



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE  
LOJA**

**ÁREA AGROPECUARIA Y DE  
RECURSOS NATURALES  
RENOVABLES**

**CARRERA DE MEDICINA  
VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**“ESTUDIO DE DOS MÉTODOS DE COLECTA DE  
ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMARIOS EN TOROS POST  
MORTEM”**

*Tesis de Grado, previa a la  
obtención del Título de Médico  
Veterinario Zootecnista*

**AUTOR:**

*Félix Eraldo Luzón Cevallos*

**DIRECTOR:**

*Dr. Hermógenes René Phamba Ochoa. Mg. Sc*

**LOJA - ECUADOR**

**2015**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA**  
**ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES**  
**CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**CERTIFICACIÓN**

**Dr. Rene Chamba Ochoa Mg. Sc**

Director de tesis y Docente de la carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional de Loja

**CERTIFICA:**

Que el presente trabajo de tesis denominado **“ESTUDIO DE DOS MÉTODOS DE COLECTA DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMARIOS EN TOROS POST MORTEM”**, realizado por el egresado Félix Eraldo Luzón Cevallos, previo a la obtención del título de **MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**, se autoriza su presentación y su publicación.

Loja, 24 septiembre del 2015



Dr. Hermógenes René Chamba Ochoa. Mg. Sc  
**DIRECTOR DE TESIS**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA**  
**ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES**  
**CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL**


**CERTIFICAN:**

Que el Egresado de la carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia, **FÉLIX ERALDO LUZÓN CEVALLOS**, autor de la tesis titulada: “**ESTUDIO DE DOS MÉTODOS DE COLECTA DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMARIOS EN TOROS POST MORTEM**”, previo a la obtención del título de Médico Veterinario Zootecnista, ha incluido todas las correcciones que se le han observado, por lo tanto autorizamos continuar con los trámites para la Graduación.

Loja, 30 octubre de 2015

  
.....  
Dr. Luis Antonio Aguirre Mendoza Mg. Sc.  
**PRESIDENTE**

  
.....  
Dr. Jorky Roosevelt Armijos Tituana. Mg. Sc.  
**VOCAL**

  
.....  
Dr. Vladimir Rodríguez Bravo Mg. Sc.  
**VOCAL**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA**  
**ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES**  
**CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**AUTORÍA**

Yo, Félix Eraldo Luzón Cevallos, declaro ser autor del presente trabajo de tesis y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y sus representantes jurídicos, de posibles reclamos o acciones legales, por el contenido de la misma.

Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja, la publicación de mi tesis en el Repositorio Institucional-Biblioteca Virtual.

Autor: Félix Eraldo Luzón Cevallos



Firma: .....

Cédula: 1104934060

Fecha: 24 de septiembre 2015

## CARTA DE AUTORIZACIÓN DE TESIS

### CARTA DE AUTORIZACIÓN DE TESIS POR PARTE DEL AUTOR PARA LA CONSULTA, REPRODUCCIÓN PARCIAL O TOTAL Y PUBLICACIÓN ELECTRÓNICA DEL TEXTO COMPLETO.

Yo, **Félix Eraldo Luzón Cevallos**, declaro ser autor de la tesis titulada: **“ESTUDIO DE DOS MÉTODOS DE COLECTA DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMARIOS EN TOROS POST MORTEM”**, como requisito para optar al grado de: **Médico Veterinario Zootecnista**, autorizo al Sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que con fines académicos, muestre al mundo la producción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera en el Repositorio Digital Institucional:

Los usuarios puedan consultar el contenido de este trabajo en el RDI, en las redes de información del país y del exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad.

La Universidad Nacional de Loja, no se responsabiliza por el plagio o copia de la tesis que realice un tercero.

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja a los once días del mes de noviembre del dos mil quince, firma el autor.



**Firma:** .....

**Autor:** Félix Eraldo Luzón Cevallos

**Número de Cédula:** 1104934060

**Dirección:** Zarzas 2 **Correo electrónico:** felixluzon9\_1990@hotmail.com

**Celular:** 0986191196

### DATOS COMPLEMENTARIOS:

**Director de Tesis:** Dr. Hermógenes René Chamba Ochoa. Mg. Sc

**Tribunal de Grado:** Dr. Luis Antonio Aguirre Mendoza Mg. Sc.

Dr. Jorky Roosevelt Armijos Tituana Mg. Sc.

Dr. Vladimir Rodríguez Bravo Mg. Sc.

## **AGRADECIMIENTO**

A la Universidad Nacional de Loja, Área Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables, en forma particular a la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia y a todos los doctores que conforman la docencia, por haberme formado académicamente en el transcurso de mi carrera.

Al Dr. René Chamba Ochoa. Mg. Sc, por haberme ayudado con la formulación del anteproyecto de la presente tesis; así mismo por su cooperación desinteresada y supervisión a lo largo de toda la investigación, como Director de Tesis.

A los responsables del Laboratorio de Reproducción Animal; Dr. Rómulo Chávez. Ph D, al Dr. Manuel Quezada. Mg. Sc y a la Dra. Ruth Medina.

A mi familia por que han sido mi motivación fundamental, quienes de forma incondicional siempre estuvieron conmigo en los buenos y malos momentos.

## **DEDICATORIA**

El presente trabajo de tesis lo dedico a Dios ser supremo que me ha dado la vida, voluntad e inteligencia necesaria, para elaborar este trabajo y convertirme en profesional.

A mis padres y hermanas, en especial a mi madre quién con afán, amor y preocupación me supo guiar por el camino correcto de la superación, el respeto, la honradez y la responsabilidad, valores que me ayudaron a cumplir mis sueños de ser un profesional en el campo de la Medicina Veterinaria y Zootecnia.

**FÉLIX LUZÓN CEVALLOS**

## INDICE GENERAL

Contenido	Pág.
<b>CERTIFICACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS</b>	<b>II</b>
<b>CERTIFICACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO</b>	<b>III</b>
<b>AUTORÍA</b>	<b>IV</b>
<b>CARTA DE AUTORIZACIÓN</b>	<b>V</b>
<b>AGRADECIMIENTO</b>	<b>VI</b>
<b>DEDICATORIA</b>	<b>VII</b>
<b>ÍNDICE GENERAL</b>	<b>VIII</b>
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b>	<b>XII</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>XIV</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>XVI</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>XVII</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISIÓN DE LITERATURA</b>	<b>4</b>
<b>2.1. GLÁNDULA SEXUAL DEL MACHO</b>	<b>4</b>
2.1.1. Testículos	4
2.1.1.1. Morfología funcional	5
<b>2.2. CONDUCTOS SEXUALES</b>	<b>7</b>
2.2.1. Escroto y cordón espermático	7
2.2.1.1. Control de la temperatura	8
2.2.2. El epidídimo	10
2.2.2.1. Anatomía del epidídimo	10
2.2.2.2. Funciones del epidídimo	11
2.2.2.3. Transporte	14
2.2.2.4. Concentración	15



2.2.2.5.	Almacenamiento	16
2.2.2.6.	Maduración	16
2.2.3.	Conductos deferentes y uretra	17
2.2.4.	Glándulas accesorias	18
2.2.4.1.	Glándulas vesicales	19
2.2.4.2.	Próstata	20
2.2.4.3.	Glándulas bulbo-uretrales (de Cowper)	21
2.2.4.4.	Glándulas uretrales o de Littre	21
2.2.5.	Pene	22
2.2.6	Prepucio	23
<b>2.3.</b>	<b>NEUROENDOCRINOLOGÍA REPRODUCTIVA DEL MACHO</b>	<b>24</b>
2.3.1.	Hormonas reproductoras primarias de la glándula pituitaria	24
2.3.2.	Control de la glándula pituitaria por el hipotálamo	24
2.3.3.	Hormonas gonadales	26
<b>2.4</b>	<b>ESPERMATOGÉNESIS</b>	<b>27</b>
2.4.1.	Morfología del espermatozoide	31
2.4.2.	Alteraciones de la morfología espermática	33
<b>2.5.</b>	<b>OBTENCIÓN Y TRANSPORTE DE EPIDÍDIMOS</b>	<b>36</b>
2.5.1.	Recuperación de espermatozoides del epidídimo	39
2.5.2.	Resultados sobre congelamiento de espermatozoides del epidídimo en bovinos	40
<b>2.6.</b>	<b>EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DEL SEMEN</b>	<b>44</b>
2.6.1.	Volumen	44
2.6.2.	Olor	44
2.6.3.	Densidad	45
2.6.4.	Motilidad	45
2.6.4.1	Motilidad o movimiento en masa	46
2.6.4.2.	Motilidad individual progresiva	47
2.6.5.	Evaluación de la morfología espermática	49
2.6.6.	Concentración del semen	50
2.6.6.1.	Recuento electrónico	50
2.6.6.2.	Sistemas CASA	51

2.6.6.3.	Hemocitómetro	51
2.6.7.	Evaluación del acrosoma	52
<b>2.7.</b>	<b>DILUYENTES</b>	<b>52</b>
2.7.1.	AndroMed	53
2.7.1.1.	Composición	53
2.7.1.2.	Indicaciones	54
2.7.1.3.	Preparación del diluyente	54
<b>2.8.</b>	<b>COLORANTES</b>	<b>56</b>
2.8.1.	Eosina G, solución al 2% para tinción supravital	56
2.8.2.	Nigrosina, solución al 4% para tinción supravital	56
<b>2.9.</b>	<b>TRABAJOS RELACIONADOS</b>	<b>56</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>60</b>
<b>3.1</b>	<b>MATERIALES</b>	<b>60</b>
3.1.1.	Materiales de campo	60
3.1.2.	Materiales de Laboratorio	60
3.1.3.	Materiales de oficina	61
<b>3.2.</b>	<b>MÉTODOS</b>	<b>62</b>
3.2.1.	Ubicación	62
3.2.2.	Descripción de las Unidades Experimentales	62
3.2.3.	Diseño Experimental	63
3.2.4.	Variables en Estudio	63
3.2.4.1.	Características Morfométricas	63
3.2.4.2.	Evaluación Macroscópica	64
3.2.4.3.	Evaluación Microscópica	64
<b>3.3.</b>	<b>TOMA Y REGISTRO DE DATOS</b>	<b>64</b>
3.3.1.	Evaluación de las características seminales macroscópicas	64
3.3.2.	Evaluación de las características seminales microscópicas	65
<b>3.4.</b>	<b>RECOLECCIÓN Y TRANSPORTE DE TESTÍCULOS</b>	<b>69</b>
<b>3.5.</b>	<b>OBTENCIÓN DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMARIOS</b>	<b>70</b>
3.5.1.	Protocolo 1; Lavado de epidídimo mediante flujo	70

	retrógrado	
3.5.2.	Protocolo 2; Recolección de espermatozoides mediante desmenuzamiento del epidídimo (Slicing)	72
3.6	PROCESAMIENTO DEL SEMEN	72
3.6.1.	Preparación del diluyente	72
3.6.2.	Predilución y examen del semen	73
3.6.3.	Dilución final del semen	73
3.6.4.	Evaluación post refrigeración	74
<b>3.7.</b>	<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>	<b>74</b>
3.9.	PRESENTACIÓN DE RESULTADOS	75
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>76</b>
4.1.	CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICAS DE TESTÍCULOS Y EPIDÍDIMOS	76
4.2.	CALIDAD DEL SEMEN OBTENIDO MEDIANTE LAVADO RETRÓGRADO Y DESMENUZAMIENTO DEL EPIDÍDIMO	77
4.2.3.	Características Macroscópicas	77
4.2.4.	Características Microscópicas	79
4.2.5.	Calidad del semen post refrigeración a distintos tiempos de evaluación.	84
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>88</b>
5.1.	CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICAS DE TESTÍCULOS Y EPIDÍDIMOS ESTUDIADOS	88
5.2.	CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS	88
5.3.	CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS	90
5.3.1.	Evaluación de la motilidad individual post refrigeración	93
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>94</b>
<b>7.</b>	<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>96</b>
<b>8.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>98</b>
<b>9.</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>103</b>

## INDICE DE CUADROS

<b>Contenido</b>	<b>Pág.</b>
<b>Cuadro 1.</b> Concentración espermática en toros adultos	14
<b>Cuadro 2.</b> Características seminales antes de la congelación, media (D.E).	43
<b>Cuadro 3.</b> Características seminales después de la descongelación, media (D.E).	43
<b>Cuadro 4.</b> Escala basada en el porcentaje de células móviles y criterio evaluativo	47
<b>Cuadro 5.</b> Escala basada en el porcentaje de células móviles	48
<b>Cuadro 6.</b> Escala basada en la velocidad de movimiento de las células móviles	48
<b>Cuadro 7.</b> Movilidad Individual de espermatozoides epididimarios	58
<b>Cuadro 8.</b> Características meteorológicas del lugar de estudio	62
<b>Cuadro 9.</b> Esquema del experimento	63
<b>Cuadro 10.</b> Porcentajes de motilidad masal y criterio evaluativos	66
<b>Cuadro 11.</b> Escala basada en el porcentaje de células móviles	67
<b>Cuadro 12.</b> Periodos de evaluación post refrigeración	74
<b>Cuadro 13.</b> Características morfométricas de los testículos	76
<b>Cuadro 14.</b> Características morfométricas de los epidídimos	76
<b>Cuadro 15.</b> Resultados de la evaluación macroscópica del semen obtenido mediante lavado retrógrado.	77
<b>Cuadro 16.</b> Resultados de la evaluación macroscópica del semen obtenido mediante desmenuzamiento del epidídimo (slicing)	78
<b>Cuadro 17.</b> Resultados de la evaluación microscópica del semen obtenido mediante lavado retrógrado	79
<b>Cuadro 18.</b> Resultados de la evaluación microscópica del semen obtenido mediante desmenuzamiento del epidídimo (slicing).	80
<b>Cuadro 19.</b> Resultados estadísticos de las características microscópicas según Protocolo.	82
<b>Cuadro 20.</b> Resultados estadísticos de las características microscópicas de acuerdo al tiempo de recolección de las muestras en los protocolos	83
<b>Cuadro 21.</b> Promedios del porcentaje de Motilidad Individual evaluada cada 24h post refrigeración, del semen obtenido mediante lavado retrógrado. (Protocolo 1)	84

<b>Cuadro 22.</b>	Promedios del porcentaje de Motilidad Individual evaluado cada 24h post refrigeración del semen obtenido mediante desmenuzamiento del epidídimo (Protocolo 2).	85
<b>Cuadro 23.</b>	Resultados estadísticos de los promedios de Motilidad Individual en los protocolos post refrigeración	86
<b>Cuadro 24.</b>	Resultados estadísticos de los promedios de motilidad individual post descongelación de acuerdo al tiempo de obtención de la muestra	87

## INDICE DE FIGURAS

<b>Contenido</b>	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Corte transversal de un testículo bovino	6
<b>Figura 2.</b> Epidídimo en sus tres porciones	11
<b>Figura 3.</b> Glándulas accesorias del aparato reproductor del toro	19
<b>Figura 4.</b> Esquema del eje Hipotálamo-hipófisis-testículo	26
<b>Figura 5.</b> Esquema de la Espermatogénesis	29
<b>Figura 6.</b> Fases de la espermatogénesis	30
<b>Figura 7.</b> Anormalidades primarias de los espermatozoides	34
<b>Figura 8.</b> Anormalidades secundarias de los espermatozoides	35
<b>Figura 9.</b> Contabilización de espermatozoides en la cámara de New bauer	68
<b>Figura 10.</b> Características Macroscópicas del semen obtenido mediante lavado retrógrado	77
<b>Figura 11.</b> Características macroscópicas del semen obtenido mediante desmenuzamiento del epidídimo (slicing)	78
<b>Figura 12.</b> Promedios del porcentaje de M.I evaluada cada 24h post refrigeración, del semen obtenido mediante lavado retrógrado	84
<b>Figura 13.</b> Promedios del porcentaje de M.I evaluada cada 24h post refrigeración, del semen obtenido mediante desmenuzamiento del epidídimo	85

**“ESTUDIO DE DOS MÉTODOS DE COLECTA DE  
ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMARIOS EN TOROS POST  
MORTEM”**

## RESUMEN

El propósito de este estudio fue evaluar dos protocolos de lavado retrógrado y desmenuzamiento del epidídimo para la obtención de semen de toros post mortem, determinando el tiempo desde que fueron sacrificados, hasta la obtención del esperma en el laboratorio y periodos de almacenamiento en refrigeración, sobre el porcentaje de motilidad individual. Se utilizaron los testículos de 50 toros en edad reproductiva, se dividió el número de UE (Protocolo 1: n=25; Protocolo 2: n=25); a su vez cada protocolo se subdividió en cinco grupos (2, 4, 8, 10, 24 horas). La evaluación de la calidad seminal se realizó en fresco y cada 24 horas post refrigeración por 5 días; la información obtenida se analizó mediante Estadística Descriptiva y para el Análisis de Varianza se utilizó el test de Tukey para establecer diferencia estadística entre promedios. Los resultados obtenidos indican que no hubo diferencia significativa ( $p>0.05$ ) entre los dos protocolos. A 24 h post refrigeración existe diferencia estadística significativa ( $p<0.05$ ), entre los grupos de su respectivo protocolo.

**Palabras clave:** espermatozoide, epidídimo, toro, post mortem.



## SUMMARY

The purpose of this study was to evaluate two protocols retrograde flushing and maceration of the epididymis in order to obtain semen from post mortem bulls, which took into account the time from when they were slaughtered to when the sperm was obtained in the laboratory and the period of refrigerated storage against the percentage of individual motility. Testicles from 50 bulls in the reproductive stage were used, the number of EU (Protocol 1: n = 25; Protocol 2: n = 25) was divided. Each protocol in turn was subdivided into five groups (2, 4, 8, 10, 24 hours). Evaluation of semen quality was performed on fresh semen and every 24 hours post cooling for 5 days; the information obtained was analyzed using descriptive statistics and the Tukey test was used for the variance analysis to establish the statistical difference between the averages. The results showed no significant statistical difference ( $p > 0.05$ ) between the two protocols. At 24h post cooling a statistically significant difference manifested ( $p < 0.05$ ) between the groups of each respective protocol.

**Keywords:** sperm, epididymis, bull, post mortem.

## 1. INTRODUCCIÓN

La recolección de semen de toros mediante la utilización de métodos convencionales, como la vagina artificial y el electro-eyaculador, ha permitido el establecimiento de bancos de germoplasma provenientes de machos reproductores seleccionados. Por otro lado, es importante establecer un método que permita recolectar espermatozoides de toros de alta genética que hayan muerto repentinamente, y/o de aquellos que tengan que ser sacrificados por diversas razones, de tal manera poder obtener descendencia de esos toros, mediante la inseminación artificial o la fertilización in vitro. Así que podría implementarse la recolección de espermatozoides del epidídimo para propagar la calidad genética de toros post-mortem, puesto que los espermatozoides que se encuentran allí, según se ha reportado (Reyes M et al., 2002), tienen capacidad fertilizante.

Desde hace algo más de 20 años, se han buscado medios que permitan mantener la diversidad biológica y que impidan la pérdida de especies de alto valor comercial o genético. La recuperación y criopreservación de espermatozoides tomados del epidídimo se constituye en una manera útil de rescatar el germoplasma de especímenes que estén en peligro de extinguirse, o que hayan muerto por causas naturales o accidentes. Esta técnica es particularmente útil en casos donde la colecta de semen es difícil, como sucede en los animales salvajes, área en el cual tiene mayor

aplicación. El epidídimo tiene fundamentalmente dos funciones: la maduración y el almacenamiento espermático. 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 epididimaria. 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, que podrían ser procesados y congelados para su posterior uso en inseminación artificial. (Robaire y Viger, 1995).

El presente trabajo de investigación tiene como objetivo, la obtención de espermatozoides de la cola del epidídimo de toros post mortem para evaluar su viabilidad. Así, como evaluar los protocolos de lavado retrogrado y de desmenuzamiento del epidídimo para la obtención de semen de toros post-mortem.

El alcance del objetivo general se fundamenta en los siguientes objetivos específicos:

- a) Evaluar la calidad seminal proveniente de los conductos del epidídimo de toros pos mortem.
- b) Evaluar la viabilidad espermática según protocolos de recolección, desde la obtención de los testículos en el camal, hasta la obtención

de los espermatozoides del epidídimo en el laboratorio y valorando el periodo de conservación en refrigeración.

- c) Determinar el protocolo o método más eficiente de recolección de espermatozoides epididimarios.

## **2. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1. GLÁNDULA SEXUA DEL MACHO**

#### **2.1.1. Testículos**

Los testículos tienen una forma oval un poco prolongada, están localizados en la región inguinal y están contenidos en una bolsa de piel denominada escroto que los protege y soporta. La función principal del escroto es regular la temperatura interna de las gónadas mediante la contracción involuntaria del músculo dartos, que recubre el escroto interna y basalmente. (Noakes, D., et al., 2001).

Los testículos difieren de los ovarios en que no contienen al nacer todos los gametos potenciales. Las células germinales localizadas en los túbulos seminíferos sufren divisiones celulares continuas, formando así nuevos espermatozoides durante toda la vida reproductiva. (Bearden J. 1980).

El testículo tiene dos funciones principales que son:

- 1.** La esteroidogénesis o secreción de hormonas masculinas, como la testosterona a través del proceso de esteroidogénesis, en las células de Leydig.

2. La gametogénesis o producción de espermatozoides a través del proceso de espermatogénesis, en los túbulos seminíferos (Noakes, D., et al., 2001).

#### **2.1.1.1. Morfofisiología Funcional**

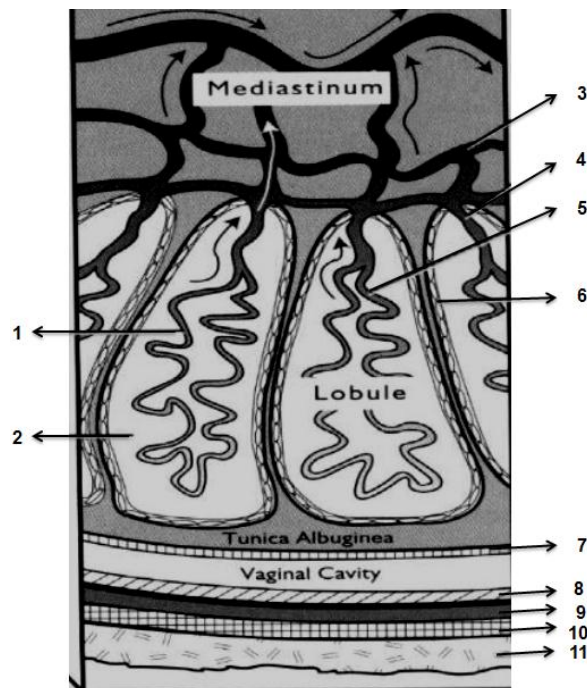
El tamaño depende de la edad, raza, y el desarrollo corporal, el peso de cada testículo está alrededor de 250- 500 gr en un animal adulto y el peso de ambos testículos es de 0,09% del peso vivo del animal. El diámetro del testículo del toro maduro varía entre 11- 17 cm de largo y de 5 y 8 cm de ancho observándose una ligera asimetría entre ambos.

La superficie testicular está recubierta por la túnica vaginal y esta se extiende sobre una capa fibrosa llamada túnica albugínea que es la que le da la forma al testículo y también por tejido seroso que es la extensión del peritoneo. Esta capa serosa se obtiene a medida que los testículos descienden al escroto y está adherida a lo largo de la línea del epidídimo. La capa externa de los testículos, la túnica albugínea testicular es una membrana delgada blanquecina del tejido conectivo elástico. Existen vasos sanguíneos visibles por debajo de su superficie (Bearden J. 1980).

Por debajo de la túnica albugínea testicular está el parénquima, que es la capa funcional de los testículos. El parénquima tiene color amarillento y está dividido en segmentos por tabiques incompletos de tejido conectivo. Dentro de estos segmentos de tejido parenquimatoso están los túbulos seminíferos,

que se forman a partir de los cordones sexuales primarios (Bearden J. 1980).

**Figura 1.** Corte transversal de un testículo bovino



**Modificado de:** Vera C. 2011

1Túbulos contortus, 2 Compartimento intersticial, 3 Red de túbulos, 4 Túbulo recto, 5 Túbulo seminífero, 6 Túnica vascular, 7 Túnica vaginal visceral, 8 Túnica vaginal parietal, 9 Fascia escrotal, 10 Túnica dartos, 11 Piel del escroto.

Los túbulos seminíferos conformados por células germinales (espermatogonias) y células de nutrición (células de Sertoli). Las células de Sertoli son más grandes y menos numerosas que las espermatogonias. Bajo la estimulación de la FSH, las células de Sertoli producen proteínas fijadoras de andrógenos e inhibina. Encontramos también espermatozoides, producto de la espermatogénesis.

Los túbulos seminíferos son pequeños túbulos enrollados de aproximadamente 200  $\mu\text{m}$  de diámetro, además representan el 80% del peso de los testículos. Se unen a una red de túbulos, la rete testis que se conecta a 12 ó 15 pequeños conductos, los conductos eferentes, que convergen en la cabeza del epidídimo. (Bearden J. 1980).

Entre los túbulos seminíferos, encontramos las células de Leydig (intersticiales). La hormona luteinizante (LH) estimula a las células de Leydig para la síntesis de testosterona en pequeñas cantidades y otros andrógenos (Unad, 2005).

## **2.2. CONDUCTOS SEXUALES**

### **2.2.1. Escroto y Cordón Espermático**

El escroto es un saco bilobulado que envuelve a los testículos. En la mayoría de las especies se localiza en la región inguinal entre las extremidades posteriores, tiene el mismo origen embrionario que los labios mayores en la hembra, está compuesto de una capa externa de piel gruesa con numerosas glándulas grandes sudoríparas y sebáceas, esta capa externa está forrada de una capa de fibras musculares lisas, la túnica dartos, que se entrelaza con tejido conectivo. La túnica dartos divide al escroto en dos y se adhiere a la túnica vaginal en el fondo de cada bolsa. (Bearden J. 1980)



### **2.2.1.1. Control de la Temperatura**

Las altas temperaturas o simplemente la temperatura corporal normal causan degeneración de las células que forman la pared de los túbulos seminíferos. Se restablecerá la fertilidad si se regresan los testículos y el escroto a su estado natural antes de que ocurra la degeneración total. Sin embargo se requerirán unas cuantas semanas para que se produzca semen fértil nuevamente. Los criptorquideos bilaterales son estériles, lo que ilustra de nuevo que la producción de espermatozoides se suspende cuando la temperatura interna de los testículos es tan alta como la temperatura corporal (Bearden J. 1980).

La baja fertilidad del semen se ve atribuida a las temperaturas altas del verano. En el ganado la temperatura interior de los testículos es de 4 a 7°C menor que en el organismo, si la temperatura ambiental está entre 5 y 21°C a medida que la temperatura ambiental aumenta y se acerca a los 38°C, la diferencia entre la temperatura corporal y la de los testículos puede reducirse a la mitad (2° a 3° por debajo de la temperatura corporal). No se ha demostrado que la temperatura ambiental baja reduzca la fertilidad (Unad. 2005).

El papel del escroto y del cordón espermático en el control de la temperatura testicular incluye el acercar los testículos al cuerpo cuando la temperatura ambiental es muy baja, o dejarlos colgar alejados del cuerpo cuando está aumentada. La túnica dartos (el músculo liso que reviste el escroto) y el

cremáster, son dos músculos (un músculo liso alrededor del cordón espermático) sensibles a la temperatura. Durante el frío la contracción de estos músculos provoca que el escroto se retraiga y se acorte el cordón espermático, acercando a los testículos más al cuerpo. Cuando el clima es caliente estos músculos se relajan, provocando que el escroto se estire y se alargue el cordón espermático, de esta manera los testículos se encontrarán más alejados del cuerpo. Estos músculos no responden a los cambios de temperatura sino hasta el principio de la pubertad. Deben ser sensibilizados primero por la testosterona para que puedan responder a los cambios de temperatura del ambiente.

El enfriamiento de los testículos en sí, ocurre por medio de dos mecanismos. La piel del escroto tiene glándulas sebáceas y sudoríparas que son más activas en climas cálidos. La evaporación de la secreción de estas glándulas enfría al escroto y por lo tanto a los testículos, la parte externa del escroto es 2 a 5°C más fría que la parte interna, a medida que se estira el escroto en un clima cálido, habrá más superficie que permitirá el enfriamiento por evaporación. A más de enfriar por evaporación, hay un enfriamiento significativo a través del intercambio calórico en el sistema circulatorio, a medida que las arterias transportan sangre a temperatura corporal a través del cordón espermático, las sinuosas red de venas llevan sangre más fría de regreso al organismo, así que ocurrirá cierto grado de enfriamiento de la sangre arterial antes de que llegue a los testículos. (Bearden J. 1980)

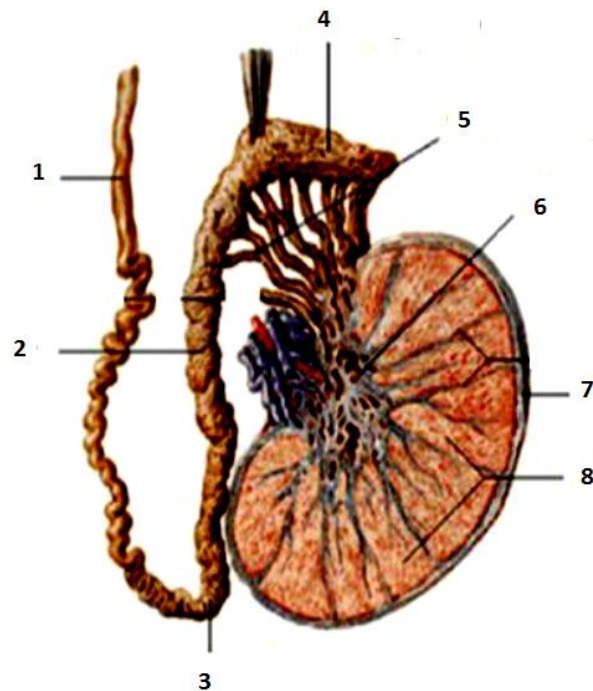
## **2.2.2. El epidídimo**

### **2.2.2.1. Anatomía del Epidídimo**

El conducto del epidídimo es un túbulo tortuoso empaquetado en un saco de tejido conectivo que es una extensión de la túnica albugínea; mide alrededor de 30 a 50 metros de largo en el toro ;( König, H., y Liebich, H., 2008).

Anatómicamente el epidídimo consta de tres partes bien definidas: cabeza, cuerpo y cola. La cabeza es la parte más grande, recorre el polo dorsal del testículo y desciende en forma de asa unos 2.5 a 3 cm de la superficie dorso lateral del testículo y formada por 13 a 15 conductos eferentes. El cuerpo del epidídimo se extiende hacia el polo distal del testículo como una banda de 1 cm de ancho y se une firmemente a la cara caudo-medial de este último. La cola del epidídimo tiene forma cónica y se une estrechamente por su base mayor al polo distal del testículo, la cola del epidídimo almacena una importante cantidad de espermatozoides, la cual continua con el conducto deferente (Noakes, D., et al., 2001).

**Figura 2.** Epidídimo en sus tres porciones



**Modificado de:** Vera C. 2011

1 Conducto deferente; 2 Cuerpo del epidídimo; 3 Cola del epidídimo; 4 Cabeza del epidídimo; 5 Conductos eferentes; 6 Rete testis; 7 Túnica albugínea; 8 Lóbulos

### **2.2.2.2. Funciones del Epidídimo**

Las funciones del epidídimo son el transporte y la maduración de los espermatozoides los cuales, a través del pasaje por los conductos eferentes y el epidídimo, adquieren la habilidad de tener movimiento progresivo lineal y la capacidad de fertilizar. Durante ese proceso, en la célula espermática ocurren cambios funcionales, bioquímicos y morfológicos. Específicamente, en la cabeza del epidídimo ocurre la reabsorción de solutos y fluidos, en el cuerpo del epidídimo la maduración espermática, y en la cola del epidídimo

el almacenamiento de los espermatozoides fértiles. Con esta consideración, es importante señalar que se podrían obtener espermatozoides viables provenientes de la cola del epidídimo que tengan motilidad y capacidad de fertilizar, poco tiempo después de la muerte del animal, que podrían ser congelados para su posterior uso en inseminación artificial (Barrios, 2002).

En su origen, los espermatozoides son incapaces de moverse, de allí que el transporte inicial a la rete testis es dependiente del fluido secretado por las células de Sertoli. En los conductos eferentes, cabeza y cuerpo del epidídimo el transporte es mediado por el epitelio del epidídimo, especialmente las células ciliadas y las contracciones peristálticas de la musculatura lisa de los conductos eferentes y la cabeza y cuerpo del epidídimo, más la presión hidrostática interna (Noakes, D., et al., 2001).

El ambiente al que se enfrentan las células espermáticas cuando llegan al epidídimo es diferente al de los túbulos seminíferos y los conductos eferentes. Tal diferencia se debe a los cambios en la composición del fluido drenado por la rete testis, debido a que la presencia de la barrera hemotesticular es incompleta en esta región. Además, en todo el trayecto del epidídimo hay células secretoras cuyas secreciones afectan a los espermatozoides; vale decir que la porción de la cabeza del epidídimo está revestida internamente por un epitelio pseudoestratificado cilíndrico ciliado. El fluido producido por las células secretoras del epidídimo es rico en carnitina, glicerofosforilcolina y varias glicoproteínas; generalmente es amarillento,

pero en toros fértiles adquiere apariencia blanco-cremosa debido a la concentración de espermatozoides (Sorensen, A., 1982).

La maduración espermática en el epidídimo es dependiente de las secreciones epiteliales, del transporte de sodio y potasio, de los andrógenos, y de la temperatura escrotal. Los cambios estructurales de los espermatozoides se deben a la utilización de fosfolípidos y colesterol como sustratos durante la maduración en el epidídimo. En estos cambios se completa el proceso de condensación nuclear, los espermatozoides pierden la gota citoplasmática, aumentan la negatividad de la carga superficial, y ocurren ligeros cambios en la morfología del acrosoma. La testosterona ejerce influencia directa en la maduración espermática. En el epidídimo los receptores intracelulares captan andrógenos y la enzima 5alfa-reductasa convierte la testosterona en dihidrotestosterona (Noakes, D., et al., 2001).

En un estudio realizado en Venezuela (Rodríguez, et al., 2000) con toros mestizos (5/8 Holstein y 5/8 Pardo Suizo), se demostró que el desarrollo y mantenimiento estructural y funcional de las células del epitelio, en la cabeza del epidídimo, dependen de la función testicular y por lo tanto de los andrógenos testiculares, pero en la cola del epidídimo los mismos aspectos dependen de los andrógenos sanguíneos.

Un solo epidídimo tiene capacidad para almacenar 1.5 - 4ml de fluido rico en espermatozoides, con una concentración de  $3.55 \times 10^9$

espermatozoides/ml, que ocupa la mitad del volumen total. Se han reportado resultados variables en las concentraciones espermáticas de los dos epidídimos de toros adultos. Allí hay una concentración de 15 a 40 x 10<sup>9</sup> espermatozoides/ml, suficientes para promover 20 eyaculados normales consecutivos en un período de 3 – 4 horas. (Barrios 2002), demuestra que la cantidad de espermatozoides varía entre las porciones del epidídimo en diferentes razas de toros, así se demuestra en la siguiente cuadro.

**Cuadro 1.** Concentración espermática en toros adultos

RAZA	EPIDÍDIMO			CONDUCTO DEFERENTE Y AMPOLLA	TOTAL
	CABEZA	CUERPO	COLA		
<b>Hereford</b>	11	1	21	6	40
<b>Charoláis</b>	18	4	35	7	64
<b>Holstein</b>	20	5	39	8	72

Adaptado de Barrios, 2002.

### **2.2.2.3. Transporte**

A manera de conducto que sale del testículo, el epidídimo transporta los espermatozoides. En machos activos, el tiempo requerido para el transporte es de 9 a 11 días. Se ha informado que una eyaculación frecuente acelera el transporte en 10 a 20%, varios factores contribuyen al movimiento de los espermatozoides a través del epidídimo (Unad. 2005).

Este movimiento de los espermatozoides es ayudado por la presión externa creada por el efecto de masaje que ocurre sobre los testículos y el epidídimo durante el ejercicio normal. Los conductos están tapizados por dos tipos de células, unas más altas llamadas Ciliadas que se mueven en dirección al epidídimo ayudando al transporte del producto testicular y las otras que tienen función secretora (apocrina). Y es posible que alternen sus funciones entre los dos tipos (Androvet 2011).

Como se mencionó previamente el movimiento de los espermatozoides es ayudado por la eyaculación. Durante la eyaculación, las contracciones peristálticas de la capa muscular lisa del epidídimo y una ligera presión negativa (acción de succión) creada por las contracciones peristálticas del conducto deferente y la uretra, desplazan en forma activa a los espermatozoides del epidídimo al conducto deferente y la uretra (Pezzone N., 2008).

#### **2.2.2.4. Concentración**

En el toro los espermatozoides que vienen del testículo y entran al epidídimo están relativamente diluidos (aproximadamente 100 millones de espermatozoides /ml). En el epidídimo se concentran aproximadamente el 75% de la producción total de espermatozoides de los testículos. La concentración ocurre cuando los líquidos que suspenden a los espermatozoides en los testículos son absorbidos por las células epiteliales



del epidídimo. La absorción de estos líquidos ocurre principalmente en la cabeza y la parte proximal del epidídimo (Bearden J. 1980).

#### **2.2.2.5. Almacenamiento**

La mayor parte se almacena en la cola del epidídimo, donde los espermatozoides concentrados son retenidos en el lumen ancho. El epidídimo de toros maduros puede contener de 50 a 74 x 10<sup>9</sup> espermatozoides/ml. En la cola las condiciones son óptimas para preservar la viabilidad de los espermatozoides por un tiempo prolongado. El pH bajo, una alta viscosidad, la gran concentración de bióxido de carbono, la gran proporción de K a Na, la influencia de la testosterona y probablemente otros factores, se combinan para contribuir a un bajo índice metabólico y a vida más prolongada. No se han duplicado estas condiciones fuera del epidídimo. Si se liga al epidídimo para evitar la entrada de nuevos espermatozoides y la salida de los ya existentes, los espermatozoides permanecerán vivos y viables aproximadamente por 60 días. Por otro lado, después de un periodo prolongado de descanso sexual, los primeros eyaculados tendrán un alto porcentaje de espermatozoides infértiles (Bearden J. 1980).

#### **2.2.2.6. Maduración**

Cuando los espermatozoides recientemente formados entran a la cabeza a partir de los conductos eferentes, no tienen la capacidad de motilidad ni

fertilidad. Durante su paso por el epidídimo, adquieren capacidad para moverse y se tornan fértiles. Si se liga la cola del epidídimo en cada extremo, los espermatozoides más cercanos del cuerpo habrán incrementado su fertilidad hasta en 25 días.

Durante el mismo periodo los que estén más cerca del conducto deferente tendrán una fertilidad reducida. Por lo tanto, parece ser que los espermatozoides adquieren la capacidad para fertilizar en la cola y después empiezan a envejecer y deteriorar si no se les utiliza (Duchens M. 1990).

Mientras están en el epidídimo, los espermatozoides pierden la gota citoplasmática que se forma en el cuello de cada espermatozoide durante la espermatogénesis. No se conoce el significado fisiológico de la gota citoplasmática, pero se ha utilizado como indicador de maduración suficiente en los espermatozoides del epidídimo. Si un porcentaje elevado de los espermatozoides recién eyaculados tienen gotas citoplasmáticas se les considera inmaduros y tienen una fertilidad reducida (Bearden J. 1980).

### **2.2.3. Conductos deferentes y uretra**

El conducto deferente es un tubo que sale del extremo distal de la cola de cada epidídimo, en su trayecto inicial está sostenido por pliegues de peritoneo, luego pasa a lo largo del cordón espermático, a través del conducto inguinal hacia la región pélvica, donde se une a la uretra en su

origen cerca de la apertura de la vejiga. El extremo agrandado del conducto deferente cerca de la uretra es el ámpula. El conducto deferente tiene una capa muscular lisa gruesa en su pared y parece tener como función única la del transporte de los espermatozoides. Algunos autores sugieren que el ámpula sirve como almacenamiento de corto tiempo para el semen. Sin embargo los espermatozoides envejecen rápidamente en el ámpula; parece más probable que los espermatozoides se mezclen en el ámpula antes de ser expulsados hacia la uretra.

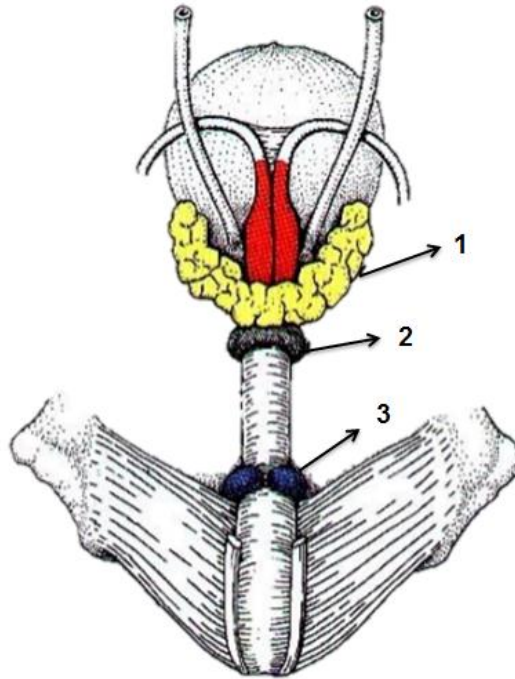
La uretra es un conducto único que se extiende desde su unión con el ámpula hasta la porción terminal del pene. Sirve como conducto excretor tanto como para la orina como para el semen. Durante la eyaculación en el toro y en el borrego hay una mezcla total de espermatozoides concentrados del conducto deferente y del epidídimo con líquidos de las glándulas accesorias en la parte pélvica de la uretra para formar el semen (Bearden J. 1980).

#### **2.2.4. Glándulas accesorias**

Las glándulas accesorias se localizan a lo largo de la porción pélvica de la uretra con conductos que vacían sus secreciones en su interior. Estas son las glándulas vesicales, la próstata y las glándulas bulbo-uretrales. Contribuyen en gran medida al volumen del semen. Además, sus secreciones son amortiguadoras, nutrientes y otras sustancias necesarias

para asegurar una motilidad óptima y una buena fertilidad del semen (Hafez, 2000).

**Figura 3.** Glándulas accesorias del aparato reproductor del toro



**Modificado de:** Vera C. 2011

1 Glándulas vesiculares; 2 Próstata; 3 Glándulas bulbouretrales

#### **2.2.4.1. Glándulas Vesicales**

Las Vesículas Seminales consisten en un par de glándulas genitales ubicadas en el piso de la pelvis a ambos lados del cuello de la vejiga. Se denominan de tal manera porque anteriormente se creía que eran reservorios de semen. Estas glándulas segregan un líquido claro que tiene

como función acrecentar el volumen del eyaculado y aportar nutrientes al semen. Alrededor del 50% del volumen total del semen es aportado por estas estructuras; las mismas que son de forma lobulada y miden de 10 a 15 cm de largo y 2 a 4 cm de diámetro. Los conductos excretores de las vesículas seminales desembocan cerca de la bifurcación donde se unen la uretra y el ámpula. Se encuentran revestidas de epitelio secretor que produce un material mucoide rico en levulosa y pequeñas cantidades de ácido ascórbico, inositol, ergotonina, aminoácidos, fosforilcolina y prostaglandinas.

También producen compuestos como la fructosa y el sorbitol, fuentes principales de energía para los espermatozoides del toro. Hay amortiguadores tanto de carbonato como de fosfato y son importantes pues evitan los cambios de pH del semen, que perjudicarían a los espermatozoides. (Bearden J. 1980)

#### **2.2.4.2. Próstata**

La próstata es una glándula única localizada a lo largo y alrededor de la uretra, apenas posterior a los conductos excretores de las glándulas vesicales. (Bearden J. 1980)

Es la única glándula accesoria del macho constante en todas las especies de animales domésticos, y su cuerpo mide 2,5 cm de ancho por 1 a 1,5 cm

de grosor, lo que la hace palpable por el recto. Contribuye en pequeña medida al volumen de semen en la mayoría de las especies. Las secreciones de la próstata se caracterizan por ser un líquido alcalino claro de aspecto lechoso, rico en fosfatasa ácida, proteínas, lípidos, hexosas y espermina, sustancia que le da al eyaculado su olor característico, también son ricas en iones inorgánicos, como Na, Cl, Ca y Mg, todos en solución. (Pezzone N. 2008)

#### **2.2.4.3. Glándulas Bulbo-uretrales (de Cowper)**

Las glándulas de Cowper son un par de glándulas localizadas a lo largo de la uretra, cerca del punto donde sale de la pelvis. Son ovoidales y difíciles de palpar en el bovino, merced de su pequeño tamaño. En el toro están incluidas en el músculo bulbo-esponjoso. Contribuyen muy poco al volumen del líquido seminal. En toros, las secreciones de estas glándulas lavan de residuos de orina a la uretra antes de la eyaculación. Estas secreciones se notan en el prepucio antes de la cópula. (Bearden J. 1980)

#### **2.2.4.4. Glándulas Uretrales o de Littre**

Están a su vez constituidas por dos tipos de glándulas, las intra-mucosas que son pequeñas, muy numerosas en la región cavernosa de la uretra y localizadas en la lámina propia y las extra mucosas, de mayores dimensiones con conductos que suelen abrirse en la uretra formando

ángulos agudos. Ambos tipos de glándulas segregan una sustancia mucóide que conjuntamente con la secreción de las glándulas de Cowper tienen la función de limpiar y lubricar la uretra antes del paso de los espermatozoides. (Pezzone N. 2008)

### **2.2.5. Pene**

Es el órgano copulador del macho. Posee una forma cilíndrica, y mide 90 cm de largo y de ancho 3 a 4 cm. Presenta tres porciones: raíz, cuerpo y glande. Dos raíces que se insertan en la base de la tuberosidad isquiática dan origen al pene y convergen para formar la porción dorsal del cuerpo del mismo. La porción fija del pene se pliega sobre sí misma formando en los animales rumiantes una curvatura en forma de S, conocida como flexura o "S" sigmoidea. (Pezzone N. 2008)

El glande del pene que es el extremo libre del pene, tiene una inervación muy buena y es homólogo del clítoris en la hembra. (Bearden J. 1980). En la mayoría de las especies, el glande es fibroelástico y contiene una pequeña cantidad de tejido eréctil. El tejido eréctil es cavernoso (como esponja) y se localiza en dos regiones del pene. El cuerpo esponjoso del pene es el tejido cavernoso situado alrededor de la uretra. Se agranda en el bulbo peniano que está cubierto por el músculo bulbo-esponjoso en la base del pene. El cuerpo cavernoso del pene es un área más grande de tejido cavernoso localizada dorsalmente al cuerpo esponjoso del pene. Se origina como dos

cuerpos cavernosos a partir del músculo isquio-cavernoso, fusionándose por último para formar un área cavernosa a medida que se acerca al glande. Estas aéreas cavernosas se llenan de sangre durante la excitación sexual lo que causa la extensión del pene (erección) y facilita la expulsión final de semen durante la eyaculación. Tanto el músculo bulbo-esponjoso como el isquio-cavernoso son estriados, esqueléticos, en sustitución del músculo liso asociado con la mayor parte de los sistemas genitales masculino y femenino (Pezzone N. 2008).

#### **2.2.6. Prepucio**

El prepucio es un pliegue invaginado de la piel que rodea la extremidad libre del pene cuando éste no está en erección. De esta forma, el exterior del mismo está constituido por los estratos normales de la piel y su interior se encuentra recubierto de una membrana mucosa. (Pezzone N. 2008)

Se dirige caudalmente, sobre la extremidad libre del pene. El fondo de saco balano-prepucial ha sido denominado fórnix. La estructura externa del prepucio se conoce como orificio prepucial y se halla rodeado de una mata de pelos bastante largos. (Bearden J. 1980)

El prepucio presenta los músculos extensores y retractares (craneales y caudales, respectivamente) del orificio prepucial, los cuales son cutáneos y cuentan con la misma inervación motora que el músculo cutáneo toracoabdominal (Pezzone N. 2008).



## **2.3. NEUROENDOCRINOLOGIA REPRODUCTIVA DEL MACHO**

### **2.3.1. Hormonas reproductoras primarias de la glándula pituitaria**

La hipófisis anterior produce tres hormonas primarias de la reproducción estas hormonas proteínicas de la adenohipófisis son la folículo estimulante (FSH), la hormona luteinizante (LH) y la prolactina. Se conoce conjuntamente a la LH y FSH como gonadotropinas, porque estimulan a las gónadas. En el macho, a la LH se la llama en algunas ocasiones hormona estimulante de las células intersticiales (ICSH). La inhibina es una proteína producida por los testículos, la cual actúa directamente sobre la hipófisis anterior para evitar la liberación de la FSH. En el macho la FSH estimula la espermiogénesis en los testículos con la acción de la espermatogonia y las células de Sertoli. La FSH estimula a las células de Sertoli para que produzcan inhibina y una proteína receptora de andrógenos (ABP). La ABP se secreta al lumen de los túbulos seminíferos y sirve como transportadora de testosterona. La LH estimula a las células de Leydig, localizadas en el tejido intersticial de los testículos para producir testosterona y otros andrógenos (Bearden J. 1980).

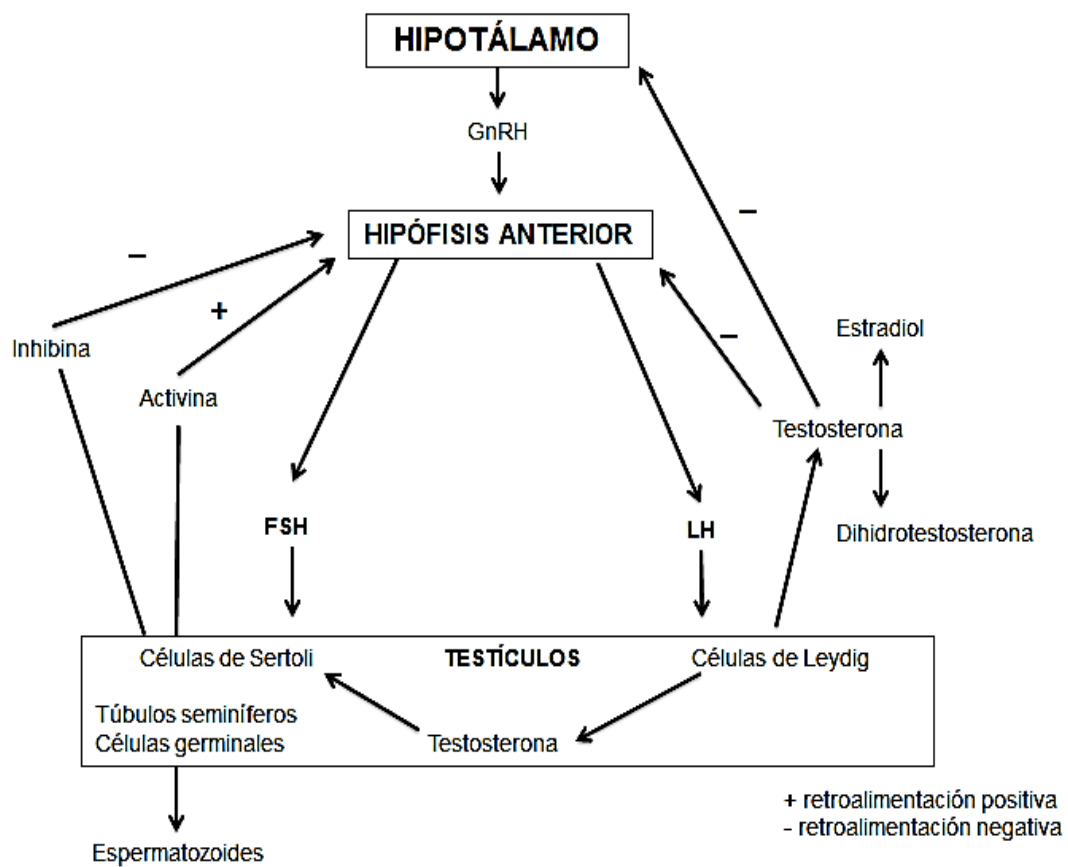
### **2.3.2. Control de la Glándula Pituitaria por el Hipotálamo**

El hipotálamo constituye el piso y la pared lateral del tercer ventrículo del cerebro y está íntimamente ligado a la hipófisis. El sistema sanguíneo porta

hipofisiario conecta al hipotálamo con la hipófisis anterior, en tanto que la hipófisis posterior es una extensión del hipotálamo. Fibras nerviosas de las células neuro-secretoras en el hipotálamo se extienden hacia abajo hasta la hipófisis posterior (Vera C., 2011).

La secreción de hormonas gonadotrópicas por la hipófisis anterior está controlada por una hormona liberadora peptídica, que es producida por células neuro-secretorias en el hipotálamo. De los cerdos y los ovinos se ha aislado y purificado un péptido que es una hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). El hipotálamo produce GnRH (liberadora de gonadotropinas). GnRH (LH-FS/GH), que quiere decir que la GnRH por un lado actúa sobre la adenohipófisis para que produzca LH (luteinizante) y FSH (folículo estimulante), que irán al testículo, donde hay receptores para ellas, y por otro lado estimula la síntesis de GH (somatotropina u hormona del crecimiento). La FSH actúa en las células de Sertoli, que provocan la estimulación de la espermatogénesis. La GH estimula el metabolismo testicular y estimula (favorece) la espermatogénesis. Hay datos que nos indican que tanto la hormona liberadora de prolactina (PRH) como la hormona inhibidora de prolactina (PIH) controlan la liberación y la retención de la prolactina en la hipófisis anterior. La hormona liberadora de corticotropina (CRH) estimula la liberación de ACTH (Bearden J. 1980).

**Figura 4.** Esquema del eje Hipotálamo-hipófisis-testículo



Tomado de; Palomino J. 2010

### 2.3.3. Hormonas Gonadales

Bajo la estimulación de la LH, las células testiculares de Leydig producen andrógenos, que son una clase de hormonas esteroides. El principal andrógeno en los machos maduros es la Testosterona, a la cual se la ha denominado como hormona sexual masculina. (Palomino J. 2010)

## 2.4. ESPERMATOGÉNESIS

La espermatogénesis es la suma de las divisiones mitóticas y meióticas de células espermáticas precursoras, que ocurren dentro del túbulo seminífero y resultan en la formación de los espermatozoides y se inicia a partir de la pubertad. El ciclo de la espermatogénesis en el toro adulto dura aproximadamente 61 días; este proceso se lleva a cabo en los compartimientos basal y adluminal del túbulo seminífero, separados funcionalmente entre sí por las células de Sertoli, que garantizan el ambiente propicio para que se lleve a cabo la espermatogénesis.

Las células de Sertoli sobre la membrana basal de los túbulos seminíferos y representan el 25% del epitelio tubular. No se dividen después de la pubertad y mantienen contacto entre las células vecinas y las células germinales en desarrollo. Así tenemos que las espermatogonias se ubican entre las células de Sertoli y la membrana basal del túbulo y otras están en las criptas inter-citoplasmáticas de las células de Sertoli. Las células de Sertoli responden a la FSH regulando el número de espermatogonias que entran en el proceso de división celular y juegan un papel importante en la elongación nuclear y en la formación del acrosoma en las espermátides. Bajo la acción de la FSH las células de Sertoli secretan glicoproteínas como transferrina, ceruloplasmina, inhibina, y proteína transportadora de andrógeno ABP.

La espermatogénesis incluye dos fases:

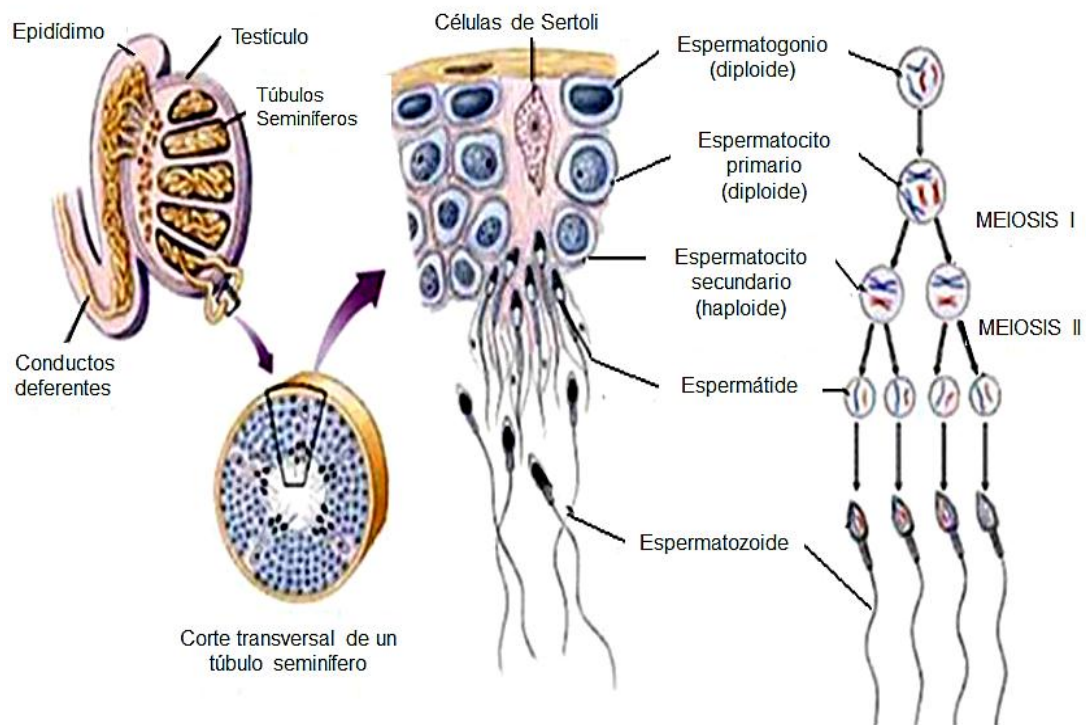
- a) La espermatocitogénesis, en la cual las espermatogonias sufren una división celular hasta transformarse en espermátides
  
- b) La espermiogénesis, en la que las espermátides sufren cambios morfológicos progresivos y se transforman en espermatozoides completamente formados (Hafez, 2000).

Las espermatogonias contienen el número de cromosomas característico de las células somáticas de la especie (60 cromosomas en el bovino) y están categorizadas en:

- Espermatogonia tipo A, que incluye espermatogonias A1 y formas células más diferenciadas llamadas espermatogonias A2, A3, A4
- Espermatogonia intermedia o "In", derivada de A4
- Espermatogonia tipo B, que incluye B1 y B2

La espermatogonia es una célula diploide que se divide mitóticamente solo para formar otra espermatogonia, excepto la espermatogonia tipo B2, que se divide para formar dos espermatocitos primarios. Deben ocurrir seis divisiones mitóticas para que se originen las espermatogonias. Por esta razón siempre habrá una cohorte de espermatogonias proliferativas a que se dividirán en tipos A y B para reemplazar a los tipos B que se dividieron anteriormente (Hafez y Hafez, 2000).

**Figura 5.** Esquema de la Espermatogénesis

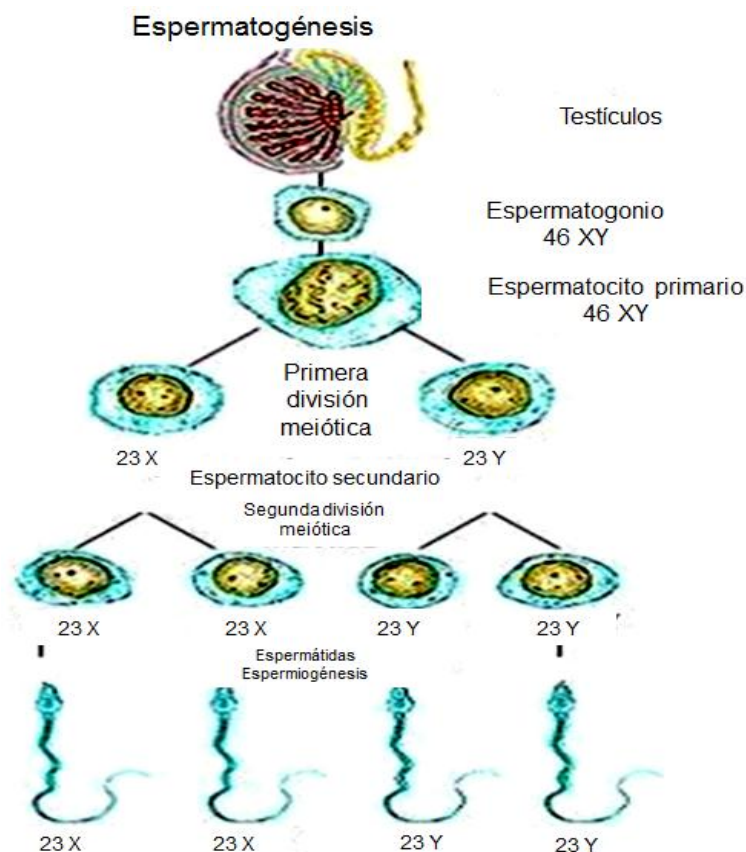


**Modificado de:** Vera C. 2011

Luego del crecimiento y desarrollo de los espermatocitos primarios siguen dos divisiones celulares. De la primera división se produce dos espermatocitos secundarios de cada uno de los espermatocitos primarios y de la segunda división se producen dos espermátides de cada espermatocito secundario. Durante la espermiogénesis ocurren cambios morfológicos como la formación del acrosoma, la condensación de la cromatina nuclear, el desarrollo de la cola, y la pérdida del “Cuerpo Residual de Regaud” (sobrante de la espermátide que no es necesario para el espermatozoide maduro). La espermiogénesis ha sido dividida en fase de Golgi, fase de capuchón, fase del acrosoma y fase de maduración. El control hormonal de

la espermatogénesis en toros adultos está dado por el eje Hipotálamo-hipófisis-testículo, a través del cual la GnRH secretada por el hipotálamo regula la liberación de LH y FSH. La LH es liberada en 3-4 episodios diarios que persisten por aproximadamente 1.5 h y tiene una acción indirecta sobre la espermatogénesis a través de la estimulación de la producción de testosterona por las células de Leydig; y la FSH actúa sobre las células de Sertoli estimulando la espermiogénesis.

**Figura 6.** Fases de la espermatogénesis



**Modificado de:** Vera C. 2011

A su vez, la testosterona es necesaria para el mantenimiento de la espermatogénesis y ejerce un mecanismo de retroalimentación negativa en el eje hipotálamo-hipófisis-testículo. La espermatogénesis puede ser afectada por diversos factores. Así tenemos que es afectada negativamente por el incremento de la temperatura escrotal que puede ocurrir por procesos de inflamación, fiebre, o temperatura ambiental muy elevada. Cuando se afecta la espermatogénesis todos los estadios de espermatogonias mueren, las espermátides sufren anormalidades estructurales y metabólicas, disminuye la proporción de espermatozoides vivos y progresivos móviles, y se incrementa las atipias por defectos de cabeza principalmente (Hafez y Hafez, 2000).

#### **2.4.1. Morfología del espermatozoide**

El espermatozoide es una célula alargada especializada cuya única función es fertilizar al ovocito; en el bovino mide aproximadamente 75 micrones de largo y tiene una carga haploide de cromosomas. Está formada por tres componentes principales: cabeza, cuello y cola (Hafez, 2000). La cabeza del espermatozoide contiene el material genético y mide 8-10 micrones de largo, 4-5 micrones de ancho y 0.5 micrones de grosor. En la cabeza del espermatozoide se encuentran el núcleo celular y el acrosoma. El núcleo es ovalado, aplanado, y la cromatina está compactada y conformada por ADN unido a histonas espermáticas.



El acrosoma tiene forma de capuchón y cubre el polo anterior de la cabeza espermática, en la región anterior tiene el cuerpo apical, y en la caudal tiene un estrechamiento que conforma el segmento ecuatorial, asociado a los procesos de envejecimiento celular. Además, tiene una membrana acrosomal de doble pared, interna y externa, conectadas por puentes; dichas membranas se fusionan en su extremo caudal. El acrosoma contiene varias enzimas hidrolíticas (acrosina, hialuronidasa, esterases e hidrolasas ácidas) que participan activamente en el proceso de la fecundación. Entre el núcleo espermático y el acrosoma se encuentra la sustancia perinuclear. La base del núcleo está rodeada por la vaina post-acrosómica donde hay proteínas ricas en azufre y receptores moleculares que reconocen al ovocito durante la fecundación.

El cuello del espermatozoide es una estructura corta (0.4-1.5 micrones de largo) ubicada entre la cabeza y la pieza intermedia; tiene un centriolo rodeado de 9 fibras periféricas orientadas longitudinalmente que se continúan con las fibras exteriores de la pieza intermedia.

La cola del espermatozoide está dividida en 3 partes bien diferenciadas: la pieza media, la pieza principal, y la pieza terminal. Con todos sus componentes mide 45-50 micrones de largo.

La pieza media tiene 2 micro-túbulos centrales y 9 dupletas periféricas que constituyen el filamento axial. Estas estructuras a su vez están rodeadas

por 9 fibras exteriores orientadas longitudinalmente y conectadas a las fibras del cuello. Además, las mitocondrias dispuestas en patrón helicoidal conforman el aparato metabólico y rodean las 9 fibras exteriores. Un engrosamiento en forma de anillo señala el límite entre la pieza media y la pieza principal.

La pieza principal es la porción más larga del flagelo, la estructura del filamento axial es idéntica a la estructura de la pieza media, e igualmente está rodeado por las fibras exteriores que son continuación de la pieza media. Sin embargo, las fibras están sujetas a variaciones de tamaño y forma, y se van estrechando gradualmente hacia el final de la pieza principal. La vaina fibrosa periférica es otra estructura de la pieza principal y se forma mediante la fusión de 2 fibras exteriores con bandas semicirculares de proteínas estructurales.

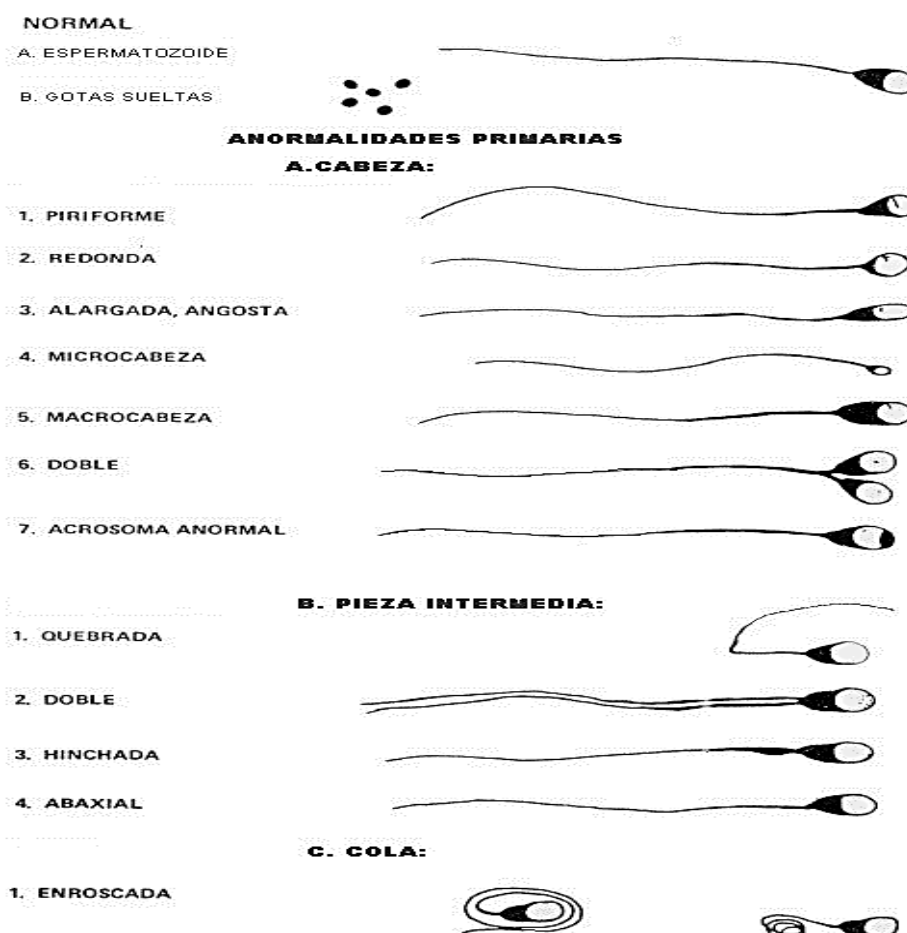
La pieza terminal comienza donde finaliza la vaina fibrosa de la pieza principal. Contiene solamente el complejo del filamento axial, y los microtúbulos se reducen gradualmente en unidades que terminan en diferentes niveles (Barrios, 2002).

#### **2.4.2. Alteraciones de la morfología espermática**

Las desviaciones morfológicas de la estructura normal del espermatozoide son consideradas anormales. Las anomalías espermáticas se han

clasificado en primarias y secundarias (Spitzer 2000; fuente Internet) según la estructura anatómica en la que se generan. Las anomalías espermáticas primarias se originan dentro del testículo y se deben a fallas en la espermatogénesis. Estas anomalías incluyen espermatozoides con escaso desarrollo, espermatozoides dobles y defectos de cabeza, entre ellos: protuberancia acrosómica, cabeza piriforme, cabeza estrecha o delgada, contorno rugoso de la cabeza, espermatozoides micro-cefálicos, y cabezas libres.

**Figura 7.** Anormalidades primarias de los espermatozoides

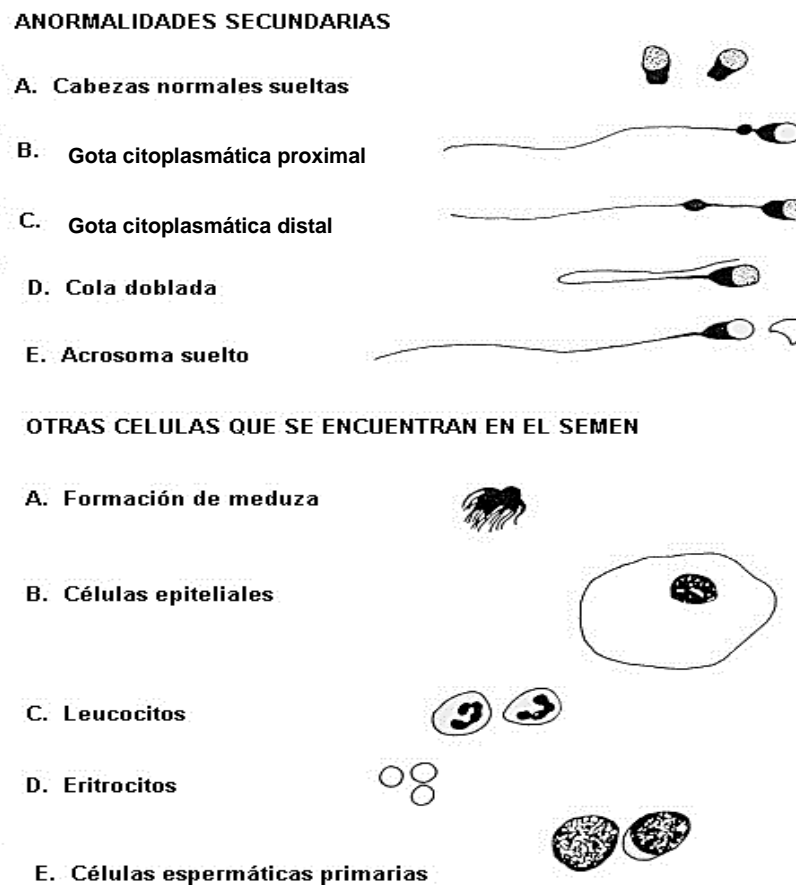


Tomado de; Hozbor F. 2011

La mayoría de los defectos de la cola del espermatozoide también son considerados anomalías primarias, entre ellas están el defecto en la pieza media, “defecto dag”, presencia de gota citoplasmática proximal, cola fuertemente enrollada, y colas accesorias.(Barrios, 2000).

Las anomalías espermáticas secundarias son aquellas originadas dentro del epidídimo. Entre ellas se encuentran: cabeza ancha, cabezas normales libres, membranas del acrosoma separadas y dobladas, implantación axial de la cola, gota citoplasmática distal, colas con curvas suaves, colas enrolladas en la porción terminal (Spitzer,2000).

**Figura 8.** Anormalidades secundarias de los espermatozoides



Tomado de; Hozbor F. 2011

La presencia, en la muestra de semen, de células epiteliales, eritrocitos, formación de medusas, células precursoras de los espermatozoides, también se consideran anomalías secundarias (Spitzer, 2000).

Algunos defectos espermáticos no se pueden definir exactamente como primarios o secundarios (Spitzer, 2000). Por ejemplo, la gota citoplasmática proximal y las cabezas sueltas pueden ser defectos originados durante la espermatogénesis (primarios), o un disturbio en la función epididimaria (secundarios).

Se considera que al menos el 70 % de los espermatozoides evaluados deben ser normales. El nivel de tolerancia máximo para los defectos de cabeza es de 15-20%, mientras que el nivel de tolerancia para los defectos de acrosoma y cola es de 25%. Por otro lado, es importante señalar, que una posible diferencia en la morfología de los espermatozoides de la cola del epidídimo pudiera explicarse por estudios preliminares en la especie ovina, que demostraron que la sobrevivencia de embriones resultantes de espermatozoides provenientes de la porción distal del cuerpo del epidídimo, tenían menor sobrevivencia que los embriones resultantes de espermatozoides provenientes de la cola del epidídimo. (Barrios, 2000).

## **2.5. OBTENCIÓN Y TRANSPORTE DE EPIDÍDIMOS**

La recolección de los epidídimos, juntamente con los testículos, se realiza inmediatamente después de la muerte de los animales, hasta 2 h después

de la muerte del animal, aunque, también se lograron recoger entre las 10 y las 20 h post mortem del animal. (Martins., et al., 2007).

Se han descrito varias formas de transportar los epidídimos; ya sea juntamente con el testículo, incluso se recolectan con el escroto o solo los epidídimos luego de ser separados del testículo. En caso de ser transportados los testículos con el escroto, éste último debe de lavarse con solución salina estéril, evitando que dicha solución penetre en la bolsa testicular, luego se secan profusamente y se colocan dentro de bolsas plástico sellados (Barrios, D., 2002).

En general los testículos pueden ser transportados en soluciones de PBS (Phosphate Buffered Saline) o en solución salina normal (0.89%). De otra manera, si se transporta sólo el epidídimo, después de ser separado del testículo, pueden ser transportadas en medio Tiroide-Albúmina-Lactato-Piruvato (TALP) (Martins, C.F., et al., 2007).

Las muestras de epidídimo-testículo pueden transportarse a temperatura ambiente de 20°C a 25°C, inclusive a 35°C, o transportándose en neveras portátiles a temperaturas de conservación entre 4°C a 5°C, hasta llegar al laboratorio donde serán procesadas (Gutiérrez, R., et al., 2004).

El tiempo de transporte de las muestras es muy variable de acuerdo a la distancia entre el rastro y el laboratorio, pero viene a ser uno de los factores

más importantes ya que depende de él, si se acorta o se alarga el tiempo transcurrido desde la muerte del animal hasta la congelación de los gametos. Estudios realizados muestran que los espermatozoides recuperados de especímenes luego de su muerte, incluso muchas horas después, mantienen su función normal y su capacidad de fertilización. Espermatozoides del epidídimo con una motilidad de 70 a 90% pueden ser obtenidos varias horas después siempre y cuando los órganos sean refrigerados inmediatamente (Martins., et al., 2009).

Según Anel, L., et al. 2002, dependiendo del intervalo entre la recuperación de los espermatozoides y la muerte, la motilidad espermática disminuirá significativamente entre las 24 y 48 h. Después de las 48 horas post-mortem, todas las medidas de calidad del espermatozoides declinan progresivamente. Este autor, también señala que el tejido del epidídimo debe refrigerarse antes de las 48 h después de la muerte con el fin de asegurar una mayor probabilidad de vida de los espermatozoides.

Por otro lado, Martins, C., et al. (2009), almacenó las muestras de epidídimo durante 72 h a 5°C, encontrando que la motilidad total disminuyó después de 48 h y los otros parámetros no fueron afectados por cualquiera de los periodos de almacenamiento. Resultando que las muestras pueden ser almacenados por largos periodos de tiempo a 5°C, cuando los espermatozoides no pueden ser criopreservados inmediatamente después de la muerte del animal.

### **2.5.1. Recuperación de Espermatozoides del Epidídimo**

Existen varios protocolos de recuperación de espermatozoides del epidídimo, los que se describen a continuación. Recolección por Flujo Retrógrado, consiste en disecar los vasos deferentes y la cola del epidídimo, se ubica el septum del epidídimo, correspondiente a la porción cercana de la zona media de la cola del epidídimo. Allí se realizó un corte transversal justo antes que el diámetro del epidídimo se reduce, para obtener la mayor cantidad de espermatozoides posibles. La porción disecada de la cola del epidídimo se colocó en una placa de Petri precalentada a 37°C y por la región libre del vaso deferente se coloca una aguja de punta roma dentro del lumen de la porción libre del vaso deferente. Con una jeringa (tipo "air-tite" de 5 mL) llena con "medio de lavado" (medio de congelación Tris yema glicerol o PBS modificado) y con esta jeringa se penetra lentamente dentro del lumen del vaso deferente. Al continuar con presión suave y continua con la jeringa, aparece por el extremo cortado de la cola del epidídimo el contenido epididimario representado por un líquido espeso y cremoso (Albers y Barrios, 2006).

La otra método es la recolección de espermatozoides por desmenuzamiento de la cola del epidídimo, donde la cola asépticamente es completamente desmenuzada (cortada finamente) en una placa Petri que contiene entre 10 a 20 mL de medio de PBS modificado. El contenido de la placa Petri se vierte en una jeringa de 20 mL (usando un embudo de vidrio) para forzar el



material desmenuzado por un filtro estéril de 0.4 – 0.75 micrones, y ese filtrado se recoge en tubos de centrifuga (50mL), este proceso se repite con 10 -20 mL de medio de lavado adicional. La centrifugación se realiza a baja velocidad (300 x g) por 5 min para concentrar la muestra y el sobrenadante se descarta (Barrios, D., 2002).

De otra forma, una vez en el laboratorio se realiza el lavado con alcohol al 70%, luego se realiza varias incisiones en la cola del epidídimo y, a continuación, pulsando esa región manualmente los espermatozoides serán liberados y se colectaran. Los espermatozoides recuperados se colocan en un tubo de 15 mL y se diluyen con yema de huevo- Tris-glicerol (Martins, C., et al., 2007).

### **2.5.2. Resultados sobre Congelamiento de Espermatozoides del Epidídimo en Bovinos**

Gutiérrez, R., et al. (2004)(b), trabajó 48 pares de testículos obtenidos de animales recién sacrificados, los que se transportaron a una temperatura de 5°C. La recuperación de espermatozoides se realizó por lavado Retrógrado con 10 mL de diluyente a base de Tris - Yema de huevo (25%) - Glicerol (5%). Los espermatozoides obtenidos permanecieron por 2 h a 5°C, para su punto de equilibrio, siendo congeladas en pajillas de 0.5 mL con  $50 \times 10^6$  de espermatozoides, sólo las muestras que obtuvieran una motilidad progresiva superior al 50%. La descongelación se realizó a 37°C/45 s. Se evaluaron la

motilidad progresiva, porcentaje de vivos, porcentaje de normales y acrosoma normal. Antes de la congelación los parámetros seminales fueron.  $59.16 \pm 10.58$  (% de motilidad),  $76.04 \pm 6.95$  (% de vivos),  $64.77 \pm 14.16$  (% de normales),  $35.32 \pm 17.33$  (% de anormales) y  $75.54 \pm 9.99$  (% de acrosoma normal). La concentración total obtenida fue de  $2.37 \times 10^9$  espermatozoides/epidídimo. Y después de la descongelación se obtuvieron;  $35.83 \pm 11.77$  (% de motilidad),  $60.83 \pm 14.12$  (% de vivos),  $60.45 \pm 12.98$  (% de normales),  $38.49 \pm 19.75$  (% de anormales) y  $71.54 \pm 11.87$  (% de acrosoma normal). Encontrándose diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en porcentajes de motilidad y porcentajes de vivos. Se obtuvo de cada cola de epidídimo de toro un promedio de 10 pajillas de 0.5 mL con una concentración de 50 millones de espermatozoides viables en el momento de la congelación. Llegando a la conclusión de que se podrían usar en biotecnologías como Inseminación Artificial, Fertilización in vitro, e Inyección Intracitoplasmática.

En otro estudio realizado por Martins, C., et al. (2007), en tres toros (toros A1, A2 y A3), los testículos fueron recuperados 2 h después de la muerte de los animales en un matadero local. Las muestras se transportaron en medio de Tiroide-Albumina-Lactato-Piruvato (TALP) a temperatura ambiente durante 5 h. Se realizó varias incisiones en la cola del epidídimo y, a continuación, pulsando esa región manualmente fueron liberados los espermatozoides y colectados. Los espermatozoides se colocaron en un tubo de 15 ml y se diluyeron con yema de huevo-Tris-Glicerol. Se empajillaron en volúmenes de 0.25 ml con  $20 \times 10^6$  espermatozoides y

equilibrados a 5°C por 4 h, para luego ser congelados en Nitrógeno líquido. Evaluándose la viabilidad de los espermatozoides epididimarios criopreservados. Las características seminales antes de la congelación para los toros A1, A2 y A3 fueron: 80, 80 y 70% de motilidad, 87, 92 y 90% de acrosoma intactos, 1, 3 y 2% integridad de cromatina, respectivamente. Siendo la concentración media de  $440 \times 10^6$  espermatozoides/cada epidídimo. Después de la congelación las características seminales para los toros A1, A2 y A3, fue: 60, 70 y 70% de motilidad, 66.1, 68 y 60% de acrosoma intactos, 2, 5 y 2% de integridad de cromatina, respectivamente. Existiendo diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) en motilidad y acrosoma intactos. Los resultados muestran que los espermatozoides del epidídimo de animales muertos pueden ser criopreservados.

Martins, C., et al.(2009), evaluaron el efecto del intervalo entre la muerte del animal y la congelabilidad de espermatozoides del epidídimo almacenadas durante diferentes períodos de tiempo. Los testículos de 25 toros mestizos fueron recolectados en el matadero 2 h después del sacrificio. En el laboratorio los espermatozoides de uno de los epidídimos, de cada toro, fueron recolectados y analizados para evaluar la vitalidad.

El epidídimo restante se almacenó durante 24 h, 48 h y 72 h a 5 ° C. Al final de cada período de tiempo, los espermatozoides fueron recuperados y criopreservados con dilución de Tris-yema de huevo y glicerol. Se tomaron muestras de esperma antes de la congelación y después de la

descongelación para evaluar la motilidad total y motilidad progresiva, la concentración, la integridad de la membrana y la integridad del acrosoma. Los resultados se muestran en la tabla 1 y 2.

**Cuadro 2.** Características seminales antes de la congelación, media (D.E).

Variables	Refrigeración de epidídimos a 5°C			
	0 h (n=6)	24 h (n=6)	48 h (n=6)	72 h (n=7)
Motilidad Total.	78.1±10.2	67.8±7.5	60.4±11.7	56.6±10.3
Motilidad progresiva (0-5)	3.2±0.5	2.9±0.6	3.1±0.3	2.8±0.8
Integridad del Acrosoma	75.5±4.0	72.3±17.5	70.5±12.4	64.0±15.4

**Cuadro 3.** Características seminales después de la descongelación, media (D.E).

Variables	Refrigeración de epidídimos a 5°C			
	0 h (n=6)	24 h (n=6)	48 h (n=6)	72 h (n=7)
Motilidad Total.	51.6±11.6	45.0±20.2	40.0±18.2	24.1±13.5
Motilidad progresiva (0-5)	2.6±0.5	2.7±0.4	2.7±0.5	2.6±0.5
Integridad del Acrosoma	64.0±10.5	36.2±14.5	39.5±22.0	38.2±13.0

La concentración media de espermatozoides obtenida por epidídimo fue de 432±77 células/mL, con una producción media de 31 pajillas por epidídimo. Los resultados mostraron que después de 48 h de almacenamiento se produjo una disminución en la motilidad total, lo que no cambia hasta 72 h.

La motilidad progresiva, la membrana plasmática y la integridad acrosómica no fueron afectadas por cualquiera de los períodos de almacenamiento. Por

el contrario, todos los parámetros del esperma, excepto la motilidad progresiva, se redujeron después de la criopreservación.

Estos procedimientos se convierten en una herramienta importante, cuando los espermatozoides no pueden ser criopreservados inmediatamente después de la muerte del animal.

## **2.6. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DEL SEMEN**

Las características seminales que se deben evaluar son:

### **2.6.1. Volumen**

La capacidad de producción de semen por gramo de tejido testicular (Producción Diaria de Espermatozoides, PDE) está directamente correlacionada con la circunferencia escrotal en toros jóvenes. En los toros que están sometidos a un régimen periódico de colección de semen, el volumen y la concentración espermática son indicadores de la capacidad para producir espermatozoides y le permiten a los centros de inseminación artificial (IA) monitorear la función testicular de los mismos (Baracaldo, M. et al., 2007).

### **2.6.2. Olor**

Olor: el olor es sui generis, constante (López J 2014).

### 2.6.3. Densidad

La densidad puede clasificarse de la siguiente forma:

- Muy buena (MB): semen cremoso, granular con 750 a 1,000 millones de espermatozoides/mL o más.
- Buena (B): semen lechoso con 400 a 750 millones de espermatozoides/mL.
- Suficiente (S): semen semejante a leche descremada con 250 a 400 millones de espermatozoides/mL.
- Pobre (P): semen translúcido con menos de 250 millones de espermatozoides/mL (Baracaldo, M. et al., 2007).

### 2.6.4. Motilidad

La valoración de la motilidad implica la estimación subjetiva de la viabilidad de los espermatozoides y calidad de la motilidad. Si no fuera por la capacidad de desplazamiento que poseen los espermatozoides de los mamíferos, es imposible que llegaran a recorrer un camino tan grande como lo es desde el lugar de su deposición en el tracto genital de la hembra, ya sea por inseminación natural como artificial. La adquisición de la capacidad de movilidad progresiva, coincide con la adquisición de la capacidad fecundante. (Hafez y Hafez, 2000).

#### **2.6.4.1. Motilidad o movimiento en masa**

Barth A (2000) reseña que la motilidad masal es el resultado de la concentración espermática, el porcentaje de células con movimiento progresivo y velocidad de movimiento de los espermatozoides. Lo cual provoca movimientos de flujo y la existencia de verdaderas “olas” de zoospermios, que al estar disminuidos o en baja concentración provocan disminución.

Palacio C. J. (2005) indica, que la observación se hace sobre una gota de semen de 5 a 10 mm de diámetro, colocada sobre un porta objetos tibio y sin cubre objetos. La observación se realiza, con semen sin diluir y bajo un campo luminoso y con un aumento de 40-125 x observando varios campos microscópicos.

Los factores que influyen en el movimiento en masa de los espermatozoides son la concentración, el porcentaje de células con movimiento progresivo y la velocidad/vigor del movimiento de los espermatozoides. Si uno o más de estos factores se encuentran comprometidos, el movimiento en masa se reducirá (Baracaldo, M. et al., 2007).

Según Derivaux (1976) , Hafez (1989), Baracaldo (2007), la calificación se realiza bajo los parámetros que se muestran en el cuadro 4.

**Cuadro 4.** Escala basada en el porcentaje de células móviles y criterio evaluativo

<b>VALOR DESCRIPTIVO</b>	<b>ASPECTO DEL MODELO</b>	<b>% CÉLULAS MÓVILES</b>	<b>CRITERIO EVALUATIVO</b>
Muy buena	Movimiento en ondas vigorosas y en remolinos rápidos	80-90%	++++
Buena	Remolinos y ondas más lentas	60-80%	+++
Regular	Sin remolinos, pero con oscilaciones generalizadas	40-60%	++
Mala	Escasa o ninguna motilidad	0-40%	+ 0 -

#### **2.6.4.2. Motilidad individual progresiva**

Consiste en estimar el porcentaje (0-100%) de espermatozoides con movimiento progresivo lineal en una muestra de semen diluido en una solución. La motilidad individual según Barth A. (2000), es el resultado de la evaluación del movimiento progresivo de los espermatozoides y de los cambios en su motilidad. Este seguimiento se hace en una superficie de 1 mm<sup>2</sup> y una altura de 0.1 mm., lo cual se consigue al colocar en un porta objetos perfectamente limpio y tibio una gota de 3 a 4 mm de semen diluido y colocando una laminilla encima.

Igualmente, la motilidad progresiva, según Palacio C. J. (2005) debe ser observada en un aumento de 200 x - 500 x, preferentemente bajo contraste de fase, y los resultados se expresan en porcentaje o en una escala de 1 a 5.



Según Salisbury (1978), Hafez (1989) y Barth (2000), la clasificación se muestra bajo parámetros que se muestran en la siguiente cuadro.

**Cuadro 5.** Escala basada en el porcentaje de células móviles

<b>Valor descriptivo</b>	<b>% células móviles</b>
Muy buena	80-100% de células móviles
Buena	60-79% de células móviles
Regular	40-59% de células móviles
Mala	Menos de 40% de células móviles

La motilidad según Echeverry (2005) permite predecir la fertilidad o habilidad para congelar, ya que la motilidad post - descongelación es frecuentemente usada para ajustar la concentración de espermatozoides por pajilla, cuando el semen se designa para I. A. La motilidad progresiva también puede ser evaluada siguiendo la velocidad de movimiento o grado de movimiento y se hace bajo la siguiente escala según Barth (2000).

**Cuadro 6.** Escala basada en la velocidad de movimiento de las células móviles

<b>Valor descriptivo</b>	<b>Velocidad del movimiento</b>
0	Sin movimiento
1	Leve movimiento de cola sin desplazamiento progresivo
2	lento movimiento de cola con algo de movimiento progresivo
3	Movimiento progresivo a velocidad lenta
4	Movimiento progresivo rápido
5	Movimiento progresivo rápido donde es difícil de seguir la célula determinada.

El mínimo aceptable de motilidad es del 25% de células motiles con una velocidad tipo 3 inmediatamente después de descongelado y un 15% de células motiles con una velocidad tipo 2 luego de 2 horas de incubación a 37° C, para ser considerada viable. El análisis visual microscópico de la motilidad individual progresiva tiene la tendencia a ser subjetivo, aunque sea efectuado por personal muy experimentado, y se torna tedioso cuando debe analizarse un gran número de muestras. Es por esta razón que la motilidad espermática no pronostica de una forma precisa la capacidad fecundante del espermatozoide (Baracaldo, M., et al., 2007; López, J., 1992).

#### **2.6.5. Evaluación de la morfología espermática**

Las células espermáticas son translúcidas y se ven transparentes al observarlas con microscopía de campo claro. Por lo tanto, es necesario usar la microscopía de contraste de fase o el uso de tinciones celulares para poder analizar la morfología de los espermatozoides. La tinción eosina-nigrosina es usada comúnmente como tinción de vitalidad celular para la determinación de espermatozoides "vivos y muertos" y también puede ser usada para evaluar la morfología espermática diferencial detallada. El componente nigrosina proporciona un fondo de contraste a las células espermáticas. La eosina tiene la capacidad de penetrar o no los espermatozoides, lo cual es un indicador de la integridad de la membrana celular y en consecuencia, de la viabilidad o vitalidad celular.

Una característica a tener en cuenta es que en el semen de buena calidad, el porcentaje de espermatozoides con motilidad individual progresiva está directamente correlacionado con el porcentaje de espermatozoides vivos.

### **2.6.6. Concentración del semen**

Aunque puede hacerse una predicción visual tentativa de la concentración espermática en una muestra de semen, es muy importante conocer la concentración exacta de espermatozoides para determinar el número de dosis de semen que se podrán congelar. Para determinar la concentración espermática pueden utilizarse los siguientes métodos, según Baracaldo, M., et al. (2007):

#### **2.6.6.1. Recuento electrónico**

Comúnmente se usan los fotómetros, tales como el SDM5. Una muestra de semen puro es diluida en una cubeta que tiene un volumen predeterminado de diluyente y luego esta dilución es analizada con el fotómetro. El análisis toma aproximadamente 30 segundos. En el equipo se debe ingresar el volumen total del eyaculado, la motilidad progresiva, el número de espermatozoides por dosis y el volumen deseado de cada dosis. El fotómetro calculará el número de dosis a congelar y el volumen final del diluyente a utilizar.

### **2.6.6.2. Sistemas CASA**

Los sistemas CASA, tales como el Sperm Vision, utilizan análisis digital programado por computadora de los campos microscópicos con espermatozoides en movimiento. Se analizan y cuantifican varias características de motilidad, y también se determina la concentración espermática. Estos sistemas requieren una dilución apropiada de la muestra de semen, previa al llenado de una cámara de recuento desechable. Las cámaras de recuento están disponibles en el mercado y tienen una profundidad de 20 micrones. Después de llenar la cámara con el semen diluido, se coloca sobre la platina del microscopio y el sistema CASA analiza como norma general 7 campos microscópicos con espermatozoides, tardando unos pocos segundos en evaluar la motilidad de cada campo. Los resultados obtenidos pueden ser almacenados en la memoria de la computadora, o ser impresos en formatos predeterminados.

### **2.6.6.3. Hemocitómetro**

Los hemocitómetros son considerados el método estándar para determinar la concentración celular y para la calibración de sistemas electrónicos de recuento celular. El método es bastante confiable y económico, pero requiere alrededor de 10 minutos por muestra evaluada e implica el recuento visual de los espermatozoides, que puede ser bastante tedioso.

### **2.6.7. Evaluación del acrosoma**

El acrosoma juega un papel fundamental en la fecundación y esta importancia hace que convenga realizar una valoración específica del mismo. En un espermatozoide que tenga el acrosoma en perfectas condiciones se pueden distinguir tres regiones claramente diferenciadas en la cabeza: la zona acrosomal, con un borde apical, la zona post acrosomal y el segmento ecuatorial entre ambas. Las muestras seminales con alta proporción de acrosomas alterados o ausentes suelen tener una fertilidad baja. Para determinar el estado del acrosoma se han usado desde hace mucho tiempo diferentes tinciones. Entre éstas tenemos la tinción de eosina/verde rápido, Giemsa y la de eosina/nigrosina, las dobles y triples tinciones, basadas en la combinación del azul de tripán con otros colorantes (Baracaldo, M., et al., 2007).

### **2.7. DILUYENTES**

Por diluyente entendemos la solución acuosa que permite 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. (Carballo, 2009)

El diluyente que se añade para congelación generalmente es del tipo TRIS (buffer). El diluyente debe contener sustancias iónicas o no iónicas que

mantengan la osmolaridad del medio (TRIS), una fuente de lipoproteína de alto peso molecular (yema de huevo, leche descremada), una fuente de energía como fructosa o glucosa, y un crioprotector. (Escobar, 2011)

### **2.7.1. AndroMed**

Es un concentrado estéril para la preparación de un diluyente libre de yema de huevo para eyaculados bovinos. Es apropiado para la congelación de semen y para la conservación de semen entre 5°C- 10°C. Andromed® también se utiliza para semen caprino, ovino y ciervo. Su contenido en antibióticos corresponde al estándar de la UE: EC norma 88/407.

#### **2.7.1.1. Composición**

- Fosfolípidos
- TRIS
- Ácido cítrico
- Azúcares
- Antioxidantes
- Tampones
- Glicerina
- Agua de altísima pureza

100ml del diluyente preparado contienen (unidades activas)

- Tilosina 5,0 mg

- Gentamicina 25,0 mg
- Espectinomicina 30,0 mg
- Lincomicina 15,0 mg

#### **2.7.1.2. Indicaciones**

La preparación es simple: se requiere añadir sólo 800 ml de agua destilada al contenido de 200 ml de un frasco de AndroMed®. La microscopía es más eficiente: AndroMed® es un medio altamente transparente que entrega imágenes de semen extremadamente claras bajo el microscopio. Los eyaculados de calidad cuestionable pueden ser detectados y evaluados fácilmente, en base a un estándar de selección definido. La eficiencia es alta dentro de las concentraciones estándar de dosis: la tasa de dilución de los eyaculados puede variarse en gran medida, manteniendo resultados sobresalientes. AndroMed® está siendo utilizado con eyaculados de baja concentración y a altas tasas de dilución (bajo 10 millones de células por pajueta).

#### **2.7.1.3. Preparación del diluyente**

El contenido (200 ml) de un frasco de AndroMed® debe diluirse con 800 ml de agua destilada estéril previamente temperada a +30°C hasta +35°C. Es posible preparar volúmenes menores, siempre que se mantenga la proporción de 4 partes de agua con 1 parte de concentrado. Para lograr las

propiedades óptimas de conservación de AndroMed®, la cantidad requerida de agua debe agregarse al concentrado y no viceversa.

El diluyente preparado AndroMed® debe temperarse antes de su uso en un baño-maría entre +30°C y +32°C. Predilución y análisis de semen: Inmediatamente tras su llegada al laboratorio, el eyaculado debiera ser evaluado (concentración, motilidad) y entonces prediluido 1+1. El eyaculado debiera mantenerse en el baño-maría entre +30°C y +32°C. Al momento de la dilución, el diluyente debe tener la misma temperatura que el eyaculado (+/-1°C). El semen no debiera permanecer en el baño-maría por más de 10 minutos. Una vez evaluado debe efectuarse la dilución final. El eyaculado ha alcanzado hasta entonces la temperatura de laboratorio (+20°C a +23°C), y a esa temperatura es envasado en pajuelas. En forma alternativa, AndroMed® puede utilizarse para el envasado de las pajuelas a +5°C.

Para ello, el semen diluido debe ser equilibrado por al menos 2 a 3 horas a +5°C. Congelación de pajuelas: La congelación de pajuelas se efectúa sobre rampas en vapor de Nitrógeno, a una altura de 4 cm sobre el nivel del Nitrógeno líquido, o en un congelador de semen profesional con una temperatura inicial de -120°C.

El proceso de congelación en un congelador automático debiera extenderse por al menos 7 minutos con mini-pajuelas (0,25 ml) y 10 minutos con pajuelas medianas (0,5 ml). También es utilizable como diluyente para



semen fresco con una temperatura de almacenaje entre +5°C y máximo de 10°C, y se recomienda como medio de referencia para el test de resistencia el control de calidad rutinario de la producción diaria. Además AndroMed® es recomendado para humedecer las vaginas artificiales al momento de colección del semen (Minitube. 2013).

## **2.8. COLORANTES**

### **2.8.1. Eosina G, solución al 2% para tinción supravital**

El colorante Eosina penetra la membrana de las células dañadas, tiñendo las lesiones y espermatozoides no viables o muertos de rosa.

### **2.8.2. Nigrosina, solución al 4 % para tinción supravital, 50 ml**

El colorante Nigrosina provee un fondo oscuro, sobre el cual resaltan los espermatozoides, pudiendo diferenciar su morfología.

## **2.9. TRABAJOS RELACIONADOS**

**Castro y col (2009)** estudiaron la viabilidad de espermatozoides de toros colectados del epidídimo, refrigerados a 4 °C, 24 horas después del sacrificio y encontraron resultados similares al de semen eyaculado. El promedio de la motilidad y del vigor espermático fue 60,2% y 3,1

respectivamente. El número promedio de espermatozoides colectados de la cola de los epidídimos fue de  $1,7 \times 10^9$ , siendo el mínimo de  $0,26 \times 10^9$  y el máximo de  $4,2 \times 10^9$ . En cuanto a la morfología se obtuvo un promedio de 68,9% de espermatozoides normales, siendo el mínimo de 31,5% y el máximo de 89,3%, donde la mayoría de los defectos fueron gotas citoplasmáticas distales. Aunque no era el objetivo 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 los dos restantes, a las 24 horas del sacrificio. En este análisis, los espermatozoides congelados 6 horas después del sacrificio se mantuvieron viables después de la descongelación (motilidad y vigor espermático de 50% y 3 respectivamente). Sin embargo, para los espermatozoides colectados 24 horas después del sacrificio los resultados fueron inferiores, con una motilidad de 10% y vigor 1.

**Albers y Barrios (2006).** Movilidad individual de los espermatozoides epididimarios de toros post-mortem obtenidos mediante lavado retrógrado. El objetivo de este estudio fue evaluar la movilidad individual de los espermatozoides presentes en la cola del epidídimo, obtenida del matadero mediante lavado retrógrado 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:  $35^{\circ}\text{C}$ ) y Protocolo 2 (T:  $25^{\circ}\text{C}$ ), de los cuales se obtuvo los siguientes resultados

**Cuadro 7.** Movilidad Individual de espermatozoides epididimarios

<b>Movilidad Individual de espermatozoides epididimarios recolectados en los Protocolos 1 y 2</b>								
Variable		n	Mínimo	Máximo	Media	Varianza	EE	Prueba t
			----- % -----					
<b>Prot. 1</b>	<b>MI 1</b>	13	0	40	17,46	226,10	15.03	aA†
	<b>MI 2</b>		10	55	34,23	111,85	10.57	aA
<b>Prot. 2</b>	<b>MI 1</b>	20	0	40	8,95	117,31	10.83	aB
	<b>MI 2</b>		1	50	26,8	155,85	12.48	aB

Letras minúsculas comparan medias entre MI para el mismo Protocolo y letras mayúsculas comparan medias entre Protocolos.

Efecto de la temperatura del instrumento de transporte sobre la Movilidad Individual de espermatozoides epididimarios

Se compararon estadísticamente los resultados obtenidos en la evaluación de la movilidad individual en cada protocolo de temperatura. La movilidad individual al momento de la primera lectura (MI1) no tuvo diferencia significativa ( $P > 0,05$ ) entre los dos protocolos, al igual que tampoco hubo diferencia significativa ( $P > 0,05$ ) entre las movilidades individuales tomadas como segunda lectura (MI2). Lo anterior indica que, en este trabajo, la temperatura del instrumento de transporte no fue un factor influyente sobre la movilidad de los espermatozoides epididimarios.

Además, la media estadística al momento de la primera evaluación de movilidad espermática (MI 1) fue menor ( $P < 0,01$ ) en ambos protocolos (P1: 17,46%; P2: 8,95%) que la movilidad al momento de la segunda evaluación (MI 2), que fue entre dos y tres veces mayor (P1: 34.23%; P2: 26.8%). Esto

indica que la movilidad de los espermatozoides epididimarios se activa después de un tiempo.

**Sánchez y col. (2010).** El establecimiento de métodos que permitan la recolección de espermatozoides de animales que hayan muerto repentinamente, puede ser una alternativa que permita obtener descendencia mediante la aplicación de técnicas de reproducción asistida. El objetivo del trabajo fue evaluar la calidad espermática epididimal post-mortem en toros de lidia lidiados. Para ello, se evaluó en fresco la calidad del semen epididimal proveniente de 28 toros. Según los resultados obtenidos, el volumen de semen epididimal obtenido en toros de lidia es de  $0.36 \pm 0.96$  ml; en el caso de la concentración espermática esta resulto de  $2509 \pm 380.5 \times 10^6$  espz/ml, así mismo la motilidad existente en las muestra fue de  $60 \pm 6.1\%$

## **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1. MATERIALES**

#### **3.1.1. Materiales de campo**

- ✓ 100 testículos de toros post mortem
- ✓ Caja de icopor para transporte
- ✓ Guantes
- ✓ Bolsas plásticas
- ✓ Báscula portátil
- ✓ Cinta métrica

#### **3.1.2. Materiales de Laboratorio**

- ✓ Microscopio óptico
- ✓ Baño maría
- ✓ Platina térmica
- ✓ Termómetro.
- ✓ Tubos falcón 15 ml – 50 ml.
- ✓ Tubos eppendorf 2ml
- ✓ Placas Petri.
- ✓ Cámara de New-bauer.
- ✓ Pipeta de New-bauer.

- ✓ Laminas portaobjetos.
- ✓ Laminas cubreobjetos.
- ✓ Equipo de disección.
- ✓ Hojas de bisturí número 4
- ✓ Centrífuga
- ✓ Eosina (2%) y Nigrosina (4%).
- ✓ Solución PBS
- ✓ Lactato de ringer
- ✓ Refrigeradora
- ✓ Filtros
- ✓ Gradilla
- ✓ Jeringas
- ✓ Micropipeta
- ✓ Puntas de 10 $\mu$ l
- ✓ Diluyente AndroMed
- ✓ Toallas desechables
- ✓ Mandil
- ✓ Guantes de nitrilo

### **3.1.3. Materiales de oficina**

- ✓ Cámara.
- ✓ Esferográfico.
- ✓ Computadora

- ✓ Libreta de apuntes
- ✓ Calculadora
- ✓ Hojas de papel bon

## 3.2. MÉTODOS

### 3.2.1. Ubicación

La recolección de los testículos de toros se realizó en el Camal Municipal del cantón Loja, en tanto que el procesamiento de las muestras se llevó a cabo en el Laboratorio de Reproducción Animal, ubicado en la Quinta Experimental Punzara de la Universidad Nacional de Loja.

**Cuadro 8.** Características meteorológicas del lugar de estudio

<b>Característica</b>	<b>Hoya de Loja</b>
<b>Altitud</b>	2 100 msnm
<b>Extensión</b>	1883 Km <sup>2</sup>
<b>Clima</b>	Templado - ecuatorial, Sub húmedo
<b>Temperatura</b>	16 °C

### 3.2.2. Descripción de las Unidades Experimentales

Se trabajó con 50 pares de testículos, obtenidos de machos bovinos en edad reproductiva; cada par de testículos constituyó una unidad experimental.

### 3.2.3. Diseño Experimental

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con un arreglo factorial 2x5 (Protocolos x tiempo de recolección), con cinco repeticiones conforme se explica en el siguiente cuadro.

**Cuadro 9.** Esquema del experimento

<b>Factor 1 (Protocolos)</b>	<b>Factor 2 (Tiempo)</b>	<b>Tratamientos</b>	<b>Repeticiones</b>
P1 (Lavado retrógrado)	2 horas post mortem	T1 P1 2 horas	5
	4 horas post mortem	T2 P1 4 horas	5
	8 horas post mortem	T3 P1 8 horas	5
	10 horas post mortem	T4 P1 10 horas	5
	24 horas post mortem	T5 P1 24 horas	5
P2 (Desmenuzamiento del epidídimo)	2 horas post mortem	T6 P2 2 horas	5
	4 horas post mortem	T7 P2 4 horas	5
	8 horas post mortem	T8 P2 8 horas	5
	10 horas post mortem	T9 P2 10 horas	5
	24 horas post mortem	T10 P2 24 horas	5
<b>Total</b>			<b>50</b>

### 3.2.4. Variables en Estudio

#### 3.2.4.1. Características morfométricas

- ✓ Circunferencia escrotal
- ✓ Peso testicular



- ✓ Largo de epidídimo
- ✓ Peso del epidídimo

#### **3.2.4.2. Evaluación Macroscópica**

- ✓ Volumen
- ✓ Color
- ✓ Olor
- ✓ Densidad

#### **3.2.4.3. Evaluación Microscópica**

- ✓ Motilidad Masal
- ✓ Motilidad Individual
- ✓ Concentración Espermática
- ✓ Morfología
- ✓ Vitalidad

### **3.3. TOMA Y REGISTRO DE DATOS**

#### **3.3.1. Evaluación de las características seminales macroscópicas**

Se evaluaron las características macroscópicas del semen obtenido mediante la colecta de flujo retrógrado y desmenuzamiento del epidídimo (Slicing). Las características macroscópicas que fueron determinadas: Volumen, Color, Olor y Densidad.

- a) **Volumen:** Para determinar el volumen colectado, se observó directamente en el tubo falcón graduado.
- b) **Color:** Igualmente se determinó por observación directa; donde se calificó como blanco marfil y blanco amarillento.
- c) **Olor:** Se determinó mediante el olfato, para lo cual fue necesario percibir su olor, y se consideró normal como sui géneris.
- d) **Densidad:** Se estableció mediante observación directa del semen; donde se calificó como cremosa o muy densa, la cual nos da una idea de la concentración espermática.

### **3.3.2. Evaluación de las características seminales microscópicas**

Para realizar la evaluación microscópica fue necesario esperar entre 40 y 45 minutos para poder observar los movimientos de los espermatozoides epididimarios, durante este periodo de tiempo se mantuvo las muestras de semen y las láminas atemperadas a 37°C sobre la platina térmica, con el fin de evitar choques térmicos en el momento que se realizaba la evaluación, transcurrido este lapso de tiempo se pudo estimar los porcentajes de motilidad y movimientos progresivos de las células espermáticas; para la coloración y frotis de las muestras se utilizó eosina al 2% y nigrosina 4%, la valoración microscópica se la hizo con lente de 10X, 40X y 100X. Se

analizaron las siguientes características: Motilidad Masal (M.M), Motilidad Individual (M.I), Concentración espermática (C.E), Morfología y Vitalidad.

**a) Motilidad Masal:** Se procedió a colocar una gota de semen de 10 a 20  $\mu$ l, sobre un porta objetos atemperado a 37°C, sin colocar el cubre objetos; se observa con el lente de 10X. El porcentaje de motilidad masal se calificó de acuerdo a criterios evaluativos propuestos en el cuadro 4.

**Cuadro 10.** Porcentajes de motilidad masal y criterio evaluativos

VALOR DESCRIPTIVO	ASPECTO DEL MODELO	% CÉLULAS MÓVILES	CRITERIO EVALUATIVO
<b>Muy buena</b>	Movimiento en ondas vigorosas y en remolinos rápidos	80-90%	++++
<b>Buena</b>	Remolinos y ondas más lentas	60-80%	+++
<b>Regular</b>	Sin remolinos, pero con oscilaciones generalizadas	40-60%	++
<b>Mala</b>	Escasa o ninguna motilidad	0-40%	+ o -

Adaptado de; Derivaux (1976), Hafez (1989) y Baracaldo (2007)

**b) Motilidad Individual:** Se colocó 10 $\mu$ l de semen en un porta objetos y se cubrió con el cubre objetos, ambos atemperados a 37°C, se observa con el lente de 40X, se evalúa los espermatozoides con movimiento progresivo rectilíneo que atraviesan el campo observado; tanto en la motilidad masal como para la motilidad individual, para la valoración se coloca la plantilla térmica en el microscopio y así poder mantener la

temperatura. Para determinar el porcentaje de motilidad individual se calificó de acuerdo a los valores propuestos en el cuadro 5.

**Cuadro 11.** Escala basada en el porcentaje de células móviles

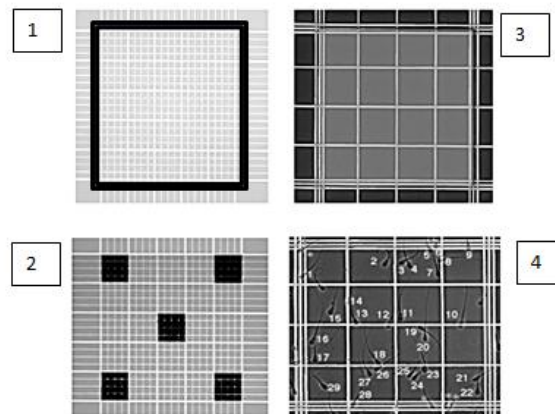
<b>Valor descriptivo</b>	<b>% células móviles</b>
Muy buena	80-100% de células móviles
Buena	60-79% de células móviles
Regular	40-59% de células móviles
Mala	Menos de 40% de células móviles

Adaptado de; Salisbury (1978), Hafez (1989) y Barth (2000).

**c) Concentración espermática:** Para determinar la concentración espermática se realizó una dilución 1:200, es decir se mezcló 10µl de semen puro en 2 ml de solución salina formolada; con la ayuda del vortex se homogenizó la muestra, posteriormente se procedió a colocar 10µl de la dilución en la cámara de Newbauer, a continuación se lleva la cámara al microscópio donde se observa con el lente de 40X.

Para realizar la contabilización se procede a contar las cabezas de los espermatozoides observados en 5 cuadros, del cuadro central grande y se aplicó la siguiente fórmula.

$$CE = n \times 200 \times 10 \times 5000 \times 1000$$



**Figura 9.** Contabilización de espermatozoides en la cámara de Neubauer

**Donde,**

- n = Número de células contadas
- 200 = Factor de dilución
- 10 = Por ser la altura de la cámara de 0.1
- 5 000 = Superficie empleada en  $\text{mm}^3$
- 1000 = Número de espermatozoides/ $\text{mm}^3$

El resultado obtenido de la concentración espermática fue en millones/ml

**d) Morfología:** Para llevar a cabo la evaluación morfológica se evaluó un total de 100 espermatozoides por muestra, con el fin de determinar el porcentaje de anormalidades.

Se utilizó la tinción vital eosina nigrosina, colocando en el extremo de un porta objetos atemperado a  $37^\circ\text{C}$ , una gota de  $10\mu\text{l}$  de nigrosina, una gota de  $20\mu\text{l}$  de eosina y una gota de semen de  $10\mu\text{l}$ , se mezcló y se dejó

reposar por 30 segundos, seguidamente a esto se realizó el extendido con la ayuda de otro porta objetos igualmente atemperado, se deja secar por un minuto; posteriormente se coloca una gota de aceite de inmersión y se lleva al microscópio para observar con el lente de 100X.

- e) Vitalidad:** En la evaluación del porcentaje de vitalidad se contabilizó un número de 100 espermatozoides por muestra. Para realizar el extendido del semen igualmente colocamos una gota de nigrosina y dos gotas de eosina en el extremo de un porta objetos, y con la ayuda de otro porta objetos atemperado, se hace el extendido de la muestra, la cual debe ser fina y uniforme, dejamos secar por un minuto colocamos una gota de aceite de inmersión y llevamos al microscópico para observar con el lente de 100X; los espermatozoides vivos no se tiñeron, mientras que los espermatozoides no viables o muertos tomaron una coloración rosada.

### **3.4. RECOLECCIÓN Y TRANSPORTE DE LOS TESTÍCULOS**

Se recolectó los testículos de 50 toros, en 10 visitas al camal municipal de Loja, de diferentes razas y con una edad estimada entre los dos y 4 años.

Los pasos seguidos para la recolección de los testículos fueron:

- ✓ Recolección de las bolsas escrotales (con sus dos testículos incluidos).
- ✓ Cada bolsa escrotal fue limpiada con toallas de papel y se colocó cada una de ellas dentro de bolsas plásticas selladas e identificadas,

y estas a su vez se colocaron en una caja de icopor a temperatura inicial de 35°C. Para lograr los 35°C se usaron bolsas plásticas con agua tibia, sobre las cuales se dispusieron rollos de papel periódico como aislantes y sobre estos se ubicaron las bolsas escrotales para el transporte de las muestras hacia el laboratorio.

- ✓ Cada bolsa escrotal fue identificada con el número correlativo correspondiente al orden en que fueron recolectadas, además de la fecha y hora de la recolección.

### **3.5. OBTENCIÓN DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMARIOS**

Los testículos bovinos recolectados en el Camal Municipal de Loja, fueron procesados en el Laboratorio de Reproductiva Animal de la carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional de Loja. Los espermatozoides epididimarios se recolectaron según los protocolos referidos por los Doctores. G. Flores-Foxworth y B. Foxworth de la Universidad de Texas A&M (EE.UU.), que consiste en el lavado por flujo retrógrado y desmenuzamiento del epidídimo.

#### **3.5.1. Protocolo 1; Lavado de epidídimo mediante flujo retrógrado**

1. Se removió el escroto, la túnica serosa testicular y los vasos sanguíneos con un bisturí y tijeras. Los vasos deferentes y la cola del

epidídimo se diseccionaron mediante el uso de implementos y técnicas asépticas.

2. El epidídimo ya separado del testículo, se colocó en una caja de Petri, con lactato de ringer precalentada a 37°C (en la platina térmica) con el fin de lavar los residuos de sangre que quedasen y se mantuvo la porción libre de los vasos deferentes firmemente.
3. Se localizó la porción más cercana de la zona media de la cola del epidídimo. Allí se realizó un corte transversal con el bisturí, justo antes que el diámetro del epidídimo se reduce, para obtener la mayor cantidad de espermatozoides posibles.
4. Se colocó una de las agujas (calibre 20, 21, 22, o 23, según el diámetro interno de cada vaso deferente) dentro del lumen de la porción libre del vaso deferente. Se adaptó una jeringa de 10 – 15 ml llena con “medio de lavado PBS “ a 37°C, y con esta jeringa se introdujo lentamente dentro del lumen de cada vaso deferente. En las paredes de los vasos deferentes se colocó una pinza contra la aguja para evitar pérdida del líquido de lavado por reflujo.
5. El fluido obtenido que contiene los espermatozoides epididimarios, se centrifugó a (300g/5min.) para concentrar la muestra. El sobrenadante obtenido se removió y fue descartado.
6. La concentración obtenida se le realizó una predilución con AndroMed en proporción 1:1 a 37°C.



### **3.5.2. Protocolo 2; Recolección de espermatozoides mediante desmenuzamiento del epidídimo (Slicing)**

1. El epidídimo fue separado asépticamente del testículo, se lo colocó en una caja Petri con lactato de ringer a 37°C, con el fin de lavar los residuos de sangre que quedasen
2. Posteriormente, fue completamente desmenuzada (cortada) en una caja de Petri, que contenga 15 ml de medio PBS a 37°C.
3. El contenido de la caja Petri se succionó en una jeringa de 20 ml para para luego ser filtrado a través de un filtro estéril, el mismo que fue recogido en tubos falcón (15 ml).
4. El medio filtrado que contiene los espermatozoides epididimarios, se centrifugó a una velocidad de (300g/5min.) para concentrar la muestra. El sobrenadante obtenido se removió y fue descartado.
5. La concentración obtenida se le realizó una predilución con AndroMed en proporción 1:1 a 37°C.

### **3.6. PROCESAMIENTO DEL SEMEN**

#### **3.6.1. Preparación del diluyente**

Se procedió de la siguiente manera:

- Se vertió 2 ml de AndroMed en un tubo falcón graduado
- Se agregó al concentrado 8 ml de agua bidestilada, atemperada a 37°C a 38°C.
- Se mezcló bien con la ayuda del vortex (agitador mecánico), hasta conseguir que la dilución se homogenice.

Esta dilución se realizó para cada muestra de forma individual, la misma que debe prepararse en baño maría entre 35°C a 37°C.

### **3.6.2. Predilución y examen del semen**

Se realizó una predilución del semen con el diluyente preparado, en proporción 1:1; para ello el diluyente debe tener la misma temperatura que el esperma. Mientras se procede al examen microscópico, el semen debe permanecer atemperado a 37°C, en la platina térmica.

### **3.6.3. Dilución final del semen**

Tras la evaluación del semen se procedió inmediatamente a la dilución final, que sería 2 ml de semen prediluido más 8 ml del diluyente preparado. Esta dilución final debe descender de temperatura pasivamente, hasta alcanzar la temperatura de laboratorio (18°C a 22°C). Posteriormente se descende la temperatura con agua refrigerada (8°C – 10°C), se debe equilibrar la temperatura por lo menos por 1 hora, seguidamente lo refrigeramos a 5°C.

### 3.6.4. Evaluación post refrigeración

Se realizó la evaluación de la motilidad individual post refrigeración, cada 24 horas. De la muestra refrigerada a 5°C se tomó, 0.5 ml de semen diluido en un tubo eppendorf, el mismo que fue atemperado a 37°C por 3 minutos en baño maría, seguidamente se retiró el tubo del baño maría, se lo secó con una toalla de papel, luego se tomó 10µl de semen y se colocó en el porta objetos tibio y colocamos el cubreobjetos, esta evaluación se la realizó sobre la platina térmica que tiene que estar en el microscopio.

**Cuadro 12.** Periodos de evaluación post refrigeración

<b>MI</b>	<b>%</b>				
<b>Hs</b>	24	48	72	96	120
$\bar{x}$					

**MI:** Motilidad individual

**Hs:** Horas

$\bar{x}$ : Promedio

### 3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

De la información obtenida, se procedió a calcular promedios, porcentajes, y luego de ello se aplicó un Análisis de Varianza, para determinar si hay diferencia estadística entre los dos métodos de estudio; posteriormente se realizó una interpretación de carácter descriptivo y explicativo, que permitió llegar a las conclusiones presentadas en el presente trabajo.

### **3.9. PRESENTACIÓN DE RESULTADOS**

Los resultados fueron analizados e interpretados, los mismos que se presentan en cuadros y gráficos estadísticos con su respectiva interpretación.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICAS DE TESTÍCULOS Y EPIDÍDIMOS

Como dato adicional en todos los testículos se evaluaron las medidas de circunferencia escrotal (con los testículos dentro de las bolsas escrotales), además el largo, ancho y peso testicular, así como la medición del largo y peso del epidídimo. Los testículos seleccionados para este estudio fueron de 50 toros, en edad reproductiva; los cuales tuvieron las medidas que se presentan en el cuadro 13 y 14 respectivamente.

**Cuadro 13.** Características morfométricas de los testículos

Variable	Mínimo	Máximo	Media	Desviación Estándar
<b>C. e (cm)</b>	32,8	35	33,81	0,59
<b>L. t (cm)</b>	10,5	13	11,94	0,58
<b>A. t (cm)</b>	5	6,8	6,10	0,44
<b>P. t (kg)</b>	1,05	1,23	1,16	0,05

**C. e:** Circunferencia escrotal; **L. t:** Largo testicular; **A. t:** Ancho testicular; **P. t:** Peso testicular

**Cuadro 14.** Características morfométricas de los epidídimos

Variable	Mínimo	Máximo	Media	Desviación Estándar
<b>P. e (g)</b>	60	65	62,76	1,42
<b>L. e (cm.)</b>	16	19	17,28	0,63

**P. e:** Peso de epidídimo; **L. e:** Largo de epidídimo

## 4.2. CALIDAD DEL SEMEN OBTENIDO MEDIANTE LAVADO RETRÓGRADO Y DESMENUZAMIENTO DEL EPIDÍDIMO

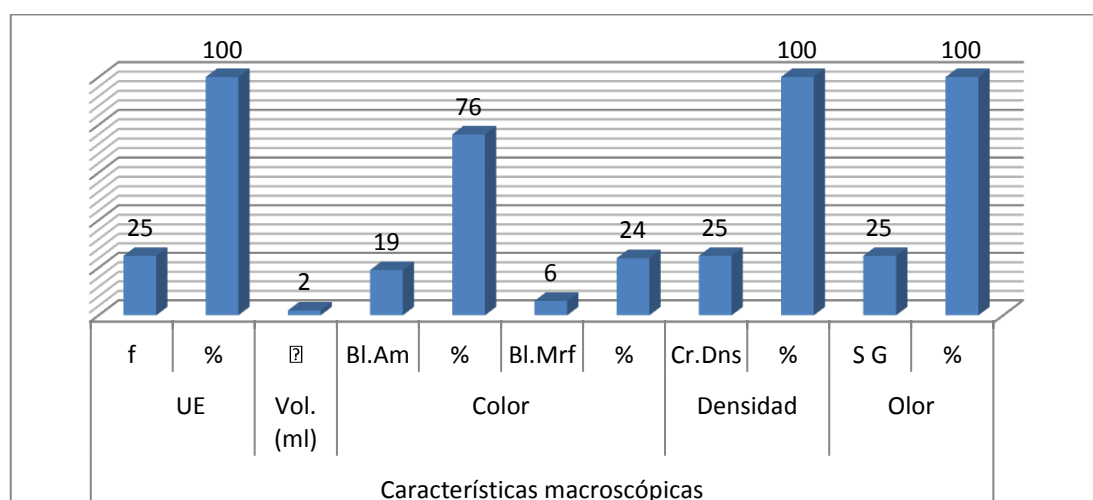
### 4.2.3. Características Macroscópicas

**Cuadro 15.** Resultados de la evaluación macroscópica del semen obtenido mediante lavado retrógrado.

Características macroscópicas										
UE		Vol. (ml)	Color				Densidad		Olor	
f	%	$\bar{x}$	Bl.Am	%	Bl.Mrf	%	Cr.Dns	%	S G	%
25	100	2	19	76	6	24	25	100	25	100

**Bl.Am:** Blanco amarillento, **Bl.Mrf:** Blanco marfil, **Cr.Dns:** Cremoso denso, **S G:** Sui géneris

Como apreciamos en el cuadro 15, en 25 UE se obtuvo un promedio de 2 ml de semen epididimario, 19 UE de las 25 presentaron una coloración Blanco amarillento que representa el 76% y 6 UE Blanco marfil que representa el 24% del total de las muestras; todas las muestras presentaron una densidad cremosa densa y olor sui géneris que representan el 100% del grupo analizado.



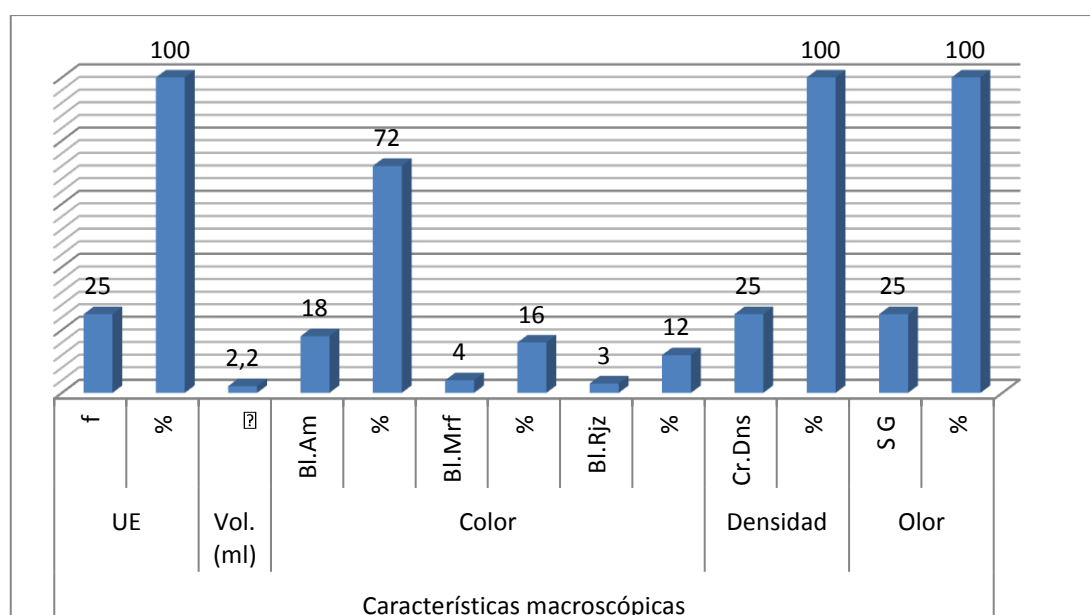
**Figura 10.** Características Macroscópicas del semen obtenido mediante lavado retrógrado.

**Cuadro 16.** Resultados de la evaluación macroscópica del semen obtenido mediante desmenuzamiento del epidídimo (slicing).

Características macroscópicas												
UE		Vol. (ml)	Color						Densidad		Olor	
f	%	$\bar{x}$	Bl.Am	%	Bl.Mrf	%	Bl.Rjz	%	Cr.Dns	%	S G	%
25	100	2,2	18	72	4	16	3	12	25	100	25	100

**Bl.Am:** Blanco amarillento, **Bl.Mrf:** Blanco marfil, **Bl.Rjz:** Blanco rojizo  
**Cr.Dns:** Cremoso denso, **S G:** Sui géneris

En el cuadro 16 se indica las características macroscópicas del semen obtenido mediante desmenuzamiento del epidídimo (slicing), donde se obtuvo un promedio de 2,2ml, 18 UE de las 25 presentaron un color Blanco amarillento lo que representa 72%, 4 UE presentaron un color Blanco marfil que constituye el 16%, 3 UE mostraron una coloración Blanco rojiza que representa el 12%; igualmente que el grupo anterior todas las muestras demostraron una densidad cremosa densa de olor sui géneris que representa el 100% del total del grupo analizado.



**Figura 11.** Características macroscópicas del semen obtenido mediante desmenuzamiento del epidídimo (slicing).

#### 4.2.4. Características Microscópicas

**Cuadro 17.** Resultados de la evaluación microscópica del semen obtenido mediante lavado retrógrado.

Variable	Tiempos de recolección post mortem				
	2h	4h	8h	10h	24h
<b>Motilidad Masal %</b>	86	76	56	48	42
<b>Motilidad individual %</b>	76	66	47	41	29
<b>Vivos %</b>	86	76	63,4	51	34
<b>C.Esp<math>\times 10^9</math>/ml</b>	69	67	56,2	62,8	65,2
<b>Esp. Anormales %</b>	7,4	8,2	8	6,6	9,4

**C.Esp:** Concentración de Espermatozoides;

En el cuadros 17 se puede observar que luego de haber realizado el análisis microscópico de cada uno de los grupos del protocolo uno (lavado retrógrado), se obtuvo los promedios de cada uno de ellos; en cuanto a la motilidad masal del grupo uno a 2h post mortem se obtuvo un 86%, en el grupo dos a 4h un 76%; en el grupo tres a 8h un 56%; en el grupo cuatro a 10h un 48% y en el grupo cinco a 24h se obtuvo un 42% de células móviles.

En lo que se refiere a la motilidad individual 2h post mortem se obtuvo un promedio de 76%; a las 4h un 66%; a 8h un 47%; a 10h un 41% y a las 24h post mortem se obtuvo un 29% de células con movimiento progresivo rectilíneo que fueron capaces de atravesar el campo óptico observado.

Para el porcentaje de espermatozoides vivos se obtuvo un 86% para el grupo uno a 2h post mortem; 76% para el grupo dos a 4h; 63.4% para el



grupo tres a 8h; 51% en el grupo cuatro a 10h; y 34% para el grupo cinco a 24h post mortem.

En lo referente a la concentración espermática dada en millones de espermatozoides por ml ( $\times 10^9$  spz/ml), se obtuvo los siguientes promedios; para el grupo uno a 2h post mortem  $69 \times 10^9$  spz/ml; para el grupo dos a 4h  $67 \times 10^9$  spz/ml ; en el grupo tres a 8h  $56.2 \times 10^9$  spz/ml; en el grupo cuatro a 10h  $62.8 \times 10^9$  spz/ml y para el grupo cinco a 24h post mortem se obtuvo  $65.2 \times 10^9$  spz/ml.

En cuanto al porcentaje de espermatozoides anormales luego del estudio realizado se obtuvo para el grupo uno a 2h post mortem un promedio de 7,4%; para el grupo dos a 4h 8,2%; en el grupo tres a 8h 8%; 6.6% para el grupo cuatro a 10h y 9.4% en el grupo cinco a 24h post mortem.

**Cuadro 18.** Resultados de la evaluación microscópica del semen obtenido mediante desmenuzamiento del epidídimo (slicing).

Variable	Tiempos de recolección post mortem				
	2h	4h	8h	10h	24h
<b>Motilidad Masal %</b>	84	72	54	46	40
<b>Motilidad individual %</b>	74	64	46	36	28
<b>Vivos %</b>	82,6	72,2	57,6	49,2	34
<b>C.EspX10<sup>9</sup>/ml</b>	67	67	56,2	58,6	61,8
<b>Esp. Anormales %</b>	9,4	8	10,6	9,8	10,4

**C.Esp:** Concentración de Espermatozoides

Los datos presentados en el cuadro 18, indican que luego de haber realizado el análisis microscópico de cada uno de los grupos del protocolo dos (desmenuzamiento del epidídimo), se obtuvo los promedios de cada uno de ellos; en cuanto a la motilidad masal del grupo uno a 2h post mortem se obtuvo un 84%, en el grupo dos a 4h, un 72%; en el grupo tres a 8h un 54%; en el grupo cuatro a 10h un 46% y en el grupo cinco a 24h se obtuvo un 40% de células móviles.

En lo que se refiere a la motilidad individual 2h post mortem se obtuvo un promedio de 74%; a las 4h un 64%; a 8h un 46%; a 10h un 36% y a las 24h post mortem se obtuvo un 28% de células con movimiento progresivo rectilíneo que fueron capaces de atravesar el campo óptico observado.

Para el porcentaje de espermatozoides vivos se obtuvo un 82.6% para el grupo uno a 2h post mortem; 72.2% para el grupo dos a 4h; 57.6% para el grupo tres a 8h; 49.2% en el grupo cuatro a 10h; y 34% para el grupo cinco a 24h post mortem.

En lo referente a la concentración espermática dada en millones de espermatozoides por ml ( $\times 10^9$  spz/ml), se obtuvo los siguientes promedios; para el grupo uno a 2h post mortem  $67 \times 10^9$  spz/ml; para el grupo dos a 4h  $67 \times 10^9$  spz/ml ; en el grupo tres a 8h  $56.2 \times 10^9$  spz/ml; en el grupo cuatro a 10h  $58.6 \times 10^9$  spz/ml y para el grupo cinco a 24h post mortem se obtuvo  $61.8 \times 10^9$  spz/ml.

En cuanto al porcentaje de espermatozoides anormales luego de realizado el análisis se obtuvo para el grupo uno a 2h post mortem un promedio de 9.4%; para el grupo dos a 4h 8%; en el grupo tres a 8h 10.6%; 9.8% para el grupo cuatro a 10h y 10.4% en el grupo cinco a 24h post mortem.

**Cuadro 19.** Resultados estadísticos de las características microscópicas según Protocolo.

Parámetro evaluado	Protocolo uno	Protocolo dos
Motilidad masal %	61,6 <sup>a</sup>	59,2 <sup>a</sup>
Motilidad individual %	51,8 <sup>a</sup>	49,6 <sup>a</sup>
Espz. vivos%	62,08 <sup>a</sup>	59,12 <sup>b</sup>
C.Espz $\times 10^9$ /ml	64,04 <sup>a</sup>	62,12 <sup>b</sup>
Espz. Anormales %	7,92 <sup>b</sup>	9,64 <sup>a</sup>

(<sup>a b</sup>) Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Protocolo uno:** Lavado retrógrado

**Protocolo dos:** Desmenuzamiento del epidídimo

**C.Espz:** Concentración de Espermatozoides

Los datos presentados en el cuadro 19; indican que en cuanto a la motilidad masal y la motilidad individual no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ), en lo referente al porcentaje de espermatozoides vivos y concentración espermática, el protocolo uno es estadísticamente superior; para el porcentaje de espermatozoides anormales el protocolo dos es significativamente superior al protocolo uno.

**Cuadro 20.** Resultados estadísticos de las características microscópicas de acuerdo al tiempo de recolección de las muestras en los Protocolos.

<b>Parámetro evaluado</b>	<b>G1</b>	<b>G2</b>	<b>G3</b>	<b>G4</b>	<b>G5</b>
<b>Motilidad masal %</b>	85 <sup>a</sup>	74 <sup>b</sup>	55 <sup>c</sup>	47 <sup>d</sup>	41 <sup>e</sup>
<b>Motilidad individual %</b>	75 <sup>a</sup>	65 <sup>b</sup>	46,5 <sup>c</sup>	38,5 <sup>d</sup>	28,5 <sup>e</sup>
<b>Espz. vivos%</b>	84,3 <sup>a</sup>	74,1 <sup>b</sup>	60,5 <sup>c</sup>	50,1 <sup>d</sup>	34 <sup>e</sup>
<b>C.Espzx10<sup>9</sup>ml</b>	68 <sup>a</sup>	67 <sup>a</sup>	56,2 <sup>b</sup>	60,7 <sup>ab</sup>	63,5 <sup>ab</sup>
<b>Espz. Anormales %</b>	8,4 <sup>a</sup>	8,1 <sup>a</sup>	9,3 <sup>a</sup>	8,2 <sup>a</sup>	9,9 <sup>a</sup>

( a ab c d e ) Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ) en la misma fila.

- G1** Recuperación de espermatozoides a 2h post mortem
- G2** Recuperación de espermatozoides a 4h post mortem
- G3** Recuperación de espermatozoides a 8h post mortem
- G4** Recuperación de espermatozoides a 10h post mortem
- G5** Recuperación de espermatozoides a 24h post mortem

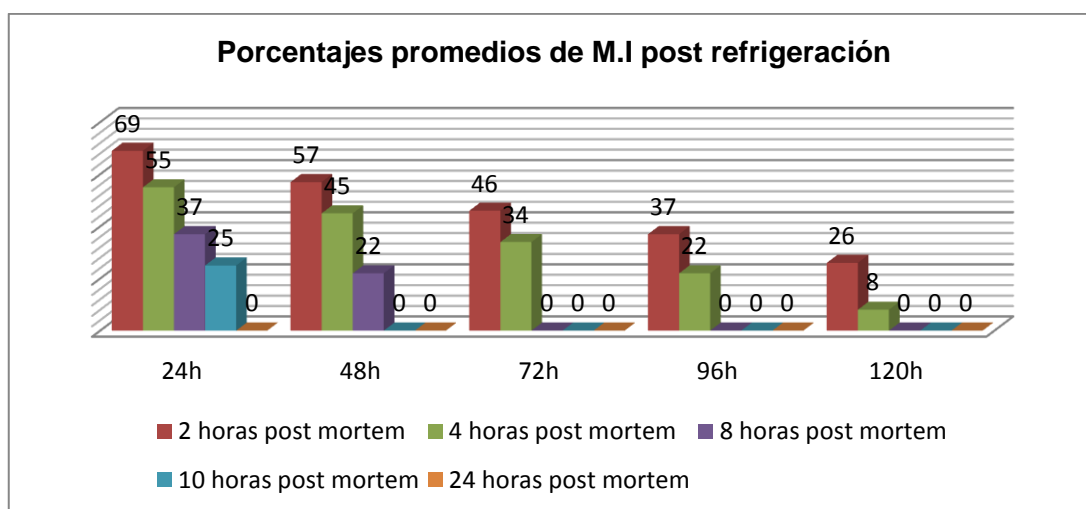
El cuadro 20 nos indica, que en lo referente a la motilidad masal, motilidad individual y espermatozoides vivos, existe diferencia estadística donde el primer grupo es estadísticamente superior en primer lugar, luego le sigue el grupo dos, tres, cuatro y en último lugar el grupo cinco; en cuanto a la concentración espermática y espermatozoides anormales los resultados no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ) en el grupo uno y dos; no obstante para la concentración espermática en el grupo tres, cuatro y cinco existe diferencia estadística; lo que no es así para el porcentaje de espermatozoides anormales, como se puede observar en el cuadro antes mencionado no existe una diferencia significativa entre los grupos de estudio.

#### 4.2.5. Calidad del semen post refrigeración a distintos tiempos de evaluación.

El porcentaje de motilidad individual se evaluó cada 24h, del semen obtenido mediante lavado retrógrado y desmenuzamiento del epidídimo (slicing). En el cuadro 21, se indica los porcentajes de motilidad individual obtenidos al realizar la evaluación post refrigeración cada 24h.

**Cuadro 21.** Porcentaje de Motilidad Individual evaluada cada 24h post refrigeración, del semen obtenido mediante lavado retrógrado. (Protocolo 1)

Porcentaje de Motilidad Individual					
Tiempo de colecta post mortem	Tiempos de evaluación				
	24h	48h	72h	96h	120h
2 horas post mortem	69	57	46	37	26
4 horas post mortem	55	45	34	22	8
8 horas post mortem	37	22	0	0	0
10 horas post mortem	25	0	0	0	0
24 horas post mortem	0	0	0	0	0

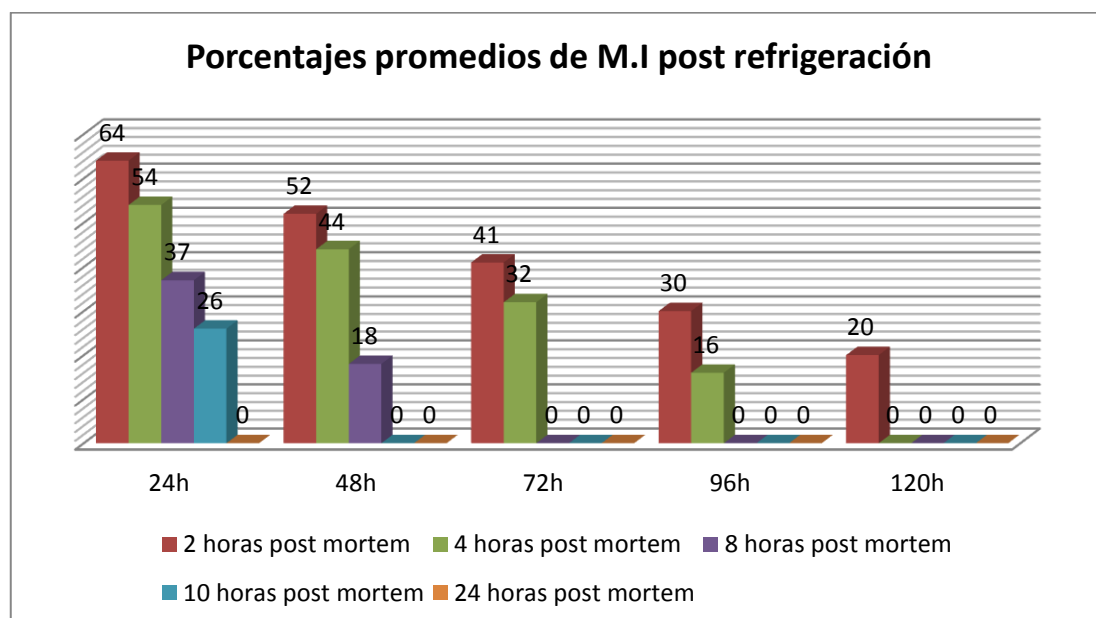


**Figura 12.** Promedios del porcentaje de M.I evaluada cada 24h post refrigeración, del semen obtenido mediante lavado retrógrado.

La figura 12 muestra los promedios de los porcentajes de motilidad individual post refrigeración, en la cual nos indica claramente que los mejores resultados se obtuvieron en el grupo uno 2h post mortem durante las 24,48 y 72 horas; y el grupo dos a 4 horas post mortem durante las 24 y 48 horas.

**Cuadro 22.** Porcentaje de Motilidad Individual evaluado cada 24h post refrigeración del semen obtenido mediante desmenuzamiento del epidídimo (Protocolo 2).

Porcentaje de Motilidad Individual					
Tiempo de colecta post mortem	Tiempos de evaluación				
	24h	48h	72h	96h	120h
2 horas post mortem	64	52	41	30	20
4 horas post mortem	54	44	32	16	0
8 horas post mortem	37	18	0	0	0
10 horas post mortem	26	0	0	0	0
24 horas post mortem	0	0	0	0	0



**Figura 13.** Promedios del porcentaje de M.I evaluada cada 24h post refrigeración, del semen obtenido mediante desmenuzamiento del epidídimo.

Como se observa en la figura 13, al igual que en la figura 16, los mejores resultados se obtuvieron en los dos primeros grupos, es decir a las 2 horas y 4 horas post mortem, pero en menor porcentaje que el protocolo uno (lavado retrógrado).

**Cuadro 23.** Resultados estadísticos de los promedios de Motilidad Individual en los protocolos post refrigeración

<b>PORCENTAJE DE MOTILIDAD INDIVIDUAL POST REFRIGERACIÓN</b>		
<b>Motilidad individual en horas</b>	<b>Protocolo uno</b>	<b>Protocolo dos</b>
24h	37,2 <sup>a</sup>	36,2 <sup>a</sup>
48h	24,8 <sup>a</sup>	22,8 <sup>a</sup>
72h	16 <sup>a</sup>	14,6 <sup>a</sup>
96h	11,8 <sup>a</sup>	9,2 <sup>a</sup>
120h	6,8 <sup>a</sup>	4 <sup>b</sup>

(<sup>a b</sup>) Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Como podemos observar en el cuadro 23, nos muestras una comparación de los resultados de la motilidad individual post refrigeración entre los dos protocolos de estudio, los mismos que indican que hay una diferencia estadística pero no es significativa ( $p > 0,05$ ).

**Cuadro 24.** Resultados estadísticos de los promedios de motilidad individual post descongelación de acuerdo al tiempo de obtención de la muestra

Tiempo de colecta post mortem	% de Motilidad Individual cada 24 horas				
	24h	48h	72h	96h	120h
2h	66,5 <sup>a</sup>	54,5 <sup>a</sup>	43,5 <sup>a</sup>	33,5 <sup>a</sup>	23 <sup>a</sup>
4h	54,5 <sup>b</sup>	44,5 <sup>b</sup>	33 <sup>b</sup>	19 <sup>b</sup>	4 <sup>b</sup>
8h	37 <sup>c</sup>	20 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>b</sup>
10h	25,5 <sup>d</sup>	0 <sup>d</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>b</sup>
24h	0 <sup>e</sup>	0 <sup>d</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>b</sup>
Promedio	36,6	23,8	15,3	10,5	4,6

( a b c d e ) Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ) en la misma fila

El cuadro 24 nos indica que el porcentaje de motilidad individual fue estadísticamente superior a las 24 horas post refrigeración en el grupo uno a 2 horas post mortem, seguido del grupo dos a 4 horas post mortem, grupo tres, grupo cuatro y por último el grupo cinco a 24 horas post mortem en el cual no se mostró una motilidad individual en las células espermáticas; es notable que a partir de las 48 horas post refrigeración el porcentaje de motilidad individual desciende considerablemente; por ende en el mismo se observa que existe una diferencia estadística significativa ( $p < 0,05$ ), entre los periodos de evaluación post refrigeración de los grupos de estudio.



## **5. DISCUSIÓN**

### **5.1. CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICAS DE TESTÍCULOS Y EPIDÍDIMOS ESTUDIADOS**

Dentro de las características morfométricas de testículos y epidídimos en el estudio realizado, se obtuvo medias de 33,81 cm para circunferencia escrotal; 11,94 cm para largo testicular; 6,10 cm para ancho testicular y de 1,2 Kg de peso testicular entre ambos testículos; 62,76 g para el peso del epidídimo y 17,28 cm de largo de epidídimo, datos que se relacionan a los señalados por Bearden J. (1980), donde indica que el peso de cada testículo está alrededor de los 250 a 500 g, el largo testicular entre 11 y 17cm y el ancho entre 5 a 8 cm, por otra parte Sudheer (2000), obtuvo promedios de 31,80 cm para circunferencia escrotal, 11,36 cm para el largo testicular; 5,56 cm para ancho o profundidad testicular; y 267,12 g para el peso de cada uno de los testículos; 1,96 cm de largo de la cola del epidídimo y 30,06 g para el peso de la cola epididimaria, así mismo, Rodríguez y col. (2000), obtuvo promedios para circunferencia escrotal de 31,25 cm, peso de la cola epididimaria 32 g y 16,63 cm para el largo del epidídimo.

### **5.2. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS**

Entre de las características macroscópicas encontradas en las 50 muestras analizadas, se obtuvo un volumen promedio de 2,2 ml, lo cual es confirmado

por Barrios (2002) y Rodríguez (2000), donde indican parámetros de 2 y 4ml respectivamente; por otra parte Sánchez y col. (2010), en un estudio realizado en 28 toros de lida post mortem obtuvo medias de 0.36 y 0.96ml; dichos resultado es inferior al encontrado.

El color de las muestras de semen colectado de los epidídimos de 37 toros post mortem mostraron una coloración blanco amarillento, una coloración blanco marfil 10 toros y una coloración blanco rojizo 3 toros; Palacio (2005), señala que la coloración normal del semen debe de ir de un blanco amarillento a un blanco marfil, colores rojizos son señal de mezcla con sangre fresca, por ende podemos determinar que la coloración blanca rojiza que se obtuvo en nuestro estudio se debió principalmente a la mezcla de sangre, en el momento de realizar el desmenuzamiento o corte del epidídimo, debido a la presencia de capilares demasiado pequeños, lo cual fue la causa de esta coloración. Por su parte Barth A (2000) obtuvo una coloración blanquecina o ligeramente amarillenta.

En cuanto al olor, todas las muestras se calificaron como sui géneris, datos que hace referencia a Barth A (2000); así mismo lo confirma López J. (2014).

En lo que se refiere a la densidad, todas las 50 muestras presentaron una consistencia cremosa densa, en un estudio realizado por Rodríguez J. (2000), con toros mestizos, demostró que una densidad cremosa densa está

dada por la concentración espermática, la cual presenta entre 15 a  $40 \times 10^9$  spz/ml, lo que es suficiente para promover 20 eyaculados normales consecutivos; por su parte Baracaldo M (2007), confirma que la densidad de un semen cremoso, granular puede contener alrededor de 750 o 1000 millones de spz/ml o más, la misma que es calificada como muy buena.

### **5.3. CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS**

En lo que respecta a las características microscópicas se tomaron en cuenta las medias de cada uno de los grupos, tanto para el protocolo de lavado retrógrado (P1) como para el protocolo de desmenuzamiento del epidídimo (P2). Es así que para el primer grupo a 2h post-mortem se obtuvo medias de 86%(P1) y 84%(P2), de motilidad masal, dichos porcentajes son menores a los obtenidos por (Chávez M. 2008), quien obtuvo mediante lavado retrógrado un 90% de motilidad masal, en toros de lidia; con un valor descriptivo muy bueno; para el segundo grupo a 4h post mortem 76% (P1) y 72% (P2), con un valor descriptivo bueno; el tercer grupo a 8h post-mortem se obtuvo un 56% (P1) y 54% (P2), y a las 10h y 24h se tuvo una media de motilidad masal de 40% a 48% de células, con un valor descriptivo regular; dichos valores descriptivos están de acuerdo a los valores de referencia presentados por Hafez (1989) y Baracaldo (2007), quienes señalan valores descriptivos, muy bueno de 80-90%, bueno de 60-79%, regular de 40-59% y mala menos de 40%.

En cuanto a la motilidad individual se encontró valores promedios, en el primer grupo a 2h post mortem 76% (P1) y 74%(P2); valor que son menores a los encontrados por Chávez M. (2008), de 80% ; para el segundo grupo a las 4h post- mortem se obtuvieron valores de 66% (P1) y 64% (P2), datos que hacen referencia a los obtenidos por Sánchez y col. (2010), quien obtuvo medias de  $60\pm 6.1\%$  de motilidad individual, realizado en un estudio a 28 toros de lidia post-mortem, con un valor descriptivo bueno; en el tercer grupo a las 8h post-mortem 47% (P1) y 46% (P2) regular; y a las 10h y 24h post-mortem se obtuvo valores de 28% y 41% respectivamente, que nos da un valor descriptivo malo de acuerdo a los porcentajes referidos por Hafez (1989) y Barth (2000). Las lecturas de motilidad individual que se hicieron tanto para el protocolo de lavado retrogrado como para el protocolo de desmenuzamiento del epidídimo, no mantuvieron un patrón uniforme; esto pudiera relacionarse con la variabilidad entre toros de matadero, no reproductores, y más aún en este estudio en el que desconocemos el origen específico de esos machos destinados al consumo y que entendemos no tuvieron una dieta adecuada lo que pudiera haber afectado, de alguna manera su capacidad reproductora. Albers M y Barrios D (2006).

En lo referente al porcentaje de espermatozoides vivos, encontramos a las 2h 86% (P1) y 82.6% (P2); a las 4h 76% (P1) y 72.2% (P2), datos se relacionan a los obtenidos por Chávez M. (2008), quien en su estudio determino porcentajes de 70% y 80%; valores de referencia encontrados por

Morillo y col. (2012), quien comenta que el porcentaje mínimo aceptable para espermatozoides vivos debe alcanzar el 70%.

Según Barrios (2002), demuestra que la cantidad de espermatozoides varía entre las porciones del epidídimo en diferentes razas de toros, en las cuales encontró de 40 a  $72 \times 10^9$  espz/ml; estos valores coinciden con los encontrados en el estudio que fue de 56,2 a  $69 \times 10^9$  espz/ml; superiores a los encontrados por Rodríguez (2000) de 15 a  $40 \times 10^9$  espz/ml; por su parte Castro y col (2009) encontró promedios de espermatozoides colectados de la cola de los epidídimos de  $1,7 \times 10^9$  espz/ml, siendo el mínimo de  $0,26 \times 10^9$  espz/ml y el máximo de  $4,2 \times 10^9$  espz/ml. En otros estudios Sánchez y col. (2010), obtuvo una concentración espermática de  $380,5 \times 10^6$  espz/ml, datos que son inferiores a los obtenidos por Chávez M. (2008), de 600 a  $1800 \times 10^6$  espz/ml.

En cuanto a la morfología el porcentaje de espermatozoides anormales fue de 7.92% para el protocolo 1 y de 9.64% para el protocolo 2. Catena M. (1999) y Barth A. (2000) confirman que el total de anormalidades no debe superar el 30%; cuando hay pocas anormalidades es suficiente contar 100 espermatozoides y cuando encontramos gran cantidad es recomendable contar 300 o más.

### 5.3.1. Evaluación de la motilidad individual post refrigeración

Castro y col (2009) estudiaron la viabilidad de espermatozoides de toros, colectados de epidídimos refrigerados a 4 °C, 24 horas después del sacrificio y encontraron resultados similares al de semen eyaculado. El promedio de la motilidad individual fue de 60,2% ; Sin embargo, para los espermatozoides evaluados a 24 horas después, post refrigeración los resultados fueron inferiores, con una motilidad de 10%. En nuestro estudio los mejores resultados se obtuvieron en los grupos uno y dos, tanto para el protocolo uno como para el protocolo 2; es así que a las 24h se determinó un porcentaje de 69% (G1) y 55% (G2), (P1); y de 64% (G1) y 54% (G2), (P2), a las 48 h se obtuvo un porcentaje de 57% (G1) y 45% (G2), (P1); y de 52% (G1) y 44 % (G2), (P2), los grupos 3,4,5 no presentaron motilidad individual. Martins C. et al. (2009) determinó que después de las 48h de almacenamiento en refrigeración, se produce una disminución total de la motilidad, lo que hace referencia a los resultados obtenidos en este trabajo. Por otra parte así lo confirma Anel L, (2002), donde menciona que dependiendo del intervalo entre la recuperación de los espermatozoides y la muerte , la motilidad espermática disminuirá significativamente entre las 48h.

## 6. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados de la investigación se puede llegar a las siguientes conclusiones:

- Las muestras obtenidas mediante el protocolo de lavado retrógrado obtuvieron mejores resultados que el protocolo de desmenuzamiento del epidídimo (slicing), aunque estos no son significativamente diferentes.
- Los resultados obtenidos mediante desmenuzamiento del epidídimo en este estudio, son datos preliminares, ya que en la bibliografía revisada no se mencionan trabajos realizados por este procedimiento; sino más bien sólo lo describen como un método para obtener espermatozoides epididimarios post mortem.
- Las muestras de semen con mejores resultados en su lectura fue en primer lugar el grupo 1 a 2h post mortem, seguido del grupo 2 a 4h post mortem y el grupo 3 a 8h post mortem.
- Los espermatozoides recolectados del epidídimo de toros post mortem mostraron sobrevivencia, aunque tienen menor movilidad que los del semen bovino recolectado por métodos convencionales.

- Los métodos de recolección utilizados fueron eficientes y repetibles, aunque se necesita mayor investigación para determinar la influencia que estos métodos pudieran tener sobre la cantidad y calidad de espermatozoides epididimarios recolectados de animales post mortem.
  
- El mejor periodo de conservación en refrigeración de semen epididimario recolectado entre las 2h y 4h post mortem, se encuentra entre las 24h y 48h, pasado este período la motilidad individual desciende significativamente.



## 7. RECOMENDACIONES

Los resultados de la investigación nos han permitido realizar las siguientes recomendaciones:

- Para la obtención de semen epididimario post-mortem, se recomienda utilizar el protocolo de Lavado Retrógrado.
- Se debe evitar cambios bruscos en la temperatura, durante el transporte y la conservación de las muestras.
- Si se va a refrigerar semen proveniente de los epidídimos, se recomienda que el lapso de tiempo entre la recolección de los testículos, hasta la obtención de los espermatozoides en el laboratorio, sea lo más pronto posible.
- Se recomienda realizar más estudios sobre estos métodos de recuperación espermática para determinar mejor la calidad de los espermatozoides.

- Se recomienda realizar estudios sobre los medios de colecta de espermatozoides epididimarios y sobre el efecto que estos pudiesen tener ante el esperma.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. ALBERS, M., Y D., BARRIOS, 2006. Movilidades individuales de los espermatozoides epididimarios de toros post mortem obtenidas mediante lavado retrógrado. Zootecnia., Vol. 24, p. 267-280.
2. ANDROVET, 2011. Andrología Veterinaria. Disponible en: URL:<http://androvvet.blogspot.com/>
3. ANEL, L., 2002. Effect of post mortem interval in quality of epididymal spermatozoa in Iberian Red Deer (*Cervus elaphus hispanicus*). Theriogenology. 57: 577.
4. BARACALDO, M., BARTH, A., AND W., BERTRAND, 2007. Pasos para el congelamiento de semen bovino: desde la colección del semen hasta el almacenamiento en el tanque de nitrógeno líquido.
5. BARRIOS, D., 2002. Evaluación de la calidad y capacidad fecundante de espermatozoides de la cola del epidídimo de toros Post Mortem. IX Congreso venezolano de Producción e Industria Animal. Valera
6. BARTH, A 2000. Curso de evaluación de toros y control de la calidad seminal. 1 ed. Córdoba (Argentina). Universidad católica de Córdoba, 2000.
7. BEARDEN J. 1980, Reproducción animal aplicada, México: Manual moderno, pág.: (21-49,62-72)
8. CARBALLO, M. 2009. Comparación de dos diluyentes comerciales para cripreservar semen de bovino bajo condiciones de campo en el trópico húmedo. [En línea] 7 de enero de 2009.

<http://cdigital.uv.mx/bitstream/12345678/65/1/DanielMCarballoGuerrero.pdf>

9. CASTRO y Col. 2009. Viabilidade dos espermatozoides colhidos do epidídimo de touros 24 horas post-mortem. Resúmenes del Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, Belo Horizonte, Brasil, Pág 379.
10. CHÁVEZ, M. 2008. Comparación en pruebas microscópicas pre-congelación y post descongelación de semen de toros de lidia post mortem. <http://androvvet.blogspot.com/>
11. DERIVAUX, J 1976. Reproducción de los animales domésticos. 2 ed. España: Acribia,. 139-166 p.
12. DUCHENS M., Examen de fertilidad para selección en toros de carne. Web en línea. 1999. Disponible en: URL:[http://www.tecnovet.uchile.cl/CDA/tecnovet\\_articulo/0,1409,SCID%253D9752%2526ISID%253D460,00.html](http://www.tecnovet.uchile.cl/CDA/tecnovet_articulo/0,1409,SCID%253D9752%2526ISID%253D460,00.html)
13. ESCOBAR, C. 2011. Técnicas de congelación y sexado del semen bovino y su importancia en reproducción. [En línea] 11 de julio de 2011. <http://www.docentes.unal.edu.co/cjimeneze/docs/8209.pdf>
14. ECHEVERRY J. 2005, Las Situaciones de Estrés en los Toros: Efectos en la Reproducción. El Cebú N° 331 pág. 52-57
15. FRANCO, J., 2007. Criopreservación de semen tomado del epidídimo, Universidad del Tolima-CGR Biotecnología, Ibagué, Tolima-Colombia
16. GUTIÉRREZ, R., HERNÁNDEZ, P., FERNÁNDEZ, R., Y G., CRUZ, 2004(b). Congelación de espermatozoides obtenidos de colas de epidídimos de bovinos, Vol. 26 No. 3 (2004): 192-196

17. HAFEZ, E., Y B., HAFEZ, 2000. Reproducción e inseminación Artificial en Animales. 7ed. Mexico.McGraw.
18. HAFEZ, E. 1989. Reproducción e inseminación artificial en animales. 5 ed. México: Interamericana - McGraw-Hill, 506-513 .
19. "HOZBOR. F. 2011. Anormalidades Espermáticas de los Espermatozoides"
20. KÖNIG, H., Y H., LIEBICH, 2008, Anatomía de los Animales Domésticos; Órganos, sistema circulatorio y Sistema Nervioso, Tomo 2, 2da Edición, 12va Reimpresión, Editorial Medica Panamericana, Madrid.
21. LÓPEZ, J., 1992. Congelación de semen en la especie ovina: Características biológicas de las dosis descongeladas. España. Universidad Complutense de Madrid Facultad de Veterinaria. p. 7 – 11.
22. LÓPEZ J, 2014. Evaluación del semen bovino. [http://reproduccion-veterinaria.webnode.com.uy/fisiologia-y-anatomia obstétrica/macho/fisiología-reproductiva-del-macho/semen/](http://reproduccion-veterinaria.webnode.com.uy/fisiologia-y-anatomia-obstetrica/macho/fisiologia-reproductiva-del-macho/semen/)
23. MARTINS, C., RUMPF, R., PEREIRA, D., DODE, M., 2007. Cryopreservation of epididymal bovine spermatozoa from dead animals and its uses in vitro.
24. MARTINS, 2009. Recovery, cryopreservation and fertilization potential of bovine spermatozoa obtained from epididymides stored at 5°C by different periods of time. Anim. Reprod. Sc. 116 (2009) 50-57.
25. MORILLO, M; SALAZAR, S; CASTILLO, E. 2012. Evaluación del potencial reproductivo del macho bovino. Maracay, VE, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. 60 p.

- 26.** NOAKES, D., ,2001. Reproducción y Obstetricia Veterinaria, 8va Edición, ELSEVIER, China: 671-694
- 27.** PALOMINO J., Neuroendocrinología reproductiva. Web en línea. 2010. Disponible en: URL:[https://www.ucursos.cl/veterinaria/2010/1/IU28/1/material\\_alumnos/bajar?id\\_material=3154](https://www.ucursos.cl/veterinaria/2010/1/IU28/1/material_alumnos/bajar?id_material=3154)
- 28.** PALACIOS CJ. 2005. Técnicas para la evaluación de la capacidad fecundante de espermatozoides. Memorias posgrado de reproducción bovina CGR Colombia.
- 29.** PEZZONE N., Anatomía del aparato reproductor del toro, 2008, Web en línea. 2008. Disponible en: URL:<http://www.latinpedia.net/Ciencia/animal/Anatomia-del-sistema-reproductor-del-toro-ad200.htm>
- 30.** REYES M, et al., 2002. Characterization and identification of epididymal factors that protect ejaculated bovine sperm during in vitro storage. Biol. Reprod., 66(1):159-166.
- 31.** RODRÍGUEZ, J y COL., 2000. Análisis morfométrico del epidídimo en toros jóvenes mestizos 5/8 Holstein y 5/8 Pardo Suizo con testículos pequeños. Revista científica, FCV-LUZ, Vol 10 (6), 458-467.
- 32.** SALISBURY, 1978. Fisiología de la Reproducción e inseminación artificial de los bovinos. Ed. W.H Freeman and company (USA). 209, 232-236, 250-252, 283 p.
- 33.** SÁNCHEZ Y COL. 2010. Congelación Post-mortem De Semen De Toro Lidiado - [http://www.centrotorolidia.es/opencms\\_wf/opencms/system/modules/es.jcyl.ita.site.torodelidia/elements/galleries/galeria\\_downloads/CONGELACION\\_POSTMORTEM\\_DE\\_SEMEN\\_DE\\_TORO\\_LIDIADO\\_RMCA\\_2010.pdf](http://www.centrotorolidia.es/opencms_wf/opencms/system/modules/es.jcyl.ita.site.torodelidia/elements/galleries/galeria_downloads/CONGELACION_POSTMORTEM_DE_SEMEN_DE_TORO_LIDIADO_RMCA_2010.pdf)

34. SORENSEN, A., 1982. Reproducción Animal; Principios y prácticas. Editorial Mc Graw-Hill. Mexico.
35. SUDHEER S. 2000. Relación entre el tamaño testicular y atributos seminales en toros cruzados. Indian J. Anim. Res., 34(2): 159-160. <http://es.calameo.com/read/0020167632b3a4c052702>
36. SPITZER J. 2000. [http://www.Ivis.Org/advances/Repro\\_Chenoweth/spitzer/chapter\\_frm.asp?](http://www.Ivis.Org/advances/Repro_Chenoweth/spitzer/chapter_frm.asp?)
37. UNAD (UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA)., Módulo de Reproducción Animal. Web en línea. 2005 pág 30-42]. Disponible en: URL:<http://es.scribd.com/doc/23408590/Manualde-reproduccion-animal>
38. VERA C., 2011. Evaluación de la validez de la cría y análisis de semen para predecir la fertilidad del toro. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/>
39. Minitube2013, [http://www.minitubiberica.com/var/StorageMinitube/Datenblaetter/135030200\\_AdroMed\\_es\\_140623.pdf](http://www.minitubiberica.com/var/StorageMinitube/Datenblaetter/135030200_AdroMed_es_140623.pdf)
40. <http://www.minitub-iberica.com/Productos-yServicios/Porcino/Material-de-Laboratorio/Eosina-G-solucion-al-2-para-tincion-supravital-50-ml>
41. <http://androvvet.blogspot.com/>





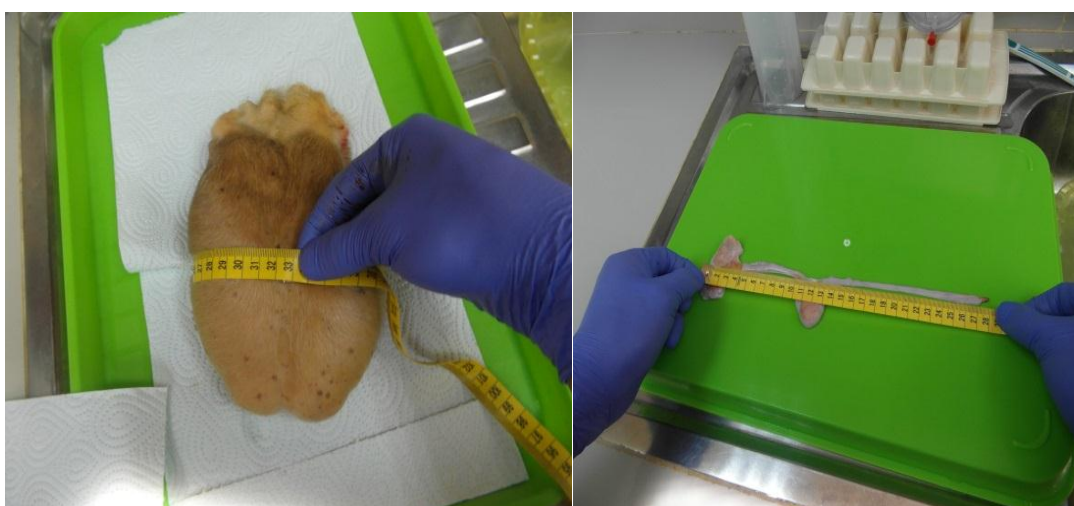


**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA**  
**ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES**  
**CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**9.2. FOTOS DEL TRABAJO DE CAMPO**



**Figura 14.** Transporte de testículos



**Figura 15.** Medición de circunferencia escrotal y de largo de epidídimo.



**Figura 16.** Pesaje de testículos y epidídimos



**Figura 17.** Separación del epidídimo



**Figura 18.** Lavado de epidídimos



**Figura 19.** Epidídimo desmenuzado (slicing)





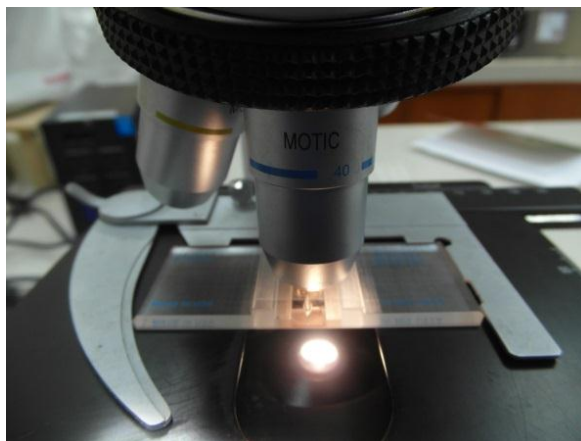
**Figura 9.** Lavado retrógrado



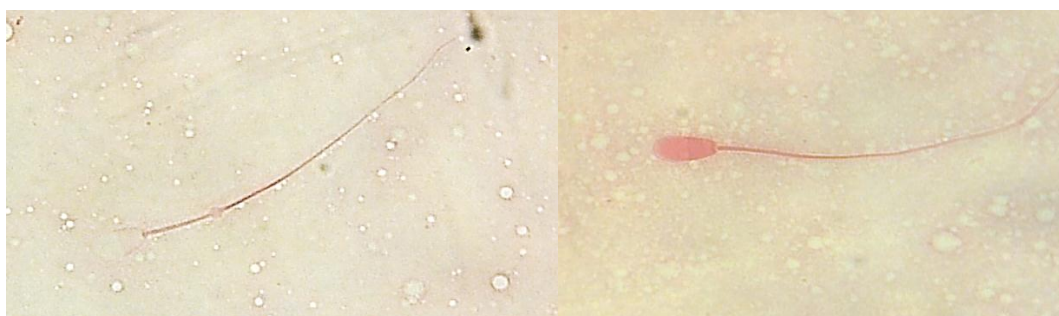
**Figura 21.** Tinción y frotis de placa con eosina 2% y nigrosina 4%



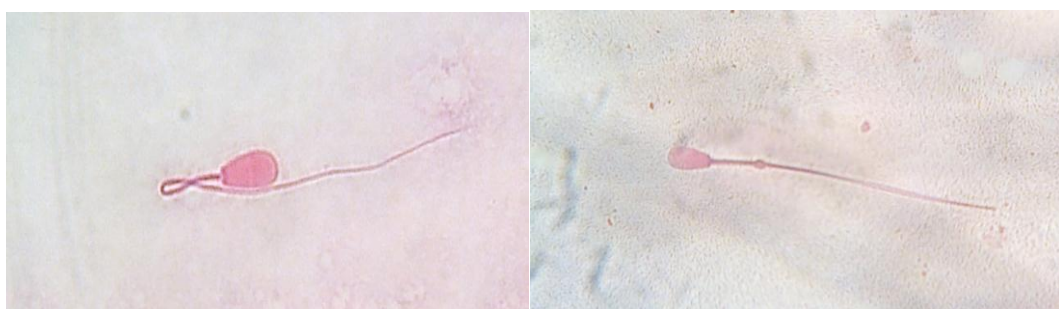
**Figura 22.** Visitas de campo al lugar de investigación



**Figura 23.** Evaluación de la concentración



**Figura 24.** Vitalidad



**Figura 25.** Espermatozoides anormales



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA**  
**ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES**  
**CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**9.3. CUADROS DE RESULTADOS**

**Cuadro 25.** Resultados del estudio de semen obtenido mediante lavado retrógrado

Resultados de la evaluación seminal, obtenido mediante lavado retrógrado de epidídimos en toros post mortem																	
Tiempo	UE	Circunferencia Escrotal (cm.)	Largo testicular (cm.)	Ancho testicular (cm.)	Peso testicular (Kg.)	Peso Epidídimo (gr.)	Largo Epidídimo (cm.)	Volumen (ml.)	Color	Densidad	Olor	M.M %	M.I %	Vivos %	C.E. X 10 <sup>9</sup> /ml	% Espz Anormales	
2 horas post mortem	1	34	12	6,3	1,19	64	17	2	Bl. Am	Cr.Dns	S G	90	80	85	70	8	
	2	33,5	12	6	1,12	62	17,5	1,8	Bl. Am	Cr.Dns	S G	80	70	80	71	5	
	3	34	12,8	6,3	1,18	63	17	2	Bl. Am	Cr.Dns	S G	90	80	90	69	10	
	4	33	11,8	5,8	1,08	61	16	1,5	Bl. Am	Cr.Dns	S G	90	80	90	70	5	
	5	34	12	6	1,2	64	17,5	2	Bl. Am	Cr.Dns	S G	80	70	85	65	9	
4 horas post mortem	6	33,5	11,8	6,5	1,12	62	17,5	1,8	Bl. Am	Cr.Dns	S G	80	70	75	58	12	
	7	32,8	11,5	5,5	1,05	60	16	1,8	Bl. Am	Cr.Dns	S G	80	70	80	70	9	
	8	33,6	12	6	1,14	62	17,5	2,5	Bl. Am	Cr.Dns	S G	70	60	75	72	7	
	9	33	11,5	5,7	1,1	61	16	1,5	Bl. Am	Cr.Dns	S G	70	60	70	65	5	
8 horas post mortem	10	34	12,5	6,5	1,2	64	17,3	2,5	Bl. Am	Cr.Dns	S G	80	70	80	70	8	
	11	33,5	10,5	6	1,2	61	17,5	2	Bl. Am	Cr.Dns	S G	60	50	63	60	9	
	12	34	12	6	1,18	63	17	2	Bl. Marf	Cr.Dns	S G	50	45	61	58	10	
	13	35	12,5	6,5	1,23	65	17	2,5	Bl. Marf	Cr.Dns	S G	60	50	68	48	12	
	14	34	12	6,3	1,2	64	18	2	Bl. Am	Cr.Dns	S G	50	40	65	50	4	
10 horas post mortem	15	33,8	12	5,8	1,19	63	17	2	Bl. Am	Cr.Dns	S G	60	50	60	65	5	
	16	35	12	6,5	1,23	65	18	2,5	Bl. Am	Cr.Dns	S G	50	40	53	48	3	
	17	33	11,5	6	1,1	61	16	1,5	Bl. Marf	Cr.Dns	S G	50	40	54	55	8	
	18	33,5	11	5,3	1,12	62	17,5	2	Bl. Am	Cr.Dns	S G	40	40	45	71	7	
24 horas post mortem	19	33,6	11,8	6,5	1,15	62	16,5	1,8	Bl. Am	Cr.Dns	S G	50	45	53	70	6	
	20	33	11	6,3	1,1	61	17	2	Bl. Am	Cr.Dns	S G	50	40	50	70	9	
	21	34	12	6,8	1,2	64	17	2,5	Bl. Marf	Cr.Dns	S G	40	30	40	65	10	
	22	34,3	12,3	6,5	1,2	64	17,6	2	Bl. Marf	Cr.Dns	S G	40	30	35	68	9	
24 horas post mortem	23	33	11,8	6,5	1,09	61	16	1,8	Bl. Am	Cr.Dns	S G	40	25	30	70	8	
	24	33,5	12,5	6,8	1,12	62	17	2	Bl. Am	Cr.Dns	S G	50	30	30	55	13	
	25	33,8	12,3	6	1,18	63	17	2,5	Bl. Marf	Cr.Dns	S G	40	30	35	68	7	
̄x total		33,7	11,9	6,2	1,2	62,6	17,0	2,0				62	52	62	64	7,92	

**Cuadro 26.** Resultados del estudio de semen obtenido mediante desmenuzamiento del epidídimo

Resultados de la evaluación seminal, obtenido mediante desmenuzamiento del epidídimo en toros post mortem																
Tiempo	UE	Circunferencia Escrotal (cm.)	Largo testicular (cm.)	Ancho testicular (cm.)	Peso testicular (Kg.)	Peso Epidídimo (gr.)	Largo Epidídimo (cm.)	Volumen (ml.)	Color	Densidad	Olor	M.M %	M.I %	Vivos %	C.E. X 10 <sup>9</sup> /ml	% Espz Anormales
2 horas post mortem	1	34	12,5	6	1,2	64	18	2,5	Bl. Am	Cr.Dns	S G	80	70	85	70	9
	2	33,5	11,5	5,3	1,08	63	17,5	2	Bl. Am	Cr.Dns	S G	80	70	75	71	8
	3	34	12	6	1,12	62	17	2	Bl. Am	Cr.Dns	S G	90	80	90	69	11
	4	33	11	5,5	1,18	60	17	1,5	Bl. Am	Cr.Dns	S G	90	80	83	70	10
	5	34,5	12	6	1,2	64	18	2	Bl. Am	Cr.Dns	S G	80	70	80	55	9
4 horas post mortem	6	34	12,3	6,5	1,05	61	17,5	2	Bl. Am	Cr.Dns	S G	70	70	75	58	6
	7	33,5	11,5	5	1,12	63	17	2,5	Bl. Am	Cr.Dns	S G	80	70	73	70	10
	8	33,6	11,5	5,7	1,14	62	17,5	2	Bl.Rojz	Cr.Dns	S G	70	60	70	72	7
	9	33	10,5	5,5	1,1	61	17	1,5	Bl. Am	Cr.Dns	S G	70	60	68	65	9
	10	34	12	6	1,19	64	17,5	2,5	Bl. Am	Cr.Dns	S G	70	60	75	70	8
8 horas post mortem	11	34	12,5	6,3	1,2	64	18	2	Bl. Am	Cr.Dns	S G	60	50	55	60	7
	12	34,5	12,8	6,5	1,18	64	17	2,5	Bl.Marf	Cr.Dns	S G	60	50	60	58	10
	13	35	13	6,5	1,23	65	17	2,3	Bl.Rojz	Cr.Dns	S G	50	40	60	48	12
	14	34	12	6	1,2	64	18	2	Bl.Am	Cr.Dns	S G	50	50	63	50	11
	15	34	12	5,8	1,2	63	17	2	Bl.Am	Cr.Dns	S G	50	40	50	65	13
10 horas post mortem	16	35	12,7	6,5	1,23	65	18	2,5	Bl.Am	Cr.Dns	S G	50	40	53	48	5
	17	33,5	11,5	5,5	1,1	60	17	2	Bl.Marf	Cr.Dns	S G	50	40	55	55	12
	18	33	11	5,3	1,12	62	19	2,5	Bl.Am	Cr.Dns	S G	50	40	45	65	14
	19	33,5	11,8	6	1,15	62	18	2	Bl.Am	Cr.Dns	S G	40	30	43	70	8
	20	35	12,5	6,5	1,1	63	18	2,5	Bl.Am	Cr.Dns	S G	40	30	50	55	10
24 horas post mortem	21	34,5	12	6	1,2	64	18	2,5	Bl.Marf	Cr.Dns	S G	40	30	42	48	10
	22	34	12,5	6,5	1,2	64	17,5	2	Bl.Rojz	Cr.Dns	S G	40	25	35	68	8
	23	33	12	6,5	1,1	64	17	2	Bl.Am	Cr.Dns	S G	40	25	30	70	9
	24	33,5	12,5	6,5	1,12	61	17	2	Bl.Am	Cr.Dns	S G	40	30	28	55	13
	25	34	12,5	6,8	1,18	62	18	2,5	Bl.Marf	Cr.Dns	S G	40	30	35	68	12
$\bar{X}$ total		33,9	12,0	6,0	1,2	62,8	17,5	2,2				59	50	59,1	62,1	9,64

**Cuadro 27.** Estadística descriptiva para circunferencia escrotal y peso testicular.

	<b>Circunferencia Escrotal (cm.)</b>	<b>Peso testicular (Kg.)</b>
Media	33,81	1,1552
Error típico	0,083995	0,007149939
Mediana	34	1,18
Moda	34	1,2
Desviación estándar	0,59	0,050557706
Varianza de la muestra	0,3527551	0,002556082
Curtosis	-0,2656486	-1,11458843
Coefficiente de asimetría	0,3588262	-0,317307356
Rango	2,2	0,18
Mínimo	32,8	1,05
Máximo	35	1,23
Suma	1690,5	57,76
Cuenta	50	50

**Cuadro 28.** Estadística descriptiva para el largo y ancho testicular.

	<b>Largo testicular (cm.)</b>	<b>Ancho testicular (cm.)</b>
Media	11,94	6,10
Error típico	0,079752679	0,061841799
Mediana	12	6
Moda	12	6,5
Desviación estándar	0,563936601	0,44
Varianza de la muestra	0,31802449	0,191220408
Curtosis	0,387708497	-0,406839953
Coefficiente de asimetría	-0,647815307	-0,503690609
Rango	2,5	1,8
Mínimo	10,5	5
Máximo	13	6,8
Suma	597,2	305,1
Cuenta	50	50



**Cuadro 29.** Estadística descriptiva para peso y largo de epidídimo.

Peso Epidídimo (gr.)		Largo Epidídimo (cm.)
Media	62,76	17,28
Error típico	0,20113961	0,089410313
Mediana	63	17,15
Moda	64	17
Desviación estándar	1,42	0,63
Varianza de la muestra	2,022857143	0,399710204
Curtosis	-0,976928198	0,508775491
Coefficiente de asimetría	-0,265577905	-0,161163278
Rango	5	3
Mínimo	60	16
Máximo	65	19
Suma	3138	863,9
Cuenta	50	50

**Cuadro 30.** Análisis de la varianza de las características microscópicas del semen bovino obtenido mediante los dos protocolos en estudio.

➤ **Análisis de varianza para el % de motilidad masal (M.M)**

**Variable N R<sup>2</sup> R<sup>2</sup>Aj CV**  
**M.M 50 0,94 0,92 8,11**

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	13832,00	9	1536,89	64,04	<0,0001
Protocolo	72,00	1	72,00	3,00	0,0910
Tiempo	13752,00	4	3438,00	143,25	<0,0001
Protocolo*Tiempo	8,00	4	2,00	0,08	0,9871
Error	960,00	40	24,00		
Total	14792,00	49			

**Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=2,80048**

Error: 24,0000 gl: 40

Protocolo	Medias	n	E.E.	
1	61,60	25	0,98	A
2	59,20	25	0,98	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=6,25738**

Error: 24,0000 gl: 40

Tiempo	Medias	n	E.E.	
1	85,00	10	1,55	A
2	74,00	10	1,55	B
3	55,00	10	1,55	C
4	47,00	10	1,55	D
5	41,00	10	1,55	E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=10,37280**

Error: 24,0000 gl: 40

Protocolo	Tiempo	Medias	n	E.E.	
1	1	86,00	5	2,19	A
2	1	84,00	5	2,19	A
1	2	76,00	5	2,19	A B
2	2	72,00	5	2,19	B
1	3	56,00	5	2,19	C
2	3	54,00	5	2,19	C
1	4	48,00	5	2,19	C D
2	4	46,00	5	2,19	C D
1	5	42,00	5	2,19	D
2	5	40,00	5	2,19	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

➤ **Análisis de varianza para el % de motilidad individual (M.I)**

Variable N R<sup>2</sup> R<sup>2</sup> Aj CV

M.I 50 0,94 0,93 9,20

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	14630,50	9	1625,61	74,74	<0,0001
Protocolo	60,50	1	60,50	2,78	0,1032
Tiempo	14543,00	4	3635,75	167,16	<0,0001
Protocolo*Tiempo	27,00	4	6,75	0,31	0,8694
Error	870,00	40	21,75		
Total	15500,50	49			

**Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=2,66598**

Error: 21,7500 gl: 40

Protocolo	Medias	n	E.E.	
1	51,80	25	0,93	A
2	49,60	25	0,93	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=5,95685**

Error: 21,7500 gl: 40

Tiempo	Medias	n	E.E.	
1	75,00	10	1,47	A
2	65,00	10	1,47	B
3	46,50	10	1,47	C
4	38,50	10	1,47	D
5	28,50	10	1,47	E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=9,87461**

Error: 21,7500 gl: 40

Protocolo	Tiempo	Medias	n	E.E.	
1	1	76,00	5	2,09	A
2	1	74,00	5	2,09	A B
1	2	66,00	5	2,09	B C
2	2	64,00	5	2,09	C
1	3	47,00	5	2,09	D
2	3	46,00	5	2,09	D
1	4	41,00	5	2,09	D E
2	4	36,00	5	2,09	E F
1	5	29,00	5	2,09	F
2	5	28,00	5	2,09	F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

➤ **Análisis de varianza para el % de espermatozoides vivos (E.V)**

**Variable** N R<sup>2</sup> R<sup>2</sup> Aj CV

**E.V** 50 0,95 0,94 7,37

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	15774,80	9	1752,76	87,95	<0,0001
Protocolo	109,52	1	109,52	5,50	0,0241
Tiempo	15617,60	4	3904,40	195,91	<0,0001
Protocolo*Tiempo	47,68	4	11,92	0,60	0,6661
Error	797,20	40	19,93		
Total	16572,00	49			

**Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=2,55200**

Error: 19,9300 gl: 40

Protocolo	Medias	n	E.E.	
1	62,08	25	0,89	A
2	59,12	25	0,89	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=5,70218**

Error: 19,9300 gl: 40

Tiempo	Medias	n	E.E.	
1	84,30	10	1,41	A
2	74,10	10	1,41	B
3	60,50	10	1,41	C
4	50,10	10	1,41	D
5	34,00	10	1,41	E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=9,45244**

Error: 19,9300 gl: 40

Protocolo	Tiempo	Medias	n	E.E.	
1	1	86,00	5	2,00	A
2	1	82,60	5	2,00	A B
1	2	76,00	5	2,00	B C
2	2	72,20	5	2,00	C D
1	3	63,40	5	2,00	D E
2	3	57,60	5	2,00	E F
1	4	51,00	5	2,00	F
2	4	49,20	5	2,00	F
1	5	34,00	5	2,00	G
2	5	34,00	5	2,00	G

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

➤ **Análisis de varianza para la concentración espermática (C.e)**

Variable N R<sup>2</sup> R<sup>2</sup> Aj CV  
C.e 50 0,32 0,17 11,61

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1010,48	9	112,28	2,09	0,0533
Protocolo	46,08	1	46,08	0,86	0,3595
Tiempo	927,48	4	231,87	4,32	0,0053
Protocolo*Tiempo	36,92	4	9,23	0,17	0,9514
Error	2145,20	40	53,63		
Total	3155,68	49			

**Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=4,18631**

Error: 53,6300 gl: 40

Protocolo	Medias	n	E.E.	
1	64,04	25	1,46	A
2	62,12	25	1,46	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=9,35386**

Error: 53,6300 gl: 40

Tiempo	Medias	n	E.E.	
1	68,00	10	2,32	A
2	67,00	10	2,32	A
5	63,50	10	2,32	A B
4	60,70	10	2,32	A B
3	56,20	10	2,32	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=15,50580**

Error: 53,6300 gl: 40

Protocolo	Tiempo	Medias	n	E.E.	
1	1	69,00	5	3,28	A
2	1	67,00	5	3,28	A
2	2	67,00	5	3,28	A
1	2	67,00	5	3,28	A
1	3	65,20	5	3,28	A
1	3	62,80	5	3,28	A
2	4	61,80	5	3,28	A
2	4	58,60	5	3,28	A
2	5	56,20	5	3,28	A
1	5	56,20	5	3,28	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

➤ **Análisis de varianza para el % de espermatozoides anormales (E.A)**

Variable N R<sup>2</sup> R<sup>2</sup> Aj CV

E.A 50 0,25 0,08 27,83

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	79,78	9	8,86	1,48	0,1869
Protocolo	36,98	1	36,98	6,19	0,0171
Tiempo	24,68	4	6,17	1,03	0,4019
Protocolo*Tiempo	18,12	4	4,53	0,76	0,5583
Error	238,80	40	5,97		
Total	318,58	49			

**Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=1,39674**

Error: 5,9700 gl: 40

Protocolo	Medias	n	E.E.	
2	9,64	25	0,49	A
1	7,92	25	0,49	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=3,12086**

Error: 5,9700 gl: 40

Tiempo	Medias	n	E.E.	
5	9,90	10	0,77	A
3	9,30	10	0,77	A
1	8,40	10	0,77	A
4	8,20	10	0,77	A
2	8,10	10	0,77	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=5,17342**

Error: 5,9700 gl: 40

Protocolo	Tiempo	Medias	n	E.E.	
2	3	10,60	5	1,09	A
2	5	10,40	5	1,09	A
2	4	9,80	5	1,09	A
1	5	9,40	5	1,09	A
2	1	9,40	5	1,09	A
1	2	8,20	5	1,09	A
1	3	8,00	5	1,09	A
2	2	8,00	5	1,09	A
1	1	7,40	5	1,09	A
1	4	6,60	5	1,09	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Cuadro 31.** Porcentajes de M.I post refrigeración, cada 24h (protocolo 1)

Horas de colecta post mortem	UE	Tiempos de evaluación de MI post refrigeración				
		24h	48h	72h	96h	120h
2 horas post mortem	1	75	60	50	40	30
	2	65	50	40	30	20
	3	70	60	50	45	30
	4	75	65	50	40	30
	5	60	50	40	30	20
4 horas post mortem	6	60	50	40	30	20
	7	60	50	40	35	20
	8	50	40	30	20	0
	9	50	40	30	25	0
	10	55	45	30	0	0
8 horas post mortem	11	40	30	0	0	0
	12	35	20	0	0	0
	13	40	30	0	0	0
	14	30	0	0	0	0
	15	40	30	0	0	0
10 horas post mortem	16	20	0	0	0	0
	17	25	0	0	0	0
	18	30	0	0	0	0
	19	30	0	0	0	0
	20	20	0	0	0	0
24 horas post mortem	21	0	0	0	0	0
	22	0	0	0	0	0
	23	0	0	0	0	0
	24	0	0	0	0	0
	25	0	0	0	0	0

**Cuadro 32.** Porcentaje de M.I post refrigeración cada 24h, protocolo 2.

Horas de colecta post mortem	UE	Tiempos de evaluación post refrigeración				
		24h	48h	72h	96h	120h
2 horas post mortem	1	60	50	40	30	20
	2	60	50	40	30	20
	3	70	55	45	30	20
	4	70	55	40	30	20
	5	60	50	40	30	20
4 horas post mortem	6	60	50	40	30	0
	7	60	50	40	30	0
	8	50	40	30	20	0

	9	50	40	30	0	0
	10	50	40	20	0	0
8 horas post mortem	11	40	30	0	0	0
	12	40	30	0	0	0
	13	35	0	0	0	0
	14	40	30	0	0	0
	15	30	0	0	0	0
10 horas post mortem	16	30	0	0	0	0
	17	30	0	0	0	0
	18	30	0	0	0	0
	19	20	0	0	0	0
	20	20	0	0	0	0
24 horas post mortem	21	0	0	0	0	0
	22	0	0	0	0	0
	23	0	0	0	0	0
	24	0	0	0	0	0
	25	0	0	0	0	0

**Cuadro 33.** Análisis de la varianza de la Motilidad Individual post refrigeración cada 24 horas

➤ **Análisis de varianza post refrigeración a las 24 horas**

**Variable** N R<sup>2</sup> R<sup>2</sup> Aj CV  
**24h** 50 0,97 0,96 12,85

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	26840,50	9	2982,28	134,03	<0,0001
Protocolo	12,50	1	12,50	0,56	0,4579
Tiempo	26773,00	4	6693,25	300,82	<0,0001
Protocolo*Tiempo	55,00	4	13,75	0,62	0,6523
Error	890,00	40	22,25		
Total	27730,50	49			

**Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=2,69645**

Error: 22,2500 gl: 40

Protocolo	Medias	n	E.E.	
1	37,20	25	0,94	A
2	36,20	25	0,94	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )



**Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=6,02493**

Error: 22,2500 gl: 40

Tiempo	Medias	n	E.E.	
1	66,50	10	1,49	A
2	54,50	10	1,49	B
3	37,00	10	1,49	C
4	25,50	10	1,49	D
5	0,00	10	1,49	E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=9,98747**

Error: 22,2500 gl: 40

Protocolo	Tiempo	Medias	n	E.E.	
1	1	69,00	5	2,11	A
2	1	64,00	5	2,11	A B
1	2	55,00	5	2,11	B C
2	2	54,00	5	2,11	C
1	3	37,00	5	2,11	D
2	3	37,00	5	2,11	D
2	4	26,00	5	2,11	E
1	4	25,00	5	2,11	E
1	5	0,00	5	2,11	F
2	5	0,00	5	2,11	F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

➤ **Análisis de varianza post refrigeración a las 48 horas**

Variable N R<sup>2</sup> R<sup>2</sup> Aj CV  
48h 50 0,92 0,90 31,09

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	25288,00	9	2809,78	51,32	<0,0001
Protocolo	50,00	1	50,00	0,91	0,3450
Tiempo	25183,00	4	6295,75	114,99	<0,0001
Protocolo*Tiempo	55,00	4	13,75	0,25	0,9073
Error	2190,00	40	54,75		
Total	27478,00	49			

**Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=4,22980**

Error: 54,7500 gl: 40

Protocolo	Medias	n	E.E.	
1	24,80	25	1,48	A
2	22,80	25	1,48	A

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )*

**Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=9,45103**

Error: 54,7500 gl: 40

Tiempo	Medias	n	E.E.	
1	54,50	10	2,34	A
2	44,50	10	2,34	B
3	20,00	10	2,34	C
5	0,00	10	2,34	D
4	0,00	10	2,34	D

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )*

**Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=15,66687**

Error: 54,7500 gl: 40

Protocolo	Tiempo	Medias	n	E.E.	
1	1	57,00	5	3,31	A
2	1	52,00	5	3,31	A
1	2	45,00	5	3,31	A
2	2	44,00	5	3,31	A
1	3	22,00	5	3,31	B
2	3	18,00	5	3,31	B
2	4	0,00	5	3,31	C
2	5	0,00	5	3,31	C
1	5	0,00	5	3,31	C
1	4	0,00	5	3,31	C

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )*

➤ **Análisis de varianza post refrigeración a las 72 horas**

**Variable** N R<sup>2</sup> R<sup>2</sup> Aj CV  
**72h** 50 0,97 0,96 24,01

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	18180,50	9	2020,06	149,63	<0,0001
Protocolo	24,50	1	24,50	1,81	0,1855
Tiempo	18108,00	4	4527,00	335,33	<0,0001
Protocolo*Tiempo	48,00	4	12,00	0,89	0,4794
Error	540,00	40	13,50		
Total	18720,50	49			

**Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=2,10036**

Error: 13,5000 gl: 40

Protocolo	Medias	n	E.E.	
1	16,00	25	0,73	A
2	14,60	25	0,73	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=4,69304**

Error: 13,5000 gl: 40

Tiempo	Medias	n	E.E.	
1	43,50	10	1,16	A
2	33,00	10	1,16	B
3	0,00	10	1,16	C
5	0,00	10	1,16	C
4	0,00	10	1,16	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=7,77960**

Error: 13,5000 gl: 40

Protocolo	Tiempo	Medias	n	E.E.	
1	1	46,00	5	1,64	A
2	1	41,00	5	1,64	A B
1	2	34,00	5	1,64	B C
2	2	32,00	5	1,64	C
2	3	0,00	5	1,64	D
2	5	0,00	5	1,64	D
2	4	0,00	5	1,64	D
1	3	0,00	5	1,64	D
1	5	0,00	5	1,64	D
1	4	0,00	5	1,64	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

➤ **Análisis de varianza post refrigeración a las 96 horas**

**Variable** N R<sup>2</sup> R<sup>2</sup> Aj CV  
**96h** 50 0,84 0,80 64,42

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	9532,50	9	1059,17	23,15	<0,0001
Protocolo	84,50	1	84,50	1,85	0,1817
Tiempo	9320,00	4	2330,00	50,93	<0,0001
Protocolo*Tiempo	128,00	4	32,00	0,70	0,5969
Error	1830,00	40	45,75		
Total	11362,50	49			

**Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=3,86654**

Error: 45,7500 gl: 40

Protocolo	Medias	n	E.E.	
1	11,80	25	1,35	A
2	9,20	25	1,35	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=8,63938**

Error: 45,7500 gl: 40

Tiempo	Medias	n	E.E.	
1	33,50	10	2,14	A
2	19,00	10	2,14	B
5	0,00	10	2,14	C
4	0,00	10	2,14	C
3	0,00	10	2,14	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=14,32141**

Error: 45,7500 gl: 40

Protocolo	Tiempo	Medias	n	E.E.	
1	1	37,00	5	3,02	A
2	1	30,00	5	3,02	A
1	2	22,00	5	3,02	B
2	2	16,00	5	3,02	B
2	3	0,00	5	3,02	B
2	4	0,00	5	3,02	C
2	5	0,00	5	3,02	C
1	3	0,00	5	3,02	C
1	4	0,00	5	3,02	C
1	5	0,00	5	3,02	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

➤ **Análisis de varianza post refrigeración a las 120 horas**

**Variable** N R<sup>2</sup> R<sup>2</sup> Aj CV  
**120h** 50 0,88 0,85 71,72

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	4242,00	9	471,33	31,42	<0,0001
Protocolo	98,00	1	98,00	6,53	0,0145
Tiempo	3992,00	4	998,00	66,53	<0,0001
Protocolo*Tiempo	152,00	4	38,00	2,53	0,0551
Error	600,00	40	15,00		
Total	4842,00	49			

**Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=2,21398**

Error: 15,0000 gl: 40

Protocolo	Medias	n	E.E.	
1	6,80	25	0,77	A
2	4,00	25	0,77	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=4,94690**

Error: 15,0000 gl: 40

Tiempo	Medias	n	E.E.	
1	23,00	10	1,22	A
2	4,00	10	1,22	B
4	0,00	10	1,22	B
3	0,00	10	1,22	B
5	0,00	10	1,22	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=8,20042**

Error: 15,0000 gl: 40

Protocolo	Tiempo	Medias	n	E.E.	
1	1	26,00	5	1,73	A
2	1	20,00	5	1,73	A
1	2	8,00	5	1,73	B
2	3	0,00	5	1,73	B
2	4	0,00	5	1,73	B
2	2	0,00	5	1,73	B
2	5	0,00	5	1,73	B
1	3	0,00	5	1,73	B
1	4	0,00	5	1,73	B
1	5	0,00	5	1,73	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

