



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
SEDE MORONA SANTIAGO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
CARRERA ZOOTECNIA

**“EVALUACIÓN DE 3 PROTOCOLOS DE CRIOCONSERVACIÓN
DE SEMEN EQUINO ANGLO ÁRABE Y PURA SANGRE INGLÉS
(PSI) EN LA ESTACIÓN EXPERIMENTAL TUNSHI DE LA
ESPOCH”**

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERO ZOOTECNISTA

AUTOR:

LUIS ADRIAN LEÓN PABAÑA

Macas – Ecuador

2023



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
SEDE MORONA SANTIAGO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
CARRERA ZOOTECNIA

**“EVALUACIÓN DE 3 PROTOCOLOS DE CRIOCONSERVACIÓN
DE SEMEN EQUINO ANGLO ÁRABE Y PURA SANGRE INGLÉS
(PSI) EN LA ESTACIÓN EXPERIMENTAL TUNSHI DE LA
ESPOCH”**

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERO ZOOTECNISTA

AUTOR: LUIS ADRIAN LEÓN PABAÑA

DIRECTOR: Ing. CARLOS ANDRÉS MANCHENO HERRERA Mgs.

Macas – Ecuador

2023

© 2023, Luis Adrián León Pabaña

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

Yo, Luis Adrián León Pabaña, declaro que el presente Trabajo de Integración Curricular es de nuestra autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autor asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este Trabajo de Integración Curricular; el patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Macas, 28 de noviembre del 2023.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Luis Adrián León Pabaña', with a long horizontal stroke extending to the right.

Luis Adrián León Pabaña

C.C.: 140125504-5

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO SEDE MORONA
SANTIAGO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
CARRERA ZOOTECNIA**

El Tribunal del Trabajo de Integración Curricular certifica que: El Trabajo de Integración Curricular; Tipo: Proyecto de Investigación , “**EVALUACIÓN DE 3 PROTOCOLOS DE CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN EQUINO ANGLO ÁRABE Y PURA SANGRE INGLÉS (PSI) EN LA ESTACIÓN EXPERIMENTAL TUNSHI DE LA ESPOCH**”, realizado por el señor: **LUIS ADRIAN LEÓN PABAÑA**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Integración Curricular, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

	FIRMA	FECHA
Ing. Geovanny Marco Soldado Soldado Mgs. PRESIDENTE DEL TRIBUNAL		2023 – 11 – 28
Ing. Carlos Andrés Mancheno Herrera Mgs. DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR		2023 – 11 – 28
Ing. Luis Alfonso Cóndo Plaza PhD. ASESOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR		2023 – 11 – 28

DEDICATORIA

La presente investigación quiero dedicarle a mi madre ROSA MARIA PABAÑA QUIZHPI y a mi padre LUIS GILBERTO LEON CARCHIPULLA por todo el apoyo que me dieron en toda mi trayectoria Universitaria, a mis hermanos CRISTIAN, CRISTINA, ANA, JACKELINE, ELIZABHET por ser un eje emocional enseñándome muchos valores que me hicieron una persona de bien, a mis cuñados DIEGO, FRANCISCO, DANIELA que son mi motivación de todos los días.

Adrian

AGRADECIMIENTO

Mis agradecimientos son para Dios por regalarme la vida y a la virgen Purísima de Macas por ser esa luz que me llevo por el camino del bien junto a familia han sido mi fortaleza a lo largo de mi preparación profesional, todos ellos confiaron y creyeron en mi dándome todas las herramientas necesarias para salir adelante.

Expreso mis agradecimientos a los profesionales de la Estación Experimental Tunshi por ayudarme con técnicas y equipos necesarias para mi trabajo de campo.

Agradezco al Ing. Andrés Mancheno e Ing. Luis Cóndo por todo el tiempo que dedicaron para guiarme en mi trabajo de titulación, quienes con su experiencia y conocimientos me supieron corregir, enseñar lo necesario en este desarrollo investigativo.

Adrian

INDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xii
RESUMEN.....	xiii
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I.....	3
1. DIAGNÓSTICO DEL PROBLEMA.....	3
1.1. Planteamiento del problema.....	3
1.2. Objetivos	4
1.2.1. Objetivo general	4
1.2.2. Objetivos específicos	4
1.3. Justificación	4
CAPÍTULO II	5
2. MARCO TEÓRICO	5
2.1. Generalidades de los equinos	5
2.1.1. <i>Razas de equinos</i>	<i>6</i>
2.1.1.1. <i>Pura sangre inglés (PSI).....</i>	<i>6</i>
2.1.1.2. <i>Pura sangre Anglo-árabe.....</i>	<i>7</i>
2.1.2. <i>Reproducción del equino</i>	<i>8</i>
2.1.2.1. <i>Sistema endocrino del equino</i>	<i>8</i>
2.1.2.2. <i>Sistema reproductor del caballo</i>	<i>10</i>
2.1.2.3. <i>Tipos de reproducción.....</i>	<i>13</i>
2.1.3. <i>Espermatogénesis</i>	<i>15</i>
2.1.3.1. <i>Espermatogonias.....</i>	<i>15</i>
2.1.3.2. <i>Gonadotropinas hipofisarias</i>	<i>15</i>
2.1.3.3. <i>Andrógenos</i>	<i>15</i>
2.1.3.4. <i>Fases de la espermatogénesis</i>	<i>16</i>
2.1.3.5. <i>Endocrinología reproductiva del macho.....</i>	<i>17</i>
2.1.4. <i>Semen equino</i>	<i>17</i>
2.1.4.1. <i>Espermatozoide equino</i>	<i>18</i>
2.1.4.2. <i>Anatomía y fisiología del espermatozoide</i>	<i>18</i>

2.1.5.	<i>Extracción de semen</i>	19
2.1.5.1.	<i>Vagina artificial</i>	19
2.1.6.	<i>Valoración de muestras seminales</i>	20
2.1.7.	<i>Tratamiento del semen equino</i>	21
2.1.7.1.	<i>Semen fresco</i>	21
2.1.7.2.	<i>Semen refrigerado</i>	22
2.1.7.3.	<i>Semen congelado</i>	23
2.1.8.	<i>Crioconservación</i>	23
2.1.8.1.	<i>Extracción del semen</i>	23
2.1.8.2.	<i>Centrifugado</i>	23
2.1.8.3.	<i>Crioprotectores</i>	24
2.1.8.4.	<i>Refrigeración</i>	25
2.1.8.5.	<i>Congelación</i>	25
2.1.8.6.	<i>Descongelación</i>	26
2.1.9.	<i>Factores que afectan la crioconservación del semen</i>	26
2.1.9.1.	<i>Choque térmico</i>	26
2.1.9.2.	<i>Centrifugación</i>	27
2.1.9.3.	<i>Diluyentes</i>	27
2.1.10.	<i>Alteraciones del semen por crioconservación</i>	27
2.1.10.1.	<i>Membrana plasmática del espermatozoide equino</i>	28
 CAPITULO III		 30
3.	MARCO METODOLÓGICO	30
3.1.	Localización y duración del experimento	30
3.2.	Materiales, equipos e instalaciones	30
3.2.1.	<i>Materiales de campo</i>	30
3.2.2.	<i>Materiales de laboratorio</i>	31
3.2.3.	<i>Equipos de laboratorio</i>	31
3.2.4.	<i>Reactivos</i>	32
3.2.5.	<i>Instalaciones</i>	32
3.3.	Unidades experimentales	32
3.4.	Mediciones experimentales	32
3.4.1.	<i>Pre-congelacion (semen fresco)</i>	32
3.4.2.	<i>Post- Congelación (Semen descongelado)</i>	32
3.5.	Técnicas estadísticas	33
3.6.	Diseño experimental	33

3.6.1.	<i>Colecta y evaluación de semen fresco</i>	33
3.6.2.	<i>Evaluación de semen post congelación</i>	33
3.6.3.	<i>Esquema del Experimento (semen fresco)</i>	34
3.6.4.	<i>Esquema del Experimento (semen post-congelación)</i>	35
3.6.5.	<i>Esquema del ADEVA pre-congelación</i>	35
3.6.6.	<i>Esquema del ADEVA post-congelación</i>	36
3.7.	Procedimiento experimental	36
3.8.	Metodología de la evaluación	37
3.8.1.	<i>Pre-congelación (semen fresco)</i>	37
3.8.1.1.	<i>Volumen de eyaculado (ml)</i>	37
3.8.1.2.	<i>pH</i>	38
3.8.1.3.	<i>Concentración espermática (spz/ml)</i>	38
3.8.1.4.	<i>Motilidad masal (%)</i>	38
3.8.1.5.	<i>Motilidad individual (%)</i>	38
3.8.2.	Post- Congelación (Semen descongelado)	38
3.8.2.1.	<i>Motilidad individual (%)</i>	38
3.8.2.2.	<i>Morfoanomalias</i>	39
3.8.2.3.	<i>Integridad de la membrana plasmática (%)</i>	39
CAPITULO IV		40
4. MARCO DE ANALISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS		40
4.1	Pre-congelación de semen (semen fresco)	40
4.1.1	<i>Volumen del eyaculado (ml)</i>	40
4.1.2	<i>pH</i>	41
4.1.3	<i>Concentración espermática (spz/ml)</i>	42
4.1.4	<i>Motilidad masal (escala 1-5)</i>	43
4.1.5	<i>Motilidad individual (%)</i>	44
4.2	Semen post-congelacin (semen descongelado)	45
4.2.1	<i>Motilidad individual (%)</i>	45
4.2.2	<i>Morfoanomalias (%)</i>	46
4.2.3	<i>Integridad de la membrana espermática (%)</i>	47
4.2.4	<i>Costo de la biotecnología</i>	48
CONCLUSIONES		50
RECOMENDACIONES		51
GLOSARIO		
BIBLIOGRAFÍA		

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-2:	Taxonomía de los caballos	5
Tabla 2-2:	Parámetros de semen equino fresco.....	21
Tabla 1-3:	Condiciones meteorológicas del cantón Riobamba.....	30
Tabla 2-3:	Esquema del experimento (semen fresco)	34
Tabla 3-3:	Esquema del experimento (semen post-congelación).....	34
Tabla 4-3:	Esquema del ADEVA pre-congelación	35
Tabla 5-3:	Esquema del ADEVA post-congelación	35
Tabla 1-4:	Tabla de resumen de los resultados obtenidos en las variables	40
Tabla 2-4:	Tabla de resumen de los resultados obtenidos en las variables	45
Tabla 3-4:	Materiales e insumo utilizados	49

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1-2: Raza de caballo pura sangre inglés	7
Ilustración 2-2: Raza de caballo angloárabe.....	8
Ilustración 3-2: Sistema endocrino de equino (caballo y yegua).....	10
Ilustración 4-2: Sistema reproductor del caballo.....	13
Ilustración 5-2: Monta natural del equino	14
Ilustración 6-2: Inseminación artificial	14
Ilustración 7-2: Tipos celulares del epitelio germinativo (ratón).....	16
Ilustración 8-2: Endocrinología reproductiva del caballo	17
Ilustración 9-2: Anatomía del espermatozoide equino.....	19
Ilustración 10-2: Vaginas artificiales para equinos	20
Ilustración 11-2: Curva de congelamiento convencional del semen	26
Ilustración 1-4: Volumen del eyaculado (ml).....	41
Ilustración 2-4: pH	42
Ilustración 3-4: Concentración espermática (spz/ml).....	43
Ilustración 4-4: Motilidad masal (escala 1-5).....	44
Ilustración 5-4: Motilidad individual (%)	45
Ilustración 6-4: Motilidad individual (%)	46
Ilustración 7-4: Morfoanomalías (%).....	47
Ilustración 8-4: Integridad de la membrana espermática (%)	48

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A: VISITA DE LOS EQUINOS EN LA ESTACIÓN EXPERIMENTAL TUNSHI DE LA ESPOCH

ANEXO B: DESPARASITANTE Y MULTIVITAMÍNICO UTILIZADO EN LA PREPARACIÓN DE LOS EQUINOS

ANEXO C: EQUINO ANGLO ÁRABE DE ESTACIÓN EXPERIMENTAL TUNSHI DE LA ESPOCH

ANEXO D: EQUINO PURA SANGRE INGLES DE LA ESTACIÓN EXPERIMENTAL TUNSHI DE LA ESPOCH

ANEXO E: VAGINA ARTIFICIAL EQUINA UTILIZADA PARA LA EXTRACCIÓN DE SEMEN

ANEXO F: PREPARACIÓN DEL DILUYENTE (CRIORAMP) Y EQUIPOS PARA EL ANÁLISIS DE SEMEN FRESCO

ANEXO G: ESTIMULACIÓN DE LA LIBIDO DEL MACHO

ANEXO H: DESVIACIÓN E INTRODUCCIÓN DEL PENE EQUINO EN LA VAGINA ARTIFICIAL

ANEXO I: TUBO COLECTOR DE SEMEN SELLADO CON PAPEL ALUMINIO

ANEXO J: ANÁLISIS DE SEMEN FRESCO

ANEXO K: DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA

ANEXO L: CÁMARA NEUBAUER UTILIZADA EN EL CONTEO ESPERMÁTICO

ANEXO M: PREPARACIÓN DEL DILUYENTE PARA LA CENTRIFUGACIÓN

ANEXO N: CENTRIFUGACIÓN DE LA MUESTRA DE SEMEN FRESCO

ANEXO Ñ: SEMEN CENTRIFUGADO Y LISTO PARA EMPAJILLAR

ANEXO O: EMPAJILLADO Y SELLADO DE LAS PAJUELA

ANEXO P: APLICACIÓN DE CURVAS DE CONGELACIÓN PARA LA POSTERIOR CRIOCONSERVACIÓN

ANEXO Q: CONSERVACIÓN DE LAS PAJUELAS EN TANQUE DE NITRÓGENO LÍQUIDO

RESUMEN

Esta investigación buscó evaluar tres protocolos de crioconservación de semen equino en las razas Anglo Árabe y Pura Sangre Inglés en la Estación Experimental Tunshi de la ESPOCH. Los protocolos variaron en tiempos y fuerzas G en la centrifugación previa a la crioconservación (15min - 2000 RPM; 20min - 1500 RPM; 25min-1000 RPM). Se emplearon los diluyentes comerciales RAMP PLUS para la centrifugación y CRIO RAMP para la crioconservación según las recomendaciones del fabricante. La evaluación incluyó características del semen fresco y post congelación para determinar la eficiencia de cada tratamiento. Utilizando una curva de congelación, el semen se enfrió a 4 grados Celsius durante 4 horas y luego se congeló en vapor de nitrógeno líquido durante 10 minutos. Se evaluaron 10 unidades experimentales por tratamiento y raza, totalizando 180 unidades experimentales en tres extracciones de semen. Los resultados del semen fresco se analizaron con un diseño de bloques completos al azar, asignando cada bloque a los machos utilizados. Para el semen post congelación, se aplicó un diseño completamente al azar con arreglo combinatorio de factores, siendo el factor A los tiempos y fuerzas G en la centrifugación y el factor B la línea genética equina. La interpretación de resultados se realizó con el software estadístico InfoStat versión 2021, utilizando análisis de estadística descriptiva, ADEVA y separación de medias. Los mejores resultados se observaron con el T3 (25min - 1000 RPM), con una motilidad individual del 61,75% y una integridad de la membrana espermática del 50,07%. Se concluyó que el protocolo más eficaz para la crioconservación de semen equino es el T3, desaconsejando el T1 (15min - 2000 RPM) debido a sus resultados más bajos en motilidad e integridad de la membrana espermática.

Palabras clave: <CRIOCONSERVACIÓN>, <SEMEN>, <EQUINO>, <CENTRIFUGACIÓN>, <POST CONGELACIÓN>.



15-12-2023
2229-DBRA-UPT-2023

ABSTRACT

This research sought to evaluate three protocols for cryopreservation of equine semen in Anglo Arabian and English Thoroughbred breeds at the Tunshi Experimental Station of ESPOCH. The protocols varied in times and G-forces in the centrifugation prior to cryopreservation (15min - 2000 RPM; 20min - 1500 RPM; 25min-1000 RPM). Commercial diluents RAMP PLUS for centrifugation and CRIO RAMP for cryopreservation were used according to the manufacturer's recommendations. The evaluation included fresh and post-freezing semen characteristics to determine the efficiency of each treatment. Using a freezing curve, semen was cooled to 4 degrees Celsius for 4 hours and then frozen in liquid nitrogen vapor for 10 minutes. Ten experimental units per treatment and breed were evaluated, totaling 180 experimental units in three semen extractions. The results of fresh semen were analyzed with a randomized complete block design, assigning each block to the males used. For post-freezing semen, a completely randomized design with a combinatorial arrangement of factors was applied, with factor A being the times and G forces in the centrifugation and factor B the equine genetic line. The interpretation of results was performed with the statistical software InfoStat version 2021, using descriptive statistics analysis, ADEVA and separation of means. The best results were observed with T3 (25min - 1000 RPM), with an individual motility of 61.75% and sperm membrane integrity of 50.07%. It was concluded that the most effective protocol for equine semen cryopreservation is T3, discouraging T1 (15min - 2000 RPM) due to its lower results in motility and sperm membrane integrity.

Key words: <CRYOCONSERVATION>, <SEMEN>, <EQUINE>, <CENTRIFUGATION>, <POST-FREEZE>.


Silvia Elizabeth Cárdenas Sánchez
C.I. 0603927351

INTRODUCCIÓN

Los equinos han sido constituidos desde la antigüedad como una de las especies que reflejan riqueza y poder en las distintas civilizaciones siendo una especie que ha tenido grandes representaciones a lo largo de la Historia. En la actualidad se han utilizado para varios campos por su fuerza, resistencia y docilidad siendo la única especie de monta representante en los 5 continentes, por sus grandes características han conseguido un espacio dentro del campo genético y reproductivo ganando tamaño, desarrollo muscular y óseo.

Hoy en día la extracción de semen es la técnica más utilizada para conservar las características de los equinos porque permite aprovechar de una mejor manera el material genético (semen) recolectado del macho, lo que nos da un mayor número de hembras preñadas por año siendo esta la más eficiente por su costo y rentabilidad, además, permite el control y prevención de enfermedades venéreas que se pueden transmitir de macho a hembra o viceversa y a una mayor capacidad de cruzamiento de razas teniendo la posibilidad de fertilizar en cualquier momento del año.

El método más utilizado para la recolección del semen equino es a través de una vagina artificial que simula las condiciones de una vagina equina manteniendo ciertas características importantes como la lubricación, humedad y presión que facilita su recolección. El semen recolectado es sometido a procesos de refrigeración y/o congelación. Se ha determinado que el porcentaje de supervivencia en la centrifugación y crioconservación de los espermatozoides varía dependiendo de la calidad de semen que tenga el caballo, se tiene datos de que el 20% de los equinos producen un semen de excelente calidad que no presenta problemas al momento de la congelación, un 60% de manera admisible y el 20% tienen una mala congelación.

Por esta razón, la presente investigación evaluó la eficiencia de 3 protocolos de centrifugación utilizando diferentes tiempos y fuerzas G (15min a 2000 RPM; 20min a 1500 RPM y 25min a 1000 RPM) para la posterior congelación de semen equino con la finalidad de determinar el protocolo que cause menor daño a la membrana espermática, dándole mayor resistencia al momento de la crioconservación y en especial en la descongelación. Se realizaron 3 extracciones de semen a 2 reproductores equinos (Anglo Árabe y Pura Sangre Inglés) en la estación experimental Tunshi de la ESPOCH y se evaluaron 10 pajuelas por cada tratamiento y por extracción teniendo un total de 180 unidades experimentales evaluadas.

En el primer capítulo de este trabajo de integración curricular se expone el planteamiento del problema, la justificación y los objetivos del investigador mediante una valoración previa del entorno donde se desarrolla la vida de los animales.

En el capítulo segundo, se ubica el Marco Teórico, que recoge definiciones, conceptos y estados del arte que le dieron al investigador directrices precisas de los temas abordados en la investigación a través de la revisión, registro, análisis y sistematización de documentos físicos y electrónicos.

En el tercer capítulo, se presenta la metodología de la investigación, tipo, enfoque, técnicas e instrumentos de investigación, se establece también la población y muestra de estudio, y, el procedimiento de evaluación.

En el capítulo cuarto, se muestran los resultados obtenidos a partir de la metodología planteada y finalmente se presentan las conclusiones y recomendaciones de la investigación.

CAPÍTULO I

1. DIAGNÓSTICO DEL PROBLEMA

1.1. Planteamiento del problema

Ullauri et al. (2020) menciona que la utilización de semen congelado en la reproducción equina ha tomado mayor relevancia en el mejoramiento genético porque permite conservar las características de los espermatozoides y pueden ser utilizados en tiempos indefinidos. Actualmente se realiza la extracción de semen por varios métodos, pero el más eficiente es el uso de una vagina artificial, manteniendo las condiciones que se dan naturalmente en la vagina equina como son: lubricación, la temperatura y presión, siendo esencial mantener las características del semen para ser utilizados con diferentes métodos de conservación. (Varela et al., 2018, p 44)

El porcentaje de supervivencia en la centrifugación y crioconservación de los espermatozoides varía dependiendo de la calidad de semen que tenga el caballo, se tiene registros de que el 20% de los equinos producen un semen de excelente calidad que no presenta problemas al momento de la congelación, un 60% de manera admisible y el 20% tienen una mala congelación, esto debido a que no existe una buena relación colesterol fosfolípidos en la membrana de la cabeza del espermatozoide lo que provoca que genere una cristalización que desencadena una alta mortalidad en la crio preservación, por lo que utilizar diluyentes comerciales mejoran estas características crio protectoras dándole la resistencia adecuada. (Dalal, et al., 2018, p 25).

Por esta razón, la presente investigación evaluó la eficiencia de 3 protocolos de crioconservación de semen equino al utilizar 3 diferentes tiempos y fuerzas G (15min-2000RPM; 20min-1500RPM Y 25min-1000RPM) en la centrifugación del material seminal antes de su congelación para de esta manera establecer el protocolo que ocasione menor daño a la célula espermática tanto en la crioconservación, así como en su posterior descongelación. De esta manera se logrará aprovechar al máximo el material genético obtenido de las diferentes extracciones, teniendo características de fertilidad mayores y comparación a las que actualmente se manejan en la reproducción equina.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

Evaluar tres protocolos de crioconservación de semen equino Anglo Árabe y Pura sangre Ingles (PSI) en la estación experimental Tunshi de la ESPOCH

1.2.2. Objetivos específicos

- Utilizar 3 diferentes tiempos y fuerzas G en la centrifugación de semen equino para su crioconservación (15min-2000 RPM; 20min- 1500 RPM; 25min- 1000 RPM)
- Analizar el protocolo más eficiente evaluando la integridad de la membrana espermática de semen equino post congelación.
- Determinar los costos de la Biotecnología aplicada.

1.3. Justificación

La utilización de crio protectores en la centrifugación y crioconservación del semen se ha empleado desde hace varios años atrás, la mayoría de estos no han garantizado un alto porcentaje de supervivencia de los espermatozoides a este procedimiento. Uno de los principales problemas que se presentan en la crioconservación es el daño de la membrana espermática al congelar con nitrógeno líquido, por lo que no se obtiene un buen porcentaje de células espermáticas vivas o viables al momento de usarlas en biotecnologías como la Inseminación Artificial o Inseminación Artificial a tiempo fijo, en este sentido se espera que al comparar diferentes protocolos en la centrifugación previa a la crioconservación se logre establecer el que garantice las mejores características espermáticas en la post congelación.

Además, se evaluó la eficiencia de los diluyentes RAMP PLUS y CRIO RAMP en la centrifugación y crioconservación del semen respectivamente, lo que permitió observar el daño que recibió la membrana espermática y la resistencia de los espermatozoides a cada uno de los protocolos utilizados; esto permitió observar y evaluar la calidad seminal post congelación y así tener un material más aprovechable.

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Generalidades de los equinos

Los equinos son animales que desde su domesticación hace más de 5 000 años se convirtieron en actores fundamentales para el desarrollo y colonización de los seres humanos alrededor del mundo. El registro de los primeros equinos data hace aproximadamente 40 millones de años en el Eoceno.

Los equinos o también denominados équidos son un grupo de animales vertebrados, mamíferos cuadrúpedos ungulados, la principal característica morfológica de este grupo animal es que son perisodáctilos, es decir, tienen un número impar de dedos terminan en una uña cornificada (dura como los cuernos) que se llaman pezuñas o cascos. Los equinos son herbívoros y aunque no son rumiantes tienen un aparato digestivo adaptado a sus necesidad de alimentación como un alargamiento del ciego que les permite deshacer la celulosa de las hierbas y pastos; la cara de los caballos es de forma alargada y cuello también alargado para alcanzar su alimento desde el suelo; el pelaje varía según la especie tanto en densidad y color, pudiendo ir desde el color blanco hasta el negro, sin embargo, la variedad de colores cafés y terrosos son predominantes; el pelo del cuello se llama crin y es más largo, al igual que el de la cola (Contreras, 2014, párr. 2-3).

Tabla 1-2: Taxonomía de los caballos

<i>Super reino</i>	<i>Eucariota</i>	Seres vivos formados por células con núcleo verdadero
<i>Reino</i>	<i>Animalia</i>	Todos los animales (capaces de moverse, no tienen cloroplasto y desarrollo de tipo embrionario)
<i>Subreino</i>	<i>Eumetazoa</i>	Animales con tejidos, órganos y cavidad digestiva por al menos un orificio bucal
<i>Superfilo</i>	<i>Deuterostomia</i>	Organismos que en las etapas de desarrollo embrionario se forma primero el ano y después la boca.
<i>Filo</i>	<i>Chordata</i>	Presencia de cuerda dorsal de células turgentes, tubo neural hueco en posición dorsal, hendiduras branquiales y cola.
<i>Subfilo</i>	<i>Vertebrata</i>	Espina o columna vertebral.
<i>Intrafilo</i>	<i>Gnathostomata</i>	Animales con mandíbulas articuladas, vainas de mielina de las neuronas y n sistema inmunitario adaptativo.

<i>Superclase</i>	<i>Tetrapoda</i>	Poseer cuatro extremidades o cuatro patas.
<i>Clase</i>	<i>Mammalia</i>	Vertebrados de sangre caliente que presentan glándulas mamarias productoras de leche para alimentar a las crías
<i>Subclase</i>	<i>Theria</i>	Mamíferos donde el embrión se desarrolla dentro del útero materno
<i>Infraclase</i>	<i>Placentalia</i>	Crías en el útero alimentadas por una placenta alantoica
<i>Orden</i>	<i>Perissodactyla</i>	Poseer extremidades con número impar de dedos terminadas en pezuñas
<i>Familia</i>	<i>Equidae</i>	Animales con dientes de corona alta y un único dedo en cada pata recubierto de un casco.
<i>Género</i>	<i>Eqqus</i>	Musculatura y fuerza, patas largas y pelaje espeso.

Fuente: Cumbre Pueblos, 2018, párr. 1-12.

Realizado por: (León, 2023)

2.1.1. Razas de equinos

2.1.1.1. Pura sangre inglés (PSI)

El término pura sangre se utiliza para definir un tipo de caballo, no solo una raza, es decir, son caballos pura sangre aquellos nacidos de padres de la misma raza. Los caballos de raza pura sangre inglés evolucionó en Inglaterra durante los siglos XVII y XVIII producto del cruce de sementales árabes con yeguas propias de la región, esta raza proviene de las clases berberisco Byerley de Inglaterra y los árabes Darley y Godolphin (Real Federación Española de Asociaciones de Ganado Selecto, párr. 1-3).

Este grupo animal tiene coordenadas étnicas de Baron 0, 0, +. El “0” significa que posee una característica en su grado medio, “+” significa un rasgo más desarrollado y “-” un rasgo en menos medida de la media de la población. En este caso la pura sangre inglés es un caballo eumétrico (0), es decir, de tamaño medio; de perfil rectilíneo (0) y de proporciones longilíneas (+). La cabeza de estos animales es estilizada con poca masa muscular sobre la mandíbula, el cuello es largo y ligeramente angosto y cuerpo alargado. La alzada de los machos alcanza un promedio de 1.56 metros y de 1.54 metros en la hembra, el peso promedio alcanza los 400 kg; el pelaje es monocolor en tonos castaños, alazán y otros similares (Ministerio de Agricultura, pesca y Alimentación de España, 2022, párr.1).



Ilustración 1-2: Raza de caballo pura sangre inglés

Fuente: Ministerio de Agricultura, pesca y Alimentación de España, 2022.

2.1.1.2. Pura sangre Anglo-árabe

Esta raza equina se originó en Inglaterra, aunque su presencia se ha expandido a todo el mundo, es el resultado del cruce de sementales de Sangre Pura de Carrera y yeguas árabes o viceversa, debe probarse un mínimo de 12.5% de sangre árabe del animal para considerarlo dentro de esta raza (Tissera; et al., 2009, p. 4). La morfología de la cabeza de esta raza tiene mayor similitud con la cabeza de la raza Pura Sangre de Carrera, el perfil fronto-dorsal es recto con ojos vivaces y orejas móviles, la cruz es más prominente y el cuello más largo en relación con la raza árabe. Por lo general, son más voluminosos que los caballos de raza pura sangre de carrera, las extremidades son finas y fuertes. La alzada del caballo oscila entre 1.62 y 1.65 metros y los colores del pelaje más comúnmente vistos son: alazán, zaino e incluso se encuentran ejemplares con colores bayos.

Esta raza de caballo es menos veloz que la raza pura sangre de corrida, pero sí poseen gran agilidad y equilibrio; son equinos de salto por naturaleza y son excelentes caballos de silla, además, son entrenados también para competencias de doma (Tissera et al., 2009, p. 4). Los caballos angloárabes tienen movimientos elásticos con marcha distinguida, extendida y equilibrada. Su carácter es dócil y equilibrado, con temperamento fuerte pero no agresivo.



Ilustración 2-2: Raza de caballo angloárabe

Fuente: Ministerio de Agricultura, pesca y Alimentación de España, 2022.

2.1.2. Reproducción del equino

2.1.2.1. Sistema endocrino del equino

Las estructuras que componen el sistema endocrino de los animales y el ser humano tienen como objetivo la producción de moléculas denominadas hormonas, estas hormonas se liberan en un medio extra molecular hasta alcanzar el torrente sanguíneo, a través del cual se distribuye por todo el organismo. Las hormonas funcionan como señales químicas que desencadenan una respuesta biológica en determinadas células diana.

Las células productoras de hormonas o células endocrinas se pueden encontrar en forma aislada en el cuerpo animal o vivo como en forma de órganos gónadas, los riñones y el hígado, a estas se las denomina células endocrinas difusas; o también de forma asociada formando estructuras glandulares microscópicas denominadas glándulas endocrinas como la hipófisis, la glándula pineal, las glándulas tiroideas y otras (Megías et al., 2019, p. 4).

Hipotálamo

Es el intermediario entre el sistema nervioso y el sistema endocrino, su función es la producción de hormonas que liberan o impiden la liberación de otras hormonas en el organismo, es decir, contribuye al mantenimiento de la homeostasis corporal a través de funciones como la estabilización del ritmo cardíaco, la presión, el apetito, etc.

El hipotálamo produce las neurohormonas como la antidiurética que incrementa la absorción de agua, la hormona liberadora de corticotropina que regula el metabolismo, hormona liberadora de gonadotropinas para soltar FSH influyente en las gónadas, la hormona del crecimiento, oxitocina, prolactina (Megías et al., 2019, p. 5).

Glándula pineal

Esta glándula se conoce también como epífasis y tiene forma de piña, aquí se produce la hormona melatonina relacionada con la regulación del ritmo cardíaco de los animales, además, esta hormona se produce y libera en la noche y es inhibida cuando hay presencia de luz.

Glándula tiroides

Se forma por una unidad estructural de folículos y es la glándula encargada de producir las hormonas T3 (*tryiodotironina*) T4 (*tetrayodotironina*) que se liberan al tejido conectivo y a los capilares que rodean el folículo.

Glándula paratiroides

Son un conjunto de glándulas asociadas con la tiroides, secretan las hormonas paratiroides (PTH) que están encargadas del metabolismo del calcio y el fósforo de la sangre.

Glándulas adrenales

Estas glándulas se ubican en pares en el polo craneal de los riñones y en ellas se diferencia dos componentes endocrinos que funcionan como glándulas independientes: la corteza y la médula. En la corteza se producen las hormonas esteroideas como los mineralocortoides, glucocortoides y hormonas sexuales; y, en la médula se sintetizan las catecolaminas como la epinefrina y la neopinefrina (Universidad Complutense Madrid, 2022, párr. 1).

Páncreas

Es un órgano que libera enzimas al aparato digestivo y produce hormonas, las células endocrinas pancreáticas se agrupan formando islotes de Langerhans. Las células alfa producen y liberan la hormona glucagón que se encarga de la concentración de glucosa en la sangre, las células beta liberan insulina que disminuye la concentración de glucosa en la sangre y las células delta liberan somatostatina que inhibe a contracción del músculo liso deteniendo la digestión.

Glándulas sexuales (gónadas)

Las glándulas sexuales se localizan en las gónadas tanto de hembras como machos, es decir, las gónadas femeninas son los ovarios y las gónadas masculinas son los testículos. Las gónadas masculinas poseen células liberadoras de hormonas: las células Leyding ubicadas en el tejido intersticial que rodea los túbulos seminíferos se encargan de la liberación de la testosterona que es responsable de la aparición de caracteres sexuales secundarios y favorece la producción de espermatozoides; y, las células de Sertoli producen las proteínas ABC necesarias para el incremento de la producción de espermatozoides (Megías et al., 2019, p. 6).

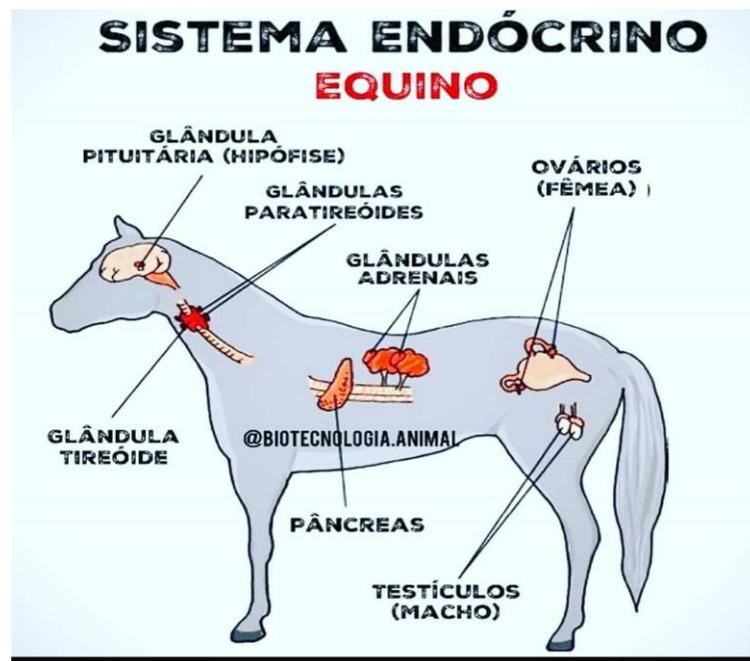


Ilustración 3-2: Sistema endocrino de equino (caballo y yegua)

Fuente: Liga Académica de Medicina de Medicina en equinos y bovinos UBM, 2022.

2.1.2.2. Sistema reproductor del caballo

El sistema reproductor del caballo macho está integrado por órganos sexuales primarios que son las gónadas o testículos y órganos secundarios comprendidos por los conductos eferentes, el epidídimo y conductos deferentes y órganos sexuales accesorios.

Testículos

En los mamíferos machos, son órganos sexuales pares casi siempre asimétricos, de forma ovalada, comprimidos en los laterales y ubicados dentro de una bolsa escrotal revestida por túnicas fibrosas para la protección de estos órganos y garantía de una correcta función espermatogénica.

En los caballos los testículos durante la vida fetal se ubican en la cavidad abdominal cerca de los riñones y descienden hasta el escroto antes del nacimiento. Al alcanzar la adultez, los testículos

del caballo tienen una longitud aproximada de 10 a 12 centímetros y un ancho aproximado de 5 centímetros, y un peso individual de entre 225 y 300 gramos (González, 2018, párr. 1).

Túbulos seminíferos

Se constituye por tejido germinal y es donde se originan los espermatozoides, cada túbulo se forma por varios tipos de células germinales y tejido sustentacular que contiene células de Sertoli que producen proteína fijadora de andrógenos e inhibina. Los tubos seminíferos representan el 80% del peso total de los testículos (González, 2018, párr. 2).

Escroto

Es un saco bilobulado que envuelve a los testículos, es asimétrico sin pelos ni vellos y generalmente se encuentra en la zona inguinal de los animales machos entre las extremidades posteriores. Se forma por una capa externa de piel gruesa con numerosas glándulas sudoríparas y sebáceas (González, 2018, párr. 3).

Epidídimo

Es el primer conducto externo que sale desde los testículos, la cabeza del epidídimo se localiza en la punta inferior de los testículos en donde se unen entre 12 y 15 conductos eferentes para formar un único tubo, el cuerpo del epidídimo se ubica dorsalmente sobre el testículo al que se une por tejido seroso y la cola se une al testículo por la parte posterior mediante un ligamento propio. Este órgano se encarga del transporte, almacenamiento, maduración y concentración de los espermatozoides (Boyle, 1992 citado en Trejos, 2009, p. 9).

Cordón espermático

Se forma por varios tejidos, empieza en el anillo inguinal abdominal y se extiende oblicuamente a través del canal inguinal pasando por encima del pene y terminando al borde de la inserción del testículo. Se compone por el músculo cremaster, arteria y vena espermática, nervios simpáticos, conducto deferente, músculo cremaster interno y capa visceral de la túnica vaginal. La función del cordón espermático junto con el escroto es sostener los testículos y mantener la temperatura de estos acercándolos al cuerpo cuando la temperatura ambiente desciende o dejándolos colgar apartados del cuerpo cuando la temperatura aumenta (Bonilla, 2013 citado en Vásquez, 2019, p. 6).

Conducto deferente

Este es un tubo que se encuentra extendido desde la cola del epidídimo hasta la zona pelviana de la uretra, por este conducto se mueven los espermatozoides durante la eyaculación. En el equino este conducto presenta una capa muscular bastante gruesa por lo que es fácilmente palpable a través de la piel del escroto y es por la contracción de esta capa muscular que se impulsa el semen hacia los órganos superficiales o de contacto con la hembra (Bonilla, 2013 citado en Vásquez, 2019, p. 11).

Uretra

Es un tubo que va desde la vejiga hasta la porción final del pene, la zona pélvica de la uretra se rodea del músculo uretral que se contrae durante la eyaculación; dentro del pene la uretra se acerca por un área cavernosa de tejido eréctil que funciona como canal excretorio de la orina y el semen (Sánchez y Palacios, 2005 citado en Vásquez, 2019, p. 6).

Pene

Es el órgano masculino externo que interviene durante la copulación con la yegua, es de forma cilíndrica, en estado de flacidez tiene una longitud aproximada de 50 cm de largo y entre 3 y 6 cm de diámetro, mientras que, durante la erección puede alcanzar hasta 100 cm de longitud. El pene del caballo se divide en tres secciones: la raíz que se halla unida al hueso de la pelvis, el cuerpo que es la parte central y el glande que es la parte terminal del pene (Sánchez y Palacios, 2005 citado en Vásquez, 2019, p. 7).

Prepucio

El prepucio es una invaginación de la piel que cubre totalmente el extremo libre del pene o glande cuando el pene no se encuentra erecto. Se forma por dos partes: una porción prepeniana o pliegue externo, y una porción penil o pliegue interno. Cuando el caballo alcanza la adultez el prepucio se cubre de pelos largos y fuertes que protegen al órgano de bacterias (González, 2018, párr. 10).

Glándulas sexuales accesorias

Estas se ubican a lo largo de la zona pélvica de la uretra con conductos que liberan las secreciones en el interior y estas son:

- *Ámpula:* Es el estrechamiento fusiforme que forma el conducto deferente antes de unirse con la uretra, tiene una estructura tubular de más o menos 0.7 a 2.0 cm de diámetro.
- *Glándulas vesicales:* Par de glándulas lobulares con apariencia de un racimo de uvas cuyos conductos excretores terminan cerca de la unión de la uretra y el ámpula. Contribuyen en la formación de semen con compuestos orgánicos como fructosa que es la fuente de energía de los espermatozoides.

- *Próstata*: Es una glándula con forma lobular que se ubica en el cuello de la vejiga y al inicio de la uretra; se forma por dos lóbulos laterales y un istmo de conexión. La función de la próstata es la secreción de fluidos para la limpieza y lubricación de la uretra durante la estimulación sexual (Zarco, 200 citado en Trejos, 2009, p. 12).
- *Válvulas bulbouretrales*: Están se localizan a lo largo de la uretra y contribuyen en menor grado con el volumen del líquido seminal, las secreciones de estas válvulas limpian los residuos de orina en la uretra durante la eyaculación.

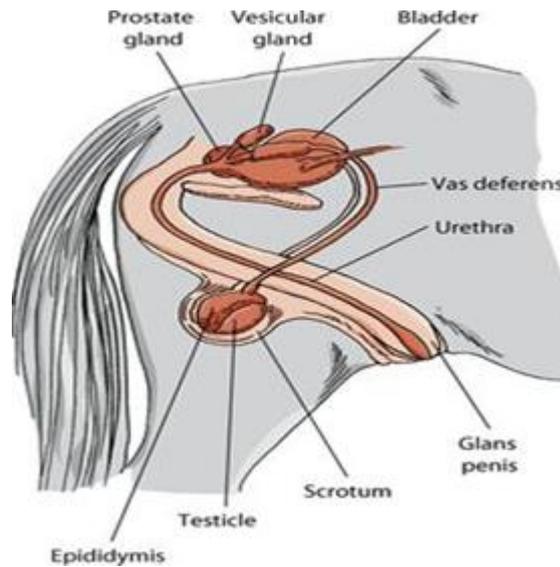


Ilustración 4-2: Sistema reproductor del caballo

Fuente: González et al., 2020, p. 1.

2.1.2.3. Tipos de reproducción

Monta natural

La monta natural es el proceso de copulación directa entre un macho y una hembra de la misma especie, se desarrolla en el ambiente natural de vida del animal. El caballo es atraído por las muestras de celo de la yegua mientras que el macho la corteja, realiza un *flehmen*, da manotazos en el piso y mordisquea los laterales de la yegua hasta que esta se quede totalmente quieta y entonces se da el coito (Morocho & Duchimaza, 2018, p. 41).



Ilustración 5-2: Monta natural del equino

Fuente: Aguilar, 2003.

Inseminación artificial

Este es un proceso de intervención humana en donde no existe contacto físico entre los animales, sino que el semen del macho es extraído por un profesional veterinario o zootecnista y después se introduce este semen en el interior de la vagina de la hembra. La principal ventaja de este método de reproducción es reducir el riesgo de transmisión de enfermedades venéreas.



Ilustración 6-2: Inseminación artificial

Fuente: Aguilar, 2003.

Trasplante de embriones

Esta técnica se empezó a utilizar con yeguas que presentaron riesgos reproductivos y no se mantenía la gestación hasta el término o yeguas de edad avanzada. Actualmente, esta técnica se dirige principalmente a yeguas de alto valor genético. En este caso intervienen tres animales y el ser humano: un semental donador de semen, la primera yegua en donde gestan los embriones y la segunda yegua donde se insertará el embrión a los siete u ocho días después de la fecundación (Morocho & Duchimaza, 2018, p. 42).

2.1.3. Espermatogénesis

La espermatogénesis o también conocida como función exocrina de los testículos es el proceso por el cual se forman y almacenan los espermatozoides a partir de las espermatogonias del tubo seminífero por acción de las gonadotropinas hipofisarias y los andrógenos.

Según Mejía (2016, p. 17) los espermatozoides de los caballos adultos se originan en el epitelio de los tubos seminíferos por acompañamiento de las células de Sertoli mediante la espermatogénesis que dura aproximadamente 57 días y se entiende como la suma de procesos de diferenciación y división de las espermatogonias, se compone por tres fases principales: espermatocitogénesis, meiosis y espermiogénesis.

2.1.3.1. Espermatogonias

Son las células germinales que se ubican en las gónadas de los animales machos, en los machos cuyos testículos se forman por túbulos seminíferos, las espermatogonias se encuentran en contacto con la lámina basal de esos túbulos. Es importante considerar, que se denominan espermatogonias a las células germinales que no han llegado a la meiosis (Megías; et al., 2022, párr. 1).

2.1.3.2. Gonadotropinas hipofisarias

Las gonadotropinas (GnRH) son hormonas elaboradas en el encéfalo y hacen que la hipófisis produzca y libere la hormona luteinizante (LH) y la hormona foliculoestimulante (FSH). Estas hormonas regulan los procesos de reproducción, en los machos provocan que los testículos generen testosterona (Instituto Nacional del cáncer, 2022, párr. 1).

2.1.3.3. Andrógenos

Este grupo de hormonas facilitan la comunicación entre las células del cuerpo y se producen a partir de la transformación del colesterol en la glándula suprarrenal. En los seres sexuales masculinas los andrógenos son hormonas que incluyen la testosterona, la androsterona y la androstenediona y cuya función es el desarrollo de los caracteres sexuales como barba y tono de voz.

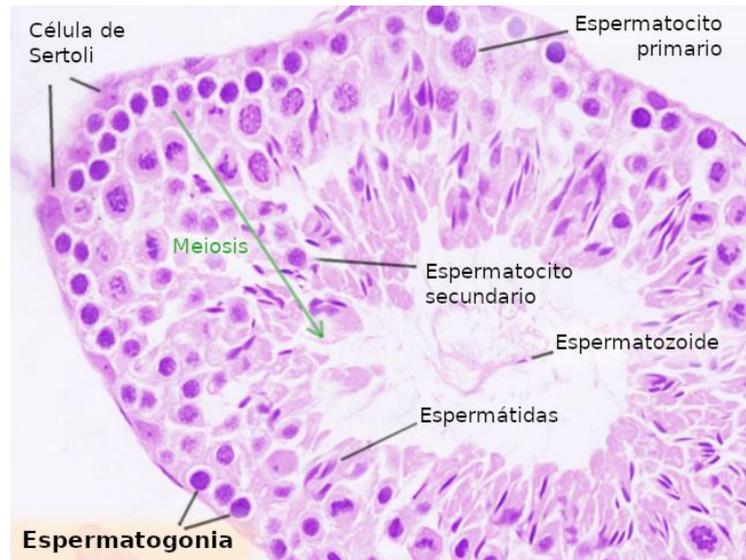


Ilustración: 7-2: Tipos celulares del epitelio germinativo (ratón)

Fuente: Megías, 2022, p. 1.

2.1.3.4. Fases de la espermatogénesis

Espermatocitogénesis

En el caballo esta fase dura aproximadamente 19.4 días y las espermatogonias de tipo A1 por mitosis se dividen en 16 células para alcanzar un grado de diferenciación, transformándose en espermatogonias de tipo A2 (espermatocitos) que experimentan una nueva mitosis y de esta forma se siempre existe una población de espermatogonias A2 que migren hasta quedar envueltas en los pliegues citoplasmáticos de las células de Sertoli (Pérez, 2013, pp. 188-189).

Meiosis

Esta fase también tiene una duración de 19.4 días y aquí ocurren un intercambio de material genético entre cromosomas homólogos de los espermatocitos primarios formando los espermatocitos secundarios; la segunda división meiótica forma cuatro espermátides a partir del espermatocito primario (Pérez, 2013, pp. 188-189).

Espermiogénesis

Es la última etapa del proceso de espermatogénesis y dura aproximadamente 18.4 días, en esta etapa ocurre la diferenciación morfológica de las espermátides en espermatozoides. Las espermátides pierden una porción citoplasmática, se reorganiza la cromatina nuclear y se recolecta material citoplasmático y se recoge la membrana celular para que se forme la cola (Pérez, 2013, pp. 188-189).

2.1.3.5. Endocrinología reproductiva del macho

Para que los testículos del macho produzcan espermatozoides se necesita que el conjunto hipotálamo – hipófisis – gónadas se sincronicen, es decir, el hipotálamo sintetiza y suelta la hormona liberadora (GnRH) para estimular a la hipófisis y producir FSH y LH. Las hormonas folículo estimulantes actúan sobre los túbulos seminíferos (células germinales y células de Sertoli). Las células de Sertoli producen inhibina que retroalimentan en sentido negativo la secreción de FSH. La hormona luteinizante por su parte estimula a las células de Leyding para la producción de andrógenos como la testosterona.

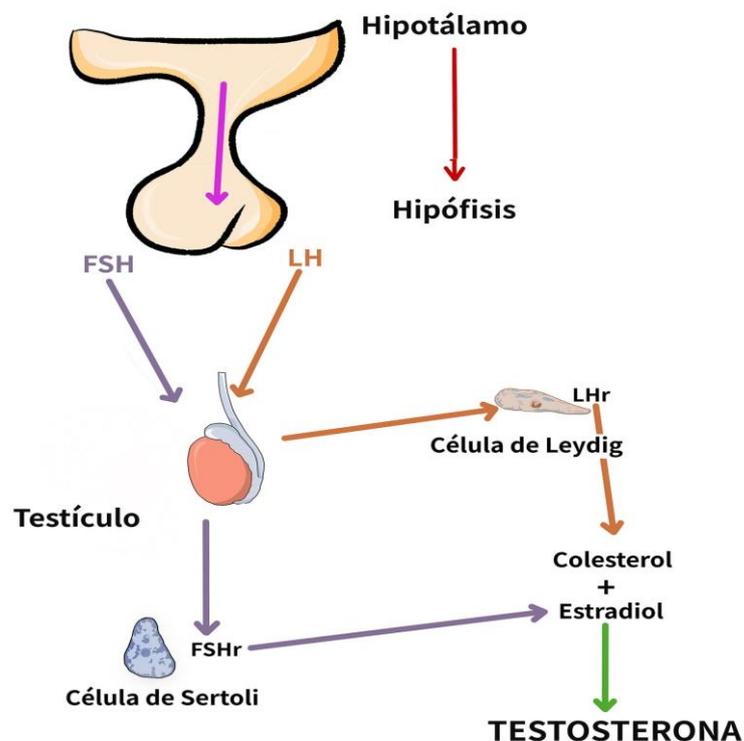


Ilustración 8-2: Endocrinología reproductiva del caballo

Fuente: Universidad Nacional Autónoma de México, 2021.

2.1.4. Semen equino

El semen del caballo se forma por tres ondas eyaculatorias que se evacúan en tiempos distintos. La primera onda se forma en la próstata, es rica en electrolitos y tiene efectos espermio estimulantes; la segunda onda se da en las ampollas de Henle y contiene espermatozoides; y, la tercera onda se origina en las vesículas seminales y aporta la mayor parte del volumen del eyaculado (Caiza et al., 1997 citado en Vásquez, 2019, p. 21).

El semen equino se compone de dos elementos principales: los espermatozoides y el plasma seminal. La eyaculación del caballo se realiza en etapas: la primera o pre-secreción se observa mediante el fluido expulsado del pene del semental cuando esté salta sobre la hembra o en el periodo de máxima excitación antes del coito, tiene la función de limpiar y lubricar la uretra; la fracción rica en espermatozoides transporta entre el 80 y 90 % de estos y es expulsada en las primeras dos a tres fases de las seis a nueve que componen el eyaculado; la fracción gel o fracción pobre, se produce en las vesículas seminales y contiene baja cantidad de espermatozoides pero es rica en ácido cítrico y potasio; la última fracción es posterior al coito y consiste en una secreción acuosa con volumen reducido (Mann, 1975 citado en Trejos, 2009, p. 14).

2.1.4.1. Espermatozoide equino

Estos organismos son células haploides cuya única función es la de fecundación de la hembra para la reproducción de la especie. Para que la fecundación se realice de manera exitosa, las células espermáticas deben sostener un metabolismo capaz de producir energía, motilidad progresiva y enzimas acrosomales para la penetración de las estructuras que envuelven el ovocito (óvulo de la hembra) (Amann & Graham, 1993 citado en Trejos, 2009, p. 21).

2.1.4.2. Anatomía y fisiología del espermatozoide

Según (Ortega, 2011 citado en Reyes, 2019, p. 16) el espermatozoide de los animales mamíferos se compone por cinco regiones: cabeza, cuello, pieza intermedia, pieza principal y pieza terminal. Los espermatozoides equinos alcanzan un tamaño aproximado de 60 μm y se rodea completamente por membrana plasmática.

- La cabeza del espermatozoide es aplanada y aquí se ubica el núcleo, el acrosoma y las estructuras del citoesqueleto, además de una pequeña cantidad de citoplasma. A la vez, el núcleo se conforma por la cromatina altamente condensada, el acrosoma y el segmento ecuatorial, y la fosa de implantación.
- *Acrosoma*: localizado sobre el núcleo, es una vesícula que contiene enzimas hidrolíticas necesarias para la penetración de la zona pelúcida del ovocito.
- El cuello del espermatozoide es el espacio de unión entre la cabeza y la pieza media, se conforma por las mitocondrias, el centriolo proximal y una serie de columnas laminadas que proporcionan gran flexibilidad para la movilidad lateral del espermatozoide.
- En la pieza intermedia del espermatozoide se encuentra una doble hélice de mitocondrias. Las mitocondrias además de controlar el metabolismo energético son la mayor fuente intracelular

de especies reactivas de oxígeno; la pieza intermedia está limitada por el anulus que es la zona donde la membrana se condensa.

- La pieza principal se ubica en una porción de la cola y se forma por nueve fibras densas y el axonema que continúa desde la pieza intermedia; las fibras van reduciéndose en tamaño hasta desaparecer al final de la pieza principal del espermatozoide.
- La pieza terminal es la parte final de la cola y se forma por el axonema que se venía extendiendo desde la pieza intermedia, esta parte del espermatozoide no tiene vaina fibrosa (Ortega, 2011 citado en Reyes, 2019, pp. 17-18).

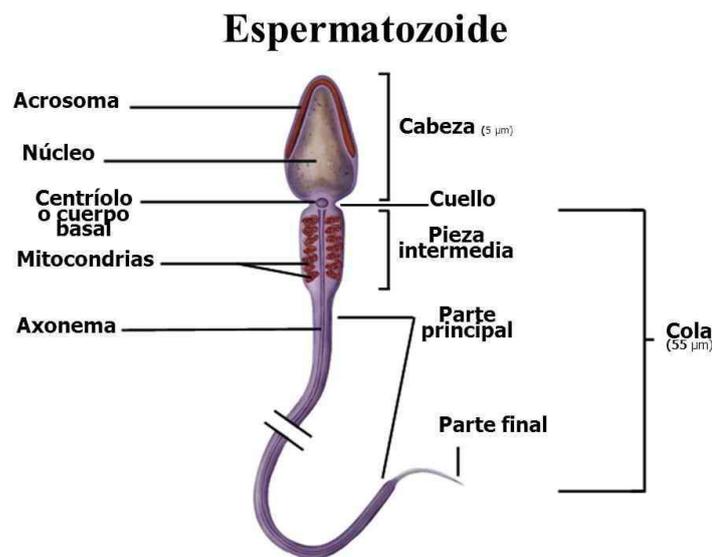


Ilustración 9-2: Anatomía del espermatozoide equino

Fuente: Partesdel.com, 2022.

2.1.5. Extracción de semen

La recolección del semen es una técnica habitual en la clínica de reproducción de los mamíferos y se emplea para evaluar la capacidad reproductiva del macho, realizar controles rutinarios de calidad del semen, diagnóstico de infertilidad y evidentemente para el proceso de inseminación artificial de la hembra de la especie. Actualmente, la inseminación artificial es la técnica más utilizada en la reproducción animal principalmente de bovinos, porcinos y equinos.

2.1.5.1. Vagina artificial

La vagina artificial es el método mayormente utilizado al momento de la extracción del semen de un animal macho, para la recolección de semen equino se conocen tres modelos de vaginas más frecuentes: Colorado, Missouri y japonesa; todos estos tipos de vagina contienen tanto los espermatozoides como el plasma seminal, es decir, recogen un eyaculado completo.

- *Missouri*: Es el más accesible económicamente, es liviana, fácil de manejar y relativamente fácil de limpiar. Se forma por una doble camisa de látex permanentemente sellada que funciona como cámara de agua y una carcasa de cuero que envuelve la camisa; cuenta con una válvula para llenar agua o aire o una mezcla de los dos.
- *Colorado*: Se compone por una carcasa externa de plástico y usa dos forros de látex, el primero forma una cámara entre la carcasa y el forro donde se introduce el agua; y, el segundo sirve para recolección propiamente dicha colocando en su extremo un recipiente. La ventaja de este modelo de vagina es la capacidad de mantener la temperatura del agua por mayor tiempo.
- *Japonesa*: Se forma por una caja externa de aluminio y un forro de látex, además, en el extremo se dota de anillo de goma espuma que estimula el glándulo del semental durante la penetración. Es totalmente rígida y dispone de un bulbo de goma para el almacenamiento del semen.

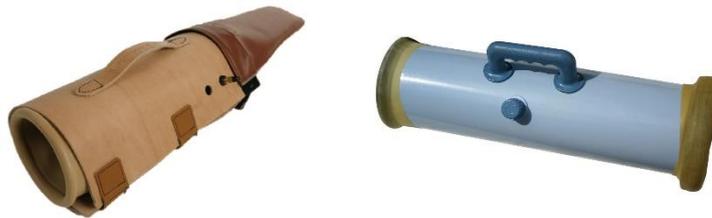


Ilustración 10-2: Vaginas artificiales para equinos

Fuente: Reyes, 2019, p. 21.

2.1.6. Valoración de muestras seminales

Las muestras seminales de los equinos son valoradas frecuentemente para conocer el comportamiento y calidad seminal, y decidir el manejo del mismo a fin de alcanzar el mayor potencial reproductivo. Entonces, la valoración de las muestras seminales persigue dos objetivos:

- Predecir la capacidad fertilizante del semental.
- Determinar la aptitud de las muestras para su conservación bajo refrigeración o congelación.

Esta valoración consiste en la medición de parámetros seminales cuantitativos como el volumen eyaculado libre de gel, la concentración espermática y el número de espermatozoides, y el pH del semen; también, parámetros cualitativos como el movimiento morfología espermática.

Para realizar la evaluación debe retirarse la fracción de gel seminal, esta es la última secreción y tiene una baja concentración de espermatozoides; puede realizarse por aspiración con jeringa estéril, filtración mediante sistemas incorporados en la en la vagina artificial y otros. El semen debe mantenerse a una temperatura de 38 °C porque los espermatozoides son altamente sensibles al shock térmico.

Tabla 2-2: Parámetros del semen equino fresco

	Mínimo	Máximo	Promedio	Autor
Volumen	30 ml	250 ml	100 ml	Morel, 1999
Gel seminal	20 ml	40 ml	30 ml	Morel, 1999
Concentración (*10⁶)			198.7 ± 27.6	Villa et al.
pH	7.2	7.6		Kenney et al., 1993
Aspecto	Semen fresco de color gris cenizo a blanco y consistencia acuosa a lechosa.			Juhasz et al., 2000
Vigor	0	5		Pérez, 2006

Fuente: Restrepo et al., 2013, p. 119 & Paredes, 2015, p.p. 22-24.

Realizado por: León, Adrián, 2023.

2.1.7. Tratamiento del semen equino

2.1.7.1. Semen fresco

El semen fresco o semen *in natura* no es utilizado frecuentemente en la inseminación artificial y se usa cuando la yegua receptora se encuentra en el mismo predio que el macho, pero no se puede realizar la monta natural. Cuando se realiza una inseminación con semen fresco debe efectuarse en un tiempo menor a treinta minutos después de la extracción, dado que, la pérdida de motilidad y capacidad de fecundación es rápida.

Los resultados de la fecundación con semen fresco son semejantes e incluso superiores a la monta natural. Mattos & Cavalheiro en 1998 obtuvieron una tasa de preñez del 78.7% usando semen diluido, mientras que, con la monta natural se alcanzó un 56.0% de preñez. Por su parte Silva (1994 citado en Trejos 2009, p. 54) indica que no existe diferencia alguna en la preñez mediante la inseminación artificial con semen fresco y la monta natural.

2.1.7.2. Semen refrigerado

El semen refrigerado se usa principalmente por la rentabilidad económica de este, los índices de preñez y la posibilidad de conservación del semen por periodos variantes entre horas y días, han convertido la inseminación artificial con semen refrigerado en la técnica más difundida.

Existen varias dificultades para el uso del semen refrigerado como, por ejemplo:

- No todos los machos de la especie producen semen capaz de soportar la refrigeración y/o congelación.
- La longevidad del semen refrigerado es relativamente corta (24 a 48 horas).
- Debe procurarse la salud del macho y la disponibilidad de recolección de semen durante toda la temporada de monta para atender la demanda de inseminación.
- El procesamiento del semen por propietarios, no profesionales, ocasiona la disminución de la calidad del semen (Loomis, 2001 citado en Trejos, 2009, p. 54).

El semen debe ser mezclado con diluyente pre-calentado (37 °C) dos o cinco minutos después de la recolección. La relación diluyente semen debe ser 1:1, sin embargo, si la inseminación se realizará después de dos horas se utiliza una disolución mayor y depende de la concentración espermática inicial. Las yeguas son inseminadas generalmente con dosis que varían desde 250 a 500 x 10⁶ espermatozoides en movimiento progresivo (Brinslo & Varner, 1992 citado en Trejos, 2009, p. 54).

El semen puede almacenarse en probetas u otros recipientes de vidrio o plástico que no sean mortíferos para los espermatozoides y las dosis se dividen al momento de la inseminación; puede almacenarse también en bolsas de polietileno o en jeringas con émbolos de plástico. Se recomienda retirar el aire de los envases durante el llenado del semen, a 4 °C la actividad espermática es menos intensa y la motilidad se mantuvo en aquellos envases sin aire según el estudio desarrollado por Mattos (1997 citado en Trejos, 2009, p. 54).

En términos generales la refrigeración del semen diluido debe hacerse a temperaturas entre los 5 °C y 6 °C, dado que, estas temperaturas mantienen la viabilidad espermática debido a la reducción de la actividad metabólica. Además, se indica un enfriamiento lento a medio (<0.03 °C/min a 0.1-0.05 °C/min).

2.1.7.3. Semen congelado

La crioconservación del semen es un procedimiento de enfriamiento y almacenamiento de esta sustancia a temperaturas inferiores a 0 °C, el nitrógeno líquido (-196 °C) es utilizado para esta forma de conservación.

El limitante de este método de preservación del semen es el elevado costo de la maquinaria y herramientas necesarias para el procedimiento y la obligatoriedad de contar con personal capacitado; mientras que los beneficios, son el acceso al semen de machos que se encuentran separados por largas distancias, mayor calidad del semen, menos desperdicio porque toda la recolección es procesada y almacenada logrando una media de 10 a 12 dosis por eyaculado (Loomis, 2001 citado en Trejos, 2009, p. 54).

2.1.8. Crioconservación

La crioconservación es el “proceso para enfriar y almacenar células, tejidos u órganos a temperaturas muy bajas o congelarlos para guardarlos para su uso en el futuro, también se llama criobanco” (Instituto Nacional del Cáncer, 2022, párr. 1).

2.1.8.1. Extracción del semen

La extracción del semen inicia con el lavado del pene del animal, principalmente la fosa uretral para eliminar microorganismos, sin embargo, no debe alterarse la flora bacteriana normal del pene. La extracción se realiza a través de maniqués y vaginas artificiales.

2.1.8.2. Centrifugado

Posterior a la extracción del semen se realiza una evaluación macroscópica para determinar características físicas y químicas; después se realiza una primera dilución del semen en proporciones de 1:1 (semen: diluyente) a una temperatura de 37°C para evitar golpes de frío. Los diluyentes más utilizados son el Kenney y el INRA96. La dilución del semen busca obtener espermatozoides concentrados y para ello se recomienda reducir el plasma seminal entre un 5 y 20% (Alvarenga et al., 2016 citado en Elgueta, 2018, p. 4).

Para el centrifugado se utilizan tubos de ensayo de 10 ml y una fuerza de centrifugación de 400 a 600 G (depende del rpm y el radio del rotor) durante 15 minutos (extremos de tiempo de 10 a 20 minutos). Weiss (2004, citado en Wemli, 2010, 25) recomienda que el semen equino debe ser centrifugado a una velocidad de 600 G durante 10 minutos para tener menor pérdida espermática y una buena calidad de congelación. La centrifugación logra que los espermatozoides se almacenen en el fondo de la pipeta y el líquido seminal quede en la superficie, posteriormente, se elimina el líquido y se obtienen los espermatozoides puros.

Después de la centrifugación debe incorporarse un diluyente de congelación que se forma por crioprotectores, azúcares, antibióticos, electrolitos y otros elementos que cumplen las funciones de proveer nutrientes a los espermatozoides, proteger a los espermatozoides de la temperatura, mantener el equilibrio del pH, mantener la presión osmótica y el balance electrolítico, e inhibir el crecimiento bacteriano (Alvarenga et al., 2016 citado en Elgueta, 2018, p. 4).

2.1.8.3. Crioprotectores

Estos son sustancias hidrosolubles que reducen el punto eutéctico (temperatura máxima a la que se produce la cristalización del solvente y soluto). Existen dos tipos de crioprotectores: permeables y no permeables.

- Los crioprotectores no permeables son compuestos de alto peso molecular que no atraviesan la membrana plasmática por lo que su efecto protector se realiza en el medio extracelular mediante ósmosis creando un medio hipertónico que por deshidratación disminuye la probabilidad de formación de cristales de hielo intracelulares (Ramónez et al., 2017 citado en Elgueta, 2018, p. 5). Los principales crioprotectores no permeables son: los azúcares, la leche desnatada y la yema de huevo.
- Los crioprotectores permeables son compuestos de bajo peso molecular y que atraviesan la membrana plasmática ocasionando la reorganización de los compuestos lipídicos y proteicos que incrementa la fluidez de la membrana plasmática, mejorando la deshidratación celular a bajas temperaturas y, por lo tanto, reduciendo la formación de cristales de hielo intracelulares, lo que incrementa la supervivencia espermática a la congelación tanto en el medio intracelular como extracelular. El crioprotector permeables más común es el glicerol (Ávila et al., 2014 citado en Elgueta, 2018, p. 5).

2.1.8.4. Refrigeración

El semen requiere un proceso de enfriamiento antes de la congelación, la temperatura del semen puede bajar de 37 °C al momento de la extracción a 20 °C sin efectos adversos para la motilidad, pero reducirlo a temperaturas de entre 19 °C y 8 °C son perjudiciales para el esperma equino. Posteriormente el enfriamiento entre 8 °C y 5 °C puede ser rápido y es aquí donde la membrana espermática transita de una fase líquida cristalina al estado de gel y por lo tanto la ocurrencia de un coque térmico ocasionaría la pérdida de motilidad y fertilidad de los espermatozoides (Alvarenga, 2002 citado en Wemli, 2010, p. 34).

Fürst en el año 2022, estableció un mecanismo de enfriamiento artesanal que reduce la temperatura del semen equino desde 22 °C a 8 °C en un tiempo de 35 minutos, es decir, disminuye la temperatura en 0.5 °C/min, para posteriormente reposar los espermatozoides por un tiempo de 25 minutos antes de la congelación (Fürst, 2006 citado en Wemli, 2010, p. 35).

Existen tres rangos de enfriamiento de los espermatozoides:

- Enfriamiento lento (< -0.33 °C/min)
- Enfriamiento medio (-0.33 a -1.0 °C/min)
- Enfriamiento rápido (> -1.0 °C/min)

Las mejores curvas de enfriamiento en semen mantenido a 5 °C, fueron la reducción de entre -0.6 a -1.0 °C/min.

2.1.8.5. Congelación

Las células espermáticas deberán atravesar un proceso de descenso de temperatura entre -15 °C hasta -50 °C (Mazur, 1980 citado en Wemli, 2010, p. 36), en donde existe el mayor riesgo de pérdida de motilidad y fertilidad. El espermatozoide alcanza un estado de anabiosis al llegar a -196 °C.

Criopreservación con nitrógeno líquido manual

Este método utiliza curvas de congelación en donde las pajillas descienden gradualmente de temperatura, para garantizar la sobrevivencia de los espermatozoides. Se ubican las pajillas de forma horizontal a aproximadamente 4 y 6 centímetros por encima del nivel de nitrógeno durante un tiempo mínimo de 7 minutos y máximo de 20 minutos. Posteriormente, las pajillas se introducen en el nitrógeno en donde pueden ser almacenadas por tiempo indeterminado, este método tiene una viabilidad del 30-35% a la descongelación (Acosta et al., 2017 citado en Rangel, 2023, p. 26).

Criopreservación mediante sistemas automatizados

Estos sistemas de congelación utilizan curvas de congelación que combinan diferentes velocidades de enfriamiento, una primera velocidad de $-10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ para cambiar la temperatura del semen desde $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y una segunda velocidad de $-25\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ a $-60\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ para reducir la temperatura hasta $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$, después de este enfriamiento se introducen las pajillas en nitrógeno líquido. Dado que las tasas de congelación son más uniformes la viabilidad post descongelamiento asciende al 50% (Elgueta, 2018 citado en Rangel, 2023, p. 26).

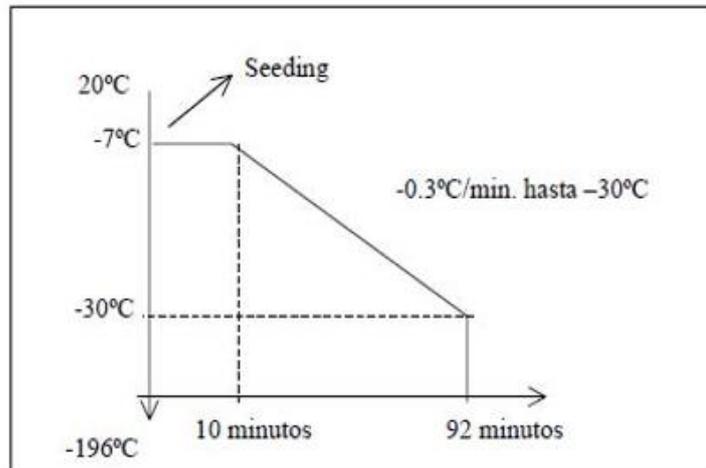


Ilustración 11-2: Curva de congelamiento convencional del semen

Fuente: Reproducción Veterinaria, 2022.

2.1.8.6. Descongelación

El procedimiento de descongelamiento de los espermatozoides se relaciona con el almacenamiento del mismo, el envasado suele realizarse en macropajuelas de 4 a 5 ml, en micropajuelas de 0.25 ml a 1 ml o en pajuelas de 0.5 ml que son las más frecuentes. Se recomiendan protocolos de descongelación por inmersión en agua a una temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 a 60 segundos cuando se usan micropajuelas y para macropajuelas se recomienda una temperatura de $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 45 segundos (Alvarenga, 2016 citado en Elgueta, 2018, p. 8).

2.1.9. Factores que afectan la crioconservación del semen

2.1.9.1. Choque térmico

El choque térmico es la alteración que sufren los espermatozoides cuando son sometidos a un enfriamiento rápido desde los $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$, estas alteraciones son la pérdida de motilidad,

alteración de la motilidad con movimientos retrógrados y circulares, reducción del metabolismo, lesión del acrosoma y la membrana plasmática y pérdida de componentes intracelulares, todas estas alteraciones son irreversibles (Amann & Pickett, 1987 citado en Trejos, 2009, p. 46).

La membrana plasmática se compone por una doble cadena de fosfolípidos en donde se localizan complejos proteicos en equilibrio están se muestran como un fluido, con el enfriamiento los lípidos transitan a una fase líquida cristalina y después a una fase de gel. Cuando se alcanza el estado de gel los lípidos se agregan formando microdominios y no se integran con otras proteínas asociadas a otros lípidos; los bordes de estos microdominios son más frágiles a la fusión o ruptura y más permeables a los iones (Hammerstedt et al., 1990 citado en Trejos, 2009, p. 46).

2.1.9.2. Centrifugación

La centrifugación y eliminación parcial del plasma seminal conduce a la disminución o pérdida de espermatozoides con motilidad rectilínea progresiva, además, cuando la centrifugación no es inocua se produce la pérdida del 10 al 20 % de espermatozoides en el sobre drenante, reduciendo la motilidad o aumentando las alteraciones morfológicas de las células espermáticas como consecuencia de la peroxidación (Parinaud et al., 1997 citado en Trejos, 2009, p. 47).

2.1.9.3. Diluyentes

La yema de huevo, la leche y el glicerol son los diluyentes más utilizados para la protección de los espermatozoides, las lipoproteínas presentes en la yema del huevo y la leche actúan como protectores térmicos y los sustratos metabolizables como la glucosa constituyen la fuente de energía de las células espermáticas; sin embargo, el metabolismo de los espermatozoides produce sustancias tóxicas como ácido láctico que reduce la motilidad, y por lo tanto, los diluyentes deben contener sustancias con capacidad tampón para neutralizar las sustancias tóxicas (Katila, 1997 citado en Trejos, 2009, p. 48).

2.1.10. Alteraciones del semen por crioconservación

El choque térmico puede ocurrir cuando la membrana plasmática pasa de estado líquido a estado de gel, por esto, el enfriamiento debe evitar que los fosfolípidos de la membrana se muevan lateralmente y formen pequeñas regiones lipídicas a las que se adhieran proteínas, esto incrementa la permeabilidad de la membrana y disminuye la actividad metabólica (Hammerstedt & Graham, 1992 citado en Castro & Cruz, 2016, pp. 48-50).

El daño de la membrana de la célula espermática durante la congelación puede causar crio capacitación, que hace que el espermatozoide tenga mayor probabilidad de sufrir una reacción acrosómica, lo que disminuye el tiempo de vida del espermatozoide (Thomas et al., 2006 citado en Castro & Cruz, 2016, pp. 48-50).

Se ha demostrado que el Ca (calcio) durante la congelación de los espermatozoides ingresa al medio intracelular por canales dependientes de voltaje y estos canales con voltaje provocan la disminución en la fertilidad. Los cambios de las concentraciones de Ca pueden ocasionar apoptosis, afectando la viabilidad y función espermática (Ball, 2008 citado en Castro & Cruz, 2016, pp. 48-50).

2.1.10.1. Membrana plasmática del espermatozoide equino

La membrana plasmática es la capa de revestimiento del espermatozoide y se compone por diferentes tipos de proteínas, fosfolípidos, colesterol, glucolípidos y carbohidratos, además de, enzimas en el acrosoma que funcionan como la principal barrera entre el espermatozoide y el ambiente externo, dada su característica de permeabilidad selectiva.

La membrana plasmática es una capa de doble que se compone principalmente por lípidos que recubren el espermatozoide, en condiciones normales los hidrófilos (cabezas) de los fosfolípidos se disponen de forma opuesta para formar una capa externa y una interna; mientras que, las hidrófobas (colas) se mantienen entre ambas capas. La deshidratación provocada por el proceso de congelamiento, modifica la disposición de los fosfolípidos, provocando la coalescencia de las cabezas, es decir, la exposición de las colas (Ortega, 2001, p. 12).

La composición de fosfolípidos de la membrana y la relación colesterol/fosfolípidos es variante según la especie animal (70% fosfolípidos, 25% lípidos neutros y 5% glicolípidos), la composición lipídica de la membrana es la que se relaciona con la capacidad de tolerancia al shock térmico, cuando mayor es la proporción de esteroides con relación a los fosfolípidos, y, mayor la saturación de fosfolípidos en grupos acetilos, mayor es la tolerancia del espermatozoide a los procesos de congelación y descongelamiento (Ortega, 2001, p. 13).

En un estudio realizado por Parks & Lynch (1992 citado en Ortega, 2001, p. 13) se determinó que el semen equino contiene menor porcentaje de colesterol que el semen bovino o porcino, por lo tanto, tienen menor tolerancia a los descensos de temperatura durante la crioconservación.

La relación del colesterol y los fosfolípidos de la membrana plasmática del semen equino es una característica que se asocia con la sensibilidad de las células espermáticas durante los descensos de temperatura, es así que, altas cantidades de colesterol en la membrana reducen la temperatura a la que se da la transición de fase (líquido a gel) manteniendo un estado más fluido a bajas temperaturas y previniendo los daños celulares (Mesa & Henao, 2011, p. 2909).

La integridad de la membrana plasmática se evalúa mediante una prueba hipo osmótica (HOS) en la que se somete al semen equino a condiciones hipo osmóticas y solo los espermatozoides biológicamente activos permiten el ingreso de agua y presentarán turgencia; la presencia de agua se muestra solo en la cola y crea enrollamientos como señal de que el agua ha sido transportada de manera fisiológica en la célula en el mecanismo de equilibrio entre los líquidos internos y del entorno extracelular, la integridad de la membrana plasmática es indispensable para que se dé la reacción acrosómica durante la fertilización (Restrepo, 2013, pp. 118-119).

CAPITULO III

3. MARCO METODOLÓGICO

3.1. Localización y duración del experimento

El trabajo de campo de la presente investigación se realizó en la estación experimental Tunshi de la ESPOCH ubicada en la parroquia Licto, al suroeste del cantón Riobamba, provincia de Chimborazo con una duración de 60 días en donde se realizó la extracción, evaluación del semen fresco, procesamiento y congelación, evaluación de semen post congelación y análisis estadístico.

En la tabla 1-3 se muestran las condiciones meteorológicas que presenta el cantón Riobamba lugar donde se realizó la evaluación del semen.

Tabla 1-3: Condiciones meteorológicas del cantón Riobamba

Temperatura °C	8-19°C
Precipitación anual	4417 mm
Humedad relativa %	88-81%
Altitud m.s.n.m	2754msnm

Fuente:(ESPOCH.,2017)

Realizado por: (León, 2023)

3.2. Materiales, equipos e instalaciones

3.2.1. *Materiales de campo*

- Overol
- Botas
- Sogas
- Esfero
- Cuaderno
- Vagina artificial para equinos
- Recipiente colector de semen equino
- Papel aluminio
- Guantes de látex
- Termo y recipiente colector de agua

3.2.2. *Materiales de laboratorio*

- Tubos de centrifugación
- Puntas de micropipetas
- Colorantes (eosina y nigrosina)
- Jeringas y agujas
- Diluyente
- Placas cubre y porta objetos
- Pajillas de 0,25cc
- Hielo
- Hielera
- Tubos eppendorf
- Vasos de precipitación
- Agua inyectable
- Papel Filtro
- Polvo polivinílico
- Balón aforado
- Rack de pajillas
- Cámara de Neubauer
- Pinzas
- Nitrógeno líquido
- Papel tornasol
- Cooler
- Huevo

3.2.3. *Equipos de laboratorio*

- Centrifugadora
- Microscopio óptico con pantalla integrada
- Platina calefactora
- Micropipetas
- Baño maría
- Termómetro
- Termo de nitrógeno líquido
- Balanza analítica
- Agitador magnético

3.2.4. Reactivos

- Citrato de Sodio
- Fructosa

3.2.5. Instalaciones

Trabajo de campo

Estación experimental Tunshi- ESPOCH

Trabajo de laboratorio

- Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Pecuarias – ESPOCH.

3.3. Unidades experimentales

Se prepararon a dos equinos reproductores de diferentes razas y edades; Anglo Árabe (14 años) y PSI (9 años) en donde se realizaron 3 extracciones de cada macho con un intervalo de 8 días por colecta. De cada extracción se evaluaron 10 pajillas por macho y por tratamiento teniendo un total de 180 unidades experimentales (pajillas) evaluadas.

3.4. Mediciones experimentales

3.4.1. Pre-congelacion (semen fresco)

- Volumen de eyaculado (ml)
- pH
- Concentración espermática (spz/ml)
- Motilidad masal (%)
- Motilidad individual (%)

3.4.2. Post- Congelación (Semen descongelado)

- Motilidad individual (%)
- Morfoanomalias (%)
- Integridad de la membrana espermática (%)

3.5. Técnicas estadísticas

Los resultados obtenidos fueron sometidos al siguiente análisis estadístico:

- Estadística descriptiva
- Análisis de varianza (ADEVA).
- Separación de medias según Tukey ($p < 0,05$)

3.6. Diseño experimental

Se conto con 2 machos equinos de la raza Anglo Árabe y Pura sangre inglés (PSI) en los cuales se determinó el mejor protocolo de crioconservación de semen mediante la variación en los tiempos y fuerzas g en la centrifugación.

Se trabajó en dos momentos:

3.6.1. Colecta y evaluación de semen fresco

Aquí se trabajó con un diseño de bloques completos al azar en donde cada bloque correspondió a los machos utilizados en el experimento.

El modelo responde al siguiente modelo aditivo:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + B_j + E_{ij}$$

- Y_{ij} = Valor estimado de la variable
- μ = Es la media general
- T_i = Efecto de las líneas genéticas de equinos
- B_j = Efecto de los bloques
- E_{ij} = Efecto del error experimental.

3.6.2. Evaluación de semen post congelación

En este momento se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo combinatorio de factores, en donde el factor A correspondió a los tiempos y fuerzas g en la centrifugación y el factor B correspondió a la línea genética equina.

El modelo responde al siguiente modelo lineal aditivo:

$$Y_{ij} = \mu + A_i + B_j + AB_{ij} + E_{ijk}$$

- Y_{ij} = Valor estimado de la variable
- μ = Es la media general
- A_i = Efecto de la línea genética
- B_j = Efecto del protocolo de crioconservación de semen equino
- AB_{ij} = Efecto de la interacción entre las líneas genéticas y los protocolos de crioconservación de semen
- E_{ijk} = Error experimental

En la siguiente tabla 2-3 se muestra el esquema del experimento (semen fresco) y en la 3-3 el esquema del experimento (semen post- congelación)

3.6.3. Esquema del Experimento (semen fresco)

Tabla 2-3. Esquema del experimento (semen fresco)

LINEA GENÉTICA/BLOQUES	Código	Repeticiones	T.U.E*	T.U.E/ TRAT
Anglo Árabe (1)	T1	3	1	3
PSI (2)	T2	3	1	3
TOTAL				6

Realizado por: (León, 2023)

3.6.4. Esquema del Experimento (semen post-congelación)

Tabla 3-3. Esquema del experimento (semen post-congelación)

Protocolos de crioconservación	Machos	Código	Repeticiones	T.U.E*	T.U.E/TRAT
A1 1 (15min-2000 RPM)	1 (B1)	A1B1	3	10	30
	2 (B2)	A1B2	3	10	30
A2 2 (20min-1500 RPM)	1 (B1)	A2B1	3	10	30
	2 (B2)	A2B2	3	10	30
A3 3 (25min-1000 RPM)	1 (B1)	A3B1	3	10	30
	2 (B2)	A3B2	3	10	30
TOTAL					180

Realizado por: (León, 2023)

En la tabla 4-3 se muestra el esquema del ADEVA Pre-congelación y en la tabla 5-3 esquema del ADEVA post-congelación.

3.6.5. Esquema del ADEVA pre-congelación

Tabla 4-3. Esquema del ADEVA Pre-congelación (Semen fresco)

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD
Total	n-1= 5
Repeticiones	r-1= 2
Tratamientos	r-1= 1
Error	(t-1) (r-1) = 2

Realizado por: (León, 2023)

3.6.6. Esquema del ADEVA post-congelación

Tabla 5-3. Esquema del ADEVA post-congelación

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD
TOTAL	$n-1= 59$
Tiempos/ Fuerzas G	$a-1= 2$
Línea genética	$b-1= 1$
(AB)	$(a-1)(b-1) = 2$
Error	$ab(r-1) = 54$

Realizado por: (León, 2023)

3.7. Procedimiento experimental

- La investigación comenzó con la preparación de los equinos (Anglo árabe y Pura sangre ingles) en la estación experimental Tunshi de la ESPOCH que consistió en la desparasitación y vitaminización 15 días antes de la primera extracción con el fin de que estén vigorosos y obtener un semen de mejor calidad.
- Transcurrido el tiempo requerido se prepararon los equipos necesarios tanto de campo como de laboratorio para la primera extracción y análisis del semen.
- Antes del proceso de extracción se preparó el diluyente llamado RAMP PLUS con un volumen de 90 ml. El procedimiento consistió en adicionar 81 ml de agua estéril a 37°C al diluyente en polvo, se homogenizó por un periodo de 10 minutos, luego se adicionó 4.5 ml de yema de huevo se volvió a homogenizar, se dividió la cantidad necesaria para diluir semen fresco y para la centrifugación.
- Se armó una vagina artificial (Colorado) para la extracción, para esto se utilizó una camisa, manga interior y tubo colector sellado con papel aluminio para que no ingresen los rayos del sol y no afecte la calidad espermática.
- Se aplicó agua caliente a 55 °C dentro de la camisa y una presión considerable para que simule las condiciones naturales de la vagina equina.
- Una vez preparado los equipos para la extracción de semen se utilizó a una yegua en celo para estimular la libido del macho, esta se sujetó de las patas traseras como de la cabeza para mantenerla estática y para una mayor seguridad.
- Al momento de la monta del equino se desvió el pene para introducirlo en la vagina artificial y recolectar la muestra.

- Se tomó los datos necesarios del semen fresco en las instalaciones de la estación Experimental Tunshi y se preparó la muestra mediante una dilución 1:1 V/V para trasladarla al Laboratorio de Reproducción Animal FCP - ESPOCH.
- En el laboratorio de Reproducción Animal de la Espoch se realizaron las alícuotas correspondientes a los diferentes tratamientos en vasos de precipitación para así realizar los diferentes protocolos de centrifugación.
- Una vez centrifugado el semen con cada uno de los protocolos se tomó con una micropipeta el pellet que se formó en el tubo de centrífuga al fondo del mismo para diluirlo en el diluyente para su crioconservación CRIO RAMP.
- Cada tratamiento fue empajillado en pajillas de 0,25 cc identificándolas con colores diferentes.
- Se utilizó polvo polivinílico para sellar las dosis y se dejó una burbuja de aire de 1 cm aproximadamente antes de sellar las dosis.
- La curva de enfriamiento inició colocando las pajillas en un cooler con agua a 4°C durante 4 horas.
- Una vez transcurridas las 4 horas de enfriamiento las pajillas fueron colocadas en un rack para ser sometidas a vapor de nitrógeno líquido durante 6 minutos a 6 cm del nitrógeno y durante 4 minutos a 4 cm del nitrógeno.
- Pasado este tiempo se colocaron las pajillas en el tanque de nitrógeno líquido para su posterior evaluación post congelación.
- La descongelación se realizó en agua a 37°C durante 45 segundos para posteriormente evaluar las características microscópicas.
- Para la integridad de la membrana se utilizó el test hipo osmótico de host preparando una solución de citrato de sodio y una solución de fructosa para la incubación del semen en un baño maría a 37°C durante 20 minutos y su posterior observación en el microscopio.

3.8. Metodología de la evaluación

3.8.1. Pre-congelación (semen fresco)

3.8.1.1. Volumen de eyaculado (ml)

Permite determinar la cantidad de semen que se tiene por eyaculado, en este caso el volumen se determinó en el recipiente colector utilizado en cada una de las extracciones.

3.8.1.2. pH

El pH se evaluó en el laboratorio colocando una gota de semen puro sobre papel tornasol y observando la coloración determinamos la escala en la que se encontró la muestra.

3.8.1.3. Concentración espermática (spz/ml)

La concentración espermática hace referencia a la cantidad de espermatozoides presentes en cada ml de semen, para esta evaluación se utilizó una cámara Neubauer, esta tiene la característica de tener en su centro una microcámara formada por 5 cuadrados verticales y 5 horizontales dando un total de 25 cuadrados, para el conteo se tomó en cuenta únicamente los 4 extremos más una del centro, luego se sumaron los 5 datos y se aplicó en la siguiente fórmula.

$$\text{Concentración spz/ml} = \# \text{ spz contados totales} \times 5 \times 10 \times 1000 \times 100$$

3.8.1.4. Motilidad masal (%)

La motilidad masal se mide en escala del 1 al 5, se determinó en el microscopio a 4x lo que permitió observar la cantidad de remolinos producidos por los espermatozoides, mientras más vigorosos fueron se le dio una calificación más alta.

3.8.1.5. Motilidad individual (%)

La motilidad individual permite evaluar parámetros como la capacidad de moverse, la trayectoria y el tipo de movimiento que tienen los espermatozoides, esta evaluación se realizó en el microscopio con el objetivo de 10x permitiendo observar la cantidad de individuos que tenían estas características dándoles la valoración respectiva.

3.8.2. Post- Congelación (Semen descongelado)

3.8.2.1. Motilidad individual (%)

La motilidad individual se valora de forma subjetiva en un rango de 15% como mínimo y 70% como máximo, es decir, se determinó de forma visual en el microscopio a temperatura de 37°C permitiendo darles la valoración correspondiente a las pajuelas de cada tratamiento post-congelación.

3.8.2.2. Morfoanomalias

Las morfoanomalias permite determinar la cantidad de espermatozoides que presentan anomalías en su estructura, para su evaluación se utilizó una gota de semen descongelado tiñéndola con una gota de colorante llamado Eosina-Nigrosina, se realizó un frotis y se dejó secar la muestra. Una vez lista la muestra fue llevada al microscopio con el objetivo a 40x y se realizó el conteo de espermatozoides totales en un lugar específico y mediante otro conteo en el mismo lugar se evaluó a los espermatozoides que tenían: cabeza grande, cabeza pequeña, sin cola, dos cabezas, dos colas, cola retorcida con el fin de determinar el total que presentaban estas anomalías, los valores recopilados fueron aplicados en la siguiente fórmula:

$$\text{Morfoanomalias (\%)} = \frac{\# \text{Espermatozoides con anomalías} \times 100}{\# \text{Espermatozoides totales}}$$

3.8.2.3. Integridad de la membrana plasmática (%)

La integridad de la membrana permite determinar la cantidad de espermatozoides viables después de la congelación en cada protocolo. Para la valoración se utilizó el test Hipo osmótico (HOST) que consistió en preparar una solución de fructosa al 1.7% (solución A) en 50ml de agua estéril y una solución de Citrato de Sodio al 0.735% (solución B) en 50ml de agua estéril. De la preparación total de cada solución se tomó 0.5ml de la solución (A) con 0.5ml de la solución (B), al que se le agregó una pajueta descongelada mezclándolos homogéneamente en un tubo eppendorf y se incubó durante 20 minutos en agua a 37°C. Posterior a la incubación se tomó una muestra de 10 µL con la micropipeta para determinar en el microscopio el número de espermatozoides que tenían la cola enrollada y cabezas hinchadas que representan a aquellos que presentan membrana espermática íntegra. A los datos obtenidos se les aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Int. Membrana (\%)} = \frac{\# \text{Espermatozoides con cola enrollada} \times 100}{\# \text{Espermatozoides totales}}$$

CAPITULO IV

4. MARCO DE ANALISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS

4.1 *Pre-congelación de semen (semen fresco)*

Tabla 1-4. Tabla de resumen de los resultados obtenidos en las variables

VARIABLES	Anglo árabe	PSI	t Student	Probabilidad	Sig.
Volumen del eyaculado (ml)	66,66	58,33	0,34	2,91	ns
pH	6,66	6,83	0,21	2,91	ns
Concentración espermática (spz/ml)	753.333,333	916.666,667	-2,71	0,05	ns
Motilidad masal	4	4	-----	-----	ns
Motilidad individual (%)	78,33	76,66	0,37	0,37	ns

Realizado por: (Leon,2023)

4.1.1 *Volumen del eyaculado (ml)*

Al analizar la variable volumen del eyaculado (ml) para la raza anglo árabe se obtuvo un promedio de 66.66 ml y para la raza Ingles pura sangre de 58,33 ml en donde no se encontraron diferencias estadísticas significancias ($p > 0,05$). Al respecto Jiménez (2022, p. 18) en su estudio denominado “Correlación entre el diámetro escrotal y características seminales en el caballo peruano de paso en cuatro criaderos de la Costa” determinó que el volumen promedio del eyaculado de la raza anglo Árabe fue de 49 ml y de la raza Ingles pura sangre de 52 ml, resultados que difieren a los obtenidos en la presente investigación, posiblemente se deba a la edad de los equinos, alimentación, clima o a su vez al método de extracción.

Aznarán (2019, p. 33) en su investigación de “Relación entre el volumen testicular, volumen del eyaculado y concentración espermática en caballos inscritos en la asociación de criadores y propietarios del caballo peruano de paso-Lambayeque” consiguió un volumen promedio de eyaculado (ml) en equinos de diferentes razas de 52,65 ml resultados que se encuentran relacionados con los de este estudio y a los obtenidos por Jiménez (2022, p.18) cuyo promedio fue 49 ml para la raza anglo árabe y 52 ml para el Ingles pura sangre.

Finalmente (Giraldo, et al.,2022, p. 26) en su estudio “Comparación de los de los parámetros

espermáticos con la capacidad de producción espermática mediante medición testicular en sementales del criadero la Marqueza de Tenjo Cundinamarca” obtuvo un promedio de 103 ml de diferentes reproductores y razas equinas, lo cual estos resultados difieren a los obtenidos en la presente investigación probablemente por el tipo de alimentación, clima, raza o posiblemente por que el método de extracción no fue con vagina artificial o a su vez por la misma edad de los equinos.

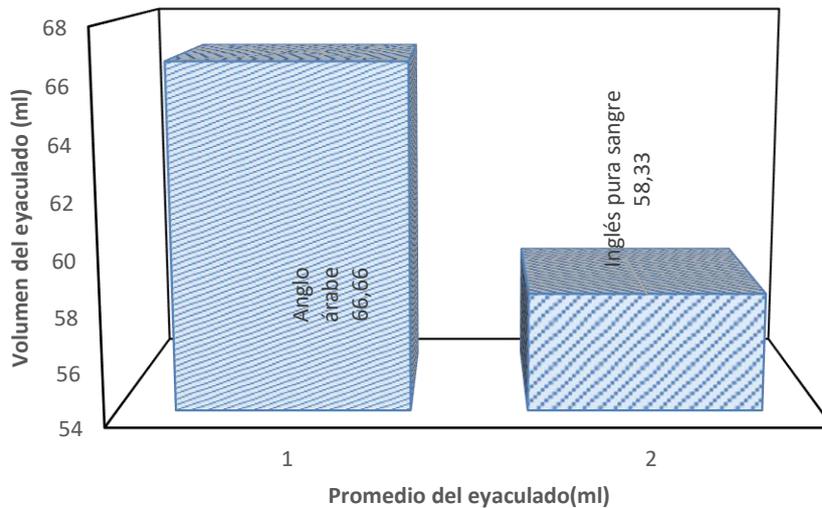


Ilustración 1-4: Volumen del eyaculado (ml)

Elaborado por: León, (2023).

4.1.2 pH

Al analizar la variable pH no se encontraron diferencias estadísticas significativas en los resultados, donde para la raza Anglo árabe se obtuvo un promedio de 6,67 y para la raza Inglés pura sangre de 6,83. Al respecto Pérez, et al., (2017, p. 5) en su investigación “Congelación de semen equino Bajo Dos Esquemas De Adición de Dimetilformamida” obtuvo un pH promedio de 7 resultados que difieren de la presente investigación posiblemente por que el método de recolección no fue con vagina artificial o a su vez porque el análisis no fue con papel tornasol.

Por lo contrario, Albarracín, et al., (2021, p. 7) en su investigación denominada “Evaluación comparativa de la calidad seminal de la raza cuarto de milla frente al caballo mestizo en la finca el secreto de la verada Maporita del Municipio de Arauca” obtuvo un pH promedio de 7 resultados que difieren a los obtenidos en la presente investigación posiblemente por los métodos de recolección, raza de equino, concentración espermática o análisis de semen.

Gonzales (2018, p. 9) en su tesis denominado “Evaluación de Espermatozoides de equino mediante una prueba de resistencia Osmótica) menciona que el pH equino esta relacionado con la concentración espermática debido a que a mayor número de espermatozoides hay por ml será más acido debido a la actividad que tendrán por lo que posiblemente nuestros resultados difieran a los anteriores por este estudio.

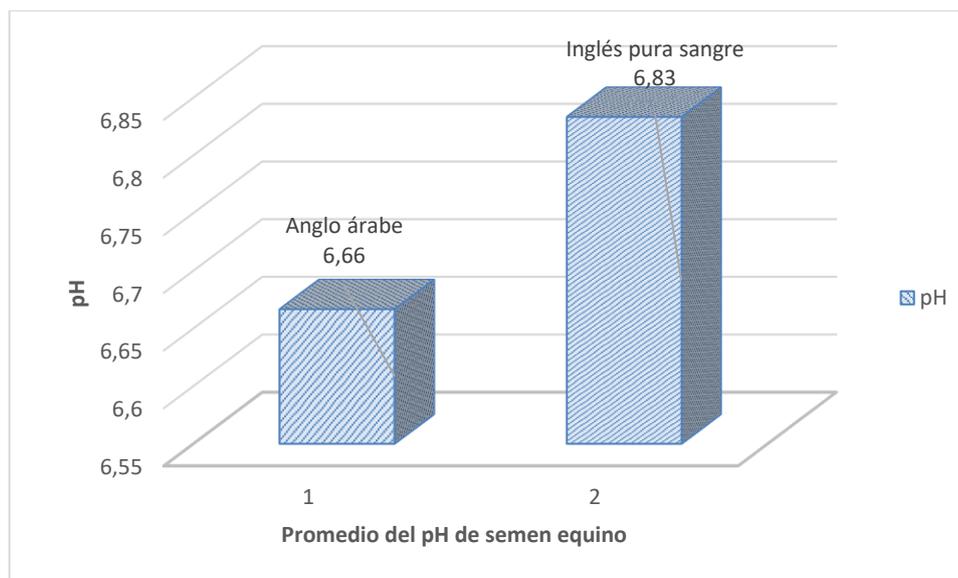


Ilustración 2-4: pH

Elaborado por: (León, 2023)

4.1.3 Concentración espermática (spz/ml)

Al evaluar la concentración espermática (spz/ml) para la raza anglo árabe se obtuvo un promedio de 753,33 millones spz/ml y para el Ingles pura sangre de 916,66 millones spz/ml donde no se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p > 0,05$) en los resultados. Al respecto Jiménez (2022, p. 19) en su tesis denominado “Correlación entre el diámetro escrotal y características seminales en el caballo peruano de paso en cuatro criaderos de la Costa” obtuvo un promedio para la raza anglo árabe de 367 millones spz/ml y 364 millones spz/ml para el Ingles pura sangre resultados que difieren con a los obtenidos en la presenten investigación, esto posiblemente se deba al método de evaluación que utilizaron para su análisis fue a través de un analizador digital de células o a su vez el tiempo transcurrido para la conteo disminuyo la calidad espermática.

Albarracín (et al.,2022, p. 7) en su investigación denominado “Evaluación comparativa de la calidad seminal de la raza cuarto de milla frente al caballo Mestizo en la finca el secreto de la

verada Maporita del Municipio de Arauca” obtuvo un promedio de 694 millones spz/ml resultados que se encuentran por debajo a los obtenidos en la presente investigación, posiblemente se deba al tamaño testicular, la forma de colecta o a su vez por la edad de los sementales.

Pérez, et al., (2017, p. 5) en su investigación “Congelación de semen equino bajo dos Esquemas de adición de dimetilformamida” obtuvo un promedio de 243,2 millones spz/ml resultados inferiores a los obtenidos en la presente investigación posiblemente por la raza de los equinos, tamaño testicular o la edad de los equinos.

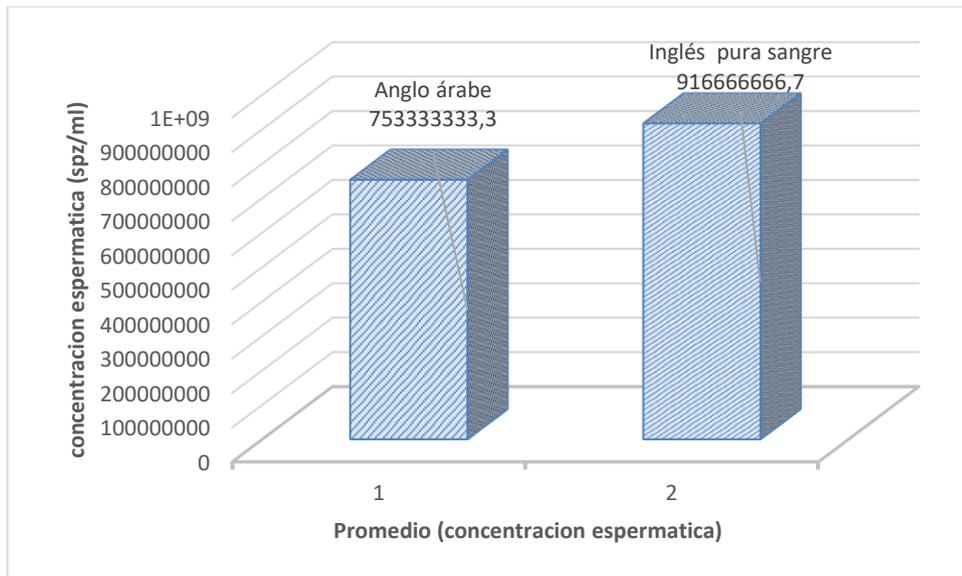


Ilustración 3-4: Concentración espermática (spz/ml)

Elaborado por: (León, 2023).

4.1.4 Motilidad masal (escala 1-5)

Al analizar la variable motilidad masal en la presente investigación para la raza anglo árabe se obtuvo un promedio de 4 y para la raza Ingles pura sangre de 4 teniendo resultados iguales. Al respecto (Luzko, et al., 2018, p. 5) en su tesis denominada “Crio preservación seminal en equinos: Efecto de la Thehalosa sobre la célula espermática” obtuvo un promedio en la motilidad masal de 4 resultados que se asemejan a los obtenidos en la presente investigación.

Miró (2015, p. 81) en su tesis llamada “Análisis demográfico y caracterización seminal del caballo de las retuertas de Doñana” obtuvo un promedio de motilidad masal de 4 resultados que se asemejan a los obtenido en la presente investigación.

Finalmente, Pérez, et al., (2017, p. 5) en su investigación denominado “Congelación de semen equino bajo dos esquemas de adición de Dimetilformamida” obtuvo un promedio de 3 resultados

que difieren a los obtenidos en la presente investigación posiblemente por que el método de extracción no se realizó con vagina artificial, condiciones climáticas, forma de colecta, raza de los equinos o a su vez por el tiempo de análisis.

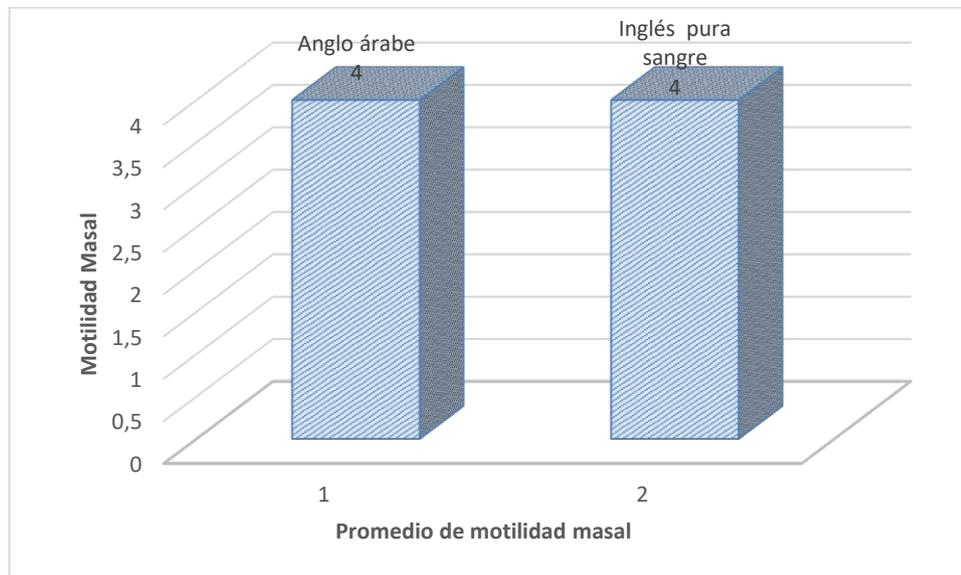


Ilustración 4-4: Motilidad masal (escala 1-5)

Elaborado por: (León, 2023)

4.1.5 Motilidad individual (%)

Al evaluar la variable motilidad individual en semen fresco para la raza Anglo árabe se obtuvo un promedio de 78,3% y para el Inglés pura sangre de 76,6% donde no se encontraron diferencias estadísticas significativas en los resultados. Al contrario Albarracín (2021, p.7) en su estudio llamado “Evaluación comparativa de la calidad seminal de la raza cuarto de milla frente al caballo mestizo en la finca el secreto de la verada maporita del municipio de Arauca” obtuvo un promedio en sus resultados de 37,5% resultados que difieren a los obtenidos en la presente investigación posiblemente por las condiciones medio ambientales del lugar, método de colecta del semen, edad de los sementales o a su vez por los intervalos de extracción.

Luzko (2018, p. 5) en su investigación denominado “Crio preservación seminal en equinos: Efecto de la Trehalosa sobre la célula espermática” obtuvo un promedio de 69% resultados que difieren a los obtenidos en la presente investigación posiblemente por la edad de los equinos, condiciones medio ambientales o a su vez no se utilizó vagina artificial para su extracción.

Jiménez (2022, p. 49) en su experimento “Correlación entre el diámetro escrotal y características seminales en el caballo peruano de paso en cuatro criaderos de la Costa” obtuvo un promedio de 77,9 % resultados que se asemejan a los obtenido en la presente investigación.

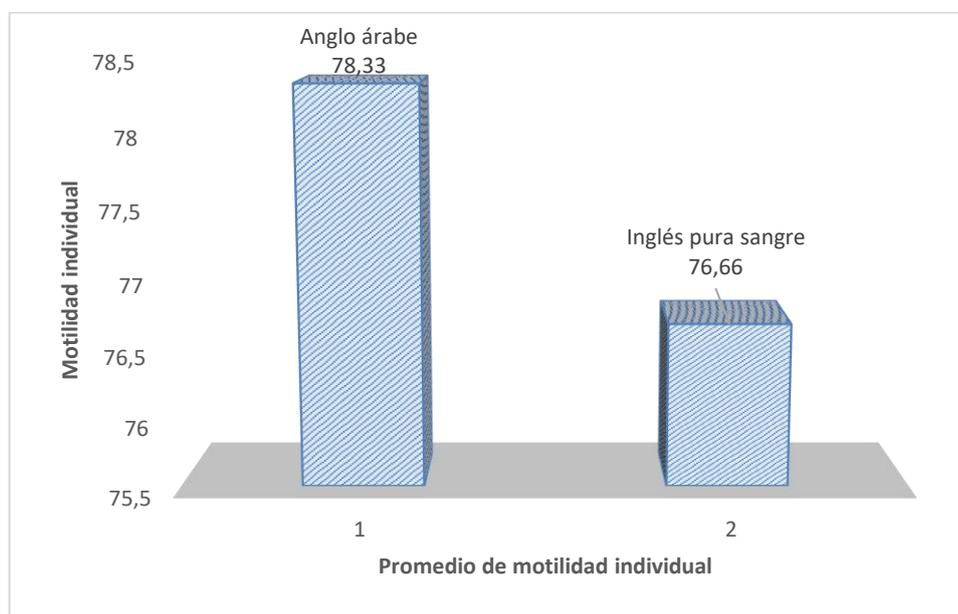


Ilustración 5-4: Motilidad individual (%)

Elaborado por: (León, 2023)

4.2 Semen post-congelación (semen descongelado)

Tabla 2-4. Tabla de resumen de los resultados obtenidos en las variables

Variables	T1	T2	T3	Probabilidad	E.E	Sig.
Motilidad individual	21,17	36,17	61,75	0,00	2,09	**
Morfoanomalias	45,63	41,25	42,12	0,12	3,85	ns
Integridad de la membrana espermática	25,43	41,50	50,07	0,00	3,78	**

Realizado por: (León,2023)

4.2.1 Motilidad individual (%)

Al analizar la variable motilidad individual (%) se encontraron diferencias estadísticas altamente significativas ($p < 0,01$) en donde el mejor tratamiento fue el T3 con un valor de 61,75% seguido del T2 con un 36,17% y los valores más bajos los obtuvo el T1 con un valor de 21,17%. Al respecto Jiménez (2022, p. 48) en su estudio denominado “Correlación entre el diámetro escrotal y

características seminales en el caballo peruano de paso en cuatro criaderos de la costa” obtuvo un promedio en la motilidad individual para equinos criollos de un 52% resultados que difieren a los obtenidos por el T3 en la presente investigación posiblemente por la raza de los equinos, método de congelación o el tipo de diluyente utilizado en la centrifugación.

Ávila (2009, p. 27) en su artículo “Efecto de la congelación y descongelación de semen equino, en dos diluyentes comerciales” obtuvo un promedio de 45% de motilidad individual resultados que se asemejan a los obtenidos en la presente investigación.

Pérez, et al., (2017, p. 5) en su estudio denominado “Congelación de semen equino bajo dos esquemas de adición de Dimetilformamida” determino un promedio de 41,0% en el T1 y en el T2 un 25% resultados que se asemejan a los obtenidos en el T1 y T2 de la presente investigación.

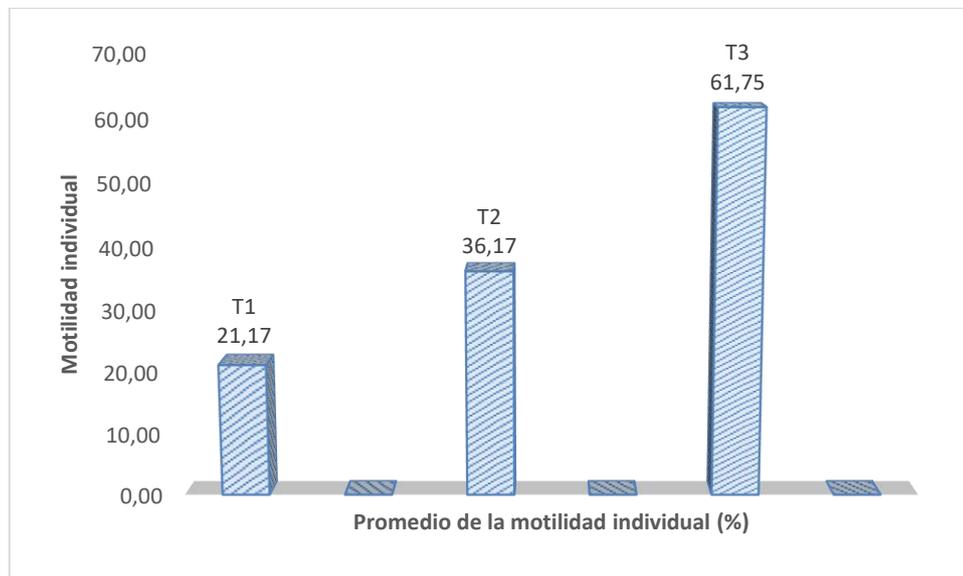


Ilustración 6-4: Motilidad individual (%)

Elaborado por: (León,2023)

4.2.2 Morfoanomalias (%)

Al evaluar la variable Morfoanomalias (%) se determinó que no existen diferencias estadísticas significativas sin embargo el T1 reporto el mayor valor con un 45.63% seguido del T3 con un 42,12% y finalmente el T2 con un 41,25%. Al respecto Jiménez (2022, p. 34) en su estudio denominado “Correlación entre el diámetro escrotal y características seminales en el caballo peruano de paso en cuatro criaderos de la costa” obtuvo un promedio para la raza anglo árabe de 46% y para el Inglés pura sangre un 52% resultados que se asemejan a los obtenido en los tratamientos de la presente investigación.

Por otra parte, Usuga (2016, p. 6) en su documento denominado “Criotolerancia de semen equino, estabilidad oxidativa y componentes del plasma seminal” obtuvo un promedio de 33.16% de morfoanomalías resultados que difieren a los obtenidos en la presente investigación posiblemente por la edad de los equinos, métodos de congelación, evaluación o a su por la raza de los sementales.

Méndez (2015, p. 25) en su estudio denominado “Efecto de un gradiente de centrifugación sobre la calidad de semen equino” menciona que en promedio un semental debe tener un 50% de espermatozoides morfológicamente normales además dice que esto dependerá mucho de la edad de los equinos y la época del año resultado que se asemeja a los obtenidos en la presente investigación.

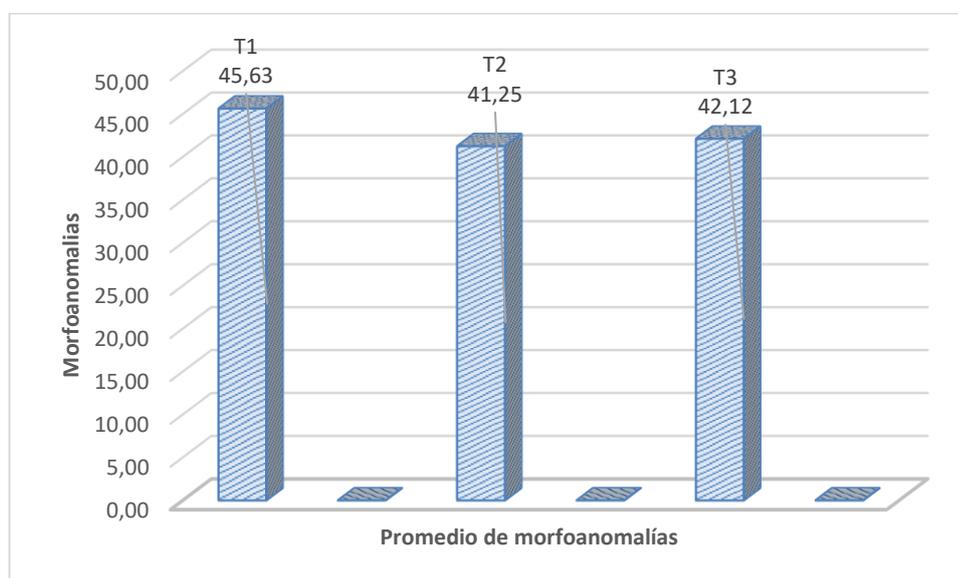


Ilustración 7-4: Morfoanomalías (%)

Elaborado por: (León, 2023)

4.2.3 Integridad de la membrana espermática (%)

Al analizar la variable Integridad de la membrana espermática (%) se encontraron diferencias estadísticas altamente significativas en donde el mejor resultado obtuvo el T3 con un 50,07% seguido del T2 con 41,50% y finalmente el T1 con un 25,43%. Al respecto Miró (2015, p. 104) en su estudio denominado “Análisis demográfico y caracterización seminal del caballo de las Retuertas de Doñana” obtuvo los siguientes resultados en tres tratamientos reportando en el T0 un 57,31% seguido del T1 control con 47,52% y el ultimo T1 (SO4Fe) con un 33,27% resultados que difieren a los obtenidos en la presente investigación posiblemente porque no se utilizaron los mismos protocolos de centrifugación, curvas de congelación o por la utilización de otro diluyente.

Pérez (2017, p. 924) en su investigación denominado “Congelación de semen equino bajo dos esquemas de adición de Dimetilformamida” obtuvo los siguientes resultados reportando para el T1 un 39,4% y para el T2 un 47,0% resultados que difieren a los obtenidos en la presente investigación posiblemente por el tipo de diluyente utilizado o por diferentes protocolos de centrifugación.

Finalmente, Barriga (et al., 2019, p. 7) en su estudio denominado “Evaluación de Lipoproteínas de baja densidad y yema de huevo como crioprotectores no penetrantes en semen de caballo peruano de paso” obtuvo los siguientes resultados en el T1 un 42,1% y el T2 un valor de 59,3% resultados que difieren a los obtenidos en la presente investigación posiblemente por el tipo de diluyente utilizado, método de criopreservación o a su vez diferentes protocolos de centrifugación.

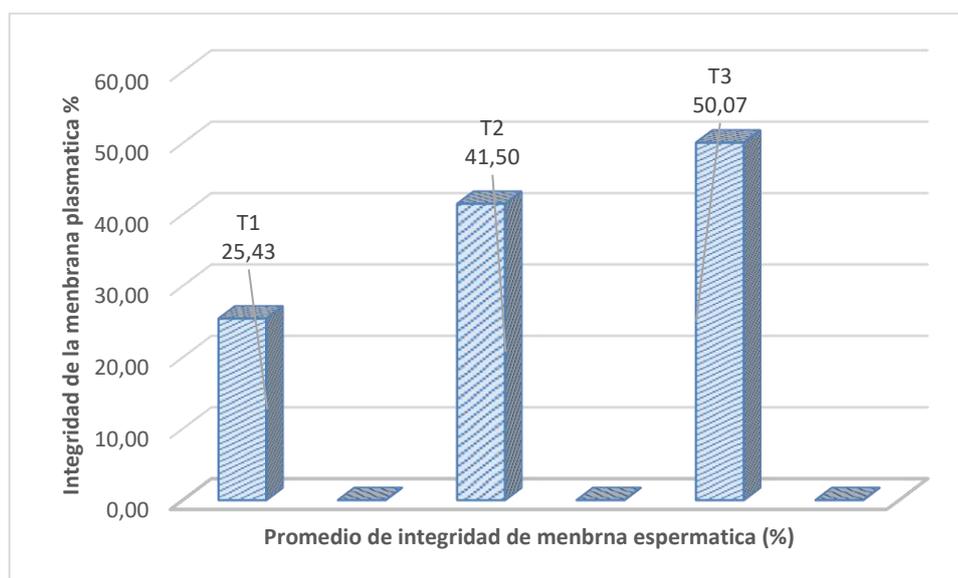


Ilustración 8-4: Integridad de la membrana espermática (%)

Elaborado por: (León, 2023)

4.2.4 Costo de la biotecnología

Al determinar el costo de la biotecnología aplicada se determinó que el valor total fue de \$438,90 dólares americanos los cuales contemplan todos los materiales e insumos utilizados en el desarrollo de la presente investigación.

En la tabla 3-4 se detallan los materiales utilizados en la investigación como la cantidad, unidad, costo unitario y costo total de la biotecnología.

Tabla 3-4. Materiales e insumos utilizados

MATERIALES E INSUMOS UTILIZADOS				
DETALLE	CANTIDAD	UNIDAD	COSTO UNITARIO	COSTO TOTAL
Puntas de micropipetas	300	Unidad	0,02	6
Agua bidestilada	8	Frasco de 500ml	3,80	28.80
Diluyente de semen equino	1	Unidad	150	150
Placas cobre y porta objetos	4	Caja de 50 unidades	3	
Pajillas de 0.25cc	400	Unidad	0,01	4
Jeringa y aguja	50	Unidad	0,40	20
Tubos eppendorf	400	Unidad	0,05	20
Vasos de precipitación	8	Unidad	3,75	30
Papel filtro	1	Caja x 50	12	12
Polvo polivinílico	1	Libra	12,50	12.50
Nitrógeno líquido	20	kg	3,80	76
Papel aluminio	2	Caja	3,50	7
Guantes de látex	1	Caja x 100	11	11
Papel tornasol	1	Caja	4	4
Cooler	1	Unidad	12	12
Huevo	12	Unidad	2,8	33.60
TOTAL				438.90 \$

Realizado por: (León, 2023).

CONCLUSIONES

- Al realizar la evaluación de tres protocolos de crioconservación de semen equino Anglo Árabe y Pura sangre inglés (PSI) en la estación experimental Tunshi de la ESPOCH, se determinó que el protocolo más eficiente fue el T3 (25min-1000 RPM) debido a que se obtuvieron mejores resultados en las variables motilidad individual con valores de 61,75% e Integridad de la membrana espermática con un 50,07% a comparación al protocolo T2 (20min-1500 RPM) donde se obtuvo valores de 36,17% en a motilidad individual y 41,50% en la integridad de la membrana espermática y los valores más bajos los reporto el T1 (15min-2000 RPM) con un 21, 17% en la motilidad individual y 25,43% en la integridad de la membrana espermática.
- Al utilizar 3 diferentes tiempos y fuerzas G en la centrifugación para la crioconservación de semen equino se determinó que en base a la variable integridad de la membrana, el protocolo correspondiente al T3 (25min- 1000 RPM) reporto menor daño con un valor 50,07% seguido de protocolo T2 (20min-1500 RPM) con un valor de 41,50% y finalmente el valor más bajo lo reporto el protocolo T1 (15min-2000 RPM) con un valor de 25,43 %.
- Se determinó que el costo total de la biotecnología aplicada fue de 438.90\$ dólares americanos, en el cual se contemplan todos los materiales e insumos utilizados.

RECOMENDACIONES

- Utilizar el protocolo de centrifugación correspondiente a 1000 revoluciones por minuto durante 25 minutos previo a la crioconservación de semen equino.
- Realizar una desparasitación y vitaminización a los machos al menos 15 días antes de realizar la extracción de semen y tenerlos fuera de cualquier actividad física excesiva.
- Evitar el contacto directo del semen recolectado con los rayos del sol debido a que los espermatozoides son fotosensibles y afectan directamente a la calidad espermática.
- Para tener éxito en la congelación de semen es importante controlar y realizar correctamente las curvas de congelación con los tiempos adecuados que son esenciales para el procedimiento de crio preservación.
- Para posteriores investigaciones se recomienda la utilización de diluyentes comerciales garantizados que le den una mayor resistencia a los espermatozoides al momento de la crioconservación y en especial a la descongelación.

GLOSARIO

Alzada: Término usado para definir la altura del caballo, considerando como base la línea del suelo en la parte posterior del casco de la mano del caballo hasta la parte más alta de la cruz (Ministerio de Agricultura, pesca y Alimentación de España, 2022).

Bilobulado: Que tiene dos lóbulos (Mesa & Henao, 2011).

Cruz: Prominencia de los cuadrúpedos ubicada en la porción anterior del espinazo o parte más alta del lomo del caballo (Mesa & Henao, 2011).

Flehmen: Rizado del labio superior y elevación de la cabeza en ciertos mamíferos como respuesta a estímulos olfativos (Ministerio de Agricultura, pesca y Alimentación de España, 2022).

Invaginación: Replegamiento interno de una membrana o una capa celular (Tissera et al., 2009).

Ungulado: Que tiene las patas terminadas en pezuña (Tissera et al., 2009).

Libido: Deseo sexual (Tissera et al., 2009).

BIBLIOGRAFÍA

1. **CASTRO CRUZ, Jefferson & CHACÓN JARAMILLO, Liliana.** “Generalidades del proceso de conservación de esperma equino: una revisión desde la congelación espermática”. *Conexión Agropecuaria* [en línea]. 2016, 6 (1), pp. 45-64. [Consulta: 25 marzo 2023]. Disponible en: <https://revista.jdc.edu.co/index.php/conexagro/article/download/54/52>
2. **CONTRERAS, Ramón.** *Los caballos* [blog]. 25 agosto 2014, La Guía – Biología. [Consulta. 14 marzo 2023]. Disponible en: <https://biologia.laguia2000.com/zoologia/los-caballos>
3. **CUMBRE PUEBLOS.** *Taxonomía de los caballos* [blog]. 24 septiembre 2018. [Consulta: 14 marzo 2023]. Disponible en: <https://cumbrepuebloscop20.org/animales/caballo/taxonomia/>
4. **CURIOSFERA.** *Razas de caballo.* [blog]. CurioSfera, 2022. [Consulta: 10 marzo 2023]. Disponible en: <https://curiosfera-animales.com/razas-de-caballos/>
5. **ELGUETA VERA, Constanza Javiera.** Actualización en técnicas de criopreservación de espermatozoides equinos (Trabajo de titulación) (Pregrado) [en línea]. Universidad de Las Américas, Facultad de Medicina Veterinaria y Agronomía, Escuela de Medicina Veterinaria. Santiago – Chile, 2018. [Consulta: 01 abril 2023]. Disponible en: <https://repositorio.udla.cl/xmlui/bitstream/handle/udla/282/a41740.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
6. **GONZÁLEZ, Kevin.** *Aparato reproductor del caballo* [blog]. Zoo Vet, 29 septiembre 2018. [Consulta: 12 marzo 2023]. Disponible en: https://zoovetesmpasion.com/caballos/reproduccion-del-caballo/aparato-reproductor-del-caballo#Glandulas_accesorias_del_caballo
7. **GONZÁLEZ, Nicolle; SÁNCHEZ, Juan; ARCE, Ismael; OPSINA, Mayra & RUIZ, Alejandro.** *Histología del aparato reproductor equino* [blog]. 03 diciembre 2020.

[Consulta: 20 marzo 2023]. Disponible en: <https://medicina-veterinaria-histologia.blogspot.com/2020/12/histologia-del-aparato-reproductor.html>

8. **INSTITUTO NACIONAL DEL CÁNCER.** *Hormona liberadora de gonadotropina* [blog]. 2022. [Consulta: 15 marzo 2023]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/hormona-liberadora-de-gonadotropina>
9. **INSTITUTO NACIONAL DEL CÁNCER.** *Crioconservación* [blog]. 2022. [Consulta: 12 marzo 2023]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/crioconservacion>
10. **MEGÍAS, Manuel; MOLIST, Pilar & POMBAL, Manuel.** *Órganos animales – ENDOCRINO* [en línea]. Universidad de Vigo – Facultad de Biología, 2019. [Consulta: 12 marzo 2023]. Disponible en: <https://mmegias.webs.uvigo.es/descargas/o-a-endocrino.pdf>
11. **MEGÍAS, Manuel; MOLIST, Pilar & POMBAL, Manuel.** *Tipos celulares: Espermatoгония* [blog]. 10 diciembre 2022. [Consulta: 15 marzo 2023]. Disponible en: <https://mmegias.webs.uvigo.es/8celulares/espermatoгония.php#:~:text=Las%20espermatoгонияs%20son%20las,l%C3%A1mina%20basal%20de%20esos%20t%C3%BAbulos.>
12. **MESA, Ana & HENAO, Guillermo.** “Efecto del colesterol y la dimetilformamida sobre parámetros postdescongelación en espermatozoides de caballos criollos colombianos”. *Revista MVZ Córdoba* [en línea]. 2012, 17 (1), pp. 2908 – 2915. [Consulta: 15 abril 2023]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/mvz/v17n1/v17n1a14.pdf>
13. **MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN.** *Raza equino caballar ANGLO-ÁRABE* [blog]. Madrid – España: 2022. [Consulta: 14 marzo 2023]. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/razas-ganaderas/razas/catalogo-razas/equino-caballar/anglo-arabe/usos_sistema.aspx

14. **MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN.** *Raza equina caballar PURA SANGRE INGLÉS* [blog]. Madrid – España: 2022. [Consulta: 10 marzo 2023]. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/razas-ganaderas/razas/catalogo-razas/equino-caballar/pura-sangre-ingles/datos_morfologicos.aspx

15. **MOROCHO FÁREZ, Ximena Susana.** “Caracterización de los sistemas de explotación equina en la provincia del Azuay” (Tesis) (Pregrado) [en línea]. Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Cuenca – Ecuador, 2018. [Consulta: 20 marzo 2023]. Disponible en: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/30015/3/Trabajo%20de%20titulacion.pdf>

16. **OCHOA GUILLEN, Juan Diego.** Efecto crioprotector de la dimetilformamida, glicerol y su combinacion sobre la criosupervivencia de espermatozoides equinos (Trabajo de Titulacion) (Pregrado) [en línea]. Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Cuenca – Ecuador, 2022. [Consulta: 01 abril 2023]. Disponible en: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/39449/1/Trabajo%20de%20Titulacion.pdf>

17. **ORTEGA FERRUSOLA, Cristina.** “Factores implicados en la variabilidad individual en la respuesta a la congelación del eyaculado equino: estructura de subpoblaciones, estrés oxidativo y cambios apoptóticos” (Tesis) (Doctora) [en línea]. Universidad de Extremadura, Facultad de Veterinaria, Departamento de Medicina Animal. Cáceres, 2011. [Consulta: 05 abril 2023]. Disponible en: https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=AhWeSjABHUXLA_kQFnoECAsQAQ&url=https%3A%2F%2Fbiblioteca.unex.es%2Ftesis%2F9788469494349.pdf&usg=AOvVaw0orMALiRjTduQ7m2CaAjtK

18. **PAREDES CAÑÓN, Astrid Lucila.** Determinación de la viabilidad espermática post-descongelamiento, bajo la adición fraccionada de dimetilformamida en caballo criollo colombiano (Tesis) (Pregrado) [en línea]. Universidad de La Salle, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Programa de Medicina Veterinaria. Bogotá – Colombia, 2015. [Consulta: 23 marzo 2023]. Disponible en:

https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1272&context=medicina_veterinaria

19. **PÉREZ ESTEBAN, Héctor.** Fisiología Animal II [en línea]. La Habana – Cuba: Universidad Nacional Agraria - Centro Nacional de Información y Documentación Agropecuaria, 2013. [Consulta: 21 marzo 2023]. Disponible en: <https://repositorio.una.edu.ni/2476/1/n150p438f.pdf>

20. **RAMÍREZ MONTENEGRO, José Amilcar.** “Determinación del fotoperiodo sobre la actividad ovárica en yeguas durante el año, en diferentes haras, en los departamentos de Guatemala, Sacatepéquez y Escuintla” (Tesis) (Pregrado) [en línea]. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Escuela de Medicina Veterinaria. Guatemala, 2006. [Consulta: 12 marzo 2023]. Disponible en: <http://www.repositorio.usac.edu.gt/4054/1/Tesis%20Med%20Vet%20Jos%C3%A9%20Amilcar%20Ram%C3%ADrez%20Montenegro.pdf>

21. **RANGEL NÚÑEZ, Edison Darío.** Análisis de técnicas de congelación de semen equino empleadas en la actualidad (Monografía) (Pregrado) [en línea]. Universidad Antonio Nariño, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Bogotá – Colombia, 2023. [Consulta: 20 marzo 2023]. Disponible en: http://repositorio.uan.edu.co/bitstream/123456789/7485/1/2023_Edison%20Dar%C3%ADo%20Rangel%20N%C3%BA%20B1ez.pdf

22. **REAL FEDERACIÓN ESPAÑOLA DE ASOCIACIONES DE GANADO SELECTO.** *Pura sangre inglés – Ganado equino caballar* [blog]. Ministerio de Agricultura, pesca y alimentación, 2021. [Consulta: 13 marzo 2023]. Disponible en: <https://rfeagas.es/razas/equino-caballar/pura-sangre-ingles/>

23. **RESTREPO BETANCUR, Giovanni; ÚSUGA SUÁREZ, Alexandra & ROJANO, Benjamín.** “Técnicas para el análisis de la fertilidad potencial del semen equino”. Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia [en línea]. 2013, 8 (1), pp. 115-127. [Consulta: 25 marzo 2023]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/cmvez/v8n1/v8n1a10.pdf>

24. **REYES LUNA, Erika Irais.** Características espermáticas del semen equino descongelado usando dos crioprotectores y su efecto según época del año en Baja California (Tesis) (Pregrado) [en línea]. Universidad Autónoma de Baja California, Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias. Baja California – México, 2019. [Consulta: 01 abril 2023]. Disponible en: <https://repositorioinstitucional.uabc.mx/bitstream/20.500.12930/2563/1/VET008347.pdf>
25. **SERRES DALMAU, Consuelo.** “Métodos tradicionales y alternativos de extracción de semen”. Revista Complutense de Ciencias Veterinarias [en línea]. 2022, pp. 125-134. [Consulta: 30 marzo 2023]. Disponible en: <https://revistas.ucm.es/index.php/RCCV/article/download/40091/38520>
26. **TREJOS SOTO, Arturo Adolfo.** “Manejo reproductivo del semental equino” (Monografía) (Pregrado) [en línea]. División Regional de Ciencia Animal, Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”. Coahuila – México, 2009. [Consulta: 15 marzo 2023]. Disponible en: [http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/2952/ARTURO%20ADOLFO%20TREJOS%20SOTO.pdf?sequ#:~:text=III%20APARATO%20REPRODUCTOR%20DELPara%20realizar%20la&text=Para%20su%20estudio%2C%20los%20C3%B3rganos,y%20pene%20\(Palma%202008\)](http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/2952/ARTURO%20ADOLFO%20TREJOS%20SOTO.pdf?sequ#:~:text=III%20APARATO%20REPRODUCTOR%20DELPara%20realizar%20la&text=Para%20su%20estudio%2C%20los%20C3%B3rganos,y%20pene%20(Palma%202008))
27. **TISSERA, Jorge; LOSINNO, Luis; AGUILAR, Javier & LUDUEÑA, Ricardo.** *Razas Equinas – Guía de trabajos prácticos* [en línea]. Argentina: Universidad Nacional de Río Cuarto (UNCR), 2009. [Consulta: 14 marzo 2023]. Disponible en: https://www.produccion-animal.com.ar/produccion_equinos/curso_equinos_I/22-razas_equinas_2009.pdf
28. **UNIVERSIDAD COMPLUTENSE MADRID.** *Adrenal – La estructura histológica* [blog]. Madrid – España, 2022. [Consulta: 11 marzo 2023]. Disponible en: [https://www.ucm.es/gradovet/adrenal#:~:text=Las%20adrenales%20son%20gl%C3%A9ndulas%20endocrinas,y%20la%20m%C3%A9dula%20\(m\).](https://www.ucm.es/gradovet/adrenal#:~:text=Las%20adrenales%20son%20gl%C3%A9ndulas%20endocrinas,y%20la%20m%C3%A9dula%20(m).)
29. **VÁSQUEZ ALTAMIRANO, Perla.** Influencia de la estación (invierno - primavera) sobre el volumen testicular y volumen del eyaculado en caballos inscritos en la Asociación de criadores y propietarios del caballo peruano de paso de Lambayeque

(Tesis) (Pregrado) [en línea]. Lambayeque – Perú, 2019. [Consulta: 10 marzo 2023].
Disponible en:
<https://repositorio.unprg.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12893/4540/BC-TES-3353%20VASQUEZ%20ALTAMIRANO.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- 30. WEMLI, Janine.** Actualidad sobre la congelación de semen equino y análisis de nuevas propuestas en la composición de los diluyentes – Reporte de caso: Artritis séptica en potros. (Tesis) (Pregrado) [en línea]. Universidad de La Salle, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Programa de Medicina Veterinaria. Bogotá – Colombia, 2010. [Consulta: 14 marzo 2023]. Disponible en:
https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1240&context=medicina_veterinaria

ANEXOS

ANEXO A: VISITA DE LOS EQUINOS EN LA ESTACIÓN EXPERIMENTAL TUNSHI DE LA ESPOCH.



ANEXO B: DESPARASITANTE Y MULTIVITAMÍNICO UTILIZADO EN LA PREPARACIÓN DE LOS EQUINOS



ANEXO C: EQUINO ANGLO ÁRABE DE ESTACIÓN EXPERIMENTAL TUNSHI DE LA ESPOCH



**ANEXO D: EQUINO PURA SANGRE INGLES DE LA ESTACIÓN EXPERIMENTAL
TUNSHI DE LA ESPOCH**



ANEXO E: VAGINA ARTIFICIAL EQUINA UTILIZADA PARA LA EXTRACCIÓN DE SEMEN.



ANEXO F: PREPARACIÓN DEL DILUYENTE (CRORAMP) Y EQUIPOS PARA EL ANÁLISIS DE SEMEN FRESCO



ANEXO G: ESTIMULACIÓN DE LA LIBIDO DEL MACHO



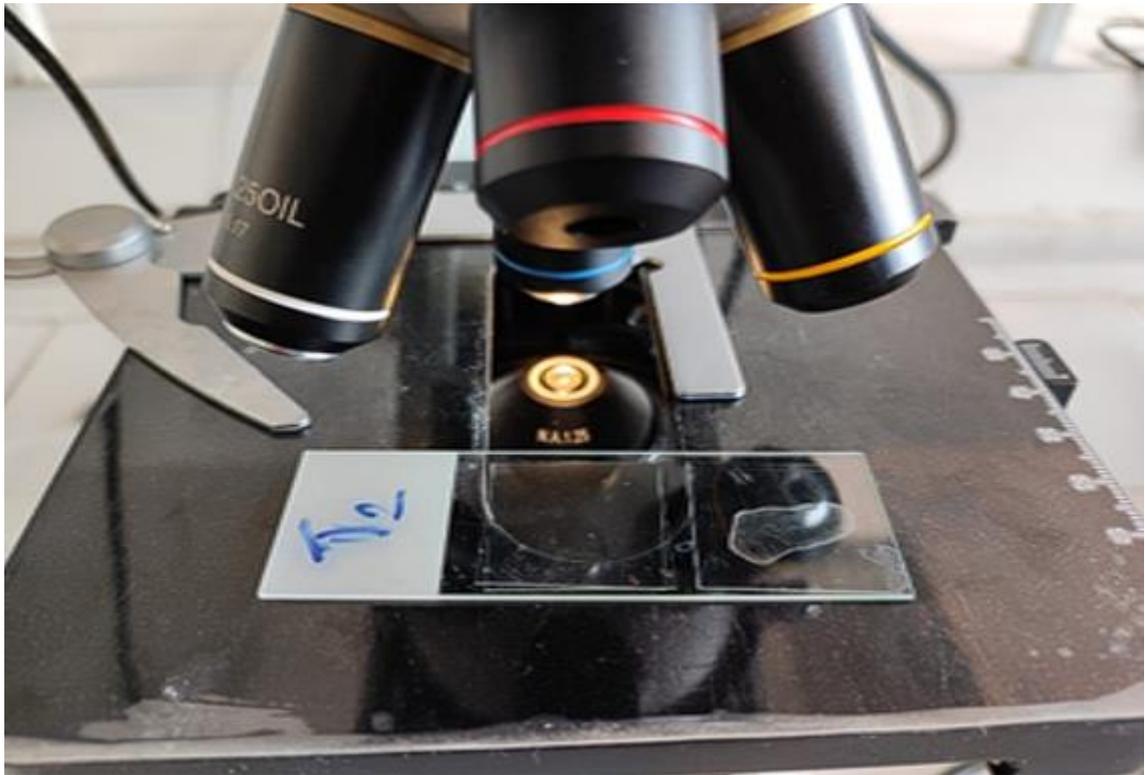
ANEXO H: DESVIACIÓN E INTRODUCCIÓN DEL PENE EQUINO EN LA VAGINA ARTIFICIAL



ANEXO I: TUBO COLECTOR DE SEMEN SELLADO CON PAPEL ALUMINIO



ANEXO J: ANÁLISIS DE SEMEN FRESCO



ANEXO K: DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA



ANEXO L: CÁMARA NEUBAUER UTILIZADA EN EL CONTEO ESPERMÁTICO



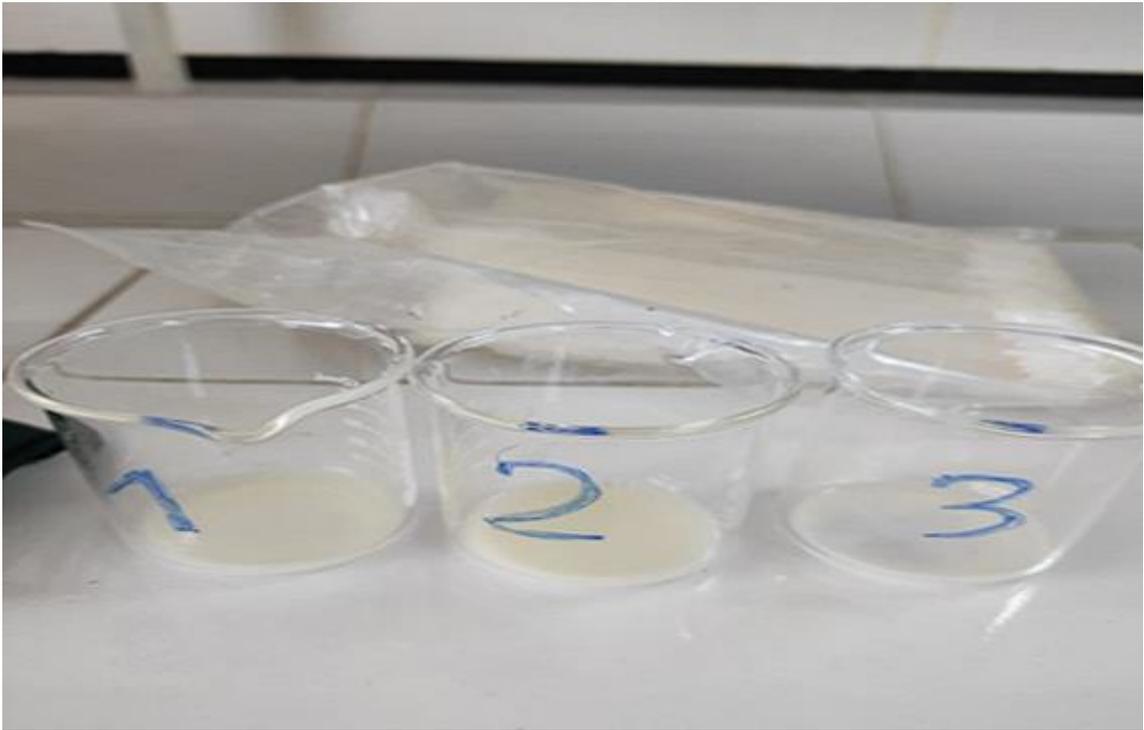
ANEXO M: PREPARACIÓN DEL DILUYENTE PARA LA CENTRIFUGACIÓN



ANEXO N: CENTRIFUGACIÓN DE LA MUESTRA DE SEMEN FRESCO



ANEXO N°: SEMEN CENTRIFUGADO Y LISTO PARA EMPAJILLAR



ANEXO O: EMPAJILLADO Y SELLADO DE LAS PAJUELAS



ANEXO P: APLICACIÓN DE CURVAS DE CONGELACIÓN PARA LA POSTERIOR CRIOCONSERVACIÓN



ANEXO Q: CONSERVACIÓN DE LAS PAJUELAS EN TANQUE DE NITRÓGENO LÍQUIDO





epoch

**Dirección de Bibliotecas y
Recursos del Aprendizaje**

**UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y
DOCUMENTAL**

REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 05 / 01 / 2024

INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)

Nombres – Apellidos: LUIS ADRIAN LEÓN PABAÑA

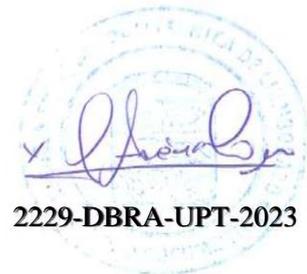
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL

Facultad: CIENCIAS PECUARIAS

Carrera: ZOOTECNIA

Título a optar: INGENIERO ZOOTECNISTA

f. Analista de Biblioteca responsable: Ing. CPA. Jhonatan Rodrigo Parreño Uquillas. MBA.



2229-DBRA-UPT-2023