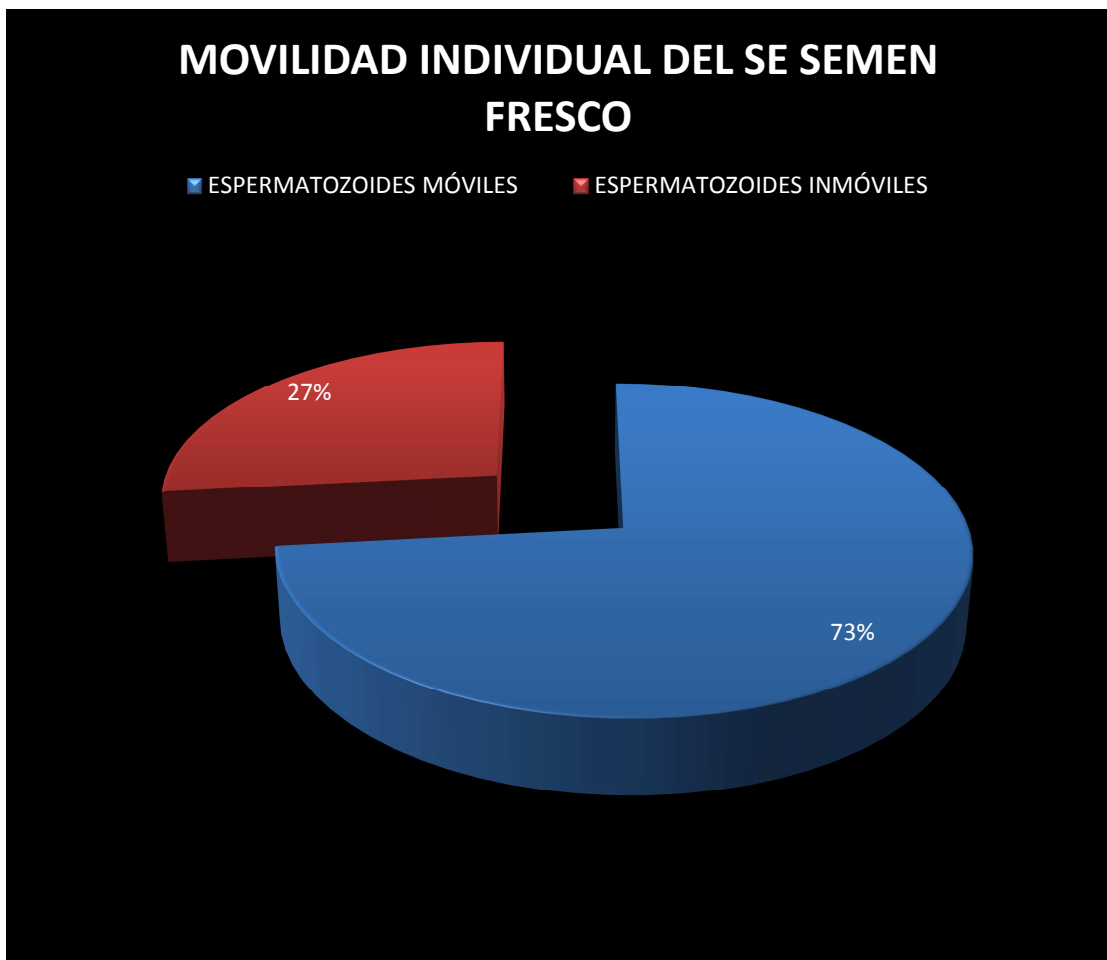
Características en 100 espermatozoides		
Muestras	Móviles	Inmóviles
1	83	17
2	72	28
3	64	36
4	73	27
5	76	24
6	78	22
7	60	40
8	72	28
9	74	26
10	81	19
TOTAL	733	267

Fuente: Directa

Elaborado por: Mayra Mise

En el cuadro número 5 nos indica la movilidad de semen fresco en el cual obtenemos como resultado 733 espermatozoides móviles y 267 muertos de un total de 1.000 espermatozoides que corresponden a 10 muestras.

GRÁFICO 2.- PORCENTAJES DE MOVILIDAD INDIVIDUAL ESPERMÁTICA ANTES DE LA CRIOCONSERVACIÓN.



Fuente: Directa

Elaborado por: Mayra Mise

En el gráfico número 2 se representa el porcentaje de movilidad individual de semen fresco diluido en el cual nos indica un 73 % de espermatozoides móviles y el 27 % de espermatozoides inmóviles.

CUADRO 6.- MORFOLOGÍA DEL SEMEN FRESCO DILUIDO.

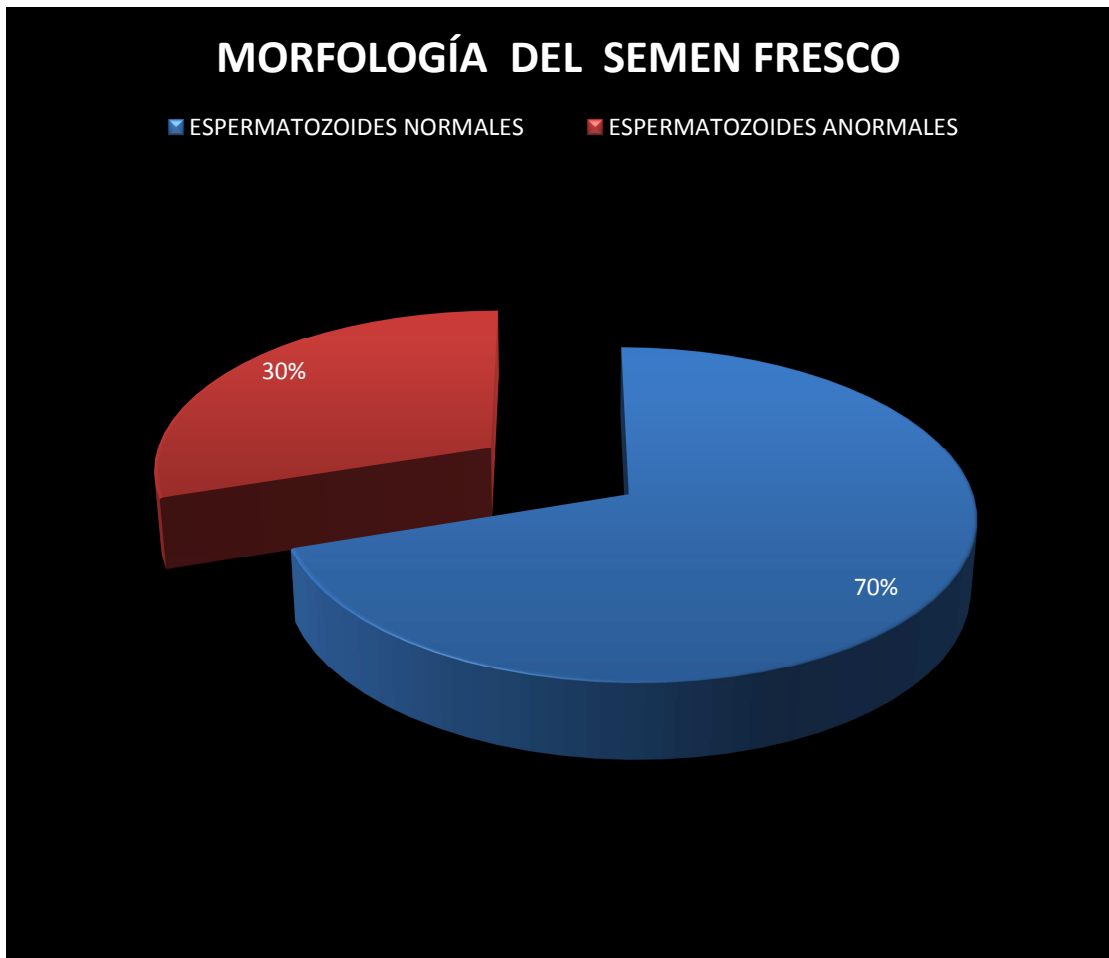
Características en 100 espermatozoides		
Muestras	Normales	Anormales
1	62	38
2	77	23
3	69	31
4	65	35
5	72	28
6	68	32
7	76	24
8	70	30
9	76	24
10	64	36
TOTAL	699	301

Fuente: Directa

Elaborado por: Mayra Mise

En el cuadro número 6 nos indica la morfología de semen fresco en el cual obtenemos como resultado 699 espermatozoides normales y 301 anormales de un total de 1.000 espermatozoides que corresponden a 10 muestras.

GRÁFICO 3.- PORCENTAJE DE MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA ANTES DE LA CRIOCONSERVACIÓN.



Fuente: Directa
Elaborado por: Mayra Mise

El gráfico número 3 representa el porcentaje de morfología de semen fresco el cual nos indica un 70 % de espermatozoides normales y el 30 % de espermatozoides anormales.

CUADRO 7.- VALOR NORMAL DE LA CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA DEL SEMEN DEL CUY.

Muestras	Conteo en cámara de Newbauer	Concentración por muestra.	Concentración por pajuela 0.25
1	262	26,200.000	6,550.000
2	250	25,000.000	6,250.000
3	238	23,800.000	5,950.000
4	265	26,500.000	6,625.000
5	256	25,600.000	6,400.000
6	259	25,900.000	6,475.000
7	262	26,200.000	6,550.000
8	280	28,000.000	7,000.000
9	251	25,100.000	6,275.000
10	263	26,300.000	6,575.000
TOTAL	2.586	258,600.000	64,650.000

Fuente: Directa

Elaborado por: Mayra Mise

En el cuadro número 7 nos indica la concentración de espermatozoides de 10 placas, realizada en la cámara de Newbauer en el conteo obtenemos como resultado 2.586 espermatozoides, también se observa la concentración espermática del total de muestras recolectada que es de 258,600.000/ml y la concentración de espermatozoides por cada pajuela va en un rango de 5,950.000 y 7,000.000.

3.2 EVALUACIÓN DE SEMEN POST-CRIOCONSERVACIÓN.

CUADRO 8.- MORTALIDAD DEL SEMEN DESCONGELADO.

Características en 100 espermatozoides		
Muestras	Vivos	Muertos
1	72	28
2	73	27
3	78	22
4	69	31
5	76	24
6	72	28
7	71	29
8	73	27
9	59	41
10	59	11
TOTAL	702	298

Fuente: Directa
Elaborado por: Mayra Mise

En el cuadro número 8 nos indica la mortalidad de los espermatozoides de una pajueta descongelada en el cual obtenemos como resultado 702 espermatozoides vivos y 298 muertos de un total de 1.000 espermatozoides que corresponden a 10 muestras.

GRÁFICO 4. PORCENTAJE DE MORTALIDAD ESPERMÁTICA POST-CRIOCONSERVACIÓN.



Fuente: Directa

Elaborado por: Mayra Mise

El gráfico número 4 representa el porcentaje de mortalidad de semen descongelado el cual nos indica un 70 % de espermatozoides vivos y 30% de muertos.

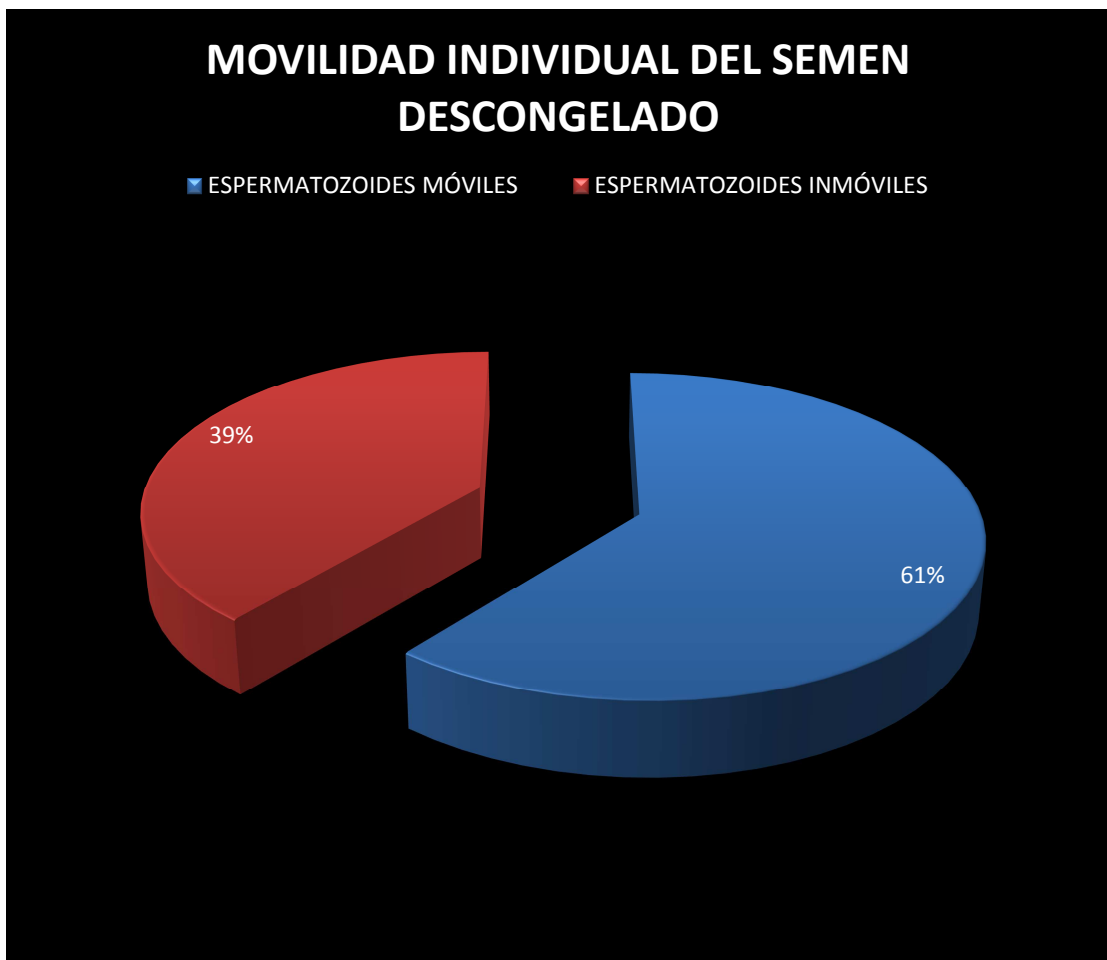
CUADRO 9.- MOVILIDAD INDIVIDUAL DEL SEMEN DESCONGELADO.

Características en 100 espermatozoides		
Muestras	Móviles	Inmóviles
1	68	32
2	63	37
3	65	35
4	54	46
5	66	34
6	65	35
7	67	33
8	69	31
9	45	55
10	46	52
TOTAL	610	390

Fuente: Directa
Elaborado por: Mayra Mise

En el cuadro número 9 nos indica la movilidad de los espermatozoides de una pajueta descongelada en el cual obtenemos como resultado 610 espermatozoides móviles y 390 inmóviles de un total de 1.000 espermatozoides que corresponden a 10 muestras.

GRÁFICO 5.- PORCENTAJES DE MOVILIDAD INDIVIDUAL ESPERMÁTICA POST-CRIOCONSERVACIÓN.



Fuente: Directa

Elaborado por: Mayra Mise

El gráfico número 5 representa el porcentaje de movilidad de semen descongelado el cual nos indica un 61 % de espermatozoides móviles y el 39 % de espermatozoides inmóviles.

CUADRO 10.- MORFOLOGÍA DEL SEMEN DESCONGELADO.

Características en 100 espermatozoides		
Muestras	Normales	Anormales
1	57	43
2	58	42
3	60	40
4	61	39
5	64	36
6	62	38
7	62	38
8	64	36
9	68	32
10	56	44
TOTAL	612	388

Fuente: Directa
Elaborado por: Mayra Mise

En el cuadro número 10 nos indica la movilidad de los espermatozoides de una pajueta descongelada en el cual obtenemos como resultado 612 espermatozoides normales y 388 anormales de un total de 1.000 espermatozoides que corresponden a 10 muestras.

GRÁFICO 6.- PORCENTAJE DE MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA POST-CRIOCONSERVACIÓN.



Fuente: Directa
Elaborado por: Mayra Mise

El gráfico número 6 representa el porcentaje de morfología de semen descongelado el cual nos indica un 61 % de espermatozoides normales y el 39 % de espermatozoides anormales.

CONCLUSIONES.

El protocolo de crioconservación dio como resultado pajuelas con funcionalidad celular, el shock térmico no disminuyó de manera brusca los porcentajes de mortalidad con respecto a los valores obtenidos del semen fresco.

Los parámetros obtenidos de la evaluación del semen fresco diluido son los siguientes: Semen de color blanco lechoso con concentración que varía entre los 23 millones y 28 millones de espermatozoides por ml y un pH de 7, con una mortalidad de 7 %, movilidad de 73 % y una morfología de anormales de 30%.

Los resultados de la evaluación del semen descongelado nos dio los siguientes parámetros: mortalidad 30 %, movilidad de 61 % y una morfología de anormales de 39%.

Las alteraciones identificadas durante el descenso de temperatura son espermatozoides con daños en la cabeza y cola rota.

En esta investigación se determinó valores bajos de gametos móviles antes y después de la crioconservación, se deben al sitio de extracción del semen ya que los espermatozoides no están capacitados, el diluyente utilizado tiene como una de sus propiedades capacitar los espermatozoides por ende el material genético si es viable.

Después de la crioconservación no se presentaron problemas de gran importancia que afecte con la vitalidad del semen.

RECOMENDACIONES

Recomendamos que para poder demostrar el potencial reproductivo de estas muestras se realice una inseminación artificial adecuada a la especie y evaluar los resultados de fertilidad del semen extraído del epidídimo.

Recomendamos realizar diferentes diluciones para obtener mayor número de pajuelas seguido de una evaluación de semen en una inseminación artificial para comprobar la fertilidad de la pajuela.

Se recomienda realizar un programa de mejoramiento genético en cuyes utilizando pajuelas realizadas con los cobayos de la Universidad Técnica de Cotopaxi para así satisfacer las necesidades de los productores de cuyes tanto a nivel local, provincial y nacional.

BIBLIOGRAFÍAS.

1. BARRILLAS, AL. 2005. Efecto de la aplicación de uncilato de boldenona sobre la calidades espermática en bovinos para su utilización como sementales. Tesis Vet. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 42p
2. BARRIOS, A.D. (2002): Evaluación de la calidad y capacidad fecundante de espermatozoides de la cola del epidídimo de toros post-mortem. Memorias del XI Congreso Venezolano de Producción e Industria Animal. Venezuela. pp.1-14.
3. BERMUDEZ, V. 2004. Patología de la reproducción en el semental bovino
4. CASTRO. H. 2002. Sistema de crianza a nivel familiar-comercial en el sector rural. Consultado 20 nov. 2008.
5. CRUZ, Robles M. 2006. Evaluación de diferentes crioprotectores para la crioconservación de espermatozoides de yamú (*Bryconamazonicus*). Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias.
6. CRUZ, H. A.R., Huerta, M., Lugo, R. V. (2009). Conejos guía de producción. 1ª edición. Ed. Papiro omega, SA. De. C.V. México.
7. CUNNINGHAM G. J., Klein G.B. (2009). Fisiología veterinaria 4ª edición. Barcelona España.
8. DEPPE, M., Ortloff, C., Salinas, G., Bravo, D. y Sánchez, R., 2003. Efecto de agentes crioprotectores sobre la preservación del acrosoma. II Reunión Anual

Sociedad de Andrología y Gametología de Chile. IV Jornadas Internacionales de Medicina Reproductiva y Biología de la Reproducción, Temuco, Chile.

9. DEUTSCHER, H. 2002. Aparato reproductor del Toro No.35
10. GALINA, Carlos y Valencia, Javier. 2009. Reproduccion de Animales Domésticos. México : Limusa S.A. , 2009. ISBN: 978-968-18-7132-1.
11. GARCÍA, M. R. (2000). Efecto de los inhibidores de H-ATP asas durante la maduración, capacitación y reacción acrosomal del espermatozoide de conejo. Tesis doctoral. Ciencias Biológicas. México.
12. GILBERT, F. Scott. (2005). Biología del desarrollo. Editorial Médica Panamericana. 7ª ed. México.
13. GUERRERO, H. (2004). Uso de dilutores hipertónicos en la criopreservación de semen ovino. Tesis Facultad de Medicina Veterinaria- Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Perú.
14. HAFEZ, E. S. E. (2002). Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. 7ª ed. McGraw-Hill. México, DF.
15. HAFEZ, E.S.E. y Hafez, B. 2004. Reproducción e inseminación artificial en animales. Mexico : McGraw-Hill Inteamericana, 2004. ISBN: 0-683-30577-8
16. HELLEMAN, C. y Jara, C. (1997). Efecto de un surfactante sobre la integridad de espermatozoides ovinos crioconservados. Archivos de medicina veterinaria. 29,153-160.

17. LASINNO L. Aguilar J. 2002. Reproducción y biotecnología en la equina. Catedra de reproducción equina, departamento de producción animal, facultad de agronomía y veterinaria. Universidad Nacional de Rio Cuarto. Brasil.
18. LAVARA J. y Vicente J. S. 2001. Estado actual de la reproducción en cunicultura. *Lagomorpha*. (113):24-32.
19. LUCIANO C., Salles E. 2002. Manejo reproductivo del conejo de carne: Inseminación artificial. INTA.
20. MACIAS, Z.J.; Magaña, C.A.; Montoya, P.L.A.; Rojas, S.L.; Villalba, S.C. (2003): Evaluación del semen. *Revista Visión Veterinaria*. México.
21. MATAS, C. García-Vázquez, F., Sansegundo, M., Gadea, J., Coy, P., Ruiz, S. 2004 estudio de la capacidad espermática in Vitro en espermatozoides eyaculados y epididimarios. Dpto. Fisiología, facultad de veterinaria, universidad de Murcia.
22. MEJIA, V. O. (2004). Congelación de semen e inseminación artificial en ovinos. Memorias del curso: Congelación de semen e inseminación artificial en ovinos, FMVZ-UMSNH.
23. NAVARRO J., Velasco S., Cruz C. 2004. Evaluación de cinco protectores para la crioconservación de semen de Cachama Blanca (*Piaractusbrachypomus*). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*.
24. NOGUEZ, E. J. 2004. Presencia de la hembra, estación de colección y orden de extracción, en la libido y calidad de semen en conejos. Chapingo, México. Tesis.

25. RICO, Numbela. E; Rivera, Valeria. C. 2003. Manual sobre el manejo de cuyes. 50p
26. 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, 2000; Vol. 10 (6), 458-467
27. SANTIANI, A. (2003). Criopreservación de semen ovino: efecto de la adición de antioxidantes al diluyente. Tesis para obtener el grado de Magíster en Ciencias mención en Biología de la reproducción. Facultad de Medicina-Universidad de la Frontera. Temuco-Chile.
28. STORNELLI. Ma., De La Sota, R. L. 2006. Fertilidad y supervivencia del semen canino criopreservado. Analecta Veterinaria.
29. TORRES, Serrano. C. X., 2002. Manual agropecuario: Tecnologías orgánicas de la granja integral autosuficiente. Col. biblioteca del campo. Tomo II. Edit. IBALPE. Bogotá, Colombia. 451- 480p.
30. TURNER, RG. (2003). Cuentos de la cola: Qué sabemos realmente sobre la motilidad del esperma. J. Androl.
31. VARGAS. S. J. 2002. Inseminación artificial en conejos con 2 dilutores diferentes a temperatura de 18-23°C. UACH Chapingo, México. Tesis.
32. ZAMBRANO R. 2002. Colecta de semen
33. ZÁRATE, H. O. 2002. Utilización de tres diluyentes en la conservación de semen de conejo. UACH Chapingo, México. Tesis.

BIBLIOGRAFÍA INTERNET.

- a) ANDROMED. Diluyente sin yema de huevo para semen bovino. [En línea]. 10 de Noviembre del 2013. Disponible en:
http://www.biotay.com/upfiles/documento_archivo_39_1315541544.pdf.
También disponible en Internet: www.minitube.com.
- b) HOSPITAL UNIVERSITARIO. Virgen de las Nieves. Anomalías múltiples de los espermatozoides. En línea. 13 de Diciembre del 2013. Disponible en:
http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Anomal%C3%ADas+M%C3%BAltiples&lang=2
- c) MEYER Philippe. Los espermatozoides y el semen. En línea. 10 de Diciembre del 2013. Disponible en:
http://www.avizora.com/atajo/secciones/textos/0019_cuide_su_semen.htm
- d) SÁNCHEZ Julio. Embriología Básica. Biblioteca virtual en línea. 18 de Noviembre del 2013. Disponible en:
<http://www.infogranja.com.ar/conejos/genitales%20macho%201224.JPG>
- e) UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID. Espermatogénesis en vertebrados (mamíferos). Biblioteca virtual en línea. 10 de Diciembre del 2013. Disponible en:
http://www.uam.es/departamentos/ciencias/biologia/citologia/Descargas/guion_practica2.pdf

ANEXOS

EVALUACIÓN DE SEMEN ANTES DE LA CRIOCONSERVACIÓN

Fecha de colecta: 28 de octubre 2013

Hora de colecta: 7:30 am

Método de colecta: post- mortem directamente del epidídimo

Especie animal: cuy (Cavia Porcellus)

Muestras	Concentración por ml.	Color	Ph	Espermatozoides Vivos	Espermatozoides Muertos	Espermatozoides Móviles
1	26,200.000	Blanco cremoso	7	95	5	83
2	25,000.000	Blanco cremoso	7	99	1	72
3	23,800.000	Blanco cremoso	7	94	6	64
4	26,500.000	Blanco cremoso	7	92	8	73
5	25,600.000	Blanco cremoso	7	94	6	76
6	25,900.000	Blanco cremoso	7	92	8	78
7	26,200.000	Blanco cremoso	7	85	15	60
8	28,000.000	Blanco cremoso	7	87	13	72
9	25,100.000	Blanco cremoso	7	98	2	74
10	26,300.000	Blanco cremoso	7	91	9	81

EVALUACIÓN DE SEMEN POST-DESCONGELADO

Fecha de descongelación: jueves 7 noviembre 2012

Hora de colecta: 07:00 pm

Especie animal: cuy (Cavia Porcellus)

Pajuela	Espermatozoides Vivos	Espermatozoides Muertos	Espermatozoides Móviles
1	72	28	68
2	73	27	63
3	78	22	65
4	69	31	54
5	76	24	66
6	72	28	65
7	71	29	67
8	73	27	69
9	59	41	45
10	59	11	46

ESPERMIOGRAMA DE SEMEN FRESCO

Muestras	Anormalidades primarias		Anormalidades secundarias			Total Espermatozoides con anormalidades
	Cola enrollada	2 o más colas	Colas dobladas	Cabezas perdidas	Gota citoplasmática	
1	6	12			20	38
2	3	10			10	23
3	2	15			14	31
4	5	18			12	35
5	1	13		2	12	28
6	5	14			13	32
7	3	15			6	24
8	8	12			10	30
9	3	16			5	24
10	12	20			4	36

ESPERMIOGRAMA DEL SEMEN POST-DESCONGELADO

Muestras	Anormalidades primarias		Anormalidades secundarias			Total Espermatozoides con anormalidades
	Cola enrollada	2 o más colas	Colas dobladas	Daños en la cabeza	Gota citoplasmática	
1	5	15	13	5	5	43
2	8	11	14	2	7	42
3	6	12	10	4	8	40
4	5	15	5	2	12	39
5	4	18	2	3	9	36
6	8	13	7	6	4	38
7	4	16	4	3	11	38
8	12	9	5	8	2	36
9	8	12	3	5	4	32
10	9	1	8	11	15	44

TOTAL PROCESAMIENTO DE SEMEN.

<i>MUESTRAS</i>	Numero de pajuelas producidas	Concentración por muestra	Concentración por pajuela 0.25
1	4	26,200.000	6,550.000
2	4	25,000.000	6,250.000
3	4	23,800.000	5,950.000
4	4	26,500.000	6,625.000
5	4	25,600.000	6,400.000
6	4	25,900.000	6,475.000
7	4	26,200.000	6,550.000
8	4	28,000.000	7,000.000
9	4	25,100.000	6,275.000
10	4	26,300.000	6,575.000
TOTAL	40	258,600.000	64,650.000

Foto 1.



Recipiente para testículos.

Foto 2.



Unidades de estudio.

Foto 3.



Colocación de la dilución y caja Petri en la plancha térmica.

Foto 4.



Diseción de la cola del epidídimo.

Foto 5.



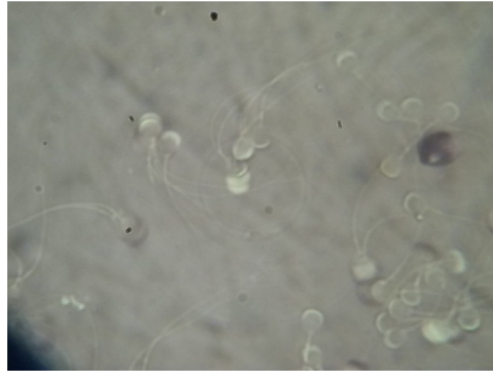
Dissección de la cola del epidídimo.

Foto 6.



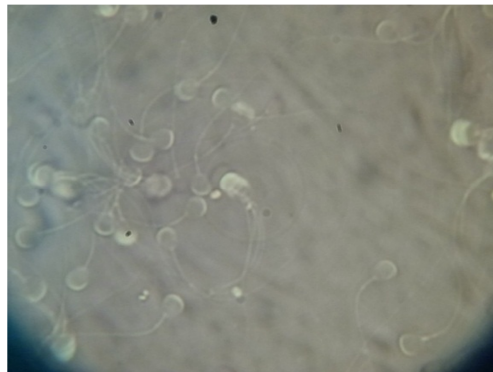
Mantenimiento del semen a temperatura de 32 °C.

Foto 7.



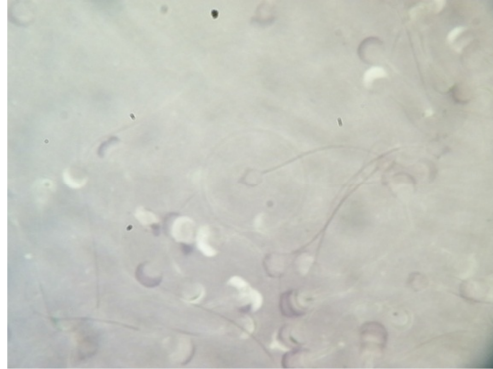
Evaluación de movilidad individual

Foto 8.



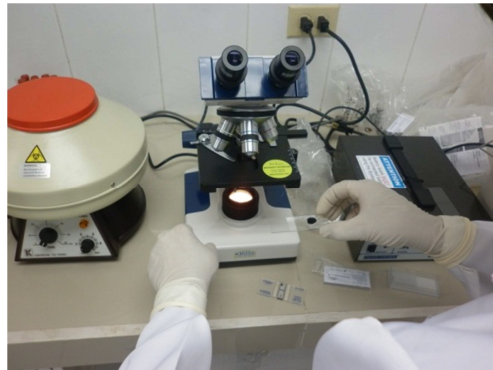
Mortalidad: placa teñida con eosina, los vivos no se colorean.

Foto 9.



Placa con espermatozoides muertos.

Foto 10.



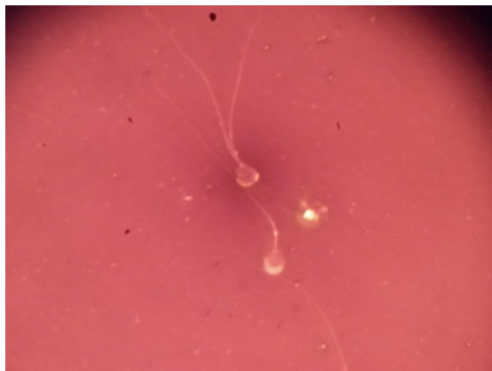
Evaluación Morfología.

Foto 11.



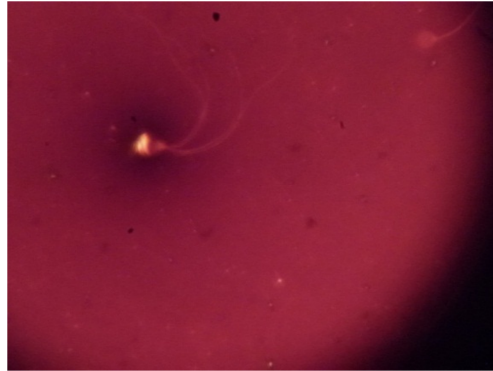
Anatomía del espermatozoide del cuy.

Foto 12.



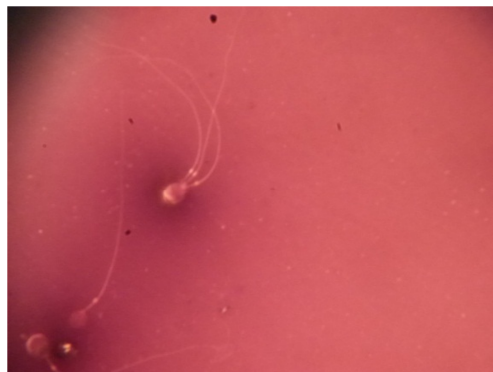
Espermatozoide con 2 colas.

Foto 13.



Espermatozoide con 4 colas.

Foto14.



Espermatozoide con 3 cola y gota citoplasmática.

Foto 15.



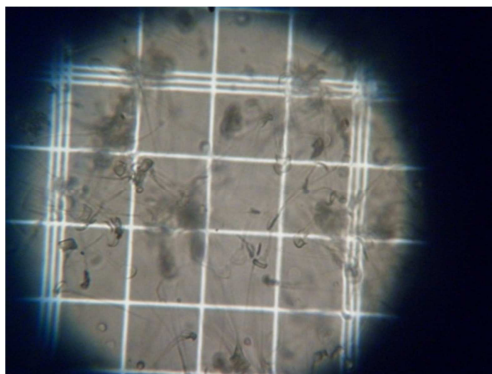
Evaluación de conteo espermático.

Foto 16.



Conteo en cámara de Newbauer.

Foto 17.



Celdillas de la cámara de Newbauer y espermatozoides.

Foto 18.



Llenado de pajillas por absorción.

Foto 19.



El exceso de semen se extrae por micro pipeta.

Foto 20.



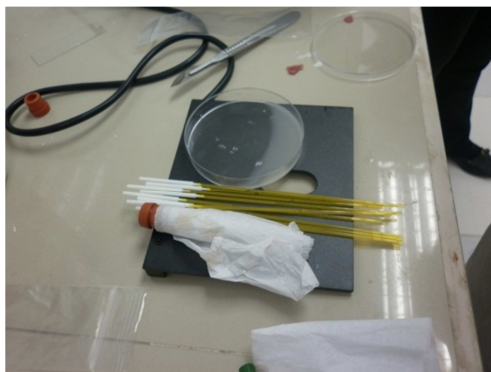
Sellado con tapón de embriones.

Foto 21.



Colocación de la burbuja en la mitad de la pajuela.

Foto 22.



Mantener las pajuelas a 32 grados centígrados.

Foto 23.



Refrigeración de las pajuelas a -4 grados $^{\circ}$.

Foto 24.



Preparación de los vapores de nitrógeno líquido.

Foto 25.



Descendimiento de temperatura de las pajuelas a $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$ con vapores de nitrógeno líquido.

Foto 26.



Monitoreo de la temperatura cada 8 minutos.

Foto 27.



Colocación de las canastillas y pinzas en el nitrógeno líquido junto con las pajuelas para alcanzar la temperatura de $-190\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Foto 28.



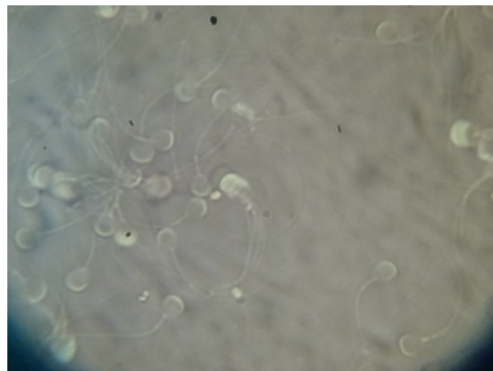
Traslado de las pajuelas a termo de nitrógeno líquido.

Foto 29.



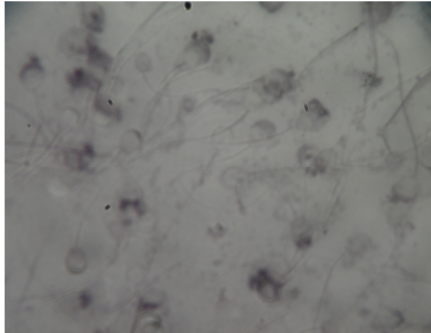
Descongelado de la pajuela y colocar unas gotas de semen en el porta objetos.

Foto 30.



Evaluación de movilidad.

Foto 31.



Evaluación de mortalidad: espermatozoides teñidos con eosina.

Foto 32.



Evaluación morfología: colas dobladas

Foto 33.



Alteraciones en el acrosoma y pérdida de cabeza.