



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
CARRERA ZOOTECNIA

**“EVALUACIÓN DE TRES CURVAS DE CONGELACIÓN PARA
LA CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN EQUINO EN EL
COMPLEJO INTERCULTURAL Y DEPORTIVO MUSHUC RUNA”**

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Trabajo Experimental

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERO ZOOTECNISTA

AUTOR: NELSON FABIAN TUZA GUACHI.

DIRECTOR: Ing. CARLOS ANDRES MANCHENO HERRERA, MgS.

Riobamba - Ecuador

2024

© 2024, Nelson Fabián Tuza Guachi

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, Nelson Fabián Tuza Guachi, declaro que el presente Trabajo de Integración Curricular es de mi 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.

Riobamba, 05 de junio de 2024.

Nelson Fabián Tuza Guachi

1804377693

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
CARRERA ZOOTECNIA

El Tribunal del Trabajo de Integración Curricular certifica que: El Trabajo de Integración Curricular, Tipo: Trabajo Experimental, “**EVALUACIÓN DE TRES CURVAS DE CONGELACIÓN PARA LA CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN EQUINO EN EL COMPLEJO INTERCULTURAL Y DEPORTIVO MUSHUC RUNA**”, realizado por el señor **NELSON FABIÁN TUZA GUACHI**, 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. Fabián Danilo Reyes Silva, PhD. PRESIDENTE DEL TRIBUNAL	_____	2024-06-05
Ing. Carlos Andres Mancheno Herrera, MgS. DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR	_____	2024-06-05
Ing. Brayan Leonel Aldaz Parra. ASESOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR	_____	2024-06-05

DEDICATORIA

Con mucho amor y con todo corazón quiero dedicar este trabajo, el cual ha sido fuente de esfuerzo y dedicación, a mi Padre celestial el cual me ha bendecido y me ha brindado salud y vida de la cual gozo día a día porque sin él yo no sería nada. A mis padres amados, Bernardo Tuza mi guerrero porque ha salido de las cosas más duras y siempre se ha levantado, es mi inspiración de superación viejito mío te amo, a Rosita Guachi madrecita mía gracias por ser mi luz en tiempos de obscuridad, gracias por haber llorado junto a mí, que nunca me falte tu bendición madrecita, gracias mis padres han sido mi soporte en este duro camino me han apoyado económicamente y moralmente animándome para no desmayar, ya que muchas veces mi camino se opacaba pero ellos estaban para levantarme y seguir sin duda para mis son los padres más buenos que tengo en la vida. A mis hermanas queridas Sandra, Mercedes, Narcisa y mi angelita Roció que de una u otra manera me han apoyado para cumplir mi propósito ya que ahí nace la inspiración de hacer todo esto y así algún día fortalecer y sustentar la familia complementando un sueño grande y verlo realizarse juntos. A mis abuelitos mis ángeles del cielo, Pachito, Angelito y Lucecita mía aunque no la haya conocido pero siento que el amor de ella era igual a la de mi madre, que desde el cielo sé que siempre están conmigo a donde quiera que vaya guiándome y dándome fuerzas ya que me enseñaron el valor del trabajo de la tierra y del campo así también siempre recordándome siempre el esfuerzo grande que hay que hacer para lograr a obtener algo, a mi mamita Jishito que más que mi abuelita es mi madre, por haberme cuidado cuando era tan solo un niño, por darme su bendición a donde quiera que salga o si llego de algún lado.

Nelson

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, quiero agradecer al rey supremo por haberme dado vida y por haber cumplido esta etapa de mi vida. Agradezco con mucho aprecio a mi segunda casa la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo en especial a la gloriosa Facultad de Ciencias Pecuarias, carrera de Zootecnia por abrirme las puertas de tan prestigiosa institución para poderme educar y enriquecer mis conocimientos con el fin de hacer hoy en día un profesional de bien con ética y moral. Al ingeniero Andres Mancheno como director de tesis y al ingeniero Bryan Aldaz como asesor, por impartir sus conocimientos, criterios, consejos y tiempo valioso para culminar este trabajo, para ustedes mi gratitud y respeto siempre los llevare en mi corazón. Quiero expresar y más sincero agradecimiento al Complejo Intercultural y Deportivo Mushuc Runa por haberme abierto las puertas para realizar la investigación, gracias al Doc. Carlos Guevara por el apoyo incondicional y todos sus conocimientos en el proceso de la investigación de la misma manera agradecer a todo el grupo de trabajo de la granja integral del Complejo Mushuc Runa por el apoyo absoluto durante mi estancia y enseñarme lo trabajo en equipo que realizan sin importar las circunstancias del día a día. Agradezco los consejos, el afecto, el apoyo, el apoyo el cariño de todos mis amigos y conocidos que han estado en las buenas y en las malas, a las mismas personas que se mantuvieron firmes conmigo en el transcurso de este camino. Como: Jeferson Ch, Raul Ch, kleber Ll, Brayan T, Carlos T, Franklin M, Edwin E, Carlos A, por palabras de aliento para seguir adelante en todo este transcurso de la mi vida universitaria en especial a Johana Ch, Jeison O, Edwin T gracias por ser parte de este proceso y en cada paso del camino, no tengo como agradecerles por ser incondicionales durante esta trayectoria.

Nelson

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	xii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xiii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
INTRODUCCIÓN.....	1

CAPÍTULO I

1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	2
1.1. Antecedentes.....	2
1.2. Planteamiento del problema.....	2
1.3. Justificación.....	3
1.4. Objetivos.....	3
1.4.1. <i>Objetivo general</i>	3
1.4.2. <i>Objetivos específicos</i>	3

CAPITULO II

2. MARCO TEORICO.....	4
2.1. Generalidades.....	4
2.2. Razas equinas.....	4
2.2.1. <i>El Pura Raza Española</i>	4
2.2.2. <i>Caballo Frisón</i>	5
2.3. Reproducción de los caballos.....	5
2.4. Fisiología reproductiva.....	6
2.4.1. <i>Aparato reproductor del equino</i>	6
2.4.2. <i>Escroto</i>	6
2.4.3. <i>Testículos</i>	7
2.4.4. <i>Epidídimo</i>	7
2.4.5. <i>Cordón espermático</i>	7
2.4.6. <i>Pene y prepucio</i>	7
2.5. Gametogénesis.....	7

2.6.	Espermatogénesis equina	8
2.7.	Morfología espermática	8
2.7.1.	<i>Cabeza</i>	8
2.7.2.	<i>Pieza media</i>	8
2.7.3.	<i>Flagelo</i>	8
2.7.4.	<i>Núcleo</i>	9
2.7.5.	<i>Daños de la membrana plasmática</i>	9
2.8.	Características Microscópicas	9
2.8.1.	<i>Concentración Espermática</i>	9
2.8.2.	<i>Motilidad espermática</i>	9
2.8.3.	<i>Motilidad masal</i>	9
2.8.4.	<i>Morfología espermática</i>	10
2.9.	Composición membranal del esperma	10
2.9.1.	<i>Proteínas</i>	10
2.9.2.	<i>Lípidos</i>	10
2.10.	Uso de biotecnologías para la reproducción equina	11
2.11.	Crio preservación de espermatozoides equinos	11
2.11.1.	<i>Uso actual de los espermatozoides crio preservados de equino</i>	12
2.12.	Técnicas de obtención de espermatozoides utilizadas en equinos	12
2.12.1.	<i>Vagina artificial</i>	12
2.12.2.	<i>Electroeyaculación</i>	13
2.12.3.	<i>Proceso de criopreservación</i>	13
2.12.4.	<i>Diluyente</i>	14
2.12.5.	<i>Daños durante la crio preservación de espermatozoides</i>	15

CAPITULO III

3.	MARCO METODOLÓGICO	16
3.1.	Localización y duración del experimento	16
3.2.	Unidades experimentales	16
3.3.	Materiales, equipos, e instalaciones	16
3.3.1.	<i>Materiales de campo</i>	16
3.3.2.	<i>Materiales de laboratorio</i>	17
3.3.3.	<i>Equipos</i>	17
3.3.4.	<i>Animales</i>	18
3.3.5.	<i>Instalaciones</i>	18
3.4.	Tratamiento y diseño experimental	18

3.4.1.	<i>Esquema del experimento</i>	18
3.5.	Análisis estadístico y pruebas de significancia	19
3.6.	Mediciones experimentales	19
3.7.	Procedimiento experimental	20
3.7.1.	<i>De campo</i>	20
3.7.2.	<i>De laboratorio</i>	20
3.8.	Metodología de la evaluación	20
3.8.1.	<i>Aspecto</i>	21
3.8.2.	<i>Color</i>	21
3.8.3.	<i>Olor</i>	21
3.8.4.	<i>pH</i>	21
3.8.5.	<i>Volumen del eyaculado</i>	21
3.8.6.	<i>Concentración espermática (millones spz/ml)</i>	21
3.8.7.	<i>Viabilidad espermática (%)</i>	22
3.8.8.	<i>Motilidad masal espermática</i>	22
3.8.9.	<i>Motilidad individual, %</i>	23
3.8.10.	<i>Morfo anomalías, %</i>	23
3.8.11.	<i>Integridad de la membrana espermática (%)</i>	23

CAPITULO IV

4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
4.1.	Características del semen equino fresco.	25
4.1.1.	<i>Características macroscópicas</i>	25
4.1.2.	<i>Características microscópicas</i>	26
4.2.	Características microscópicas de semen equino postcongelación de acuerdo a su raza.	27
4.2.1.	<i>Motilidad individual, %</i>	28
4.2.2.	<i>Integridad de la membrana, %</i>	29
4.2.3.	<i>Viabilidad espermática, %</i>	30
4.3.	Características microscópicas de semen equino en tres diferentes curvas de congelación (2, 3 y 4 horas de enfriamiento).	31
4.3.1.	<i>Motilidad individual, %</i>	32
4.3.2.	<i>Integridad de la membrana, %</i>	33
4.3.3.	<i>Viabilidad espermática, %</i>	34
4.4.	Costos de cada tratamiento.	34

CAPITULO V

5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	36
5.1.	Conclusiones.....	36
5.2.	Recomendaciones.....	37

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-3: Condiciones meteorológicas de la zona.....	16
Tabla 2-3: Esquema del experimento.....	19
Tabla 1-4: Características macroscópicas del semen fresco equino.	25
Tabla 2-4: Características microscópicas del semen fresco equino.	26
Tabla 3-4: Características microscópicas del semen equino descongelado, de acuerdo a la raza.	28
Tabla 4-4: Características microscópicas del semen equino descongelado, de acuerdo a las curvas de congelación.	31
Tabla 5-4: Análisis de los costos de cada tratamiento.	35

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-4: Motilidad individual del semen descongelado de acuerdo a la raza equina.	29
Gráfico 2-4: Integridad de la membrana del semen descongelado de acuerdo a la raza equina.	30
Gráfico 3-4: Viabilidad espermática del semen descongelado de acuerdo a la raza equina.	31
Gráfico 4-4: Análisis de regresión de la motilidad individual del semen descongelado de acuerdo a las curvas de congelación.	32
Gráfico 5-4: Análisis de regresión de la integridad de la membrana espermática del semen descongelado, de acuerdo a las curvas de congelación.	33
Gráfico 6-4: Análisis de regresión de la viabilidad espermática del semen descongelado, de acuerdo a las curvas de congelación.	34

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A. MOTILIDAD INDIVIDUAL (%).

ANEXO B. INTEGRIDAD MEMBRANA (%).

ANEXO C. VIABILIDAD ESPERMÁTICA (%).

ANEXO D. MEDIDAS EN SEMEN FRESCO.

ANEXO E. ANÁLISIS DE REGRESIÓN.

ANEXO F. RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS

ANEXO G. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar tres curvas de congelación para la criopreservación de semen Equino en el complejo intercultural y deportivo Mushuc Runa, ubicado en la vía Ambato – Riobamba en el barrio Santa Lucía, del cantón Tisaleo, provincia de Tungurahua, con un tiempo de duración de 120 días, para el desarrollo de la presente investigación se evaluaron 108 unidades experimentales las cuales correspondieron a las dosis seminales (pajillas descongeladas) obtenidas de la extracción de semen de 2 sementales equinos de la raza Español y Frisón, a los cuales se les realizó 3 colectas con un intervalo de 8 días. Las unidades experimentales (pajillas) se distribuyeron bajo un Diseño Completamente al Azar (DCA) con arreglo combinatorio de factores, en donde el factor A son las curvas de congelación y el factor B son las razas de los equinos. Se determinó que las características del semen equino fresco son similares en ambos sementales; sin embargo, se reporta un volumen de eyaculado mayor en el equino Frisón con 130,0 ml en relación al de la raza Española con 66,67 ml. Se concluyó que de acuerdo a las curvas de congelación las características microscópicas muestran valores superiores en la motilidad individual y viabilidad espermática, a las 2 y 3 horas de congelación. Se recomendó utilizar tres horas dentro del protocolo de congelación de semen equino debido a que presentó mayores niveles de motilidad individual, integridad de la membrana y viabilidad espermática (%).

Palabras clave: <CURVAS DE CONGELACIÓN>, <SEMEN EQUINO>, <CRIOPRESERVACIÓN>, <COMPLEJO INTERCULTURAL MUSHUC RUNA>, <VOLÚMEN EYACULADO>, <VIABILIDAD ESPERMÁTICA>.



ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate three freezing curves for the cryopreservation of equine semen at Mushuc Runa Intercultural and Sports Complex, located on Ambato - Riobamba road, at Santa Lucia Neighborhood, in Tisaleo Canton, Tungurahua Province with a duration time of 120 days. For the development of the present investigation, 108 experimental units were evaluated, which corresponded to the seminal doses (thawed straws) obtained from the semen extraction of 2 equine stallions of the Spanish and Friesian breeds, which were collected 3 times with an interval of 8 days. The experimental units (straws) were distributed under a Completely Randomized Design (CRD) with a combinatorial arrangement of factors, where factor A is the freezing curves and factor B is the races of quinoa. It was determined that the characteristics of fresh equine semen are similar in both stallions; however, a higher ejaculate volume is reported in the Friesian quino with 130.0 ml in relation to that of the Spanish breed with 66.67 ml. It was concluded that according to the freezing curves the microscopic characteristics show higher values in individual motility and sperm viability at 2 and 3 hours of freezing. It was recommended to use three hours within the equine semen freezing protocol because it presented higher levels of individual motility, membrane integrity and sperm viability (%).

Keywords: <FREEZING CURVES>, <EQUINE SEMEN>, <CRYOPRESERVATION>, <MUSHUC RUNA INTERCULTURAL AND SPORTS COMPLEX>, <EYACULATE VOLUME>, <SPERMATIC VIABILITY>.

0736-DBRA-UPT-2024



Mgs. Deysi Lucía Damián Tixi

C.I. 0602960221

INTRODUCCIÓN

Conocemos que los equinos en la actualidad tienen múltiples usos y ventajas en diferentes campos como el transporte, el sector agropecuario y los deportes entre otros. Para cada una de estas funciones existen determinadas razas que deben ser criadas y preservadas bajo ciertas especificaciones con el fin de establecer un sistema de producción efectivo y rentable (Giraldo *et al.*, 2006, p.4).

La reproducción juega un papel fundamental dentro de la preservación de una especie, una técnica de gran valor para el mejoramiento genético es la crío preservación o congelación de semen ya que es un procedimiento útil no solo para la inseminación sino también para determinar el contenido específico de ADN del reproductor, es decir lo que lo hace único y diferente a cualquier otro (Restrepo *et al.*, 2016, p.23).

Con una muestra de esperma también se puede perpetuar la línea genética de reproductores importantes, establecer su parentesco con otros de su misma especie y así evitar consanguinidad.

Los parámetros al momento de evaluar son muchos que se deben tener en cuenta antes de la congelación del semen, así como la temperatura y tiempos que se debe manejar al momento de la extracción, la concentración espermática, la movilidad progresiva o individual de los espermatozoides, entre otras, siendo estos los factores más importantes para descartar o aceptarlo como un semen de calidad para su consiguiente conservación ya que de esto dependerá el porcentaje de fecundación en las hembras (Giraldo *et al.*, 2006, p.4).

La variabilidad de sementales equino es la mayor limitante que puede existir, ya que cada uno muestra diferentes características seminales por lo que debemos saber cuándo, dónde, que diluyente se debe utilizar o que protocolo de temperaturas usar al momento de crío preservar, para lo cual se busca optimizar niveles de temperaturas adecuadas para la congelación de la misma y su evaluación, dado que esto apuntará a la eficiencia reproductiva equina en diferentes establecimientos de crianza (Restrepo *et al.*, 2016, p.23).

CAPÍTULO I

1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Antecedentes

La criopreservación del semen equino es una técnica ampliamente utilizada en la industria equina para conservar la fertilidad de los sementales y facilitar la reproducción asistida. Sin embargo, la eficacia de este proceso puede variar significativamente dependiendo de las condiciones de congelación utilizadas, incluyendo la curva de congelación empleada (Trejos, 2009, p.34).

En la actualidad, existen diferentes protocolos de congelación disponibles, cada uno con sus propias ventajas y limitaciones. Por lo tanto, es importante realizar una evaluación comparativa de estas curvas de congelación para determinar cuál produce los mejores resultados en términos de viabilidad y fertilidad del semen criopreservado (Trejos, 2009, p.35).

1.2. Planteamiento del problema

A pesar de los avances en la tecnología de criopreservación de semen equino, la elección de la curva de congelación óptima sigue siendo un desafío para muchos centros de reproducción equina. La variabilidad en los resultados de la criopreservación puede deberse a múltiples factores, incluyendo las características individuales del semental, las condiciones de recolección y procesamiento del semen, y las diferencias en los protocolos de congelación utilizados (Rangel, 2023, p.13).

La falta de estandarización puede resultar en una disminución de la calidad y la fertilidad del semen criopreservado, lo que afecta negativamente la eficacia de los programas de reproducción equina y puede tener implicaciones económicas significativas para la industria (Contreras, 2022, p.5).

Por lo tanto, surge la necesidad de realizar una evaluación comparativa de tres curvas de congelación ampliamente utilizadas en la criopreservación de semen equino, con el fin de determinar cuál de ellas produce los mejores resultados en términos de viabilidad espermática, integridad del ADN espermático, capacidad de supervivencia post-descongelación. Esto permitirá a los centros de reproducción equina seleccionar el protocolo de congelación más adecuado para optimizar la calidad y la fertilidad del semen criopreservado, mejorar los índices de concepción y contribuir al desarrollo sostenible de la industria equina (Rangel, 2023, p.13).

1.3. Justificación

La crio preservación del semen equino es una herramienta fundamental en la reproducción equina moderna, permitiendo la conservación a largo plazo de la fertilidad de los sementales y facilitando la distribución del material genético equino a nivel nacional e internacional. Sin embargo, la eficacia de la crio preservación puede variar considerablemente según los protocolos de congelación utilizados, incluyendo la curva de congelación empleada. Por lo tanto, la justificación de este estudio radica en la necesidad de evaluar y comparar diferentes curvas de congelación para determinar cuál produce los mejores resultados en términos de viabilidad y fertilidad del semen crio preservado.

La elección de la curva de congelación adecuada es crucial para maximizar la viabilidad y la fertilidad del semen equino crio preservado. Una curva de congelación inadecuada puede resultar en daño celular, pérdida de motilidad espermática y reducción de la capacidad de fecundación, lo que afecta negativamente la eficacia de los programas de reproducción equina y limita el éxito de las técnicas de reproducción asistida.

Una curva de congelación óptima garantiza una mejor conservación del material genético equino, lo que es fundamental para la preservación de la diversidad genética y la selección de los mejores reproductores para la mejora de las razas equinas.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Evaluar tres curvas de congelación para la criopreservación de semen equino en el complejo intercultural y deportivo Mushuc Runa.

1.4.2. Objetivos específicos

- Evaluar las características del semen equino fresco.
- Determinar las características microscópicas de semen descongelado sometido a los diferentes tratamientos de acuerdo a la raza equina.
- Evaluar tres diferentes curvas de congelación (2, 3 y 4 horas de enfriamiento) para la criopreservación de semen equino.
- Determinar los costos de cada tratamiento.

CAPITULO II

2. MARCO TEORICO

2.1. Generalidades

Los caballos (*Equus caballus*) existen desde hace 50 millones de años y han seguido evolucionando durante ese tiempo. Los caballos tienen muchos dedos en las patas y, hasta el día de hoy, los caballos hermosos solo tienen un dedo. Los caballos modernos fueron domesticados por los humanos a lo largo de los siglos para transportarlos o pelear.

Hoy en día se han desarrollado más de 300 razas de caballos diferentes. Los caballos enormes pueden tirar de carros pesados, los caballos más ligeros pueden montar, las razas de ponis famosas son adecuadas para niños y adultos pequeños, y los ponis de menos de 30 pulgadas se pueden utilizar como mascotas o guías para los ciegos. Hace 20 millones de años, los caballos variaban en tamaño: algunos se volvían muy grandes o muy pequeños, mientras que otros permanecían estables (Trejos, 2009, p.42).

2.2. Razas equinas

En el Ecuador se crían diferentes razas, alrededor del mundo se conocen como 300 razas puras, para la investigación se describirán las características de dos razas principales la Española y Frisón.

El tipo de razas livianas se refieren a caballos de tamaño eumétrico (350 a 500 kg de peso vivo), en otras palabras con un peso y volumen mediano. Las razas más representativas son los Criollos, Árabes, Cuarto de Milla (Almeida, 2012, p.23).

Los caballos de tamaño pequeño son considerados los ponies, que son animales elipométricos: con un peso vivo entre los 100 y 300 kg.

“los caballos de mayor peso (desde los 500 kg) y tamaño, se denomina animales braquimorfos, se describen como caballos con una proporción ensanchada, de dimensiones transversales grandes y longitudinales breves, como la raza Shire, Suffolk y Percherón” (Quiroz et al., 2015, p.21).

2.2.1. *El Pura Raza Española*

Esta raza se desarrolla en el territorio correspondiente a la comunidad de Andalucía, debido a esta razón a este caballo se lo conoce como andaluz. Se define como un equino de tipo mesomorfo de conformación potente y compacta.

Dentro de sus medidas zoométricas destaca su alzada a la cruz (160 cm) con un peso vivo promedio de 570 kg. Las capas presentan varias tonalidades como el tordo, castaño y negro; este último color es bien visto y el valor de estos animales por lo general son más costosos. Se describen como un animal de perfil recto y ligeramente convexo, sus ojos son grandes y orejas pequeñas. Su cuello presenta una gran fortaleza y levemente arqueado, de espaldas y pecho ancho y profundo” (Valera et al., 2007, p.12).

El resto de su morfo metría incluye un dorso corto y grupa redondeada y musculosa. La inserción de la cola es baja y poblada, al igual que la crin. Su temperamento se define como tranquilo y dócil. Se utiliza a esta raza para deportes como la doma, alta escuela, clásica y vaquera (Hernández, 2008, p.34).

2.2.2. Caballo Frisón

Esta raza equina se descubrió en la zona de Frisia en Holanda, este lugar se caracteriza por su comercio y el trabajo en el campo por lo que necesitaban de animales grandes y fuertes. Con el pasar de los años y por su condición física se utilizaron a estos caballos también para la guerra en las huestes romanas, españolas y alemanas (Larrea, 2014, p.11).

Esta raza con el pasar de los años y la industrialización de los campos de cultivos, los caballos fueron relegadas, sin embargo los mismos agricultores fueron los que rescataron esta raza y formaron la asociación holandesa. La morfología del equino se caracteriza por su cuerpo compacto y musculado, una alzada entre los 1,65 y 1,75 m.

Su color de capa característica es la negra, y en ciertos casos con una estrella blanca en la frente inferior a los 3 cm. La crin y cola son abundantes, largas y onduladas, incluso el pelo aparece en sus patas alrededor de las pezuñas (Larrea, 2014, p.11).

2.3. Reproducción de los caballos

La crianza y reproducción de caballos se da en sectores privados enfocados a animales de carreras y recreación, aun así, no se cuenta con estrategias y/o centros de reproducción en esta especie, ni bancos de germoplasma. Además, los criadores solo han aceptado el uso de biotecnologías en

reproducción equina de forma reciente, mas, sigue existiendo renuencia a la criopreservación de semen no sólo por los costos, sino por los múltiples eventos que complican el manejo de éstos, como la recolección de semen, la variabilidad en los rangos de gestaciones y viabilidad de espermatozoides equinos post- descongelados (Olaciregui, 2014, p.10).

La yegua pare una cría al parto (potrillo y potrancas) y su gestación es de 11 meses, son animales vivíparos. La madurez sexual se presenta a los 4 años de vida. Durante la reproducción sexual, el espermatozoide y el óvulo se deben fusionar para formar un cigoto diploide. En los equinos como en todos los mamíferos esta fusión depende fuertemente de un conjunto de cambios en la membrana plasmática del espermatozoide y no es de sorprender que estos sean marcadamente diferentes a los de las células somáticas (Masa, 2015, p.11).

En general la fertilidad en los equinos es menor y más variable que la de otros animales de granja, principalmente por el tipo de selección que se hace entre los animales que tiene poco o nada que ver con los aspectos reproductivos, seleccionándolos por su pedigrí, rendimiento deportivo o registros. En los equinos, como en otros animales domésticos, la máxima eficiencia reproductiva se alcanza hasta la pubertad con la mayor producción de espermatozoides; debido a una adecuada frecuencia y cantidad de secreción de hormona gonadotrópica (GnRH) (Laureano, 2005, p.31).

2.4. Fisiología reproductiva

2.4.1. Aparato reproductor del equino

Para realizar la evaluación de la capacidad reproductiva del semental, así como para el desarrollo de procedimientos de manejo artificial de la reproducción, tales como la colección de semen es indispensable tener conocimiento de la anatomía de sus órganos genitales. Este conocimiento también es útil Para diagnosticar condiciones reproductivas anormales en el garañón. Para su estudio, “los órganos genitales del macho se dividen en: testículos, escroto, cordón espermático, epidídimo, glándulas sexuales accesorias (ámpulas, vesículas seminales, próstata y glándulas bulbouretrales), prepucio y pene” (Sonnenholzner, 2020, p.15).

2.4.2. Escroto

“En los caballos es penduloso, suave, delgado, elástico y sin pelo” (Trejos, 2009, p.15).

2.4.3. Testículos

Al palparlos se debe determinar la forma, tamaño, orientación y textura. Los testículos normales son ovalados y turgentes; se localizan en una posición horizontal, con la cabeza del epidídimo en una posición anterior. La consistencia testicular debe ser similar a la de una pelota de tenis nueva (Trejos, 2009, p.15).

2.4.4. Epidídimo

El cuerpo del epidídimo se encuentra sobre la superficie dorso lateral del testículo, localizando la cola en el polo caudal de dicho órgano. El epidídimo debe palpase por completo, su cola prominente y el remanente del gubernaculo es decir ligamento caudal del epidídimo, teniendo una textura suave y esponjosa (Trejos, 2009, p.15).

2.4.5. Cordón espermático

“Los 2 cordones espermáticos deben ser similares en tamaño y de un diámetro uniforme. Una pequeña porción del cordón espermático puede ser palpado a través del cuello del escroto” (Trejos, 2009, p.15).

2.4.6. Pene y prepucio

“La piel del prepucio debe estar libre de distorsiones o engrosamientos, no deben de existir ulceraciones y el diámetro del anillo prepucial debe permitir el libre movimiento del pene” (Trejos, 2009, p.15).

2.5. Gametogénesis

La espermatogénesis es una suma de eventos cronológicos de división y diferenciación que tiene como objetivo la producción de espermatozoides tiene lugar en los testículos, específicamente en los túbulos seminíferos que están compuestos por células somáticas. Este proceso consiste en la división mitótica de células madre espermatogonias para formar espermatoцитos primarios y por meiosis crear espermátidas haploides y diferenciarse en espermatozoides y preparar su membrana plasmática y otras estructuras específicas para reaccionar adecuadamente al tracto genital femenino y al óvulo (Aznarán, 2019, p.21).

2.6. Espermatogénesis equina

La espermatogénesis tiene una duración total de 57 días en el caballo, la primera etapa de la espermatogénesis es la espermatocitogénesis y dura 19.4 días, donde la espermatogonia va a tener múltiples divisiones formando cinco tipos de espermatogonias: A1, A2, A3, B1 y B2, con la división de la espermatogonia B2 se forma el espermatocono primario (diploide) que entra en la primera división meiótica; todo el proceso meiótico tiene una duración de 19.4 días, la primera división dura 18,7 días y la segunda solo 0,7 días (Aznarán, 2019, p.21).

Por último, la espermiogénesis tarda 18,6 días y es la diferenciación de espermátidas con núcleo esférico a espermatozoides al final sucede la espermiación que es la liberación de los espermatozoides del epitelio seminífero a la luz tubular. La eficiencia de la espermatogénesis es medida por el número de espermatozoides producido por gramo de parénquima testicular y no está influenciada por la diferencia en el tamaño testicular entre los animales, en equinos en particular es de $16-19 \times 10^6$ cel/g (Aznarán, 2019, p.21).

2.7. Morfología espermática

La membrana plasmática espermática cubre a todo el espermatozoide de la cabeza a la cola y juega un papel importante en la regulación de la interacción espermatozoide-óvulo y, es por esta razón, que es una estructura extremadamente dinámica (Aznarán, 2019, p.21).

2.7.1. Cabeza

“La cabeza contiene el ADN que es vital para la interacción espermatozoide - óvulo, y además del núcleo, contiene un pequeño espacio citoplasmático en el extremo apical, llamado acrosoma” (Aznarán, 2019, p.21).

2.7.2. Pieza media

“La pieza media que contiene mitocondrias y se encargan de la producción de energía” (Aznarán, 2019, p.21).

2.7.3. Flagelo

“El flagelo, es el encargado de la movilidad” (Aznarán, 2019, p.21).

2.7.4. Núcleo

“El ADN en el espermatozoide se encuentra como cromatina, formada por ADN y protaminas. Los residuos de cisteína en las protaminas forman enlaces disulfuro que compactan al ADN seis veces más que en las células somáticas” (Aznarán, 2019, p.21).

2.7.5. Daños de la membrana plasmática

Cuando los espermatozoides se someten a congelación y descongelación, sin crioprotección, se altera la integridad de las membranas plasmáticas y de otras estructuras, existe evidencia de que la criopreservación afecta negativamente la integridad del ADN por estrés oxidativo, induciendo fragmentación del ADN, pero en ocasiones el núcleo espermático puede mantener las propiedades esenciales para dar comienzo al desarrollo embrionario (Trujillo, 2011, p.4).

2.8. Características Microscópicas

2.8.1. Concentración Espermática

La concentración espermática del semen equino varía dependiendo de varios factores, pero el rango normal es de 150 a 300 x10⁶ por mililitro, el número de espermatozoides se encuentra entre 1 y 20 billones por cada eyaculado. El volumen testicular tiene relación directa con la producción de espermatozoides. La relación normal es calcular el peso de 1 g de parénquima testicular para producir 19 millones de espermatozoides al día, aproximadamente (Gonzales, 2015).

2.8.2. Motilidad espermática

“Proporciona los datos más importantes sobre calidad y viabilidad de una muestra espermática” (Vélez, 2017, p.8).

2.8.3. Motilidad masal

“la motilidad masal en equinos se caracteriza por su forma fisiológica, donde la inserción del flagelo en la cabeza del espermatozoide es abaxial, debido a este factor la movilidad de los espermatozoides no es totalmente lineal en comparación a otros animales” (Vélez, 2017, p.8).

2.8.4. Morfología espermática

Se basa en la relación directa existente entre los espermatozoides anormales en el eyaculado, el tipo de defecto y su relación con la fertilidad in-vivo. El rango de presencia de anomalías en un semen de calidad está entre 10 % y 25 %. Altos porcentajes se asocian a inmadurez sexual, procesos degenerativos y patológicos. Se han encontrado varias afecciones hereditarias asociadas con defectos testiculares, espermatogénesis anormal y espermatozoides morfológicamente anormales (Vélez, 2017, p.8).

2.9. Composición membranal del esperma

La membrana plasmática del espermatozoide en los mamíferos es una bicapa lipídica altamente con un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados, estas estructuras son responsables de la flexibilidad y de la capacidad funcional de los espermatozoides pero constituyen el principal sustrato para la peroxidación, lo cual puede dar lugar a severos desordenes funcionales en el espermatozoide (Villa, 2007, p.11).

2.9.1. Proteínas

Las proteínas que se encuentran en la bicapa lipídica están unidas por interacciones no covalentes, y realizan diversas funciones, como son: el transporte de moléculas específicas hacia las células; ayudando a las reacciones normales y funcionan como receptores en la transmisión de señales (Arenas, 2010, p.15).

2.9.2. Lípidos

Los lípidos componen entre el 30 y el 50% de la membrana y se encuentran anclados a su posición. Aspecto que resulta importante para la fertilización pues la fusión de los gametos masculino y femenino, requieren la participación particular de un microambiente de lípido (Ospitia y González, 2011, p.31).

La membrana plasmática de los espermatozoides equinos contiene aproximadamente 57% de fosfolípidos, 37% de colesterol y 6% glicolípidos, la diferencia de espermatozoide equino con otras especies es con respecto a su contenido relativamente alto de colesterol el cual parece estar relacionado con la tasa de capacitación, posiblemente porque el colesterol debe ser agotado de la membrana plasmática durante este proceso (Ospitia y González, 2011, p.31).

2.10. Uso de biotecnologías para la reproducción equina

Actualmente el uso de la conservación de células vivas mediante la congelación, ha traído nuevos retos a la medicina veterinaria, con la finalidad de mejorar la supervivencia celular durante el proceso de colección, congelación, almacenamiento y descongelación, ya que es bien sabido que, durante estos pasos, un porcentaje alto de las células mueren, debido a los cambios de temperatura, presión osmótica, pH, luz y medio ambiente (Elgueta, 2018, p.5).

En numerosos países el semen se importa de ultramar y el uso de esta tecnología es más común en el sector lácteo, en América Latina se tienen datos de que 95% de los países que la integran utilizan inseminación artificial, siendo la biotecnología más usada. En numerosos sistemas en pequeña escala o de bajos insumos externos el uso de biotecnología es muy limitada. En lo concerniente a los proveedores de servicios de IA, el sector privado desempeña una función importante en esta región, y sobre todo, el uso de las biotecnologías suele ser mucho mayor en el ganado bovino que en todas las otras especies (Elgueta, 2018, p.5).

2.11. Crio preservación de espermatozoides equinos

La criopreservación de semen equino ha ganado popularidad, ya que prolonga el tiempo de almacenamiento de los gametos y ofrece beneficios adicionales, incluyendo una forma más fácil para entregar y conservar material genético, contribuyendo a la expansión de las diversas técnicas de reproducción como la inseminación artificial (IA), fertilización in vitro (FIV) y la inyección intracitoplasmática (ICSI).

Se ha visto que la IA con semen congelado es un elemento esencial en los programas de mejoramiento y selección, aumentando la producción de especies domésticas Sin embargo, se considera que el éxito de la criopreservación de espermatozoides de equino, generalmente es menor que el de espermatozoides de toro o cuando se usa semen fresco para inseminar o monta natural (Elgueta, 2018, p.5).

La membrana plasmática del espermatozoide es de vital importancia en el proceso de fertilización (capacitación, reacción acrosomal y fusión del espermatozoide con el óvulo) y se ha estimado que solo el 20-40 % de los equinos producen semen con características favorables para la criopreservación, pues durante este proceso, se producen alteraciones en el espermatozoide causando una disminución en los espermatozoides viables y no más del 50% sobrevive a la criopreservación (Elgueta, 2018, p.5).

Las células que siguen vivas pueden tener procesos como capacitación y reacción acrosomal inducidas por el proceso de criopreservación, lo cual evita que penetre el óvulo y por lo tanto pierde su capacidad fecundante. En general se ha observado que en espermatozoides de equino criopreservados la movilidad, viabilidad e integridad membranal, es menor, en comparación con los espermatozoides de eyaculado en fresco (Elgueta, 2018, p.5).

2.11.1. Uso actual de los espermatozoides crio preservados de equino

La criopreservación de semen debido a las complicaciones de manejo al momento de obtener semen para conservarlo y por los altos costos de éste procedimiento, pues, no se cuenta con estrategias y/o centros de reproducción en equinos, ni bancos de germoplasma. Por lo que el control del manejo del semen equino es meramente privado, los costos de éste, dependen de los registros que se tengan del donador y sus triunfos o ganancias económicas en una variedad de competencias (Contreras, 2022, p.21).

También se ha observado una gran variabilidad en los rangos de gestación y viabilidad post-descongelación; tanto, que se ha estimado que solo cerca del 20% de los caballos producen espermatozoides aptos para congelarse, el 60% produce células con características aceptables y el otro 20% consiste en individuos con gametos pobres de características para ser criopreservados. Es así como los protocolos de inseminación artificial en equinos con semen congelado se han vuelto tan variables (Contreras, 2022, p.21).

2.12. Técnicas de obtención de espermatozoides utilizadas en equinos

Los espermatozoides equinos pueden ser recolectados por varias técnicas como la vagina artificial, electroeyaculación, recuperación de la vagina de una yegua después del apareamiento natural, y la recuperación de los espermatozoides del epidídimo, sin embargo, no todas son de uso común ni de utilidad práctica (Vicenté, 2006, p.11).

2.12.1. Vagina artificial

Es la técnica de recolección de semen más comúnmente usada en reproducción equina y con el uso de ésta técnica, se trata de simular las condiciones de temperatura (42-44 °C), presión y lubricación de la vagina de la yegua, estímulos necesarios para desencadenar la eyaculación (Vicenté, 2006, p.11).

2.12.2. Electroeyaculación

La electroeyaculación es un método ampliamente utilizado para la recolección de semen en algunas especies como bovinos y ovinos, pero su uso en los equinos no es recomendable debido a los riesgos tanto para los animales como para el operador. Además, involucra el uso de anestesia general en los caballos y la colocación de un electroestimulador vía rectal (Vicenté, 2006, p.11).

En raras ocasiones se utiliza la electroeyaculación y no es considerada una técnica eficaz para obtener espermatozoides viables, pues hay menor calidad espermática, en su mayoría caracterizada por menor movilidad, probablemente relacionada por la contaminación de orina (Vicenté, 2006, p.11).

2.12.3. Proceso de criopreservación

Antes del proceso de congelamiento debe haber una curva de enfriamiento lenta de 37 °C a 5 °C en un periodo de 0,5 a 2,5 horas. El enfriamiento de los espermatozoides produce una disminución en la actividad metabólica de los espermatozoides, incluso el crecimiento bacteriano se reduce para prolongar la viabilidad de los espermatozoides, un enfriamiento a velocidad lenta puede aumentar la resistencia a las lesiones por frío en la membrana acrosomal y la membrana plasmática en el espermatozoide (Restrepo et al., 2016, p.2).

Se ha observado que la calidad del espermatozoide sometido a una velocidad de enfriamiento lenta, antes de la congelación, es mayor que cuando es utilizada una velocidad de enfriamiento rápida, pues si los espermatozoides de equino se enfrían rápidamente, la membrana espermática tiene cambios irreversibles por choque térmico. Después del descongelado los espermatozoides pierden movilidad, por lo que se aletargan incluso en movimiento circular, el metabolismo se reduce, presentan lesiones en la membrana plasmática, acrosoma y componentes intracelulares (Oliveria, 2010).

El efecto de la criopreservación depende también de su curva de congelación. Sí los espermatozoides son congelados a una velocidad moderada (-25 a -40 °C/min), el agua no congelada en el interior de la célula se difunde al medio extracelular, debido a la mayor concentración de solutos en la fracción no congelada de éste (Restrepo et al., 2016, p.2).

Sí en cambio la velocidad de congelación es lenta (<-25 °C/min, los espermatozoides se deshidratan y no se forman cristales de hielo, sin embargo, esto resulta en elevadas concentraciones intracelulares de solutos que pueden dañar a los espermatozoides. Por otro lado,

si la congelación es rápida (> -60 °C/min) el agua intracelular no dispone de tiempo suficiente para difundir fuera del espermatozoide antes de congelarse, formando cristales intracelulares de hielo, resultando en lesión celular (Ospitia y González, 2011, p.31).

Se ha reportado que la movilidad espermática progresiva es mayor cuando se congela con congelador programable que con caja de poliestireno, inmediatamente después de descongelar y a las 3 horas ($p < 0.05$). Sin embargo, las ventajas de usar una caja de congelación es que es un método barato, fácil de usar, requiere de poca cantidad de nitrógeno líquido y es portable, mientras que un congelador programable es caro, usa una gran cantidad de nitrógeno líquido y solo puede ser usado en laboratorio, y a pesar de que hay diferencias en los valores de movilidad no se han reportado diferencias en otros parámetros de calidad en el espermatozoide (Ospitia y González, 2011, p.31).

A la temperatura del nitrógeno líquido, dentro de las pajillas de congelación hay canales de agua no congelada con concentraciones más altas de solutos. El volumen de esta fracción no congelada es muy importante porque solamente espermatozoides presentes en estos espacios sobreviven a la criopreservación. Por lo tanto, la criopreservación de espermatozoides en concentraciones demasiado altas, disminuye el porcentaje de células que sobreviven a la congelación. La descongelación de las pajillas se realiza colocándolas en agua a 37 °C por 30 segundos (Ospitia y González, 2011, p.31).

2.12.4. Diluyente

Durante el proceso de crio preservación se utilizan diluyentes, normalmente se utilizan productos comerciales, se utilizan para proteger a los espermatozoides durante el proceso y que su integridad no se vea afectada, su composición es variable, pero incluyen minerales, nutrientes, agentes crio protectores y antibióticos. Los diluyentes también brindan protección contra el choque térmico, producida por el cambio brusco de temperaturas (Camacho, 2014, p.28).

Dentro de los factores más importantes que afectan la longevidad del semen una vez diluido, se encuentran la calidad previa del semen, concentración espermática, tipo de diluyente, antibiótico utilizado, la tasa de dilución y la velocidad de enfriamiento. Además del efecto de dilución del plasma seminal, los efectos positivos de los diluyentes se basan en el control del pH, osmolaridad y en la entrega de energía (Camacho, 2014, p.28).

2.12.5. Daños durante la crio preservación de espermatozoides

Las lesiones causadas por criopreservación en las células son probablemente debidas a los efectos acumulativos de muchos diferentes modos de crio-lesión, como: formación de hielo intracelular, pérdida de componentes de la membrana, deshidratación de la membrana, desnaturalización de proteínas (tanto membranales y citoplásmicas), burbujas de gas, daños lisosomales y punción de la membrana.

Un buen crioprotector debe proteger a la célula contra todos estos tipos de crio-lesiones, pues los espermatozoides equinos no pueden sobrevivir la congelación sin crioprotección, aunque la presencia de éste, puede potencialmente inducir daño por la expansión y contracción de volumen (Ospitia y González, 2011, p.31).

El estrés osmótico durante la crio preservación es el resultado de la adición o remoción de crioprotectores y por el mismo procedimiento de enfriamiento. La respuesta osmótica de la célula depende de su permeabilidad membranal al agua, así como, de su permeabilidad membranal a los agentes crioprotectores.

Esta relativa permeabilidad cambia con la temperatura y el espermatozoide solo es capaz de tolerar un rango de cambios en la presión osmótica. Se ha visto que el espermatozoide equino es capaz de regular su medio ambiente interno a condiciones isosmóticas después de ser expuesto a osmolalidades de 75–900 mOsm kg⁻¹. Sin embargo desde que es expuesto a osmolalidades cerca de 450 mOsm kg⁻¹, empiezan a crearse severas alteraciones en su función (Camacho, 2014, p.28).

CAPITULO III

3. MARCO METODOLÓGICO

3.1. Localización y duración del experimento

La presente investigación se realizó en el Complejo Intercultural y Deportivo Mushuc Runa, ubicado en el km E35 de la vía Ambato – Riobamba en el barrio Santa Lucia, del cantón Tisaleo, provincia de Tungurahua, a 1°21'00" de latitud Sur y a 78°40'00" de longitud Oeste, con un tiempo de duración de 120 días. Las condiciones meteorológicas de la zona se observan en la tabla 1-3.

Tabla 1-3: Condiciones meteorológicas de la zona.

Parámetros	Valores
Temperatura, °C	16,0
Precipitación, mm/año	2800 - 4500
Altitud, msnm	3164
Humedad relativa, %	80,0

Fuente: (INAMHI. 2021).

Realizado por: Tuza, Nelson, 2024.

3.2. Unidades experimentales

Para el desarrollo de la presente investigación se evaluaron 108 unidades experimentales las cuales correspondieron a las dosis seminales (pajillas descongeladas) obtenidas de la extracción de semen de 2 sementales equinos de la raza Español y Frisón, a los cuales se les realizó 3 colectas con un intervalo de 8 días.

3.3. Materiales, equipos, e instalaciones

3.3.1. *Materiales de campo*

- Desparasitantes.
- Vitaminas.
- Libreta de apuntes.
- Esferográficos.
- Overol.
- Botas.

- Gorra.
- Mascarilla.
- Guantes.
- Porta y cubre objetos.
- Calentador de agua.
- Vagina artificial.
- Recipiente recolector de semen.
- Papel pH.
- Diluyentes.
- Pipetas.
- Colorantes (eosina y nigrosina)

3.3.2. *Materiales de laboratorio*

- Tubo de centrifugación.
- Puntas de micro pipetas.
- Jeringas.
- pajillas de 0,025 cc.
- Pinzas.
- Papel tornasol.
- Cooler.
- Placa porta objetos.
- Placa cubre objetos.
- Caja Petri.
- Placas de Neubauer.
- Vaso de precipitación.
- Balón volumétrico de 100 ml
- Pipeta
- Papel absorbente

3.3.3. *Equipos*

- Báscula.
- Microscopio.
- Tanque de nitrógeno.

- Placa calefactora.
- Computadora.
- Centrifuga.
- Baño María.

3.3.4. Animales

Se utilizaron 2 sementales equinos de las razas Española y Frison.

3.3.5. Instalaciones

Se utilizaron las instalaciones del complejo intercultural y deportivo MUSHUC RUNA.

3.4. Tratamiento y diseño experimental

En el presente estudio se utilizó 2 sementales equinos de las razas Español y Frisón a los cuales se les realizó 3 extracciones de semen con un intervalo de 8 días por extracción. Las unidades experimentales (pajillas) se distribuyeron bajo un Diseño Completamente al Azar (DCA) con arreglo combinatorio de factores, en donde el factor A son las curvas de congelación y el factor B son las razas de los equinos. El diseño responde al siguiente modelo lineal aditivo:

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

Donde:

Y_{ijk} : observación de la variable respuesta obtenida del tratamiento.

μ : Media general.

A_i : efecto del nivel del factor A (raza).

B_j : efecto del nivel del factor B (curva de congelación).

AB_{ij} : efecto de la interacción del nivel factor A y del nivel de factor B en su repetición k.

ϵ_{ijk} : error.

3.4.1. Esquema del experimento

El esquema del experimento se describe en la tabla 2-3.

Tabla 2-3: Esquema del experimento.

Factor A	Factor B	Código	Repeticiones	T.U.E.*	REP/TRAT
Curvas de congelación	Razas equinas				
2 Horas (refrigeración) 15 minutos (congelación)	Español	A1B1	18	1	18
3 Horas (refrigeración) 10 minutos (congelación)		A1B2	18	1	18
4 Horas (refrigeración) 5 minutos (congelación)		A1B3	18	1	18
2 Horas (refrigeración) 15 minutos (congelación)	Frisón	A2B1	18	1	18
3 Horas (refrigeración) 10 minutos (congelación)		A2B2	18	1	18
4 Horas (refrigeración) 5 minutos (congelación)		A2B3	18	1	18
Total					108

T.U.E.: Tamaño de la Unidad Experimental

Realizado por: Tuza, Nelson, 2024.

3.5. Análisis estadístico y pruebas de significancia

En el semen fresco extraído se evaluó las variables: volumen de eyaculado, pH, aspecto, color y olor del eyaculado; para lo cual se utilizó estadística descriptiva.

Para los parámetros microscópicos del semen fresco: motilidad individual, motilidad masal, viabilidad espermática, morfoanomalías y concentración espermática se utilizó estadística descriptiva.

En las variables post congelación motilidad individual, integridad de la membrana y viabilidad espermática, se realizó un análisis de la varianza (ADEVA) $P < 0,05$ y la separación de medias a través de la prueba de Tukey con un nivel de significancia de $P < 0,05$. Para las variables que presenten significancia se realizó un análisis de regresión y correlación.

3.6. Mediciones experimentales

- Aspecto.
- Color.
- Olor.

- pH.
- Volumen del eyaculado.
- Concentración espermática (millones spz/ml).
- Viabilidad espermática (%).
- Motilidad masal espermática.
- Motilidad individual, %.
- Morfo anomalías, %.
- Integridad de la membrana espermática (%).

3.7. Procedimiento experimental

3.7.1. De campo

Previo a las extracciones de las muestras seminales se desparasitó y vitaminizó a los equinos utilizando vitaminas del complejo AD3E y multivitamínicos con fósforo, magnesio y selenio principalmente. La alimentación y el estado de salud se mantuvo uniforme al momento del inicio del trabajo. Las extracciones seminales se realizaron con el uso de una vagina artificial (Colorado) la cual se llenó con 500 - 700 ml de agua a una temperatura de 55°C y se colocó la presión adecuada; previamente se sincronizó una yegua para que presente celo y de esta forma se estimule a los machos. El eyaculado colectado se evaluó y se registraron los datos correspondientes, para después realizar los protocolos de crioconservación en pajillas de acuerdo a los tiempos establecidos y analizar la capacidad funcional y de fertilidad del semen.

3.7.2. De laboratorio

Las variables como la motilidad individual, integridad de la membrana y viabilidad espermática, se evaluaron después de descongelar las pajillas en agua a una temperatura de 37°C durante 45 segundos. Re registraron los datos correspondientes para luego realizar un análisis estadístico y obtener los resultados.

3.8. Metodología de la evaluación

Antes de extraer las muestras seminales se preparó a los sementales tomando en cuenta que se encontraron en un buen estado nutricional, buena salud, entre otras, las extracciones se realizaron 3 veces con un intervalo de 8 días.

En el semen recién obtenido se evaluaron parámetros macroscópicos y microscópicos:

3.8.1. *Aspecto*

Se observó detenidamente la presencia de cuerpos extraños o impurezas que dañen la naturaleza del eyaculado puesto que es un factor negativo para la investigación (Chucag, 2023, p.23).

3.8.2. *Color*

Se evaluó por medio visual, refiriendo que el color depende mucho de la concentración espermática dándonos diferentes tonos como blanco cremoso, blanco lechoso, trasparente o traslucido, si la coloración es rosada indica que existe una contaminación por sangre por lo él eyaculado y deberá ser descartada para la investigación (Chucag, 2023, p.23).

3.8.3. *Olor*

Se lo determinó acercando el tubo de colecta hacia las fosas nasales e inhalando el olor de la muestra directamente; este parámetro indica las condiciones y el estado en que se encuentra la muestra, en donde el más adecuado es un olor neutro y agradable, puesto que si no presenta estas características el eyaculado puede estar contaminado con orina o más aún existe presencia de bacterias de una posible infección.

3.8.4. *pH*

Se tomó una muestra del eyaculado el cual se evaluó con un medidor de ph en donde el resultado debe arrojar valore entre 7,0 y 7,5 que nos indica un pH levemente alcalino (Chucag, 2023, p.23).

3.8.5. *Volumen del eyaculado*

Para tomar esta medición se utilizó un tubo graduado donde se deposita la cantidad del eyaculado obtenido y por lectura directa se determina el valor expresado en mililitros (ml) (Chucag, 2023, p.23).

3.8.6. *Concentración espermática (millones spz/ml)*

La concentración espermática hace referencia a la cantidad de espermatozoides presentes en un ml de eyaculado y para su cálculo se utiliza una cámara Neubauer, en la cual se utilizó una dilución de semen (1:100) en una solución formalizada distribuyéndolo en los compartimientos

de la cámara de conteo celular para su posterior conteo (5 cuadros) y cálculo con la siguiente fórmula (Taday, 2022, p.18):

La concentración de espermatozoides se calcula utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración espermática} = \text{número de espermatozoides} * 5 * 10 * 100 * 1000$$

3.8.7. Viabilidad espermática (%)

La viabilidad espermática se determinó mediante el uso de tinción de Eosina/ nigrosina. El método consiste en colocar la cantidad de 10 µl de eosina sobre la misma cantidad es decir 10 ul de semen sobre un portaobjetos previamente atemperado. Esto se debe homogenizar mediante una extensión (frotis) para luego dejar reposar la muestra durante un minuto.

La muestra se coloca en un microscopio y con la ayuda de un objetivo de 40 x se contabiliza un mínimo de 100 espermatozoides en los diferentes campos del portaobjetos, con ayuda de los colorantes se distingue los espermatozoides viables (los que presentan una coloración transparente - blanca en la cabeza) de los no viables (los que presentan una coloración rosa en la cabeza), el resultado se expresa en porcentaje (Taday, 2022, p.18).

$$\text{Viabilidad \%} = \frac{\text{espermatozoides vivos}}{\text{espermatozoides contados}} * 100$$

3.8.8. Motilidad masal espermática

La motilidad masal se evaluó al analizar el movimiento que tiene los espermatozoides de manera grupal en la muestra de semen fresco ya que el movimiento es un indicador de la vitalidad que tienen los espermatozoides. Para su evaluación se tomó una muestra de semen fresco (microgota) y se colocó sobre una placa cubre objetos atemperada a 37 grados centígrados; se observa en el microscopio con un objetivo de 4x. La valoración se da en una escala del 1 al 5 en donde el valor de 1 indica la ausencia de movimiento y 5 nos indica que la muestra tiene un movimiento de ondas (Taday, 2022, p.18).

0 = ningún espermatozoide muestra movimiento.

1 = muy pocos espermatozoides muestran vida.

2 = se observan movimientos pero no aparecen ondas.

3 = se muestran ondas de movimiento lentas.

4 = movimiento vigoroso pero las ondas no son muy rápidas.

5 = ondas de movimiento muy rápidas.

3.8.9. Motilidad individual, %

La motilidad individual se determinó tomando una muestra (microgota) de semen y colocándola sobre una placa porta objetos atemperado a 37 grados centígrados, se colocó la placa cubre objetos y se lleva la muestra al microscopio para observarla con objetivo 10x. Se observa la capacidad individual para moverse, la dirección en que se mueven los espermatozoides y qué tipo de movimiento realizan. Se observa un movimiento rectilíneo, que será considerado un espermatozoide normal, pero si su movimiento es descoordinado y no tiene dirección el espermatozoide será considerado como anormal, la valoración se registra en porcentaje (Taday, 2022, p.18).

3.8.10. Morfo anomalías, %

Las morfo anomalías se observaron con un microscopio, se observa las anomalías presentes en cada espermatozoide como espermatozoides sin cabeza, con dos cabezas, cabezas muy grandes, cabezas pequeñas, sin cola, colas ensortijadas entre otras. Este procedimiento se realizó con la toma de una gota de muestra seminal para luego teñirla con una gota de eosina/ nigrosina, para luego realizar el respectivo frotis y secarlo al ambiente por un minuto para luego llevarlo al microscopio y observarlo con el objetivo de 40x para determinar la valoración se utiliza la siguiente fórmula (Taday, 2022, p.18).

$$\text{Morfo anomalías} = \frac{\text{espermatozoides con anomalías}}{\text{espermatozoides normales}} * 100$$

Después de preparar las pajillas a diferentes temperaturas, se descongelan y se evalúan las siguientes variables:

3.8.11. Integridad de la membrana espermática (%)

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 consiste en preparar una solución de fructosa al 1,7 % (solución A) en 50 ml de agua estéril y una solución de Citrato de Sodio al 0,735 % (solución B) en 50 ml de agua estéril. De la preparación total de cada solución se tomó 0,5 ml de la solución (A) con 0,5 ml de la solución (B).

. Posterior a la incubación se tomó una muestra de 10 μL con una micro pipeta para observar con el microscopio el número de espermatozoides que tengan la cola enrollada y cabezas hinchadas que representan a aquellos que presentan membrana espermática íntegra, los resultados se presentan en porcentaje de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Integridad de la membrana} = \frac{\textit{espermatozoides con cola enrollada}}{\textit{espermatozoides totales}} * 100$$

CAPITULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Características del semen equino fresco.

4.1.1. Características macroscópicas

Las características macroscópicas de semen equino (volumen, pH, aspecto, color y olor) evaluadas en los dos sementales de razas Español y Frisón se describen en la tabla 1-4.

Las característica macroscópicas son similares en ambos sementales; sin embargo, se encuentran diferencias en el volumen de eyaculado, reportando un mayor volumen el equino Frisón con 130,0 ml en relación al de la raza Española con 66,67 ml.

Tabla 1-4: Características macroscópicas del semen fresco equino.

Características	Español	Frisón
Volumen sin filtro, ml	66,67	130,00
pH	7,33	7,33
Aspecto	Normal	Normal
Color	Blanco lechoso	Blanco cremoso
Olor	Sui generis	Sui generis

Realizado por: Tuza, Nelson, 2024.

En la evaluación de protocolos de crio preservación de semen equino Contreras (2022, p.45) reportó los siguientes parámetros del semen fresco de equinos de razas cuarto de milla: volumen de 110,83 ml, un color blanco grisáceo, un aspecto acuoso y olor característico al semen o sui generis; este volumen seminal del semental Cuarto de Milla es superior al Español, pero inferior al Frisón, debido a que la raza del equino influye en este parámetro.

Montiel *et al.*, (2022, p.3) evaluó el volumen seminal de varias razas de equinos, Cuarto de milla 54,0 ml, Árabe 77,0 ml, Frisón 87,0 ml, Español 77,0 ml, Warmblood 68,0 ml y Holsteiner 56,0 ml) con resultados muy diferentes por lo que se determina que la raza de los animales sí influye en este parámetro.

De acuerdo a los resultados se observa la variabilidad del volumen de un eyaculado equino entre los 30,0 y 250,0 ml, este volumen puede modificarse debido a varios factores como la raza, edad, frecuencia de recogida, alimentación, nivel de estimulación o época del año (Gutiérrez, 2014, p.24).

4.1.2. Características microscópicas

Las características microscópicas de semen equino (motilidad individual, motilidad masal, viabilidad espermática, morfoanomalías y concentración espermática) evaluadas en los dos sementales de razas Español y Frisón se describen en la tabla 2-4.

Las características microscópicas son similares en ambos sementales, sin embargo se encuentran diferencias en la concentración espermática, observando una mayor concentración en el equino Frisón con $5,57 \times 10^8$ espermatozoides/ml, mientras que el semental de la raza Española reportó una concentración de $2,51 \times 10^8$ espermatozoides/ml.

Tabla 2-4: Características microscópicas del semen fresco equino.

Características	Español	Frisón
Movimiento individual, %	61,67	68,33
Movimiento en masa	3,33	3,33
Viabilidad espermática, %	93,33	94,67
Morfoanomalías, %	9,00	10,67
Concentración espermática, espermatozoides/ml	$2,51 \times 10^8$	$5,57 \times 10^8$

Realizado por: Tuza, Nelson, 2024.

En la evaluación de protocolos de crío preservación de semen equino Contreras (2022, p.45) reportó los siguientes parámetros del semen fresco de dos equinos de razas cuarto de milla, motilidad espermática 60,0 %; movimiento en masa 3,33; concentración espermática $3,92 \times 10^8$ espermatozoides/ml.

Gutiérrez y Restrepo (2014, p.47), por otro lado señalan que el semen fresco de equino para calificarlo como apto para su congelación debe tener una motilidad mayor al 60,0 % y una concentración espermática mayor al $1,0 \times 10^8$, en la presente investigación el semen tanto del equino de raza Español y Frisón se encuentran aptos para el proceso de críoconservación. La motilidad individual progresiva se ve influenciada por varios factores como la “temperatura, cambios osmóticos, manejo inadecuado del eyaculado, tipo de diluyente, tiempo entre la colección y evaluación de semen, edad, y uso de antibióticos en los diluyentes” (Kandiel, 2018, p.5).

Alvarenga *et al* (2012, p.5) indican que la motilidad en masa o vigor espermático debe ser igual o superior a 3, para calificar una muestra seminal como apta para su congelación; dentro de la investigación los eyaculados de los equinos Español y Frisón presentaron un valor de 3,33 por lo que se encontraron aptos para su procesamiento y congelación.

Montiel *et al.*, (2022, p.3) evaluó el movimiento individual de varias razas de equinos, Cuarto de milla 74,0 %, Árabe 77,0 %, Frisón 71,0 %, Español 71,0 %, Warmblood 74,0 % y Holsteiner 75,0 %; observando que este parámetro se ve claramente influenciado por la raza de los animales.

En cuanto a la concentración espermática Montiel *et al.*, (2022, p.3) determinaron para la raza Cuarto de milla $1,6 \times 10^8$ espermatozoides/ml, Árabe $0,96 \times 10^8$ espermatozoides/ml, Frisón $1,37 \times 10^8$ espermatozoides/ml, Español $1,39 \times 10^8$ espermatozoides/ml, Warmblood $1,84 \times 10^8$ espermatozoides/ml y Holsteiner $2,3 \times 10^8$ espermatozoides/ml; éste parámetro también se encuentra influenciado debido a varios factores como la alimentación, edad, condición corporal, raza de los sementales; otro de los factores que influyen en este parámetro es el método de determinación (automatizado o manual) en donde en este caso al utilizar un método manual (Cámara de Neubauer) podría variar el cálculo con relación a otros autores.

La concentración normal de un equino se encuentra dentro de un amplio rango que va desde $0,5 \times 10^8$ espermatozoides/ml; hasta los 8×10^8 espermatozoides/ml; por lo que los resultados obtenidos en el presente estudio se encuentran dentro del rango normal (Montiel *et al.*, 2022, p.3).

4.2. Características microscópicas de semen equino postcongelación de acuerdo a su raza.

Las características microscópicas de semen equino (Frisón y Español) después de empajillar y descongelar se describen en la tabla 3-4.

Las variables de Integridad de la membrana y viabilidad espermática no presentaron diferencias estadísticas significativas; sin embargo, se observa un ligero incremento en los valores del macho de la raza Frisón en ambos casos.

Tabla 3-4: Características microscópicas del semen equino descongelado, de acuerdo a la raza.

Variables	Español	Frisón	E.E.	Prob.
Motilidad individual				
(%)	42,96 b	56,57 a	2,34	0,0001
Integridad				
membrana (%)	26,02 a	29,72 a	1,4	0,0638
Viabilidad				
espermática (%)	53,8 a	55,93 a	2,48	0,5444

Realizado por: Tuza, Nelson, 2024.

4.2.1. *Motilidad individual, %*

Al analizar la variable motilidad individual de semen equino postcongelación, se observaron diferencias estadísticas significativas ($P < 0,05$) en donde se reporta un promedio de 56,57% para el semental de la raza Frisona versus un 42,96% para el semental de la raza Española (gráfico 1-4).

Se asume así que la motilidad individual en el semen descongelado depende de la raza de los equinos, lo que se puede contrarrestar con Camacho (2014, p.21) quien reporta un 59,0 % al evaluar diluyentes INRA 82 y botucio para la criopreservación espermática de caballos criollos colombianos.

Contreras (2022, p.45) evaluó dos protocolos de crio preservación de semen equino, reportando una motilidad progresiva en el semen descongelado entre un 64, 17 y 71,67 %, estos valores son muy variables y depende del tipo de protocolo que se emplee para el procesamiento del semen, otro autores como Riccio *et al.*, (2016, p.23) reportaron una motilidad del 82,0 %.

Señalando que la raza de los equinos es un factor que difiere los valores de la variable motilidad seminal, Aurich (2020, p.8) reporta un 41,17 % al evaluar la eficiencia de la crio preservación de semen en sementales de la raza Cuarto de Milla y 47,18 % en la raza Árabe; y Sielhorst *et al.*, (2016, p.10) al evaluar el efecto de la congelación múltiple de semen de semental sobre la calidad y fertilidad en la raza Hanoveriana 62,9 %.

Los resultados además pueden variar en dependencia del método de evaluación utilizada, ya sea mediante un sistema automatizado o por observación directa en el microscopio.

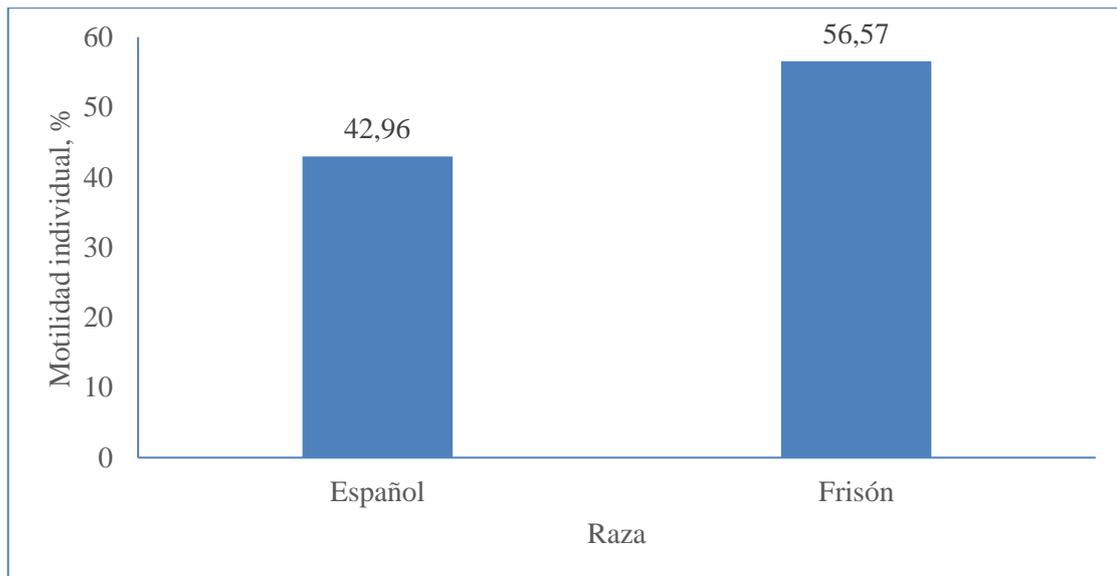


Gráfico 1-4: Motilidad individual (%) del semen descongelado de acuerdo con la raza equina.

Realizado por: Tuza, Nelson, 2024.

4.2.2. *Integridad de la membrana, %*

La variable integridad de la membrana no reportó diferencias estadísticas significativas ($P > 0,05$) de acuerdo a la raza de los equinos, sin embargo se observó un promedio de 29,72% para el semental Frisón y un 26,02% para el semental Español (gráfico 2-4).

Cabrera *et al* (2014, p.8) evaluaron la integridad de las membranas plasmática, acromasal y potencial en semen de equino después del proceso de congelación – descongelación, reportando una integridad de la membrana entre el 15,2 % y 12,6 %, en los equinos se presenta una variabilidad en los datos de integridad de la membrana debido a diversos factores como la raza, los múltiples eyaculados de un mismo animal, los procesos de congelación-descongelación, fragmentación del ADN espermático, translocación de la fosfatidilcerina, daños en el acrosoma, entre otros.

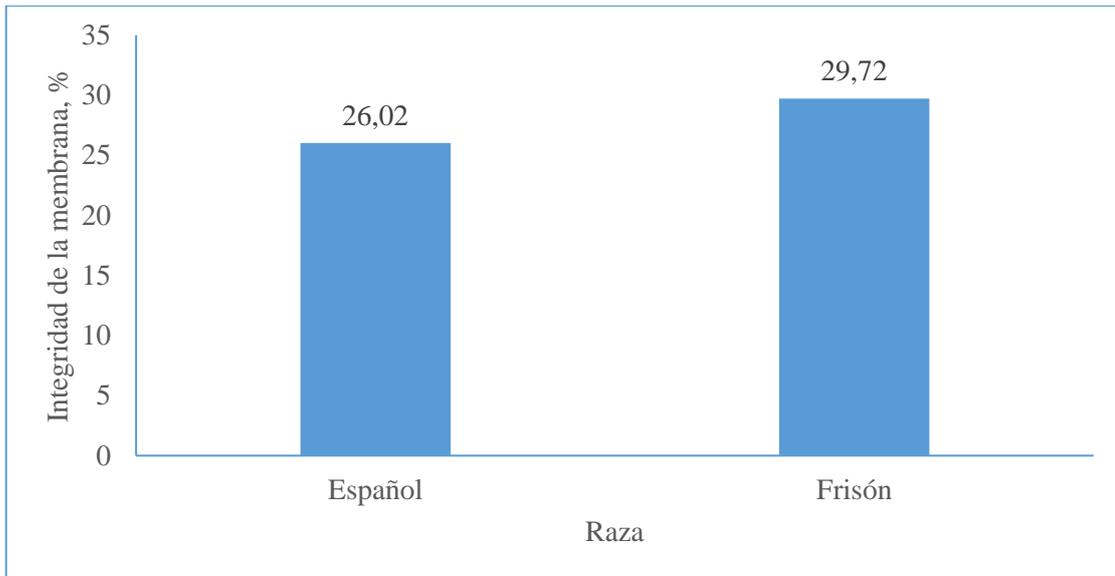


Gráfico 2-4: Integridad de la membrana del semen descongelado de acuerdo con la raza equina.

Realizado por: Tuza, Nelson, 2024.

4.2.3. Viabilidad espermática, %

La viabilidad espermática de semen equino postcongelación no mostró diferencias estadísticas significativas con relación a la raza, sin embargo cabe señalar que el resultado para la raza Española fue un promedio de 53,80 % para la raza Frisona de 55,93 % (gráfico 3-4).

Contreras (2022, p.55) indica que el semen descongelado de equinos de raza cuarto de milla presentaron una viabilidad espermática entre el 46,67 % y 88,33 %, en cambio León y Moreno (2006, p.56) manifiesta valores inferiores a los reportados de entre el 30,0 y 31,0 % en equinos de raza Criollo Colombiano.

Valores inferiores se reportó por Clavijo (2015, p.10) al determinar una viabilidad espermática promedio del semen descongelado del 39,5 % en la raza Española. Este factor no solo está en dependencia de la raza sino también de otros factores, como los cambios de temperatura y alteraciones de la membrana del espermatozoide, pero como un valor en general los espermatozoides de equinos luego de la descongelación llegan a sobrevivir un 50 % de ellos (Clavijo, 2015, p.23).

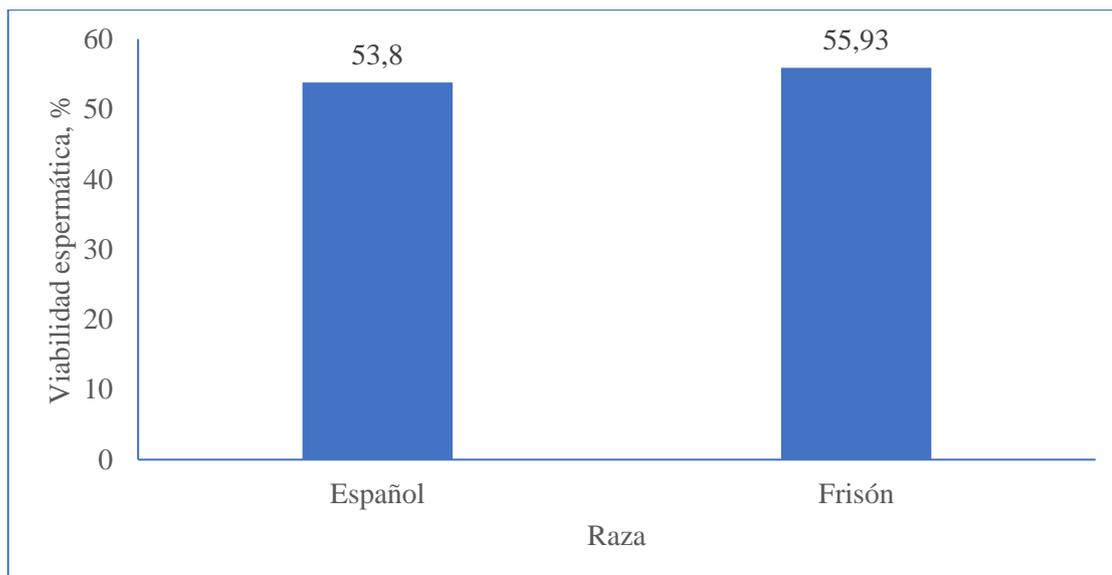


Gráfico 3-4: Viabilidad espermática del semen descongelado de acuerdo a la raza equina.

Realizado por: Tuza, Nelson, 2024.

4.3. Características microscópicas de semen equino en tres diferentes curvas de congelación (2, 3 y 4 horas de enfriamiento).

Las características microscópicas de semen equino (movimiento individual, integridad de la membrana y viabilidad espermática) después de empajillar y descongelar el semen de dos sementales de razas Español y Frisón, de acuerdo a las curvas de congelación (2, 3 y 4 horas), se describen en la tabla 4-4.

Las característica microscópicas muestran valores superiores ($P < 0,05$) en la motilidad individual y viabilidad espermática, a las 2 y 3 horas de congelación; mientras que en la variable integridad de la membrana a las 3 horas de congelación fue el tratamiento que presentó mejores resultados (tabla 4-4).

Tabla 4-4: Características microscópicas del semen equino descongelado, de acuerdo a las curvas de congelación.

Variables	2 horas	3 horas	4 horas	E.E.	Prob.
Motilidad					
individual (%)	52,78 a	59,31 a	37,22 b	2,68	<0,0001
Integridad					
membrana (%)	24,17 b	36,53 a	22,92 b	1,41	<0,0001

Viabilidad espermática (%)	61,81 a	67,78 a	35,00 b	1,87 <0,0001
----------------------------------	---------	---------	---------	--------------

Realizado por: Tuza, Nelson, 2024.

4.3.1. Motilidad individual, %

El análisis de regresión de la motilidad individual espermática en los sementales equinos, presentó diferencias estadísticas ($P < 0,05$); a medida que aumentan las horas de congelación del semen, la motilidad individual de los espermatozoides también aumenta ($r = 0,11$). El coeficiente de determinación (R^2), indica que el 1,13 % de la varianza de la variable motilidad individual está explicado por las horas de congelación del semen, mientras que el 98,87 % restante, está en dependencia de factores externos, como el manejo individual de los equinos, medio ambiente, entre otros; como se puede observar en el gráfico 4-4.

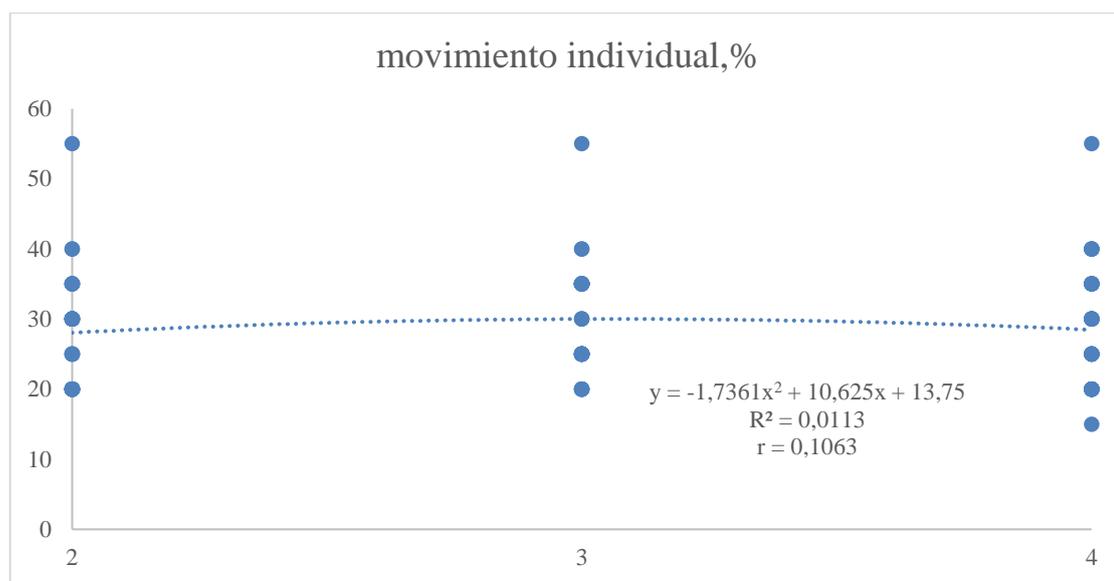


Gráfico 4-4: Análisis de regresión de la motilidad individual del semen descongelado de acuerdo a las curvas de congelación.

Realizado por: Tuza, Nelson, 2024.

El movimiento individual de los espermatozoides muestra un mayor valor al utilizar una curva de congelación de 3 horas; de acuerdo a Neira et al., (2007, p.23) demuestra que la curva de congelación prolongada no es favorable ya que se ejercen más efectos tóxicos sobre la célula y la integridad de la membrana y el movimiento de los espermatozoides se reduce.

La crio preservación de los espermatozoides equinos se produce cuando se reduce la temperatura hasta los $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$, lo que provoca daños a las células sexuales “los espermatozoides cesan su

actividad metabólica y se tornan células durmientes, el espermatozoide alcanza un estado de anabiosis al encontrarse en nitrógeno líquido -196°C, en este momento no hay paso de agua, y se forman cristales” (Caldevilla et al., 2020, p.11).

4.3.2. Integridad de la membrana, %

El análisis de regresión de la integridad de la membrana espermática en los sementales equinos, presentó diferencias ($P < 0,05$); a medida que aumentan las horas de congelación del semen, el porcentaje de la integridad de la membrana de los espermatozoides aumenta ($r = 0,21$). El coeficiente de determinación (R^2), indica que el 4,48 % de la varianza de la variable integridad de la membrana está explicado por las horas de congelación del semen, mientras que el 95,52 % restante, está en dependencia de factores externos, como el manejo individual de los equinos, medio ambiente, entre otros; como se puede observar en el gráfico 5-4.

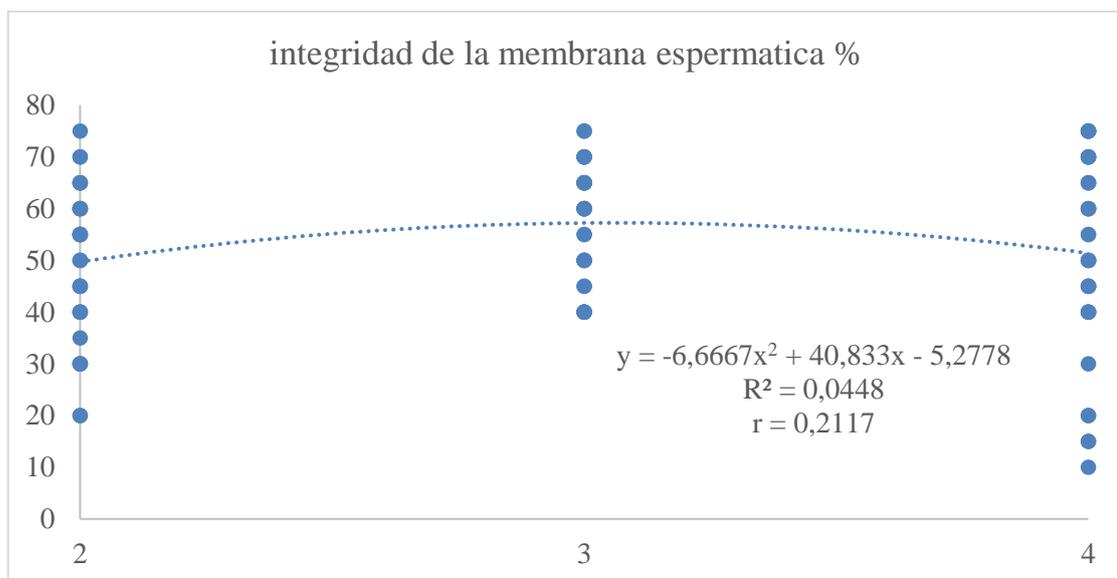


Gráfico 5-4: Análisis de regresión de la integridad de la membrana espermática del semen descongelado, de acuerdo a las curvas de congelación.

Realizado por: Tuza, Nelson, 2024.

La variable integridad de la membrana demuestra el metabolismo espermático y el éxito en la fertilización. “La capacidad fecundante de los espermatozoides se ve influenciada debido al choque térmico producido durante la congelación, este proceso puede producir daños como hinchamiento, ruptura, cambios en la fluidez, alteración del flujo de calcio y cambios en la actividad enzimática” (Criciani et al., 2015, p.2).

El cambio de temperaturas durante el proceso puede provocar una capacitación espermática anticipada. Para comprobar la integridad de las células espermáticas se puede realizar un test hipo osmótico, para lo cual se coloca los espermatozoides en una solución (citrato de sodio).

4.3.3. Viabilidad espermática, %

El análisis de regresión de la viabilidad espermática en los sementales equinos, presentó diferencias ($P < 0,05$); a medida que aumentan las horas de congelación del semen, el porcentaje de la viabilidad espermática de los espermatozoides aumenta ($r = 0,07$). El coeficiente de determinación (R^2), indica que el 0,55 % de la varianza de la variable viabilidad espermática está explicado por las horas de congelación del semen, mientras que el 99,45 % restante, está en dependencia de factores externos, como el manejo individual de los equinos, medio ambiente, entre otros; como se puede observar en el gráfico 6-4.

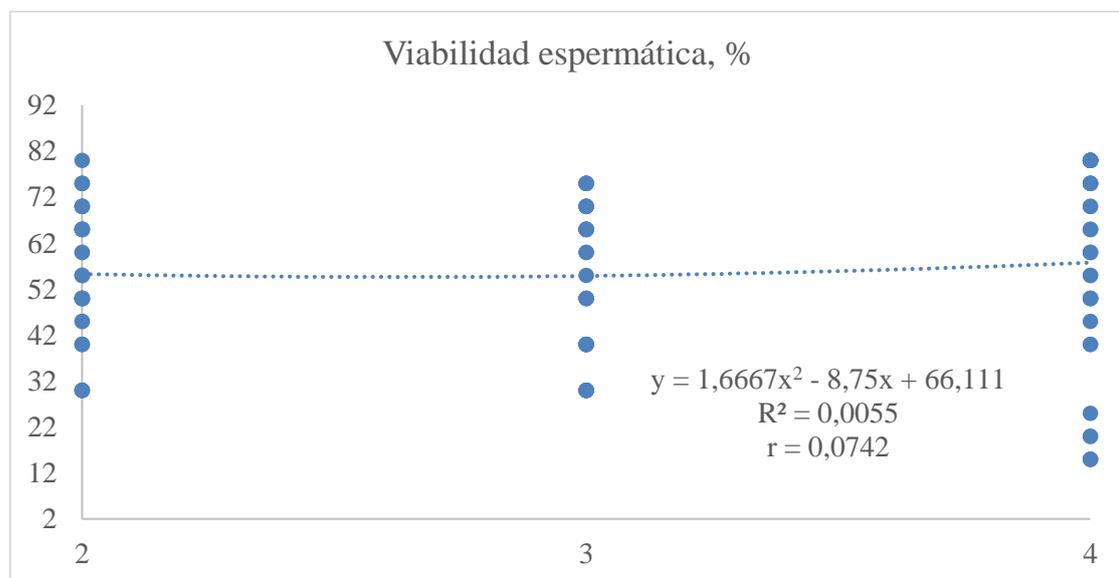


Gráfico 6-4: Análisis de regresión de la viabilidad espermática del semen descongelado, de acuerdo a las curvas de congelación.

Realizado por: Tuza, Nelson, 2024.

La viabilidad espermática está en estrecha relación con la composición del medio de dilución para proteger a los espermatozoides al momento de su congelación y al descongelar no exista daños en la integridad de los espermatozoides (Cruciani *et al.*, 2015, p.3).

4.4. Costos de cada tratamiento.

Los resultados obtenidos después de haber realizado el respectivo análisis de los costos empleados se muestran en la tabla 5-4.

Después de evaluar la variable costos de producción, se obtuvieron 745 pajuelas provenientes de tres extracciones del semental de la raza Español y 2972 pajillas del equino de la raza Frisón, debido al volumen seminal y al conteo de espermatozoides se necesitó de una mayor inversión en una raza en comparación a la otra.

Tabla 5-4: Análisis de los costos de cada tratamiento.

Variables	unidad	Costo unitario, (\$)	Razas			
			Español		Frisón	
			Cantidad	Total	Cantidad	Total
Costos	\$					
*pajillas	unidad	190,00	745,00	70,82	2972,00	282,30
*Botrucio	unidad	100,00	15,00	150,00	59,00	590,00
*RAMP PLUS	unidad	15,00	3,00	500,00	12,00	500,00
Nitrógeno líquido	kg	2,50	6,00	15,00	24,00	60,00
Total costos	\$			735,82		1432,30

*costo 200 pajillas \$190,0; costo frasco 25 ml Botrucio \$100,0; costo 1 sobre RAMP PLUS \$15,0.

CAPITULO V

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

Al analizar los resultados obtenidos en la presente investigación, se llegó a las siguientes conclusiones:

- Al evaluar las características del semen equino fresco se determinó que las características macroscópicas son similares en ambos sementales; sin embargo, se reporta un volumen de eyaculado mayor en el equino Frisón con 130,0 ml en relación al de la raza Española con 66,67 ml.
- De acuerdo a la raza de los equinos las características microscópicas muestran valores superiores en la raza Frisón en la motilidad individual con un 56,57 %; mientras que en las otras variables no se reportan diferencias significativas con un promedio de la integridad de la membrana 27,87 % y de la viabilidad espermática de 54,86 %.
- De acuerdo a las curvas de congelación las características microscópicas muestran valores superiores en la motilidad individual y viabilidad espermática, a las 2 y 3 horas de congelación; mientras que en la variable integridad de la membrana a las 3 horas de congelación presentó mejores resultados.
- Los costos para procesar el semen de tres extracciones del equino de la raza Español es de \$ 735,82 y del equino de la raza Frisón es de \$ 1432,30.

5.2. Recomendaciones

- Realizar una investigación con diferentes tiempos en las curvas de congelación del semen equino con el propósito de conocer si se puede obtener un efecto significativo sobre las otras variables microscópicas como son la movilidad individual, la movilidad en masa y la viabilidad espermática.
- Se recomienda utilizar tres horas dentro del protocolo de congelación de semen equino debido a que presentó mayores niveles de motilidad individual, integridad de la membrana y viabilidad espermática (%).
- Realizar este tipo de valoraciones en semen de equinos de diferentes razas, debido a que este factor influye en los parámetros macroscópicos y microscópicos de la calidad seminal.
- Controlar cuidadosamente todas las variables externas que puedan influir en los resultados del estudio, como la temperatura ambiente, la humedad y el tiempo de procesamiento del semen antes de la congelación.

BIBLIOGRAFÍA

1. **ALMEIDA SOSA, M. R.** *Caracterización zoométrica y diagnóstico de los sistemas de producción de caballos mestizos de vaquería en el cantón Rumiñahui*. [En línea]. (Trabajo de titulación) (Pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba-Ecuador. 2012. [Consulta: 2024-03-10].
2. **ALVARENGA, M.A; et al.** “Methods of Concentrating Stallion Semen. *Journal of Equine*”. *Veterinary Science* [en línea], 2012, 32: pp. 424-429. [Consulta: 2024-03-10].
3. **AURICH, J.** “Efficiency of Semen Cryopreservation in Stallions”. *Animals* [en línea], 2020,10: págs. 1-13. [Consulta: 2024-03-10].
4. **AZNARÁN VIGO, R. G.** 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. (Trabajo de titulación). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. 2019. págs. 20-23. [Consulta: 2024-03-10].
5. **BORUNDA BALDERRAMA, R.** Evaluación de la calidad seminal en fresco y posdescongelado de sementales equinos de la Comarca Lagunera. (Trabajo de titulación). Universidad de la Salle, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Programa de Medicina Veterinaria. Bogotá, Colombia. 2010. págs. 20-23. [Consulta: 2024-03-10].
6. **CABRERA, P; et al.** “Selección espermática en semen congelado/descongelado de equino: evaluación de las membranas plasmática, acrosomal y potencial de membrana mitocondrial”. *International Journal of Morphology* [en línea], 2014, 32(2), págs. 725-731. [Consulta: 2024-03-26].
7. **CAMACHO C, A.** Evaluación de los diluyentes INRA 82 y Botucio para la criopreservación espermática de caballos criollos colombianos. (Trabajo de titulación). Universidad de la Salle. Bogotá, Colombia. 2014. págs. 2-12. [Consulta: 2024-03-21].
8. **CLAVIJO, L.** Evaluación de dos diluyentes comerciales en el proceso de criopreservación de células espermáticas de caballos Pura Raza Española de entre 6 y 10 años. (Trabajo de titulación). Universidad San Francisco de Quito. Ecuador. 2015. págs. 12-31. [Consulta: 2024-03-10].

9. **CONTRERAS, F. A.** *Evaluación de dos protocolos de criopreservación de semen equino*. Colombia: FAO, 2022. [Consulta: 2024-03-10]. Disponible en: <https://agris.fao.org/search/en/providers/124309/records/6511b0010777009829fa4f82>
10. **CRUCIANI, O; et al.** “Evaluación de la integridad de membranas plasmáticas en espermatozoides equinos refrigerados”. *Revista Jornadas de Investigación – UMaza* [en línea], 2015, 32(2), págs. 7-31. [Consulta: 2024-03-22].
11. **ELGUETA, J.** Actualización en técnicas de criopreservación de espermatozoides equinos. (Trabajo de Titulación). Universidad De Las Américas Facultad De Medicina Veterinaria Y Agronomía Escuela De Medicina Veterinaria. Santiago-Chile. 2018. págs. 7-11 [Consulta: 2024-03-21].
12. **VICENTÉ, R.** Extracción, evaluación y procesamiento de semen equino. Universidad autónoma agraria “Antonio narro” división de ciencia animal. Coahuila, México. 2006. págs. 5-21. [Consulta: 2024-03-21].
13. **GIRALDO, Natalia; et al.** “Evaluación del efecto de la refrigeración sobre la calidad del semen equino”. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia* [en línea], 2006, vol. 1, no 2, págs. 8-16. [Consulta: 2024-03-21].
14. **GUTIÉRREZ, L. C.** Optimización de las técnicas de acondicionamiento del semen equino para los procesos de conservación seminal. (Trabajo de titulación). Universidad Complutense de Madrid. Madrid - España. 2014. págs. 23-35. [Consulta: 2024-03-10].
15. **HERNÁNDEZ GUERRA, Á. M.** Caracterización hematológica e inmunofenotípica del caballo de Pura Raza Española. (Trabajo de titulación). Universidad Cardenal Herrera. Valencia - España. 2008. págs. 12-15. [Consulta: 2024-03-11].
16. **KANDIEL M, E.** “Evaluation of semen characteristics, oxidative stress and biochemical indices in Arabian horses of different ages during the hot summer season”. *Iranian Journal of Veterinary Research* [en línea], 2018, 19(4): págs. 270-275. [Consulta: 2024-03-15].
17. **LARREA IZURIETA, C. O.** (2014). Caracterización zoométrica y genética del caballo autóctono de los cantones Chambo y Guamote de la provincia de Chimborazo (Trabajo de Titulación). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba – Ecuador. 2014. págs. 70-75. [Consulta: 2024-03-10].

18. **LAUREANO, F.** Cría y manejo del caballo (Trabajo de Titulación). Universidad autónoma agraria “Antonio Narro” división de ciencia animal departamento de producción animal. Coahuila - México. 2005. págs. 20-47. [Consulta: 2024-03-8].
19. **LEÓN, S, & MORENO D, A.** Efecto de la asociación l-glutamina - etilenglicol en la criopreservación de semen equino (Trabajo de Titulación). Universidad De La Salle. Bogotá . Colombia. 2006. págs. 12-37. [Consulta: 2024-03-6].
20. **MESA GUERRA, P. F.** Beneficios y ventajas de la inseminación artificial utilizando semen congelado en programas de reproducción en equinos (Trabajo de Titulación). Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de La Salle. Bogotá - Colombia. 2015. págs. 16-23. [Consulta: 2024-03-10].
21. **MONTIEL QUIROGA, A. J; et al.** “Características seminales antes y después de la criopreservación de seis razas de equinos en latitudes cercanas al Ecuador”. *Revista de Salud Animal* [en línea], 2022, 1(4): págs. 20-25. [Consulta: 2024-03-10].
22. **NEIRA, J. A; et al.** “Efecto de la asociación L-Glutamina–Etilenglicol en la criopreservación de semen equino”. *Revista de Medicina Veterinaria* [en línea], 2007, (14), págs. 93-105. [Consulta: 2024-03-10].
23. **OSPITIA RODRÍGUEZ, P & GONZÁLEZ CAICEDO, A.** Efecto del medio extensor y de las curvas de enfriamiento y congelamiento en la célula espermática equina en caballos de la sabana de Bogotá. (Trabajo de titulación). Universidad de La Salle. Bogotá - Colombia. 2011. págs. 6-42. [Consulta: 2024-03-10].
24. **QUIROZ, B; et al.** “Caracterización morfométrica en equinos utilizados como herramienta de tracción en Florencia–Caqueta”. *Revista Facultad de Ciencias Agropecuarias-FAGROPEC* [en línea], 2015, 7(1), págs. 26-31. [Consulta: 2024-03-10].
25. **RANGEL NÚÑEZ, Edison Darío.** Análisis de Técnicas De Congelación De Semen Equino Empleadas En La Actualidad. (Trabajo de titulación). Universidad Antonio Nariño. Bogotá - Colombia. 2023. págs. 6-42. [Consulta: 2024-03-10].
26. **RESTREPO BETANCUR, Giovanni; et al.** “Proliferación microbiana y calidad posdescongelación de semen equino criopreservado en presencia de antibióticos”. *Revista*

de Investigaciones Veterinarias del Perú [en línea], 2016, vol. 27, no 2, págs. 316-325. [Consulta: 2024-03-10].

27. **RICCIO G, N; et al.** “Motility of Stallion Spermatozoa after Centrifugation and Cooling in INRA96® or Walworth Extender”. *Journal of Agricultural Science and Technology* [en línea], 2016, 6: págs. 143-147. [Consulta: 2024-03-17].
28. **SIELHORST, J; et al.** Effect of multiple freezing of stallion semen on sperm quality and fertility. *Journal of Equine Veterinary Science* [en línea], 2016, 40: págs 56-61. [Consulta: 2024-03-10].
29. **TREJOS SOTO, A.** Manejo reproductivo del semental equino. (Trabajo de titulación). Universidad autónoma Agraria Antonio Narro. México - Torreón, 2009. págs. 11-24. [Consulta: 2024-03-15].
30. **VALERA CÓRDOBA, M; et al.** “Otras razas equinas en Andalucía”. *Las razas ganaderas de Andalucía. Patrimonio ganadero andaluz* [en línea], 2007. 2: págs 16-19. [Consulta: 2024-03-16].
31. **VÉLEZ, A.** Comparación del efecto de la centrifugación con coloide equipure® y del protocolo de refrigeración sobre la viabilidad de la célula espermática en caballo criollo colombiano utilizando dos medios diluyentes Kenney®, Botuspecial. (Trabajo de titulación). Universidad de La Salle. Bogotá - Colombia. 2017. págs. 16-52. [Consulta: 2024-03-15].



ANEXOS

ANEXO A. MOTILIDAD INDIVIDUAL (%)

1. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Razas	H or a	Repeticiones															SU MA	PROM EDIO				
		i	ii	iii	iv	v	vi	vii	viii	ix	x	xi	xii	xiii	xiv	xv						
ESPAÑOL	2	45	50	55	40	40	50	65	65	65	60	65	65	70	40	45	40	50	55	40	940,00	52,22
ESPAÑOL	3	60	55	60	55	65	65	70	70	60	65	65	70	60	60	65	70	70	70	75	1160,00	64,44
ESPAÑOL	4	30	20	40	30	40	20	50	40	40	40	40	50	10	10	10	20	20	30	560,00	31,11	
FRISÓN	2	55	60	50	55	55	60	60	60	60	50	55	60	60	50	60	50	50	50	60	1030,00	57,22
FRISÓN	3	65	75	65	70	70	65	70	70	70	70	70	70	60	70	60	60	60	75	1245,00	69,17	
FRISÓN	4	45	45	30	30	30	40	50	40	40	50	40	40	40	40	50	40	50	40	765,00	42,50	
Promedio General																						52,78
Desviación Estándar																						1,94
Coficiente de Variación (CV)																						15,61

2. ANÁLISIS DE VARIANZA

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Raza	1337,04	1	1337,04	19,71	<0,0001
Curva de conservación	16404,17	2	8202,08	120,91	<0,0001
Raza*Curva de conservación..	256,02	2	128,01	1,89	0,1568
Error	6919,44	102	67,84		
Total	24916,67	107			

3. MEDIAS Y ASIGNACIÓN DE RANGOS DE ACUERDO A LA PRUEBA DE TUKEY (P≤0,05)

Raza	Medias	n	E.E.		
Frison	56,3	54	1,12	A	
Español	49,26	54	1,12		B

Curva de conservación	Medias	n	E.E.			
T2	66,81	36	1,37	A		
T1	54,72	36	1,37		B	
T3	36,81	36	1,37			C

Raza	Curva de conservación	Medias	n	E.E.	
Frison	T2	69,17	18	1,94	A
Español	T2	64,44	18	1,94	A
Frison	T1	57,22	18	1,94	A
Español	T1	52,22	18	1,94	A
Frison	T3	42,5	18	1,94	A
Español	T3	31,11	18	1,94	A

ANEXO B. INTEGRIDAD MEMBRANA (%)

1. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Razas	H or a	Repeticiones															SU MA	PROM EDIO							
		i	ii	i	v	v	i	ii	vi	i	x	x	i	ii	xi	i			x	v	v	i	i	xv	iii
ESPAÑOL	2	3	4	2	2	3	2	2	3	3	2	3	3	3	2	2	2	4	0	0	5	0	30	520,00	28,89
ESPAÑOL	3	2	3	3	2	3	2	3	4	2	3	4	2	2	4	3	2	3	0	0	5	5	40	550,00	30,56
ESPAÑOL	4	2	2	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	2	2	2	2	0	0	0	25	420,00	23,33
FRISÓN	2	2	2	3	2	2	3	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	0	0	5	0	35	430,00	23,89
FRISÓN	3	3	3	5	3	3	4	3	3	5	3	3	4	3	3	5	3	3	0	0	5	5	35	700,00	38,89
FRISÓN	4	3	2	3	3	2	3	3	2	3	3	2	3	3	2	3	3	2	0	0	0	0	35	495,00	27,50
Promedio General																							28,84		
Desviación Estándar																							1,44		
Coficiente de Variación (CV)																							21,13		

2. ANÁLISIS DE VARIANZA

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Raza	168,75	1	168,75	4,54	0,0355
Curva de conservación	1883,8	2	941,9	25,35	<0,0001
Raza*Curva de conservación..	837,5	2	418,75	11,27	<0,0001
Error	3790,28	102	37,16		
Total	6680,32	107			

3. MEDIAS Y ASIGNACIÓN DE RANGOS DE ACUERDO A LA PRUEBA DE TUKEY (P≤0,05)

Raza	Medias	n	E.E.		
Frison	30,09	54	0,83	A	
Español	27,59	54	0,83		B

Curva de conservación	Medias	n	E.E.		
T2	34,72	36	1,02	A	
T1	26,39	36	1,02		B
T3	25,42	36	1,02		B

Raza	Curva de conservación	Medias	n	E.E.			
Frisón	T2	38,89	18	1,44	A		
Español	T2	30,56	18	1,44		B	
Español	T1	28,89	18	1,44		B	C
Frison	T3	27,5	18	1,44		B	C
Frison	T1	23,89	18	1,44			C
Español	T3	23,33	18	1,44			C

ANEXO C. VIABILIDAD ESPERMÁTICA (%)

1. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Razas	H or a	Repeticiones															SU MA	PROM EDIO			
		i	ii	iii	iv	v	vi	vii	viii	ix	x	xi	xii	xiii	xiv	xv					
ESPAÑOL	2	50	55	55	60	65	70	70	75	65	75	75	75	45	55	60	60	65	55	112 5,00	62,50
ESPAÑOL	3	70	65	65	65	65	75	75	65	65	65	65	75	65	65	65	75	75	75	121 5,00	67,50
ESPAÑOL	4	40	30	40	30	30	30	40	30	40	30	30	30	15	15	15	25	25	20	510, 00	28,33
FRISÓN	2	55	40	45	50	50	58	78	88	88	78	88	58	58	64	45	55	55	55	106 5,00	59,17
FRISÓN	3	75	80	70	75	65	78	88	88	88	78	88	65	75	65	65	75	75	75	131 5,00	73,06
FRISÓN	4	60	50	55	45	55	40	40	55	55	55	55	40	30	40	35	55	40	40	815, 00	45,28
Promedio General																					55,97
Desviación Estándar																					2,13
Coficiente de Variación (CV)																					16,18

2. ANÁLISIS DE VARIANZA

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Raza	1102,08	1	1102,08	13,43	0,0004
Curva de conservación	21443,06	2	10721,53	130,69	<0,0001
Raza*Curva de conservación..	1859,72	2	929,86	11,33	<0,0001
Error	8368,06	102	82,04		
Total	32772,92	107			

3. MEDIAS Y ASIGNACIÓN DE RANGOS DE ACUERDO A LA PRUEBA DE TUKEY (P≤0,05)

Raza	Medias	n	E.E.		
Frison	59,17	54	1,23	A	
Español	52,78	54	1,23		B

Curva de conservación	Medias	n	E.E.		
T2	70,28	36	1,51	A	
T1	60,83	36	1,51		B
T3	36,81	36	1,51		C

Raza	Curva de conservación	Medias	n	E.E.				
Frison	T2	73,06	18	2,13	A			
Español	T2	67,5	18	2,13	A	B		
Español	T1	62,5	18	2,13		B		
Frison	T1	59,17	18	2,13		B		
Frison	T3	45,28	18	2,13			C	
Español	T3	28,33	18	2,13				D

ANEXO D. MEDIDAS EN SEMEN FRESCO

1. MEDIDAS RESUMEN

Raza	Variable	n	Media	D.E.	Mín	Máx
Español	volumen Sin Filtro (ml)	3	66,67	7,64	70	85
Español	pH	3	7,33	0,21	7,1	7,5
Español	movimiento individual	3	61,67	2,89	70	75
Español	movimiento en masa	3	3,33	0,58	3	4
Español	Viabilidad espermática, %	3	93,33	1,53	92	95
Español	Morfo anomalías (%)	3	9	1	8	10
Español	Concentración espermática.	3	250666667	66153861,1	177000000	305000000
Frisón	volumen Sin Filtro (ml)	3	130	0	120	120
Frisón	pH	3	7,33	0,06	7,3	7,4
Frisón	movimiento individual	3	68,33	0	75	75
Frisón	movimiento en masa	3	3,33	0,58	3	4
Frisón	Viabilidad espermática, %	3	94,67	0,58	94	95
Frisón	Morfo anomalías (%)	3	10,67	1,53	9	12
Frisón	Concentración espermática.	3	556666667	233041484	300000000	755000000

ANEXO E. ANÁLISIS DE REGRESIÓN

1. INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA ESPERMÁTICA

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
HORAS CONGELACIÓN	4075,46	2	2037,73	28,59	<0,0001
Error	7484,72	105	71,28		
Total	11560,19	107			

Coef	Est.	E.E.	LI(95%)	LS(95%)	T	p-valor
const	-78,47	14,69	-107,6	-49,34	-5,34	<0,0001
HORAS CONGELACIÓN	77,29	10,39	56,69	97,89	7,44	<0,0001
HORAS CONGELACIÓN ²	-12,99	1,72	-16,4	-9,57	-7,54	<0,0001

2. MOVIMIENTO INDIVIDUAL

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
HORAS CONGELACIÓN	9267,13	2	4633,56	17,98	<0,0001
Error	27052,08	105	257,64		
Total	36319,21	107			

Coef	Est.	E.E.	LI(95%)	LS(95%)	T	p-valor
const	-46,11	27,93	-101,49	9,27	-1,65	0,1017
HORAS CONGELACIÓN	78,06	19,75	38,9	117,21	3,95	0,0001
HORAS CONGELACIÓN ²	-14,31	3,28	-20,8	-7,81	-4,37	<0,0001

3. VIABILIDAD ESPERMÁTICA

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
HORAS CONGELACIÓN	21943,06	2	10971,53	86,75	<0,0001
Error	13279,86	105	126,47		
Total	35222,92	107			

Coef	Est.	E.E.	LI(95%)	LS(95%)	T	p-valor
const	-66,39	19,57	-105,19	-27,59	-3,39	0,001
HORAS CONGELACIÓN	102,85	13,84	75,41	130,28	7,43	<0,0001
HORAS CONGELACIÓN ²	-19,37	2,3	-23,93	-14,82	-8,44	<0,0001

ANEXO F. RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS



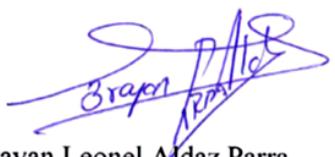
ANEXO G. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.





ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
CERTIFICADO DE CUMPLIMIENTO DE LA GUÍA PARA
NORMALIZACIÓN DE TRABAJOS DE FIN DE GRADO

Fecha de entrega: 10/07/2024

INFORMACIÓN DEL AUTOR
Nombres – Apellidos: Nelson Fabián Tuza Guachi
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: Ciencias Pecuarias
Carrera: Zootecnia
Título a optar: Ingeniero Zootecnista
<p style="text-align: center;"> Ing. Carlos Andres Mancheno Herrera, MgS Director del Trabajo de Integración Curricular</p> <p style="text-align: center;"> Ing. Brayan Leonel Aldaz Parra Asesor del Trabajo de Integración Curricular</p>