

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



**“COMPARACIÓN DEL EFECTO DE DOS CRIOPRESERVANTES PENETRANTES
DIMETILFORMAMIDA (DMF) Y GLICEROL EN LA CRIOPRESERVACIÓN
ESPERMÁTICA DE SEMEN DE TOROS DE LIDIA PROVENIENTE DE EPIDÍDIMO Y
DE EYACULADO COMPLETO”.**

**"COMPARISON OF THE EFFECT OF TWO PENETRATING CRYOPRESERVANTS
DIMETHYLFORMAMIDE (DMF) AND GLYCEROL ON THE SPERMATIC
CRYOPRESERVATION OF FIGHTING BULLS SEMEN FROM THE EPIDIDYMIS AND
COMPLETE EJACULATE".**

Tesis Presentada Por:
Rodríguez Arenas Jesús Arturo
Para optar el Título Profesional de
Médico Veterinario y Zootecnista

Asesor:
Dr. Reátegui Ordoñez, Juan Eduardo

**AREQUIPA – PERU
2018**



Universidad Católica de Santa María

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

AREQUIPA - PERÚ

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERIAS BIOLÓGICAS Y QUÍMICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DICTAMEN PASE A SUSTENTACIÓN

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

DICTAMINA:

Que el Borrador de tesis titulado:

“COMPARACION DEL EFECTO DE DOS CRIOPRESERVANTES PENETRANTES DIMETILFORMAMIDA (DMF) Y GRICEROL EN LA CRIOPRESERVACION ESPERMATICA DE SEMEN DE TOROS DE LIDIA, PROVENIENTES DE EPIDIDIMO Y DE EYACULADO.”

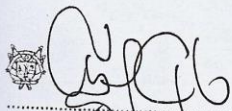
presentado por (la) Sr.(s)(ita):

RODRIGUEZ ARENAS, JESUS ARTURO

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

Asesor: DR. JUAN REATEGUI ORDOÑEZ

Arequipa, 04 de enero del 2018



MGTER. CARLO SANZ LUDEÑA
Director de la Escuela Profesional de
Medicina Veterinaria y Zootecnia

CSL/DEPMVZ
JL



Universidad Católica de Santa María

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

AREQUIPA - PERÚ

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

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DICTAMEN BORRADOR DE TESIS

Señor Magíster

CARLO SANZ LUDEÑA

Director de la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Presente.-

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

““COMPARACION DEL EFECTO DE DOS CRIOPRESERVANTES PENETRANTES
DIMETILFORMAMIDA (DMF) Y GRICEROL EN LA CRIOPRESERVACION
ESPERMATICA DE SEMEN DE TOROS DE LIDIA, PROVENIENTES DE EPIDIDIMO Y
DE EYACULADO.”

presentado por:

RODRIGUEZ ARENAS, JESUS ARTURO

Asesorado (a) por el DR. JUAN REATEGUI ORDOÑEZ

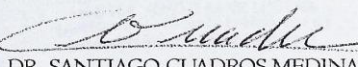
El jurado dictaminador presidido por el DR. SANTIAGO CUADROS MEDINA, e integrado por la vocal MGTER. FERNANDO FERNANDEZ FERNANDEZ y secretario el MGTER. CARLO SANZ LUDEÑA;

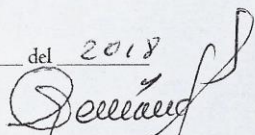
DICTAMINA:

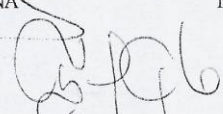
apto para sustentación

OBSERVACIONES

Arequipa, 04 de Enero del 2018


DR. SANTIAGO CUADROS MEDINA
Presidente


MGTER. FERNANDO FERNANDEZ FERNANDEZ
Vocal


MGTER. CARLO SANZ LUDEÑA
Secretario



Universidad Católica de Santa María

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

AREQUIPA - PERÚ

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERIAS BIOLÓGICAS Y QUÍMICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

AMPLIACION DE PLAZO PARA DESARROLLO DE
BORRADOR DE TESIS

Bachiller: RODRIGUEZ ARENAS, JESUS ARTURO;

Visto el Expediente N° 20170000029433, presentado por el señor Bachiller de Medicina Veterinaria y Zootecnia Bachiller: RODRIGUEZ ARENAS, JESUS ARTURO, quien está solicitando la ampliación del plazo para el desarrollo de su Borrador de Tesis, ya que por motivos personales no ha podido cumplir con su trabajo;

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

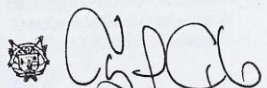
RESUELVE:

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

“COMPARACION DEL EFECTO DE DOS CRIOPRESERVANTES PENETRANTES DIMETILFORMAMIDA (DMF) Y GRICEROL EN LA CRIOPRESERVACION ESPERMATICA DE SEMEN DE TOROS DE LIDIA, PROVENIENTES DE EPIDIDIMO Y DE EYACULADO.”

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

Arequipa, 03 de julio del 2017



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

CSL/DEPMVZ
jl.



Universidad Católica de Santa María

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

AREQUIPA - PERÚ

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

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DICTAMEN DE PLAN DE TESIS

Señor Doctor:

OVIDIO VELASCO VELASQUEZ

Director de la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Presente.-

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

“COMPARACION DEL EFECTO DE DOS CRIOPRESERVANTES PENETRANTES
DIMETILFORMAMIDA (DMF) Y GRICEROL EN LA CRIOPRESERVACION
ESPERMATICA DE SEMEN DE TOROS DE LIDIA, PROVENIENTES DE EPIDIDIMO Y DE
EYACULADO.”

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

RODRIGUEZ ARENAS, JESUS ARTURO

Asesor: DR. JUAN REATEGUI ORDOÑEZ

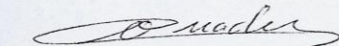
El jurado dictaminador presidido por el DR. SANTIAGO CUADROS MEDINA e integrado por el
MGTER. FERNANDO FERNANDEZ FERNANDEZ y el MGTER. CARLO SANZ LUDEÑA

DICTAMINA:

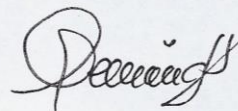
apto para ejecución

OBSERVACIONES

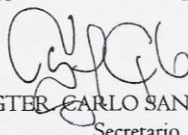
Arequipa, 27 de diciembre de 2016



DR. SANTIAGO CUADROS MEDINA
Presidente



MGTER. FERNANDO FERNANDEZ F.
Vocal



MGTER. CARLO SANZ LUDEÑA
Secretario



Universidad Católica de Santa María

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

AREQUIPA - PERÚ

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

INSCRIPCIÓN PLAN DE TESIS 2016

Bachiller: RODRIGUEZ ARENAS, JESUS ARTURO

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

DICTAMINA:

Autorizar la inscripción del Plan de Tesis titulado

“COMPARACION DEL EFECTO DE DOS CRIOPRESERVANTES PENETRANTES
DIMETILFORMAMIDA (DMF) Y GRICEROL EN LA CRIOPRESERVACION
ESPERMATICA DE SEMEN DE TOROS DE LIDIA, PROVENIENTES DE EPIDIDIMO Y
DE EYACULADO.”

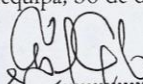
presentado por el (la) Sr.(ita) Alumno(a) de la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia;

RODRIGUEZ ARENAS, JESUS ARTURO

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

ASESOR: DR. JUAN REATEGUI ORDOÑEZ

Arequipa, 30 de diciembre del 2016


.....
DR. ÓVIDIO VELASCO VELASQUEZ
Director de la Escuela Profesional de
Medicina Veterinaria y Zootecnista

OVV/DEPMVZ

Jl.

DEDICATORIA

Dedico mi tesis principalmente a Dios, por darme la vida y permitirme llegar hasta este momento tan trascendental de mi formación profesional.

Igualmente, dedico este trabajo a mis padres que han sabido formarme con buenos sentimientos, hábitos y valores, los cuales me han servido para afrontar los momentos más difíciles.

A mi Hermana que constantemente ha estado a mí lado brindándome su apoyo, poniéndose muchas veces en el rol de madre.

A mi Hermano, que con su apoyo y consejos me han servido para afrontar día a día los retos que se presentaron en mi camino.

A ti Meme que cuando mi madre no estaba presente, tú fuiste quien llevo a cabo los trabajos de ella. Puedo decir enteramente que eres a más de mi abuela, mi segunda madre, y los valores y contribuciones que has formado para mi vida como persona son simplemente invaluable.

Gracias a todas las personas que ayudaron en la ejecución de este proyecto.

AGRADECIMIENTOS

Mi gratitud se dirige primero a quien ha formado mi camino y me ha encaminado por la senda correcta, a Dios, el que en todo instante está conmigo apoyándome aprendiendo de mis errores y a no cometerlos otra vez. Eres quien guía mi camino.

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

Agradecer hoy y siempre a mi familia que siempre han procurado mi bienestar y que si no fuese por el esfuerzo realizado por ellos, mis estudios no hubiesen sido posibles; a mi Papá, que con sus consejos ha ayudado a superar cada obstáculo que se me presentaba; a mi Mamá, por su apoyo y cariño y a mis hermanos por apoyarme en los momentos de debilidad en la elaboración de la tesis.

Agradezco de igual forma a mi Asesor de Tesis Dr. Cs. MVZ Juan Eduardo Reátegui Ordoñez por brindarme la oportunidad de acudir a su capacidad y conocimiento científico, asimismo haberme tenido la paciencia para guiarme durante todo la ejecución de la tesis.

Al Dr. Víctor Pacheco Sánchez, por su apoyo, ofrecimiento y asesoramiento. La generosidad y amabilidad demostrada en cada momento ha sido un gran apoyo durante todo el tiempo dedicado a su realización.

A mi amiga y compañera de estudios Ximena Barriga Marcapura, por tu valiosa amistad y compañerismo, gracias por el apoyo que me brindaste en todo el transcurso de la tesis. Con nuestra frase “vivimos al límite, tú tranquilo”

A los miembros del jurado, Dr. Cs. MVZ Santiago Cuadros Medina, M. Sc. MV Fernando Fernández Fernández y Mg. MVZ Carlos Sanz Ludeña por la revisión del trabajo y sus aportaciones para el mejoramiento de esta investigación.

INDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	
ABSTRACT	
INTRODUCCION	
CAPITULO I	
1.1.- Enunciado del problema	21
1.2.- Descripción del problema	21
1.3.- Justificación del problema	22
1.3.1.- Aspecto general.....	22
1.3.2.- Aspecto tecnológico.....	22
1.3.3.- Aspecto social	22
1.3.4.- Aspecto económico.....	23
1.3.5.- Importancia del trabajo	23
1.4.- Objetivos.....	24
1.4.1.- Objetivo general.....	24
1.4.2.- Objetivos específicos	24
1.5.- Planteamiento de la hipótesis.....	24
CAPITULO II	
II.MARCO TEÓRICO O CONCEPTUAL.....	25
2.1.- Análisis bibliográfico.....	25
2.1.1.- Material principal.....	25
2.2.- Antecedentes de investigación.....	51
2.2.1.- Revisiones de tesis universitarias.....	51
2.2.2.- Otros trabajos de investigación.....	53
CAPITULO III	
III.MATERIALES Y MÉTODOS	56
3.1.- Materiales.....	56
3.1.1.- Localización del trabajo.....	56
3.1.2.- Materiales biológicos	56
3.1.3.- Material de laboratorio.....	56
3.1.4.- Material de campo.....	57
3.1.5.- Equipo y maquinaria	58
3.1.6.- Otros materiales	58
3.2.- Métodos	58
3.2.1.- Muestreo.-	58
3.2.2.- Métodos de evaluación	59

3.2.3.- Variables de respuesta..... 65

CAPITULO IV

IV.RESULTADOS	Y	DISCUSIONES
.....		67
CONCLUSIONES		87
RECOMENDACIONES		89
BIBLIOGRAFIA.....		90
ANEXOS.....		95



INDICE DE FIGURAS

FIGURA N° 01

MAPA EN DONDE SE UBICA GEOGRAFICAMENTE EL DISTRITO DE YURA DENTRO
DEL DEPARTAMENTO DE AREQUIPA 101

FIGURA N° 02

MAPA A ESCALA DEL DISTRITO DE YURA DEPARTAMENTO DE AREQUIPA 101



INDICE DE CUADROS

CUADRO N° 01	
ENVOLTURAS DEL TESTÍCULO.....	26
CUADRO N° 02	
APARATO REPRODUCTOR DEL MACHO, PARTES Y FUNCIONES	38
CUADRO N° 03	
CALIFICACIÓN DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA	50
CUADRO N° 04	
CALIFICACIÓN DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA	64
CUADRO N° 05	
OPERALIZACIÓN DE VARIABLES.....	66
CUADRO N° 06	
MOTILIDAD 0H ESPERMATICA CON EL CRIOPRESERVANTE GLICEROL Y DIMETILFORMAMIDA EN SEMEN OBTENIDO DEL EYACULADO COMPLETO	67
CUADRO N° 07	
MOTILIDAD 2H ESPERMATICA CON EL CRIOPRESERVANTE GLICEROL Y DIMETILFORMAMIDA EN SEMEN OBTENIDO DEL EYACULADO COMPLETO	69
CUADRO N° 08	
VIABILIDAD ESPERMATICA CON EL CRIOPRESERVANTE GLICEROL Y DIMETILFORMAMIDA EN SEMEN OBTENIDO DEL EYACULADO COMPLETO	70
CUADRO N°. 09	
MEMBRANA PLASMÁTICA ESPERMATICA CON EL CRIOPRESERVANTE GLICEROL Y DIMETILFORMAMIDA EN SEMEN OBTENIDO DEL EYACULADO COMPLETO	72
CUADRO N°. 10	
CABEZA ESPERMATICA CON EL CRIOPRESERVANTE GLICEROL Y DIMETILFORMAMIDA EN SEMEN OBTENIDO DEL EYACULADO COMPLETO	74
CUADRO N° 11	
ACROSOMA ESPERMATICA CON EL CRIOPRESERVANTE GLICEROL Y DIMETILFORMAMIDA EN SEMEN OBTENIDO DEL EYACULADO COMPLETO	76
CUADRO N° 12	
COLA ESPERMATICA CON EL CRIOPRESERVANTE GLICEROL Y DIMETILFORMAMIDA EN SEMEN OBTENIDO DEL EYACULADO COMPLETO	78
CUADRO N° 13	
MOTILIDAD 0H ESPERMATICA CON EL CRIOPRESERVANTE GLICEROL Y DIMETILFORMAMIDA EN SEMEN OBTENIDO DE LA EPIDÍDIMO.....	80
CUADRO N° 14	
MOTILIDAD 2H ESPERMATICA CON EL CRIOPRESERVANTE GLICEROL Y DIMETILFORMAMIDA EN SEMEN OBTENIDO DEL EPIDÍDIMO	82
CUADRO N°. 15	
VIABILIDAD ESPERMATICA CON EL CRIOPRESERVANTE GLICEROL Y DIMETILFORMAMOTILIDADMIDA EN SEMEN OBTENIDO DEL EPIDÍDIMO	83

CUADRO N° 16	
MEMBRANA PLASMÁTICA ESPERMÁTICA CON EL CRIOPRESERVANTE GLICEROL Y DIMETILFORMAMIDA EN SEMEN OBTENIDO DEL EPIDÍDIMO.....	85
CUADRO N° 17	
DATOS DE COLECCIÓN Y EVALUACIÓN DE SEMEN FRESCO MEDIANTE ELECTROEYACULACIÓN TORO 1.....	97
CUADRO N° 18	
DATOS DE COLECCIÓN Y EVALUACIÓN DE SEMEN FRESCO MEDIANTE ELECTROEYACULACIÓN TORO 2.....	97
CUADRO N° 19	
DATOS DE COLECCIÓN Y EVALUACIÓN DE SEMEN FRESCO MEDIANTE ELECTROEYACULACIÓN TORO 3.....	98
CUADRO N° 20	
DATOS DE COLECCIÓN Y EVALUACIÓN DE SEMEN FRESCO MEDIANTE ELECTROEYACULACIÓN TORO 4.....	98
CUADRO N° 21	
DATOS DE COLECCIÓN Y EVALUACIÓN DE SEMEN FRESCO MEDIANTE ELECTROEYACULACIÓN TORO 5.....	99
CUADRO N° 22	
RESULTADOS DE COLECTA POR ELECTROEYACULACION TORO IMPERIO.....	103
CUADRO N° 23	
RESULTADO DE COLECTA POR ELECTROEYACULACION TORO TALENTOSO.....	103
CUADRO N° 24	
RESULTADOS DE COLECTA POR ELECTROEYACULACION TORO FRANCISCANO.....	104
CUADRO N° 25	
RESULTADOS DE COLECTA POR ELECTROEYACULACION TORO FULERO.....	104
CUADRO N° 26	
RESULTADOS DE COLECTA POR ELECTROEYACULACION TORO EMPERADOR.....	105
CUADRO N° 27	
RESULTADOS DE COLECTA A PARTIR DE LA COLA DEL EPIDIDIMO TORO 1.....	105
CUADRO N° 28	
RESULTADOS DE COLECTA A PARTIR DE LA COLA DEL EPIDIDIMO TORO 2.....	106
CUADRO N° 29	
RESULTADOS DE COLECTA A PARTIR DE LA COLA DEL EPIDIDIMO TORO 3.....	106
CUADRO N° 30	
RESULTADOS DE COLECTA A PARTIR DE LA COLA DEL EPIDIDIMO TORO 4.....	107
CUADRO N° 31	
RESULTADOS DE COLECTA A PARTIR DE LA COLA DEL EPIDIDIMO TORO 5.....	107

INDICE DE GRÁFICOS

GRAFICO N° 01	
MOTILIDAD 0H ESPERMATICA CON EL CRIOPRESERVANTE GLICEROL Y DIMETILFORMAMIDA EN SEMEN OBTENIDO DEL EYACULADO COMPLETO	68
GRÁFICO N° 02	
MOTILIDAD 2H ESPERMATICA CON EL CRIOPRESERVANTE GLICEROL Y DIMETILFORMAMIDA EN SEMEN OBTENIDO DEL EYACULADO COMPLETO	69
GRÁFICO N° 03	
VIABILIDAD ESPERMATICA CON EL CRIOPRESERVANTE GLICEROL Y DIMETILFORMAMIDA EN SEMEN OBTENIDO DEL EYACULADO COMPLETO	71
GRÁFICO N° 4	
MEMBRANA PLASMÁTICA ESPERMATICA CON EL CRIOPRESERVANTE GLICEROL Y DIMETILFORMAMIDA EN SEMEN OBTENIDO DEL EYACULADO COMPLETO	73
GRÁFICO N° 05	
CABEZA ESPERMATICA CON EL CRIOPRESERVANTE GLICEROL Y DIMETILFORMAMIDA EN SEMEN OBTENIDO DEL EYACULADO COMPLETO	75
GRAFICO N° 06	
ACROSOMA ESPERMATICA CON EL CRIOPRESERVANTE GLICEROL Y DIMETILFORMAMIDA EN SEMEN OBTENIDO DEL EYACULADO COMPLETO	77
GRÁFICO N° 07	
COLA ESPERMATICA CON EL CRIOPRESERVANTE GLICEROL Y DIMETILFORMAMIDA EN SEMEN OBTENIDO DEL EYACULADO COMPLETO.....	79
GRÁFICO N° 08	
MOTILIDAD 0H ESPERMATICA CON EL CRIOPRESERVANTE GLICEROL Y DIMETILFORMAMIDA EN SEMEN OBTENIDO DE LA EPIDÍDIMO	81
GRÁFICO N° 09	
MOTILIDAD 2H ESPERMATICA CON EL CRIOPRESERVANTE GLICEROL Y DIMETILFORMAMIDA EN SEMEN OBTENIDO DEL EPIDÍDIMO	82
GRAFICO N° 10	
VIABILIDAD ESPERMATICA CON EL CRIOPRESERVANTE GLICEROL Y DIMETILFORMAMIDA EN SEMEN OBTENIDO DEL EPIDÍDIMO	84
GRÁFICO N°. 11	
MEMBRANA PLASMÁTICA ESPERMATICA CON EL CRIOPRESERVANTE GLICEROL Y DIMETILFORMAMIDA EN SEMEN OBTENIDO DEL EPIDÍDIMO	86

INDICE DE FOTOS

FOTO N° 01: Plato térmico para mantener la temperatura de los equipos.....	123
FOTO N° 02: Microscopio óptico con un contador de células para la evaluación espermática. ...	123
FOTO N° 03: Microscopio de contraste de fase con platina termina la que nos ayuda a mantener una temperatura adecuada para la evaluación de las muestras.....	123
FOTO N° 04: Micro pipetas con sus respectivos tips para poder trabajar las muestras en laboratorio.....	124
FOTO N° 05: Baño maria para amntener la temperatura de las distintas solucones con las que se trabajo.....	124
FOTO N° 06: Portaobjetos y cubreobjetos donde se realiza la evaluación de las muestras.	124
FOTO N° 07: Cámara de Neubauer donde se realiza la concentración de las muestras.....	125
FOTO N° 08: Evaluando las muestras obtenidas por electroeyaculación y a partir de la cola del epidídimo.....	125
FOTO N° 09: Fondo donde se realizó la colecta mediante electroeyaculación.	125
FOTO N° 10: Electrodos del equipo de electroeyaculación que fueron introducidos en el recto del animal.	126
FOTO N° 11: Manga donde se procedió al realizar la toma de muestras.	126
FOTO N° 12: Equipo de electroeyaculación que se utilizó para las colectas en campo.....	126
FOTO N° 13: Una vez puesto el animal en la manga se procede a realizar la limpieza del recto y a introducir los electrodos.....	127
FOTO N° 14: Una vez introducido los electrodos en el recto del animal se procede a realizar los impulsos eléctricos.....	127
FOTO N° 15: Dado los impulsos necesarios para que el animal eyacule se realiza la colecta con la ayuda de un cono colector.....	127
FOTO N° 16: Cono colector con la muestra obtenida después de la estimulación necesaria para que el toro eyacule.	128
FOTO N° 17: Muestra obtenida mediante electroeyaculación.	128
FOTO N° 18: Muestra obtenida mediante electroeyaculación puesta bajo un fondo blanco para poder observar su aspecto.	128
FOTO N° 19: Dilución del semen fresco previa evaluación con su respectivo Dilutor evitando que le caigan los rayos del sol.....	129
FOTO N° 20: Identificación de las pajillas, en cada pajilla va el nombre del toro la fecha de enpajillado y el nombre del propietario.....	129
FOTO N° 21: Una vez realizado el llenado de las pajillas se realiza la vaporización de las mismas y luego se coloca en el tanque de almacenamiento.	129

FOTO N° 22: Toros en pie de los cuales se obtendrán las muestras, animales aislados debido a la bravura de los mismos.	130
FOTO N° 23: Toros de lidia recién faenados listos para la extracción de los testículos, se recomiendo no tirarles agua para mejorar los resultados del procedimiento.	130
FOTO N° 24: Extrayendo los testículos con su bolsa escrotal para su respectiva evaluación.....	130
FOTO N° 25: Testículos sacados de la caja térmica y lavados con solución fisiológica para retirar cualquier suciedad que nos afecte la evaluación de las muestras.....	131
FOTO N° 26: Se procede al retiro de las capas que envuelven a los testiculos para poder trabajar teniendo en cuenta y manteniendo la temperatura de los testiculos de 37 grados centigrados.	131
FOTO N° 27: Limpiado el testículo se identifica las partes anatómicas del testículo para realizar el procedimiento y retiro de espermatozoides de la cola del epidídimo.	131
FOTO N° 28: Identificada la cola del epidídimo se procedió a la colecta de espermatozoides mediante la técnica de flujo retrogrado.	132
FOTO N° 29: Realizada la técnica se coloca el contenido en una placa Petri para su posterior evaluación.	132
FOTO N° 30: Evaluación de las muestras de viabilidad con eosina – negrosina.	132
FOTO N° 31: Evaluando viabilidad de las muestras con reactivo eosina- negrosina.....	133
FOTO N° 32: Evaluación de la membrana plasmática.	133
FOTO N° 33: Evaluación de morfología de los espermatozoides encontrando algunas malformaciones (gota citoplasmática)	133
FOTO N° 34: Evaluación morfología de los espermatozoides encontrando algunas malformaciones en la cabeza (microcefalia).....	134
FOTO N° 35: Evaluación morfológica de los espermatozoides encontrando malformaciones en la cola (cola enrollada).	134
FOTO N° 36: Evaluación morfología de los espermatozoides (cola enrollada).	134

INDICE DE ANEXOS

ANEXO 01	
MATRIZ DE SISTEMATIZACION	96
ANEXO 02	
MAPAS O CROQUIS DE UBICACIÓN	100
ANEXO 03	
MATRIZ DE RESULTADOS	102
ANEXO 04	
PROCEDIMIENTOS DE OPERACIÓN ESTANDAR (POEs) Y OTROS	108
ANEXO 05	
SECUENCIA FOTOGRAFICA	122
ANEXO 06	
CONSTANCIAS	12230



RESUMEN

Con el objetivo de evaluar los efectos de dos criopreservantes penetrantes: glicerol y dimetilformamida sobre las características del semen criopreservado de toros de lidia obtenidas de epidídimo y de eyaculado completo, se recolectaron 5 muestra de semen mediante la técnica de electroeyaculación y 5 muestras de semen de cola del epidídimo. La extracción del semen por electroeyaculación se realizó utilizando la técnica de Palmer⁴⁵. El semen de la cola del epidídimo fue colectado con la técnica de flujo retrógrado⁴⁹. Las muestras fueron analizadas por motilidad, concentración, integridad estructural y funcional de la membrana plasmática (prueba hipo osmótica) y viabilidad espermática (coloración con eosina/nigrosina). Obteniendo los siguientes resultados a partir del semen del eyaculado completo: Motilidad a las 0 horas con glicerol 3,8 y con dimetilformamida 2,52 según la escala³⁸; Motilidad a las 2 horas con glicerol 1,8 y con dimetilformamida 0,68 según la escala³⁸, Viabilidad 45,22% y 33,70%; Integridad membrana plasmática 43,30% y 32,76%; Anormalidades de cabeza 5,04% y 7,56%; Anormalidades del Acrosoma 5,32% y 6,64% y Anormalidades de la cola 6,20% y 9,68% para glicerol y dimetilformamida respectivamente. A partir del semen de la cola del epidídimo: Motilidad a las 0 h 2,64 horas y 1,36; Motilidad a las 2 horas 0,80 y 0,40 según la escala³⁸; Viabilidad 50,20% y 25,08%; integridad de membrana plasmática 47,96% y 22,16% Anormalidades de cabeza 8,60% y 8,36%; Anormalidades del Acrosoma 8,76% y 8,68% y Anormalidades de la cola 9,08% y 8,96% para glicerol y dimetilformamida respectivamente. Llegando a las siguientes conclusiones: La motilidad, morfología y la funcionalidad de membrana espermática con el criopreservante glicerol y Dimetilformamida presentan diferencia estadística significativa ($p < 0,05$), presentando mejores valores de calidad seminal en semen criopreservado con glicerol. En tanto, los indicadores de calidad seminal de semen colectado de cola de epidídimo y por electroeyaculación presentan diferencia estadística significativa ($p < 0,05$), presentando mejores valores de calidad seminal en semen colectado por electroeyaculación o eyaculado completo.

Palabras claves: Criopreservantes, Toros de lidia, Epidídimo, Eyaculado completo.

ABSTRACT

In order to evaluate the effects of two penetrating cryopreservants: Glycerol and dimethylformamide on the characteristics of cryopreserved semen from fighting bulls obtained from epididymis and complete ejaculate, five samples of semen were collected by the technique of electroejaculation and five samples of epididymal tail semen. The extraction of the semen by electroejaculation technique was performed using the Palmer technique⁴⁵. The epididymal tail semen was collected by the retrograde flow technique. The samples were analyzed by motility, concentration, structural and functional integrity of the plasma membrane (osmotic hypo test) and sperm viability (coloration with eosin / nigrosin). Obtaining the following results from the semen of the complete ejaculate: Motility at 0 hours with glycerol 3,8 and with dimethylformamide 2,52 according to the scale³⁸, Motility at 2 hours with glycerol 1,8 and with dimethylformamide 0,68 according to the scale³⁸, Viability 45,22% and 33,70%; Integrity of the plasma membrane 43,30% and 32,76%; head abnormalities 5,04% and 7,56%; Acrosome abnormalities 5,32% and 6,64% and tail abnormalities 6,20% and 9,68% for glycerol and dimethylformamide respectively. From semen of the tail of the epididymis: Motility at 0 hours with glycerol 2,64 and 1,36; Motility at 2 hours 0,80 and 0,40 according to the scale³⁸; Viability 50,20% and 25,08%; Integrity of the plasma membrane 47,96% and 22,16%; head abnormalities 8,60% and 8,36%; Acrosome abnormalities 8,76% and 8,68% and tail abnormalities 9,08% and 8,96% for glycerol and dimethylformamide respectively. Getting the following conclusions: The motility, morphology and the functionality of the sperm membrane with the cryopreservant glycerol and dimethylformamide present significant statistical difference ($p < 0,05$), presenting better seminal quality values in semen cryopreserved with glycerol. Whereas the semen quality indicators collected from epididymal tail and by electroejaculation present significant statistical difference ($p < 0,05$), presenting better seminal quality values the semen collected by electroejaculation or complete ejaculate.

Key words: Cryopreservants, Fighting bulls, Epididymis, Complete ejaculate.

INTRODUCCION

La criopreservación tiene como objetivo el mantenimiento de la viabilidad y funcionabilidad celular a temperaturas bajas. La criobiología se refiere a entender los efectos de las temperaturas bajas sobre los sistemas celulares ya que el tiempo biológico es una consecuencia de determinadas reacciones bioquímicas y el frío prolonga el tiempo biológico puesto que enlentece estas reacciones. Sin embargo, este no es un proceso exento de problemas ya que puede inducir variaciones extremas en las propiedades químicas, térmicas y eléctricas las cuales pueden alterar las membranas celulares, los organelos y la delicada interacción célula-célula inherente en las células y tejidos a criopreservar⁵⁵. La estructura y composición de las membranas plasmáticas determinan los principales eventos celulares que tienen lugar durante los procesos de criopreservación, su comportamiento durante la congelación y descongelación definirá los índices de supervivencia de la célula congelada. Los periodos críticos para la sobrevivencia celular durante la criopreservación son la fase inicial del congelamiento y el periodo de retorno a condiciones fisiológicas⁵⁷, por otro lado la recolección de semen de toros por métodos convencionales, como la vagina artificial y el electroeyaculador, ha permitido el establecimiento de bancos de germoplasma provenientes de machos reproductores seleccionados. No obstante, es importante establecer un método que permita recolectar espermatozoides de toros élites que hayan muerto repentinamente, de manera tal de poder obtener descendencia de esos toros, mediante la inseminación artificial o la fertilización in vitro. Se podría implementar la recolección de espermatozoides de la cola del epidídimo para propagar la calidad genética de toros postmortem, puesto que los espermatozoides que se encuentran allí, según se ha reportado Chung⁵⁸ y Reyes-Moreno et al⁵⁹, tienen capacidad fertilizante. El epidídimo tiene fundamentalmente dos funciones: la maduración y el almacenamiento espermático^{60, 61}. La maduración, o desarrollo progresivo de la capacidad fertilizante de los espermatozoides, ocurre en la cabeza y el cuerpo del epidídimo, y el almacenamiento ocurre en la cola del mismo⁶². Con esta consideración, es importante señalar que se podrían obtener espermatozoides viables provenientes de la cola del epidídimo con movilidad y capacidad fertilizante, poco tiempo después de la muerte del animal, los cuales podrían ser procesados y congelados para su posterior uso en inseminación artificial, razones suficientes por la cual se presentó dicha investigación.

CAPITULO I

1.1.- Enunciado del problema

Comparación del efecto de dos criopreservantes penetrantes dimetilformamida (DMF) y glicerol en la criopreservación espermática de semen de toros de lidia proveniente de epidídimo y de eyaculado completo.

1.2.- Descripción del problema

Los criopreservantes son sustancias hidrosolubles y de baja toxicidad, que disminuyen el punto eutéctico de una solución dada, (punto en el cual una composición dada de A y B solidifica como un elemento puro), el descenso del punto eutéctico implica que se alcanzará una concentración dada de solutos a una temperatura menor, de forma que la célula estará más deshidratada y el gradiente osmótico al que estará sometido será menor³⁶.

Bioquímicamente es posible distinguir tres tipos de criopreservantes, los alcoholes (metanol, etanol, propanol, 1-2 propanediol y glicerol) azúcares (glucosa, lactosa, sucrosa) y el dimetil sulfoxido, los criopreservantes pueden clasificarse también en agentes penetrantes y no penetrantes de acuerdo a la permeabilidad celular¹⁰.

Es necesario encontrar los criopreservantes que mejor se adapten al proceso de criopreservación de semen de eyaculado completo y semen de cola de epidídimo que mantenga las características seminales de motilidad, concentración, integridad estructural y funcional de la membrana plasmática (prueba hipo osmótica) y viabilidad espermática (coloración eosina/nigrosina), durante el proceso de criopreservación - conservación. Por lo anteriormente mencionado se comparó el efecto de dos criopreservantes penetrantes dimetilformamida y glicerol en la criopreservación espermática de semen de toro de lidia proveniente de epidídimo y de eyaculado completo.

1.3.- Justificación del problema

1.3.1.- Aspecto general

Entender y aplicar adecuadamente la criopreservación de semen para implementar protocolos de criopreservación ideales al toro de lidia y las condiciones de manejo de nuestra región son indispensables para la aplicación de biotecnologías de la reproducción. Asimismo, es importante y necesario, dar a conocer parámetros esenciales al proceso de criopreservación y la importancia de conocer ciertas características del gameto masculino del bovino de lidia que puedan incidir con la viabilidad durante el proceso de congelación y repercutan en la fertilidad de la vaca, entre otros los criopreservantes.

1.3.2.- Aspecto tecnológico

La criopreservación tiene como objetivo el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad celular a temperaturas bajas, La criobiología se refiere a entender los efectos de las temperaturas bajas sobre los sistemas celulares ya que el tiempo biológico es una consecuencia de determinadas reacciones bioquímicas y el frío prolonga el tiempo biológico puesto que enlentece estas reacciones. Sin embargo este no es un proceso exento de problemas ya que puede inducir variaciones extremas en las propiedades químicas, térmicas y eléctricas las cuales pueden alterar las membranas celulares, los gametos y la delicada interacción célula-célula inherente en las células y tejidos a criopreservar⁵⁵, donde el criopreservante juega un rol vital en la preservación del espermatozoide.

1.3.3.- Aspecto social

El entender y aplicar adecuadamente la criopreservación y el uso de crioprotectores en espermatozoides es fundamental para los centros de criopreservación, los laboratorios de cultivo celular y la aplicación del semen criopreservado en los sistemas de producción animal por lo cual es necesario contrastar el uso de diferentes criopreservantes prestando especial atención a la conservación del gameto y su posterior aplicación en la inseminación artificial, llegando a evaluar los resultados a nivel de fertilidad de la vaca para uso masivo en los sistemas de producción de leche.

1.3.4.- Aspecto económico

Los resultados de la presente investigación permitieron reducir costos de manejo de reproductores machos de linaje de toros de lidia en los criadores, elevando su competitividad con el uso de biotecnologías reproductivas para la preservación de material genético de alto valor; asimismo la validación en tiempo real de una técnica de colección, evaluación seminal y criopreservación permitirá tanto al ganadero y consultor definir si se debe o no aplicar alguna biotecnología reproductivas en el manejo del toros de lidia como es Inseminación Artificial o Inseminación Artificial a Tiempo Fijo.

1.3.5.- Importancia del trabajo

La criopreservación de semen es una importante biotecnología reproductiva, que busca promover la conservación del germoplasma masculino por tiempo indeterminado. Esta biotecnología, cuando se asocia a la inseminación artificial (IA), representa un mecanismo eficiente para la promoción y difusión de material genético de excelente calidad. La criopreservación de semen permite la perpetuación de material genético y proporciona una economía para el productor al reducir los costos de alimentación y transporte de los reproductores, así como los riesgos de transmisión de enfermedades sexualmente transmisibles y el poder conservar germoplasma masculino⁵⁶.

Es ineludible hallar el criopreservante que mejor se adapte al proceso de criopreservación de semen de eyaculado completo y semen de cola de epidídimo para la preservación del gamento masculino y aquel que mantenga durante el proceso de criopreservación las características seminales de motilidad, concentración, integridad estructural y funcional de la membrana plasmática (prueba hipo osmótica) y viabilidad espermática (coloración con eosina/nigrosina).

1.4.- Objetivos

1.4.1.- Objetivo general

Evaluar los efectos de dos criopreservantes penetrantes: glicerol y dimetilformamida sobre las características del semen criopreservado de toros de lidia obtenidas de epidídimo y de eyaculado completo.

1.4.2.- Objetivos específicos

- Determinar la motilidad, morfología y funcionalidad espermática con el criopreservante glicerol en semen obtenido en eyaculado completo.
- Determinar la motilidad, morfología y funcionalidad espermática con el criopreservante dimetilformamida en semen obtenido en eyaculado completo.
- Determinar la motilidad, morfología y funcionalidad espermática con el criopreservante glicerol en semen obtenido del epidídimo.
- Determinar la motilidad, morfología y funcionalidad espermática con el criopreservante dimetilformamida en semen obtenido del epidídimo.
- Comparar la calidad seminal de semen criopreservado con glicerol y dimetilformamida sobre semen recolectado del eyaculado completo.
- Comparar la calidad seminal de semen criopreservado con glicerol y dimetilformamida sobre semen recolectado del epidídimo.

1.5.- Planteamiento de la hipótesis

Dado que: los criopreservantes penetrantes de bajo peso molecular ayudan a la conservación espermática.

Es probable que: la adición en el procedimiento, de criopreservantes como dimetilformamida y glicerol permitirá obtener una mejora en la calidad seminal del semen criopreservado proveniente del epidídimo y del eyaculado completo.

CAPITULO II

I. MARCO TEÓRICO O CONCEPTUAL

2.1.- Análisis bibliográfico

2.1.1.- Material principal

Anatomía del aparato reproductor masculino del bovino

TESTÍCULOS

Son órganos pares, productores de espermatozoides y de hormonas masculinas. Se encuentran situados en el escroto. Su forma es oval pero varían sus proporciones, en los rumiantes son muy alargados. A la vez varía su tamaño alcanzando un tamaño promedio de 300 gr¹. Hoy en día, son considerados como glándulas mixtas, es decir exo y endocrinas, porque los túbulos seminíferos forman espermatozoides y los excretan por medio de los conductos espermáticos al exterior. Las células de Leyding o intersticiales elaboran la hormona testosterona enviándolas por los vasos sanguíneos². Dada su forma oval, se consideran en el testículo dos polos. Uno se relaciona con la cabeza del epidídimo y por ello se denomina polo capital. El opuesto se relaciona con la cola del epidídimo, polo caudado. El borde epididimario es el que sujeta el epidídimo; el opuesto es el borde libre¹.

Envolturas del testículo:

En la migración del testículo, al pasar por el trayecto inguinal arrastra una parte de todas las capas que constituye la pared abdominal. Estas capas formaran una envoltura de muchas hojas alrededor del testículo, epidídimo y cordón espermático, de las que exponemos a continuación un esquema indicando la estructura de la pared abdominal de la que derivan: ⁽¹⁾

CUADRO N° 01
ENVOLTURAS DEL TESTÍCULO

Envolturas testiculares	Pared abdominal
Escroto	Piel
Dartos	Tejido subcutáneo
Fascia espermática externa	Fascias subcutánea y del M. externo
Fascia cremasterica	Fascia del M. oblicuo interno del abdomen
Cremaster	M. oblicuo interno del abdomen
Fascia espermática interna	Fascia transversa
Túnica vaginal Periorquio(lámina parietal) Epiorquio(lámina visceral)	Peritoneo parietal (proceso vaginal)
Albugínea	

Fuente: Climent S. y col 2013¹

La albugínea no tiene representación porque no depende de la pared abdominal sino que es una diferenciación propia del testículo.

Escroto.- Bolsa de revestimiento, que en rumiantes es un verdadero saco penduloso, su posición es inguinal, los testículos llegan al escroto promediando la preñez en los rumiantes, en otras especies lo hacen pocas semanas antes del nacimiento². La diferencia entre la temperatura abdominal y la testicular en el vacuno es de 2 c². Consta de una piel delgada, pigmentada de forma variable en las distintas especies y cubierta por mayor o menor cantidad pelo, rica en glándulas sudoríparas y sebáceas. Las primeras contribuyen a la refrigeración del testículo por la evaporación del sudor¹. El escroto externamente está protegido por la piel. La epidermis es delgada con la cantidad variable de pelos, la dermis tiene numerosas células cebadas en los rumiantes².

Dartos.- deriva del tejido subcutáneo y consta de fibras colágenas, elásticas y musculares lisas. Tapiza por dentro el escroto y a nivel del plano sagital constituye el septo escrotal, el cual divide las bolsas testiculares en dos compartimientos, cada uno de los cuales contiene un testículo envuelto por sus correspondientes capas. Externamente produce la depresión del rafe escrotal. Las fibras musculares del dartos se contraen por el frío o por estímulos mecánicos y producen el plegamiento de la piel del escroto, adaptándola estrechamente al testículo y

engrosándola con lo que favorece el aislamiento frente a la disminución de la temperatura ambiente. Colabora también en el acercamiento del testículo a la pared corporal, aunque esta función es más característica del cremaster¹.

Fascia espermática externa.- consta de dos hojas de tejido conjuntivo difíciles de separar. La más superficial corresponde a la fascia subcutánea y la profunda a la fascia del musculo oblicuo externo del abdomen. A nivel de la cola del epidídimo suele presentar adherencias al dartos, las cuales se conocen como ligamento escrotal¹.

Fascia cremasterica.- está íntimamente adherida al musculo cremaster y deriva de la fascia del musculo oblicuo interno del abdomen¹.

Cremaster.- es una lámina muscular estriada desprendida del musculo oblicuo interno. Realmente deriva del mesénquima del gubernaculo pero secundariamente establece conexiones con los músculos citados, de los que parece desprenderse. Se inserta en la porción laterodorsal del proceso vaginal. Bajo ciertos estímulos se contrae y aproxima el testículo al trayecto inguinal, para mantener constante su temperatura, pero este reflejo dura poco tiempo, por lo que la participación del cremaster en la termorregulación de testículo no es esencial. Con el calor se relaja y aleja el testículo de la pared abdominal, favoreciendo su refrigeración¹.

Fascia espermática interna.- deriva de la fascia transversa y está íntimamente ligada a la capa parietal de la túnica vaginal, de la que es difícil de separar. Para comprender la disposición de la túnica vaginal hay que remitirse a su desarrollo embrionario. Sabemos que proviene de una evaginación del peritoneo parietal hacia el escroto. Cuando termina su desarrollo, el proceso vaginal tiene la forma de una botella alargada, con una porción proximal estrecha y larga y una porción distal amplia. Esta última es empujada por el testículo y el epidídimo que provocan su invaginación, mientras la primera es invaginada por el cordón espermático¹. Tales órganos quedan cubiertos por la lámina visceral de la túnica vaginal (epiorquio), a la que empujan hacia la lámina parietal de la túnica vaginal, disminuyendo su cavidad (cavidad vaginal), la cual comunica con la cavidad peritoneal a través del anillo vaginal. Los elementos del cordón espermático pasan

por el anillo vaginal hacia el testículo, envueltos en el correspondiente pliegue del peritoneo¹.

EPIDÍDIMO

Consta de cabeza, cuerpo y cola. Es alargado y está fijo al borde epididimario del testículo. Su cola se une al polo caudado por el ligamento propio del testículo¹. Mide aproximadamente 75 metros de longitud. En los carnívoros y en los equinos 72 - 81 mts. Toro 40 - 50 mts². La situación del epidídimo varía en las distintas especies; en rumiantes es dorsomedial, además coincide con la línea que divide la cara media en dos mitades iguales¹.

La cabeza del epidídimo consta de un número variable de conductos eferentes dispuestos de forma tortuosa en el interior de lobulillos separados por tejido conjuntivo, constituyendo los conos eferentes. Su unión forma el conducto del epidídimo, que también de forma tortuosa ocupa el cuerpo y se dirige hacia la cola, aumentando progresivamente de diámetro¹. Es un conducto largo pudiendo medir hasta 10 m en bovinos¹. Desde la rete testis los espermatozoides van al epidídimo por medio de los conductillos eferentes que varían de una especie a otra, pero en general oscila de 13 y 20 u en los mamíferos domésticos, en el toro tiene un diámetro de 170 y 400 u².

La cola del epidídimo es una zona de almacenamiento de los espermatozoides. Los espermatozoides que permanecen mucho tiempo en la cola del epidídimo muestran signos de envejecimiento, con alteraciones morfológicas, pérdida de motilidad y capacidad fecundante. Por eso se piensa que los que no se renuevan por eyaculación se hacen progresar hacia la uretra y se eliminan con la orina¹. En la cola del epidídimo, se secreta un factor que estimula la adquisición del movimiento de traslación o progresivo (FMP), este factor se encuentra en el plasma seminal, es una glucoproteína que sería responsable del aumento del AMP cíclico de los espermatozoides².

Si en la porción terminal del epidídimo, donde se almacena los espermatozoides, estos no son eyaculados en un tiempo determinado, estos pierden su poder

fecundante, en el almacenamiento, requieren una temperatura algo inferior a la corporal².

Funciones del Epidídimo:

- Transporte y supervivencia de los espermatozoides
- Formación de un medio idóneo, que contribuye a una disminución del metabolismo espermático que es inmovilización y supervivencia de los gametos (disminución del pH, reabsorción del Cl y Na, que se compensa con el aumento de K y secreción de sustancias viscosas que contribuya a dicha inmovilidad)
- Cambios morfológicos en las espermatides, produce el movimiento de la gota citoplasmática a lo largo de la pieza intermedia y pérdida eventual.
- Adquisición de la capacidad fertilizante

GLÁNDULAS ACESORIAS

Se agrupan alrededor de la uretra pélvica. Presentan variaciones según la especie. Su crecimiento y funcionalidad está ligada a la presencia de las hormonas sexuales masculinas. Pueden palparse por vía rectal, sin embargo el mejor método de exploración consiste en el examen ultrasonográfico con una sonda transrectal¹. Son las que proporcionan a mayor parte del plasma seminal que contiene abundantes carbohidratos, proteínas y aminoácidos, enzima, vitaminas hidrosolubles, minerales y una capacidad tampón alta, siendo este plasma esencial para mantener la vitalidad de un espermatozoide³.

Glándulas vesiculares.- Son pares y se sitúan dorsolateralmente al cuello de la vejiga, en los rumiantes son compactas y su superficie es lobulada. Su secreción constituye la fracción post espermática del eyaculado¹. La secreción es gelatinosa; blanca o blanco amarillento y representa un 30% del eyaculado total de un toro, está compuesta por fructuosa, inositol, ergotioneina, ácido cítrico².

Próstata.- Existe en todos los animales, íntimamente relacionada con la primera porción de la uretra, consta de un cuerpo y una porción diseminada (capa glandular dispuesta alrededor de la uretra y solo visible si esta se secciona), la

glándula vierte su producto por numerosos conductillos prostáticos que se abren en el seno prostático, a ambos lados del colículo seminal¹.

Su secreción es un líquido lechoso, alcalino que es eliminado antes de la eyaculación, su función es neutralizar el plasma seminal que se acidifica por la secreción de anhídrido carbónico metabólico, este líquido contiene sustancias inorgánicas y orgánicas, como proteínas prostaglandinas, enzimas; representa el 5% del volumen total del eyaculado en rumiantes².

Glándulas bulbouretrales o de Cowper.- Son pares y se encuentran dorsalmente a la porción caudal de la uretra pélvica, su conducto excretor es único en todas las especies, su secreción es filante y mucosa y constituye la fracción pre espermática del eyaculado¹. La secreción es sialomucoproteica, en los rumiantes más fluida y proteinacea, en el verraco mucosa parece que interactúa con algunas proteínas es viscosa para formar un gel elástico que sería, el Tapón cervical que impediría el reflujo del esperma, en el gato además contiene glucógeno².

URETRA

Comienza en el orificio uretral interno y termina en el orificio uretral externo, situado en el vértice del pene, se considera dividida en dos partes: pélvica y peniana, en la uretra pélvica ya conocemos la parte pre-prostatica, situado entre la vejiga y la próstata, que solo transporta orina, el resto llevara orina durante la micción o semen en la eyaculación¹.

En su porción pelviana se encuentra una eminencia redondeada el COLICULO SEMINAL, en esta eminencia desembocan los conductos eyaculadores en el caballo, rumiantes (conductos deferentes y de las glándulas vesiculares fusionados)².

Pasada la pelvis comienza la parte peniana, que se dirige ventrocranealmente pasando entre los pilares del pene para situarse en el surco uretral del cuerpo cavernoso, la uretra peniana está rodeada por una formación tubular impar de tejido eréctil, el cuerpo esponjoso, su mucosa forma pliegues longitudinales y está cubierta por un epitelio de transición que a nivel del orificio uretral externo cambia a escamoso estratificado¹.

En los rumiantes y caballo la porción terminal de la uretra se denomina PROCESO URETRAL el cual sobresale en mayor o menor grado del glande peneano, la luz esta revestida de epitelio de transición o plano estratificado².

PENE

El órgano copulador del macho se compone fundamentalmente de tejido eréctil y está firmemente unido a la arcada isquiática de la pelvis por los pilares del pene. El pene de los rumiantes es largo, delgado y de consistencia firme aun cuando no está en erección. Se dobla sobre sí mismo formando la flexura sigmoidea del pene, de situación retroescrotal en los rumiantes¹.

El pene consta de dos cuerpos cavernosos, la uretra envuelta por su cuerpo esponjoso y el glande¹.

Cuerpo cavernoso.-Constituye la porción más voluminosa del pene, son acúmulos alargados de tejido eréctil, envueltos en una capsula fibroelastica gruesa, denominada túnica albugínea de ella parten hacia el interior un septo mediano y numerosas trabéculas que forman una malla interna de sostén para los espacios cavernosos del tejido eréctil¹. Cerca de la arcada isquiática, los cuerpos cavernosos se separan entre sí y se unen a ella mediante los pilares del pene, a medida que avanza hacia el vértice del pene, los cuerpos cavernosos se fusionan más y más uno al otro en el plano medio de forma que solo persiste un fino septo que los separa. A lo largo de la cara ventral del cuerpo cavernoso hay un surco profundo, el surco uretral, que aloja la uretra y su cuerpo esponjoso. Caudalmente el cuerpo del pene está sujeto a la cara ventral de la pelvis mediante dos láminas de tejido conjuntivo denominado ligamento suspensorio del pene. También irradian de la línea alba unas láminas fibroelásticas que a modo de cincha, lo rodean y fijan, el ligamento fundiforme. Según la cantidad relativa de tejido conjuntivo presente en los cuerpos cavernosos del pene se pueden distinguir los tipos fibroelásticos y musculocavernosos. Los penes fibroelásticos presentan un gran predominio de las trabéculas conjuntivas sobre los espacios cavernosos, lo que les confiere una consistencia dura, incluso cuando no están en erección. Los penes musculocavernosos presentan grandes espacios en cuyas paredes abundan las fibras musculares lisas en vez de las trabéculas conjuntivas. Por tanto, cuando el pene esta flácido es menor y ofrece una consistencia blanda y compresible¹.

Cuerpo esponjoso.- Envuelve completamente la uretra, continuándose proximalmente con la capa vascular de la porción pélvica, a nivel de la arcada isquiática forma un abultamiento, el bulbo del pene, dividido en dos mitades por un septo medio¹. El bulbo se aplica a las caras caudal y laterales de la uretra, estando cubierto por una gruesa capa circular de tejido muscular estriado, que forma el musculo bulboesponjoso. Se denomina raíz del pene al conjunto del bulbo del pene y a los dos pilares del pene¹.

Glande.- Difiere con las especies, en rumiantes tienen un glande pequeño constituido por una delgada capa de venas cavernosas. En los rumiantes está ligeramente retorcido u su característica principal es el largo proceso uretral, formado por la uretra rodeada de su cuerpo esponjoso, que en el toro no sobrepasa el vértice del pene¹.

PREPUCIO

Cuando no está en erección, el glande y la porción libre del pene están en el interior de la vaina cutánea, el prepucio. Consta de una lámina externa que se continúa con la piel de la pared abdominal y una lámina interna en contacto con el pene y que a nivel del extremo caudal de la cavidad prepucial se continúa con la piel que recubre la porción libre del pene. Las láminas interna y externa se unen a nivel del orificio prepucial. La lámina externa del prepucio tiene la misma estructura que la piel circundante, estando cubierta de pelo. Su cara ventral presenta el rafe prepucial, continuación del rafe escrotal y más o menos marcado, según las especies¹. Los rumiantes presentan un característico mechón de pelos a nivel del orificio prepucial. La lamina interna carece de pelos y glándulas, excepto en un corto trecho cerca del orificio prepucial, donde son muy abundantes las glándulas sebáceas. La secreción de estas glándulas se vierte a la cavidad prepucial donde se mezcla con las células degeneradas y descamadas del epitelio para formar el esmegma¹.

GAMETOGÉNESIS EN EL BOVINO

Espermatogénesis

La cinética del epitelio germinal se llama espermatogénesis, la espermatogénesis, parece seguir un curso ondulante o por oleadas, las fases no son iguales en todos los planos transversales de cada canalículo testicular, la duración del ciclo se estima en general aproximadamente en 19 – 20 días², que clásicamente se lo divide en tres fases:

1. espermatocitogenesis

Es la proliferación de las espermatogonias para dar origen a los espermatoцитos de primer orden o primarios, la proliferación asegura el mantenimiento del número original de espermatogonias es decir la renovación para que no se agoten en el proceso de diferenciación, esta multiplicación se realiza por mitosis normales, se realizan aceleradamente a partir de la pubertad y no cesara hasta la muerte del animal, a diferencia de lo que ocurre con otras estirpes celulares, es que las espermatogonias no doblan su volumen, después de cada mitosis, de manera que cuantas más divisiones han sufrido, menor su tamaño².

La primera se designa espermatogonia tipo A (EGA), la segunda como espermatogonia tipo B (EGB) y el tercer tipo es la espermatogonia intermedia (EGI), en todos los mamíferos la población de espermatogonias está compuesta por dos clases celulares, las células madre definidas y además células en diferenciación². Las células en diferenciación incluyen las células que poseen diversos grados de especialización, ósea son células especializadas que pueden dividirse para originar nuevas células en diferenciación pero no células madres, de modo las EGI y EGB parecen irreversiblemente dedicadas a producir espermatoцитos y deben clasificarse como células en diferenciación, las EGA pueden clasificarse como células madre, pueden dividirse y originar EGI y EGB y nuevas células madre. En el toro, la espermatocitogenesis tiene 6 divisiones, 3 para espermatogonias tipo A, 1 para la intermedia y 2 para el tipo B².

Meiosis

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

50% “X” y 50% “Y”, hacen que los espermatozoides con “X” sean menos móviles que los “Y”².

El espermatozocito primario da origen por la primera división meiótica en dos espermatozocitos secundarios a partir de un primario, contiene gránulos de cromatina bastante pálidos y glóbulos cromáticos fuertemente teñidos, el diámetro total de la célula suele ser de 12 μ los primarios de 18 o 20 μ los espermatozocitos secundarios originan las espermatides, recién formadas poseen un núcleo esférico pequeño, el diámetro total no sobrepasa las 8 μ tienen un contenido haploide de cromosomas².

2. Espermiogenesis

El espermatozocito por una serie de procesos complejos se diferencia en la célula germinal altamente especializada, el espermatozocito, el aparato de Golgi está bien diferenciado en las espermatides, estos se ubican cerca del núcleo, comienza a secretar material en forma de gránulos envueltos por vesículas de membrana lisa, son los gránulos proacrosómicos y las vesículas se llaman vesículas proacrosómicas estos se fusionan para formar un granulo único el acrosómico rodeado de su vesícula, todo esto corresponde a la fase Golgi, para proseguir con la fase de casquete, aquí la vesícula crece y de esférica que era se aplana al apoyarse sobre la superficie del núcleo, el material PAS positivo se coloca sobre la membrana de la vesícula adyacente al núcleo, formando una capa única, luego las partículas PAS positivas se fusionan para dar lugar a una delgada capa supra nuclear y el granulo acrosómico no sufre ninguna modificación, la superficie externa de la vesícula se aplana más para adherirse firmemente al granulo y a la placa a modo de sombrero llamándose casquete o caperuza, crece deslizándose sobre la superficie nuclear hasta cubrir los 2/3 de la misma, empieza después de la fase acrosómica en granulo y el casquete se orientan hacia la lámina propia del túbulo². La masa citoplasmática se desplaza hacia el lado opuesto del núcleo donde se halla el granulo y el casquete, estos dos se conocen como sistema acrosómico. El aparato de Golgi se separa del sistema acrosómico y se pierde el citoplasma, el núcleo comienza a alargarse y se aplana en sentido opuesto, el granulo acrosómico experimenta una saliencia al que se le llama acrosoma².

Luego sigue la fase de maduración en donde el sistema acrosómico se hace más débil mientras que la célula se libera del exceso de citoplasma².

Los cambios a nivel del sistema acrosómico se ha estudiado mucho en el macho cabrío, toro y padrillo, demostrando pocas diferencias con referencia al cerdo, en el quino es casquete se fija fuertemente al ápice nuclear pero tiene unión poco laxa sobre el último tercio de la superficie, los centriolos están en el polo opuesto del núcleo, la cromatina se condensa y se tiñe cada vez más fuerte y hace que el núcleo tome el tamaño y forma típica para cada especie, un centriolo se orienta perpendicularmente a la superficie celular y se encarga de formar el flagelo y se constituye en el cuerpo basal, posteriormente se forma el anillo a partir del material del cuerpo acrosómico rodean al flagelo y se desplaza a lo largo del mismo, delimitando la futura pieza intermedia, las mitocondrias migran y se disponen a su alrededor para formar una vaina, el exceso del citoplasma forma el cuerpo residual, pequeña esfera sin organelos que existe hasta poco antes de la espermiación².

El acrosoma tiene dos funciones: disolver las envolturas ovulares para facilitar la penetración del espermatozoide y adherirse a la membrana ovular en el momento de la fecundación, para lo cual cuenta con proteínas específicas llamadas Bindinas².

3. Espermiación

Es la liberación del espermatozoide del epitelio seminífero en los mamíferos, durante la espermiogénesis existe estrecha asociación entre los espermatozoides y el citoplasma de las células de Sertoli, estas emiten láminas de citoplasma que envainan a grupos de espermatides por las etapas similares de desarrollo hallándose generaciones de espermatides y en el túbulo hay varias de estas generaciones cada una en una etapa diferente de la espermiogénesis, las espermatides se encuentran ligadas entre sí por medio de puentes citoplasmáticos que permiten que se muevan en masa desde basal a luminal a medida que se diferencian cuando se desarrolla el sistema acrosómico, las espermatides se orientan hacia la membrana basal del túbulo seminífero, las más jóvenes profundizan más en el túbulo relacionándose en las prolongaciones sertolianas, cuando maduran solo la mantiene un puente de citoplasma que ancla en la pieza intermedia².

En la espermiación se produce la ruptura del puente citoplasmático que une el cuerpo residual, la célula de Sertoli se encarga de fagocitar el cuerpo residual².

MORFOLOGÍA DEL ESPERMATOZOIDE

El espermatozoide es una célula altamente especializada que ha evolucionado para desarrollar una única función: fecundar al óvulo. Presenta a nivel de la cabeza una serie de mecanismos encargados de garantizar la penetración del ovocito y transmitirle así el material genético; por otro lado, la cola posee una maquinaria metabólica encargada de dotar de movimiento al espermatozoide⁴.

Los espermatozoides maduros son células alargadas consistentes de una cabeza aplanada portadora del núcleo y una cola que contiene el aparato necesario para la movilidad celular. La célula espermática está cubierta en su totalidad por la membrana plasmática. El extremo anterior del núcleo espermático está cubierto por el acrosoma, un delgado saco membranoso de doble capa estrechamente adherido al núcleo durante las últimas etapas de la formación del espermatozoide en el testículo. Esta estructura en forma de casquete, contiene varias enzimas hidrolíticas incluyendo proacrosina, hialuronidasa, esterases y ácido hidrolasa, que participan en el proceso de fecundación. Un cuello une la cabeza del espermatozoide con la cola (flagelo), la cual se subdivide en los segmentos medio, principal y caudal⁵.

La cabeza del espermatozoide contiene cromatina muy compacta. La cromatina condensada consiste en un complejo formado por ADN y una clase especial de proteínas básicas llamadas protaminas espermáticas. El contenido de ADN nuclear es haploide, dicho núcleo posee la mitad de cromosomas que el núcleo de las células somáticas de la misma especie⁵. La cola espermática está formada por el cuello y los segmentos medio, principal y caudal. La región de la cola comprendida entre el cuello y el anillo citoplasmático es el segmento medio. El centro de este segmento medio, junto con toda la longitud de la cola, constituye el axonema. Este se compone de nueve pares de microtúbulos dispuestos radialmente alrededor de los filamentos centrales. El axonema y las fibras densas que lo rodean están cubiertos periféricamente por numerosas mitocondrias dispuestas en un patrón helicoidal (vaina mitocondrial)⁵.

Estructuralmente se diferencian en el espermatozoide:

- a) Cabeza: donde se encuentra el precioso patrimonio genético, que son los cromosomas en su máxima condensación. La extensión del núcleo es de un tercio de la longitud total de la cabeza⁶. El acrosoma es un saco membranoso invertido que contiene un complejo lipoglucoprotéico específico que incluye una serie de enzimas, tales como la hialuronidasa y acrosina. La primera de ellas se encarga de degradar los mucopolisacáridos y es posible que provoque la dispersión del cúmulus oóforos del ovocito. En cambio, la segunda facilita la penetración del espermatozoide a través de la zona pelúcida del ovocito⁴.
- b) Segmento o pieza intermedia: formado por las mitocondrias que se alinean extremo con extremo en bandas que se enrollan en espiral para formar una hélice y cuya función es la de garantizar el metabolismo del espermatozoide y asegurar su movilidad⁶
- c) Cola: De dos centriolos situados en la porción terminal de la pieza intermedia parten una serie de fibrillas hacia la cola, presentando dos fibrillas centrales rodeadas de un anillo de nueve pares periféricos de fibrillas contráctiles, responsables del movimiento del espermatozoide⁶.

En el caso del toro 75μ , la cabeza tiene forma variable, en el caso del toro tiene forma de raqueta, su cabeza mide $8-10\mu$ de largo por 4μ de ancho, el espesor de todas las especies oscila entre 0.5 y 1.5μ la pieza intermedia mide para todos entre 10 y 15μ e3 largo por 1μ de diámetro, la cola del flagelo mide 35 a 40μ de largo por $0.4 - 0.8\mu$ de diámetro².

CUADRO N° 02
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 (espermatozoides) • 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 con 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
Glándulas vesiculares	Tienen la forma de sacos alargados	<ul style="list-style-type: none"> • Contribuye con fluido al semen
Glándulas 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.

Fuente: E. Mellisho 2010 anatomía de los órganos genitales del macho⁷.

Concepto de criopreservación

La criopreservación es el proceso en el cual células o tejidos son congelados a muy bajas temperaturas, generalmente entre $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (el punto de ebullición del nitrógeno líquido) para disminuir las funciones vitales de una célula o un organismo y poderlo mantener en condiciones de vida suspendida por mucho tiempo. A esas temperaturas, cualquier actividad biológica, incluidas las reacciones bioquímicas que producirían la muerte de una célula, quedan efectivamente detenidas. El objetivo principal de la criopreservación es la interrupción del metabolismo por un tiempo determinado arbitrariamente durante el que los embriones se encuentran en una anabiosis (estado de vida latente) artificial⁸.

Agentes crioprotectores (ACP)

Los criopreservantes son sustancias hidrosolubles y de baja toxicidad, que disminuyen el punto eutéctico de una solución dada, (punto en el cual una composición dada de A y B solidifica como un elemento puro), el descenso del punto eutéctico implica que se alcanzará una concentración dada de solutos a una temperatura menor, de forma que la célula estará más deshidratada y el gradiente osmótico al que estará sometido será menor^{9, 10}.

En presencia de un crioprotector, la cantidad de agua que permanece en estado líquido a medida que desciende la temperatura es mayor, y por lo tanto, la concentración de electrolitos aumenta. El efecto está relacionado con la concentración molar del crioprotector. Mazur P¹¹ y Cole KW¹² propusieron que la fracción de agua no congelada es más importante que la concentración de electrolitos, ya que la constricción de los canales líquidos causa un estrés físico sobre las células ya contraídas, e incrementa el contacto célula-célula que se considera perjudicial. Existen numerosos compuestos que ejercen efecto crioprotector sobre las células^{13y14}, y tradicionalmente se han clasificado en agentes penetrantes o no penetrantes en función de que su acción sea intra o extracelular. Desde que Polge C. at el¹⁵, demostraron la eficacia del glicerol, se ha considerado como el crioprotector celular universal, y ha sido el más extensamente utilizado para los espermatozoides de la mayoría de las especies de

mamíferos, puesto que ningún otro crioprotector ha dado mejores resultados que el glicerol.

Fundamentos de criopreservación

Transporte a través de las membranas durante la congelación y descongelación

Las bajas temperaturas (asociadas al aumento de la rigidez de la membrana) y la rapidez (décimas de segundo) con la que suceden los cambios osmóticos en los procesos de congelación y descongelación hacen muy difícil el movimiento de moléculas a través de la membrana mediante procesos de transporte activo (dependientes de ATP), la disminución de temperatura desde 25°C a 10°C reduce en un 60% la actividad de las bombas dependientes de ATP y la difusión facilitada o como transporte (transporte concomitante de dos moléculas a través de la membrana dependiente una de ellas de ATP y/o iones H⁺), en consecuencia, los procesos de difusión y ósmosis son los que predominan en los momentos de estrés osmótico¹⁶.

La difusión es un proceso mediante el cual las moléculas de una sustancia tienden a alcanzar una distribución homogénea en todo el espacio que les es accesible. La magnitud de la tendencia a difundir desde una zona a otra si está presente una membrana que separe las dos zonas está definida por la ley de difusión de Fick, que relaciona el gradiente entre las dos zonas (gradiente químico o de concentración), las características de la membrana (grosor, área de sección transversa y permeabilidad para un determinado soluto), es directamente proporcional a la superficie (área) de la membrana y a la diferencia de concentración del soluto entre los dos lados e inversamente proporcional al espesor (grosor) de la membrana. La velocidad de la difusión es proporcional a una constante de difusión que depende de las propiedades de la membrana y de cada soluto en particular, un equilibrio puede conseguirse en segundos si la distancia es de micras, pero puede subir a varias horas si la distancia de difusión se incrementa a milímetros. La ósmosis es un caso especial de difusión en el que es el movimiento del disolvente el que se estudia, y se define en función de los solutos. La ósmosis es el movimiento del agua desde soluciones con baja concentración de soluto hasta soluciones con alta concentración de soluto y la

presión osmótica es la presión hidrostática que se genera a través de una membrana semipermeable con un gradiente de concentración al lado y lado, depende del número de partículas de la solución¹⁷.

La presión osmótica se suele expresar en osmoles y depende exclusivamente del número de partículas disueltas (moles) por unidad de volumen, con independencia de su carga eléctrica, peso o fórmula química, es por tanto una propiedad coligativa (es decir las propiedades colectivas que una solución tiene cuando estos compuestos están presentes), los productos criopreservados se deben almacenar a temperaturas desde -133°C (vapores de nitrógeno líquido) a -196°C (nitrógeno líquido). A estas temperaturas no existen fenómenos de difusión ni energía térmica suficiente para llevar a cabo las reacciones químicas y por tanto las dificultades de la congelación no derivan de la permanencia a temperaturas bajas sino de los procesos de congelación y descongelación¹⁸.

La lesión celular crio inducida se explica en función de la formación de hielo intracelular y el estrés osmótico al que se ven sometidas las membranas celulares durante la congelación, Merryman propone la hipótesis del volumen celular mínimo que relaciona el efecto de la deshidratación producida durante la concentración de solutos y la muerte celular con la vuelta a las condiciones isotónicas después de la congelación (choque osmótico), el volumen celular mínimo se basa en que el volumen se reduce en relación al aumento de la osmolaridad extracelular, a medida que la célula pierde volumen por la pérdida de agua, la compresión del contenido citoplasmático aumenta la resistencia de la célula a seguir perdiendo volumen, y al excederse la resistencia física de la membrana se producirán cambios irreversibles en su permeabilidad, en este caso los crioprotectores actuarían reduciendo por sus propiedades coligativas la cantidad de hielo formado a una temperatura determinada¹⁹.

Tipos de crioprotectores

Según De la Fuente J²⁰; habla sobre los crioprotectores en la actualidad Grupos de crioprotectores:

1. De bajo peso molecular y permeable, como: Etilenglicol, 1-2 Propanodiol, Glicerol y otros²⁰.

- Reemplazan el agua intracelular minimizando la formación de cristales.
 - Regulan la deshidratación y protegen la estructura proteica.
2. De bajo peso molecular y no permeable, como: Glucosa, Sacarosa y otros azúcares²⁰.
- Deshidratan las células antes de la congelación minimizando la formación de cristales.
 - Estabilizan la estructura de la membrana.
3. De alto Peso molecular no permeables, como: Polivinilpirrolidona, Polivinil alcohol y otros polímeros como el Ficol²⁰.
- Protegen en congelación/descongelación alterando el tamaño y la forma de los cristales.

Los crioprotectores penetrantes

Son de bajo peso molecular y permeable a través de la membrana celular. Son utilizados: el glicerol, el dimetilsulfoxido (DMSO) y propanediol (PROH). El dimetil sulfóxido es un solvente bipolar aprótico, hidrosoluble, de bajo peso molecular; desde el descubrimiento de sus propiedades crioprotectoras por Lovelock, el DMSO se ha usado como un crioprotector, su acción crioprotectora se atribuye principalmente a su habilidad de prevenir acumulación excesiva de electrolitos y otras sustancias durante el proceso de congelamiento, y la formación de cristales de hielo que rompen la estructura de la membrana, su bajo peso molecular permite la entrada rápida través de la membrana celular, modula la estabilidad y fases de la bicapa de los fosfolípidos, así como también afecta los procesos de solvatación de agua. Se han sugerido las interacciones electrostáticas de DMSO con fosfolípidos lo cual parece ser crítico para la crioprotección de la membrana. El 1-2. propanediol ha sido utilizado principalmente para congelación de blastocitos y embriones en estado de preimplantación de humanos y otras especies¹⁰.

Como actúa el glicerol en las células

Durante el procesado ocurren dramáticos movimientos de agua y crioprotector en una célula espermática; respuestas similares, aunque únicas, es posible que ocurran en cada subcompartimento celular²¹. En respuesta a la adición del glicerol

al medio isotónico en el que están las células espermáticas en suspensión, tiene lugar un primer ajuste del volumen celular debido a una rápida salida de agua intracelular (arrugamiento de la célula), seguida por un lento retorno al volumen original a medida que penetra el crioprotector. Cuando el agua extracelular se congela ocurre un segundo ajuste de volumen, motivado por la salida de agua del interior de la célula, en respuesta a las altas concentraciones de sales extracelulares. La descongelación induce cambios de volúmenes análogos pero opuestos. Como los componentes de membrana pueden cambiar a lo largo del ciclo de congelación-descongelación, la cinética del transporte de agua puede no ser equivalente²¹.

Los ajustes de volumen de mayor magnitud se producirán cuando las células son expuestas a condiciones hipertónicas durante la congelación. Ello se revierte durante la descongelación y el espermatozoide recupera su volumen isotónico. Otro gran cambio ocurrirá cuando el espermatozoide equilibrado con glicerol, es transferido de un diluyente glicerolado (1300 mOsm.) al tracto genital de la hembra (300 mOsm). A medida que el agua osmóticamente activa entra en la célula, más rápidamente de lo que el glicerol puede salir, ocurrirá una expansión de 3,4 veces. ¿Cómo pueden las membranas acomodarse a esta gran reducción y expansión de volumen?²¹. La respuesta a condiciones moderadamente hipertónicas podría ser a través de una íntima aproximación de los sistemas de membrana²², pero como el mayor espacio lo ocupa el núcleo (núcleoproteínas altamente condensadas y cromatina unidas por puentes disulfuro)²³, el acrosoma y los espacios intramembrana pueden reducir su volumen, pero las reducciones sustanciales del volumen total podrían ser a expensas del tracto intermedio y la cola²¹.

Efectos nocivos del glicerol

Además de los efectos osmóticos, el glicerol actúa directamente sobre las membranas espermáticas²⁴. La naturaleza de esta acción no se conoce con exactitud, pero puede relacionarse con:

- Alteración directa de las capas de la membrana^{25, 26, 27, 28}
- Interacción con los enlaces de proteínas y glucoproteínas²⁹
- Inducción de un incremento de la demanda bioenergética²¹

En virtud de su efecto directo sobre las membranas espermáticas y sobre el metabolismo celular, el glicerol tiene una acción perjudicial sobre la fertilidad espermática y esta acción es más acusada a mayor temperatura, en semen ovino el efecto negativo sobre la fertilidad se ha atribuido a la inducción anticipada de la reacción acrosómica, que sería la responsable de las bajas tasas de concepción del semen congelado³⁰. En espermatozoides humanos, la hiperosmolaridad posee un efecto estimulador de la reacción acrosómica³¹, y también se ha planteado si la presión osmótica del medio, que se incrementa al añadir el glicerol, podría estimular la reacción acrosómica³⁰.

Concentración óptima de glicerol

Teniendo en cuenta los efectos tóxicos del glicerol y el hecho indiscutible de que su uso es necesario para la supervivencia espermática postdescongelación, es necesario establecer una concentración óptima que represente un compromiso entre el efecto tóxico y el efecto protector³². La concentración de glicerol requerida para una supervivencia óptima depende de numerosas consideraciones (constituyentes del diluyente, velocidad de congelación y descongelación, formato de envasado), pero el factor determinante de esta concentración es la especie³². Los espermatozoides de toro se ven adversamente afectados por niveles superiores al 10%^{33 y 34}, siendo la concentración óptima entre el 6 y 9% para espermatozoides congelados en pajuelas³⁵.

Los Crioprotectores no-penetrantes

Son sustancias de alto peso molecular, efectivas a velocidades altas de congelación, son importantes por ejercer su acción crioprotectora promoviendo la rápida deshidratación celular y suelen usarse asociados a los agentes penetrantes, los más utilizados son: sacarosa, glucosa, dextrosa y dextrano, estos compuestos generalmente son polímeros que forman puentes de hidrógeno con el agua, reduciendo la actividad de agua a una magnitud mucho mayor que la que se predeciría por su concentración molar (ellos no obedecen la ley de Raoult)³⁶. La adición del criopreservante genera estrés osmótico sobre las células porque aumenta la osmolaridad del medio, las células inicialmente se deshidratan para compensar la fuerza osmótica inducida por la presencia de los ACP y después se hidrata. La definición de los parámetros biofísicos de cada célula y el estudio de

la interacción con los ACP durante la congelación y descongelación de las células deben ser definidos para establecer los límites físicos que aseguren la supervivencia de la célula³⁶.

Evaluación de semen fresco

Existen dos tipos de evaluaciones diferentes, la del semen fresco y la del semen congelado-descongelado. Primeramente se describirán los pasos a seguir para realizar la evaluación del semen fresco que es uno de los pasos en la determinación de la aptitud reproductiva del toro³⁷.

Una vez que el semen llega al laboratorio, se debe colocar en Baño María a una temperatura de entre 32 y 35°C. para comenzar con su evaluación³⁷.

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 12ml³⁷.
- **Color:** se consideran normales los colores que van del blanco al amarillento, siendo patológicos, los colores rosado, amarronado y verdoso³⁷.
- **Densidad:** la densidad del semen varía desde un semen acuoso, lechoso, lechoso cremoso, hasta un cremoso, estando directamente relacionada con la concentración³⁷.
 - MB = Cremoso, espeso 750.000 esp/mm³
 - B = lechoso, 400 a 750.000 esp/mm³
 - R = leche aguachenta, 250 a 400.000 esp/mm³
 - P = 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 masal o de remolinos, se considera como positiva o negativa³⁷.
- **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 6,8³⁷.

- **Cuerpos Extraños:** se evalúa observando el fondo del tubo para detectar la presencia de algún cuerpo extraño, se considera como positivo o negativo³⁷.
- **Schalm Test:** se realiza para detectar la presencia de leucocitos, pero sólo en casos que se sospeche la presencia de los mismos. No se hace de rutina en cada evaluación³⁷.

Finalizada la evaluación macroscópica, se continúa con la evaluación MICROSCÓPICA, que consta de los siguientes pasos:

- **M.M.Mi (Motilidad en Masa Microscópica):** 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. 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 formado remolinos. Dentro de esos parámetros se consideran los puntos intermedios. Se considera como valor mínimo de aceptación 3 de MMMi³⁷.
- **M.I. (Motilidad individual):** 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. 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 %³⁷.

MB = 80-100% de células móviles.

B = 60-79%

R = 40-59%

P = menos de 40%

- **Vigor:** se evalúa el vigor, al mismo tiempo que la MÍ, 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 rápidamente por el campo y son difíciles de seguir visualmente. Dentro de estos parámetros se consideran los puntos intermedios. Se considera como valor mínimo aceptable un vigor de 3³⁷.
- **Concentración:** para evaluar la concentración, se debe preparar previamente una solución salina formolada 2%. Se colocan 10 microlitros de semen puro en 2ml. de solución salina formolada (1/200) y se homogeniza invirtiendo el tubo varias veces. Una vez homogeneizado, se toman aproximadamente 14 microlitros y se carga la Cámara de Newbawer por capilaridad, en ambos retículos, teniendo en cuenta de cargar otros 14 microlitros para el segundo retículo volviendo a homogeneizar entre una carga y otra³⁷.
- **Frotis:** para completar la evaluación se deben realizar los siguientes frotis: Coloración Vital, Morfología y Acrosomía, pudiéndose evaluar éstos dos últimos en el mismo frotis, con la tinción adecuada³⁷.
 - a) **Coloración Vital:** se realiza extrayendo una gota de aproximadamente 10 microlitros de semen puro y colocándola sobre la punta de un portaobjetos limpio y desengrasado atemperado a 36,-37°C sobre la platina térmica. Sobre esta gota se coloca una gota de aproximadamente 30 microlitros de eosina, que debe estar a la misma temperatura del semen, en un tubo dentro del Baño María. Se mezcla suavemente con la punta de la pipeta por aproximadamente 20 segundos. Se utiliza otro portaobjetos, también atemperado, y se apoya sobre el borde de la gota para que por capilaridad se distribuya sobre el portaobjetos, se levanta y se

realiza el extendido en forma firme. Se deja secar sobre la platina térmica y se procede a su lectura. El fundamento de esta técnica es el siguiente: el colorante penetra la membrana de los espermatozoides muertos, dejando sin teñir los que se encontraban vivos al momento de realizar la tinción. Para sacar el porcentaje de espermatozoides vivos se procede a observar el frotis a 400 aumentos, contando en guarda griega todos los espermatozoides de cada campo evaluado, discriminando los que están teñidos, como muertos y los sin teñir como vivos. Se cuentan no menos de 100 células y se saca el porcentaje. Se considera como valor mínimo aceptable, el 70 % de espermatozoides vivos³⁷.

b) Morfología y Acrosomía: se coloca una gota de aproximadamente 30 microlitros de semen diluido sobre un portaobjetos limpio y desengrasado y se realiza el frotis en forma firme y pareja. Se deja secar el frotis y se lo tiñe con una solución de Giemsa. Se dejan incubar con el colorante por 4 horas, se los retira se enjuagan y se los deja secar. La evaluación de la morfología y la acrosomía se realiza bajo aceite de inmersión a 1000 aumentos. Los espermatozoides se visualizan de color violáceo y en el caso de tener presente su acrosoma se puede apreciar de un violáceo más intenso, de estar ausente el mismo se observa la cabeza del espermatozoide de un color homogéneo o con el tercio superior más claro. El valor mínimo tanto para rodeo general como para congelación es de 70% de acrosomas normales. También se puede evaluar por medio de contraste de fase con glutaraldehído al 0,2%. Si se desea ver sólo morfología se puede utilizar también Rosa de Bengala observándose a los espermatozoides de un color rosa intenso³⁷.

Evaluación de semen criopreservado

Funcionalidad de la membrana plasmática o integridad celular (HOST).

Se realiza con el Test de endosmosis (HOS). Se coloca en un tubo de ensayo 125 µl de solución HOS a 37°C y 12.5 µl de semen, incubándolo a 37°C durante 10 minutos, se detiene la reacción agregando 25 µl de Solución HOS Formol y se

coloca entre porta y cubreobjetos 5 μ l de la muestra observando con microscopio de contraste de fase a 400X. Los espermatozoides con cola enrollada totalmente, parcialmente, o simplemente acodada se consideraron vivos (reaccionados) y el resultado final se expresará porcentualmente. En cada muestra seminal debe observarse un mínimo de 40% de reaccionados para considerarla adecuada³⁸.

Integridad del acrosoma. Para la evaluación se colocará una gota de semen sobre un portaobjetos y al lado una gota similar de glutaraldehído al 0,2% diluido con buffer fosfato salino. Se realizarán tres lecturas por cada pajuela descongelada utilizando un microscopio de contraste de fase (1000X) y contando en cada extendido 100 espermatozoides. Para ello la muestra de semen se fijará con glutaraldehído al 2%. El defecto puede ser la falta total del capuchón acrosómico o su pérdida en distintas proporciones³⁸.

El resultado final se expresará en porcentaje e indica la proporción de acrosomas dañados (AD), no más del 50% de los espermatozoides deberán presentar acrosomas dañados para que la dosis sea considerada de calidad³⁸.

Porcentaje de espermatozoides vivos. Se utilizará la técnica de eosina nigrosina aplicada sobre una gota de semen, luego se realizará un extendido y una vez seco se observará al microscopio óptico (40X). Se contará un total de 200 espermatozoides indicando el número de espermatozoides blancos o sin colorante (vivos) respecto de los que se observan coloreados o rojos (muertos). El fondo del preparado se observará grisáceo o negruzco haciendo contrastar a los espermatozoides³⁸.

Motilidad individual progresiva. El porcentaje de motilidad progresiva y el vigor serán determinados inmediatamente después de descongelado el semen y luego de 2 horas de incubación. Una gota de semen delgada y uniforme es colocada entre porta y cubre objeto tibios procediendo a evaluar a 100 aumentos el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva y luego, la tasa de progresión (vigor). Esta, puede ser cuantificada utilizando la siguiente escala³⁸

CUADRO N° 03
CALIFICACIÓN DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA

Escala	Descripción
0	Sin movimiento
1	Ligera ondulación o vibración de cola, sin progresión
2	Progresión lenta, incluyendo detención y comienzo de movimiento
3	Movimiento progresivo continuo y moderada velocidad
4	Movimiento progresivo, rápido
5	Movimiento progresivo muy rápido, en el cual las células son difíciles de seguir visualmente.

Fuente: Reátegui y col, 2016³⁸

El semen de buena calidad, que ha sido recientemente descongelado, normalmente tiene 40-50% de espermatozoides con motilidad progresiva y un vigor de 3-4. Después de 2 horas de incubación, estos valores generalmente disminuyen un 10 - 15% y 1 punto, respectivamente. Las normas mínimas para motilidad exigidas que se corresponden con las de las normas ISO 9002 son: 0 hs.= 25% de espermatozoides con motilidad progresiva. Vigor 3. 2 hs= 15% de espermatozoides con motilidad progresiva³⁸.

Con respecto a las Malformaciones Espermáticas, se las puede clasificar siguiendo diferentes criterios³⁷:

1) Primarias y Secundarias: Es la clasificación más usada en la bibliografía, pero no por ello la más exacta. Las malformaciones Primarias por definición, son aquellas que se originan dentro del testículo durante la espermatogénesis y malformaciones Secundarias son aquellas que se originan dentro del epidídimo; cabe destacar que por definición se denota el origen y no la severidad del defecto³⁷

2) Mayores y Menores: Esta clasificación la propuso Bloom en 1977 y llamó malformaciones Mayores a aquellas que estaban asociadas con infertilidad y malformaciones Menores a aquellas que, al momento de crear el método de clasificación, no se encontraban relacionadas con la fertilidad en forma directa³⁷

3) Compensables y No Compensables: En 1994 Saacke y col. propusieron clasificar los defectos como Compensables a aquellos en los que el espermatozoide no llega a la vecindad del ovocito y no evita que otro

espermatozoide realice la fertilización; por lo tanto si se aumenta la concentración de la dosis seminal, se podría llegar a compensar este tipo de malformación, tal es el caso de espermatozoides con problemas en el sistema de locomoción. Un defecto No Compensable es aquel en el cual el espermatozoide está perfectamente capacitado para llegar hasta el ovocito, realiza el bloqueo de la polispermia pero es incapaz de continuar el proceso de fertilización³⁷

En la actualidad, quizás lo más adecuado sea identificar cada una de las anomalías por su ubicación dentro de la estructura del espermatozoide y la relación de cada una de ellas con la fertilidad, para lo cual aún se requieren muchos estudios para poderlo dilucidar fehacientemente en todos los casos. En general el número máximo de anomalías de cabeza aceptable se encuentra entre un 15 y un 20%. Con respecto a las anomalías de acrosoma y cola se puede aceptar hasta un 25%. Fuese cual fuese el sistema de clasificación, en ninguno de los casos se debe esperar un mínimo de 70% de espermatozoides normales en el eyaculado para poder aceptar un toro como apto reproductivo en cuanto a su semen, tanto para rodeo general, como para congelar³⁷.

2.2.- Antecedentes de investigación

2.2.1.- Revisiones de tesis universitarias

En la revisión bibliográfica de antecedentes de investigación no se encontraron reportes respecto al tema a tratar en la presente investigación, por lo que analizamos los siguientes reportes.

Bustios, C.³⁹, realizó un trabajo experimental que se llevó a cabo con uso de reproductores machos porcinos en un centro de inseminación artificial, ubicado en la Ciudad de Arequipa, geográficamente ubicado entre las coordenadas latitud sur 16°23'57.41", longitud oeste 71°32'12.79". Con los objetivos de evaluar el efecto del dilutor, raza y tiempo de conservación sobre la calidad seminal y funcional del semen porcino conservado, se eligieron aleatoriamente dos razas de reproductores porcinos machos adultos (Yorkshire y Landrace), a los cuales se les evaluó la fracción rica del eyaculado de cinco colectas, con una frecuencia de recolección semanal. Los indicadores de calidad espermática evaluados fueron macroscópicos (volumen y color de eyaculado) y microscópicos (motilidad,

concentración, morfología e integridad de membrana) cada uno con dos dilutores y esto a su vez en diferentes horas (0, 24, 48, 72 horas). En el análisis estadístico se aplicó un Análisis de varianza para un diseño completamente al azar con un arreglo factorial 2x2x2 (dos dilutores, cuatro tiempos de evaluación y dos razas evaluadas), para las características macroscópicas (volumen, color) y microscópicas (motilidad, integridad de membrana), se analizó con una prueba no paramétrica de Chi Cuadrado. Luego del periodo experimental se lograron los siguientes resultados: Volumen promedio (ml) 140.00a para Landrace y 122.00a para Yorkshire (Letras diferentes denotan diferencia estadística significativa $P < 0.05$). Se observó que el 100% de las muestras presentaron el color blanco característico de semen. La concentración promedio (espermatozoides por ml) fue 25.80a para Landrace y 23.20a para la raza Yorkshire. Se observó que la motilidad promedio (%) de semen según el dilutor y tiempo de conservación fue: para el dilutor A en la hora 0 de 77.30a, en la hora 24 de 73.90a, en la hora 48 de 70.70a, y en la hora 72 de 67.50a, y para el Dilutor B en la hora 0 de 77.30a, en la hora 24 de 72.80a, en la hora 48 de 68.90a, y en la hora 72 de 65.00a. Integridad de membrana promedio (%) según el dilutor y tiempo de conservación fue: para el dilutor A en la hora 0 de 92.4a, en la hora 24 de 85.9a, en la hora 48 de 71.6a, y en la hora 72 de 61.1a, y para el dilutor B en la hora 0 de 92.4a, en la hora 24 de 86.05a, en la hora 48 de 71.85a, y en la hora 72 de 61.95a. Se observó que la motilidad promedio (%) en semen según raza y tiempo de conservación fue: Para la raza Landrace en la hora 0 de 89.60a, en la hora 24 de 85.50a, en la hora 48 de 82.70a, y en la hora 72 de 79.90a, y para la raza Yorkshire en la hora 0 de 96.80b, en la hora 24 de 93.20b, en la hora 48 de 90.60b, y en la hora 72 de 88.20b (Letras diferentes denotan diferencia estadística significativa $P < 0.05$). La Integridad de membrana promedio (%) en semen según raza y tiempo de conservación fue: para la raza Landrace en la hora 0 de 73.00a, en la hora 24 de 69.10a, en la hora 48 de 65.90a, y en la hora 72 de 63.10a, y para la raza Yorkshire en la hora 0 de 81.60b, en la hora 24 de 77.60b, en la hora 48 de 73.70b, y en la hora 72 de 69.40b (Letras diferentes denotan diferencia estadística significativa $P < 0.05$). Se concluye que el factor que más influye en la calidad seminal y funcional del semen de porcino conservado es la raza⁴⁰.

Brito, D y Reinoso, N.⁴¹ realizaron un trabajo de investigación para mejorar las condiciones de colecta seminal con Electroeyaculador (EE) intentando sobre todo preservar el bienestar animal durante el proceso de la colecta. Se realizó con tres toros adultos de fenotipo Criollo, en dos situaciones diferentes: T1- sin tranquilizante y T2- con tranquilizante (xilacina 2%) aplicado previo a la colecta. El semen fue colectado durante 9 sesiones, sumando un total de 27 colectas. Para determinar el efecto del tranquilizante durante la extracción seminal se evaluaron dos indicadores de estrés; cortisol y progesterona, mediante muestras sanguíneas tomadas en cinco momentos: 20 y 5 minutos antes, al momento de la colecta y a los 5 y 20 minutos posteriores a ésta, y también por medio de muestras fecales. Además, se analizó las características seminales cuali-cuantitativas; luego se procesó, congeló y valoró posdescongelación con el fin de evaluar el efecto del tranquilizante. El análisis seminal en fresco no fue significativo ($P > 0,05$) al comparar los dos tratamientos, pero en posdescongelación si existió diferencias ($P < 0,05$) para la variable HOST. Los niveles séricos de cortisol mostraron diferencias significativas a los 5 minutos antes y 5 minutos posteriores a la colecta, para P4 hubo diferencias a los 5 minutos luego de la colecta. Estas dos hormonas al ser analizarlas en heces a las 8 horas luego de la electroeyaculación, fueron estadísticamente diferentes al comparar los tratamientos. En conclusión, el uso de xilacina no mejora las características seminales, sin embargo disminuye el estrés generado tras el proceso de electroeyaculación en toros.

2.2.2.- Otros trabajos de investigación

Ávila, L. y Col.⁴² realizaron una investigación para entender y aplicar adecuadamente la criopreservación de material biológico que es fundamental en laboratorios y bancos de células. Reportan que sin embargo aunque se han implementado protocolos para criopreservación, aún no se tienen los ideales en la mayoría de los casos. Indican que. El objetivo de esta revisión es dar a conocer ciertos parámetros inherentes al proceso de criopreservación y la importancia de conocer ciertas características de la célula que pueden incidir con la viabilidad del producto congelado para lograr la técnica adecuada. Para alcanzar este propósito, el documento se basará en el conocimiento de las propiedades fisicoquímicas de la célula y/o el tejido, pues este proceso es afectado por diferentes variables como permeabilidad celular, volumen osmóticamente inactivo y relación superficie/área

de la célula, la cual es variable de acuerdo a la especie, tipo y estadio de la célula a congelar. La estructura y composición de las membranas plasmáticas determinan los principales eventos celulares que tienen lugar durante los procesos de criopreservación; las bajas temperaturas afectan la difusión y ósmosis a través de las membranas y cada célula maneja su propio perfil biofísico el cual interactúa con diferentes criopreservantes celulares. El hallar el protocolo adecuado será lo que garantice la viabilidad y funcionabilidad celular.

María I. Albers Álvarez y Diego R. Barrios Arismendi⁴³ realizaron un estudio para evaluar la motilidad individual de los espermatozoides presentes en la cola del epidídimo, obtenida del matadero mediante lavado retrogrado de testículos de toros cebú post-mortem. Los testículos fueron recolectados al azar ($n=90$) y transportados bajo dos diferentes temperaturas, siguiendo dos diferentes protocolos: protocolo 1 ($T: 35\text{ }^{\circ}\text{C}$) y protocolo 2 ($T: 25\text{ }^{\circ}\text{C}$), durante el periodo abril-julio 2003. El material experimental fue transportado según el protocolo elegido al azar, desde el sitio de recolección hasta el laboratorio en un lapso comprendido entre 30 y 60 minutos. Se realizó histopatología para seleccionar los testículos que tuvieran 70% o más de tejido funcional para cada protocolo (protocolo 1: $n=13$; y protocolo 2: $n=20$). Una vez realizada la selección, se evaluó la movilidad individual de los espermatozoides recolectados de las colas epididimarias en los testículos seleccionados. Esta recolección se realizó por lavado retrogrado con tris-yema-glicerol, a través del conducto deferente. Para cada protocolo se hicieron dos lecturas de la movilidad individual espermática (MI1 y MI2), con intervalo de 1 hora entre cada lectura. Los datos se analizaron mediante estadística descriptiva y se realizó una prueba de T para comparar dos muestras independientes. Los resultados obtenidos indican que no hubo diferencia significativa ($P<0,05$) entre los dos protocolos en el comportamiento de la movilidad individual. Esto nos indica que la temperatura de transporte no afecta la movilidad espermática epididimaria y que es posible recolectar espermatozoides vivos de la cola del epidídimo de toros post-mortem.

Restrepo G y col⁴⁹ Diversos factores influyen sobre la capacidad fertilizante del semen canino criopreservado. Las alteraciones estructurales, y los efectos osmóticos y tóxicos sobre los espermatozoides, han centrado el interés en

desarrollar nuevas técnicas de criopreservación y crioprotectores con mayor potencial para la conservación de la capacidad fertilizante del semen. Objetivo. Comparar el efecto de la congelación rápida con glicerol y dimetilformamida sobre la calidad post-descongelación del semen canino. Materiales y métodos. En un proceso de criopreservación por congelación rápida, fueron implementados cuatro tratamientos (glicerol al 3% y 5%, y dimetilformamida al 3% y 5%). Posterior a la descongelación, fueron evaluados para cada tratamiento, la movilidad individual, la morfología espermática y la integridad de membrana de los espermatozoides. La evaluación estadística se realizó mediante un análisis de varianza y una prueba de diferencia significativa mínima de Fisher. Resultados. Para la movilidad individual se encontró superioridad del glicerol 5% ($58\% \pm 7.8$) sobre DMF 5% ($44.5\% \pm 17.7$), glicerol 3% ($18\% \pm 10.1$), y DMF 3% ($11.8\% \pm 10.5$). Para la integridad de membrana, DMF 5% obtuvo el mayor promedio ($33.4\% \pm 9.7$), siendo superior a glicerol 3% ($27.5\% \pm 4.3$) y DMF 3% ($24.2\% \pm 5.3$), pero sin diferencia estadística sobre glicerol 5% ($31.4\% \pm 3.8$). Para la morfología espermática no se encontró diferencia estadística entre glicerol 5% ($67\% \pm 11.9$), glicerol 3% (65.6 ± 12.5), y DMF 5% ($60\% \pm 16.5$), pero sí hubo diferencia entre estos y DMF 3% ($50.1\% \pm 18.3$). Conclusiones. El glicerol y la DMF en concentraciones del 5% proveen una protección similar del semen canino durante la criopreservación por congelación rápida

CAPITULO III

II. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.- Materiales

3.1.1.- Localización del trabajo

a.- Localización espacial

La presente investigación se desarrolló en el Laboratorio de investigación de Biotecnología animal F – 405 del Vicerrectorado de Investigación en el Campus de la Universidad Católica de Santa María, la toma de muestras en campo se realizaron en Quiscos ubicado en el distrito de Yura, provincia de Arequipa, ambos ubicados, en la región de Arequipa, geográficamente ubicada a una latitud Sur $16^{\circ} 23' 55,69''$, longitud Oeste $71^{\circ} 32' 12,81''$.

La región de Arequipa se encuentra a una altitud de 2 328 m.s.n.m, con una temperatura promedio de $15,8^{\circ}\text{C}$ con una variabilidad de $8,2^{\circ}\text{C}$ a $25,6^{\circ}\text{C}$, con una humedad relativa mayor a 27% y menor a 70% y una precipitación promedio de 78 mm⁴⁴.

b.- Localización temporal

La presente investigación se desarrolló durante los meses de diciembre 2016 a diciembre 2017 para el desarrollo de trabajo de gabinete y de campo.

3.1.2.- Materiales biológicos

- Semen fresco colectado de 5 toros de lidia por electro eyaculación.
- Órganos de matadero de 5 machos recién faenados obtenidos de camales de la zona de estudio.

3.1.3.- Material de laboratorio

Reactivos

- Solución salina formolada
- Solución HOS formol
- Solución HOS

- Agua destilada ionizada
- Solución fisiológica al 0.09%
- Eosina nigrosina
- Rosa de bengala
- Dilutor de semen (continental)
- Nitrógeno líquido
- Yema huevo
- Alcohol polivinilico
- Glicerol
- Dimetilformamida (DMF)

Materiales

- Termocupla
- Jeringas 1 cc.
- Rampa de congelar
- Pipetas Pasteur
- Micropipetas (0 a 10 microlitros)
- Micropipetas (10 a 100 microlitros)
- Micropipetas (100 a 1000 microlitros)
- Tubos Falcon de 15 cc
- Porta y cubreobjetos
- Crioviales(1,5 2 y 5 ml)
- Cámara de Neubauer
- Tips
- Placas Petri
- Catéter N° 20
- Jeringa de 10 ml
- Estuche de disección.
- Hojas de bisturí N°21
- Mango de bisturí N° 4

3.1.4.- Material de campo

- Registros
- Manga para bovinos
- Equipo de electroeyaculación

- Equipo de cómputo portátil
- Cámara digital
- Caja térmica
- Hielo
- Papel toalla
- Guantes
- Tijeras

3.1.5.- Equipo y maquinaria

- Microscopio óptico a 100, 400 y 1000 aumentos.
- Microscopio de contraste de fases a 100, 400 y 1000 aumentos.
- Cámara para microscopio
- Platina térmico
- Contador de células
- Equipo de baño María.
- Refrigeradora.
- Equipo de cómputo portátil
- Equipo mínimo de disección

3.1.6.- Otros materiales

- Materiales de escritorio
- Materiales de impresión

3.2.- Métodos

3.2.1.- Muestreo.-

a.- Universo

Se consideró como universo los toros de lidia del criadero un número de 10 animales.

b.- Tamaño de muestra

Convenientemente se utilizó 10 colectas de semen como tamaño muestral, 5 para colecta por electro eyaculación y 5 para colecta de cola de epidídimo.

c.- Procedimiento de muestreo

Mediante un muestreo aleatorio simple, se asignaron las repeticiones según tratamiento.

3.2.2.- Métodos de evaluación

a.- Metodología de la experimentación

Se utilizó toros de lidia a los cuales se realizó extracciones de semen mediante el electro eyaculador.

La técnica de electro eyaculación consiste en dar pulsos eléctricos muy leves en la próstata y vesículas seminales para que el animal presente eyaculación. Con la utilización del electro eyaculador, como método para la recolección de semen, la eyaculación es un proceso bifásico, primero ocurre la emisión y continúa con la erección y la eyaculación propiamente dicha. Cuando se produce la estimulación adecuada, esta viaja vía nervio pudendo interno hacia los centros lumbosacros de la columna vertebral, desde allí parte la respuesta vía nervios simpáticos lumbares (del plexus hipogástrico), lo cual estimula la contracción de la musculatura lisa que recubre la próstata, glándulas vesiculares y conductos deferentes, asegurando la progresión de la masa espermática hacia la uretra pélvica⁴⁵.

Método de Extracción de semen mediante electroeyaculación. Primero se aseguró que las tres líneas metálicas o electrodos ubicados ventralmente, estén limpios y libres de corrosión. Posteriormente se retiró el exceso de heces del recto, se levantó la cola del toro hasta hacerla horizontal, se lubrica el electrodo y se introduce en el recto, dirigiéndolo ligeramente hacia abajo y haciendo movimientos rotatorios. Una vez insertado completamente el electrodo, se colocó la cola en el medio del mango (en forma de “U”) de este y se sujeta con la misma mano que sujetaba la cola⁴⁵.

Cuando se utiliza la electroeyaculación se inician los estímulos a mínima intensidad y rítmicamente se incrementa, de acuerdo con la reacción del animal, cada estímulo debe durar menos de un segundo y se deben aplicar entre

5 y 10 estímulos por cada grado de intensidad. Las reacciones son muy variables entre animales y aun en el mismo animal⁴⁵.

Para la sujeción de los toros de lidia se usó una manga que pudo albergar a la mayoría de los animales grandes. Los animales deben estar parados libremente y la manga debe tener un buen piso. Los animales que son sujetados de la cabeza, comúnmente se arrodillan y luego durante la electroeyaculación se vuelcan en estos casos un cinturón por debajo del tórax pueden ser de utilidad⁴⁶.

Es muy importante destacar que la cantidad de estimulación debe ser estimada a través de las respuestas del animal y no prestando atención al voltaje del equipo. La primera estimulación debe ser pequeña hasta que el macho demuestre una mínima respuesta. Las estimulaciones sucesivas deben ir siendo incrementadas, con una duración de uno o dos segundos y luego discontinuarse por medio segundo antes de comenzar con la siguiente estimulación. El fluido pre seminal no debe recolectarse porque diluye el eyaculado y puede originar falsos resultados. Cuando éste comienza a tornarse más opaco y espeso comienza la colección en el cono o tubo colector colocado directamente en el pene⁴⁶.

Método de Extracción de espermatozoides del epidídimo. Se utilizaron pares de testículos de toros, colectados en el Faenamamiento del animal.

Primero se realizó la colecta de los testículos (en su bolsa escrotal) del riel de matanza, pocos segundos (entre 10 y 20) después de la muerte del toro, cada bolsa escrotal fue limpiada cuidadosamente con toallas de papel y colocadas dentro de bolsas plásticas (bolsas zip-lock) e identificadas, y estas a su vez se colocaron en una caja con temperatura de 37-38°C, el transporte de los testículos al laboratorio de Biotecnología Animal tardó entre 30 y 45 minutos.

En el laboratorio los testículos fueron retirados de la caja térmica, lavadas con solución fisiológica y la cola del epidídimo aislada del testículo y del tejido conectivo adyacente. Luego, la cola del epidídimo fue secada con una gasa

estéril y los espermatozoides fueron colectados con la técnica de flujo retrógrado. Esta técnica consiste en pasar un catéter N° 20 por el ducto deferente, el cual es conectado a una jeringa de 10 ml, conteniendo medio diluyente, sin crio protector. Luego, se procedió al lavado de la cola del epidídimo, hasta que todo el contenido de la jeringa extravase la parte final del mismo; finalmente la muestra fue depositada en una placa de Petri sobre una superficie previamente calentada.

Análisis espermático. Después de la colecta, los espermatozoides fueron analizados en cuanto a motilidad, concentración, integridad estructural y funcional de la membrana plasmática (prueba hipo osmótica) y viabilidad espermática (coloración con eosina/nigrosina).

Para la evaluación de motilidad, una alícuota espermática fue depositada sobre una lámina previamente calentada, recubierta por un cubreobjetos y observada en un microscopio de contraste de fase, con el objetivo de 100X. La motilidad se caracterizará por la presencia de movimientos rectilíneos y fue dada en una puntuación de 0, 1, 2, 3, 4 y 5³⁸.

La concentración espermática se evaluó luego de la dilución de 1:50 de los espermatozoides en solución salina formolada. Los espermatozoides diluidos fueron colocados en la cámara de Neubauer y las células fueron contadas en un microscopio de contraste de fase, con objetivo de 400X. El valor obtenido fue dado en millones/ml.

La integridad funcional de la membrana fue evaluada por el parámetro hipoosmótico según la técnica descrita por González RA⁴⁷ utilizando una solución hipoosmótica de 150 mOsmol. Fueron contadas 200 células espermáticas, en varios campos de la lámina, escogidos aleatoriamente, siendo considerados espermatozoides con integridad funcional de la membrana aquellos que presentaron edema, evidenciado por el enrollamiento de la cola. Los resultados fueron presentados en porcentaje de espermatozoides con integridad funcional de la membrana (cola enrollada en el test).

La viabilidad espermática se evaluó utilizando una solución de eosina/nigrosina preparada según Barth AD y Oko RJc⁴⁸. Se preparó un frotis con una alícuota de 5 μ L de la solución y la misma cantidad de semen. Después de secar al aire, la lámina fue analizada, contándose 200 células en microscopio óptico (400X), se consideran células con la membrana lesionada aquellas coloreadas en rosa. Los resultados fueron presentados en porcentaje de espermatozoides viables (espermatozoides no coloreados de rosa)³⁸.

Congelación y descongelación espermática. Después del análisis, el contenido espermático fue separado en dos alícuotas, destinadas a congelación por el método convencional. A partir de la concentración espermática de la muestra colectada, la cantidad de diluyente se calculó en ml. El contenido espermático, de la primera muestra fue diluido y criopreservado en un medio que contiene aproximadamente 4% de Glicerol en la solución final. La segunda muestra en un criopreservante que contenga Dimetilformamida al 4%.

Después de la dilución, las muestras fueron envasadas, a temperatura ambiente de 25 °C, en pajillas francesas de 0,5 ml, conteniendo aproximadamente 50×10^6 espermatozoides/pajilla. Las pajillas se congelaron por el método convencional. En el método convencional las pajillas son acomodadas en una canastilla de metal y refrigeradas a 4 °C, durante 4 horas, en nevera doméstica. Luego de este periodo, la canastilla de metal, con las pajillas, fueron transferidas a una caja de poliestireno, conteniendo nitrógeno líquido y acomodados 6 cm por encima de la superficie líquida, durante 20 minutos. Finalmente, las pajillas fueron sumergidas en nitrógeno líquido y posteriormente almacenadas en un termo de nitrógeno líquido.

Las pajillas de ambos grupos fueron descongeladas a 37 °C en baño María, durante 30 segundos, para evaluación de células pos-congelación, que se realizó de acuerdo a los POE'S establecidos.

Evaluación de semen criopreservado

Funcionalidad de la membrana plasmática o integridad celular (HOST).

Se realiza con el Test de endosmosis (HOS). Se coloca en un tubo de ensayo 125 μ l de solución HOS a 37°C y 12.5 μ l de semen, incubándolo a 37°C durante 10

minutos, se detiene la reacción agregando 25 μ l de Solución HOS Formol y se coloca entre porta y cubreobjetos 5 μ l de la muestra observando con microscopio de contraste de fase a 400X. Los espermatozoides con cola enrollada totalmente, parcialmente, o simplemente acodada se consideraron vivos (reaccionados) y el resultado final se expresará porcentualmente. En cada muestra seminal debe observarse un mínimo de 40% de reaccionados para considerarla adecuada³⁸.

Integridad del acrosoma. Para la evaluación se colocará una gota de semen sobre un portaobjetos y al lado una gota similar de glutaraldehído al 0,2% diluido con buffer fosfato salino. Se realizarán tres lecturas por cada pajuela descongelada utilizando un microscopio de contraste de fase (1000X) y contando en cada extendido 100 espermatozoides. Para ello la muestra de semen se fijará con glutaraldehído al 2%. El defecto puede ser la falta total del capuchón acrosómico o su pérdida en distintas proporciones³⁸.

El resultado final se expresará en porcentaje e indica la proporción de acrosomas dañados (AD), no más del 50% de los espermatozoides deberán presentar acrosomas dañados para que la dosis sea considerada de calidad³⁸.

Porcentaje de espermatozoides vivos. Se utilizará la técnica de eosina nigrosina aplicada sobre una gota de semen, luego se realizará un extendido y una vez seco se observará al microscopio óptico (40X). Se contará un total de 200 espermatozoides indicando el número de espermatozoides blancos o sin colorante (vivos) respecto de los que se observan coloreados o rojos (muertos). El fondo del preparado se observará grisáceo o negruzco haciendo contrastar a los espermatozoides³⁸.

Motilidad individual progresiva. El porcentaje de motilidad progresiva y el vigor serán determinados inmediatamente después de descongelado el semen y luego de 2 horas de incubación. Una gota de semen delgada y uniforme es colocada entre porta y cubre objeto tibios procediendo a evaluar a 100 aumentos el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva y luego, la tasa de progresión (vigor). Esta, puede ser cuantificada utilizando la siguiente escala³⁸

CUADRO N° 04
CALIFICACIÓN DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA

Escala	Descripción
0	Sin movimiento
1	Ligera ondulación o vibración de cola, sin progresión
2	Progresión lenta, incluyendo detención y comienzo de movimiento
3	Movimiento progresivo continuo y moderada velocidad
4	Movimiento progresivo, rápido
5	Movimiento progresivo muy rápido, en el cual las células son difíciles de seguir visualmente.

Fuente: Reátegui y col, 2016³⁸

El semen de buena calidad, que ha sido recientemente descongelado, normalmente tiene 40-50% de espermatozoides con motilidad progresiva y un vigor de 3-4. Después de 2 horas de incubación, estos valores generalmente disminuyen un 10 - 15% y 1 punto, respectivamente. Las normas mínimas para motilidad exigidas que se corresponden con las de las normas ISO 9002 son: 0 hs.= 25% de espermatozoides con motilidad progresiva³⁸

Con respecto a las Malformaciones Espermáticas, se las puede clasificar siguiendo diferentes criterios:

1) Primarias y Secundarias: Es la clasificación más usada en la bibliografía, pero no por ello la más exacta. Las malformaciones Primarias por definición, son aquellas que se originan dentro del testículo durante la espermatogénesis y malformaciones Secundarias son aquellas que se originan dentro del epidídimo; cabe destacar que por definición se denota el origen y no la severidad del defecto³⁷

2) Mayores y Menores: Esta clasificación la propuso Bloom en 1977 y llamó malformaciones Mayores a aquellas que estaban asociadas con infertilidad y malformaciones Menores a aquellas que, al momento de crear el método de clasificación, no se encontraban relacionadas con la fertilidad en forma directa³⁷

3) Compensables y No Compensables: En 1994 Saacke y col. propusieron clasificar los defectos como Compensables a aquellos en los que el espermatozoide no llega a la vecindad del ovocito y no evita que otro espermatozoide realice la fertilización; por lo tanto si se aumenta la concentración de la dosis seminal, se podría llegar a compensar este tipo de malformación, tal

es el caso de espermatozoides con problemas en el sistema de locomoción. Un defecto no compensable es aquel en el cual el espermatozoide está perfectamente capacitado para llegar hasta el ovocito, realiza el bloqueo de la polispermia pero es incapaz de continuar el proceso de fertilización³⁷

En la actualidad, quizás lo más adecuado sea identificar cada una de las anomalías por su ubicación dentro de la estructura del espermatozoide y la relación de cada una de ellas con la fertilidad, para lo cual aún se requieren muchos estudios para poderlo dilucidar fehacientemente en todos los casos. En general el número máximo de anomalías de cabeza aceptable se encuentra entre un 15 y un 20%. Con respecto a las anomalías de acrosoma y cola se puede aceptar hasta un 25%. Fuese cual fuese el sistema de clasificación, en ninguno de los casos se debe esperar un mínimo de 70% de espermatozoides normales en el eyaculado para poder aceptar un toro como apto reproductivo en cuanto a su semen, tanto para rodeo general, como para congelar³⁷

b.- Recopilación de la información

- **En el campo:** las muestras se obtuvieron mediante electro eyaculación y de cola epidídimo en órganos de matadero. (ver ficha)
- **En el laboratorio:** se realizó la evaluación microscópica y funcional de las muestras de semen colectadas en campo. (ver ficha)
- **En la biblioteca:** se realizó una revisión bibliográfica de libros, revistas y tratados del tema en mención.
- **En otros ambientes generadores de la información científica:** se consultó con expertos en el tema, revisión de páginas web, revistas indexadas y otros.

3.2.3.- Variables de respuesta

A.- Variables independientes

Semen fresco del eyaculado completo de toros de lidia

Semen fresco de la cola del epidídimo de toros de lidia

B.- Variables dependientes

Semen criopreservado con glicerol

Semen criopreservado con dimetilformamida

CUADRO N° 05
OPERALIZACIÓN DE VARIABLES

	VARIABLE	INDICADOR	SUBINDICADOR	SUB- SUBINDICADOR
Variable independiente	Semen fresco de toro	• Del Eyaculado	• Macroscópico	<ul style="list-style-type: none"> • Color • Volumen • PH
			• Microscópico	<ul style="list-style-type: none"> • Motilidad • Vitalidad • Morfología • Concentración
			• Funcionalidad	<ul style="list-style-type: none"> • Host
		• Del Epidídimo	• Macroscópico	<ul style="list-style-type: none"> • Color • Volumen • PH
			• Microscópico	<ul style="list-style-type: none"> • Motilidad • Vitalidad • Morfología • Concentración
			• Funcionalidad	<ul style="list-style-type: none"> • Host
Variable dependiente	Semen criopreservado	• Dimetilformamida	• Microscópico	<ul style="list-style-type: none"> • Motilidad • Vitalidad • Morfología • Concentración
			• Funcionalidad	<ul style="list-style-type: none"> • Host
		• Glicerol	• Microscópico	<ul style="list-style-type: none"> • Motilidad • Vitalidad • Morfología • Concentración
			• Funcionalidad	<ul style="list-style-type: none"> • Host

CAPITULO IV

IV RESULTADOS Y DISCUSIONES

CUADRO N° 06

Motilidad espermática a las 0 horas con el criopreservante glicerol y dimetilformamida en semen obtenido del eyaculado completo en toros de lidia

Motilidad 0 horas	Criopreservante	
	Glicerol	DMF
Media	3,80	2,52
Desviación	0,41	0,51
Máximo	4,00	3,00
Mínimo	3,00	2,00
TAMAÑO	25	25

t=10.42

P<0.05

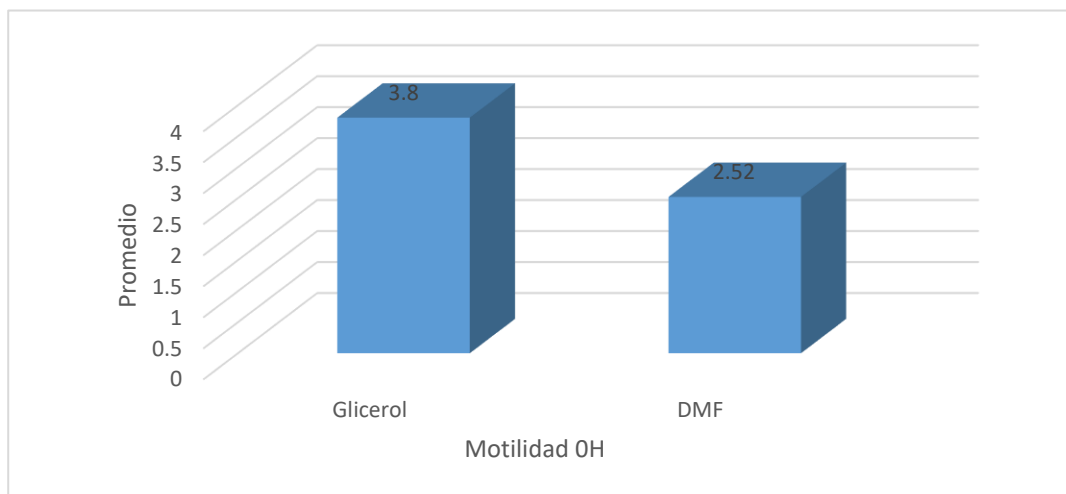
El cuadro N° 06, presenta la motilidad espermática a las 0 horas comparando los dos dilutores glicerol y dimetilformamida, en semen obtenido del eyaculado completo.

La motilidad se evaluó en una escala del 0 al 5; siendo 0 la puntuación mínima para espermatozoides inmóviles y 5 para una motilidad alta. Se observa una media de 3,80 para el criopreservante glicerol y de 2,52 para el caso de dimetilformamida. Se observa una mayor motilidad con el criopreservante glicerol que con el dimetilformamida, lo que afirma que el glicerol tiene propiedades que ayudan a la supervivencia espermática post congelación. ⁽³²⁾

Según la prueba de t de studen, muestra que la motilidad a las 0 horas en glicerol y dimetilformamida presentaron diferencia estadística significativa (P<0.05).

Los datos del cuadro N° 06 se ven expresados en el gráfico N° 01 donde se observa la motilidad espermática a las 0 horas comparando los dilutores glicerol y dimetilformamida, semen obtenido del eyaculado completo.

GRAFICO N° 01
Motilidad espermática a las 0 horas con el criopreservante glicerol y dimetilformamida en semen obtenido del eyaculado completo en toros de lidia



En la gráfica se observa la motilidad espermática a las 0 horas para los dos dilutores en estudio, que comparado con lo reportado por Álvarez, et al. (2017)⁵⁰ quienes reportan una motilidad de 2,01 (24,06% promedio) y 3,03 (57,17% promedio) para criopreservante glicerol y dimetilformamida muestra una variación considerable en los valores frente a nuestro estudio, reportando valores mayores a dimetilformamida que podría deberse al uso de concentración del mismo (5%).

La motilidad fue evaluada en una escala del 0 al 5 siendo relacionada con los siguientes porcentajes:

- 5=80-100%
- 4 = 60-79%
- 3= 40-59%
- 2= 20-39%
- 1= 5-19%
- 0 = menos de 5%

Por su parte Terreros, et al. (2015)⁵¹ que utilizó el criopreservante dimetilsulfoxido obtuvo una motilidad de 31,10% a las 0 horas, los resultados del presente fueron mayores probablemente porque el glicerol atribuye principalmente a su habilidad de prevenir la acumulación excesiva de electrolitos y otras sustancias durante el proceso de congelación, lo que ayuda a la motilidad y supervivencia de los espermatozoides descongelados.

CUADRO N° 07

Motilidad espermática a las 2 horas con el criopreservante glicerol y dimetilformamida en semen obtenido del eyaculado completo en toros de lidia.

Motilidad 2 horas	Criopreservante	
	Glicerol	DMF
Media	1,80	0,68
Desviación	0,50	0,63
Máximo	3,00	2,00
Mínimo	1,00	0,00
TAMAÑO	25	25

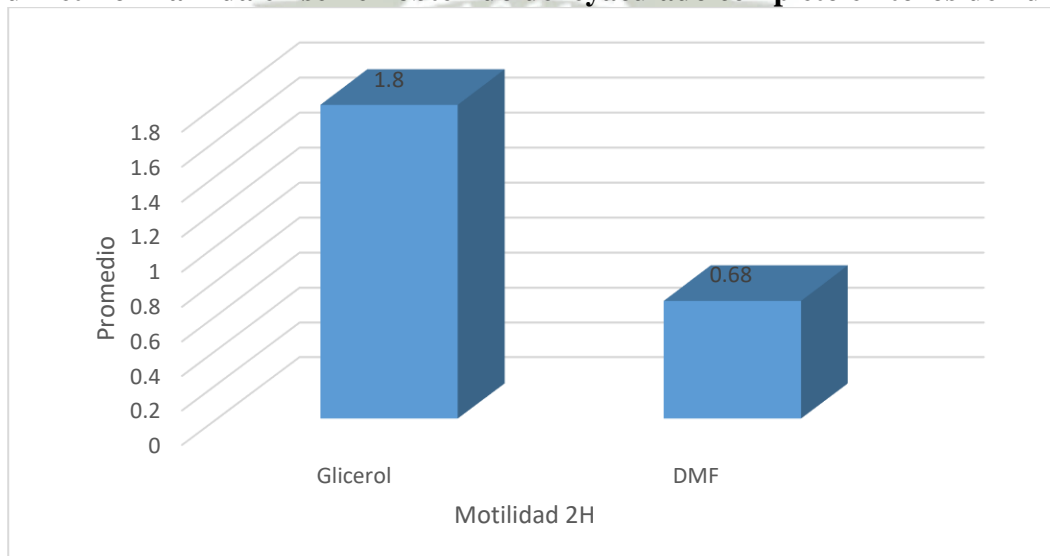
t=7.72

P<0.05

En el cuadro se observa la motilidad espermática a las 2 horas, comparando los dos dilutores en estudio, en semen obtenido del eyaculado completo teniendo como media $1,80 \pm 0,50$ para el caso de glicerol y $0,68 \pm 0,63$ para el caso de dimetilformamida, siendo valores máximos 3,00 y 2,00 respectivamente. Según la prueba de t de student, muestra que la motilidad 2 horas en glicerol y dimetilformamida presentaron diferencia estadística significativa ($P<0.05$). Cabe mencionar que dicha evaluación no es descrita por muchos autores, la mayoría de la bibliografía no toma en cuenta dicho parámetro pero a nuestro parecer es un referencia importante ya que podemos ver la eficiencia del crioprotector no solo al momento de la descongelación sino también a un tiempo determinado, tiempo en el cual podemos realizar distintos trabajos con dichas muestras tanto en laboratorio como en campo, tal como lo muestra la gráfica N° 02

GRÁFICO N° 02

Motilidad espermática a las 2 horas con el criopreservante glicerol y dimetilformamida en semen obtenido del eyaculado completo en toros de lidia



CUADRO N° 08

Viabilidad espermática con el criopreservante glicerol y dimetilformamida en semen obtenido del eyaculado completo en toros de lidia.

Viabilidad	Criopreservante	
	Glicerol	DMF
Media	45,22	33,70
Desviación	3,85	3,05
Máximo	56,00	40,00
Mínimo	38,00	29,00
TAMAÑO	25	25

t=13.28

P<0.05

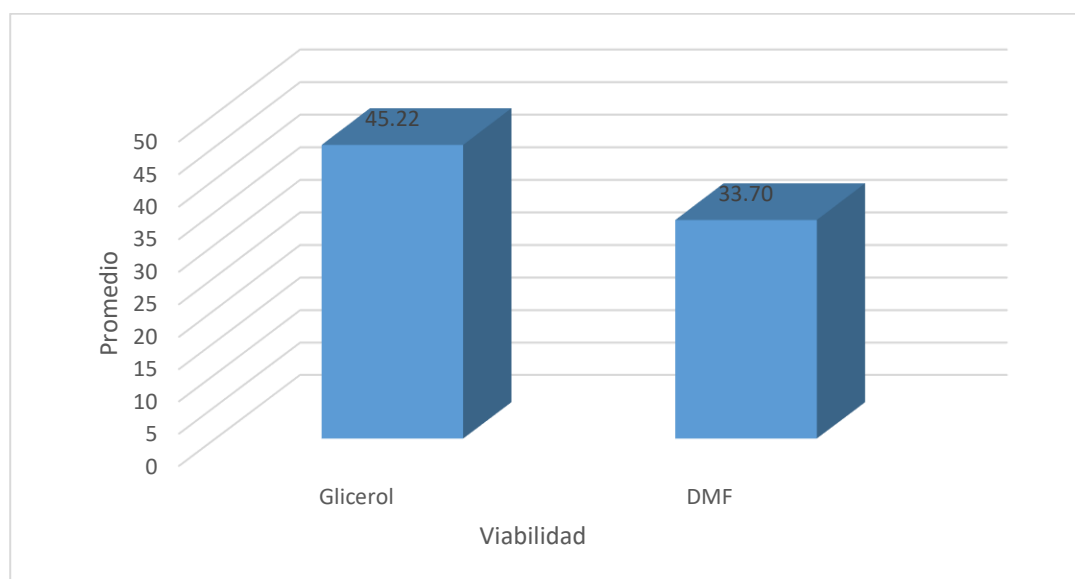
En el cuadro N° 08 se observa la viabilidad espermática con los criopreservantes glicerol y dimetilformamida en semen obtenido del eyaculado completo, presentando una viabilidad de $45.22 \pm 3,85\%$ con el criopreservante glicerol y una viabilidad de $33.70 \pm 3,05\%$ con el criopreservante dimetilformamida, porcentualmente se observa una mejor viabilidad de espermatozoides con el criopreservante glicerol.

Según la prueba de t de student, muestra que la viabilidad en glicerol y dimetilformamida presentaron diferencia estadística significativa ($P<0.05$).

Los datos del cuadro N° 08 se ven expresados en el gráfico N° 03 donde se observa la viabilidad espermática comparando los dilutores glicerol y dimetilformamida de semen obtenido del eyaculado completo.

GRÁFICO N° 03

Viabilidad espermática con el criopreservante glicerol y dimetilformamida en semen obtenido del eyaculado completo en toros de lidia.



En el gráfico se observa la viabilidad espermática comparando los dos dilutores en estudio, donde se obtuvo $45,22 \pm 3,85\%$ con el criopreservante glicerol y de $33,70 \pm 3,05\%$ con el criopreservante dimetilformamida, comparando con lo reportado por Canorio N. et al (2015)⁵², quienes reportan una viabilidad de $62,7 \pm 3,7\%$ para el criopreservante glicerol y $60,7 \pm 3,4$ para el criopreservante Dimetilsulfóxido al 0.5M, muestra una variación considerable en los valores frente al presente estudio, reportando valores mayores de la misma manera con el criopreservante glicerol, debido a su concentración.

Por otra parte Ribeiro A. et al (2014)⁵³, que utilizaron el criopreservante glicerol obtuvieron una viabilidad de $52,7 \pm 9,00\%$, los resultados del presente trabajo fueron mayores debido a la concentración del mismo (6%), cabe mencionar que a pesar de ser datos mayores los reportados los datos del presente trabajo están dentro de los márgenes establecidos.

CUADRO N°. 09
Membrana plasmática espermática con el criopreservante glicerol y dimetilformamida en semen obtenido del eyaculado completo en toros de lidia.

Membrana plasmática	Criopreservante	
	Glicerol	DMF
Media	43,30	32,76
Desviación	3,31	3,36
Máximo	50,00	40,00
Mínimo	38,00	26,00
TAMAÑO	25	25

t=11.43

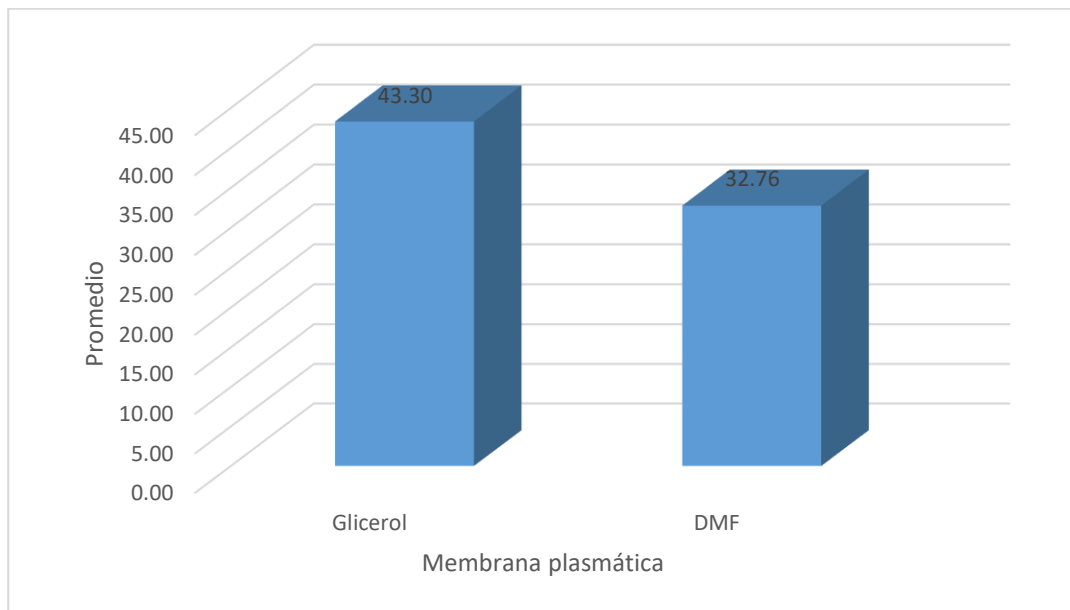
P<0.05

En el cuadro N° 09 se observa la integridad de la membrana plasmática comparando los dos criopreservantes glicerol y dimetilformamida en semen obtenido del eyaculado completo, presentado una integridad de membrana plasmática de $43,30 \pm 3,31\%$ con el criopreservante glicerol y $32,76 \pm 3,36\%$ para el criopreservante dimetilformamida, porcentualmente se observa una mejor viabilidad de espermatozoides con el criopreservante glicerol.

Según la prueba de t de studen, muestra que la evaluación de membrana plasmática en glicerol y dimetilformamida presentaron diferencia estadística significativa ($P<0.05$).

Los datos del cuadro N° 09 se ven expresados en el gráfico N° 04 donde se observa la integridad de la membrana plasmática comparando los dos dilutores en estudio glicerol y dimetilformamida.

GRÁFICO N° 04
Membrana plasmática espermática con el criopreservante glicerol y dimetilformamida en semen obtenido del eyaculado completo en toros de lidia.



Se observa la evaluación de la integridad de la membrana plasmática comparando los dos dilutores obteniendo $43,30 \pm 3,31\%$ con el criopreservante glicerol y $32,76 \pm 3,36\%$ para el criopreservante dimetilformamida, comparando con lo reportado por Terreros, et al (2015)⁵¹, quienes reportan una integridad de la membrana plasmática de $23,9 \pm 8,3$ para el criopreservante glicerol al 7% y $31,1 \pm 8,5$ para el criopreservante dimetilsulfoxido, con lo que llegamos a la conclusión que la concentración del criopreservante es transcendental para una buena calidad seminal pos congelación.

Por otro lado Restrepo, et al. (2011)⁵⁴ reportaron para la integridad de membrana, DMF 5% obtuvo el mayor promedio ($33,4\% \pm 9,7$), siendo superior a glicerol 3% ($27,5\% \pm 4,3$) y DMF 3% ($24,2\% \pm 5,3$), pero sin diferencia estadística sobre glicerol 5% ($31,4\% \pm 3,8$), lo que no indica que la concentración del criopreservante va afectar en la calidad seminal.

CUADRO N° 10
Cabeza espermática con el criopreservante glicerol y dimetilformamida en semen obtenido del eyaculado completo en toros de lidia.

Cabeza	Criopreservante	
	Glicerol	DMF
Media	5,04	7,56
Desviación	2,23	2,68
Máximo	8,00	12,00
Mínimo	0,00	2,00
TAMAÑO	25	25

t=-3.63

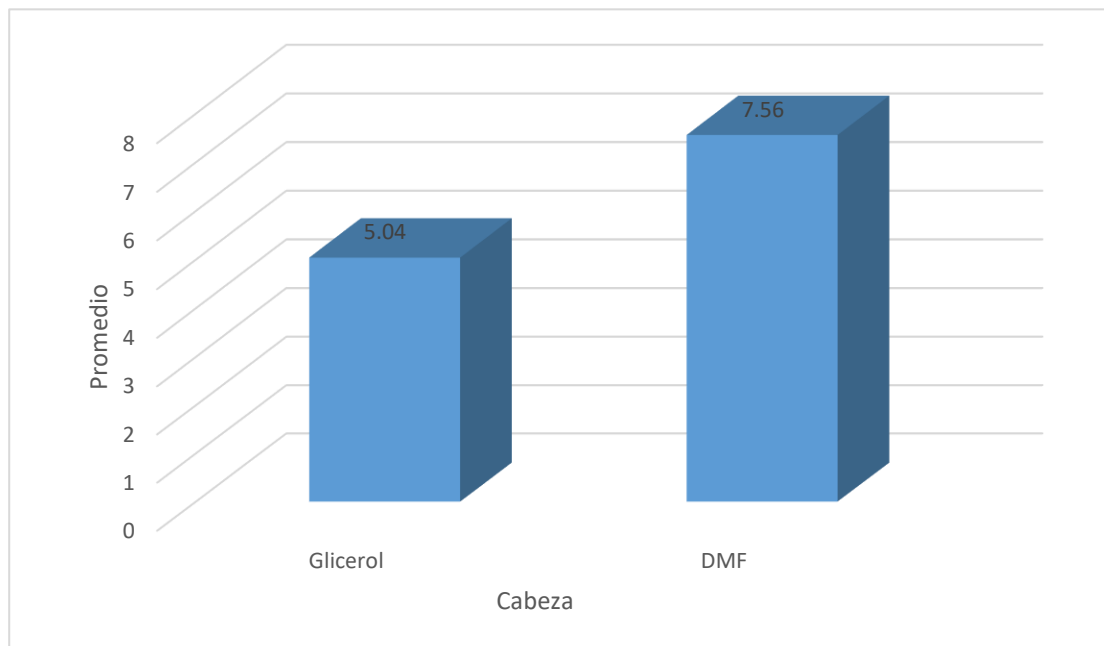
P<0.05

En el cuadro N° 10 se observa las anomalías de la cabeza de los espermatozoides comparando los dilutores en estudio glicerol y dimetilformamida en semen obtenido del eyaculado completo, obteniendo $5,04\% \pm 2,23\%$ de anomalías en el caso del criopreservante glicerol y $7,56 \pm 2,68\%$ de anomalías con el criopreservante dimetilformamida, se puede observar un mayor número de anomalías con el criopreservante dimetilformamida lo que nos da a entender que la fertilidad con dicho criopreservante podría verse afectada.

Según la prueba de t de student, muestra que la cabeza en glicerol y dimetilformamida presentaron diferencia estadística significativa ($P<0.05$).

Los datos del cuadro N° 10 se ven expresados en el gráfico N° 05 donde se observa las anomalías de la cabeza de los espermatozoides comparando los dilutores en estudio glicerol y dimetilformamida en semen obtenido del eyaculado completo.

GRÁFICO N° 05
**Cabeza espermática con el criopreservante glicerol y dimetilformamida en semen
obtenido del eyaculado completo en toros de lidia**



En cuanto a morfología Restrepo, et al. (2011)⁵⁴ no reporta diferencia estadística entre el glicerol al 5% ($67,00 \pm 11,90\%$) y dimetilformamida al 5% ($60,00\% \pm 16,50$). Por otra parte Álvarez, et al. (2017)⁵⁰ no reporta porcentajes de morfología con los cuales se puede discutir y comparar los resultados reportados en la presente investigación. En general el número máximo aceptable de anomalías de la cabeza se encuentra entre 15 y 20 % estando nuestros valores obtenidos muy por debajo de lo indicado en el marco teórico.

CUADRO N° 11

Acrosoma espermática con el criopreservante glicerol y dimetilformamida en semen obtenido del eyaculado completo en toros de lidia.

Acrosoma	Criopreservante	
	Glicerol	DMF
Media	5,32	6,64
Desviación	2,08	2,50
Máximo	9,00	10,00
Mínimo	1,00	2,00
TAMAÑO	25	25

t=-2.15

P<0.05

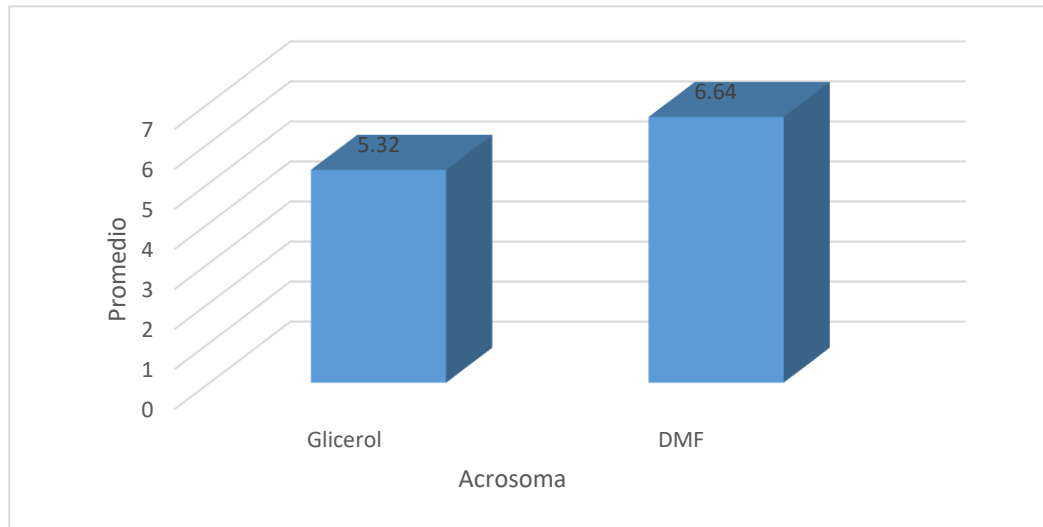
En el cuadro N° 11 se observa las anomalías del acrosoma espermático, comparando los dos dilutores en estudio glicerol y dimetilformamida en semen obtenido del eyaculado completo, obteniendo $5,32 \pm 2,08\%$ de anomalías en el caso del criopreservante glicerol y $6,64 \pm 2,50\%$ de anomalías con el criopreservante dimetilformamida, se puede observar un mayor número de anomalías con el criopreservante dimetilformamida lo que nos da a entender que la fertilidad con dicho criopreservante podría ser baja, no obstante el porcentaje de anomalías con glicerol también es elevado pero ambos están dentro de los rangos establecidos.

Según la prueba de t de student, muestra que el acrosoma en glicerol y dimetilformida presentaron diferencia estadística significativa ($P < 0.05$).

Los datos del cuadro N° 11 se ven expresados en el gráfico N° 06 donde podemos ver las anomalías de la cabeza de los espermatozoides comparando los dilutores en estudio glicerol y dimetilformamida en semen obtenido del eyaculado completo

GRAFICO N° 06

Acrosoma espermática con el criopreservante glicerol y dimetilformamida en semen obtenido del eyaculado completo en toros de lidia.



En cuanto a morfología Restrepo, et al. (2011)⁵⁴ no reporta diferencia estadística entre el glicerol al 5% ($67,00 \pm 11,90\%$) y dimetilformamida al 5% ($60,00\% \pm 16,50$). Por otra parte Álvarez, et al. (2017)⁵⁰ no reporta porcentajes de morfología con los cuales se puede discutir y comparar los resultados reportados en la presente investigación. En general el número máximo aceptable de anomalías del acrosoma y cola es de 25 % estando los valores del presente trabajo valores muy por debajo de lo indicado en el marco teórico.

CUADRO N° 12
Cola espermática con el criopreservante glicerol y dimetilformamida en semen obtenido del eyaculado completo en toros de lidia

Cola	Criopreservante	
	Glicerol	DMF
Media	6,20	9,68
Desviación	2,68	2,01
Máximo	12,00	15,00
Mínimo	2,00	6,00
TAMAÑO	25	25

t=-4.98

P<0.05

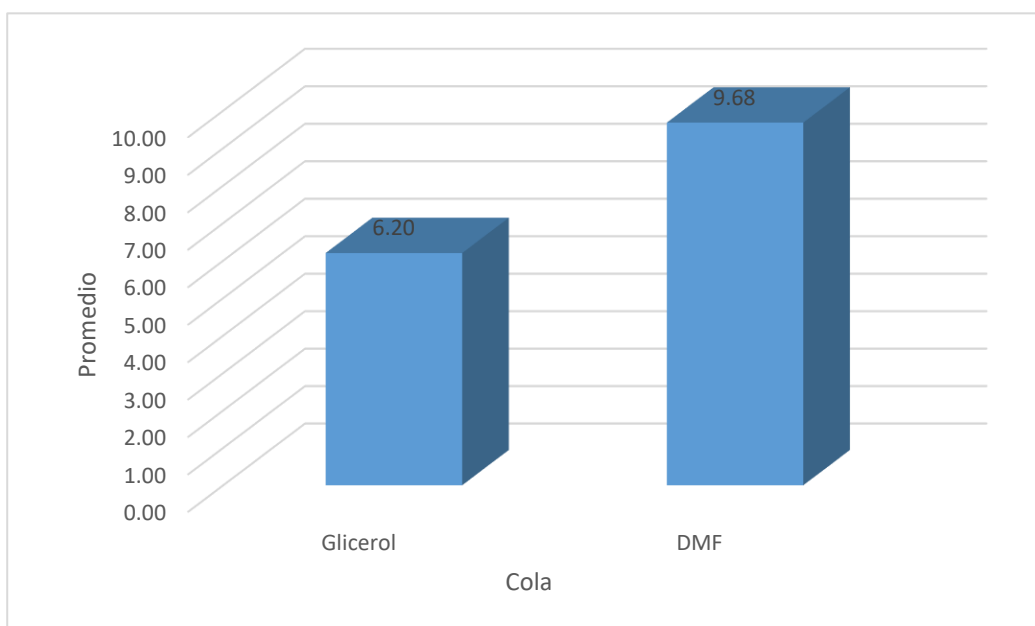
En el cuadro N° 12 se observan las anomalías presentes en la cola de los espermatozoides comparando los dos criopreservantes en estudio, glicerol y dimetilformamida en semen obtenido del eyaculado completo, obteniendo $6,20 \pm 2,68\%$ de anomalías en el caso del criopreservante glicerol y $9,68 \pm 2,01\%$ de anomalías con el criopreservante dimetilformamida, se puede observar un mayor número de anomalías con el criopreservante dimetilformamida lo que nos da a entender que la fertilidad con dicho criopreservante podría ser baja, no obstante el porcentaje de anomalías con glicerol también es elevado pero ambos están dentro de los rangos establecidos.

Según la prueba de t de student, muestra que la cola en glicerol y dimetilformamida presentaron diferencia estadística significativa ($P < 0.05$).

Los datos del cuadro N° 12 se ven expresados en el gráfico N° 07 donde podemos ver las anomalías de la cola de los espermatozoides comparando los dilutores en estudio glicerol y dimetilformamida en semen obtenido del eyaculado completo

GRÁFICO N° 07

Cola espermática con el criopreservante glicerol y dimetilformamida en semen obtenido del eyaculado completo en toros de lidia.



Se observan las anomalías presentes en la cola de los espermatozoides, presentando $6,20 \pm 2,68\%$ de anomalías en el caso del criopreservante glicerol y $9,68 \pm 2,01\%$ para el caso del criopreservante dimetilformamida.

En cuanto a morfología Restrepo, et al. (2011)⁵⁴ no reporta diferencia estadística entre el glicerol al 5% ($67,00 \pm 11,90\%$) y dimetilformamida al 5% ($60,00\% \pm 16,50$). Por otra parte Álvarez, et al. (2017)⁵⁰ no reporta porcentajes de morfología con los cuales se puede discutir y comparar los resultados reportados en la presente investigación.

Con respecto a las anomalías de acrosoma y cola se puede aceptar hasta 25 % de anomalías, fuese cual fuese el sistema de calificación, se debe esperar un mínimo de 70 % de espermatozoides normales para poder aceptar un toro como apto reproductivamente en cuanto al semen.

CUADRO N° 13
Motilidad espermática a las 0 horas con el criopreservante glicerol y dimetilformamida en semen obtenido de la cola del epidídimo en toros de lidia.

Motilidad 0 horas	Criopreservante	
	Glicerol	DMF
Media	2,64	1,36
Desviación	0,49	0,57
Máximo	3,00	2,00
Mínimo	2,00	0,00
TAMAÑO	25	25

t=8.68

P<0.05

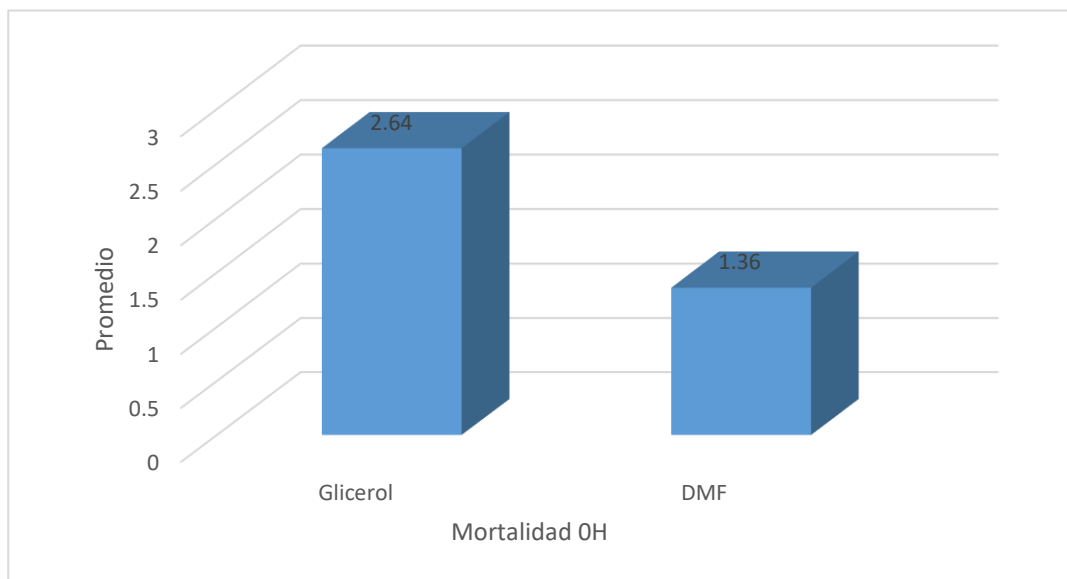
En el cuadro N° 13 se observa la motilidad espermática a las 0 horas comparando los dilutores en estudio glicerol y dimetilformamida en semen obtenido de la cola del epidídimo.

La motilidad se evaluó en una escala del 0 al 5; siendo 0 la puntuación mínima para espermatozoides inmóviles y 5 para una motilidad alta. Se observa una media de 2,64 para el criopreservante glicerol y de 1,36 para el caso de dimetilformamida, al igual que en el semen obtenido del eyaculado completo se puede observar una mayor motilidad con el glicerol, lo que afirma que el glicerol tiene propiedades que ayudan a la supervivencia espermática post congelación. ⁽³²⁾

Según la prueba de t de student muestra que la motilidad 0 horas en glicerol y dimetilformamida presentaron diferencia estadística significativa (P<0.05).

Los datos del cuadro N° 13 se ven expresados en el gráfico N° 08 donde se observa la motilidad espermática a las 0 horas comparando los dilutores glicerol y dimetilformamida de semen obtenido de la cola del epidídimo.

GRÁFICO N° 08
Motilidad espermática a las 0 horas con el criopreservante glicerol y dimetilformamida en semen obtenido de la cola del epidídimo en toros de lidia.



En el gráfico se observa la motilidad espermática a las 0 horas comparando los dos dilutores en estudio, que comparando con lo reportado por Álvarez, et al (2017)⁵⁰ quienes reportan una motilidad de 3.05 (44,89 % promedio) y 3,1 (49,22 % promedio) para los criopreservantes glicerol y dimetilformamida, comparado los resultados con el presente trabajo muestra una variación considerable en los valores frente a nuestro estudio, reportando valores mayores a dimetilformamida que podría deberse al uso de concentración del mismo (5%).

La motilidad fue evaluada en una escala del 0 al 5 siendo relacionada con los siguientes porcentajes:

- 5=80-100%
- 4 = 60-79%
- 3= 40-59%
- 2= 20-39%
- 1= 5-19%
- 0 = menos de 5%

Según Gutiérrez et al. (2004) realizaron recuperación de espermatozoides por lavado Retrógrado con 10 mL de diluyente a base de Tris - Yema de huevo (25%) – Glicerol (5%) después de la descongelación obtuvieron una motilidad de 35.83%, comparándolo con nuestros resultados nos indica que estamos en un promedio lo que nos indica que glicerol actúa mejor sobre el dimetilformamida.

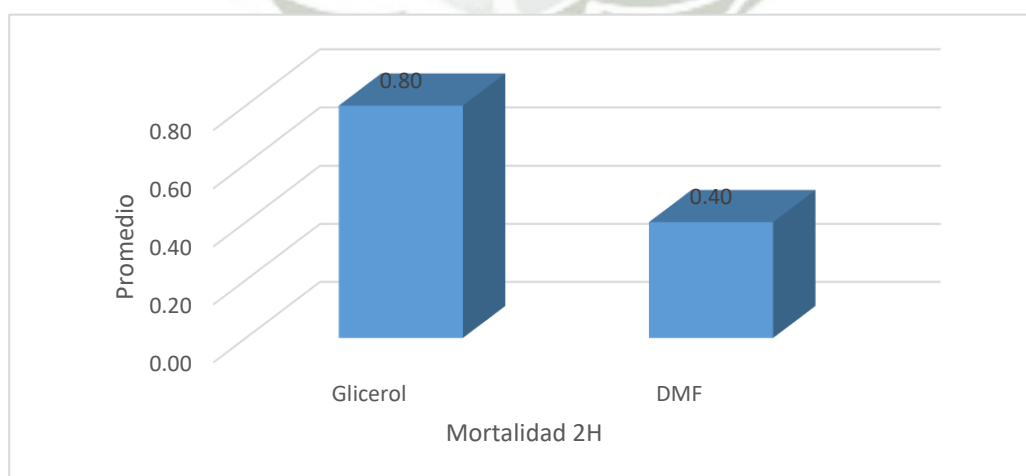
CUADRO N° 14
Motilidad espermática a las 2 horas con el criopreservante glicerol y dimetilformamida en semen obtenido de la cola del epidídimo en toros de lidia.

Motilidad 2 horas	Criopreservante	
	Glicerol	DMF
Media	0,80	0,40
Desviación	0,65	0,50
Máximo	2,00	1,00
Mínimo	,00	0,00
TAMAÑO	25	25

t=2.30 P<0.05

En el cuadro N° 14 se observa la motilidad a las 2 horas comparando los dilutores en estudio glicerol y dimetilformamida en semen obtenido de la cola del epidídimo, teniendo como media $0,80 \pm 0,65$ para el caso de glicerol y $0,40 \pm 0,50$ para el caso de dimetilformamida, siendo los valores máximos 2,00 y 1,00 respectivamente. Según la prueba de t de student muestra que la motilidad 2 horas en glicerol y dimetilformamida presentaron diferencia estadística significativa ($P<0.05$). Cabe mencionar que dicha evaluación no es descrita por muchos autores, la mayoría de la bibliografía no toma en cuenta dicho parámetro pero a nuestro parecer es un referencia importante ya que podemos ver la eficiencia del crioprotector no solo al momento de la descongelación sino también a un tiempo determinado, tiempo en el cual podemos realizar distintos trabajos con dichas muestras tanto en laboratorio como en campo, tal como lo muestra la gráfica N° 09

GRÁFICO N° 09
Motilidad espermática a las 2 horas con el criopreservante glicerol y dimetilformamida en semen obtenido de la cola del epidídimo en toros de lidia.



CUADRO N° 15

Viabilidad espermática con el criopreservante glicerol y dimetilformamida en semen obtenido de la cola del epidídimo en toros de lidia.

Viabilidad	Criopreservante	
	Glicerol	DMF
Media	50,20	25,08
Desviación	6,32	5,05
Máximo	59,00	36,00
Mínimo	38,00	17,00
TAMAÑO	25	25

t=19.93 P<0.05

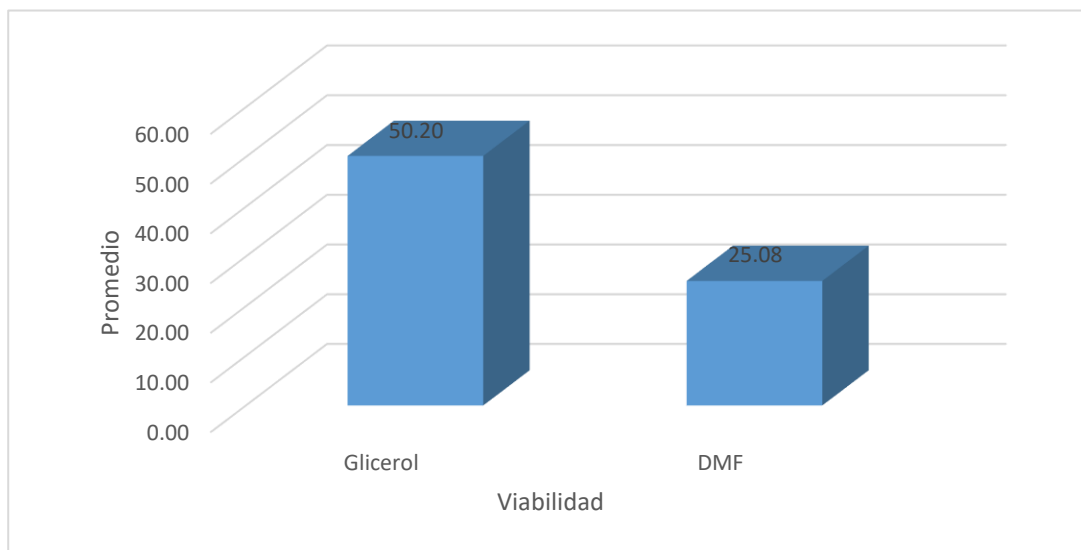
En el cuadro N° 15 se observa la viabilidad espermática comparando los dos criopreservantes glicerol y dimetilformamida en semen obtenido de la cola del epidídimo, observándose una viabilidad de $50,20 \pm 6,32\%$ con el criopreservante glicerol y una viabilidad de $25,08 \pm 5,05\%$ con el criopreservante dimetilformamida, porcentualmente se observa una mayor viabilidad de espermatozoides con el criopreservante glicerol.

Según la prueba de t de student muestra que la viabilidad en glicerol y dimetilformamida presentaron diferencia estadística significativa ($P<0.05$).

Los datos del cuadro N° 15 se ven expresados en el gráfico N° 10 donde se observa la viabilidad espermática comparando los dilutores glicerol y dimetilformamida de semen obtenido de la cola del epidídimo.

GRAFICO N° 10

Viabilidad espermática con el criopreservante glicerol y dimetilformamida en semen obtenido de la cola del epidídimo en toros de lidia.



Se observa la viabilidad espermática comparando los dos dilutores en estudio, donde se obtuvo $50,20 \pm 6,32\%$ con el criopreservante glicerol y una viabilidad de $25,08 \pm 5,05\%$ con el criopreservante dimetilformamida comparando con lo reportado por Álvarez et al (2017)⁵⁰ quienes reportan una viabilidad de $65,22\%$ con el criopreservante glicerol al 5% y $56,67\%$ con el criopreservante dimetilformamida al 5%, lo que nos demuestra que la concentración de los criopreservantes van afectar a la calidad seminal pos descongelación, pero a la vez nos indica que el glicerol sigue siendo un mejor criopreservante mostrando mejores promedios.

Comparando los resultados con Ribeiro A. et al (2014)⁵³ obtuvieron una viabilidad de $53,9\%$ trabajando con el criopreservante glicerol, lo que comparando con nuestros resultados nos indica que está dentro del rango promedio.

CUADRO N° 16
Membrana plasmática espermática con el criopreservante glicerol y dimetilformamida en semen obtenido de la cola del epidídimo en toros de lidia.

Membrana plasmática	Criopreservante	
	Glicerol	DMF
Media	47,96	22,16
Desviación	6,34	6,76
Máximo	59,00	41,00
Mínimo	38,00	14,00
TAMAÑO	25	25

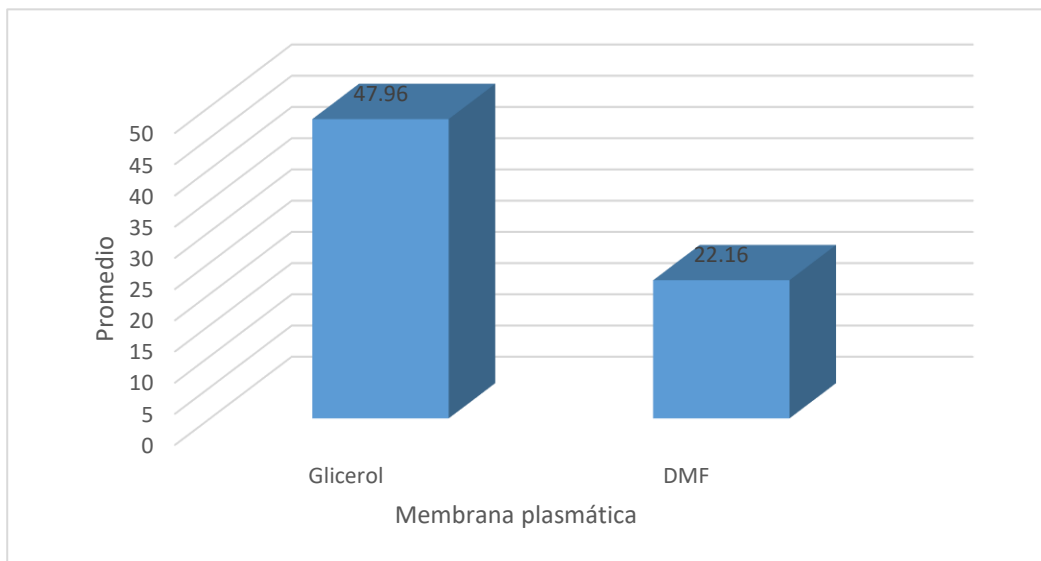
t=13.42 P<0.05

En el cuadro N° 16 se observa la evaluación de la integridad membrana plasmática comparando los dos criopreservantes glicerol y dimetilformamida en semen obtenido de la cola del epidídimo, presentando una integridad de membrana plasmática de $47,96 \pm 6,34\%$ con el crioprotector glicerol y una integridad de membrana plasmática de $22,16 \pm 6,76\%$ con el crioprotector dimetilformamida, porcentualmente se puede observar una mejor reacción con el criopreservante glicerol.

Según la prueba de t de student muestra que la membrana plasmática en glicerol y dimetilformamida presentaron diferencia estadística significativa ($P<0.05$).

Los datos del cuadro N° 16 se ven expresados en el gráfico N° 11 donde se observa la integridad de la membrana plasmática comparando los dos dilutores en estudio glicerol y dimetilformamida en semen obtenido de la cola del epidídimo.

GRÁFICO N° 11
Membrana plasmática espermática con el criopreservante glicerol y dimetilformamida en semen obtenido de la cola del epidídimo en toros de lidia.



Se observa la evaluación de la integridad de la membrana plasmática comparando los dos dilutores obteniendo $47,96 \pm 6,34\%$ con el crioprotector glicerol y una integridad de membrana plasmática de $22,16 \pm 6,76\%$ con el crioprotector dimetilformamida

Comparando con lo reportado por Terreros, et al (2015)⁵¹, quienes reportan una integridad de la membrana plasmática de $23,9 \pm 8,3$ para el criopreservante glicerol al 7% y $31,1 \pm 8,5$ para el criopreservante dimetilsulfoxido, con lo que llegamos a la conclusión que la concentración del criopreservante es trascendental para una buena calidad seminal pos congelación.

Por otro lado Álvarez et al (2017)⁵⁰ reportaron para la integridad de membrana, de $39,94\%$ para el criopreservante glicerol y $44,67\%$ para el caso del criopreservante dimetilformamida, lo que nos muestra que los valores

CONCLUSIONES

- Primera:** La criopreservación de semen de eyaculado completo con glicerol reporta promedios de motilidad de $3,80 \pm 0,41$ y $1,80 \pm 0,50$ a las 0 y 2 horas respectivamente; Morfología de cabeza $5,04 \pm 2,23\%$; Morfología del acrosoma $5,32 \pm 2,08\%$; Morfologías de cola $6,20 \pm 2,68\%$ y funcionalidad de Membrana plasmática de $43,30 \pm 3,31\%$
- Segunda:** La criopreservación de semen de eyaculado completo con dimetilformamida reporta promedios de motilidad de $2,52 \pm 0,51$ y $0,68 \pm 0,63$ a las 0 y 2 horas respectivamente; morfología de cabeza $7,56 \pm 2,68\%$; morfología del acrosoma $6,64 \pm 2,50\%$; morfología de cola $9,68 \pm 2,01\%$ y funcionalidad de membrana plasmática de $32,76 \pm 3,36\%$.
- Tercera:** La criopreservación de semen de la cola del epidídimo con glicerol reporta promedios de motilidad de $2,64 \pm 0,49$ y $0,80 \pm 0,65$ a las 0 y 2 horas respectivamente; morfología de cabeza $8,60 \pm 1,66\%$; morfología del acrosoma $8,76 \pm 2,01$; morfología de cola $9,08 \pm 2,12\%$ y funcionalidad de membrana plasmática de $47,96 \pm 6,34\%$.
- Cuarta:** La criopreservación de semen de la cola del epidídimo con dimetilformamida reporta promedios de motilidad de $1,36 \pm 0,57$ y $0,40 \pm 0,50$ a las 0 y 2 horas respectivamente; morfología de cabeza $8,36 \pm 2,02\%$; morfología del acrosoma $8,68 \pm 1,57\%$; morfología de cola $8,96 \pm 2,34\%$ y funcionalidad de membrana plasmática de $22,16 \pm 6,76\%$.
- Quinta:** La motilidad, morfología y funcionalidad de membrana espermática con el criopreservante glicerol y Dimetilformamida presentan diferencia estadística significativa ($P < 0,05$), presentando mejores valores de calidad seminal el semen criopreservado con glicerol
- Sexta:** La motilidad, morfología y funcionalidad de membrana espermática con semen colectado de cola de epidídimo y por electroeyaculación presentan diferencia estadística significativa ($P < 0,05$), presentando mejores valores de calidad seminal el semen colectado por electroeyaculación o eyaculado completo.

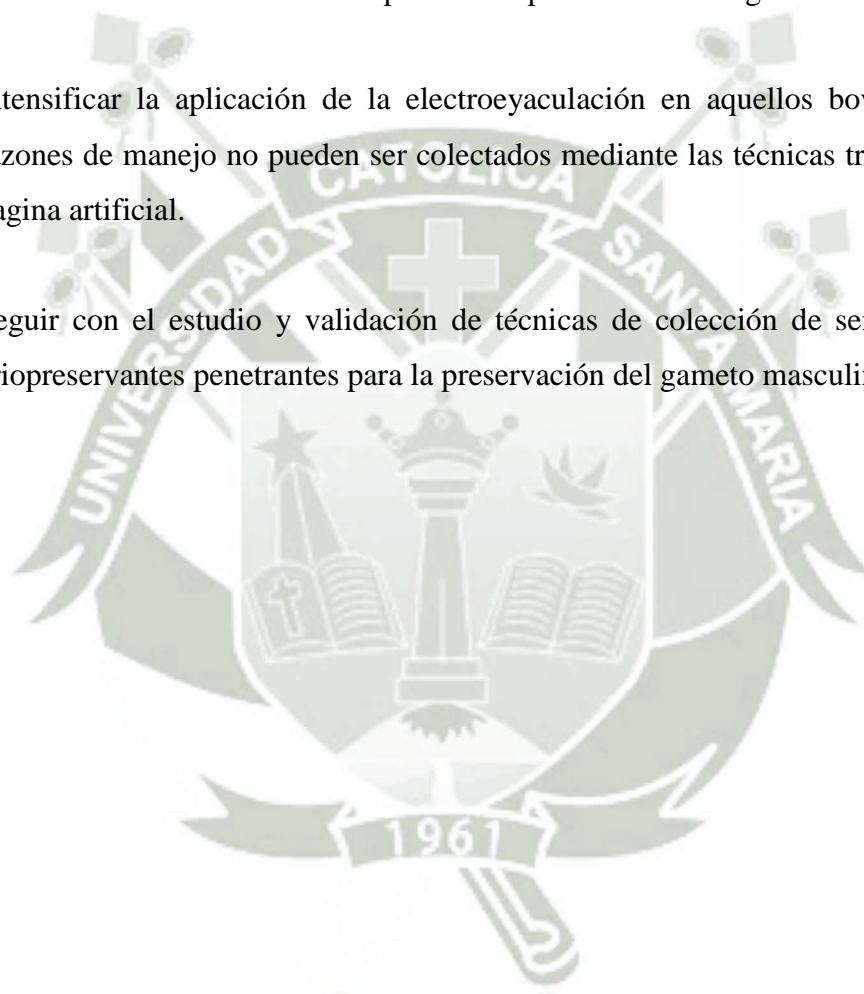
Séptima: La recolección de semen con electroyaculador muestra mejores características seminales frente a la recolección de cola de epidídimo, existiendo diferencia estadística significativa ($P < 0.05$).

Octava: El glicerol muestra mejores indicadores de calidad seminal al ser comparado con el Dimetilformamida, existiendo diferencia estadística significativa $P < 0.05$.



RECOMENDACIONES

1. Considerar al glicerol como primera opción de criopreservante de semen de toro de lidia al mostrar mejor conservación de las características seminales.
2. Realizar mayores estudios en la técnica de colecta de cola de epidídimo ya que es una biotecnología de fácil aplicación en animales de alto valor genético que por alguna razón de manejo no reproductivo tienen que ser enviados a faenamiento, siendo además una técnica alternativa para la criopreservación de gameto macho.
3. Intensificar la aplicación de la electroeyaculación en aquellos bovinos que por razones de manejo no pueden ser colectados mediante las técnicas tradicionales de vagina artificial.
4. Seguir con el estudio y validación de técnicas de colección de semen y uso de criopreservantes penetrantes para la preservación del gameto masculino.



BIBLIOGRAFIA

1. Climent S, Sarasa M, Latorre R, Muniesa P, Terrado J, Climent M. Embriología y anatomía veterinaria. Vol. II. Zaragoza, España. (2013).
2. Zegarra J. Embriología normal veterinaria Universidad Católica de Santa María Arequipa (2017)
3. López J. Glándulas reproductivas del macho y sus funciones. Descargado [01 de diciembre del 2017]. De R. vet recordando la reproducción en: (<http://www.reproduccionveterinaria.com/fisiologia-y-anatomia-obstetrica/macho/fisiologia-reproductiva-del-macho/glandulas-reproductivas-del-macho-y-sus-funciones/>) (2017).
4. Illera M. Endocrinología Veterinaria y Fisiología de la Reproducción. Ed. Colibac, Madrid, pp: 209-315. (1984).
5. Garner D, Hafez E. Espermatozoides y plasma seminal. En: Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. Editor E.S.E Hafez. Editorial Interamericana, Tercera edición. Capítulo 7: 158-179. (1996).
6. Frandson RD, Spurgeon TL. Anatomía y Fisiología de los Animales Domésticos. Ed. Interamericana McGraw-Hill, México, pp: 386-409. (1995)
7. E. Mellisho. Anatomía de los órganos genitales del macho [PDF]. Descargado [20, septiembre del 2017]. De manual de laboratorio de reproducción animal en: http://tarwi.lamolina.edu.pe/~emellisho/Reproduccion_archivos/Practica%201-aparato%20macho%20hembra.pdf. (2010).
8. Gorlach, A.; Transferencia de embriones en el ganado vacuno. Editorial. Acribia, SA, Nueva York. 1ra. Edición p. 66-79. (1998)
9. García JV. Criopreservadores concepto y manejo. Biol Clin Hematol. (1984)
10. Porcu E. Oocyte Criopreservation. En: Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z (eds). Textbook of Assisted Reproductive Techniques: Laboratory and Clinical Perspectives. London, UK: Martin Dunitz Ltd; (2001).
11. Mazur, P., Rigopoulos, N. Contributions of unfrozen fraction and of salt concentration to the survival of slowly frozen human erythrocytes: influence of warming rate. Cryobiology. 20, 274-289. (1983)
12. Mazur, P., Cole, K.W. Influence of cell concentration on the contribution of unfrozen fraction and salt concentration to survival of slowly frozen human erythrocytes. Cryobiology. 22, 509-536. (1985)

13. Doebbler, G.F. Cryoprotective compounds. Review and discussion of structure and function. *Cryobiology*. 3, 2-11. (1996)
14. Meryman, H.T. Cryoprotective agents. *Cryobiology*. 8, 173-183. (1971)
15. Polge, C., Smith, A.U., Parkes, A.S. Revival of spermatozoa after vitrification and the dehydration at low temperatures. *Nature*. London. 164, 666. (1949)
16. Mendoza JA, Dulin P, Warren T. The lower hydrolysis of ATP by the stress protein GroEL is a major factor responsible for the diminished chaperonin activity at low temperature. *Cryobiology*. (2000)
17. Mathews K.M, van Holde KE, Ahern KG. *Biochemistry*. Third edition. Addison Wesley p. 363-92. (2003)
18. Loken SD, Demetrik DJ. A novel method for freezing and storing research tissue bank specimens. *Hum Pathol*. (2005)
19. Meryman HT. Osmotic stress as a mechanism of freezing injury. *Cryobiology*. (1971)
20. De la Fuente, J.; Reproducción asistida en el vacuno de leche congelación. INIA – Reproducción Animal y Conservación Recursos Zoogenéticos. Instituto de Estudios de Postgrado Universidad de Córdoba. Córdoba. (sitio en internet) Disponible en: http://www.uco.es/zootecniaygestion/img/pictorex/16_11_49_4_CORDOBA.pdf. Descargado [15, octubre del 2016]. (2009)
21. Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them survive. *J Androl*. 11:73 -88. (1990)
22. Jones, R.C. Ultrastructure of mammalian spermatozoa: The effects of buffer concentration in fixatives for boar spermatozoa. *Micron*. 2, 350-362. (1971)
23. Bedford, J.M., Calvin, H.I. The occurrence and possible functional significance of –S-S- crosslinks in sperm heads, with particular reference to eutherian mammals. *J. Exp. Zool.*, 188, 137-156. (1974)
24. Parks, J.E., Graham, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*. 38, 209-222. (1992)
25. Hempling, H.G., White, S. Permeability of cultures magakaryocytopenetic cells of the rat to dimethylsulfoxide. *Cryobiology*. 21, 133-143. (1984)
26. Anchoroguy, T.J., Rudoph, A.S., Carpenter, J.F., Crowe, J.H. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiology*. 24, 324-331. (1987)

27. Goodrich, R.P., Handel, T.M., Baldeschwieler, J.D. Modification of lipid phase behaviour with membrane-bound cryoprotectants. *Biochim. Biophys. Acta.* 938, 143-154. (1988).
28. Crowe, J.H., Crowe, L.M., Carpenter, J.F., Aurel Wistram, C. Stabilization of dry phospholipids bilayers and proteins by sugars. *Biochem. J.*, 242, 1-10. (1987).
29. Armitage, W.J. Osmotic stress as a factor in the detrimental effect of glycerol on human platelets. *Cryobiology.* 23, 116-125.(1986)
30. Slavik, T. Effect of glycerol on the penetrating ability of fresh ram spermatozoa with zona-free hamster eggs. *J. Reprod. Fert.* 79, 99-103. (1987)
31. Aitken, R.J., Wang, Y.F., Liu, J., Best, F., Richardson, D.W. The influence of medium composition osmolarity and albumin on acrosome reaction and fertilizing capacity of human spermatozoa: development of an improved zona-free hamster egg penetration test. *Int. J. Androl.* 6,180-193.(1983)
32. Watson, P.F. The preservation of semen in mammals. En: Finn C.A. (ed). *Oxford Reviews of Reproductive Biology.* Oxford University Press. Vol. 1. pp. 283-350. (1979).
33. Polge, C. The storage of bull semen at low temperatures. *Vet. Rec.* 65, 557- 559. (1953)
34. Robbins, R.K., Saacke, R.G., Chandler, P.T. Influence of freeze rate and glycerol level on acrosomal retention and survival of bovine spermatozoa frozen in straws. *J. Anim. Sci.* 42, 145-154. (1976)
35. Pickett, B.W., Berndtson, W.E. Preservation of bovine spermatozoa by freezing in straws: a review. *J. Dairy Sci.* 57, 1287-1301. (1974)
36. Avila, L y col. Fundamentos de criopreservación [PDF]. Descargado [17, octubre del 2016].en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rcog/v57n4/v57n4a08.pdf>. (2006)
37. IRAC. Protocolo para la evaluación de semen en rumiantes [PDF]. Descargado [17, octubre del 2016]. De sitio argentino de producción animal en: <http://www.produccion-animal.com.ar/>. (2016)
38. Reátegui, J. Determinación de la calidad del semen crio preservado comercial utilizado en hatos lecheros, implicancia en la fertilidad e impacto en variables productivas. Vicerrectorado de investigación. Universidad Católica de Santa María. (2015)
39. Bustios, C. Evaluación del Efecto del Dilutor, Raza y Tiempo de Conservación sobre la Calidad Seminal y Funcional del Semen Porcino Conservado. Universidad Católica de Santa María. Para optar el título profesional de médico veterinario y zootecnista. (2012)
40. Amann, R.P. En: Extension and storage of stallion spermatozoa. A review *Equine Veterinary Science.* Vol. 7, no5 p. 289-302.(1964)

41. Brito, D y Reinoso, N. Evaluación cuali-cuantitativa de semen colectado con electroeyaculador (ee) de toros tratados con y sin tranquilizante. Universidad De Cuenca. Para optar el título profesional de médico veterinario y zootecnista.(2017)
42. Luz Mábel Ávila-Portillo, Bacter, José I. Madero, M.D, Claudia López, Bacter, María Fernanda León, Claudia Gómez, Lucy Gabriela Delgado, Claudio Gómez, José Manuel Lozano, María T. Reguero. Fundamentos de criopreservación. Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología Vol. 57 No. 4 • (291-300).(2006)
43. Maria I. Albers Alvarez y Diego R. Barrios Arismendi. Movilidad individual de los espermatozoides epididimarios de toros postmortem obtenidos mediante lavado retrogrado. (2006).
44. SENAMHI. Delimitación de la Cuenca Atmosférica de Arequipa. Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología. Arequipa, Noviembre. (2017)
45. Palmer, C.W., L.F. Brito, A.A. Arteaga, L. Soderquist, Y. Persson and A.D. Barth. Comparison of electroejaculation and transrectal massage for semen collection in range and yearling feedlot beef bulls. Anim Reprod Sci 87:25-31.(2005)
46. Gonçalves PBD, JR Figueiredo, VJ Freitas. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. 2nd ed. Editora Roca, São Paulo, Brasil. (2008)
47. Gonzalez RA. Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelação e crioprotectores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membrana dos espermatozoides bovino. Tesis doctoral, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, Brasil.(2004)
48. Barth AD, RJ Oko. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Iowa State University Press, Ames, USA. (1989)
49. Giovanni Restrepo Betancur, Jorge Gómez Oquendo, Neil Vásquez Araque Criopreservación de semen canino por congelación rápida con glicerol y Dimetilformamida (2011)
50. Cristina Álvarez San Martín, Lydia Gil Huerta, Noelia González Ortiz, Maite Olaciregui, Diego Lozano, evaluación post-congelación de semen equino tras la adición de distintos crioprotectores añadidos al diluyente inra96® (2017).
51. Marino Terreros C, Wilfredo Huanca L, Irma Arriaga C, Antonio Ampuero B. Efecto de Tres Crioprotectores en la Criopreservación de Espermatozoides Epididimario de Alpaca (2015).

52. Nadia Canorio Pariona, Fernando Paredes Arnedo, Martha Valdivia Cuya. Agentes Crioprotectores Alternativos para el Congelamiento Lento de Espermatozoides Epididimarios de Alpaca (Vicugna pacos) (2015).
53. A Ribeiro-Peresa, L Munita-Barbosab, M Yumi-Kanazawab, MI Mello-Martinsc, F Ferreira de Souza. Criopreservación de espermatozoides bovinos extraídos de la cola del epidídimo utilizando los métodos convencional y automatizado (2014).
54. Giovanni Restrepo Betancur, Jorge Gómez Oquendo, Neil Vásquez Araque. Criopreservación de semen canino por congelación rápida con glicerol y Dimetilformamida. (2011)
55. Woods EJ, Benson JD, Agca Y, Critser JK. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. (2004).
56. Castelo TS, TR Frota, AR Silva. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. (2008)
57. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. 1984
58. Chung, J. Effects of sperm treatments on fertilization and in vitro development of bovine follicular oocytes. 1997
59. Reyes-Moreno, C; Boilard, M; Sullivan, R; Sirard, M. Characterization and identification of epididymal factors that protect ejaculated bovine sperm during in vitro storage. Biol. 2002
60. Chenoweth, P. Clinical reproductive anatomy and physiology of the bull. En: Youngquist: Current Therapy in Large Animal Theriogenology. 1997
61. Mortimer, S. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. 1997
62. Amann, R.P; Schanbacher, B.D. Physiology of male reproduction. 1983





CUADRO N° 17
DATOS DE COLECCIÓN Y EVALUACIÓN DE SEMEN FRESCO MEDIANTE
ELECTROEYACULACIÓN TORO 1

Fecha de colecta	29/09/2017
Nombre	Imperio
Identificación	N°148
Edad	7 años
Voltaje	18
Volumen	2ml
Color, aspecto	Blanco cremoso
Motilidad	96 %
PH	6.5
Morfología	86%
Concentración	850000000

CUADRO N° 18
DATOS DE COLECCIÓN Y EVALUACIÓN DE SEMEN FRESCO MEDIANTE
ELECTROEYACULACIÓN TORO 2

Fecha de colecta	29/09/2017
Nombre	Talentoso
Identificación	N°611
Edad	6 años
Voltaje	7
Volumen	1.8 ml
Color, aspecto	Blanco lechoso
Motilidad	96%
PH	6.3
Morfología	83%
Concentración	800000000

CUADRO N° 19
DATOS DE COLECCIÓN Y EVALUACIÓN DE SEMEN FRESCO MEDIANTE
ELECTROEYACULACIÓN TORO 3

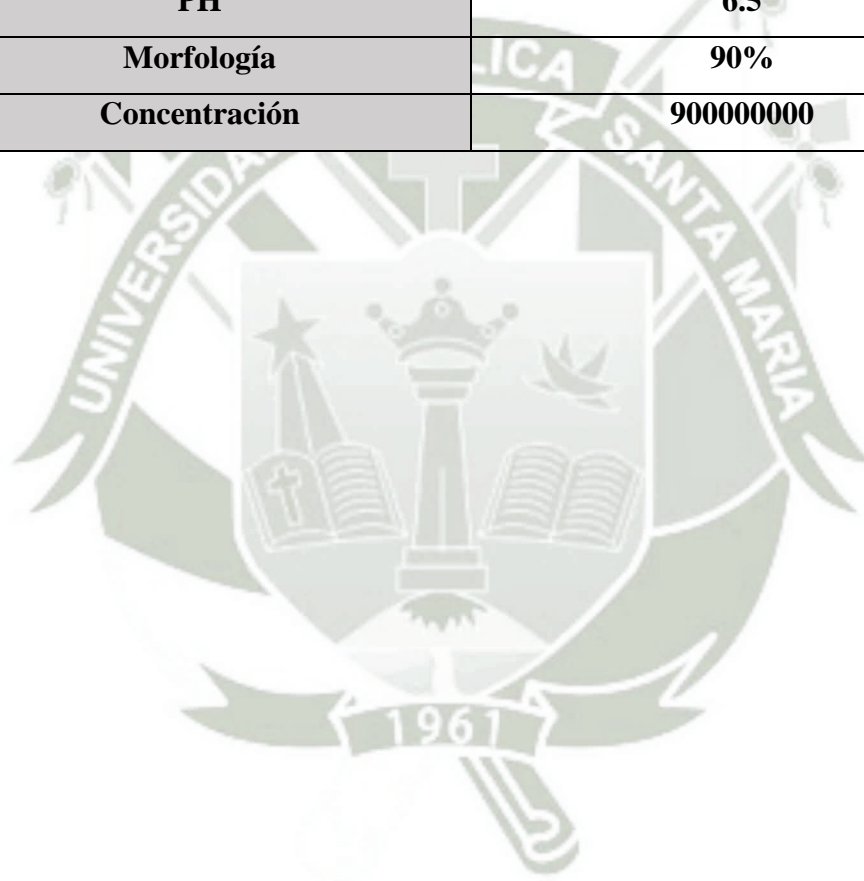
Fecha de colecta	29/09/2017
Nombre	Franciscano
Identificación	N° 43
Edad	5 años
Voltaje	9
Volumen	5 ml
Color, aspecto	Blanco transparente
Motilidad	80 %
PH	6.5
Morfología	85%
Concentración	875000000

CUADRO N° 20
DATOS DE COLECCIÓN Y EVALUACIÓN DE SEMEN FRESCO MEDIANTE
ELECTROEYACULACIÓN TORO 4

Fecha de colecta	29/09/2017
Nombre	Fulero
Identificación	N° 665
Edad	3 años
Voltaje	7.5
Volumen	3 ml
Color, aspecto	Blanco cremoso
Motilidad	94%
PH	6.7
Morfología	88%
Concentración	830000000

CUADRO N° 21
DATOS DE COLECCIÓN Y EVALUACIÓN DE SEMEN FRESCO MEDIANTE
ELECTROEYACULACIÓN TORO 5

Fecha de colecta	29/09/2017
Nombre	Emperador
Identificación	N° 472
Edad	6 años
Voltaje	8
Volumen	4 ml
Color, aspecto	Blanco transparente
Motilidad	90%
PH	6.5
Morfología	90%
Concentración	900000000



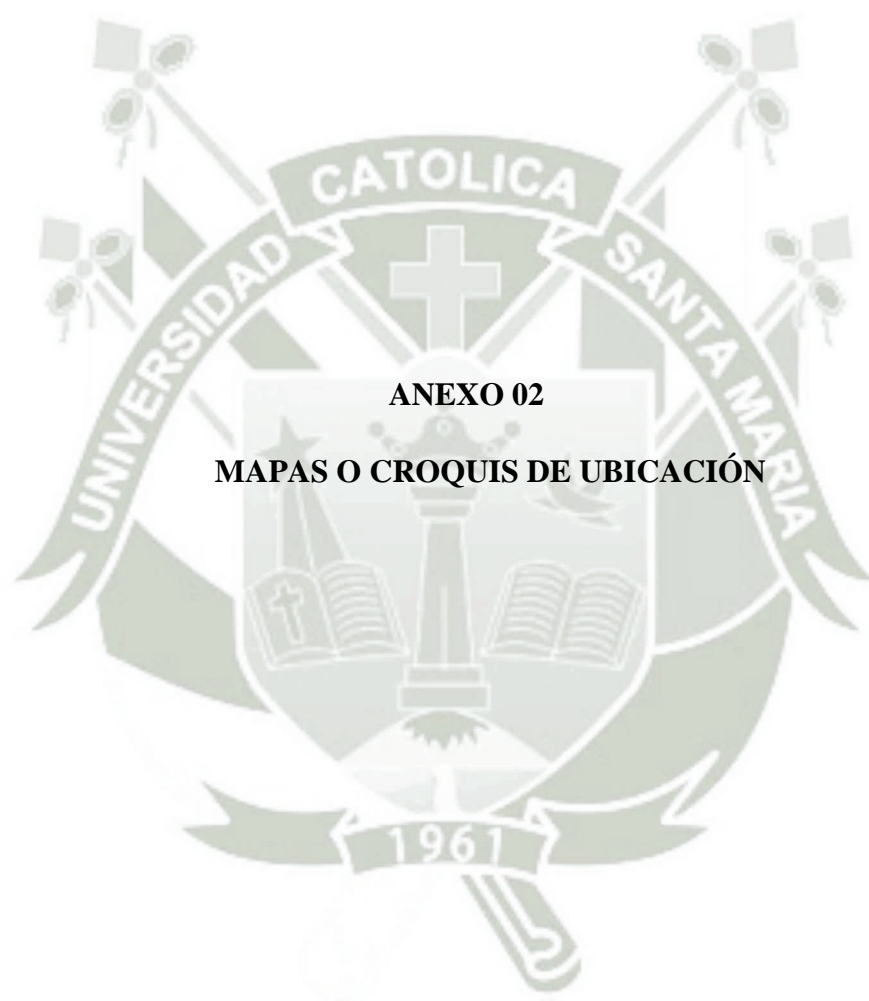


FIGURA N° 01
MAPA EN DONDE SE UBICA GEOGRAFICAMENTE EL DISTRITO DE YURA
DENTRO DEL DEPARTAMENTO DE AREQUIPA

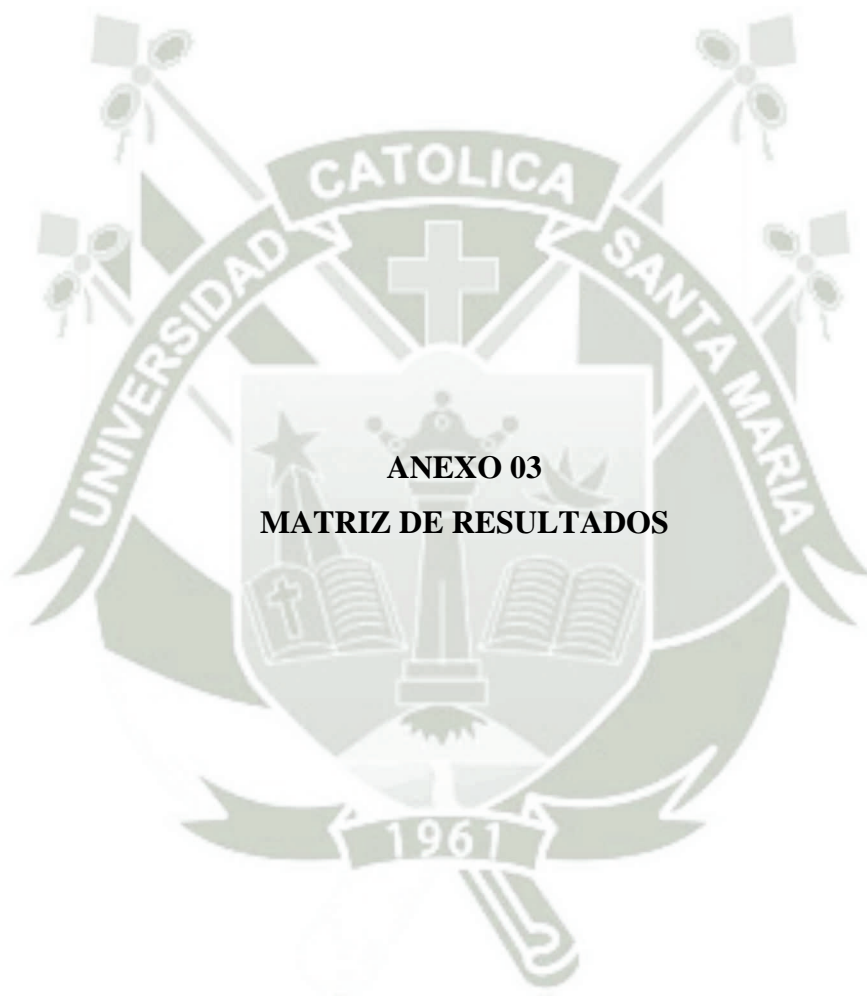


Fuente: (http://www.perutouristguide.com/translator/04ar/translator_04ar_mapa_arequipa.html)

FIGURA N° 02
MAPA A ESCALA DEL DISTRITO DE YURA DEPARTAMENTO DE
AREQUIPA



Fuente: <http://mapasamerica.dices.net/peru/mapa.php?nombre=Quiscos&id=66906>



CUADRO N° 22

RESULTADOS DE COLECTA POR ELECTROEYACULACION TORO IMPERIO

DILUTOR	CONCENTRACION (espermatozoides/ml)	MOTILIDAD		VIABILIDAD	MENBRANA PLASMÁTICA	MORFOLOGIA		
		0 H	2 H	VIVOS %	HOST POSITIVO %	cabeza %	acrosoma %	cola %
GLICEROL								
1	39000000	4	2	45	48	2	3	8
2	48000000	4	2	48	44.5	3	1	9
3	45000000	3	2	56	50	6	8	4
4	47000000	4	1	45	44	0	9	8
5	40000000	4	2	46.5	44	3	9	12
DMF								
1	47000000	2	0	35	34	5	2	9
2	38000000	3	1	39	40	7	3	8
3	40000000	3	1	40	39	3	8	12
4	43000000	2	0	34.5	32.5	5	3	11
5	45000000	2	0	36	34.5	2	7	10

CUADRO N° 23

RESULTADO DE COLECTA POR ELECTROEYACULACION TORO TALENTOSO

DILUTOR	CONCENTRACION (espermatozoides/ml)	MOTILIDAD		VIABILIDAD	MENBRANA PLASMÁTICA	MORFOLOGIA		
		0 H	2 H	VIVOS %	HOST POSITIVO %	cabeza %	acrosoma %	cola %
GLICEROL								
1	52000000	4	1	49	48	4	7	4
2	50000000	4	2	51	49	6	5	9
3	53000000	4	2	46	45	8	4	11
4	51000000	3	2	49.5	46	8	6	3
5	56000000	4	1	45	44.5	7	6	2
DMF								
1	51000000	3	1	37	33.5	9	7	11
2	57000000	2	0	30.5	29	7	4	11
3	48000000	3	1	34.5	30	4	3	6
4	61000000	2	0	32.5	26	7	6	9
5	59000000	3	0	35.5	31.5	11	9	10

CUADRO N° 24
RESULTADOS DE COLECTA POR ELECTROEYACULACION TORO FRANCISCANO

DILUTOR	CONCENTRACION (espermatozoides/ml)	MOTILIDAD		VIABILIDAD	MENBRANA PLASMÁTICA	MORFOLOGIA		
		0 H	2 H	VIVOS %	HOST POSITIVO %	cabeza %	acrosoma %	cola %
GLICEROL								
1	28000000	4	2	44.5	43.5	6	3	8
2	30000000	4	2	44	41	4	7	5
3	25000000	4	1	41.5	40	6	5	5
4	32000000	3	1	47	44	8	6	7
5	27000000	4	2	45	41	2	6	6
DMF								
1	20000000	2	0	34	36	8	8	7
2	23000000	3	2	29.5	33.5	11	10	9
3	30000000	2	1	35	31.5	7	5	6
4	29000000	2	0	31.5	35	7	7	9
5	24000000	3	1	30.5	29.5	6	4	10

CUADRO N° 25
RESULTADOS DE COLECTA POR ELECTROEYACULACION TORO FULERO

DILUTOR	CONCENTRACION (espermatozoides/ml)	MOTILIDAD		VIABILIDAD	MENBRANA PLASMÁTICA	MORFOLOGIA		
		0 H	2 H	VIVOS %	HOST POSITIVO %	cabeza %	acrosoma %	cola %
GLICEROL								
1	43000000	3	2	45	42.5	2	2	4
2	33000000	4	2	40.5	40	5	7	3
3	37000000	4	2	48	46	6	5	8
4	40000000	4	2	44	42.5	6	4	6
5	41000000	4	2	45	42.5	7	4	4
DMF								
1	38000000	3	1	31.5	32.5	11	9	9
2	43000000	3	0	37.5	36	9	9	7
3	40000000	2	1	29.5	30.5	11	7	10
4	39000000	2	0	30	26.5	8	6	11
5	36000000	3	1	34	35	6	5	9

CUADRO N° 26
RESULTADOS DE COLECTA POR ELECTROEYACULACION TORO EMPERADOR

DILUTOR	CONCENTRACION (espermatozoides/ml)	MOTILIDAD		VIABILIDAD	MENBRANA PLASMÁTICA	MORFOLOGIA		
		0 H	2 H	VIVOS %	HOST POSITIVO %	cabeza %	acrosoma %	cola %
GLICEROL								
1	20000000	4	2	43	40	4	5	6
2	15000000	4	1	40	38	3	3	10
3	18000000	3	2	38	40	8	7	4
4	15000000	4	2	40	38	6	7	4
5	13000000	4	3	44	40.5	6	4	5
DMF								
1	21000000	3	1	34	32.5	12	10	15
2	18000000	2	1	36	36	9	10	11
3	19000000	2	1	29	30.5	6	8	11
4	17000000	3	2	35	31.5	7	6	9
5	20000000	3	1	31	32.5	11	10	12

CUADRO N° 27
RESULTADOS DE COLECTA A PARTIR DE LA COLA DEL EPIDIDIMO TORO 1

DILUTOR	CONCENTRACION (espermatozoides/ml)	MOTILIDAD		VIABILIDAD	MENBRANA PLASMÁTICA	MORFOLOGIA		
		0 H	2 H	VIVOS %	HOST POSITIVO %	cabeza %	acrosoma %	cola %
GLICEROL								
1	28000000	3	1	51	54	11	9	11
2	24000000	2	0	53	50	9	7	9
3	27000000	2	0	40	48	7	9	5
4	30000000	3	1	41	49	8	5	10
5	26000000	2	0	45	41	6	8	11
DMF								
1	22000000	2	0	30	35	9	9	8
2	20000000	1	0	28	25	12	6	11
3	25000000	1	0	23	20	7	9	7
4	24000000	1	0	18	20	6	9	12
5	29000000	2	1	26	24	7	8	10

CUADRO N° 28
RESULTADOS DE COLECTA A PARTIR DE LA COLA DEL EPIDIDIMO TORO 2

DILUTOR	CONCENTRACION (espermatozoides/ml)	MOTILIDAD		VIABILIDAD	MENBRANA PLASMÁTICA	MORFOLOGIA		
		0 H	2 H	VIVOS %	HOST POSITIVO %	cabeza %	acrosoma %	cola %
GLICEROL								
1	25000000	3	1	53	55	7	11	6
2	32000000	3	0	42	49	12	8	6
3	30000000	2	1	41	42	9	12	7
4	28000000	3	1	51	45	9	9	9
5	26000000	2	0	38	39	10	7	10
DMF								
1	32000000	1	0	29	33	5	9	12
2	28000000	2	1	25	18	9	11	5
3	25000000	1	0	18	16	7	10	8
4	29000000	1	1	25	14	8	5	10
5	31000000	2	1	19	17	8	9	12

CUADRO N° 29
RESULTADOS DE COLECTA A PARTIR DE LA COLA DEL EPIDIDIMO TORO 3

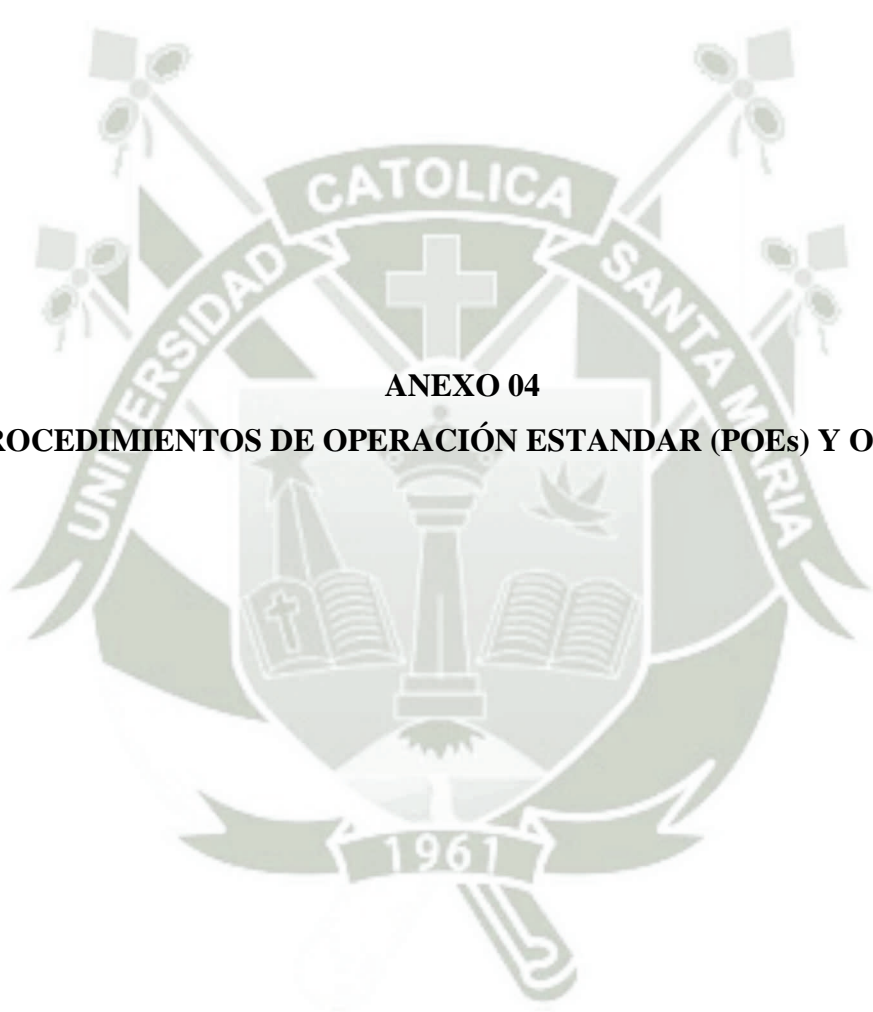
DILUTOR	CONCENTRACION (espermatozoides/ml)	MOTILIDAD		VIABILIDAD	MENBRANA PLASMÁTICA	MORFOLOGIA		
		0 H	2 H	VIVOS %	HOST POSITIVO %	cabeza %	acrosoma %	cola %
GLICEROL								
1	17000000	2	1	45	38	10	13	9
2	20000000	3	1	53	41	7	9	11
3	15000000	3	2	51	56	9	11	7
4	13000000	2	0	46	43	9	8	12
5	18000000	3	1	53	51	11	7	11
DMF								
1	15000000	2	0	31	26	8	10	9
2	13000000	1	1	29	24	10	9	10
3	18000000	1	0	17	16	6	9	11
4	20000000	1	0	28	29	5	11	8
5	17000000	2	1	20	16	6	9	11

CUADRO N° 30
RESULTADOS DE COLECTA A PARTIR DE LA COLA DEL EPIDIDIMO TORO 4

DILUTOR	CONCENTRACION (espermatozoides/ml)	MOTILIDAD		VIABILIDAD	MENBRANA PLASMÁTICA	MORFOLOGIA		
		0 H	2 H	VIVOS %	HOST POSITIVO %	cabeza %	acrosoma%	cola %
GLICEROL								
1	25000000	2	1	54	45	8	11	9
2	23000000	3	1	59	44	9	9	10
3	19000000	3	1	54	46	7	7	11
4	21000000	3	2	48	57	7	7	8
5	23000000	3	1	51	56	11	6	12
DMF								
1	28000000	1	0	29	22	9	10	5
2	23000000	2	1	31	22	10	8	11
3	21000000	1	0	20	16	8	10	7
4	25000000	1	0	25	17	11	9	9
5	18000000	2	1	18	15	9	9	6

CUADRO N° 31
RESULTADOS DE COLECTA A PARTIR DE LA COLA DEL EPIDIDIMO TORO 5

DILUTOR	CONCENTRACION (espermatozoides/ml)	MOTILIDAD		VIABILIDAD	MENBRANA PLASMÁTICA	MORFOLOGIA		
		0 H	2 H	VIVOS %	HOST POSITIVO %	cabeza %	acrosoma%	cola %
GLICEROL								
1	17000000	3	0	58	46	8	7	12
2	19000000	3	0	57	58	10	9	8
3	21000000	3	1	56	59	7	11	6
4	23000000	3	2	56	41	8	8	10
5	20000000	2	1	59	46	6	11	7
DMF								
1	24000000	2	1	25	20	12	10	5
2	20000000	1	0	36	21	10	6	11
3	18000000	0	0	26	27	9	7	9
4	19000000	2	1	29	41	7	6	11
5	23000000	1	0	22	20	11	9	6



ANEXO 04
PROCEDIMIENTOS DE OPERACIÓN ESTANDAR (POEs) Y OTROS



VICERRECTORADO
DE INVESTIGACIÓN

PROCEDIMIENTO DE OPERACIÓN ESTANDAR (POE)

Descongelado de Pajilla de Semen Criopreservado

Nro.: L-001

Fecha de Elaboración: Marzo / 2017 Fecha Última Revisión: _____ / _____
(Mes) (Año) (Mes) (Año)

DESCRIPCIÓN DE LA TAREA

Lugar donde se realizará: Laboratorio de Biotecnología Animal F-405	
Número de personas que participaron: <input checked="" type="checkbox"/> 1 (Una) <input type="checkbox"/> 2 (Dos) <input type="checkbox"/> 3 (Tres) <input type="checkbox"/> 4 (Cuatro)	
Nivel de experiencia: Avanzado en la manipulación de manejo de semen criopreservado y tanques de nitrógeno líquido.	
Equipos y accesorios utilizados:	
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Baño maría húmedo ✓ Papel absorbente ✓ Tubos de vidrio 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Guantes de seguridad ✓ Lentes de seguridad ✓ Pinza para remover pajillas
Personal: Encargado de la evaluación de semen criopreservado.	
Otros equipos requeridos: Termo de nitrógeno líquido para almacenamiento de semen a -196°C.	

PRODUCTO TERMINADO O RESULTADO ESPERADO

Semen descongelado listo para continuar con la evaluación microscopía y funcional.

ALCANCE DE ESTE POE


Validar la técnica correcta del descongelado de pajillas de semen criopreservado. La mayoría del semen se empaca en pajillas de 0.25 y 0.5 ml. Para una mejor facilidad, descongele las pajillas en agua tibia por lo menos 30 segundos pero no más de 15 minutos, use cualquier dispositivo especial para esto, ya sea un baño maría, termo o el descongelador electrónico (Cito), que mantiene el agua a una temperatura entre 35 – 37 °C, justo por debajo de la temperatura corporal y nunca sobre ésta. Las pajillas de semen criopreservado son almacenadas en termos de nitrógeno líquido, son empacadas ya sea en un sistema de porta pajillas (Caña de metal) o tubos plástico (goblets). En un sistema de porta pajillas, éste trae en su parte superior una etiqueta metálica con el código del toro, así que usted puede rápidamente localizar la pajilla que necesita. Todas las pajillas en el porta pajillas contienen semen de un solo toro. En el sistema de goblet, la información del toro está impresa en una barra insertada en el goblet.

HABILIDADES ESPECÍFICAS, ENTRENAMIENTO, CERTIFICACIONES Y PERMISO REQUERIDO

- ✓ Habilidad y destreza en descongelamiento de pajillas de semen congelado
- ✓ Habilidad para el manejo de tanques de nitrógeno líquido para el almacenamiento de semen

PROTOCOLOS POE Nro. 001

Nro.	Pasos y procedimientos comprendidos en esta tarea o proceso	✓
1	Se identificará los tubos donde descongelar con el código de toro y numero de muestra antes de iniciar el procedimiento, se aconseja descongelar una sola pajilla al mismo tiempo	
2	Comience vertiendo agua fría al descongelador, permitiendo que la unidad caliente el agua a la temperatura adecuada de 37 °C. Siempre asegúrese de empezar con agua fría, si usted le pone agua caliente, éste puede estar más caliente que la temperatura apropiada para descongelar.	
3	Para realizar el chequeo de la temperatura, los descongeladores traen un termómetro digital para este fin, al sumergir el termómetro por 10 segundos o más unos números grandes en el termómetro indican la temperatura. Unidades más antiguas usan termómetros normales, los cuales deben ser calibrados a menudo. Si escoge usar un termo para descongelar pajillas, en la mayoría de los casos usted llenará el termo con agua tibia. Si el termómetro muestra que el agua está a una temperatura entre 35 y 37 C el agua está lista para la descongelación, si no, adicione agua fría o caliente hasta que se obtenga la temperatura correcta. Son necesarios frecuentes chequeos para asegurarse de la exactitud de la temperatura de descongelamiento	
4	Siempre localice la unidad de descongelamiento cerca al termo criogénico para reducir el tiempo en que la pajilla está expuesta a la temperatura del aire y cubra la unidad de descongelamiento tan pronto como haya colocado la pajilla. Todas las transferencias de pajillas deben ser hechas en 10 segundos o menos, las pajillas no deben ser expuestas más tiempo del necesario al aire y deben descongelarse a temperatura apropiada.	
5	Destape el termo y rápidamente localice la canastilla que tiene el portapajillas que usted necesita.	
6	Levante la varilla de la canastilla por encima del anillo indicador que está en la boca del termo solo lo necesario para retirar de forma segura solo la pajilla que se quiere. Esto debe ser siempre un poco más debajo de la boca del cuello del termo. Generalmente, usted debe ser capaz de localizar y retirar la pajilla apropiada manteniendo la canastilla por lo menos 3 cm. Debajo de la boca del cuello.	
7	Si el portapajillas que necesita no puede ser localizado en 10 segundos, baje la canastilla hacia el termo por 10 a 15 segundos y súbalo de nuevo para realizar la tarea. Si el nitrógeno líquido hierve o emite vapores cuando usted baja la canastilla, usted está manteniéndola en el cuello del termo por más de 10 segundos.	
8	Cuando levante la canastilla ponga la varilla de la misma entre su primer y segundo dedo con su palma de la mano hacia el termo. Sujete la varilla contra el cuello del termo, su dedo pulgar estará libre, luego con su mano libre alcance dentro del cuello el portapajillas deseado. Levante el portapajillas solo lo suficiente para hacer accesibles las pajillas de la parte superior, tome el portapajilla entre el dedo pulgar e índice de la mano que sostiene la canastilla	
9	Con la pinza porta pajillas, levante la pajilla verticalmente hacia arriba, sacándola del portapajilla, rápidamente colóquela en la unidad de descongelamiento y al mismo tiempo suelte el portapajilla y baje la canastilla hacia el termo y colóquela en su respectivo lugar.	
10	Retire la pajilla del descongelador después de 30 segundos. Aproximadamente, séquela con una toalla de papel limpia.	
11	Corte los extremos sellados de la pajilla con un cortapajillas, asegúrese de hacerlo de la manera correcta para volcar su contenido en tubos previamente atemperados e identificados.	

12	Incubar los tubos por lo menos 5 min. En el baño maría antes de iniciar la evaluación y contrastación de la pajilla de semen	
13	Verifique la identificación del toro para asegurarse que está trabajando con el reproductor elegido. Cada pajilla es marcada con el nombre y número de registro del toro, código de la raza, el número de la empresa empacadora de semen y el número de la colección. Realice esto sin exponer la pajilla a temperaturas extremas.	
<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <p>Logo de certificación</p>  </div> <div style="text-align: center;"> <p>Código de la NAAB</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: center; margin-top: 10px;"> <div style="text-align: center; margin-right: 20px;"> <p>Empresa de IA</p> </div> <div style="text-align: center; margin-right: 20px;"> <p>Número de registro del toro</p> </div> <div style="text-align: center; margin-right: 20px;"> <p>Nombre del toro</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>Fecha de colección</p> </div> </div>		





PROCEDIMIENTO DE OPERACIÓN ESTANDAR (POE)

COLECCIÓN DE SEMEN DEL EPIDIDIMO

Nro.: L-002

Fecha de Elaboración: Marzo /2017 Fecha Última Revisión: _____ / _____
(Mes) (Año) (Mes) (Año)

DESCRIPCIÓN DE LA TAREA

Lugar donde se realizará: laboratorio de biotecnología animal	
Número de personas que participaron: <input type="checkbox"/> 1 (Una) <input type="checkbox"/> 2 (Dos) <input type="checkbox"/> 3 (Tres) <input checked="" type="checkbox"/> 4 (Cuatro)	
Nivel de experiencia: Avanzada	
Equipos y accesorios utilizados:	
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Equipo mínimo de disección ✓ Bisturí ✓ Caja de tecnophor ✓ Microscopio portátil 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Papel toalla ✓ Jeringas ✓ Pipetas Pasteur ✓ placas Petri ✓ bandeja de plástico ✓ bolsas ziploc
Personal: calificado para la colecta	
Otros equipos requeridos:	

PRODUCTO TERMINADO O RESULTADO ESPERADO

Muestra de semen obtenida de cola de epidídimo

ALCANCE DE ESTE POE

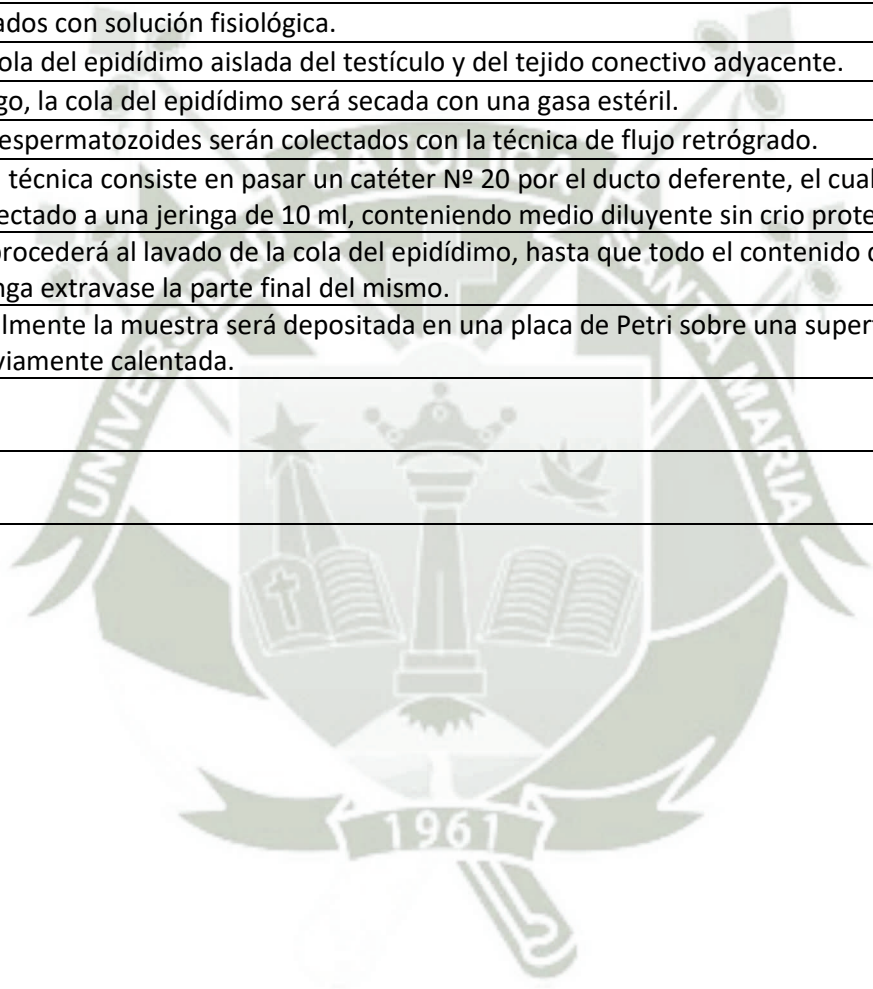
Validar la técnica de colección de semen de la cola del epidídimo en toros de lidia. Este procedimiento post mortem es considerado una importante herramienta en la utilización de espermatozoides de animales en peligro de extinción. Los espermatozoides colectados del epidídimo pueden ser crío preservados o utilizados de inmediato en la fecundación in vitro o en la inyección intracitoplasmática en los oócitos.

HABILIDADES ESPECÍFICAS, ENTRENAMIENTO, CERTIFICACIONES Y PERMISO REQUERIDO

- Habilidad para colectar testículos de matadero
- Habilidad y destreza para la colección de semen de cola de epidídimo

PROTOSCOLOS POE Nro. L- 002

Nro.	Pasos y procedimientos comprendidos en esta tarea o proceso	✓
	Colección del órgano de matadero	
1.	Se utilizarán pares de epidídimos de toros, colectados en el Faenamiento del animal.	
2.	Los testículos serán colectados con su bolsa escrotal.	
3.	Cada bolsa escrotal será limpiada con toallas de papel.	
4.	Después, serán colocados en bolsas plásticas selladas, almacenados en una caja térmica, manteniéndolos a una temperatura de 37°C y trasladados en 10 minutos hasta el Laboratorio de Investigación en Biotecnología Animal.	
	Colección de espermatozoides en laboratorio	
5.	Los testículos serán retirados de la caja térmica.	
6.	Lavados con solución fisiológica.	
7.	La cola del epidídimo aislada del testículo y del tejido conectivo adyacente.	
8.	Luego, la cola del epidídimo será secada con una gasa estéril.	
9.	Los espermatozoides serán colectados con la técnica de flujo retrógrado.	
10.	Esta técnica consiste en pasar un catéter N° 20 por el ducto deferente, el cual es conectado a una jeringa de 10 ml, conteniendo medio diluyente sin crioprotector.	
11.	Se procederá al lavado de la cola del epidídimo, hasta que todo el contenido de la jeringa extravase la parte final del mismo.	
12.	Finalmente la muestra será depositada en una placa de Petri sobre una superficie previamente calentada.	





PROCEDIMIENTO DE OPERACIÓN ESTANDAR (POE)

Análisis de Pajillas de Semen Criopreservado

Nro.: L-003

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

DESCRIPCIÓN DE LA TAREA

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

PRODUCTO TERMINADO O RESULTADO ESPERADO

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

ALCANCE DE ESTE POE

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

HABILIDADES ESPECÍFICAS, ENTRENAMIENTO, CERTIFICACIONES Y PERMISO REQUERIDO

- ✓ Habilidad y destreza en descongelamiento de pajillas de semen congelado
- ✓ Habilidad para el manejo de tanques de nitrógeno líquido para el almacenamiento de semen
- ✓ Entrenamiento y habilidades en el análisis de laboratorio con técnicas de rutina para determinar calidad seminal y funcional.

PROTOCOLOS POE Nro. L-003

Nro.	Pasos y procedimientos comprendidos en esta tarea o proceso	✓
1	Una vez descongelado el semen y cumpliendo el protocolo del POE Nro. L-001	

CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA		
<p>La concentración de una pajuela de 0,25ml ó 0,5ml varía de 20 – 30 millones de espermatozoides totales por pajuela. De los cuales al descongelado deben existir un mínimo de 10 millones de células motiles por pajuela.</p>		
1	Realizar una dilución 1:50 (2,5 ml de solución salina formolada y 50 µl semen)	
2	Cargar la cámara de Neubauer. Dejar decantar 2-3 minutos	
3	<p>Contar los espermatozoides de 5 cuadrados secundarios: El volumen de cada cuadrado secundario es de: $0,2 \text{ mm} \times 0,2 \text{ mm} \times 0,1 \text{ mm} = 0.0004 \text{ mm}^3 = 0.004 \mu\text{l}$ Entonces el volumen total contado es: $0,004 \mu\text{l} \times 5 \text{ cuadrados secundarios contados} = 0,02 \mu\text{l}$ Si el valor lo multiplicamos por el factor de dilución (1:50), el volumen es: $0,02 \mu\text{l} \times 0,02 = 0.0004 \mu\text{l}$ Método de conteo de la "L" invertida:</p>	
4	<p>Para el recuento se consideran dos de los cuatro lados del cuadrado secundario (pintados con negro). Se cuentan los espermatozoides cuya cabeza esté sobre los lados elegidos. Si hay espermatozoides ubicados sobre los otros dos bordes, se ignoran al contar (en la imagen de la derecha los espermatozoides coloreados de negro se cuentan, los blancos no).</p> <p>La cantidad de espermatozoides contados se multiplica por 10 (0.1 mm de profundidad), por 5 (1/5 de mm cuadrado), por 50 (dilución 1:50), esto me dará el número de espermatozoides por microlitros, para llevarlo a mililitro el resultado lo multiplicamos por 1000 para llevarlo a mililitro.</p> <p>Células contadas *10 (0.1mm de profundidad)* 5 (1/5 de mm cuadrado)* 50 (dilución 1:50)</p>	

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

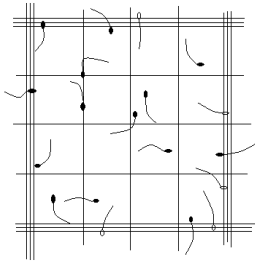
	La motilidad puede ser cuantificada utilizando la siguiente escala:															
	Tabla N° 01 Calificación de motilidad espermática															
	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 15%;">ESCALA</th> <th>DESCRIPCIÓN.-</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">0</td> <td>Sin movimiento.</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">1</td> <td>Ligera ondulación o vibración de cola, sin progresión.</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">2</td> <td>Progresión lenta, incluyendo detención y comienzo de movimiento</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">3</td> <td>Movimiento progresivo continuo y moderada velocidad</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">4</td> <td>Movimiento progresivo, rápido</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">5</td> <td>Movimiento progresivo muy rápido, en el cual las células son difíciles de seguir visualmente.</td> </tr> </tbody> </table>	ESCALA	DESCRIPCIÓN.-	0	Sin movimiento.	1	Ligera ondulación o vibración de cola, sin progresión.	2	Progresión lenta, incluyendo detención y comienzo de movimiento	3	Movimiento progresivo continuo y moderada velocidad	4	Movimiento progresivo, rápido	5	Movimiento progresivo muy rápido, en el cual las células son difíciles de seguir visualmente.	
ESCALA	DESCRIPCIÓN.-															
0	Sin movimiento.															
1	Ligera ondulación o vibración de cola, sin progresión.															
2	Progresión lenta, incluyendo detención y comienzo de movimiento															
3	Movimiento progresivo continuo y moderada velocidad															
4	Movimiento progresivo, rápido															
5	Movimiento progresivo muy rápido, en el cual las células son difíciles de seguir visualmente.															
4	El semen de buena calidad, que ha sido recientemente descongelado, normalmente tiene 40-50% de espermatozoides con motilidad progresiva y un vigor de 3-4. Después de 2 horas de incubación, estos valores generalmente disminuyen un 10 - 15% y 1 punto, respectivamente.															
5	Las normas mínimas para motilidad exigidas que se corresponden con las de las normas ISO 9002 son: 0 hs.= 25% de espermatozoides con motilidad progresiva. Vigor 3. 2 hs= 15% de espermatozoides con motilidad progresiva. Vigor 2															

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

TEST DE ENDOSMOSIS (HOS)	
Los espermatozoides con cola enrollada totalmente, parcialmente, o simplemente acodada se consideraron vivos (reaccionados) y el resultado final se expresará porcentualmente. En cada muestra seminal debe observarse un mínimo de 40% de reaccionados para considerarla adecuada.	
1	Colocar en un tubo de ensayo 125 µl de solución HOS a 37°C y 12.5 µl de semen.
2	Incubar a 37°C durante 10 minutos.
3	Detener la reacción agregando 25 µl de Solución HOS Formol.
4	Colocar entre porta y cubreobjetos 5 µl de la muestra.
5	Observar con microscopio de contraste de fase a 400 aumentos.

INTEGRIDAD ACROSÓMICA	
El defecto puede ser la falta total del capuchón acrosómico o su pérdida en distintas proporciones. El resultado final se expresará en porcentaje e indica la proporción de acrosomas dañados (AD), no más del 50% de los espermatozoides deberán presentar acrosomas dañados para que la dosis sea considerada de calidad.	
Tinción Giemsa	
1	Realizar un frotis con una gota de semen de 7 µl en portaobjetos precalentado a 37°C.
2	Secar sobre platina térmica de 15 a 20 minutos
3	Fijar en formol bufferado durante 20 min.
4	Lavar 20 minutos en agua corriente
5	Colorear con Giemsa (una parte de colorante con 9 partes de agua corriente) durante 90 minutos.
6	Enjuagar cuidadosamente con agua corriente.
7	Secar al aire.
8	Observar con objetivo de inmersión.
Observación con contraste de fase (sin tinción)	
1	Colocar una gota (8-9 µl), entre porta y cubreobjetos, de la dilución preparada para el recuento de espermatozoides (2.5 ml de Solución Salina formolada y 50 µl semen).
2	Observar con microscopio de contraste de fase.
Observación con contraste de fase y glutaraldehído	
1	Se colocará una gota de semen sobre un portaobjetos y al lado una gota similar de glutaraldehído al 0,2% diluido con buffer fosfato salino
2	Se realizaran tres lecturas por cada pajuela descongelada utilizando un microscopio de contraste de fase (1000X) y contando en cada extendido 100 espermatozoides.

MORFOLOGÍA	
El resultado final se expresará en porcentaje e indica la proporción de malformaciones aceptándose no más del 25%. De los espermatozoides con malformaciones un máximo de 8% de anomalías deberán ser de cabeza y un 17% de anomalías de cola.	
Tinción con Rosa de Bengala	
1	Realizar frotis sobre portaobjetos atemperado a 37 °C con una alícuota de 5 µl de semen y 5 µl de solución acuosa de Rosa de Bengala al 3% (m/v) atemperado
2	Dejar secar a temperatura ambiente durante 20 minutos.
3	Observar con objetivo de inmersión
Observación con contraste de fase (sin tinción)	
1	Colocar una gota (8-9 µl), entre porta y cubreobjetos, de la dilución preparada para el recuento de espermatozoides (2.5 ml de Solución Salina formolada y 50 µl semen).
2	Observar con microscopio de contraste de fase.



PROCEDIMIENTO DE OPERACIÓN ESTANDAR (POE)

COLECCIÓN DE SEMEN POR ELECTROEYACULACION

Nro.: C-001

Fecha de Elaboración: marzo /2017 Fecha Última Revisión: _____ / _____
(Mes) (Año) (Mes) (Año)

DESCRIPCIÓN DE LA TAREA

Lugar donde se realizará: criaderos de toros de pelea	
Número de personas que participaron: <input type="checkbox"/> 1 (Una) <input type="checkbox"/> 2 (Dos) <input type="checkbox"/> 3 (Tres) <input checked="" type="checkbox"/> 4 (Cuatro)	
Nivel de experiencia: Avanzada	
Equipos y accesorios utilizados:	
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Ficha de colecta ✓ Brete de colecta ✓ Equipo de electroeyaculación ✓ Lubricante 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Termómetros. ✓ Tubos colectores graduados ✓ Tubos Falcon de 15 cc ✓ Papel toalla ✓ Guantes
Personal: calificado para el manejo del toro y calificado para la colecta del semen	
Otros equipos e instalaciones requeridas: material de sujeción	

PRODUCTO TERMINADO O RESULTADO ESPERADO

Muestra de semen fresco obtenida por electroeyaculación

ALCANCE DE ESTE POE

Validar la técnica de colección de semen mediante electroeyaculación en toros de lidia, dicha técnica consiste en dar pulsos eléctricos muy leves en la próstata y vesículas seminales para que el animal presente erección y eyaculación. Con la utilización del electro eyaculador, como método para la recolección de semen. La eyaculación es un proceso bifásico, primero ocurre la emisión y continúa con la erección y la eyaculación propiamente dicha. Cuando se produce la estimulación adecuada, esta viaja vía nervio pudendo interno hacia los centros lumbosacros de la columna vertebral, desde allí parte la respuesta vía nervios simpáticos lumbares (del plexus hipogástrico), lo cual estimula la contracción de la musculatura lisa que recubre la próstata, glándulas vesiculares y conductos deferentes, asegurando la progresión de la masa espermática hacia la uretra pélvica

HABILIDADES ESPECÍFICAS, ENTRENAMIENTO, CERTIFICACIONES Y PERMISO REQUERIDO

- Manipulación y manejo del toro de lidia.
- Conocimiento y manipulación del electroeyaculador.
- Conocimiento de la técnica de colección de semen mediante la técnica de electroeyaculación.

PROTOSCOLOS POE Nro. C-001

Nro.	Pasos y procedimientos comprendidos en esta tarea o proceso	✓
1.	Se usara una manga que pueda albergar a la mayoría de los animales grandes.	
2.	Antes de realizar el procedimiento se deberá llenar la ficha de colección de semen donde se indicaran los datos del animal.	
3.	Se asegura que las tres líneas metálicas o electrodos ubicados ventralmente, estén limpios y libres de corrosión.	
4.	Se retira el exceso de heces del recto, se levanta la cola del toro hasta hacerla horizontal.	
5.	Se lubrica el electrodo y se introduce en el recto, dirigiéndolo ligeramente hacia abajo y haciendo movimientos rotatorios.	
6.	Una vez insertado completamente el electrodo, se coloca la cola en el medio del mango (en forma de "U") de este y se sujeta con la misma mano que sujetaba la cola.	
7.	Se inician los estímulos a mínima intensidad y rítmicamente se incrementa, de acuerdo con la reacción del animal.	
8.	Cada estimulo debe durar menos de un segundo y se deben aplicar entre cinco y 10 estímulos por cada grado de intensidad.	
9.	El fluido preseminal no debe recolectarse porque diluye el eyaculado y puede originar falsos resultados.	
10.	Cuando éste comienza a tornarse más opaco y espeso comienza la colección en el cono o tubo de colecta colocado directamente en el pene.	
11.	Una vez terminada la colecta se medirá la cantidad total de semen colectado mediante dicha técnica.	
12.	Cuando empieza a eyacular se observa el voltaje para tomarlo en cuenta en la ficha de colección, dicho voltaje varía de acuerdo al animal.	
13.	Terminada la colecta se retira los electrodos del recto y se limpia.	

FICHA DE EVALUACIÓN ESPERMÁTICA

DATOS DEL SOLICITANTE

Fecha: _____

Nombre y apellido del propietario: _____

Establecimiento: _____

EXTRACCION DE SEMEN

Identificación del animal: _____

Nombre del animal: _____

Método de extracción:

Vagina Artificial	<input type="checkbox"/>	Electroeyaculación	<input type="checkbox"/>	Otro	<input type="checkbox"/>
-------------------	--------------------------	--------------------	--------------------------	------	--------------------------

EVALUACION DE SEMEN FRESCO

EXAMEN MACROSCOPICO

Volumen: _____

Color: _____

Olor: _____

Aspecto: _____

Ph: _____

EXAMEN MICROSCOPICO

Concentración: _____

Motilidad total: _____

Motilidad progresiva: _____

Numero espermatozoides/ dosis: _____

Espermatozoides vivos: _____

Morfología (tinción Rosa de Bengala): _____

FUNCIONALIDAD

Espermatozoides con membrana funcional: _____

Espermatozoides con acrosoma intacto: _____

EVALUACION DE SEMEN CRIOPRESERVADO

EXAMEN MICROSCOPICO

	MUESTRA N°1 (GLICEROL)	MUESTRA N°2 (DMF)
Motilidad (%): 0Hrs.	_____	_____
2Hrs.	_____	_____
Motilidad progresiva (%):	_____	_____
Concentración (mill):	_____	_____
Espermatozoides vivos (%): (Conteo de 200 células)	_____	_____
Espermatozoides con membrana funcional (%): (Conteo de 100 células)	_____	_____
Espermatozoides con acrosoma intacto (%):	_____	_____
Morfología: espermatozoides con anomalías:		
• Espermatozoides con anomalías en cabeza (max. 8%):	_____	_____
• Espermatozoides con anomalías en cola (max 17%):	_____	_____
• Espermatozoides con acrosoma intacto (max 5%):	_____	_____



MATERIALES Y EQUIPOS:



FOTO N° 01: Platina térmica para mantener la temperatura de los equipos.

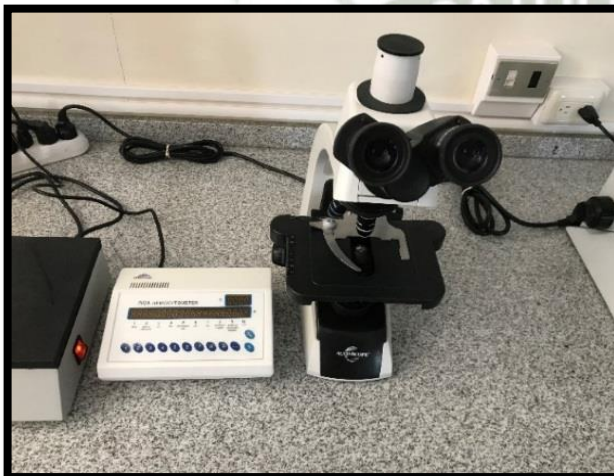


FOTO N° 02: Microscopio óptico con un contador de células para la evaluación espermática.



FOTO N° 03: Microscopio de contraste de fase con platina térmica la que nos ayuda a mantener una temperatura adecuada para la evaluación de las muestras.

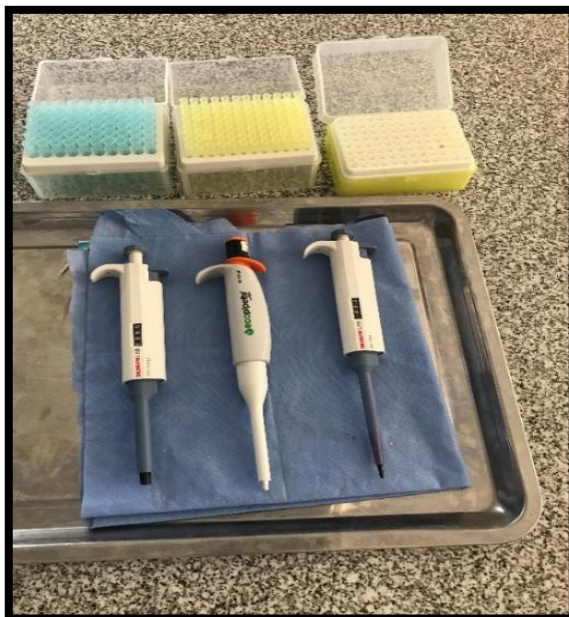


FOTO N° 04: Micro pipetas con sus respectivos tips para poder trabajar las muestras en laboratorio.



FOTO N° 05: Baño maria para mantener la temperatura de las distintas soluciones con las que se trabajo.



FOTO N° 06: Portaobjetos y cubreobjetos donde se realiza la evaluación de las muestras.



FOTO N° 07: Cámara de Neubauer donde se realiza la concentración de las muestras.



FOTO N° 08: Evaluando las muestras obtenidas por electroeyaculación y a partir de la cola del epidídimo.

COLECTA DE SEMEN MEDIANTE LA ELECTROEYACULACIÓN:



FOTO N° 09: Fundo donde se realizó la colecta mediante electroeyaculación.



FOTO N° 10: Electrodo del equipo de electroeyaculación que fueron introducidos en el recto del animal.



FOTO N° 11: Manga donde se realizar la toma de muestras.



FOTO N° 12: Equipo de electroeyaculación que se utilizó para las colectas en campo.



FOTO N° 13: Una vez puesto el animal en la manga se procede a realizar la limpieza del recto y a introducir los electrodos.



FOTO N° 14: Una vez introducido los electrodos en el recto del animal se procede a realizar los impulsos eléctricos.



FOTO N° 15: Dado los impulsos necesarios para que el animal eyacule se realiza la colecta con la ayuda de un cono colector.



FOTO N° 16: Cono colector con la muestra obtenida después de la estimulación necesaria para que el toro eyacule.

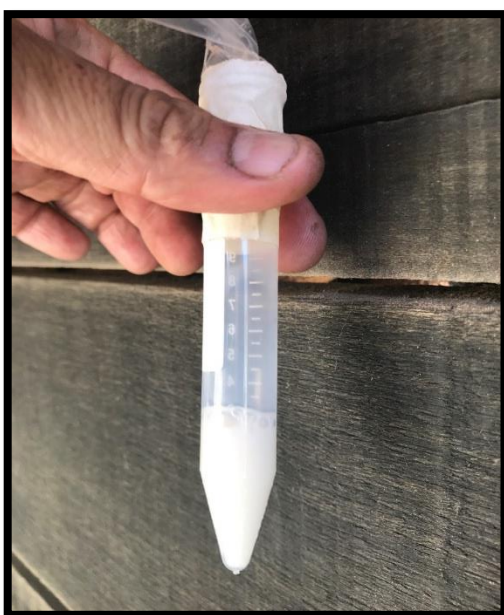


FOTO N° 17: Muestra obtenida mediante electroeyaculación.



FOTO N° 18: Muestra obtenida mediante electroeyaculación puesta bajo un fondo blanco para poder observar su aspecto.



FOTO N° 19: Dilución del semen fresco previa evaluación con su respectivo Dilutor evitando que le caigan los rayos del sol.

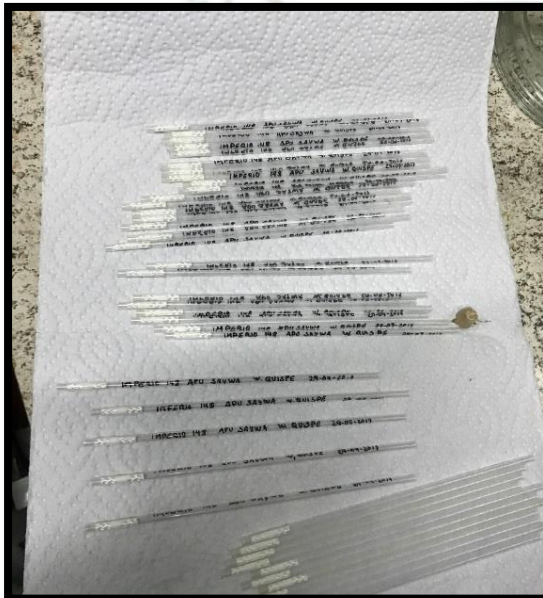


FOTO N° 20: Identificación de las pajillas, en cada pajilla va el nombre del toro la fecha de enpajillado y el nombre del propietario.



FOTO N° 21: Una vez realizado el llenado de las pajillas se realiza la vaporización de las mismas y luego se coloca en el tanque de almacenamiento.

COLECTA DE SEMEN A PARTIR DE LA COLA DEL EPIDÍDIMO:



FOTO N° 22: Toros en pie de los cuales se obtendrán las muestras, animales aislados debido a la agresividad de los mismos.



FOTO N° 23: Toros de lidia recién faenados listos para la extracción de los testículos, se recomienda no tirarles agua para mejorar los resultados del procedimiento.



FOTO N° 24: Extrayendo los testículos con su bolsa escrotal para su respectiva evaluación.



FOTO N° 25: Testículos sacados de la caja térmica y lavados con solución fisiológica para retirar cualquier suciedad que nos afecte la evaluación de las muestras.



FOTO N° 26: Se procede al retiro de las capas que envuelven a los testículos para poder trabajar teniendo en cuenta y manteniendo la temperatura de los testículos de 37 grados centígrados.



FOTO N° 27: Limpiado el testículo se identifica las partes anatómicas del testículo para realizar el procedimiento y retiro de espermatozoides de la cola del epidídimo.



FOTO N° 28: Identificada la cola del epidídimo se procedió a la colecta de espermatozoides mediante la técnica de flujo retrogrado.

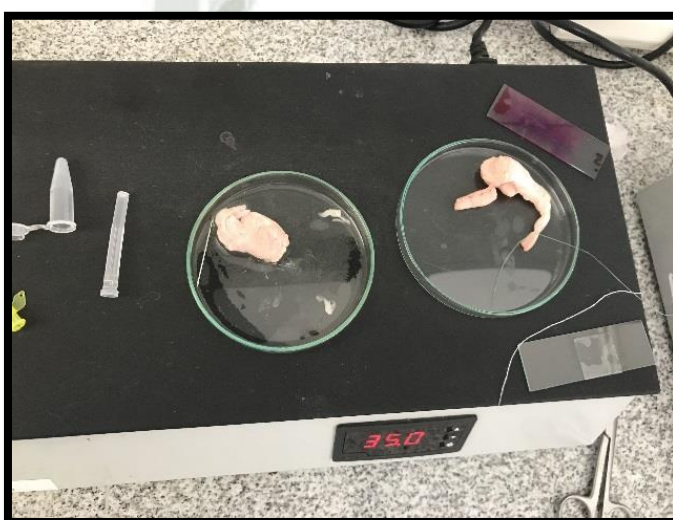


FOTO N° 29: Realizada la técnica se coloca el contenido en una placa Petri para su posterior evaluación.

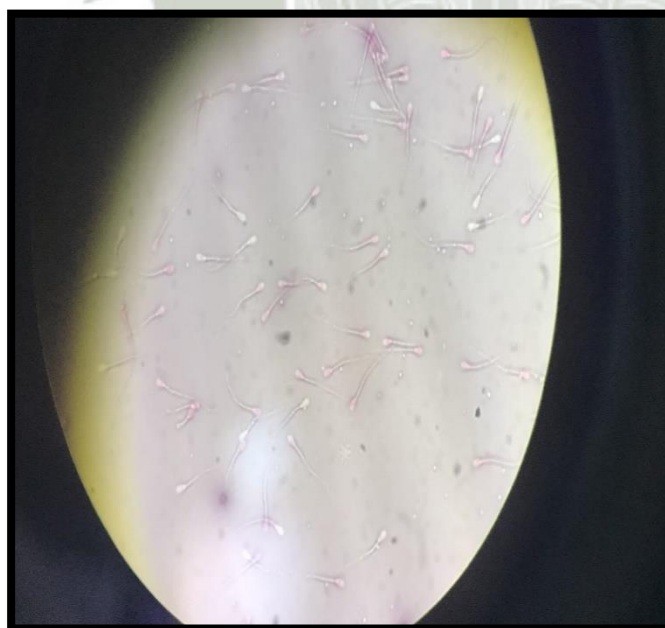


FOTO N° 30: Evaluación de las muestras de viabilidad con eosina – negrosina.

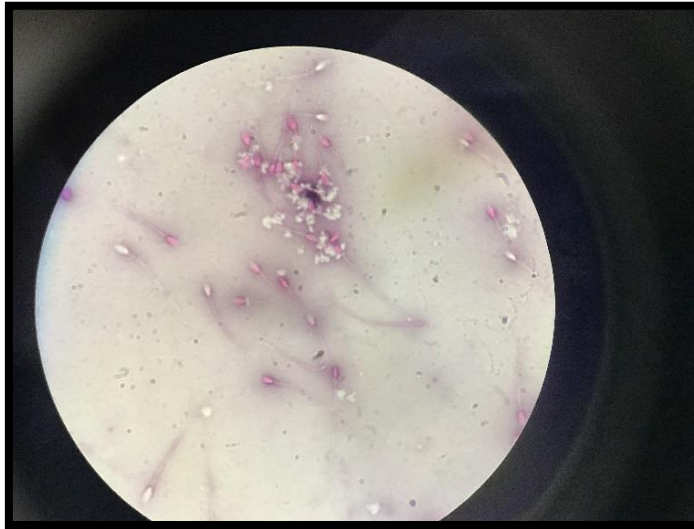


FOTO N° 31: Evaluando viabilidad de las muestras con reactivo eosina-negrosina

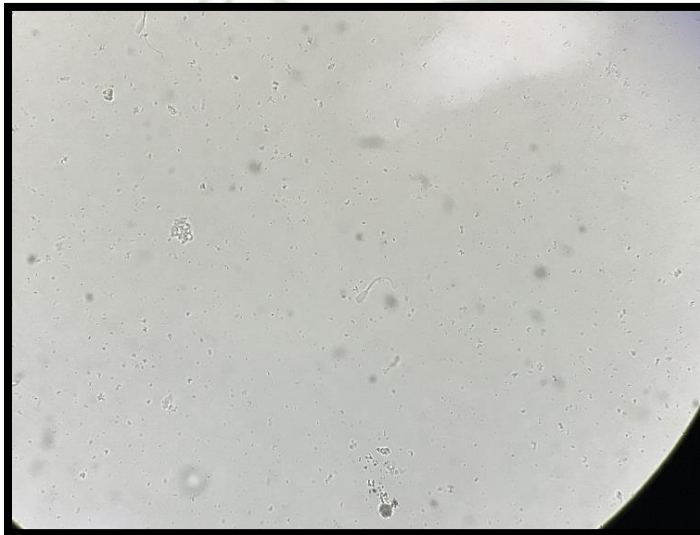


FOTO N° 32: Evaluación de la membrana plasmática.



FOTO N° 33: Evaluación de morfología de los espermatozoides encontrando algunas malformaciones (gota citoplasmática)

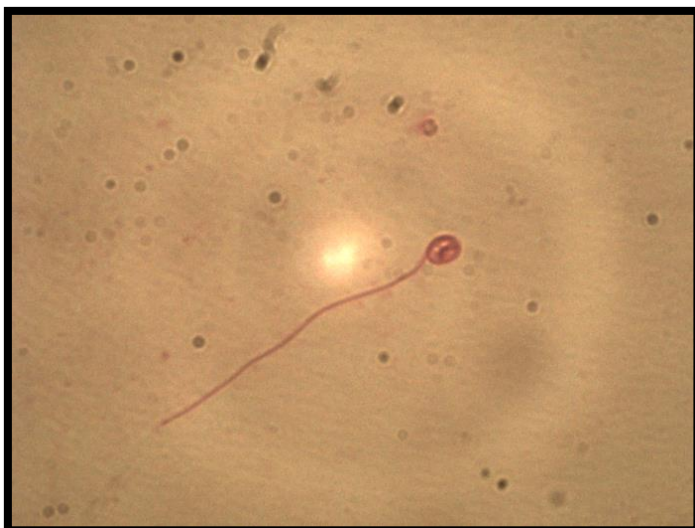


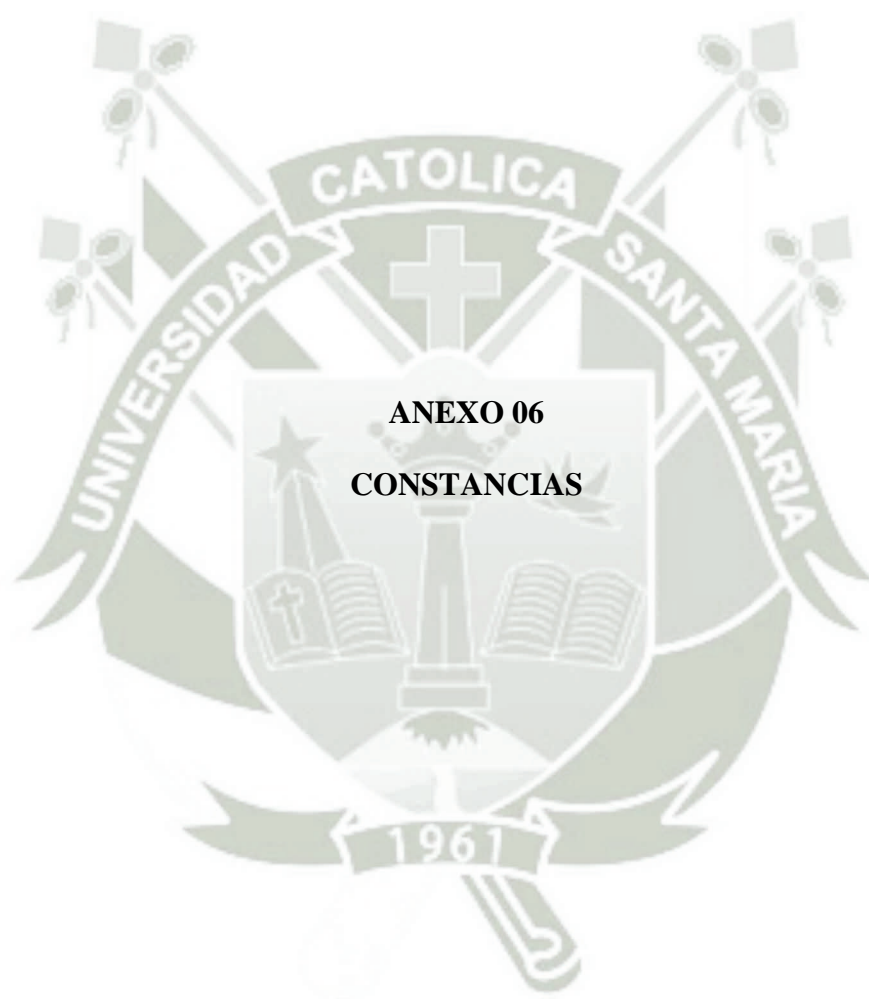
FOTO N° 34: Evaluación morfológica de los espermatozoides encontrando algunas malformaciones en la cabeza (microcefalia).



FOTO N° 35: Evaluación morfológica de los espermatozoides encontrando malformaciones en la cola (cola enrollada).



FOTO N° 36: Evaluación morfológica de los espermatozoides (cola enrollada).





Universidad Católica de Santa María

(51 54) 382038 Fax:(51 54) 251218 ✉ ucsm@ucsm.edu.pe 🌐 http://www.ucsm.edu.pe Apartado: 1350

AREQUIPA - PERÚ



VICERECTORADO
DE INVESTIGACIÓN

CONSTANCIA

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

El Sr **JESUS ARTURO RODRÍGUEZ ARENAS**

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

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

Arequipa, 27 de diciembre de 2017.



Dr. ~~Gonzalo H. Escobar del Carpio~~
VICE RECTOR DE INVESTIGACIÓN
Universidad Católica de Santa María