



UNIVERSIDAD TECNICA DE BABAHOYO
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ESCUELA DE AGRICULTURA, SILVICULTURA, PESCA Y
VETERINARIA
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

TRABAJO DE TITULACIÓN

Trabajo de Integración Curricular, presentado al H. Consejo Directivo de la Facultad, como requisito previo a la obtención del título de:

MÉDICO VETERINARIO

TEMA:

Evaluación andrológica de semen conservado de las razas gyr y girolando.

AUTOR:

Josue Jampier Mora Yopez

TUTOR:

Dr. Jorge Eduardo Alava Cobeña , Msc.

Babahoyo - Los Ríos – Ecuador
2023

Indice

CAPÍTULO I.- INTRODUCCIÓN	1
1.1. Contextualización de la situación problemática	1
1.2. Planteamiento del problema	2
1.3. Justificación.....	2
1.4. Objetivos de investigación.	3
1.4.1. Objetivo general.....	3
1.4.2. Objetivos específicos.	3
CAPÍTULO II.- MARCO TEÓRICO.....	4
2.1.1. Historia de la Conservación del semen	4
2.1.2. Origen de la Raza Gyr	5
2.1.3. Origen de la Raza Girolando	6
2.2.1. Órganos Reproductores del Toro	11
2.2.2. Testículo.....	11
2.2.3. Epidídimo	12
2.2.4. Conducto deferente	12
2.2.5. Glándulas genitales accesorias	13
2.2.6. Ámpula del ducto deferente	13
2.2.7. Glándula vesicular.....	13
2.2.8. Glándula bulbouretral.....	14
2.2.9. Pene	14
2.2.10. Escroto y prepucio	15
2.3. Factores que alteran la calidad seminal.	15
2.3.1. Estrés	15
2.3.1. Otros.....	16
2.4. Fisiología del aparato reproductor del toro	16
2.4.1. Endocrinología de la reproducción en el macho	16
2.4.1. Testículos y su morfología.	17
2.4.2. Testículos	17
2.4.4. Morfología espermática.....	18
2.4.5. Espermatogénesis	18

2.4.6. Morfología Espermatoca	19
2.4.7. Anormalidades Morfológicas.....	20
2.4.8. Fisiología Espermatoca	20
2.4.9. Evaluación seminal	21
Ph	23
2.6. Evaluación microscópica	23
2.6.2. Progresiva	23
2.7. Determinación de la vitalidad espermatoca	24
2.7.1. Tinción vital	24
2.7.2. Semen congelado in vitro	25
2.7.3. Criopreservación	26
2.7.4. Vitrificación	26
2.8. Mecanismo de acción de los componentes de los diluyentes.....	26
2.9. Efectos de la criopreservación sobre morfología y funcionalidad espermatoca.	27
2.10. Características del diluyente.....	28
2.11. Diluyentes más comunes utilizados en la biotecnología	29
2.11.1. AndroMed®	29
2.11.2. Triladyl®	30
2.12. El uso de trehalosa para la conservación de semen.....	30
2.13. Protocolo de congelación.....	31
2.14. Protocolo de vitrificación	31
2.15. Protocolo de descongelación y calentamiento	31
2.16. Evaluación de la calidad del semen	32
2.16.1. Volumen	32
2.16.2. Densidad	32
2.17.1. Motilidad o movimiento en masa	33
2.17.2. Manejo de dilución de semen	34
CAPÍTULO III.- METODOLOGÍA.....	35
CAPÍTULO IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
CAPÍTULO V.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.	43
REFERENCIAS	45

ANEXOS

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 . Ph de semen conservado en pajillas de 0,25 ml.....	39
Tabla 2 Evaluación microscópica de pajillas 0,25ml de semen bovino	40
Ilustración 1.....	41
Ilustración 2.....	41

INDICE DE ANEXO

Anexo 1	52
Anexo 2.....	53
Anexo 3.....	54
Anexo 4.....	55
Anexo 5.....	56
Anexo 6.....	57
Anexo 7.....	58
Anexo 8.....	59
Anexo 9.....	60
Anexo 10.....	61
Anexo 11.....	62
Anexo 12.....	63
Anexo 13.....	64
Anexo 14.....	65
Anexo 15.....	66
Anexo 16.....	67

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el semen conservado de las razas Gyr y Girolando, determinando el Ph del semen conservado en pajillas de 0,25 ml en reproductores, también se analizó la motilidad masal, individual, concentración espermática y viabilidad del semen conservado. De acuerdo a los resultados obtenidos se dice que se obtuvieron resultados de las pajillas de 0,25 ml con valores como que la pajilla proveniente del toro fulminante- Gyr fue de la mayor valor del Ph con 7, mientras que la del Girolando- Black Bull fue de la menor valor con 5, en cuanto a la calidad seminal de los bovinos tenemos como resultados que de la pajilla proveniente del toro Gyr- Jakua Master es del 90% en su motilidad masal. El 90% en su motilidad individual, en su morfología presentó un 60% y en su viabilidad un 80%, en cuanto a la pajilla proveniente del toro Gyr- Fulminante fue de un 75% de motilidad masal fue del 75%, motilidad individual del 75%, su morfología de un 80% y su viabilidad de un 85%, dándonos resultados menores a los anteriores.

Palabras claves: Pajillas, Gyr, Girolando, Resultados

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the preserved semen of the Gyr and Girolando breeds, determining the pH of the preserved semen in 0.25 ml straws in broodstock, mass motility, individual motility, sperm concentration and viability of preserved semen were also analyzed. According to the results obtained, it is said that results were obtained from the 0.25 ml straws with values such as the straw coming from the fulminant bull - Gyr was of the highest value of the Ph with 7, while that of the Girolando - Black Bull was of the lowest value with 5, As for the seminal quality of the cattle, we have as results that the straw from the Gyr-Jakua Master bull is 90% in its massal motility. 90% in its individual motility, 60% in its morphology and 80% in its viability, as for the straw from the Gyr-Fulminant bull, it was 75% massal motility, it was 75%, individual motility was 75%, morphology was 80% and viability was 85%, giving us lower results than the previous ones.

Key words: Straws, Gyr, Girolando, Results

CAPÍTULO I.- INTRODUCCIÓN

1.1. Contextualización de la situación problemática

Usualmente los problemas más determinantes relacionados con la conservación de semen es la calidad del material seminal con el que se va a trabajar, ya que se busca siempre tener un material idóneo, para realizar una correcta inseminación a futuro. **(Godfrey y Dowson et al. 2005)**

Bajo el comentario de Orantes: Se dice que algunos toros pueden producir materiales amorfos con un bajo porcentaje de espermatozoos fértiles **(Orantes Zebadua et al. Manzur 2010)**

Otro de los factores predisponentes a analizar es los problemas de los cambios bruscos de temperatura, pero del agua o del diluyente en que el semen se va a descongelar y esto puede ocasionar el cambio fisiológico o morfológico del material seminal **(Dunchen et al. De los reyes 2012).**

Bajo ningún concepto se puede volver a congelar una dosis que haya sido descongelada con anterioridad, también es importante mencionar que el mal manejo o el indebido manejo del instrumental durante la manipulación del material seminal congelado puede afectar determinante la célula espermática, recordar que otros de los factores que suelen causar problemas que pueden afectarse de manera intrínseca o extrínsecamente por los derivados controles del semen. **(Foot Rh. 1995)**

1.2. Planteamiento del problema

El problema a investigar en este tema es el análisis de material seminal de las dos razas de toros las cuales, nos permitirán conocer desde su porcentaje de fertilidad y su total porcentaje de espermatozoides en buen estado, las cuales nos facilitara el estudio sobre la motilidad y viabilidad en el semen de las razas de toro gyr y girolando.

1.3. Justificación

Se dice que la criopreservación o la conservación de semen es de los avances científicos relacionados con la medicina veterinaria más estupendos en el ámbito reproductivo, ya que de esta manera se puede obtener mejoras genéticas a futuro, las cuales permitirá conocer nuevos cruces de razas por medio de esta conservación de semen, que se utiliza usualmente en las inseminaciones artificiales.

1.4. Objetivos de investigación.

1.4.1. Objetivo general.

- Evaluar el semen conservado de las razas Gyr y Gyrolando

1.4.2. Objetivos específicos.

- Determinar el pH de semen conservado en pajillas de 0,25 ml en reproductores de las razas Gyr y Girolando.
- Analizar la motilidad masal, individual, concentración espermática y viabilidad del semen conservado en pajillas de 0,25 ml de las razas Gyr y Girolando

1.5. Hipótesis.

Ho: El semen conservado en pajillas de 0,25 ml es de mayor calidad en la raza Gyr y Girolando.

Ha: El semen conservado en pajillas de 0,25 ml es de menor calidad en la raza Gyr y Girolando

CAPÍTULO II.- MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes.

2.1.1. Historia de la Conservación del semen

Historia de la preservación del esperma

Lazzaro Spallanzani observó en 1776 que los espermatozoides enfriados en la nieve durante 30 minutos se volvían inactivos, pero podían reactivarse. Al bajar la temperatura, se suprime la actividad metabólica y se prolonga la vida útil de los espermatozoides. A principios del siglo XX, el investigador ruso Ivanov logró embarazar a unas 500 yeguas. En 1913, Ivanov descubrió un carnero muerto en la nieve. El esperma congelado contenía esperma vivo capaz de ser fertilizado. Desde entonces, se inició la búsqueda de un método para mantener vivos los espermatozoides el mayor tiempo posible. **(Mirantes, 2011)**

Luego se hicieron importantes aportes al perfeccionamiento de la fecundación, entre los que destacan: la creación de una vagina artificial por parte del investigador italiano Amantea en Italia en 1914, el uso de diluyentes de semen (fosfato de sodio) en 1930, que hizo posible para prolongar la vida de los espermatozoides. semen durante varios días, y en 1952 fue posible congelar el semen de toro, extendiendo la vida útil del esperma indefinidamente.

La inseminación artificial fue la primera biotecnología utilizada para mejorar la reproducción y la genética animal y aportó el mayor beneficio a la producción animal. ácido láctico. **(Menjivar, 2018)**

(Menjivar, 2018) también menciona que el interés en la inseminación artificial creció después del Primer Congreso de Reproducción Animal e Inseminación Artificial en Milán en 1948. Posteriormente, programas de test de toros en Colorado (1963) los cuales fueron estandarizados después.

2.1.2. Origen de la Raza Gyr

Proviene de la península de Kathiawar en la India, una región con un clima muy cálido y suelos muy áridos y secos. Esta raza participó activamente en la formación de las razas Red Brahman e Indubrasil. Gyr Dairy ofrece al ganadero moderno una alternativa de cruzamiento para producir ganado de doble propósito.

Se sabe que las primeras reses Gyr en América fueron exportadas a Brasil, país desde donde se extendieron ampliamente por todo el continente. De hecho, fuera de la India, la raza Gir se encuentra principalmente en Brasil, Colombia, México, Panamá, Nicaragua, Honduras, Costa Rica, El Salvador, Paraguay y otros países.

Cuando se trata de mejoramiento genético de las razas Cebú, lo que más se destaca es Brasil, país líder en programas de mejoramiento genético en el trópico, que ha logrado avances importantes en el avance genético de su rebaño lechero a través de mejoras y técnicas clásicas. Los métodos reproductivos como la inseminación artificial y, más recientemente, también la transferencia de embriones y la fertilización in vitro, se deben principalmente a características fácilmente medibles y a una alta heredabilidad.

El objetivo principal de la cría de ganado Gir es promover los beneficios resultantes, ya que estos individuos requieren menos pasto y pueden adaptarse fácilmente a los climas tropicales. **(Saldivar, 2016)**

(Saldivar, 2016) igualmente menciona que la vacada Gyr se presenta como una opción para retocar la extracción de goma en los climas cálidos, pues comparte las características de los ganados bos índicus como su gran rusticidad, correa e ingreso adaptabilidad a la atmósfera tropical. Importantes explotaciones lecheras de ambiente cálido, de este modo como sistemas productivos de finalidad en el departamento, han erigido a sus esquemas ejemplares de esta raza.

2.1.3. Origen de la Raza Girolando

Los primeros cruces entre Holstein y Gir se produjeron en Brasil en la década de 1940 con el objetivo de que los animales resultantes del cruce de las dos razas combinaran la alta producción de leche del ganado Holstein con la sencillez de la raza Gir.

Los productos de este cruce se caracterizaron por una excelente productividad, alta fertilidad de las vacas y buena energía.

Debido a estas ventajas, la práctica se extendió rápidamente por todo el país y en poco tiempo se convirtió en el ganado predominante en la mayoría de los potreros brasileños. Algunos dicen que esta transición se produjo por casualidad cuando el toro Gyr estaba apareando con las vacas Holstein. **(Goltz, 2018)**

(Goltz, 2018) asimismo, reitera que en saliente dolido se creó en 1978 el Programa de Cruce Dirigido (Procuza) para preferir grey de cuajada y de rendija en todos los grados de sangre. Por sub sucursal de la ABC (Asociación Brasileña de Criadores), la Asociación de los Criadores ganaderos de Leche del Triángulo Mineiro y Alto Paranaíba (Assoleite) cuadro el espécimen encargado de hacer el Procuza. En 1988, el Ministerio de Agricultura determinó el cese del Procuza, y en 1989 la Assoleite obtuvo el examen aquí al Ministerio y comenzó a transportar el widget (NoRAE) de alineamiento de la Raza Girolando, pasando a organismo denominada Asociación Nacional de Criadores de Girolando. En 1996, con la oficialización de la cuna Girolando, la agrupación pasó a organismo indicación Asociación Brasileña de Criadores de Girolando (Girolando), con lugar en Uberaba, Minas Gerais.

2.2. Bases teóricas

La criopreservación de esperma es una importante biotecnología reproductiva que tiene como objetivo preservar el germoplasma del macho por un período de tiempo indefinido.

Esta biotecnología, combinada con la inseminación artificial, representa un mecanismo eficaz para la promoción y difusión de material genético de la más alta calidad.

La criopreservación de esperma permite al productor ahorrar al reducir los costos de alimentación y transporte de los órganos reproductores, así como los riesgos. Se reduce la transmisión de enfermedades de transmisión sexual (**Castelo y col 2008**).

Castro y col (2009) estudiaron la viabilidad de espermatozoides de toros colectados del epidídimo, refrigerados a 4 °C, 24 horas posteriormente de la filantropía y encontraron resultados similares al de semen eyaculado. La media de la motilidad y del hincapié espermático fue 60,2% y 3,1 respectivamente.

El guardia medio de espermatozoides colectados del pegamento de los epidídimos fue de $1,7 \times 10^9$, siendo el nadie de $0,26 \times 10^9$ y el decisivo de $4,2 \times 10^9$. En cuanto a la morfología se obtuvo una media de 68,9% de espermatozoides normales, siendo el nadie de 31,5% y el decisivo de 89,3%, donde la generalidad de los defectos fueron gotas citoplasmáticas distales. Aunque quia cuadro el neutro del estudio, los autores congelaron los espermatozoides obtenidos de los 4 epidídimos (2 toros), siendo que en 2 epidídimos los espermatozoides fueron colectados a las 6 horas y las repeticiones restantes, a las 24 horas de la filantropía.

En naciente análisis, los espermatozoides congelados 6 horas posteriormente de la filantropía se mantuvieron viables posteriormente de la descongelación (motilidad y hincapié espermático de 50% y 3 respectivamente).

Sin embargo, para los espermatozoides colectados 24 horas posteriormente de la filantropía los resultados fueron inferiores, con una motilidad de 10% e hincapié

Es prominente incluso mentar que interiormente de la viabilidad post-descongelación, la motilidad es considerada como el criterio más prominente en el justiprecio de la fertilidad. El meta de su fama es delimitar la armonía de espermatozoides móviles y la armonía de los que se mueven progresivamente. La motilidad del espermatozoide es un dato culminante en el desarrollo de interacción de los gametos, progresivas reflexivo lesiones celulares que pueden rebajar las preparaciones de fecundación. **(Armenjares, 2013)**

(Armenjares, 2013) También menciona que el porcentaje de motilidad progresiva y viabilidad se determina inmediatamente después de la descongelación del espermatozoide y después de 2 horas de incubación a 36°C mediante una prueba de resistencia al calor.

El espermatozoide recién descongelado de buena calidad normalmente contiene entre un 40% y un 50% de espermatozoides con motilidad y energía progresivas 3-4. Después de 2 horas de incubación, estos valores suelen disminuir entre un 10-15% o 1 punto. Los estándares mínimos de movilidad los establece el Departamento de Medicina y Teriogenología del Rodeo de la Universidad de Saskatchewan, Canadá.

Es decir:

0 horas = 25% de espermatozoides con motilidad progresiva. Energía 3.

2 horas = 15% espermatozoides con motilidad progresiva. Potencia 2.

La dosis de fecundación debe contener al menos 8 millones de espermatozoides con motilidad progresiva. Este número puede reducirse a 6 millones si los espermatozoides contienen más del 30% de espermatozoides con motilidad progresiva y la frecuencia de anomalías es inferior al 25%.

El acrosoma es el revestimiento interno de la cabeza del espermatozoide y su función principal es penetrar la cabeza del espermatozoide. La membrana del óvulo lo penetra y juega un papel fundamental en la fecundación.

El defecto puede ser la ausencia del casquete acrosómico o su pérdida parcial. Se espera que al menos el 50% de los espermatozoides tengan los acrosomas intactos después de la descongelación y el 35% después de 2 horas de incubación.

Las anomalías de la morfología de los espermatozoides generalmente se dividen en primarias y secundarias. Los defectos primarios son aquellos que surgen en los testículos durante la espermatogénesis y los defectos secundarios son los que surgen en el epidídimo. Esta definición se refiere al origen, no a la gravedad. Es un error creer que los defectos primarios son más graves que los secundarios.

Un número de 100 celdas es suficiente a menos que haya problemas graves. Con una gran cantidad de defectos en los espermatozoides, se deben contar hasta 500 células para obtener un espermograma preciso. **(Lucumi, 2019)**

Para que la eventualidad taza de la I.A. sea cero, el semen pasivo rondar vago de todo representante patógeno transmisible. Este debería espécimen el primer criterio de especie requerido por los compradores de semen, o que un montón eminente de enfermedades pueden espécimen transmitidas por esta vía, tales como: Rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR), Diarrea Viral Bovina/Enfermedad de las Mucosas (BVD), Brucelosis, Leptospirosis, Campylobacteriosis, Trichomonosis, Histofilosis, Clamidiasis, entre otras.

En cuanto a la especie bacteriológica del semen, es habitual que existen microorganismos banales en el éter clima donde se encuentran los toros dadores que pueden desempeñarse (NoRAE) como potenciales contaminantes del mismo.

El entorno actual, caracterizada por un ingreso competencia, hace que cada Centro de I.A. quiera apropiarse el crítico pertenencias de sus reproductores, sacando veterano montón de dosis de cada eyaculado. **(Cambindo, 2017)**

Esto suele observarse en semen de toros lecheros de alto valor genético, donde el recuento de espermatozoides por dosis se ajusta en función de los datos de recaída que reciben periódicamente los centros.

Cabe señalar que la valoración del porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva es subjetiva. Sin embargo, una evaluación realizada por personas con experiencia es de gran valor ya que la información se proporciona de inmediato, lo cual es un método rentable y fácil de implementar. La llegada de los sistemas de digitalización de imágenes asistidos por ordenador ha abierto un nuevo campo en el estudio de la motilidad de los espermatozoides.. **(Parvoni, 2020)**.

Estos sistemas, que han automatizado y simplificado el proceso, son usados actualmente en centros de investigación en andrología y centros de reproducción asistida. **(Parvoni, 2020)**

También podemos mencionar las siguientes características de motilidad del semen bovino congelado: La motilidad masiva (4x o 10x) se muestra de la siguiente manera: El semen muy bueno tiene llamativas ondas oscuras con movimiento rápido; los buenos espermatozoides tienen menos ondas oscuras con movimientos moderados; El modelo normal tiene ondas distintas con muy poco movimiento, pero el modelo pobre no tiene ondas y los espermatozoides se observan inmóviles. La movilidad individual (aumento de microscopio de 400x) es muy buena: más del 80%; bueno – más del 60%; normal – más del 40% y pobre. **(Colmenares, 2019)**

2.2.1. Órganos Reproductores del Toro

El sistema reproductor masculino incluye los testículos, el epidídimo y los conductos deferentes correspondientes a cada testículo, las glándulas sexuales accesorias, la uretra distal, el pene, el prepucio y el escroto. Las principales diferencias entre especies son la presencia y posición de las glándulas sexuales accesorias, la posición de los testículos y la estructura del pene **(Andrade, 2015)**.

2.2.2. Testículo

Cada testículo funciona para causar espermatozoides (deportista exocrino) y las hormonas sexuales masculinas llamadas andrógenos (deportista endocrino), siendo la testosterona una de las principales.

Los testículos melodía órganos elipsoides sólidos cuyo equilibrio en absolutones es equivalente con la masa orgánica del animal.

Sus características generales melodía una cima craneal que está relacionado con la líder del epidídimo, una cima socorro que está relacionado con la goma del epidídimo, superficies medial y fronterizo coincidente al campamento que tienen con respecto al cuerpo, reborde epididimario y reborde libre.

Microscópicamente, presentan un flotador albugíneo que es de lienzo conjuntivo habitual comprimido anormal que encapsula al parénquima testicular, en la generalidad de las especies se encuentra un lecho vascular en el flotador albugíneo. **(Andrade, 2015)**

(Andrade, 2015) también menciona que la túnica albugínea del carnero es superficial, mientras que la del caballo y el jabalí es profunda. Además, en un caballo puede haber fibras musculares lisas y en un carnero el testículo está muy empapado.

En el ganado vacuno, la red testicular está revestida por epitelio columnar pseudoestratificado. En el verraco, los bordes apicales de las células de revestimiento pueden contener vesículas que se cree que tienen actividad secretora apocrina. Algunos investigadores creen que las células que recubren estas áreas son en realidad una extensión de la población de células de Sertoli del túbulo contorneado.

2.2.3. Epidídimo

El epidídimo es un órgano alargado que consta de numerosas vueltas del conducto epidídimo. Se adhiere a uno de los bordes del testículo y puede expandirse ligeramente hacia los dos extremos o polos del testículo.

(Cardenas, 2017)

Se divide en tres partes: la cabeza, que está unida a la cápsula testicular y recibe los conductos eferentes que se unen para formar el conducto epidídimo en el que maduran los espermatozoides, y el cuerpo, que está menos adherido a la superficie y forma un espacio. La Cola está conectada al testículo, un ligamento llamado propiamente testículo, en esta cola el diámetro disminuye y se forman los conductos deferentes **(Cardenas, 2017)**.

2.2.4. Conducto deferente

El ducto deferente es la continuación del ducto epididimario y es tortuoso en su inicio, para después tener un trayecto rectilíneo. Este ducto corre medial al epidídimo conforme se dirige a los vasos sanguíneos testiculares para formar el cordón testicular o espermático que atraviesa el canal inguinal, punto en el cual el ducto gira caudo medialmente para pasar ventral al uréter antes de alcanzar la cara dorsal de la vejiga y atraviesa la próstata antes de entrar a la uretra. En algunas especies el tramo situado sobre la vejiga se ensancha para formar la ampolla del ducto deferente, el cual se une a la uretra pélvica en el colículo seminal. Microscópicamente, presenta un epitelio de revestimiento pseudoestratificado cilíndrico con estereocilios.

La lámina propia de la submucosa consiste en tejido conjuntivo ordinario laxo areolar. Sin embargo, la característica principal es la capa muscular muy gruesa del órgano.

(Cardenas, 2017)

2.2.5. Glándulas genitales accesorias

Las glándulas genitales accesorias están íntimamente relacionadas con la uretra pélvica y difieren en las distintas especies. Se incluyen la próstata, el ámpula del ducto deferente, la glándula vesicular y la bulbouretral. (Ledesma, 2011)

2.2.6. Ámpula del ducto deferente

La ampolla del ducto deferente es un ensanchamiento provocado por la proliferación glandular en la pared del ducto cuya función es producir una secreción mucoide y viscosa, rica en carbohidratos, que se adiciona al líquido seminal. **(Ledesma, 2011)**

(Ledesma, 2011) también menciona que todos los mamíferos domésticos existen glándulas tubuloalveolares ramificadas simples en la lámina propia-submucosa de la porción terminal del ducto.

2.2.7. Glándula vesicular

La glándula vesicular es par y se localiza en la superficie dorsolateral del cuello de la vejiga. Está ausente en los depredadores.

En caballos y rumiantes, el conducto excretor se conecta a la parte terminal del conducto deferente y forma el conducto eyaculador. Esta disposición se puede observar en los cerdos, pero el conducto y el conducto deferente normalmente desembocan en la uretra de forma independiente uno del otro.

Descrito microscópicamente como una glándula tubuloalveolar exocrina multicelular. Las secreciones ricas en fructosa sirven como fuente de energía para los espermatozoides eyaculados. **(Ledesma, 2011)**

2.2.8. Glándula bulbouretral

La glándula bulbouretral es par y está presente en todos los mamíferos domésticos, excepto en el perro.

Se ubica en la superficie dorsal de la parte caudal de la uretra pélvica cerca del bulbo del pene. En el cerdo consta de dos estructuras grandes de forma cilíndrica. **(Landivar, 2021)**

En otros mamíferos domésticos son casi esféricos. Tanto la glándula derecha como la izquierda tienen un conducto (excepto en el caballo, donde cada glándula tiene múltiples conductos).

Microscópicamente, su estroma está representado por una cápsula de tejido conectivo denso, regular y de forma irregular, intercalada con fibras musculares lisas y estriadas del esqueleto. Aquí es donde se forman las trabéculas que separan el parénquima glandular. Las glándulas están rodeadas externamente por músculo esquelético estriado, que corresponde al músculo del bulbo glandular. El parénquima está representado por glándulas alveolares tubulares complejas. **(Landivar, 2021)**

2.2.9. Pene

El pene es un órgano copulador y está muy especializado en los mamíferos domésticos. Comienza en el isquion y se extiende con su extremo libre hasta el glande, rodea la parte terminal de la uretra y realiza las funciones tanto del sistema reproductivo como del sistema urinario. El pene de los carnívoros y los caballos es un músculo cavernoso que requiere un flujo sanguíneo significativo para producir una erección. **(Cortes, 2012)**

2.2.10. Escroto y prepucio

(Cortes, 2012) También se menciona que el escroto es la capa encargada de revestir y proteger los testículos. Consiste en piel, la cubierta que forma la pared exterior del escroto; es una sutura, que es la línea media visible formada por las mitades de piel izquierda y derecha del escroto; Tunica dartos es la capa interna de la pared del escroto, que consiste en tejido conectivo ordinario. En su interior hay un tabique escrotal que divide y divide la cavidad escrotal en dos compartimentos. El escroto de cerdos y gatos se encuentra directamente ventral al ano y no cuelga. En caballos, perros y rumiantes existe un espacio perineal entre el ano y el escroto. Estos animales tienen el escroto colgante.

2.3. Factores que alteran la calidad seminal.

2.3.1. Estrés

Existen diferentes tipos de estrés ya bullicio que pueden padecer a un cornúpeto en su condición reproductiva y en personal en la condición seminal. Hay estrés calórico, social, por dieta (fárrago ya defecto), entre otros. La superior máquina por éter del cual el estrés puede encajar nave a una inadecuada condición seminal se apoyó en la hormona conocida como CRH –dato salvador de la hormona corticotropa (ACTH)–, el cual desencadena la cascada del estrés con acción.

El CRH es secretado a altura hipotalámico, luego en situaciones estresantes asimismo es producido por las células intersticiales ya de Leydig a altura testicular (iniciado por Serotoninas), actuando en los receptores en la laminilla de las células de Leydig como un retumbante controlador infeliz para la LH cuyos principales receptores se encuentran en estas células intersticiales, dando nave a un corte por éter de una proteína kinasa C como respuesta al estrés. Así se impide la fabricación de andrógenos por dichas células, recordando el papel central que la testosterona y la dihidrotestosterona ejercen a altura del espermatogénesis. **(Marcillo, 2011)**

(Marcillo, 2011) También menciona que vencedor células de Sertoli, en su obra de moldeadoras y activadoras de las células primordiales (Espermatogonias en adelante,) requieren como hormonas de incentivo punto la hormona FSH como los andrógenos mencionados. En riesgo de que algo de saliente máquina falle, la consecuencia se ve reflejada en la brazado y especie de espermatozoides producidos.

Concomitante a esta situación, CRF estimula la extracción por las células de Leydig de β -endorfinas las cuales a través de una máquina paracrino bloquean la extracción de receptores de las células de Sertoli para la batalla de FSH, impidiendo que estas ejerzan su concierto durante la espermatogenesis y dando recinto a una merma en la extracción espermática.

Mecanismo semejante al que ocurre en toros que viven en países de estaciones y que es influenciado por la redundancia lumínica.

2.3.1. Otros

Dentro de la clasificación de otros factores que podrían afectar la calidad del semen se debe incluir el sistema de colecta, métodos de criopreservación del mismo, entre otros. **(Marcillo, 2011)**

2.4. Fisiología del aparato reproductor del toro

2.4.1. Endocrinología de la reproducción en el macho

El desarrollo del aparato reproductor masculino y sus características sexuales secundarias depende de los andrógenos.

Para el pleno desarrollo del fenotipo masculino se requieren enzimas que catalizan la conversión del colesterol en testosterona y 5^a-DHT. **(Bazconcelos, 2019)**

El proceso reproductivo implica la participación de numerosas hormonas, hipotalámicas, que incitan y regulan la secreción, hipofisiarias que estimulan la liberación de gametos y secreción de hormonas gonadales, placentarias que intervienen en la gestación. Dentro de las hormonas hipofisiarias hay liberadoras e inhibidoras siendo las liberadoras las siguientes: hormona liberadora tirotrópica, corticotrópica, prolactina, oxitocina y vasopresina, y hormona liberadora de la hormona liberadora del crecimiento.

Las hormonas inhibidoras son: hormona inhibidora de la prolactina, de los melanocitos y de la STH. Se describe la acción y el mecanismo por el cual las hormonas desempeñan su papel en el organismo, la descripción química y los diferentes mecanismos de secreción. Se describen también otros tipos de hormonas sintéticas que se han encontrado como son los estrógenos: hexoestrol, dienoestrol, zeranol. Se describen los factores que afectan la acción hormonal, el control endocrino de la espermatogenesis y los efectos biológicos de algunas hormonas. .
(Bazconcelos, 2019)

2.4.1. Testículos y su morfología.

Una membrana de tejido conectivo, la túnica albugínea, rodea cada testículo y consta de tubos seminíferos y tejido intersticial. Los conductos deferentes convergen en la red testicular, que se comunica con el epidídimo a través de los conductos.

La pared de los conductos de los espermatozoides contiene células germinales y células de Sertoli. **(Bazconcelos, 2019)**

2.4.2. Testículos

Las células de Sertoli suministran nutrientes y otros elementos a las células germinales (ABF), producen estrógenos e inhibina. Las espermátidas se liberan en la luz de la MT, pasan a la red testicular y luego al epidídimo, donde los espermatozoides se depositan en la cola. En el espacio entre la MT se encuentran las células de Leydig, que son la fuente de andrógenos en los testículos. **(Bazconcelos, 2019)**

2.4.3. Espermatogénesis

- Espermatocitogénesis – espermiogénesis
- Meiosis: $2n$ a n
- Continua desde la pubertad en adelante
- Duración: aproximadamente 50-60 días
- Ubicación: tubo seminífero

Maduración: epidídimo (fertilización y motilidad) **(Bazconcelos, 2019)**

2.4.4. Morfología espermática

Se considera que el espermatozoide es la célula más especializada de todas. A lo largo de la evolución, se ha diferenciado de otros tipos de células. La peculiaridad de la presencia de una cabeza que contiene información genómica, una sección media con mitocondrias que brindan motilidad al flagelo, son características que brindan diversidad morfológica entre especies; No todos los espermatozoides son iguales y no todos realizan simultáneamente aprendizaje y reacciones acrosómicas en el aparato reproductor femenino. **(Saldivar P. , 2018)**

2.4.5. Espermatogénesis

Las células sexuales se producen en los testículos mediante un proceso continuo de divisiones mitóticas que conduce a la formación de espermatogonias. La espermatogénesis es el desarrollo y transformación de las células de los gametos masculinos.

El ciclo espermatogénico consta de tres fases:

1. Espermatocitogénesis, que consiste en sucesivas

divisiones mitóticas de las espermatogonias con formación de espermatocitos primarios.

2. Meiosis, que consiste en la división meiótica de

espermátidas primarias, a partir de las cuales se forman los espermatocitos secundarios, y luego

espermátidas.

3. Espermiogénesis – diferenciación morfológica y fisiológica. **(Sanchez, 2011)**

Durante la espermiogénesis, el centríolo produce el flagelo del espermatozoide, aquí las mitocondrias se encuentran y se asientan en la base del núcleo para formar parte de la sección media, el aparato de Golgi da lugar a la vesícula acrosómica, el resto del citoplasma se elimina y el núcleo se condensa.

Una vez completado el proceso de espermiogénesis, los espermatozoides son liberados a la luz de los túbulos seminíferos en el proceso llamado espermiación y transportados hasta el epidídimo, donde alcanzan la maduración necesaria para adquirir la capacidad de fecundar un óvulo. **(Gilbert, 2005)**

2.4.6. Morfología Espermática

Un espermatozoide normal en diferentes especies animales como conejo, cerdo y borrego suele tener una apariencia simétrica con cabeza oval de contorno regular y que al teñirlo se observan zonas bien definidas como: zona acrosómica que cubre más de la tercera parte de la cabeza y la sub acrosómica que cubre el resto de la cabeza. **(Vargas, 2018)**

(Vargas, 2018) También menciona que la pieza intermedia es recta y de contorno regular. Se halla alineada con el eje longitudinal de la cabeza y mide de 7 a 8 μm de longitud. La cola es única, delgada, no enrollada y de contorno irregular, tiene una longitud de 45 a 60 μm .

2.4.7. Anormalidades Morfológicas

El estudio de la morfología espermática ha tenido gran importancia al proporcionarnos parámetros que nos permiten lograr una adecuada elección de espermatozoides que garanticen resultados exitosos en tratamientos de reproducción asistida. **(Mendoza, 2018)**

La morfología del esperma es uno de los parámetros de selección más importantes y se correlaciona con el potencial de fertilidad. Esto indica que la morfología anormal de los espermatozoides (teratozoospermia) puede afectar radicalmente la fertilización, el desarrollo embrionario y la implantación. **(Mendoza, 2018)**

Se han publicado varios criterios para evaluar la morfología del esperma. A los efectos de esta guía, se propone dividirlos en dos partes: primarias, cuando reflejan anomalías que ocurren en el testículo, y secundarias, cuando ocurren durante el transporte. a través del sistema de conductos o si surgen por errores en el procesamiento de los espermatozoides desde el momento del registro. **(Mendoza, 2018)**

2.4.8. Fisiología Espermática

En los espermatozoides de los mamíferos, la adquisición de la capacidad de fertilización requiere la ocurrencia de tres procesos fisiológicos: la maduración del epidídimo, el aprendizaje y la respuesta acrosómica.

La maduración de los espermatozoides se produce durante el paso a través del epidídimo. Una vez que los espermatozoides son transportados al epidídimo y viajan a través de la cabeza y el cuerpo hasta llegar a la cola del epidídimo, se consideran tan maduros como los eyaculados y potencialmente fértiles. La capacitación y la reacción acrosómica ocurren después de que los espermatozoides se eyaculan en el tracto reproductivo femenino y se transportan a las trompas de Falopio.

(Casierra, 2012)

Sin embargo, a diferencia de los espermatozoides de eyaculado, los espermatozoides de epidídimo no tienen componentes adquiridos del plasma seminal que pudieran modificar las características estructurales de la membrana plasmática. Estas diferencias confieren cierta ventaja, en cuanto al tiempo necesario para alcanzar la capacitación, a los espermatozoides de cola de epidídimo sobre los espermatozoides de eyaculado. Dicha ventaja prosigue durante la reacción acrosomal.

(Martinez F. S., 2019)

2.4.9. Evaluación seminal

Con la evaluación seminal se pueden conocer las principales características como son: el volumen, la movilidad y la concentración, evaluaciones más detalladas deberían considerar la morfología y la proporción de espermatozoides vivos y muertos.

(Marquenioni, 2017)

Hoy en día, para el examen microscópico de los espermatozoides existen métodos asistidos por ordenador como el análisis de semen asistido por ordenador (en casa), cuyos resultados, aunque costosos, no dependen de la experiencia del especialista.

El equipo consta de un microscopio de contraste de fases, una cámara de vídeo de alta resolución conectada a un monitor, una grabadora de vídeo, una computadora y un software de análisis de esperma asociado que puede medir la motilidad, la concentración y la morfología. **(Escalante, 2016)**

(Granados, 2019) menciona que las principales pruebas que se suelen realizar en la evaluación microscópica son las siguientes:

2.4.9. Evaluación macroscópica

Los indicadores visibles para el evaluador se determinan utilizando los criterios para cada indicador:

2.4.9.1. Tiempo de licuefacción

Para esto se conoce el tiempo de captura del eyaculado. A su llegada al laboratorio será valorado inmediatamente.

2.5. Color del eyaculado

Una vez recogido el eyaculado, se examina a través de un tubo transparente y se puede valorar su apariencia o color. Los colores más comunes son:

- Amarillentos.
- Crema.
- Gris.

Ph

Se coloca una gota de eyaculado en una tira reactiva (Bili-Latetix Bayer), se absorbe y cambia de color. Luego, la tira se compara con el estándar contenido en el paquete de tiras para realizar una medición y determinar el pH. Valor de eyaculación (el valor de esperma correspondiente está entre 5,3 y 7,8 para la mayoría de los mamíferos). **(Castillo, 2019)**

2.6. Evaluación microscópica

Los indicadores determinados son: movilidad, morfología, concentración y viabilidad.

2.6.1. Estimación de movilidad masiva.

La motilidad masiva se define como el movimiento de vórtice de todos los espermatozoides en una muestra. Normalmente, la movilidad de masas se evalúa subjetivamente en una escala de 0 a 5, con un valor de 5 cuando se observan ondas. **(Espinosa, 2019)**

2.6.2. Progresiva

La prueba de motilidad es una de las pruebas más utilizadas para estimar la calidad del esperma. La evaluación requiere el uso de un microscopio óptico o compuesto convencional con objetivos de 10x y 40x (aumentos) y es importante mantener la temperatura de los espermatozoides a examinar y del material a utilizar dentro de los 30°. **(Jarillo, 2019)**

La movilidad puede clasificarse como:

- Muy buena: cuando el 80 – 100 % de espermatozoides presentan movilidad progresiva.
- Buena: cuando el 60 - 79 % de espermatozoides presentan movilidad progresiva.
- Regular: cuando el 40 - 59 % de espermatozoides presentan movilidad progresiva.

Pobre: cuando menos del 40 % de espermatozoides presentan movilidad progresiva.

(Jarillo, 2019)

2.7. Determinación de la vitalidad espermática

2.7.1. Tinción vital

El método más utilizado para evaluar la vitalidad es la técnica de tinción vital. Esto permite la diferenciación de espermatozoides vivos y muertos por la permeabilidad de la membrana plasmática a los pigmentos vitales. Por lo tanto, en las células con una membrana celular en funcionamiento, los tintes no pueden atravesarla, pero cuando hay un cambio, los tintes pueden ingresar a la célula **(Benavides, 2021)**

El método tradicional es la tinción con eosina nigrosina, que también se utiliza para evaluar anomalías morfológicas.

Este procedimiento muestra una expansión donde las células blancas vivas aparecen sobre un fondo violeta o están muertas y son de color rosa. **(Diaz M. ,2017)**

El mayor inconveniente que presenta el uso de la eosina-nigrosina es que, al ser un colorante hipotónico que se añade a una muestra que no ha sido fijada químicamente, puede producir morfologías anormales en los espermatozoides, especialmente defectos en la cola.. **(Diaz M. , 2017)**

2.7.2. Semen congelado in vitro

El proceso de enfriamiento se puede utilizar como método de almacenamiento a corto plazo. Esto requiere un medio adecuado, que normalmente consiste en un tampón, sal, azúcar y una sustancia que proteja la conserva de las caídas de temperatura, como la yema de huevo.

La principal diferencia con los medios de criopreservación es el uso de un crioprotector que reduce la temperatura por debajo de 196 °C para evitar daños celulares al descongelar la muestra.

El uso de semen congelado en la inseminación artificial tiene importantes beneficios para la cría de animales, ya que favorece el comercio nacional e internacional de razas y líneas genéticas, la creación de bancos de germoplasma, santuarios genéticos y la conservación de especies amenazadas y en peligro de extinción. **(Carcelen, 2010)**

La conservación de las estructuras espermáticas y de su capacidad fertilizante exige la reducción o interrupción reversible del metabolismo celular. Esto se consigue mediante el uso de diluyentes y la refrigeración o congelación que deprimen el metabolismo. **(Carcelen, 2010)**

2.7.3. Criopreservación

La tecnología de criopreservación de esperma se ha desarrollado durante aproximadamente 50 años. Las diferencias fisiológicas en los espermatozoides entre especies e incluso entre individuos siguen siendo una cuestión abierta y, a pesar de los esfuerzos en el campo de la criopreservación de espermatozoides, existen pocas técnicas que permitan altas tasas de supervivencia. **(Aguilar, 2018)**

En este caso, se trata de una adición a un programa de conservación más integral, donde la criopreservación de material genético brinda seguridad en caso de desastre o cuando surgen problemas genéticos como resultado de la acumulación de genes recesivos dañinos. **(Aguilar, 2018)**

2.7.4. Vitrificación

La vitrificación es un método de criopreservación ultrarrápido que expone directamente las células al nitrógeno líquido o su vapor, evitando la cristalización del agua intracelular y el criodaño. Este método no utiliza crioprotectores sistémicos, que pueden presentar riesgos mutagénicos. Este método se realiza sobre espermatozoides obtenidos mediante selección de espermatozoides, lo que garantiza una alta motilidad y la ausencia de plasma seminal reduce el riesgo de infección viral y bacteriana. **(Belmonte, 2013)**

2.8. Mecanismo de acción de los componentes de los diluyentes

Los crioprotectores son sustancias hidrosolubles y de baja toxicidad que bajan el punto eutéctico (punto de congelación) de determinadas soluciones (García y Vila, 1984), previniendo el estrés osmótico. **(Benavides R. , 2020)**

Reducir el punto eutéctico significa que la concentración máxima del soluto se logra a una temperatura más baja, aumentando así la deshidratación de los espermatozoides y exponiéndolos a menos estrés osmótico. De esta forma, los crioprotectores previenen la formación de hielo intracelular debido al aumento de la deshidratación celular.

Los crioprotectores también se pueden clasificar en ingredientes activos permeables y no permeables según su permeabilidad celular. **(Benavides R. , 2020)**

2.9. Efectos de la criopreservación sobre morfología y funcionalidad espermática.

La criopreservación reduce la viabilidad de los espermatozoides a través de cambios bioquímicos y estructurales, particularmente en la membrana plasmática debido al estrés osmótico ejercido por las células a través de procesos de deshidratación, deformación de la membrana y formación de cristales de hielo. **(Alcivar, 2021)**

Los efectos de la criopreservación en los espermatozoides incluyen el "choque térmico", que implica la respuesta de los espermatozoides a una caída de temperatura. El daño varía desde la alteración mecánica de las membranas celulares por cristales de hielo hasta el daño molecular (fragmentación del ADN, degeneración del acrosoma, daño mitocondrial) y el desequilibrio osmótico debido a cambios en la permeabilidad. Diversos tipos de daños como térmicos, mecánicos, químicos y osmóticos. Esto incluye la adición de crioprotectores antes de la congelación, cambios en el volumen celular, contracción e hinchazón de las membranas en respuesta a soluciones crioprotectoras hipertónicas, transiciones de fase de los fosfolípidos de las membranas y pérdida de hielo extracelular que conduce a un aumento de la formación de solutos y, por tanto, a un aumento de la formación de solutos. presión osmótica que conduce a la pérdida de agua celular (deshidratación) y formación de hielo intracelular que provoca la alteración del citoesqueleto. **(Alcivar, 2021)**

(Alcivar, 2021) También se ha observado que una disminución de la temperatura de 25 °C a 10 °C aumenta la actividad de las bombas dependientes de ATP3, favoreciendo la difusión o el cotransporte (dependiendo de uno de los ATP3 se transportan dos moléculas simultáneamente). y/o iones H⁺). Por tanto, los procesos de difusión y ósmosis se vuelven dominantes en momentos de estrés osmótico.

Hay otros daños que ocurren a nivel estructural durante la criopreservación, como cambios en las mitocondrias y la fluidez de la membrana, que promueven la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y cambios en el potencial de membrana. De manera similar, el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), el óxido nítrico (NO) y el anión superóxido (O₂⁻) tienen efectos positivos sobre la señalización intracelular, el rendimiento de los espermatozoides y la reacción acrosómica. En cantidades adecuadas, estas moléculas desempeñan funciones importantes en la fisiología del esperma, pero en concentraciones elevadas, la toxicidad asociada con la inactivación de proteínas mediante ionización, peroxidación lipídica y daño al ADN perjudica la capacitación y los espermatozoides. Las reacciones físicas son dañinas.**(Alcivar, 2021)**

2.10. Características del diluyente

Un diluyente es un medio compuesto por múltiples sustancias que realizan diferentes funciones, tales como: B. Preservación del semen previo a la criopreservación, tampones para ajustar el pH, nutrientes y antibióticos.

El sistema tampón es una sustancia responsable de mantener el equilibrio del pH de los espermatozoides, ya que el metabolismo de los espermatozoides libera catabolitos tóxicos que producen ácido láctico, reduciendo así la viabilidad de otros espermatozoides. Las sustancias tampón contenidas en el diluyente mantienen el pH entre 6,9 y 7,1.

Los crioprotectores son sustancias que protegen los espermatozoides de la congelación. Existen crioprotectores intracelulares y extracelulares. Los crioprotectores extracelulares provocan una rápida deshidratación de los espermatozoides. Los más comunes son la sacarosa, la dextrosa, la glucosa y el dextrano. **(Landivar M. , 2021)**

(Landivar M. , 2021) También menciona que como entidad nutritiva se debe del renuevo de cigoto y leche, la cual contiene lecitina (fosfatidilcolina), que parece matricular la telilla mediante la gastronomía de fosfolípidos celulares perdidos .

Investigaciones realizadas con semen congelado, determinaron la presencia de bacterias principalmente mesófilas e incluso coliformes ,y encima la fitotomía bacteriana del enseres espermático en bovinos se han opuesto microorganismos patógenos como Actinomyces pyogenes bovis, Staphylococcus aureus, Streptococcus (grupos A y D de Lancefield), Escherichia coli y Pseudomonas aeruginosa; con vieja frecuencia bacterias saprofitas de varios géneros y especies .Los hallazgos nunca presentan aviso en el vencimiento de la inseminación cursi cabal al explotación de antibióticos que se adicionan al diluyente.

2.11. Diluyentes más comunes utilizados en la biotecnología

2.11.1. AndroMed®

Es un concentrado estéril para la producción de diluyente de eyaculado bovino sin yema de huevo. Se utiliza para congelar el esperma y mantenerlo fresco. Cada frasco de AndroMed® contiene 200 ml de concentrado para producir 1000 ml de diluyente listo para usar. El contenido de antibióticos corresponde a la norma de la UE: norma UE 88/407.

Contiene: fosfolípidos, TRIS, ácido cítrico, azúcar, antioxidantes, tampones, glicerina, antibióticos y agua ultrapura. **(Villalba, 2020)**

2.11.2. Triladyl®

Esta es una concentración estéril para la preparación de un diluyente de yema de huevo para la congelación de semen bovino en un solo paso. Cada botella de Triladyl® contiene 250 g de concentrado para producir 1250 g de diluyente listo para usar. El contenido de antibióticos varía desde una dilución de 1:8 (1 parte de esperma por 8 partes de diluyente) hasta el estándar de la UE: estándar de la UE 88/407.

Contiene: TRIS, ácido cítrico, azúcar, tampón, glicerina, antibióticos y agua extremadamente pura.

Cada 100 ml de dilución preparada contiene (unidades activas): tilosina 5,7 mg, gentamicina 28,6 mg, espectinomicina 34,3 mg y lincomicina 17,2 mg. Por ejemplo, 100 ml de semen diluido a partir de una dilución 1:8 contienen la siguiente concentración de antibióticos: tilosina 5,0 mg, gentamicina 25,0 mg, espectinomicina 30,0 mg y lincomicina 15,0 mg (25). **(Villalba, 2020)**

2.12. El uso de trehalosa para la conservación de semen

Existe una gran cantidad de estudios sobre el efecto crioprotector de la trehalosa sobre la viabilidad del esperma en ovejas, mientras que hay menos estudios disponibles en ganado vacuno. La importancia de la trehalosa radica en que es un crioprotector no permanente que protege la estructura de las membranas de los espermatozoides del estrés oxidativo y del daño causado por el shock de frío que se produce cuando baja la temperatura. **(Iturralde, 2021)**

Según la trehalosa, tiene la propiedad de interactuar con los lípidos de la membrana y limitar así la transición de fase. El gran efecto crioprotector de este azúcar es que tiene un efecto estabilizador de membranas, lo que significa que sufre menos cambios de temperatura. **(Villalba, 2020)**

2.13. Protocolo de congelación

La congelación de los espermatozoides se realizó utilizando un diluyente comercial (Triladyl, Minitübe, Alemania), que se diluyó a 1:1:3 (V:V) de Triladyl, con yema de huevo y agua bidestilada, respectivamente.

La cantidad de diluyente que se adicionó al eyaculado fue para obtener una concentración final de 50×10^6 espermatozoides/mL. Posteriormente, el semen diluido se enfrió lentamente durante 2 h hasta llegar a 5°C y se mantuvo a esta temperatura durante 2 h más, para luego envasarlo en pajillas de 0.5 mL. **(Iturralde, 2021)**

2.14. Protocolo de vitrificación

Para la vitrificación, el semen se centrifugó a 1000 g durante 3,5 min y luego se resuspendió en medio TEST a base de: N-[Tris-(hidroximetil)-metil]-2-amino-etanosulfónico ácido 210,6 mM, Hidroxi-metilaminometano 95,8 mM, D-glucosa 10,1 mM, suplementado con 6 % de yema de huevo y 0,1 M de sacarosa para obtener una concentración de 50×10^6 espermatozoides/mL. **(Gallegos, 2021)**

Esta suspensión se refrigeró por 30 min. Para el proceso de vitrificación, se formaron gotas de 60 µL y se agregaron directamente a NL2. Para su conservación se colocaron dos gotas vitrificadas en un criotubo (Nunc®) el cual se sumergió en NL2.

(Gallegos, 2021)

2.15. Protocolo de descongelación y calentamiento

(Gallegos, 2021) También se menciona que la descongelación se realizó a 37 °C durante 45 segundos . El calentamiento del espermatozoides vitrificados se llevó a cabo como se describe con cargas ligeras.

2.16. Evaluación de la calidad del semen

Las características seminales que se deben evaluar son:

2.16.1. Volumen

El talento de obtención de semen por gramo de tela testicular (Producción Diaria de Espermatozoides, PDE) está bruscamente correlacionada con la circunferencia escrotal en toros jóvenes.

En los toros que están sometidos a un régimen alterno de florilegio de semen, el corpulencia y la agrupamiento espermática melodía indicadores de la talento para provocar espermatozoides y le permiten a los centros de inseminación artificial (IA) monitorear la interpretación testicular de los mismos. **(Cardona, 2020)**

2.16.2. Densidad

La densidad puede clasificarse de la posterior forma:

- **Muy buena (MB):** semen cremoso, granular con 750 a 1,000 millones de espermatozoides/ml o más
- **Buena (B):** semen cande con 400 a 750 millones de espermatozoides/ml
- **Suficiente (S):** semen parecido a cuajo descremada con 250 a 400 millones de espermatozoides/ml
- **Pobre (P):** semen translúcido con aparte de 250 millones de espermatozoides/ml

En esta repetición últimos métodos, la corpulencia y el agrupamiento podrían en absolutones individuo representativos del talento general de un cornúpeta para provocar espermatozoides; sin embargo, con una buena técnica, es asequible apoderarse eyaculados limpios con buen agrupamiento. . **(Cardenas A. , 2019)**

2.17. Motilidad

2.17.1. Motilidad o movimiento en masa

Se coloca una menudencia de semen de 5 mm de secante sobre un portaobjetos precalentado, y se observa el acto en aluvión de los espermatozoides usando microscopía de labrantío claro, el diafragma de labrantío cerrado y con magnificación de 40x. **(Cardenas A. , 2019)**

(Cardenas A. , 2019) También afirma que los factores que influyen en el flujo de espermatozoides son la concentración, la proporción de células con flujo lento y la velocidad/redundancia del flujo de espermatozoides. Si más de estos factores se ven afectados, el aumento disminuirá.

Calificaciones descriptivas para el método del aluvión:

- **Muy Bueno (MB):** Remolinos oscuros y rápidos.
- **Bueno (B):** remolino lento
- **Regular ®:** No se producen vórtices a pesar de la influencia indiferente de las células individuales.
- **Pobre (P):** la actividad celular individual es mínima o está ausente.

movilidad individual

- Coloque un grupo de espermatozoides de 5 a 7 μ l en un portaobjetos fresco precalentado, cree un papel secante de aproximadamente 3 a 5 mm y cúbralo con una membrana cubreobjetos.

- La cantidad de semillas utilizadas para el método de evaluación (5 o 7 μL) depende de la cantidad de cubreobjetos seleccionados por el usuario (cubreobjetos de 18 x 18 mm o 22 x 22 mm).
- La notificación es observada con microscopía de antítesis de circunstancia y con bulbo de 200 - 400x, determinando el proporción de células espermáticas con acto paulatino lineal.
- Si el semen está muy concentrado, la muestra puede diluirse con un tampón o diluyente de semen antes de colocar un cubreobjetos.
- Calificación descriptiva motriz individual:
 - **Muy bueno (MB):** 80-100% con motricidad progresiva
 - **Bueno (B):** 60-79% con motricidad progresiva
 - **Normal ®:** 40-59% con motricidad progresiva Habilidades Habilidades
 - **Pobre (P):** <40% con motilidad progresiva

El análisis visual microscópico de la motilidad progresiva individual tiende a ser subjetivo, incluso cuando lo realiza personal altamente capacitado, y se vuelve laborioso cuando es necesario analizar un gran número de muestras. Sistemas de análisis de esperma asistidos por ordenador (CASA). . **(Moran, 2019)**

2.17.2. Manejo de dilución de semen

Certified Semen Services (CSS) es una organización voluntaria sin fines de lucro cuya misión es establecer políticas para muchos centros de inseminación de ganado de América del Norte. **(Moran, 2019)**

CAPÍTULO III.- METODOLOGÍA.

3.1. Tipo y diseño de investigación.

Inductiva, deductiva y experimental.

3.2. Operacionalización de variables.

Tipo de variables	Variables	Definición	Tipo de medición e indicador	Técnicas de tratamiento de investigación	Resultados esperados
Dependientes	pH	El pH: normalmente en semen fresco de toro el pH oscila entre 6.2 y 6.8, sin embargo, los diluyentes utilizados comercialmente incrementan estos valores entre 6.8 y 7.2.	Experimental	Cuantitativa	Evaluar los porcentajes adecuados de las diferentes razas de pajuelas.
Dependientes	Concentración espermática	La concentración de una pajuela al momento del descongelado debe de existir un mínimo de 10.000.000 de células motiles por pajuela.	Experimental	Cuantitativa	Evaluar los porcentajes adecuados de las diferentes razas de pajuelas.
Dependientes	Mortalidad total	Evaluar los porcentajes de mortalidad al momento del descongelamiento de las pajuelas.	Experimental	Cuantitativa	Evaluar los porcentajes adecuados de las diferentes razas de pajuelas.

Dependientes	Viabilidad	Indica el número de espermatozoides vivos presentes en una pajuela criopreservada	Experimental	Cuantitativa	Evaluar los porcentajes adecuados de las diferentes razas de pajuelas.
Independientes	Dosificación de las dosis seminales.	Comparación para observar o evaluar sobre la dosificación de 0,25 a 0,50 ml.	Cuantitativa	Cuantitativa	Evaluar los porcentajes adecuados de las diferentes razas de pajuelas.

(Mora, 2023)

3.3. Población y muestra de investigación.

10 pajuelas, 5 pajuelas de cada toro, con 2 toros de distintas razas: Gyr y Girolando.

3.3.1. Población y muestra

10 pajillas de las razas bovinas Gyr y Girolando.

Las muestras a analizar en este trabajo serán las pajuelas de semen conservado de las razas de toro, evaluando su motilidad y viabilidad.

3.4. Técnicas e instrumentos de medición.

3.4.1. Técnicas

Para la conservación del semen se utilizan diluyentes que son soluciones acuosas que permiten aumentar el volumen del eyaculado hasta conseguir las dosis necesarias, preservar las características funcionales de las células espermáticas y mantener el nivel de fertilidad adecuado. Muchos de los diluyentes utilizan la yema de huevo dentro de sus componentes. Existen varios trabajos que buscan reemplazar la yema de huevo con sustancias como la lecitina de soya.

Estudios realizados han mostrado que la lecitina de soya al 1 o 1,5 % puede reemplazar la yema de huevo.

Actualmente, hay programas como el Computer Assisted Sperm Analysis (CASA), que determinan la concentración, motilidad en masa e individual que ayudan en la preparación de semen a congelar con excelentes resultados . El otro parámetro a tener en cuenta es la calidad del diluyente. Son muchos los utilizados con variables resultados y que buscan la durabilidad del semen en el tiempo con base en la congelación o criopreservación. Phillips investigador Europeo en su trabajo con diluyentes a base de fosfato sódico, fosfato potásico y yema de huevo, logro mantener vivos espermatozoides por 18 horas a una temperatura de -4 y -10 °C

(Moran, 2019)

3.4.2. Instrumentos

- Tanque de Nitrogeno con el material seminal
- Pajuelas
- Corta Pajuelas
- Colorantes para tinción : Neosina y Negrosina
- Microscopio.
- Papel higienico o papel secante
- Termo Descongelador
- Termometro
- Tijeras y pinzas
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Set de micropipetas
- Puntas de micropipetas
- Tubos de Ensayo de 5ml

3.5. Procesamiento de datos.

Se aplicara una estadística descriptiva para el análisis de resultados y se empleara el uso del Excel para representación de cuadros o tablas para presentar los resultados de la evaluación andrológica.

3.6. Aspectos éticos.

Los datos obtenidos se obtendrán de forma legal, confiable y estrictamente apegados a la verdad de los manejos de la ética

CAPÍTULO IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados

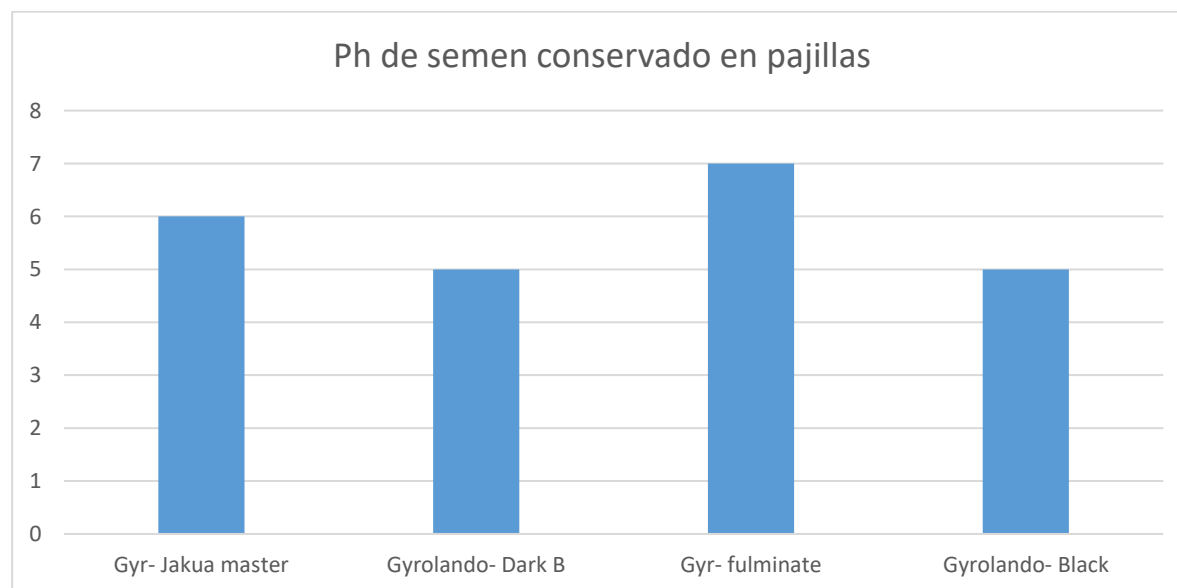
4.1.1 pH de semen conservado en pajillas de 0,25 ml de las razas Gyr y Girolando

En esta tabla 1 se muestran los resultados de la evaluación del semen. del ph de los pajillas de 0,25 ml evaluadas durante este trabajo experimental, fueron las siguientes en el Gyr – Jakua Master fue de 6, en el Girolando Dark B fue de 5 , en el Gyr fulminante fue de 7 y en el Girolando Black fue de 5.

Tabla 1 . Ph de semen conservado en pajillas de 0,25 ml

Razas	PH
Gyr- Jakua master	6
Girolando- Dark B	5
Gyr- fulminate	7
Girolando- Black	5

(Mora, 2023)



(Mora, 2023)

(Mora, 2023)

4.1.2 Calidad seminal en bovinos

En esta tabla mostraremos los resultados de la calidad seminal de los resultados, obtenidos de este trabajo, donde nos menciona que el análisis de la pajilla del toro Gyr- Jakua Master fue el mejor con una motilidad masal del 90%, motilidad inividual del 90%, Morfologia del 60% y una Viabilidad del 80%.

Tabla 2 Evaluación microscópica de pajillas 0,25ml de semen bovino

Razas	Motilidad masal	Motilidad individual	Morfologia	Viabilidad
Gyr- Jakua master	90%	90%	60%	80%
Gyrolando- Dark B	82%	82%	90%	75%
Gyr- fulminate	75%	75%	80%	85%
Gyrolando- Black	95%	95%	70%	80%

(Mora, 2023)

Ilustración 1

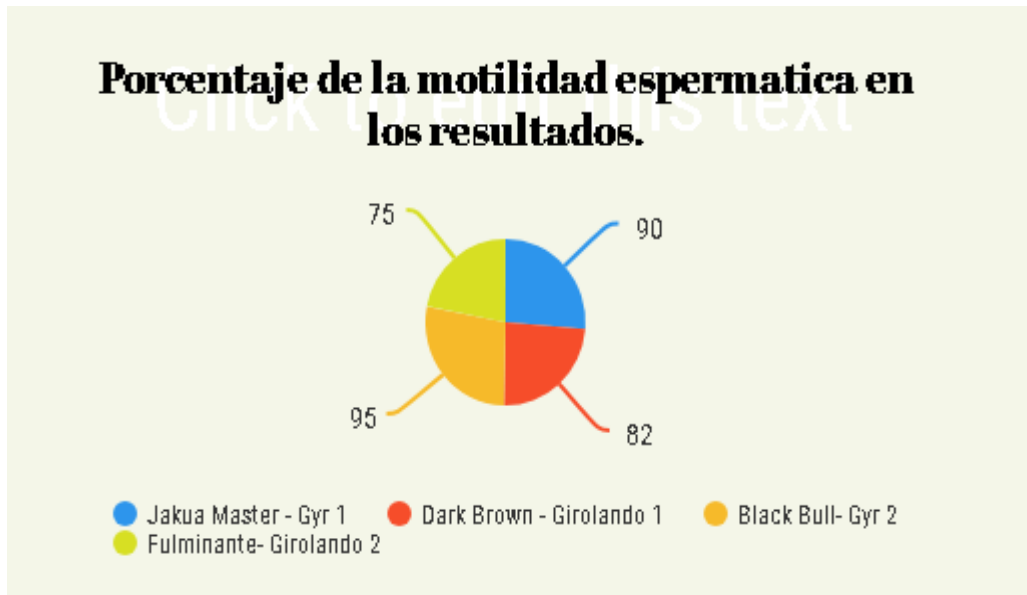
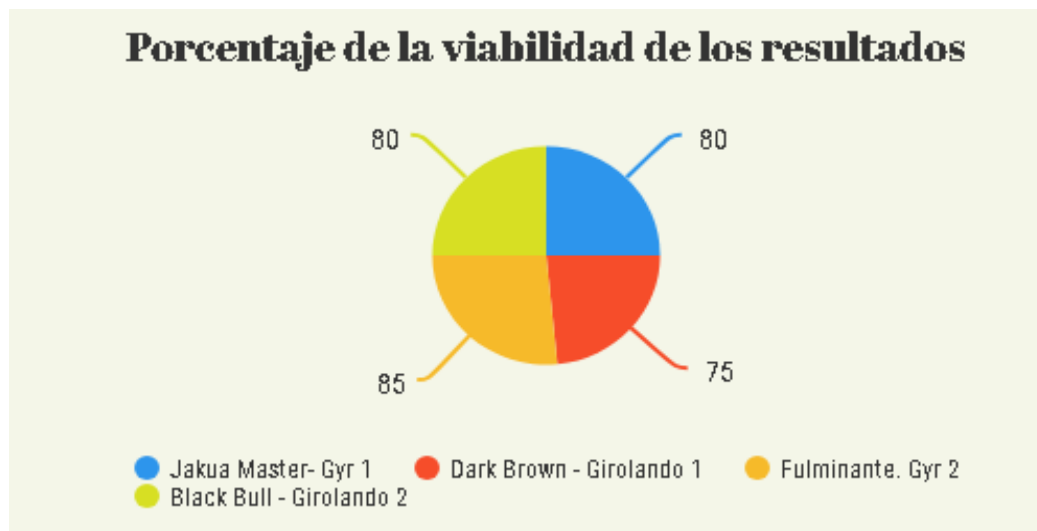


Ilustración 2



(Mora, 2023)

4.2. Discusión

(Maldonado, 2019) La motilidad individual estimada en este estudio va de 59 a 80%, rango que contiene al valor promedio de quienes en la provincia de Morona Santiago registraron una motilidad individual de 70,3% para bovinos charoláis, valor muy distinto al de nuestros resultados que fueron de 90% de motilidad en un toro de raza girolando.

(Rioja, 2017) Con respecto a la calidad espermática post descongelamiento se puede decir que los tratamientos aquí descritos mostraron Motilidad Individual Progresiva entre 41 y 45%, en nuestros resultados se mostraron una motilidad individual de un 75% de un toro de raza gyr, la cual determina una diferencia de los resultados estimados anteriormente.

(Fernandez, 2021) Con respecto a la Morfología, el trabajo aquí descrito obtuvo valores superiores al 92%, y en relación a nuestros resultados se obtuvo una morfología del 70% en un toro de raza gyr que demuestran ser valores menores a los del trabajo citado.

CAPÍTULO V.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

5.1. Conclusiones

Se concluye que por medio de esta evaluación se determinan distintos estadios por medio de las pruebas realizadas a los distintos materiales seminales, las cuales fueron identificados por medio de las pruebas de laboratorio en este caso con la observación microscópica que nos permitio determinar la morfología, y también el conteo de los espermatozoides tanto vivos y muertos.

Tambien es importante mencionar que por lógica, la realización de las pruebas de ph en el semen fueron fundamentales para determinar por medio de una escala de números, la determinación exacta o probable de la cual, se relaciona con el resultado del ph.

En cuanto a la motilidad y la viabilidad los parámetros para la observación microscópica fue de total importancia para obtener los resultados las cuales obtuvimos luego de la evaluación, que a nuestro criterio, fueron resultados aceptables que se esperaban en un determinado tiempo, mencionando o resaltando que este tipo de trabajos nos benefician como médicos veterinarios ya que nos permite demostrar y aprender nuevas actividades en lo que le corresponde a el área de laboratorio y la andrología.

Finalmente, podemos mencionar que es importante en este tipo de trabajos experimentales, la correcta temperatura para el descongelamiento del material seminal, para luego de su observación en el microscopio pueda ser mas sencilla de analizar.

5.2. Recomendaciones

- Se recomienda realizar trabajos similares al de este trabajo, en donde se puede usar pajillas de otros tipos de razas de toros.
- Es importante también conocer todos los factores que pueden influir en la en el estado de conservación de las pajillas, para obtener buenos resultados posterior a la inseminación artificial
- Se recomienda que al seleccionar un método de conservación queda totalmente abierto al criterio del médico veterinario o del biotecnólogo la cual será importante la disponibilidad y el lugar donde trabaje.

REFERENCIAS

1. Pérez, J., Chacón, L., Otero, R., Cardona, J., & Andrade, F. (2014). Relación entre la circunferencia escrotal, el crecimiento testicular y parámetros de calidad de semen en toros de raza Guzerat, desde la pubertad hasta los 36 meses de edad.
Revista de Medicina Veterinaria, 71-87.
2. Aguilar, R. (2018). *Estudio de la criopreservacion del semen bovino* . Lima, Peru : Publicaciones de la Universidad Central de Lima .
3. al, F. S. (2019). *Fisiologia Espermatica y sus valorizaciones* . Cochabamba, Bolivia : Publicaciones de la Universidad Central de Cochabamba .
4. Alcivar, C. (2021). *Estudio de la calidad espermatica de semen congelado* . Bucaramanga, Colombia : Editoriales de la Universidad Central de Bucaramanga .
5. Andrade, M. (2015). *Anatomia y fisiologia del aparato reproductor del bovino macho*. Ciudad de Mexico, Mexico : Editoriales de la Unam .
6. Armenjares, M. (2013). *Analisis de la viabilidad y vigor de semen congelado en bovinos* . Santiago del Estero, Argentina : Universidad de Santiago del Estero .
7. Bazconcelos, R. (2019). *Fisiologia del aparato reproductor del macho bovino* . Junin, Argentina : Editoriales de la Universidad Nacional de Junin .
8. Belmonte, P. (2013). *Fase de criopreservacion de semen bovino* . Junin, Argentina : Publicaciones de la Universidad Central de Junin .
9. Benavides, M. (2021). *Estudio microscopico del semen in vitro* . Barranquilla, Colombia : Editoriales de la Universidad de Barranquilla .
10. Benavides, R. (2020). *Estudio de los diluyentes usados para la descongelacion de semen* . Toluca, Mexico : Publicaciones de la Ciudad de Toluca .
11. Cambindo, M. (2017). *Analisis microscopico de semen congelado en bovinos* . Bogota, Colombia : Universidad Central de Bogota .
12. Carcelen, J. (2010). *Analisis microscopico seminal* . Valencia, Venezuela : Publicaciones de la Universidad de Valencia .
13. Cardenas, A. (2019). *Estudio de la calidad espermatica* . Guadalajara, Mexico : Publicaciones de la Universidad de Guadalajara .
14. Cardenas, M. (2017). *Estudio anatomico del aparato reproductor del macho bovino* . Torreon, Mexico : Universidad Nacional de Torreon .
15. Cardona, R. (2020). *Estudio del congelamiento del semen* . Junin, Argentina : Publicaciones de la Universidad de Junin .
16. Casierra, M. (2012). *Analisis de la fisiologia espermatica en bovinos* . Nariño, Colombia : Editoriales de la Universidad Nacional de Nariño .
17. Castillo, P. (2019). *Recoleccion y manipulacion de semen bovino in vitro* . Xochimilco, Mexico : Universidad Autonoma Nacional .

18. Colmenares, E. (2019). *Evaluacion de la motilidad masal del semen bovino* . San Jose, Costa Rica : Editoriales de la Universidad de San Jose .
19. Cortes, J. (2012). *Anatomia del macho bovino y otras especies* . Concepcion, Chile : Universidad Nacional de Concepcion .
20. Cristhian Paúl Lectong Anchundia, J. L. (feb de 2021). *ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA AGROPECUARIA DE MANABÍ MANUEL FÉLIX LÓPEZ*. Obtenido de <https://repositorio.espam.edu.ec/bitstream/42000/1386/1/TTMV07D.pdf>.
21. Diaz, M. (2017). *Conservacion y manejo de semen in vitro* . Montevideo, Uruguay : Publicaciones de la Universidad de Montevideo .
22. Diaz, N. (2018). *Protocolos de criopresevacion en bovinos* . Pereira, Colombia : Universidad Tecnologica de Pereira .
23. Escalante, G. (2016). *Estudio de la evaluacion seminal bovina* . Santiago, Chile : Publicaciones de la Universidad de Santiago de Chile .
24. Espinosa, R. (2019). *Manual de analisis seminal in vitro* . Xochimilco, Mexico : Universidad Autonoma Nacional .
25. Fernandez, M. (2021). *Evaluacion de semen conservado en Charolais* . Carabobo, Venezuela : Editoriales de la Universidad de Carabobo .
26. Gallegos, P. (2021). *Estudio de la criopreservacion del semen bovino* . Valencia, Venezuela : Editoriales de la Ciudad de Valencia .
27. Gilbert, R. (2005). *Manual de recoleccion y congelacion seminal* . Michigan, United States : Universidad of Michigan .
28. Goltz, L. (2018). Origen e historia de la raza girolando. *Revista Argentina* , 1-20 .
29. Granados, J. (2019). *Recoleccion y manipulacion seminal de semen in vitro* . Ibagué, Colombia : Publicaciones de la Universidad Central de Ibagué .
30. I
31. Jarillo, E. (2019). *Recoleccion y manipulacion seminal in vitro* . Xochimilco, Mexico : Universidad Autonoma Nacional .
32. Landivar, M. (2021). *Anatomia del macho bovino*. Ciudad de Mexico, Mexico: Editoriales de la Unam .
33. Landivar, M. (2021). *Crioperservacion seminal* . Santa Cruz, Bolivia : Editoriales de la ciudades de Santa CRUZ .
34. Ledesma, P. (2011). *Anatomia del aparato reproductor del macho bovino* . Mendoza, Argentina : Editoriales de la Ciudad de Mendoza .
35. Lucumi, M. (2019). *Espermograma y conteo seminal de semen congelado* . Boyaca, Colombia : Universidad Central de Boyaca .
36. Maldonado, J. (2019). *Evaluacion andrologica en semen conservado* . Madrid, España : Editoriales de la Universidad de Madrid .
37. Marcillo, M. (2011). *Factores que alteran la calidad seminal* . Monterrey : Red. Vet. Zoo .
38. Marquenioni, C. (2017). *Evaluacion seminal en bovinos* . Ezeiza, Argentina : Publicaciones de la Universidad Central de Ezeiza .

39. Marquetti, D. (2009). *Estudio de los diluyentes usados en semen in vitro* . Barracas, Argentina : Editoriales de la Universidad de Barracas .
40. Martinez, F. S. (2019). *Fisiologia espermatica en bovinos de raza Bhraman* . Cochabamba, Bolivia : Publicaciones de la Universidad Central de Cochabamba .
41. Mendoza, M. (2018). *Analisis morofoligico del espermatozoide en bovinos* . Xochimilco, Mexico : Universidad Autonoma Metropolitana .
42. Menjivar, J. (2018). *Historia de la criopreservacion seminal* . Lima, Peru : Universidad Nacional de Lima .
43. Mirantes, N. (2011). *Estudio sobre la crioperservacion del semen de bovinos* . Pamplona, España: Editoriales de la Universidad de Pamplona .
44. Moran, R. (2019). *Estudio de la morfologia seminal en bovinos* . Bogota, Colombia : Editoriales de la Universidad de Bogota .
45. Parvoni, F. (2020). *Analisis microscopico de las celulas seminales* . Buenos Aires, Argentina : Universidad Agropecuaria de Buenos Aires .
46. Rioja, M. (2017). *Analisis y evaluacion de semen en bovinos* . Santa Martha, Colombia : Editoriales de la Universidad de Santa Martha .
47. Saldivar, K. (2016). *Investigaciones sobre el origen de la raza Gyr* . Asuncion, Paraguay : Editoriales de la Ciudad de Asuncion .
48. Saldivar, P. (2018). *Recoleccion y manipulacion seminal in vitro* . Xochimilco, Mexico: Universidad Autonoma Metropolitana .
49. Sanchez, E. (2011). *Recoleccion y manipulacion seminal in vitro* . Xochimilco, Mexico : Universidad Autonoma Metropolitana.
50. Vargas, A. (2018). *Recoleccion y manipulacion seminal in vitro* . Xochimilco, Mexico : Universidad Autonoma Metropolitana .
51. Villalba, C. (2020). *Criopreservacion seminal en bovinos* . Toluca, Mexico : Editoriales de la Ciudad de Toluca .
52. Ake, J., Martinez, H., & Centurion, F. (2012). Efecto de los diluyentes Triladyl y Seagearsobre la congelacion de semen canino. Yucatan: Bioagrociencias.
53. Armas, R., Castillo, A., & Aparicio, N. (2013). Influencia de la concentración seminal pre congelación, sobre la viabilidad espermática post descongelación en toros de la raza.
54. Simbra (5/8 Simmental x 8/8 Brahman. Panama: Centro de Investigaciones biotecnologicas agropecuarias, Facultad de Ciencias Agropecuarias.

55. Cabrera, P., & Pantoja, C. (2012). Viabilidad Espermática e integridad del acrosoma en semen congelado de toros nacionales. *Revista de investigaciones veterinarias del Peru*, 4-14.
56. Cabrera, p., Yoong, w., & Gamarra, G. (2009). Evaluación de la fertilidad in vitro del semen de toros jóvenes nacionales en ovocitos provenientes de ovarios de animales beneficiados. *Revista de investigaciones veterinarias del peru*, 2-5
57. Gonzales, A., Gonzalo, W. V., & Prospero, C. (2016). Evaluación de Tres Métodos para Uso de Albúmina Sérica Bovina en el Sexado de Espermatozoides de Toros. *Revistas de investigaciones Veterinarias del Peru.*, 518-530.
58. Gonzales, E., Chamba, H., Sanchez, E., & Luzon, F. (2018). Evaluación comparativa de dos métodos de recuperación espermática de epidídimos bovinos post-mortem. *Abanico Veterinario*, 1-5.
59. Montes, J., Torres, M., Rugeles, C., Ermanza, R., & Guimaraes, J. (2012). Inducción in vitro de la reacción acrosómica con heparina en semen congelado de toros brahman y gyr. *La Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 1-6
60. Muiño, R., Tamargo, C., Hidalgo, C., & Peña, A. (2007). Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Holstein bulls: Effects of cryopreservation and between-bull variation. *Animal Reproduction Science*, 20-27.
61. Leonardo, H., Nivia, A., Hernandez, D., Rubio, J., & Quintero, A. (2013). Evaluación de la motilidad espermática a través del sistema c.a.s.a de semen caprino criopreservado bajo diferentes medios diluyentes. *Dialnet*, 16-17.
62. López, G., & Mellado, B. (2001). Estimación de la concentración y motilidad de espermatozoides de toros y machos cabríos utilizando un patrón de fotografías de eyaculados y pruebas de nado ascendente. *Agrociencia*, 6-8.
63. Olegario, C., et al., e. (2005). Analisis de Semen Bovino. *Tecnología Agroalimentaria*,
64. Pallete, A. (2001). Evaluación y Selección de toros Lecheros. *Revistas de investigaciones veterinarias de Peru*, 150-150.
65. Peres, R., Barbosa, M., Kanazawa, Y., Martins, M., & De Souza, F. (2014). Criopreservación de espermatozoides bovinos extraídos de la cola del epidídimo utilizando los métodos convencional y automatizado. *Cielo*, 3-5.

66. Quintero, A., Mayorga, J., & Warter, C. (2017). El análisis seminal como herramienta para predecir el potencial reproductivo en toros. *Journal of veterinary andrology*, 1-8.
67. Córdova Izquierdo, Alejandro ;Córdova Jiménez, Mary Silvia;Ruiz Lang, Claudio Gustavo ;Córdova Jiménez, Cristian Alejandro;Guerra Liera, Juan Eulogio ;Rodríguez Denis, Blanca Estela ;Arancibia Salinas K. Estrés
68. Siever Morales C. , Próspero Cabrera V. , César Pantoja A. DGI y NSC. Evaluación de Carga Bacteriana en Pajillas de Semen. 2016;(February).
69. Enrique A. Silveira Prado y Roberto Machado Pérez . Flora bacteriana del semen de toro antes y después de la congelación (Bacterial flora of bull.
70. Nuñez Selles A. Terapia antioxidante, estrés oxidativo y productos antioxidante: retos y oportunidades. *Rev Cuba Salud Pública*. 2011.
71. Alfonso J. Estrés oxidativo y función espermática. Revisión. 2005;
72. Barragán Barragán IF. Evaluación del efecto crioprotector de diferentes fuentes de antioxidantes en el semen bovino. Escuela Superior Politécnica De Chimborazo; 2017.
73. Trigos Yalta MJ. Efecto del uso de dos dilutores (Agua de coco y leche descremada) para la viabilidad espermática en semen fresco en bovinos. Universidad Nacional Toribio Rodríguez De Mendoza de Amazonas; 2017.
74. Espinosa Vargas WD. Efecto de la adición de un surfactante natural (Aloe vera) al diluyente Triladyl® para criopreservación de semen bovino en toros reproductores de Agso-Genes, Quito-Pichincha. Universidad Técnica de Cotopaxi; 2012.
75. Valdez TJM, Grado AJA, Burrola BME, Sánchez RB, Antillon RJ. Efecto de diferentes fuentes antioxidantes sobre parámetros celulares y capacitación espermática posdescongelado en semen bovino. 2017;(August).
76. Rodríguez Borbón A. Efecto de la cafeína y la Rhus Trilobata sobre el desarrollo de competencia de ovocitos bovinos de maduración in vitro. 2017.
77. Palma G. 2001. Biotecnología de la Reproducción, selección del Sexo.
78. Manual de procedimientos. Laboratorio de reproducción asistida.

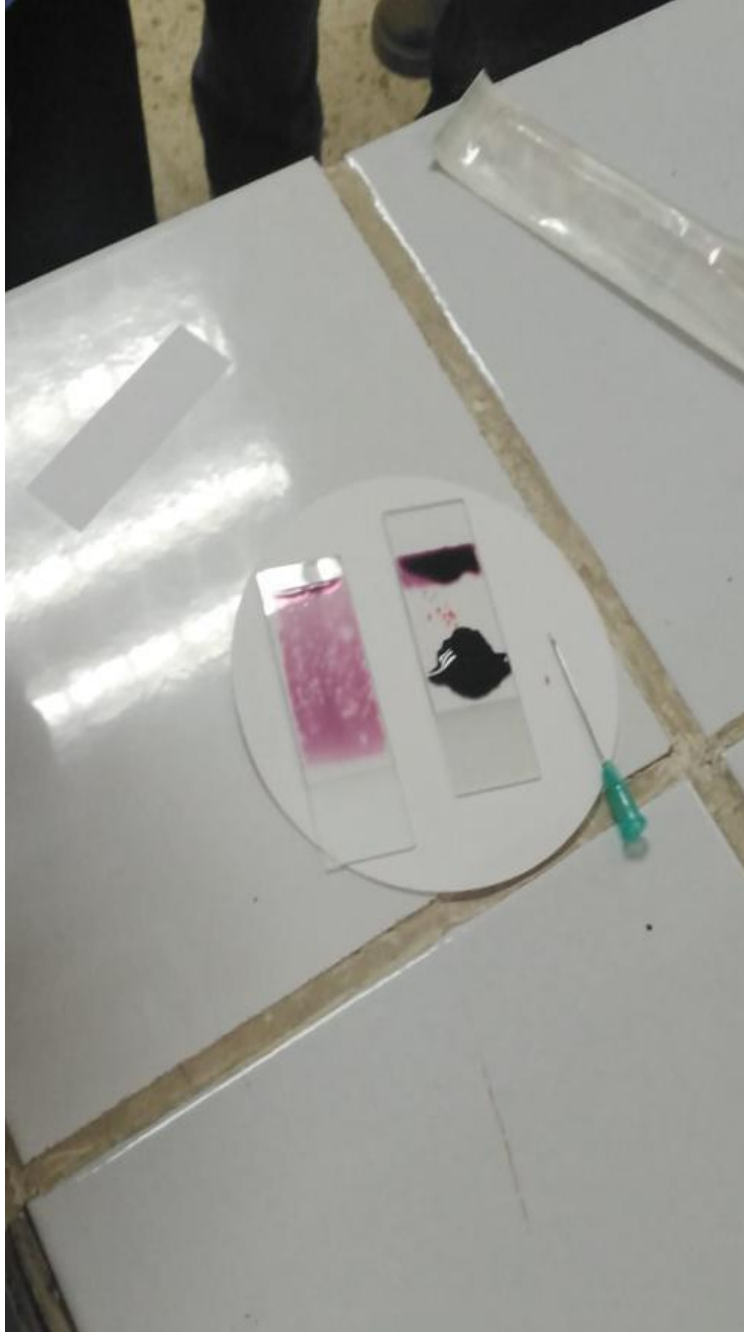
79. Red Latinoamericana de Reproducción Asistida. Abril 2006.

80. Jankovicova J, Antalikova J, Simon M, Michalcova K, Horovska L. 2011. El análisis comparativo de la fluorescencia del esperma bovino utilizando iba-520 (anti-cd46 de anticuerpos) y las lectinas: localización probable de cd46 en la membrana de esperma bovino. Gen. Physiol. Biophys. 30 Spec No: S70-6.

ANEXOS

Anexo 1

Ensayo del trabajo de laboratorio, Preparacion de Tinciones, con neosina y negrosina para identificar por medio del microscopio a los espermatozoides



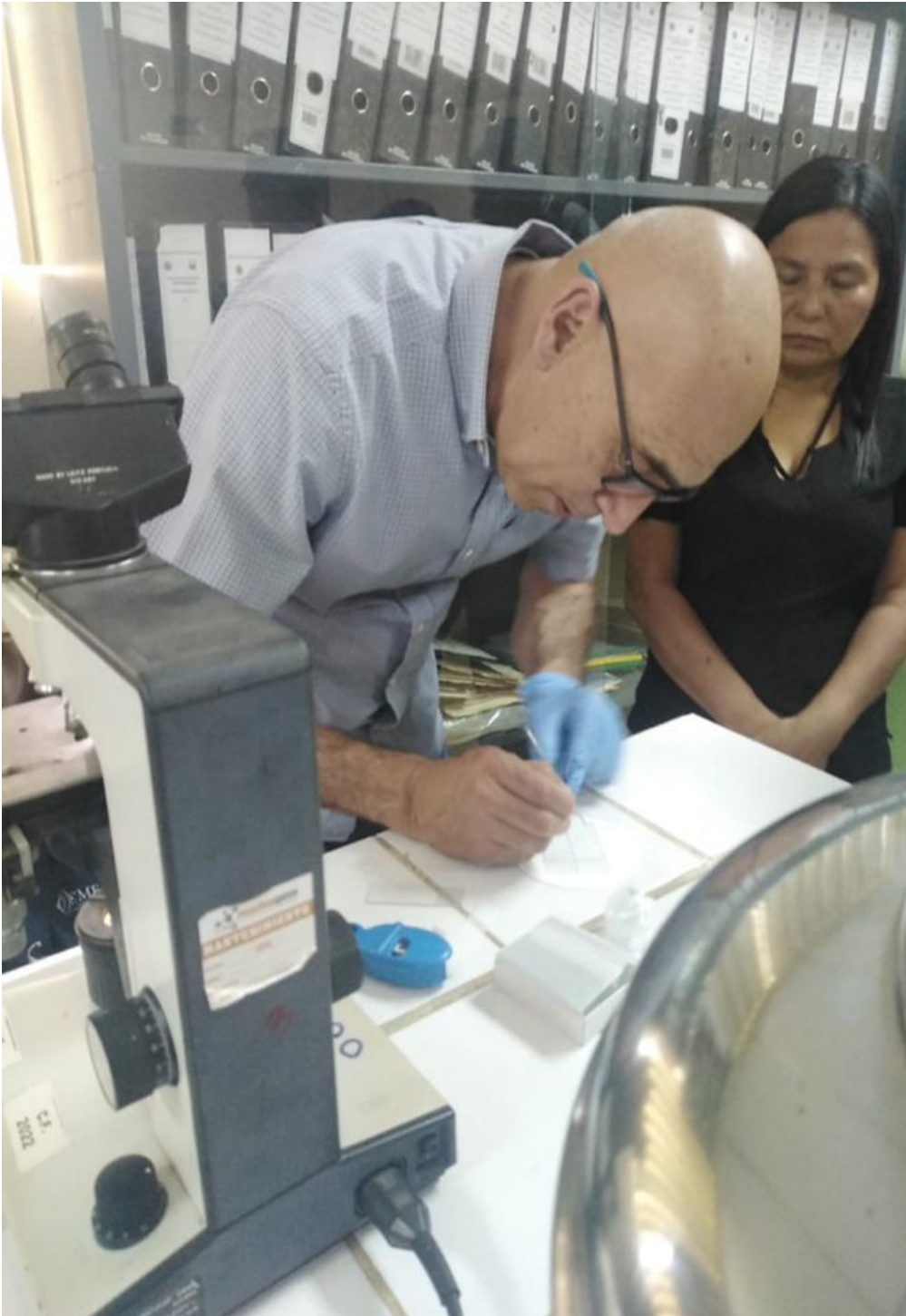
Anexo 2

Observacion microscópica durante la actividad en de la evaluación andrológica.



Anexo 3

Preparacion de las placas y cubreobjetos por parte del Dr. Almeida



Anexo 4

Calibración de la imagen en el microscopio



Anexo 5

Preparacion del material seminal para su análisis



Anexo 6

Aplicación de la gota de semen diluido en la placa, para su observación.



Anexo 7

Aplicación de la gota de semen diluido en un tubo de penbex, su análisis microscópico.



Anexo 8

Manejo del semen diluido previo a su observación microscópica



Anexo 9

Aplicación del semen diluido en el tubo de penbex, previo a la mezcla de la neosina y negrosina.



Anexo 10

Preparación de las placas para la observación en el microscopio.



Anexo 11

Observacion del descongelamiento de la pajueta, con la correcta temperatura estimada que son 37 grados.



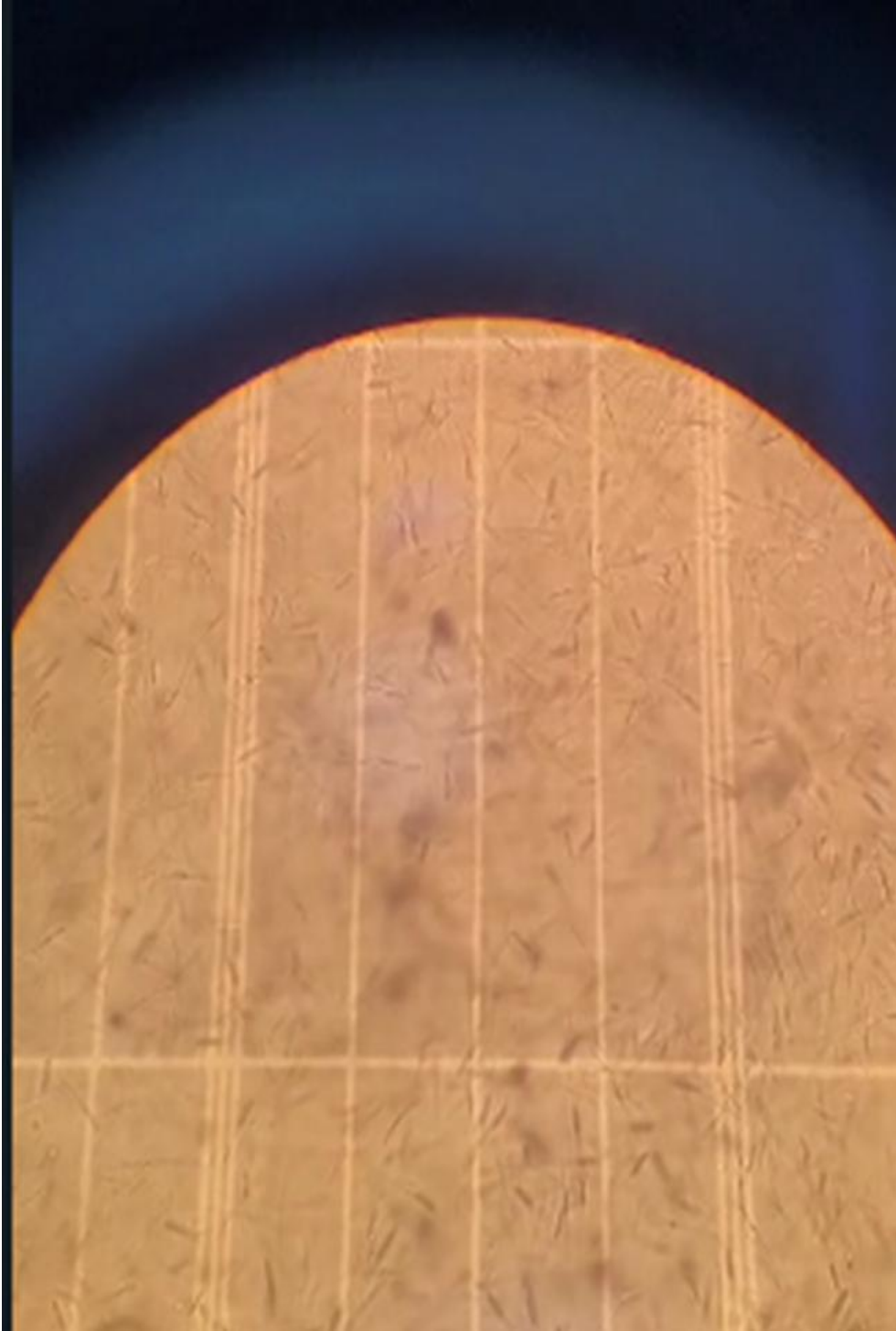
Anexo 12

Observacion de los espermatozoides en la camara de Neubauer en el microscopio.



Anexo 13

Observacion microscópica de la motilidad masal y la viabilidad.



Anexo 14

Observacion microscópica con la tinción de eosina y negrosina.



Anexo 15

Evidencia fotográfica y presentación del cartelón del tema de titulación junto a la Dra. Ketty Murillo, miembro de la comisión de titulación.



Anexo 16

Evidencia fotográfica del trabajo de laboratorio, junto al Dr. Jorge Alava, tutor de mi trabajo de titulación.

