



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Título:

**EVALUACIÓN DE DOS DILUYENTES BOTUCRIO® E INRA96
MEDIANTE CRIOCONSERVACIÓN DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS EN
CABALLOS LUCITANO Y ARABE EN EL CANTÓN LATACUNGA.**

Proyecto de Investigación presentado previo a la obtención del Título de Médico
Veterinario

Autor:

Tigse Vargas Ángel Fernando

Tutor:

Garzón Jarrin Rafael Alfonso PhD.

LATACUNGA – ECUADOR

Agosto 2023

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Ángel Fernando Tigse Vargas, con cédula de ciudadanía No. 1725922445, declaro ser autor del presente proyecto de investigación: “Evaluación de dos diluyentes Botucio® e Inra96 mediante crioconservación de células espermáticas en caballos Lucitano y Arabe en el cantón latacunga.”, siendo el Doctor PhD. Rafael Alfonso Garzón Jarrin , Tutor del presente trabajo; y, eximo expresamente a la Universidad Técnica de Cotopaxi y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

Además, certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Latacunga, 17 de agosto del 2023



Ángel Fernando Tigse Vargas Estudiante
C.C.1725922445



Dr. Rafael Alfonso Garzón Jarrin, PhD.
Docente Tutor
C.C. 0501097224

CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR

Comparecen a la celebración del presente instrumento de cesión no exclusiva de obra, que celebran de una parte **TIGSE VARGAS ÁNGEL FERNANDO**, identificado con cédula de ciudadanía **1725922445** de estado civil soltero, a quien en lo sucesivo se denominará **EL CEDENTE**; y, de otra parte, la Doctora Idalia Eleonora Pacheco Tigselema, en calidad de Rectora, y por tanto representante legal de la Universidad Técnica de Cotopaxi, con domicilio en la Av. Simón Rodríguez, Barrio El Ejido, Sector San Felipe, a quien en lo sucesivo se le denominará **LA CESIONARIA** en los términos contenidos en las cláusulas siguientes:

ANTECEDENTES: CLÁUSULA PRIMERA. - **EL CEDENTE** es una persona natural estudiante de la carrera de Medicina Veterinaria, titular de los derechos patrimoniales y morales sobre el trabajo de grado “Evaluación de dos diluyentes Botucurio® e Inra96 mediante crioconservación de células espermáticas en caballos Lucitano y Arabe en el cantón latacunga.”, la cual se encuentra elaborada según los requerimientos académicos propios de la Facultad; y, las características que a continuación se detallan:

Historial Académico

Inicio de la carrera: Abril 2018 - Agosto 2018

Finalización de la carrera: Abril 2023 – Agosto 2023

Aprobación en Consejo Directivo: 25 de mayo del 2023

Tutora: Doctor PhD. Rafael Alfonso Garzón Jarrin

Tema: “Evaluación de dos diluyentes Botucurio® e Inra96 mediante crioconservación de células espermáticas en caballos Lucitano y Arabe en el cantón latacunga.”

CLÁUSULA SEGUNDA. - **LA CESIONARIA** es una persona jurídica de derecho público creada por ley, cuya actividad principal está encaminada a la educación superior formando profesionales de tercer y cuarto nivel normada por la legislación ecuatoriana la misma que establece como requisito obligatorio para publicación de trabajos de investigación de grado en su repositorio institucional, hacerlo en formato digital de la presente investigación.

CLÁUSULA TERCERA. - Por el presente contrato, **EL CEDENTE** autoriza a **LA CESIONARIA** a explotar el trabajo de grado en forma exclusiva dentro del territorio de la República del Ecuador.

CLÁUSULA CUARTA. - **OBJETO DEL CONTRATO:** Por el presente contrato **EL CEDENTE**, transfiere definitivamente a **LA CESIONARIA** y en forma exclusiva los siguientes derechos patrimoniales; pudiendo a partir de la firma del contrato, realizar, autorizar o prohibir:

- a) La reproducción parcial del trabajo de grado por medio de su fijación en el soporte informático conocido como repositorio institucional que se ajuste a ese fin.
- b) La publicación del trabajo de grado.
- c) La traducción, adaptación, arreglo u otra transformación del trabajo de grado con fines académicos y de consulta.

- d) La importación al territorio nacional de copias del trabajo de grado hechas sin autorización del titular del derecho por cualquier medio incluyendo mediante transmisión.
- e) Cualquier otra forma de utilización del trabajo de grado que no está contemplada en la ley como excepción al derecho patrimonial.

CLÁUSULA QUINTA. - El presente contrato se lo realiza a título gratuito por lo que **LA CESIONARIA** no se halla obligada a reconocer pago alguno en igual sentido **EL CEDENTE** declara que no existe obligación pendiente a su favor.

CLÁUSULA SEXTA. - El presente contrato tendrá una duración indefinida, contados a partir de la firma del presente instrumento por ambas partes.

CLÁUSULA SÉPTIMA. - CLÁUSULA DE EXCLUSIVIDAD. - Por medio del presente contrato, se cede en favor de **LA CESIONARIA** el derecho a explotar la obra en forma exclusiva, dentro del marco establecido en la cláusula cuarta, lo que implica que ninguna otra persona incluyendo **EL CEDENTE** podrá utilizarla.

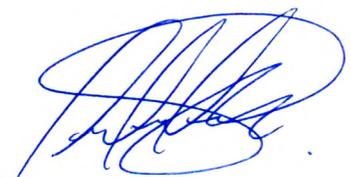
CLÁUSULA OCTAVA. - LICENCIA A FAVOR DE TERCEROS. - **LA CESIONARIA** podrá licenciar la investigación a terceras personas siempre que cuente con el consentimiento de **EL CEDENTE** en forma escrita.

CLÁUSULA NOVENA. - El incumplimiento de la obligación asumida por las partes en la cláusula cuarta, constituirá causal de resolución del presente contrato. En consecuencia, la resolución se producirá de pleno derecho cuando una de las partes comunique, por carta notarial, a la otra que quiere valerse de esta cláusula.

CLÁUSULA DÉCIMA. - En todo lo no previsto por las partes en el presente contrato, ambas se someten a lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, Código Civil y demás del sistema jurídico que resulten aplicables.

CLÁUSULA UNDÉCIMA. - Las controversias que pudieran suscitarse en torno al presente contrato, serán sometidas a mediación, mediante el Centro de Mediación del Consejo de la Judicatura en la ciudad de Latacunga. La resolución adoptada será definitiva e inapelable, así como de obligatorio cumplimiento y ejecución para las partes y, en su caso, para la sociedad. El costo de tasas judiciales por tal concepto será cubierto por parte del estudiante que lo solicitare.

En señal de conformidad las partes suscriben este documento en dos ejemplares de igual valor y tenor en la ciudad de Latacunga, a los 17 días del mes de agosto del 2023.



Ángel Fernando Tigse Vargas

EL CEDENTE

Dra. Idalia Pacheco Tigselema

LA CESIONARIA

AVAL DE LA TUTORA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

En calidad de Tutora del Proyecto de Investigación con el título:

“EVALUACIÓN DE DOS DILUYENTES BOTUCRIO® E INRA96 MEDIANTE CRIOCONSERVACIÓN DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS EN CABALLOS LUCITANO Y ARABE EN EL CANTÓN LATACUNGA.” de Tigse Vargas Ángel Fernando, de la carrera de Medicina Veterinaria, considero que el presente trabajo investigativo es merecedor del Aval de aprobación al cumplir las normas, técnicas y formatos previstos, así como también ha incorporado las observaciones y recomendaciones propuestas en la Pre defensa.

Latacunga, 17 de agosto del 2023



Dr. Rafael Alfonso Garzón Jarrin, PhD.

DOCENTE TUTOR

C.C. 0501097224

AVAL DE LOS LECTORES DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

En calidad de Tribunal de Lectores, aprobamos el presente Informe de Investigación de acuerdo a las disposiciones reglamentarias emitidas por la Universidad Técnica de Cotopaxi; y, por la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales; por cuanto, la postulante: Tigse Vargas Ángel Fernando, con el título de Proyecto de Investigación: “EVALUACIÓN DE DOS DILUYENTES BOTUCRIO® E INRA96 MEDIANTE CRIOCONSERVACIÓN DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS EN CABALLOS LUCITANO Y ARABE EN EL CANTÓN LATACUNGA.”, ha considerado las recomendaciones emitidas oportunamente y reúne los méritos suficientes para ser sometido al acto de sustentación del trabajo de titulación.

Por lo antes expuesto, se autoriza los empastados correspondientes, según la normativa institucional.

Latacunga, 17 de Agosto del 2023



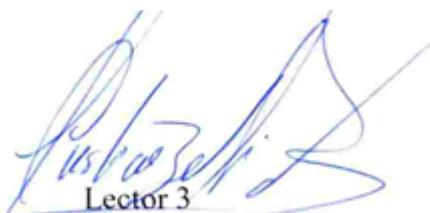
Lector 1 (Presidente)

Dr. Miguel Ángel Gutiérrez Reinoso, Ph.D.
CC: 0502236623



Lector 2

MVZ. Cristian Neptalí Arcos Álvarez, Mg.
CC: 1803675634



Lector 3

MVZ. Cristian Fernando Beltrán Romero, Mg.
CC: 0501942940

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios y mi Santísima Virgen del Cisne “Mi Churonita”, que me han regalado la vida y me han acompañado con su santa bendición en todo momento de mi vida.

A mis Padres, Luis Tigse y Alejandrina Vargas. Por su apoyo incondicional y siempre estar presente en todo momento de mi vida. A mis hermanos Sandra, Wilson, Nancy y Luis Tigse. Por sus consejos y apoyo en cada momento.

A mis Abuelitos Carlos Vargas y Transito Chilig. Por sus consejos para continuar con mi preparación estudiantil.

A una estrella en el cielo que siempre me cuida desde lo más alto a mi abuelito Luis Tigse. Por brindarme sus consejos y enseñanzas para siempre seguir adelante.

Agradezco infinitamente a las empresas: GENUTRIVET, gerente propietario Ing. Edwin Yépez y VITA EQUUS VET, propietario Mvz. Juan Andrés de la Cueva, quienes fueron mentores principales en mi formación profesional.

Gracias de todo corazón a todas las personas que me apoyaron en mi formación profesional.

Ángel Fernando Tigse Vargas.

DEDICATORIA

Dedico este logro a mis Padres Luis Tigse y Alejandrina Vargas, por su apoyo incondicional en lo largo de mi estudiantil. A mis Hijos Josue Alejandro y Fernanda Estefanía, que son el motor fundamental para continuar con mi preparación profesional. Y a todos quienes confiaron en mí y siempre me han brindado su apoyo incondicional.

Ángel Fernando Tigse Vargas.

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

TÍTULO: EVALUACIÓN DE DOS DILUYENTES BOTUCRIO® E INRA96 MEDIANTE CRIOCONSERVACIÓN DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS EN CABALLOS LUCITANO Y ARABE EN EL CANTÓN LATACUNGA

AUTOR: Ángel Fernando Tigse Vargas.

RESUMEN

La reproducción equina es un proceso fundamental dentro de la vida, que nos permite directamente mejorar y renovar las diferentes razas con las características deseadas de acuerdo con los criadores, La conservación de células espermáticas es una técnica de los procesos reproductivos, una de ella es la biotecnología en la actualidad. El mejoramiento genético en los equinos ha permitido el uso de los mejores caballos reproductores dentro del estudio realizado, se hizo una selección, preparación, colecta y evaluación del eyaculado espermático de los equinos. Se escogieron cinco caballos árabes y cinco caballos lusitanos para realizar un análisis sobre la crioconservación del semen en las dos razas, estos sementales son del cantón Latacunga, donde entraron a comparación los dos diluyentes comerciales el cual es el Botucurio e Inra96. Las características de cada uno sin duda son evidentes dentro del análisis macroscópicos como son volumen, concentración, motilidad total, motilidad progresiva, color, olor y pH, en las características microscópicas se evaluó motilidad total, motilidad progresiva, porcentaje de vivos-muertos. En las diferentes extracciones seminales de los equinos se llegó a la conclusión que el diluyente Botucurio en esta investigación dio mejor resultado macroscópico y microscópico con un 70% mientras que el diluyente Inra96 dio un resultado de factibilidad de un 30%. Por consiguiente, se recomienda trabajar con el diluyente Botucurio.

Palabras claves: crioconservación, células espermáticas, diluyentes, semen, razas, mejoramiento equino, biotecnología.

TECHNICAL UNIVERSITY OF COTOPAXI
FACULTY OF AGRICULTURAL SCIENCES AND NATURAL RESOURCES

TITLE: " EVALUATION OF TWO DILUENTS BOTUCRIO® AND INRA96 BY CRYOPRESERVATION OF SPERM CELLS IN LUCITANO AND ARABIAN HORSES IN LATACUNGA CANTON."

AUTHOR: Tigse Vargas Angel Fernando

ABSTRACT

Equine reproduction is an important and fundamental process in the life of stallions since it allows us to directly improve and renew the different breeds with the desired characteristics according to the breeders, the conservation of sperm cells is a technique of the reproductive processes, one of them is biotechnology at present. The genetic improvement in equines has allowed the use of the best reproductive horses within the study carried out, a selection, preparation, collection, and evaluation of the equine sperm ejaculate was made. Five Arabian horses and five Lusitano horses were chosen to carry out an analysis on the cryopreservation of semen in the two breeds, these stallions are from the Latacunga canton, where the two commercial diluents Botucrio and Inra96 were compared. The characteristics of each one are undoubtedly evident in the macroscopic analysis such as volume, concentration, total motility, progressive motility, color, odor, and pH, In the microscopic characteristics, total motility, progressive motility, percentage of live-dead were evaluated. In the different seminal extractions of equines, it was concluded that the Botucrio diluent in this research gave better macroscopic and microscopic results with 70%, while the Inra96 diluent gave a feasibility result of 30%. Therefore, it is recommended to work with the Botucrio diluent because of its greater efficacy in showing excellent results in the evaluations and its moderate economic cost.

Keywords: Cryopreservation, Sperm cells, Extender, Semen, Breeds, Equine breeding, Biotechnology.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DECLARACIÓN DE AUTORÍA	ii
CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR.....	iii
AGRADECIMIENTO	vii
DEDICATORIA.....	viii
RESUMEN.....	ix
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	xi
ÍNDICE DE TABLAS.....	xiii
ÍNDICE DE GRÁFICOS	xiii
1. INFORMACIÓN GENERAL.....	1
2. BENEFICIARIOS.....	2
2.1. Directos: propietarios y el tesista.....	2
2.2. Indirectos: estudiantes de la carrera de medicina veterinaria y asociaciones de criadores equinos.	2
3. JUSTIFICACIÓN.....	2
4. PROBLEMÁTICA.....	3
5. OBJETIVOS.....	4
5.1. Objetivo general:.....	4
5.2. Objetivos específicos:	4
6. ACTIVIDADES Y SISTEMAS DE TAREAS EN RELACIÓN A LOS OBJETIVOS.....	4
7. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICA.....	6
7.1. Caballo.....	6
7.2. Anatomía y fisiología del aparato reproductor del caballo.	6
7.3. Pubertad y madurez sexual en el macho equino	10
7.4. Observación de la libido y de la capacidad de monta.....	11
7.5. Espermatogénesis.....	11
7.6. Espermatozoide equino.....	12
7.7. Extracción y manejo del eyaculado para la crioconservación	12
7.8. Características generales del eyaculado equino previo a la crioconservación.....	13
7.9. Medios diluyentes	13
7.10. Crioconservación.....	14
7.11. Crioconservación de semen equino.....	14
7.12. Enfriamiento previo a la crioconservación del eyaculado equino.....	15
7.13. Evaluación post congelación.....	15
8. ÁREA DE ESTUDIO.....	16

8.1.	Métodos	16
8.2.	Evaluación macroscópica del material seminal	18
8.3.	DISEÑO EXPERIMENTAL	18
9.	METODOLOGÍA	19
9.1.	Materiales.....	19
9.2.	Sementales	19
9.3.	Campo	20
9.4.	Preparación de sementales.	20
9.5.	Armado de la vagina artificial para la colecta	20
9.6.	Preparación de la yegua.	20
9.7.	Colecta de los sementales	20
9.8.	Aplicación de la fórmula para calcular en número de pajillas y en volumen de diluyente que vamos a ocupar.....	21
9.9.	Evaluación macroscópica del semen	21
9.10.	Evaluación microscópica en laboratorio	21
9.11.	Congelación de muestras seminales.....	22
9.12.	Evaluación de pajuelas pos descongelación.....	23
9.13.	Almacenamiento de las muestras seminales	23
9.14.	Descongelación de muestras seminales.....	23
10.	EVALUACIÓN MICROSCÓPICA DE SEMEN POSDESCONGEACION.....	23
11.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	24
12.	DISCUSIÓN	34
13.	CONCLUSIONES.....	34
14.	RECOMENDACIONES	35
15.	BIBLIOGRAFIA	36
16.	ANEXOS	40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Evaluar parámetros macroscópicos del semen de los caballos seleccionados en relación al volumen, color, consistencia, pH, entre otros.....	24
Tabla 2: Evaluación estadística de medias entre los caballos árabes y lucitanos.....	24
Tabla 3: Medir parámetros microscópicos del material seminal; motilidad total y progresiva porcentaje de células vivas y muertas.....	25
Tabla 4: Evaluación de diluyentes ante la raza de caballo.	25
Tabla 5: Evaluación estadística entre medias del diluyente Botucrio e Inra_96.	26
Tabla 6: Evaluación de células espermáticas post descongelamiento en base a las razas en estudio.....	29
Tabla 7: Análisis estadístico entre variable/raza/diluyente	31
Tabla 8: Comparación entre diluyentes y razas de caballos.....	31
Tabla 9: Estimar la efectividad de los diluyentes, BotuCrio e INRA96, mediante estudio estadístico para mantener la funcionalidad de los espermatozoides equinos.	32
Tabla 10: Análisis estadístico entre motilidad total y motilidad progresiva & Diluyentes.....	32

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Porcentaje de motilidad total & Diluyentes.	27
Gráfico 2: Porcentaje de motilidad progresiva & Diluyentes.....	27
Gráfico 3: Porcentaje de espermatozoides & Diluyentes.....	28
Gráfico 4: Porcentaje de espermatozoides muertos & diluentes.	28
Gráfico 5: Porcentaje de espermatozoides vivos entre razas de caballos.....	29
Gráfico 6: Porcentaje de espermatozoides muertos entre razas de caballos.....	30
Gráfico 7: Porcentaje de motilidad parcial entre razas de caballos.....	30
Gráfico 8: Porcentaje de motilidad total entre razas de caballos.....	31
Gráfico 9: Motilidad progresiva en semen fresco & Diluyentes.....	33
Gráfico 10: Motilidad total en semen fresco & Diluyentes.....	33

1. INFORMACIÓN GENERAL

Título del Proyecto: Evaluación de dos diluyentes BotuCrio® e INRA96 mediante crioconservación de células espermáticas en caballos Lucitano y Arabe en el Cantón Latacunga.

Fecha de inicio:

20 de Abril del 2023

Fecha de finalización:

30 de Agosto del 2023

Lugar de ejecución:

Provincia de Cotopaxi.

Cantón Latacunga.

Parroquia Belisario Quevedo.

Facultad que auspicia:

Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales.

Carrera que auspicia:

Medicina Veterinaria

Proyecto de investigación vinculado:

Proyecto de Mejoramiento Genético Equino.

Equipo de Trabajo:

- Tutor: PhD. Rafael Garzón Jarrin
- Estudiante: Ángel Fernando Tigse Vargas.

Área de Conocimiento:

- Ciencias: 42 Ciencias agrarias ciencias veterinarias y genéticas.

Línea de investigación:

- Análisis conservación y aprovechamiento de la biodiversidad local.

Sub líneas de investigación de la Carrera:

- Mejora y conservación de recursos zoogenéticos.

2. BENEFICIARIOS

2.1.Directos: propietarios y el tesista.

2.2.Indirectos: estudiantes de la carrera de medicina veterinaria y asociaciones de criadores equinos.

3. JUSTIFICACIÓN

La contribución de la biotecnología moderna ha llevado a cabo el desarrollo de mecanismos y técnicas que sirven de apoyo a la producción de varias especies animales como son los equinos, una de las alternativas más requeridas es la CONSERVACIÓN DEL SEMEN ya que permite el aprovechamiento de una manera más eficiente del material genético de los animales que aportan con características deseadas como son: su tamaño, vigorosidad, resistencia, entre otros.

La finalidad es la investigación es la crioconservación del semen equino, es un método y una herramienta que tiene muchas ventajas como son: la evaluación de la calidad seminal por eyaculado o pos congelamiento, contribuir con la disminución de enfermedades de transmisión sexual; también nos permite el almacenamiento seminal por periodos largos de tiempo por su congelación y aceptan realizar bancos de material genético de animales que van destacando en diferentes actividades ecuestres por su alto valor genético y sus cualidades para las características deseadas por el productor.

La importancia de dar un realce al progresos y avances a los productores de semovientes de la provincia de Cotopaxi y del país, que han obtenido con la crioconservación en el área de la biotecnología de la reproducción animal en relación con los equinos se han dado los casos en Colombia y en Perú, en donde, lo equinos son más importantes día tras día, esto se debe a su amplia participación de actividades ecuestres como son, actividades deportivas, de trabajo, de exposición y su comercialización a nivel del mundo del material genético equino crioconservado.

El manejo de las técnicas actuales de crioconservación de semen equino da variabilidad en los resultados ya que son varios los diluyentes que se dan uso, los diluyentes comerciales basan su composición en productos de origen animal como la leche, huevos, glicerol y amidas. Existe actualmente una deficiencia en investigaciones de técnicas sobre la crioconservación de semen equino ya que el material seminal no es aprovechado de una manera correcta y eficiente. Por lo tanto, este estudio busca un reporte de técnicas de crioconservación de semen equino que esté

al alcance de los pequeños y medianos productores con grandes resultados de eficiencia.

En Ecuador existen muchos criaderos equinos muy importantes y con reproductores de alta calidad genética y comercial, las mismas que no se han realizado estudios para la mejora de preservación del material seminal como es la crioconsercación del semen equino.

Por estos antecedentes es justificable realizar esta investigación en el Ecuador, Provincia de Cotopaxi, Cantón Latacunga con el fin de proporcionar sostenibilidad en la especie y seleccionar a los mejores sementales.

4. PROBLEMÁTICA

Uno de los principales problemas de los criaderos es el alto costo que no es accesible hacia los pequeños y medianos criadores de equinos, en la aplicación de esta técnica de la crioconservación de semen es uno de los principales procedimientos en el desarrollo dentro de las biotecnologías para la reproducción equina, pues la conservación permite una distribución máxima y adecuada a la disponibilidad del material germinal de especímenes de interés, dentro de las diferentes investigaciones ha facilitado el desarrollo de programas de selección genética para rasgos de valor comercial en la especie.

La crioconservación del semen equino se ha vuelto precaria en la provincia de Cotopaxi a lo largo del tiempo, donde la genética equina se ha visto perjudicada debido a los pequeños criadores de esta especie ya que han tomado a consideración mantener el método tradicional de la monta para su reproducción. La crioconservación del semen permite conservar y almacenar material genético por largos periodos de tiempo. La optimización de los diluyentes para la congelación de semen equino sin duda busca garantizar la máxima viabilidad y fertilidad posible del semen crioconservado, es fundamental debido a que la inseminación artificial con semen crioconservado cumple un papel fundamental en el uso de caballos que fenotípicamente mejora los programas de mejoramiento genético.

Los escasos ejemplares que existen en Ecuador están principalmente concentrados en los grandes y mayores criadores, donde la economía de los mismos no se ve afectado al mantener animales de raza, con una genética internacional.

En Ecuador el costo de compra venta de los ejemplares es alto, ya que la carga genética y su valor se potencializa con la aparición de ciertos rasgos que los criadores buscan en los reproductores. En Ecuador no existen modificaciones en relación a los métodos de contención

de semen equino y menos implementando programas de genética enfocados en dar realce al caballo criollo ecuatoriano potenciando los caracteres fenotípicos y genotípicos posicionándolo en una raza propia del país.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general:

- Evaluar dos diluyentes comerciales (BotuCrio® e INRA96) para la crioconservación de semen equino en caballos árabes y lucitanos del cantón Latacunga.

5.2. Objetivos específicos:

- Estimar los parámetros macroscópicos (volumen, ph, color, olor) del semen de los caballos árabes y lucitanos.
- Analizar los parámetros microscópicos del material seminal los caballos árabes y lucitanos.: motilidad total, motilidad progresiva, porcentaje vivos-muertos post descongelamiento.
- Categorizar las diferencias entre los diluyentes en estudio, para determinar la calidad del semen post descongelamiento en porcentaje de vivos y muertos.

6. ACTIVIDADES Y SISTEMAS DE TAREAS EN RELACIÓN A LOS OBJETIVOS

ACTIVIDADES Y SISTEMAS DE TAREAS EN RELACIÓN A LOS OBJETIVOS PLANTEADOS.	ACTIVIDAD.	RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD.	DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD.
Objetivo 1. Evaluar parámetros macroscópicos del semen de los caballos seleccionados en	Se obtuvieron las muestras colectadas de semen en el campo para su valoración macroscópicamente.	Los valores del volumen, color, consistencia, Ph, olor.	Determinación macroscópica de su estado mediante los sentidos como son: visión,

relación al volumen, color, consistencia, pH, entre otros.			tacto, olfato, cintas de pH.
<p>Objetivo 2.</p> <p>Medir parámetros microscópicos del material seminal: motilidad total, motilidad progresiva, porcentaje vivos-muertos post descongelamiento.</p>	<p>Se obtuvieron las muestras para su valoración microscópicamente en las colectas seminales.</p>	<p>Los valores de las colectas como: motilidad total, motilidad progresiva, porcentaje vivos-muertos post descongelamiento.</p>	<p>Caracterización microscópica y registros de cada muestra recolectada.</p>
<p>Objetivo 3.</p> <p>Estimar la efectividad de dos diluyentes, BotuCrio® e INRA96, mediante un estudio estadístico.</p>	<p>Se obtuvieron las mezclas de semen con cada uno de los diluyentes.</p>	<p>Los valores de estimación con cada una de las muestras.</p>	<p>Determinación microscópica de cada uno de los diluyentes pos descongelación.</p>

7. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICA

7.1.Caballo

Hoy en día los autores admiten que proviene del idioma español, de algunos animales heterogéneos, pero especialmente de la sangre de árabes y bárbaros de Andalucía, que los conquistadores españoles trajeron más, caballos inferiores para los soldados, por ser más baratos, en reserva. (1)

Muchos de estos caballos fueron abandonados o perdidos en el nuevo continente y por ello fueron criados salvajes, reproduciéndose libremente en las condiciones ambientales de aquellas regiones, sometidos a una selección natural en la que ganaron los duros supervivientes de la orden. El clima, la nutrición y las enfermedades transmitidas por animales, además de la persecución humana y animal. (2)

El mismo autor señala que este animal casi siempre es pequeño, las características del caballo pampeano indican la capacidad de adaptación al entorno. Descendiente de los caballos árabes y andaluces, volvió a su estado salvaje antes de ser usado y criado por los indios. Sirvió a todos los partidarios en la lucha por la libertad; como los ejércitos de los colonos europeos. El caballo es la herramienta más útil para el transporte y manejo de los campesinos. Actualmente, no se consideran sus valiosas propiedades. Aunque sea un capricho del criador sustituir el genuino por uno foráneo o exótico, no hay otro caballo que pueda soportar condiciones productivas equilibradas con jinete y montura durante varios días sin ningún suplemento ni higiene.(3)

7.2.Anatomía y fisiología del aparato reproductor del caballo.

Testículos

Estas son las gónadas masculinas, derivadas del esperma y de hormonas masculinas como la testosterona. Los testículos del caballo se encuentran en la región púbica, envueltos en un divertículo abdominal llamado escroto o escroto; el eje longitudinal de este testículo es mayor que el horizontal. Tienen forma de huevo y cada uno tiene dos lados, dos bordes y dos extremos. En el caballo, los testículos se ubican en la cavidad abdominal durante el feto, cerca del mesonéfrico y descienden al escroto durante el parto; su tamaño normal para un semental adulto es de unos 10-12 cm de largo, 6-7 cm de alto y 5 cm de ancho; pesa alrededor de 225-300 g.El tamaño de los testículos varía según la edad, la estación y la raza del animal, así como las variaciones individuales. El tamaño testicular es importante porque tiene una alta correlación

con el potencial de producción de esperma. Los testículos son más grandes y activos durante la época de cría y alcanzan su tamaño máximo en los meses de mayor fotoperíodo. La actividad testicular disminuye, lo que puede conducir a niveles más bajos de testosterona circulante y una producción total más baja.(4)

A pesar del declive estacional, los testículos del caballo no detienen por completo la producción de esperma en ningún momento del año. Por lo tanto, los sementales son fértiles durante todo el año. Los testículos están cubiertos por la túnica vaginal, un tejido seroso que es una extensión del peritoneo. Esta capa serosa se forma cuando los testículos descienden y se adhieren al escroto.(5)

La capa más externa del testículo es la túnica albugínea testicular, una delgada membrana blanquecina de tejido conectivo elástico. Debajo de los testículos de la túnica albugínea se encuentra el parénquima, capa funcional 4 de los testículos, es de color amarillento y está separado en segmentos por tabiques incompletos de tejido conjuntivo. Estos segmentos contienen los túbulos semiesféricos. Con la estimulación de FSH, las células de Sertoli (células alimentadoras) producen proteína de unión a andrógenos e inhibina. Los túbulos seminíferos son las áreas de producción de esperma que componen 80 μ l de los testículos.(6)

Estos túbulos seminíferos están conectados por una red de túbulos llamada rete testis, que están conectados a 12 a 15 pequeños túbulos, conductos eferentes que convergen en la cabeza del epidídimo. Las células de Leyding (intersticiales) se encuentran en el parénquima testicular entre los túbulos seminíferos. LH estimula las células de Leydig para producir pequeñas cantidades de testosterona u otros andrógenos. Se sabe que la testosterona es importante para el desarrollo de las características sexuales secundarias y el comportamiento sexual normal.(7)

Epidídimo

El epidídimo es el primer conducto externo de los testículos, que se une longitudinalmente a la superficie de los testículos. Está cubierto por la túnica vaginal y la albugínea, que consisten en la cabeza, que está firmemente unida a los testículos, el cuerpo del epidídimo y la cola; que termina en los deferentes. Su longitud en caballos es de 72-81 m. La función del apéndice es transportar los espermatozoides desde el testículo; qué diferentes factores afectan este movimiento. Un factor es la presión de los nuevos espermatozoides, este movimiento es apoyado por la presión externa creada por la acción de fricción sobre los testículos y el epidídimo durante el ejercicio normal. Durante la eyaculación, las contracciones de la capa de

músculo liso del epidídimo y la ligera presión negativa creada por la contracción de los vasos sanguíneos y la uretra transportan activamente los espermatozoides desde los vasos del epidídimo hasta la uretra.(8)

Con respecto al almacenamiento de esperma, la mayoría de los espermatozoides se almacenan en la cola del epidídimo, ya que el esperma concentrado permanece en su lugar. Allí, los medios son óptimos para proteger la viabilidad de los espermatozoides durante mucho tiempo. La maduración ocurre cuando los espermatozoides recién formados ingresan a la cabeza del epidídimo, desde los conductos eferentes, carecen de la capacidad de moverse y ser fértiles.(9)

Cuando atraviesan el epidídimo, adquieren la capacidad de moverse y volverse fértiles. Al atravesar el epidídimo, los espermatozoides pierden la gota citoplasmática formada durante la espermatogénesis en el cuello del espermatozoide, lo que indica la maduración de los espermatozoides en el epidídimo. Si una gran proporción de espermatozoides recién eyaculados tienen gotitas citoplasmáticas, se consideran inmaduros debido a la baja fertilidad. También es causado por funciones del epidídimo, destrucción masiva de espermatozoides viejos y anormales.(10)

Cordón espermático

El cordón espermático comienza en el anillo inguinal profundo, donde se unen sus partes, y discurre oblicua y ventralmente a través del canal inguinal, pasando por el costado del pene y terminando en el borde de inserción del testículo. El conducto deferente consta de: la arteria testicular, las venas testiculares, el plexo testicular, los vasos sanguíneos, los haces de tejido muscular liso y la capa visceral de la túnica vaginal. Tanto el escroto como el escroto soportan los testículos, y su función común es mantener la temperatura testicular acercando los testículos al cuerpo cuando la temperatura ambiente es muy baja, o permitiéndoles que cuelguen del cuerpo cuando suben.(11)

Uretra

Este es un tubo que se extiende desde la vejiga hasta la última parte del pene. La parte pélvica de la uretra se envuelve alrededor del músculo uretral, que se contrae fuertemente durante la eyaculación. La uretra termina en una extensión libre llamada proceso uretral; En el interior del pene, el cuerpo calloso esponjoso rodea la uretra, una zona hueca de tejido eréctil que sirve de

canal para la secreción de orina y esperma, que sería una prolongación de la cola del epidídimo.(12)

Escroto

Este es el saco que contiene los testículos y las partes adyacentes del cordón espermático. Tiene forma esférica, pero suele ser asimétrica porque el testículo, principalmente el izquierdo, es más grande y está situado ligeramente caudalmente. El escroto consta de varias capas; la capa externa de piel gruesa con muchas glándulas sudoríparas y sebáceas, la túnica dartos, que divide el escroto en dos bolsas, la fascia escrotal y la parietal. Es importante que la temperatura del testículo sea 0,5-4°C inferior a la temperatura del resto del cuerpo, y este mecanismo regulador lo aseguran dos músculos lisos: túnica dartos y cremáster y el músculo liso que rodea al testículo. cordón espermático, ambos sensibles al calor.(13)

Glándulas sexuales accesorias

Las glándulas sexuales accesorias viene siendo un conjunto de glándulas que se localizan entre la parte final del conducto deferente y la base del pene. (14)

- Próstata: Es una glándula lobulillar situada en el cuello de la vejiga y al comienzo de la uretra, desde el abdomen hasta el recto. Consta de dos bloques laterales y un istmo de conexión. Cada glándula es 3x1.5x0.5.(14)
- Vesículas seminales: Son dos sacos piriformes alargados ubicados a ambos lados de la parte caudal de la superficie dorsal de la vejiga, en los caballos tiene aproximadamente 15-20 cm de largo y aproximadamente 5 cm de diámetro máximo. En el caballo, las vesículas seminales probablemente producen la última parte de la eyaculación en forma de gel; la función de las vesículas seminales depende de la testosterona.(15)
- Glándulas bulbouretrales: estas glándulas son pares, con forma de lóbulo, con forma de huevo y están ubicadas cerca del arco isquiático. Mide unos 4 cm de largo y unos 2,5 cm de ancho en Orissa, y tiene de 6 a 8 conductos excretores que desembocan en la uretra por detrás de los conductos prostáticos. La función de sus glándulas accesorias es secretar plasma seminal, que ayuda a transportar los espermatozoides a través del conducto hasta la yegua.(15)

Pene

Tiene la forma del órgano genital masculino, cilíndrico, flácido, de unos 50 cm de largo y 3-6 cm de diámetro, mientras que un pene erecto puede medir hasta 100 cm o más. El pene del caballo carece de flexión sigmoidea; Se divide en tres partes: la raíz, que se une al hueso pélvico; el cuerpo, que es la parte media del pene; y la bellota, que es la parte final. La cabeza del caballo tiene mucha más capacidad de erección que la de los toros, cerdos u ovejas, es redonda y tiene una superficie frontal cóncava. Las partes estructurales del pene son el cuerpo cavernoso y el cuerpo esponjoso; las áreas de la cavidad se llenan de sangre durante la excitación sexual, lo que provoca tensión en el pene (erección) y facilita la liberación final de los espermatozoides durante la eyaculación.(16)

Prepucio

El prepucio, llamado habitualmente "la vaina", es una penetración en la piel que cubre completamente la parte libre del pene cuando no está en posición vertical, y consta de dos partes; externo e interno. Las glándulas sebáceas modificadas ubicadas en el prepucio secretan una secreción denominada "esmegma", cuya función es facilitar el paso del coito eréctil a los órganos reproductores femeninos.(17)

7.3.Pubertad y madurez sexual en el macho equino

La pubertad es la etapa del desarrollo cuando, además de un crecimiento y desarrollo vigoroso, el potro comienza a exhibir características y comportamientos masculinos como vocalización frente a las hembras, erección, masturbación y cópula, y un aumento en el tamaño de los músculos masticatorios. organos La pubertad ocurre antes de un desarrollo corporal suficiente, por lo que la reproducción debe esperar hasta que los individuos alcancen la madurez sexual.(18)

Al alcanzar la madurez sexual, el individuo adquiere la capacidad de liberar gametos viables y así alcanzar su máximo potencial reproductivo. La pubertad ocurre en los caballos a los 18 meses de edad, y el rango de edad de 18 a 24 meses varía según la fecha de nacimiento del potro. Este momento coincidió con el descenso de un testículo. El potro muestra los primeros signos de interés por la hembra cuando es un año y luego quiere montar a las yeguas en celo, aunque esto no siempre sucede, salvo razas pequeñas, el potro no alcanza la madurez sexual

hasta que es un año hasta dos años de edad; los potros grandes y bien contruidos ya se aparean a la edad de dos años.(19)

Se puede decir que la pubertad precede a la madurez porque el organismo continúa creciendo y madurando hasta que expresa su máximo potencial reproductivo. Generalmente, los mamíferos alcanzan la pubertad cuando alcanzan los 60 grados de peso corporal.(20)

7.4.Observación de la libido y de la capacidad de monta

La buena calidad del esperma no garantiza la fertilidad, a menos que el semental también esté dispuesto y sea capaz de inyectar esperma en el tracto reproductivo de la yegua o en la vagina artificial. El comportamiento sexual se puede estudiar exponiendo al semental a una yegua que está mayormente en celo, un semental con una buena libido mostrará el deseo fuerte e inmediato de la yegua al mostrar inquietud, patadas, vocalizaciones, preparación íntima (por ejemplo, lamer y morder, "mostrado. " la respuesta de flehmen cuando la yegua orina); y desarrollar una erección.(21)

El comienzo, la intensidad y la duración de este período están influenciados por la composición genética y el comportamiento aprendido (a través de las experiencias positivas y negativas del semental), así como por la estacionalidad y la limitación de enfermedades.La razón del debilitamiento o ausencia de la libido en la mayoría de los sementales. Son el abuso, principalmente su uso excesivo o abuso repetido de intentos de expresar interés sexual.(22)

7.5.Espermatogénesis

Es el proceso de gametogénesis masculina, que representa el conjunto de cambios que conducen a la transformación de las células primarias. Durante el desarrollo embrionario, células especiales llamadas células progenitoras migran desde la región amarilla del embrión hacia las gónadas indiferenciadas. Las células germinales se encuentran en el epitelio seminífero, cuya estructura es mantenida por las células de Sertoly. Las células germinales son las únicas que tienen la capacidad de dividirse por meiosis y reducir el número de cromosomas responsables de la carga genética.(23)

El ciclo espermatogonial 13 comienza con la célula madre o espermatozoide tipo A, forman una serie de puntos de partida para los espermatozoides. Elementos celulares del ciclo espermatogénico: Espermatogonias: Proceden de los gonocitos (gametos) y pertenecen a la capa de los túbulos seminíferos. Espermatocitos: Los espermatocitos son el resultado de la

mitosis de las espermatogonias y son gametos que se someten a una división meiótica. El final de la profase meiótica coincide con la 4ª etapa del epitelio seminífero, durante la cual se producen rápidamente la metafase, la anafase y la telofase. En este momento aparecen los espermatocitos secundarios. Esperma: cuando los testículos alcanzan su pleno desarrollo (antes de la pubertad), la meiosis se completa y los espermatozoides resultantes se convierten en espermatozoides. Una de las características de este fenómeno es la elongación de los espermatozoides y su migración hacia la luz de los túbulos seminíferos.(23)

7.6. Espermatozoide equino

La célula espermática equina se divide en cabeza, parte media, pieza principal y final. El espermatozoide está revestido por la membrana plasmática, compuesta por diferentes tipos de proteínas, fosfolípidos, colesterol, glucolípidos y carbohidratos. También posee enzimas en el acrosoma, que actúan como la barrera principal entre el espermatozoide y el ambiente externo, debido a su característica de permeabilidad selectiva.(24)

En el espermatozoide y en el plasma seminal están presentes antioxidantes, que son inhibidores de las especies reactiva de oxígeno (ERO). La principal defensa antioxidante se da por acción de la catalasa (CAT), la superóxido dismutasa (SOD), el glutatión reducido (GR) y el glutatión peroxidasa (GPx), presentes en el espermatozoide y en el plasma seminal. Estos antioxidantes contribuyen en el aumento inicial de la motilidad y de la integridad de la membrana espermática.(24)

7.7. Extracción y manejo del eyaculado para la crioconservación

En esta etapa, el lugar donde se colecta el eyaculado debe ser un área espaciosa, sin obstáculos, limpia y libre de cualquier distracción para el caballo ya que algunos sementales tienen comportamientos violentos y/o imprevisibles durante la copula. La disponibilidad de espacio es muy importante para garantizar la seguridad del personal, de la yegua y del propio animal. La colecta y procesamiento del semen requiere de un buen conocimiento del comportamiento reproductivo del caballo, del comportamiento de cada animal y de la fisiología de la erección y eyaculación.(25)

En caballos, el método más conveniente para la recolección de semen es la vagina artificial (VA). La VA es un instrumento que intenta reproducir las condiciones naturales de la vagina de la yegua (temperatura, presión y lubricación) para estimular en el macho la eyaculación

cuando se introduce el pene en ésta. Consiste en un cilindro rígido o flexible con una cubierta exterior dura o firme (normalmente látex), y una cubierta suave interior, que crea una cámara dentro de la cual se introduce agua para lograr las condiciones ideales de temperatura y presión.(25)

7.8.Características generales del eyaculado equino previo a la crioconservación

En los equinos el volumen seminal sin gel varía entre 20-60 mL; esto depende del reproductor y el número de colectas que se realicen por semana. El porcentaje de motilidad se encuentra entre 60-80% y la concentración espermática oscila entre los 170 -300 millones de espermatozoides. La evaluación in vitro del semen permite valorar las características relacionadas con la capacidad fecundante del espermatozoide como: motilidad, funcionalidad e integridad de la membrana plasmática. El porcentaje de motilidad espermática se estima visualmente en un microscopio. Es la técnica más utilizada y considerada de gran valor ya que permite diferenciar el semen de baja y alta calidad.(26)

7.9.Medios diluyentes

Los medios de diluyentes son principalmente componentes que mitigan los efectos negativos que producen al semen congelado y dentro de ello favorece la viabilidad fisiológica de las células espermáticas y también están incluidos en los mecanismos básicos de la crioconsecvaciòn.(27)

Tienen diferentes funciones, dentro de ellos es: mantener la viabilidad a tiempo prolongado en la vida del espermatozoide, mantener actividad metabólica y nutrición del espermatozoide, ayudar en la regulación del pH, aumenta la motilidad, incrementa el volumen de las dosis de inseminación, entre otros.(27)

Diluyente Botucurio®

El Botucurio® es un medio diluyente para congelación de semen equino que combina glicerol-metilformamida como crioprotector y 20 aminoácidos diferentes en el diluyente base. La evaluación in vitro de semen congelado en Botucurio®, sugiere que los parámetros de la motilidad se incrementan en comparación con semen descongelado procesado en los diluyentes que contienen glicerol como único crioprotector.(28)

Diluyente INRA 96

El diluyente INRA 96 es un medio de conservación que es formado a base de proteínas micelares purificadas de la leche, cuyo poder protector que tiene sobre los espermatozoides le da un aval al diluyente.(29)

Los medios de conservación a base de leche que existen en el mercado contienen las proteínas solubles y micelares necesarias para la conservación. La originalidad del medio INRA 96 es que contiene únicamente la fracción pura de las proteínas micelares de la leche altamente protectoras de los espermatozoides.(29)

7.10.Crioconservación

En la actualidad existen dos métodos de conservación del material seminal: refrigerado (5 °C) y crioconservado (-196 °C). La viabilidad del semen refrigerado es capaz de mantenerse hasta por 48 horas de almacenamiento; sin embargo, es importante tomar a consideración que, para poder obtener ventajas en la inseminación artificial, es necesario un periodo prolongado de almacenamiento. Esto se logra mediante la crioconservación del espermatozoide ya que así se detiene el proceso metabólico de los espermatozoides y permite un almacenamiento indefinido sin que pueda existir una pérdida de la fertilidad.(30)

Dentro de la crioconservación se debe tomar a consideración que consiste en el enfriamiento de células o tejidos a bajas temperaturas (-80 y -196°C) para lograr detener totalmente el metabolismo celular y así asegurar una conservación por un largo tiempo, en la crioconservación de material seminal, la conservación se da por disminución del crecimiento bacteriano, la reducción del metabolismo espermático, el control de la acidificación, y la reducción de la formación de especies reactivas de oxígeno.(30)

7.11.Crioconservación de semen equino

La reproducción es un proceso fundamental que se muestra en el mejoramiento genético de los equinos ya que esto ha permitido el uso de los mejores caballos reproductores; por lo que la crioconservación del semen de caballo es una técnica que complementa a los procesos de biotecnología reproductiva. Sin embargo, existe una gran variabilidad en la habilidad de los espermatozoides entre los sementales para soportar el proceso de congelación, e incluso existe variación de los eyaculados y fertilidad dentro de un mismo caballo.(31)

Es importante saber que la crioconservación aumenta la disponibilidad de material genético de calidad facilitando así los trabajos de reproducción asistida. Además, se dispone de material seminal de sementales con características deseadas, la posibilidad y apertura del almacenamiento de semen fuera de la época de apareamiento, acorta las barreras geográficas y hace posible el envío de semen a cualquier parte del mundo, ya que el transporte de un contenedor con muestras seminales es menos costoso que transportar una yegua, se dispone de semen continuamente en el sitio donde se encuentra la yegua. Por otro lado, permite programar una inseminación artificial cuando exista una yegua en ovulación y el semen que ha sido congelado y almacenado adecuadamente puede estar disponible por décadas. El desarrollo de protocolos confiables de crioconservación permite sin duda un intercambio de semen entre diferentes subpoblaciones que son geográficamente distantes lo que ayuda a diversificar la variabilidad genética.(31)

7.12.Enfriamiento previo a la crioconservación del eyaculado equino

Luego de realizar la colecta de la muestra seminal, esta es examinada en cuanto a color, volumen, número total de células espermáticas, motilidad y morfología, ya que el número total de espermatozoides y la morfología son indicadores importantes de la salud testicular. Para empezar con el proceso de enfriamiento existen varios contenedores comerciales que están específicamente diseñados para disminuir la temperatura y transportar el semen equino. Algunos de estos contenedores son el Equitainer I™ y el Equitainer II™, los cuales proporcionan tasas variables de enfriamiento. Es decir, las velocidades de enfriamiento se vuelven cada vez más lentas a medida que la temperatura interna se reduce, dependiendo de la temperatura ambiental y el volumen de semen diluido. El enfriamiento previo a la criopreservación del eyaculado equino permite evitar la muerte celular por choque térmico.(32)

7.13.Evaluación post congelación

La evaluación de la motilidad espermática post descongelación es la prueba más común cuando se va a utilizar semen congelado para inseminar una yegua. La morfología espermática también debe evaluarse, en especial cuando se usa, de manera repetida a un semental. Algunos defectos espermáticos pueden afectar la penetración y la adhesión al ovocito, pero su motilidad no se ve afectada; el semen congelado de algunos sementales puede tener muy buena motilidad, pero una morfología pobre, lo que puede resultar en bajas tasas de preñez en las yeguas. Por otro lado, es importante evaluar la concentración espermática, ya que esta puede cambiar entre

varios eyaculados de un mismo caballo. A pesar de la falta de un método estandarizado, una dosis para inseminación debe cumplir con criterios mínimos como son: por lo menos 30-35% de motilidad y un mínimo de 50% de células espermáticas morfológicamente normales. (33)

8. ÁREA DE ESTUDIO

8.1.Métodos

Medidas de seguridad del personal

Es importante destacar que la colecta de material espermático en caballos, es un proceso con un alto grado de dificultad y que representa un peligro elevado para el personal que realiza la colecta, ya que los caballos son animales con gran potencia muscular y pueden causar lesiones graves al personal encargado de su manejo. Además, pueden lastimar a la yegua, e incluso se pueden causar lesiones ellos mismos. Debido a estas razones, previo a la colecta el personal usó: casco, botas con punta de acero y overol para garantizar su integridad y seguridad. Además, los caballos fueron manipulados por personal que conoce el comportamiento de cada animal, para tranquilizarlos y poder realizar las colectas.

Preparación del espacio físico

El área en la que se lleva a cabo la colecta del semen deben ser en potreros amplios, para permitir que el caballo y la yegua puedan maniobrar y saltar; sin obstáculos y libres de cualquier distracción para el caballo.

Preparación, estímulo del semental

El semental es llevado cerca de la yegua tranquilizada con el objetivo de que sea estimulado con mayor rapidez. Una vez estimulado, y cuando el pene está totalmente protruido se aleja de la yegua y se procede a lavar el pene con agua tibia. Esto permite eliminar el esmegma u otros detritus presentes en la superficie del pene.

Preparación de la yegua

Para los procesos de colecta se seleccionó una yegua disponible en los distintos sitios de colecta. Previo a la colecta, la yegua fue tranquilizada con una dosis de 1mL de Tranquilán® (maleato de acepromazina) inyectable de uso veterinario. Una vez tranquilizada, se colocó una traba a nivel de la cuartilla de uno de los miembros posteriores, utilizando para esto una cuerda ancha

para evitar lastimar las patas del animal; se cubre los ojos en caso de ser necesario, moquillo, pechera y pialera. Después, se vendó la cola de la yegua con un guante de inseminación o film transparente y cinta adhesiva. Se esperó 15 minutos a que el tranquilizante haga efecto.

Armado de la vagina artificial

Para realizar las colectas de material seminal, se utiliza una vagina artificial tipo Hannover. Ya que la misma vagina artificial sea utilizada para todos los sementales, durante su armado se procede a colocar y retirar (antes y después de cada colecta) una funda vaginal. La funda vaginal se sujeta a un extremo de la vagina con cinta adhesiva, y además se coloca dos cintas de caucho por fuera de la funda vaginal y sobre la cinta adhesiva para dar mayor seguridad y evitar que esta se afloje durante la colecta.

En el extremo distal de la vagina artificial, se coloca un frasco de colecta (biberón), el cual es cubierto con papel aluminio y cinta adhesiva para proteger el semen de la luz. Se coloca una gasa estéril en la punta del biberón, sujetado con cinta adhesiva, para poder separar la porción gelatinosa de la porción espermática del eyaculado, y además poder eliminar objetos extraños como pelo, tierra, suciedad y esmegma. Luego, se procedió a llenar la vagina artificial con agua a una temperatura inicial entre los 48 °C y 50° C. Finalmente, la porción proximal de la vagina artificial se lubricó con gel no espermicida y se cubrió este extremo con papel aluminio, hasta el momento de la colecta, para evitar que ingresen elementos extraños.

Colecta del material seminal

Seguidamente se lava el pene, se vuelve a acercar el semental a la yegua para que este se estimule y realice un pre eyaculado, se le permite reconocer a la yegua y cuando el pene estuvo totalmente erecto y protruido, se deja que monte a la yegua. El pene fue desviado hacia el interior de la vagina artificial para que el caballo pueda eyacular con facilidad. Se sostiene la vagina artificial en una posición ligeramente elevada para simular el ángulo del tracto reproductivo de la yegua. Inmediatamente después de la eyaculación, se deja vacío aproximadamente dos tercios de agua de la vagina artificial, para disminuir la presión y facilitar el drenaje del semen.

Cuando, el pene del caballo empieza a perder tono y empieza a retroceder, se baja lentamente la vagina artificial hasta que sea colocada en una posición casi vertical al final del proceso. El semen colectado cae en tubos graduados (biberones estériles). Finalmente, se aleja al caballo

de la yegua. Para la recolección de la segunda muestra de material seminal, se espera aproximadamente 30 minutos a partir de la primera colecta. Una vez transcurrido este tiempo se vuelve a estimular al semental y se procede de igual manera que para la primera colecta.

8.2.Evaluación macroscópica del material seminal

Volumen

La concentración espermática en el semen equino tiene valores de 30-600x10⁶ espermatozoides por mililitro de semen. La frecuencia de una eyaculación afecta al volumen total y a la vez del número de espermatozoides por eyaculado hasta que alcance la producción espermática diaria, es decir que mientras más frecuente sea la colecta el semen menor será el volumen. Dentro de una producción espermática diaria es el total de espermatozoides que un padrillo puede eyacular por día, tras provocar la depleción de las reservas espermáticas extra gonales.

pH

El pH del semen del potro varía en un rango entre 7 y 7.5, o sea es levemente alcalino. Normalmente el pH debería ser ligeramente mayor en el segundo eyaculado.

Color

El color del semen de potro normal, varía entre blanco acuoso a blanco cremoso dependiendo de la concentración espermática. La presencia de semen rosado es indicador de heridas o fragilidad capilar. El color amarillo indicaría presencia de orina y un color amarillo verdoso es entendido como indicador de pus.

Olor

El olor es característico para el semen de cada especie y, por tanto, muy difícil de describir; solamente la práctica permite distinguir un olor anormal. El examen por medio de olfacción podría servir para distinguir algunas infecciones.

8.3.DISEÑO EXPERIMENTAL

En el diseño experimental de esta investigación se realizó la comparación de dos diluyentes (BotuCrio® e INRA96) en el proceso pos descongelación, la valoración cuantitativa y cualitativa de los espermatozoides después de las colectas y procesados con relación a los obtenidos previos a la crio preservación y después de la congelación, usando conteos y valoraciones espermáticas.

9. METODOLOGÍA

9.1. Materiales

Materiales de Campo

- Sogas o cuerdas
- Personal de apoyo.

Materiales de Extracción

- Vagina Artificial para equinos “Botupharma”.
- Diluyentes de transporte CrioRam e Inra 96.

Materiales de Laboratorio

- Diluyentes de crioconservacion Botucurio e Inra 96.
- Vasos de precipitación de 100 ml, 200ml.
- Filtro seminal.
- Centrifugadora.
- Cámara de Neubauer
- Placa termina.
- Baño María.
- Microscopio.
- Tubos falcon de 10ml – 15ml.
- Pipetas Pasteur de 3-5 ml.
- Porta y cubre objetos.

9.2. Sementales

Con la ayuda de los convenios obtenidos con los propietarios se pudo conseguir distintos sementales los cuales nos ayudaron con este estudio.

Caballos Árabes: Moro, J.H.V, Azin, Luchin, Trueno.

Caballos Lucitanos: Negro, Castaño, Negro 2, Camayo, Apolo.

9.3.Campo

Universidad Técnica de Cotopaxi, Facultad CAREN (Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales).

9.4.Preparación de sementales.

Al semental se le procede a realizar una limpieza cuidadosa de su aparato reproductor. Con la ayuda de agua clorada, sin ningún jabón ni producto de limpieza. Así podemos obtener un eyaculado sin ninguna alteración.

9.5.Armado de la vagina artificial para la colecta

Procedemos a equipar nuestra vagina artificial colocando la primera camisa de látex. Esta es la que mantendrá la temperatura similar a la vagina de una yegua de aproximadamente 38° y con una presión D Euán.

Continuamos con administrar agua caliente a 50°C. Esta temperatura de agua depende mucho del lugar en el que se estén realizando las colectas ya sean Costa, Sierra, Oriente. El agua caliente nos ayudara a regular la temperatura de la vagina.

Una vez que nuestra vagina este con la temperatura de 50°C a 56°C y la presión similar a la de una vagina real, procedemos a colocar una segunda camisa plástica estéril en la cual llevará el termo colector y dentro del colocaremos el sliner en el cual el caballo depositará el semen.

9.6.Preparación de la yegua.

Con la ayuda de una cuerda larga procedemos a realizar dos piales en las cuartillas de los pies de la yegua, esto evitara que la yegua anquee y produzca alguna lesión o lastime al caballo.

9.7.Colecta de los sementales

Con la ayuda del personal de apoyo sujetamos a la yegua.

Procedemos a que el semental se excite, conduciéndole hacia la yegua y que este aperciba el olor de ella, así nuestro semental se excitará y este tendrá que realizar un pre-eyaculado antes de realizar la monta.

Una vez que realice el pre-eyaculado, este estará listo para ser colectado.

En la colecta el semental cubre a la yegua, y nosotros le ayudamos a introducir su miembro en la vagina artificial para que este eyacule y este semen poderlo analizar y crio conservar.

9.8. Aplicación de la fórmula para calcular en número de pajillas y en volumen de diluyente que vamos a ocupar

Fórmula:

Volumen*Concentración*Porcentaje de Motilidad Total / Concentración Deseada de espermatozoides en pajuelas.

Concentración Deseada:

100.000.000 de espermatozoides.

150.000.000 de espermatozoides.

200.000.000 de espermatozoides.

9.9. Evaluación macroscópica del semen

Constatamos mediante un vaso de precipitación graduado cuanto de volumen se extrajo por eyaculado del semental, valoramos el color, olor mediante nuestros órganos de los sentidos y con la ayuda de las cintas de pH calculamos el mismo de cada uno de los sementales.

9.10. Evaluación microscópica en laboratorio

Preparamos placas con porta y cubre objetos del semen fresco - semen post descongelación y observamos por medio del microscopio la concentración de espermatozoides motilidad total, motilidad progresiva, porcentaje vivos-muertos.

Evaluación de motilidad total

Para la evaluación microscópica se obtuvo una muestra pequeña (aproximadamente 50µL) con una micropipeta. La motilidad total se evaluó a través de microscopio de luz. Se evaluó cinco campos diferentes a 40X; se anotaron las observaciones en una escala de 0- 100%.

Concentración espermática

Para determinar la concentración espermática, se utilizó la Cámara de Neubauer. Se contó las células espermáticas de 5 cuadros grandes y para establecer la concentración se utilizó la fórmula del fabricante. Los resultados se anotaron en 1×10^6 espermatozoides/ mL.

Determinación de vivos/muertos- Tinción Botuvital

En un portaobjetos, previamente calentado a 38°C , se colocó una gota de 20-50 μL de semen con una gota del mismo volumen de Botuvital que es una tintura de eosina-nigrosina, la cual se incubó por 30 segundos. Una vez transcurrido ese tiempo, se extendió la muestra a lo largo de todo el portaobjetos con ayuda de un cubreobjetos delante de la gota. Luego se añadió una gota de aceite de inmersión para el análisis. Se evaluó 100 espermatozoides a una magnificación de 100X con aceite de inmersión. Los espermatozoides blancos, sin teñir, se clasifican como “vivos”, y los que poseen alguna coloración rosa o roja se clasifican como “muertos”.

Evaluación de la morfología espermática

Se evaluó la morfología o estructura del espermatozoide con un microscopio de luz a una magnificación de 100x. Se evaluó 100 espermatozoides para evidenciar defectos morfológicos como fueron espermatozoides sin cabeza, divididos, colas enrolladas, empleando el mismo método que para la evaluación de vivos/muertos. Se anotó el porcentaje de anormalidades en la cabeza, parte, media y cola de los espermatozoides.

9.11. Congelación de muestras seminales

1. Filtrado del semen: Separación del gel seminal del semen.
2. Dilución uno a uno del semen puro más diluyente de transporte (CrioRam e Inra 96).
3. Botucio: Colocamos en la centrifugadora los tubos falcón con semen a 1000 rpm por 10 minutos.
4. Inra 96: Colocamos en la centrifugadora los tubos falcón con semen a 10000 rpm por 10 minutos.
5. Culminado el tiempo de centrifugación procedemos a separar el plasma o sobre nadante del pellet y colocamos el pellet en un tubo falcón estéril hasta culminar con los demás.
6. Con los mililitros de pellet obtenidos procedemos a realizar la combinación con el diluyente criocervante (temperatura a baño maría) el número de pajuelas y la cantidad de espermatozoides varía de acuerdo a los resultados obtenidos en la fórmula.

7. Procedemos a empajillar (pajillas 0.5).
8. Se continua con los descensos de temperatura para mantener la vitalidad de los espermatozoides (es importante tomar a consideración los tiempos y los grados a los que van hacer sometidos).
 - Primer descenso de temperatura a 4 °C x 15mts.
 - Segundo descenso de temperatura a -15 °C x 15mts.
 - Tercer descenso a vapores de nitrógeno a -120 x 15mts.
 - Cuarto descenso de temperatura: sumergimos las pajuelas al nitrógeno liquido a -196 °C.

9.12.Evaluación de pajuelas pos descongelación.

9.13.Almacenamiento de las muestras seminales

Las pajuelas elaboradas fueron evaluadas y almacenadas en el termo criogénico.

9.14.Descongelación de muestras seminales

1. Procedemos a extraer una pajuela del termo criogénico.
2. Colocamos la pajuela en un termo para descongelación con agua a 37 °C por 30s.
3. Secar la pajuela y evaluar microscópicamente.

10. EVALUACIÓN MICROSCÓPICA DE SEMEN POSDESCONGEACION

Procedemos a preparar placas en los porta objetos con una gota de material seminal y colocamos un cubre objetos para así poder observar en el microscopio y analizar el porcentaje de motilidad, vivos y muertos.

El porcentaje de membranas lesionadas lo realizamos mediante una tinción (Botuvital), el cual nos permite diferenciar los espermatozoides que sufrieron un choque térmico y la membrana fue afectada.

Este procedimiento lo volvemos a repetir con las pajuelas de los dos diluyentes Inra 96 y botucio.

11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Tabla 1: Evaluar parámetros macroscópicos del semen de los caballos seleccionados en relación al volumen, color, consistencia, pH, entre otros.

	Promedio general	Promedio árabe	Promedio lusitano
Volumen (ml)	17.25	22	12,5
pH	6.97	6.8	7.15
Concentración	192'600.000	169'200.000	216'000.000
Patologías (%)	40	36	24

El promedio del volumen seminal de las unidades experimentales muestreadas fue de 17.25 ml. Al observar el volumen seminal promedio respecto a las razas de los equinos, se observa que la raza árabe produce cerca del doble de ml de semen respecto a los lusitanos. Por otro lado, a pesar que la raza árabe genera mayor volumen seminal, inversamente muestra un mayor porcentaje de patologías que la raza lusitana; en promedio, los equinos muestreados presentan un 40% de patologías en las células seminales.

En cuestión del pH, el promedio general del potencial de hidrógeno presente en el volumen seminal es de 6.9 cercano a 7. Respecto a las razas estudiadas, ambas muestran un pH seminal muy cercano al neutro.

Según el estudio FERTILIDAD EN LOS MACHOS, 2022; disponen dentro de la investigación que el promedio del volumen seminal es del 60 ml dentro de ello se puede destacar que los caballos árabes y lusitanos en estudio dieron un promedio de 17.25ml donde se puede determinar que la cantidad es menor a lo previsto, esto puede verse afectado por distintas características como la temperatura corporal, estrés, patologías asociadas a la reproducción y factores de riesgo dentro del lugar de extracción.(34)

Tabla 2: Evaluación estadística de medias entre los caballos árabes y lucitanos.

	Árabe	Media / se	Lusitano	Media / se
M total	IC95 = 70.3-77.7	74 / 1.87	IC95 = 85.6-90.4	88 / 1.22
M progresiva	IC95 = 59.0-62.9	61 / 1	IC95 = 68.1-75.9	72 / 2

Respecto a las motilidad total y progresiva observada microscópicamente de las células espermáticas, tras los análisis estadísticos de Mann Whitney, para determinar si existe diferencia significativa entre estas variables respecto a las razas de los equinos, se obtuvieron

valores de p de 0.00749 para motilidad total y de 0.01042 para motilidad progresiva; estos resultados muestran evidencia estadística que existe diferencia significativa de los parámetros de estos dos parámetros, siendo los equinos de raza lusitano quienes presentan mejores promedios de 88% y 72% respectivamente para motilidad total y progresiva, cuyos intervalos de confianza estimados al 95% muestran un rango pequeño respecto al promedio de cada parámetro.

Según el autor Giovanni Restrepo, 2013; redacta que dentro de la motilidad total y progresiva estadísticamente representa el 62% donde determina la concentración de un eyaculado, es uno de los pasos más importantes en la evaluación seminal, dado que además de proveer información sobre la capacidad fecundante, también es necesario para definir las tasas de dilución, o la cantidad de dosis para la inseminación artificial, en el estudio realizado nos da una representación del 95% como un rango promedio, esto nos muestra una eficacia dentro de los caballos árabes y lucitanos.(35)

Tabla 3: Medir parámetros microscópicos del material seminal; motilidad total y progresiva porcentaje de células vivas y muertas.

	Inra-96	botucurio	árabe	Lusitano
M total	p-v = 0.000254	p-v = 0.01284	p-v = 0.0005094	p-v = 0.0007803
M progresiva	p-v = 0.000254	p-v = 0.00848	p-v = 0.000254	p-v = 0.002537
% de vivos	p-v = 0.01541	p-v = 0.03874	p-v = 0.0006126	p-v = 0.0009817
% de muertos	p-v = 0.01541	p-v = 0.03874	p-v = 0.0006126	p-v = 0.0009817

Para la evaluación estadística post-descongelación, se aplicó también la prueba de Mann Whitney, tras verificar el incumplimiento de todos los requisitos para la aplicación del test paramétrico T-student, siendo la inexistencia de normalidad de datos la principal causa de esta decisión, misma que se observa tras realizar el test de Shapiro-Wilk y obtener valores menores a 0.05 en los valores p (indicativo de anormalidad de la distribución de datos).

Tabla 4: Evaluación de diluyentes ante la raza de caballo.

	Diluyente	Raza del caballo
Motilidad total	p-v = 0.0001286	p-v = 0.05806
Motilidad progresiva	p-v = 0.0001209	p-v = 0.05707
Porcentaje de vivos	p-v = 0.0001366	p-v = 0.08296
Porcentaje de muertos	p-v = 0.0001366	p-v = 0.08296

Tras la aplicación de la prueba no paramétrica de Mann Whitney, se observa, por estadística inferencial, que todas los datos de las variables de interés (Motilidad total y progresiva, porcentaje de vivos y muertos) tienen diferencia significativa respecto al diluyente, por otro lado, los valores p obtenidos tras analizar las variables de interés respecto a la raza de los equinos, se determinó que la motilidad total y progresiva y el porcentaje de vivos y muertos son iguales estadísticamente entre la raza árabe y lusitano.

Tabla 5: Evaluación estadística entre medias del diluyente Botucurio e Inra_96.

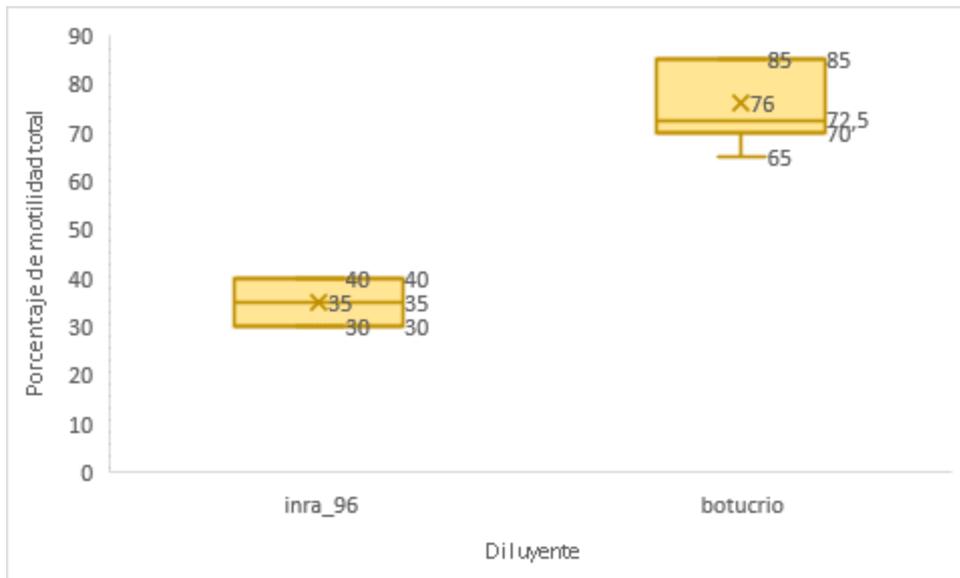
	Inra_96	Media / se	Botucurio	Media / se
M total	IC95% = 31.73-38.26	35 / 1.66	IC95% = 69.94-81.53	75.5 / 2.83
M progresivo	IC95% = 31.73-38.26	35 / 1.66	IC95% = 61.66-70.33	66 / 2.21
% vivos	IC95% = 5.28-6.11	5.7 / 0.21	IC95% = 62.35-70.64	66.5 / 2.11
% muertos	IC95% = 93.88-94.71	94.3 / 0.21	IC95% = 29.35-37.64	33.5 / 2.11

Tras haber constatado la diferencia significativa de las variables de estudio respecto al diluyente utilizado, se observa que los parámetros analizados en las células espermáticas son superiores en el material seminal diluido con BotuCriro, dando valores de motilidad tanto progresiva como total superiores al 60%, siendo la motilidad total la que tiene el porcentaje más alto con más del 75%. Así mismo el material seminal expuesto a Botucurio tuvo un porcentaje promedio de células espermáticas superior al 66% respecto al que fue diluido con INRA96 que apenas se evidenció un promedio de 5.28%. Los porcentajes de las células espermáticas muertas son correspondientes al restante porcentaje obtenido de células vivas.

Los intervalos de confianza calculados al 95% son la muestra gráfica de la ausencia de solapamiento entre las variables dependientes de estudio respecto a las independientes, por lo que demuestran la diferencia significativa descrita por los valores p.

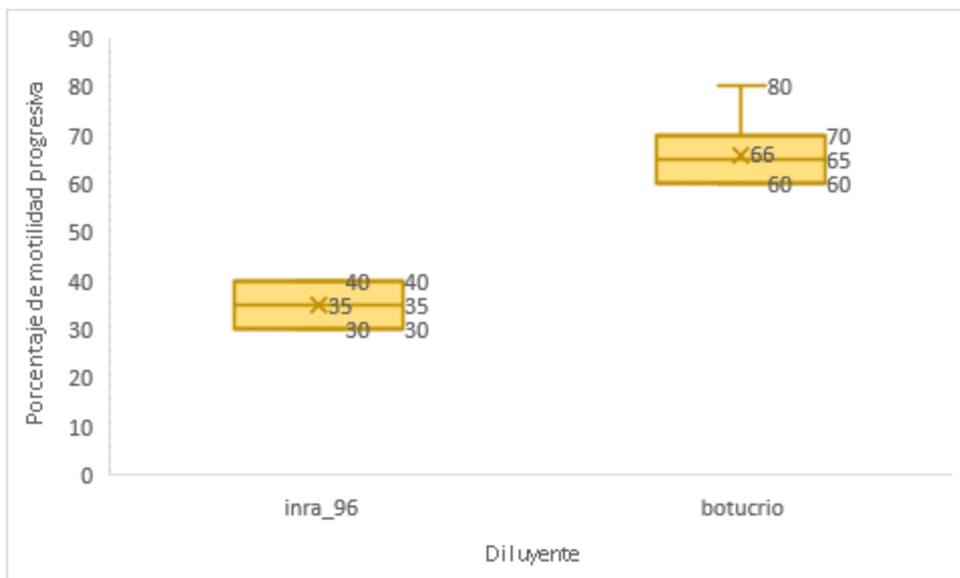
Podemos observar con los intervalos de confianza que el diluyente “Botucurio” presenta mejores parámetros en las variables analizadas, con relación al diluyente Inra-96. Podemos observar que los promedios de motilidad tanto total como progresiva y de células espermáticas vivas es significativamente mayores con el diluyente Botucurio, en relación al tejido seminal analizado con el diluyente Inra-96.

Gráfico 1: Porcentaje de motilidad total & Diluyentes.



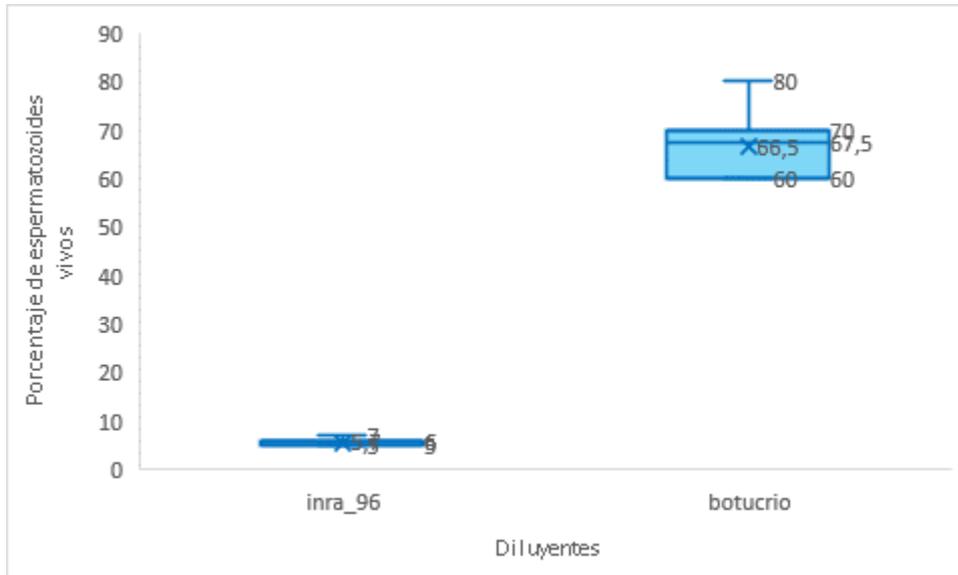
En la grafica observamos una diferencia significativa, en el analisis de Porcentaje de motilidad total, en cuanto a los dos diluyentes. Y se observa que el diluyente botucurio nos brinda una mejor motilidad total posdescongelamiento.

Gráfico 2: Porcentaje de motilidad progresiva & Diluyentes.



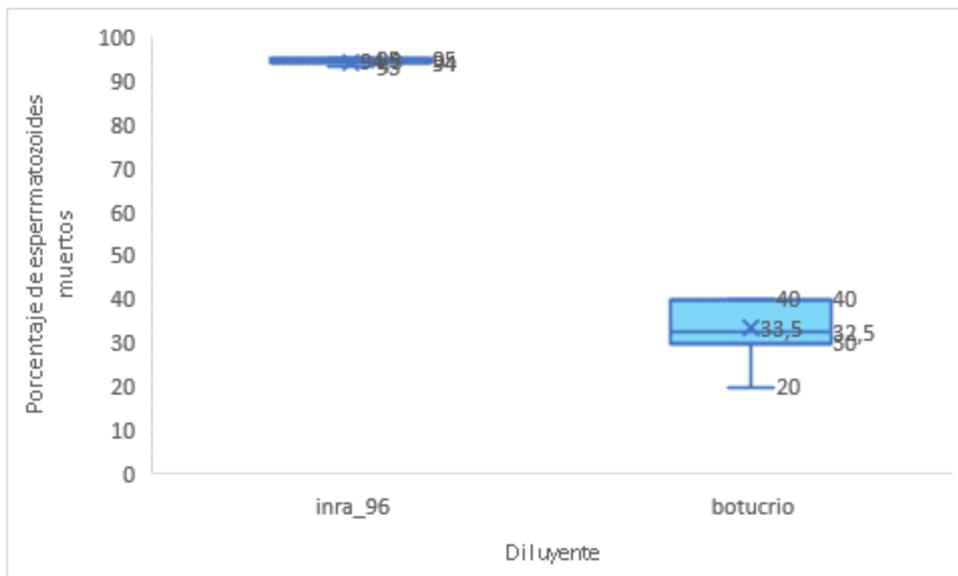
En la grafica observamos una diferencia significativa, en el analisis de Porcentaje de motilidad progresiva, en cuanto a los dos diluyentes. Y se observa que el diluyente botucurio nos brinda una mejor motilidad progresiva posdescongelamiento.

Gráfico 3: Porcentaje de espermatozoides & Diluyentes.



En la grafica nos muestra una diferencia significativa, en el analisis de Porcentaje de espermatozoides vivos, en cuanto a los dos diluyentes. Y se observa que el diluyente botucio brinda un mejor medio para la supervivencia de los espermatozoides mostrando asi un mayor porcentaje de espermatozoides vivos posdescongelamiento.

Gráfico 4: Porcentaje de espermatozoides muertos & diluyentes.



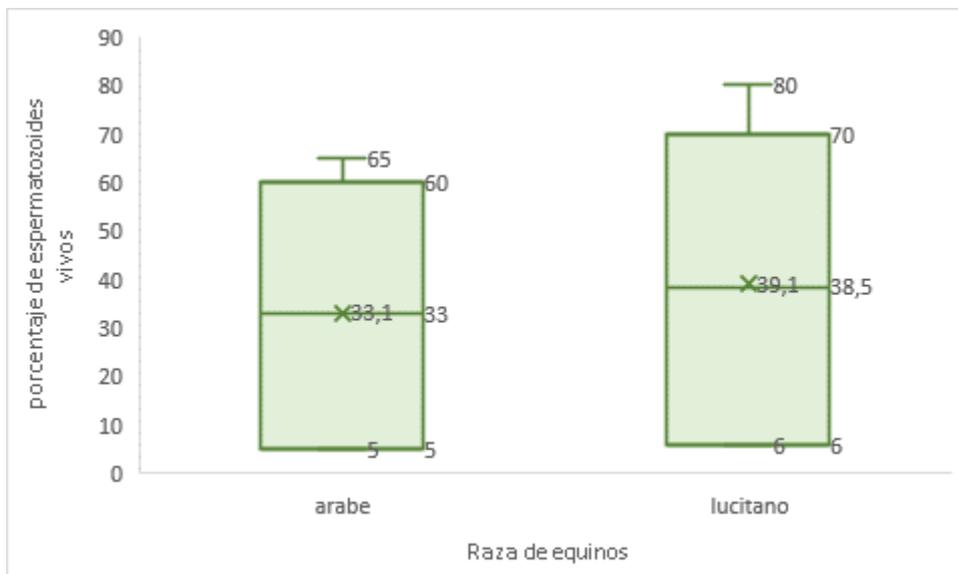
En la grafica nos muestra una diferencia significativa, en el analisis de Porcentaje de espermatozoides muertos, en cuanto a los dos diluyentes. Y se observa que el diluyente Inra96 no brinda un medio apropiado para la supervivencia de los espermatozoides mostrando asi un mayor porcentaje de espermatozoides muertos posdescongelamiento.

Tabla 6: Evaluación de células espermáticas post descongelamiento en base a las razas en estudio.

	árabe	Media / se	lusitano	Media / se
M total	IC95% = 36.7-62.4	49.5 / 6.51	IC95% = 47.3-75.7	61.5 / 7.22
M progresivo	IC95% = 35.2-54.8	45 / 5	IC95% = 45.4-66.6	56 / 5.41
% vivos	IC95% = 14.84-51.35	33.1 / 9.31	IC95% = 17.52-60.67	39.1 / 11.00
% muertos	IC95% = 48.64-85.15	66.9 / 9.31	IC95% = 39.32-82.47	60.9 / 11.00

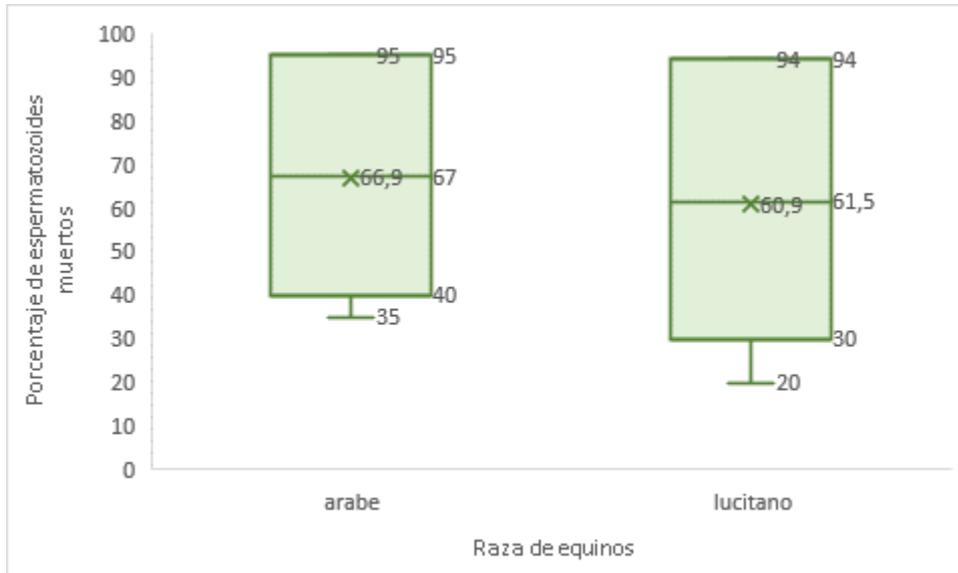
Podemos observar en la tabla anterior, que los intervalos de confianza calculados al 95% respecto a la variable de estudio “Raza de equino” cada uno de los intervalos se solapan entre ellos, dando una muestra gráfica de la ausencia de diferencia significativa mostrada por los valores p. A pesar que los promedios de la raza lusitana sobre las variables motilidad total y progresiva y del porcentaje de vivos y muertos son superiores a los obtenidos por la raza árabe post-descongelación, no existe diferencia significativa que muestre que los valores son diferentes entre las razas.

Gráfico 5: Porcentaje de espermatozoides vivos entre razas de caballos.



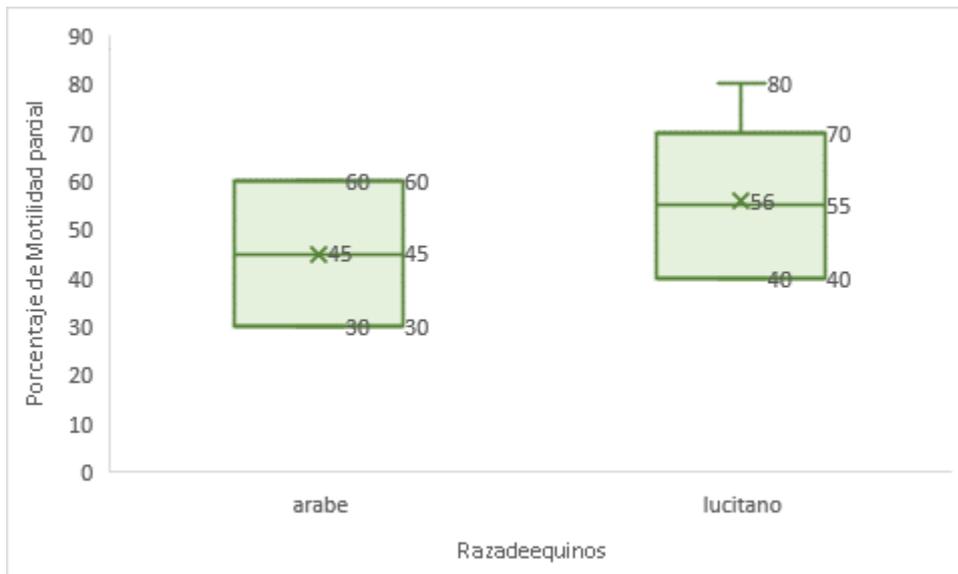
En la grafica nos muestra una minima diferencia, en el analisis de Porcentaje de espermatozoides vivos, en base a las razas. Y se observa que los espermatozoides de los sementales lucitanos brindan un mayor porcentaje de supervivencia de espermatozoides posdescongelamiento.

Gráfico 6: Porcentaje de espermatozoides muertos entre razas de caballos.

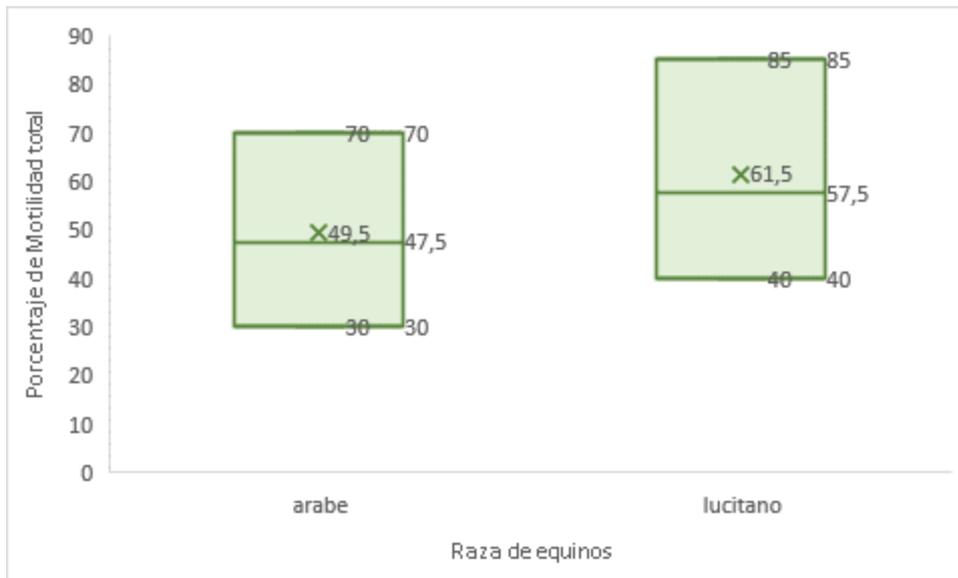


En la grafica nos muestra una minima diferencia, en el analisis de Porcentaje de espermatozoides muertos, en base a las razas. Y se observa que los sementales arabes no brindan un buen porcentaje de supervivencia de espermatozoides posdescongelamiento.

Gráfico 7: Porcentaje de motilidad parcial entre razas de caballos.



En la grafica nos muestra una diferencia moderada, en el analisis de Porcentaje de motilidad progresiva, en base a las razas. Y se observa que los espermatozoides de los sementales lucitanos brindan un mayor porcentaje de motilidad posdescongelamiento.

Gráfico 8: Porcentaje de motilidad total entre razas de caballos.

En la grafica nos muestra una diferencia moderada, en el analisis de Porcentaje de motilidad total, en base a las razas. Y se observa que los espermatozoides de los sementales lucitanos brindan un mayor porcentaje de motilidad posdescongelamiento.

Tabla 7: Análisis estadístico entre variable/raza/diluyente

Variable ~ raza*diluyente	Diluyente
Motilidad total	p-value = 0.09259
Motilidad progresiva	p-value = 0.3322
Porcentaje de vivos	p-value = 0.0004144
Porcentaje de muertos	p-value = 0.0004144

Se realizó un análisis de la varianza de dos vías en el que se obtuvieron valores <0.05 para la interacción entre las variables independientes (raza y diluyente) respecto a las variables dependientes (porcentaje de vivos y porcentaje de muertos), esto quiere decir que tanto el porcentaje de espermatozoides vivos como muertos aumenta o disminuye dependiendo de la combinación que se realice entre las razas del equino y el diluyente.

Tabla 8: Comparación entre diluyentes y razas de caballos.

	diff	lwr	upr	p-adj
inra_96: árabe – botucurio: árabe	-39	-43.52367	-34.47633	0.00e+00
botucurio: lusitano – botucurio: árabe	14	9.47633	18.52367	8.00e-07
inra_96: lusitano – botucurio: árabe	-29	-33.52367	-24.47633	0.00e+00
botucurio: lusitano – inra_96: árabe	53	48.47633	57.52367	0.00e+00
inra_96: lusitano – inra_96: árabe	10	5.47633	14.52367	5.44e-05
inra_96: lusitano – botucurio: lusitano	-43	-47.52367	-38.47633	0.00e+00

En los análisis posteriores de Tukey se confirmó que para obtener mejores resultados en estas dos variables se debe combinar el semen de mejor calidad de la raza lusitana con el diluyente BotuCrio.

Tabla 9: Estimar la efectividad de los diluyentes, BotuCrio e INRA96, mediante estudio estadístico para mantener la funcionalidad de los espermatozoides equinos.

Dado que las variables medidas en semen fresco son igualmente valoradas post descongelación son la motilidad total y motilidad progresiva, son a estas dos variables las únicas a las cuales se las evaluó por medio de estadística inferencial. Los valores obtenidos se observan en la siguiente tabla de datos.

Semen fresco	Motilidad total		Motilidad progresiva	
	BotuCrio	INRA	BotuCrio	INRA
70	65	30	60	30
75	75	40	70	40
70	70	30	60	30
75	85	40	70	40
80	70	30	60	30
85	85	40	70	40
90	70	30	60	30
90	85	40	70	40
85	70	30	60	30
90	85	40	80	40
Promedio	81	76	66	35

Al analizar los datos obtenidos en semen fresco y compararlos con la aplicación de los dos diluyentes estudiados, esto por medio del test estadístico de Mann Whitney, se obtuvieron los siguientes valores p, presentados en la siguiente tabla.

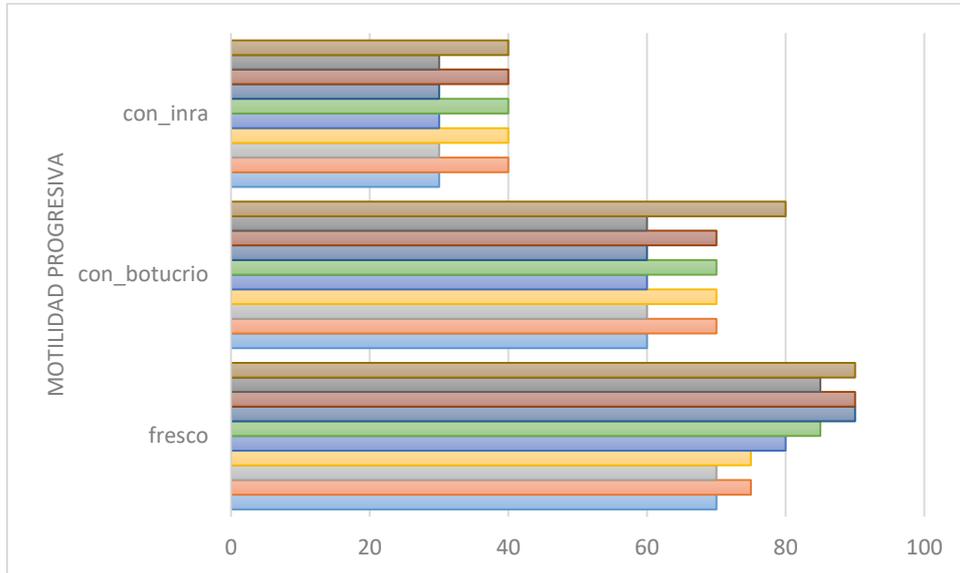
Tabla 10: Análisis estadístico entre motilidad total y motilidad progresiva & Diluyentes.

Motilidad total		Motilidad progresiva	
S. fresco vs BotuCrio	S. fresco vs INRA96	S. fresco vs BotuCrio	S. fresco vs INRA96
p-value = 0.1495	p-value = 0.0001391	p-value = 0.001503	p-value = 0.0001391

Se puede observar que todos los niveles de factor, con excepción de uno, tienen una diferencia significativa al evaluar los parámetros de motilidad total y progresiva cuando se evalúa el semen fresco con relación a los diluyentes. En otras palabras, y en base a los promedios obtenidos de

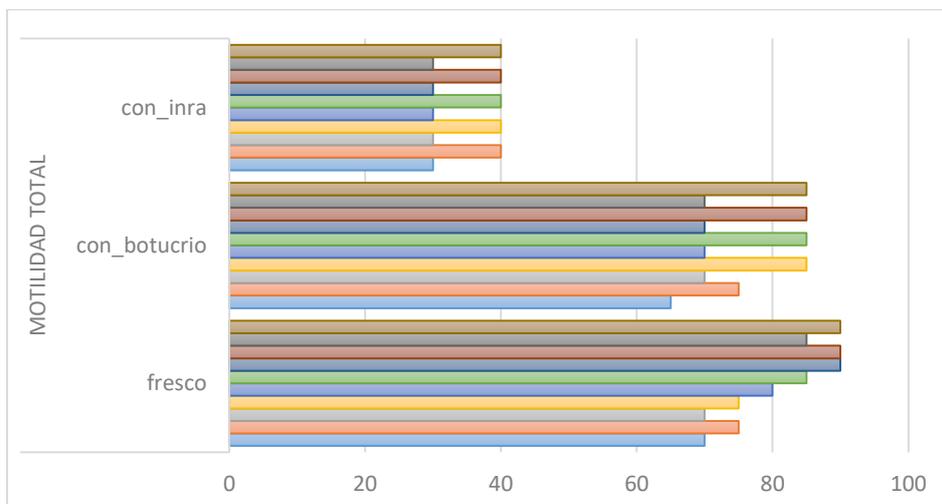
cada nivel de factor, el porcentaje de motilidad progresiva se reduce drásticamente y significativamente en el post descongelamiento tras colocar cualquiera de los dos diluyentes.

Gráfico 9: Motilidad progresiva en semen fresco & Diluyentes.



Así mismo, la motilidad total baja drásticamente y significativamente tras aplicar el diluyente INRA96. Por el contrario, la motilidad total no tiene diferencia significativa en el post descongelamiento, cuando se aplicó el diluyente BotuCrio, esto quiere decir que el promedio de motilidad total se mantiene y conserva, estadísticamente hablando, tras la criopreservación al usar BotuCrio.

Gráfico 10: Motilidad total en semen fresco & Diluyentes.



12. DISCUSIÓN

En el estudio realizado se utilizó dos diluyentes comerciales el cual es el Botucrio e Inra96. Las características de cada uno de ellos son diferentes y se muestran en los resultados. Desde el punto económico se ha visto más factible utilizar el diluyente Botucrio, por su eficacia en su rendimiento para el estudio previsto. Este diluyente es el que demostró mejores beneficios en la crio-conservación de semen equino.

Los resultados del diluyente Botucrio fueron realmente beneficiosos para la investigación, ya que el momento de descongelar las pajuelas ya procesadas, analizamos el material seminal y se pudo determinar que el porcentaje de espermatozoides vivos mantienen un 65% a 70 % de vitalidad. Al contrario que nos sucedió con el diluyente Inra96. Esto puede darse por la falta de conocimiento del manejo de este diluyente.

Se determinó de igual manera los porcentajes de motilidad total, motilidad progresiva dándonos como resultado que el diluyente Botucrio supera con una diferencia significativa al diluyente Inra96.

Tomando en cuenta que los dos diluyentes mantienen el mismo procedimiento determinamos que el más seguro confiable y económico es el diluyente Botucrio.

13. CONCLUSIONES

1. Los valores positivos en cuanto a los parámetros macroscópicos como son volumen donde se evidencio una buena cantidad de líquido seminal, el pH fue neutro, el color cremoso-lechoso y el olor tiene la característica a leche cruda sui generis (olor único).
2. Los valores microscópicos de motilidad total, motilidad progresiva, porcentaje de vivos y muertos pos descongelación fueron de buenas.
3. El diluyentes Botucrio muestra un mejor resultado en motilidad total con una media de 75.5/2.83, motilidad progresiva con una media de 66/2.21, porcentaje de vivos con una media de 66.5/2.11, porcentaje de muertos con una media de 33.5/2.11 post descongelamiento, mientras que el diluyente Inra 96 se obtiene motilidad total con una media de 35/1.66, motilidad progresiva con una media de 35/1.66, porcentaje de vivos con una media de 5.7/0.21, porcentaje de muertos con una media de 94.3/0.21 post descongelamiento se obtiene un con resultados inferiores evidentes.

14. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda no permitir un desgaste reproductivo de los ejemplares en estudio ya que esto puede generar atrofias a nivel del miembro reproductor del macho.
2. Es importante tomar a consideración la temperatura del agua en la que va hacer descongeladas las pajuelas ya que el choque térmico puede afectar el material seminal.
3. Ejecutar los programas de mejoramiento genético equino tomando a consideración los diluyentes en estudio, cabe resaltar que dentro de esta investigación se obtuvieron mejores resultados con el diluyente Botucrio, ya ha generado mejores resultados pos descongelamiento.

15. BIBLIOGRAFIA

1. Morales johan. caracterización zoométrica de caballos criollos [Internet] repositorio.espam.edu.ec 2017 [citado 10 de junio 2023] Disponible en: <https://repositorio.espam.edu.ec/bitstream/42000/526/1/TMV105.pdf>
2. Alomalisa, N. Caracterización fenotípica del caballo criollo de la provincia de Tungurahua cantón Tisaleo. [Internet] repositorio.espam.edu.ec 2014 [citado 10 de junio 2023] Disponible en: <https://repositorio.espam.edu.ec/bitstream/42000/526/1/TMV105.pdf>
3. Bonilla, D. Sistemas de producción equina. Universidad Nacional Abierta y a Distancia. [Internet] repositorio.espam.edu.ec 2013 [citado 10 de junio 2023] Disponible en: <https://repositorio.espam.edu.ec/bitstream/42000/526/1/TMV105.pdf>
4. Canelón, J., Páez, J., Rojas, C. Morfometría de caballos criollos venezolanos en un Hato del Estado Apure. [Internet] repositorio.espam.edu.ec 2004 [citado 10 de junio 2023] Disponible en: <https://repositorio.espam.edu.ec/bitstream/42000/526/1/TMV105.pdf>
5. Causapaz, K. Caracterización fenotípica de la línea bovina pizán en la sierra norte del Ecuador. [Internet] repositorio.espam.edu.ec 2013 [citado 10 de junio 2023] Disponible en: <https://repositorio.espam.edu.ec/bitstream/42000/526/1/TMV105.pdf>
6. Ceballos, O. Caracterización morfoestructural y faneróptico del bovino criollo en la provincia de Manabí, Ecuador. [Internet] repositorio.espam.edu.ec 2012 [citado 12 de junio 2023] Disponible en: <https://repositorio.espam.edu.ec/bitstream/42000/526/1/TMV105.pdf>
7. Dowdall, R. Criando Criollos. Hemisferio Sur. Buenos Aires. [Internet] repositorio.espam.edu.ec 2022 [citado 12 de junio 2023] Disponible en: <https://repositorio.espam.edu.ec/bitstream/42000/526/1/TMV105.pdf>
8. Gómez, N. Caracterización estructural, morfológica y genética de la población de cabras autóctonas de la región Apurímac del Perú. [Internet] repositorio.espam.edu.ec 2013 [citado 12 de junio 2023] Disponible en: <https://repositorio.espam.edu.ec/bitstream/42000/526/1/TMV105.pdf>
9. Larrea, C. Caracterización zoométrica y diagnóstico de los sistemas de producción del caballo criollo en el cantón el chambo. [Internet] repositorio.espam.edu.ec 2018 [citado 12 de junio 2023] Disponible en: <https://repositorio.espam.edu.ec/bitstream/42000/526/1/TMV105.pdf>
10. Larrea, C. Caracterización zoométrica y genética del caballo autóctono de los cantones Chambo y Guamote de la provincia de Chimborazo". [Internet] repositorio.espam.edu.ec 2020 [citado 13 de junio 2023] Disponible en: <https://repositorio.espam.edu.ec/bitstream/42000/526/1/TMV105.pdf>

11. Larrea, J. Caracterización fenotípica y sistemas de producción de una manada de caballos en la comunidad de Atillo en el canto Guamote. [Internet] repositorio.espam.edu.ec 2017 [citado 14 de junio 2023] Disponible en: <https://repositorio.espam.edu.ec/bitstream/42000/526/1/TMV105.pdf>
12. Losinno, L. Cursos de producción equina. Exterior del caballo. Guía de trabajos prácticos. [Internet] repositorio.espam.edu.ec 2015 [citado 14 de junio 2023] Disponible en: <https://repositorio.espam.edu.ec/bitstream/42000/526/1/TMV105.pdf>
13. Blanchard T.L., Brinsko S.P., Love C.C. y Varner D.D. How to use testicular measurements for first-season subfertility insurance consideration in thoroughbred stallions. LIV Annual Convention AAEP. San Diego, USA: American Association Equine Practitioners. [Internet] repositorio.unprg.edu.pe 2018 [citado 18 de junio 2023] Disponible en: <https://repositorio.unprg.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12893/4540/BC-TEST-3353%20VASQUEZ%20ALTAMIRANO.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
14. Caravaca, F., Castel, J., Guzman, J., Delgado, M., Mena, Y. Alcalde, M., Gonzales, P. Bases de la reproducción animal. España, Ed. Servicio de publicación Universidad de Córdoba. [Internet] repositorio.unprg.edu.pe 2013 [citado 18 de junio 2023] Disponible en: <https://repositorio.unprg.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12893/4540/BC-TEST-3353%20VASQUEZ%20ALTAMIRANO.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
15. Charmandarian, A., Krupick, M. y Muñoz, G. Anatomía del aparato reproductor masculino. Sistema reproductor del equino. [Internet] repositorio.unprg.edu.pe 2013 [citado 20 de junio 2023] Disponible en: <https://repositorio.unprg.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12893/4540/BC-TEST-3353%20VASQUEZ%20ALTAMIRANO.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
16. Chenier, T.S. "Anatomy and examination of the normal testicle". Eds: Samper JC, Pycock JF, McKinnon AO. Current therapy in equine reproduction. Saint Louis, USA. [Internet] repositorio.unprg.edu.pe 2017 [citado 20 de junio 2023] Disponible en: <https://repositorio.unprg.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12893/4540/BC-TEST-3353%20VASQUEZ%20ALTAMIRANO.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
17. Cox, M. Caracterización andrológica de potros de raza chilota. [Internet] repositorio.unprg.edu.pe 2019 [citado 25 de junio 2023] Disponible en: <https://repositorio.unprg.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12893/4540/BC-TEST-3353%20VASQUEZ%20ALTAMIRANO.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
18. Departamento de Lambayeque (Perú). EcuRed. [Internet] repositorio.unprg.edu.pe 2016 [citado 25 de junio 2023] Disponible en:

[https://www.ecured.cu/index.php?title=Departamento_de_Lambayeque_\(Per%C3%BA\)&oldid=3061786](https://www.ecured.cu/index.php?title=Departamento_de_Lambayeque_(Per%C3%BA)&oldid=3061786)

19. Fernández, A., Conde, T. y Fondevilla, J. La exploración clínica del caballo. España. [Internet] repositorio.unprg.edu.pe 2018 [citado 25 de junio 2023] Disponible en: <https://repositorio.unprg.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12893/4540/BC-TEST-3353%20VASQUEZ%20ALTAMIRANO.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
20. Galina C; J, Valencia. Reproducción de los animales domésticos Comp. [Internet] repositorio.unprg.edu.pe 2020 [citado 28 de junio 2023] Disponible en: <https://es.scribd.com/document/324723947/Galina-Valencia-Reproduccion-de-Animales-Domesticos>
21. Gaudencio, L.F. Cría y manejo del caballo Departamento de reproducción animal. [Internet] repositorio.unprg.edu.pe 2020 [citado 28 de junio 2023] Disponible en: <https://repositorio.unprg.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12893/4540/BC-TEST-3353%20VASQUEZ%20ALTAMIRANO.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
22. Access Medicina. Gametogénesis y espermatogénesis. [Internet] accessmedicina.mhmedical.com 2021 [citado 28 de junio 2023] Disponible en: <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1476§ionid=95222997>
23. W.D. Cardona. Evaluación de la reacción acrosomal en espermatozoides. [Internet] accessmedicina.mhmedical.com 2021 [citado 28 de junio 2023] Disponible en: [Internet] scielo.isciii.es/ 2005 [citado 30 de junio 2023] Disponible en: https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0210-48062005000700007
24. A Ribeiro-Peres. Criopreservación de espermatozoides. [Internet] scielo.cl/scielo.php 2014 [citado 30 de junio 2023] Disponible en: https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-732X2014000100005
25. Usuga Alexandra. Criotolerancia del semen equino, estabilidad oxidativa y componentes del plasma seminal. [Internet] scielo.org.pe 2016 [citado 30 de junio 2023] Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172016000300011
26. Carpio Mateo. Efecto de dos métodos de congelación. [Internet] scielo.org.pe 2017 [citado 02 de julio 2023] Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172008000100003
27. Rafael del Campo. Diluyente semen botucurio. [Internet] rafaeldelcampo 2021 [citado 02 de julio 2023] Disponible en: <https://www.rafaeldelcampo.com/producto/12388701>
28. Girovet. Inra 96 diluyente para semen fresco. [Internet] girovet.com 2021 [citado 02 de julio 2023] Disponible en: <https://www.girovet.com/es/inra-96->

diluyenteparasemenfresco200ml#:~:text=inra%2096%20mejora%20la%20preservaci%20n,protegen%20altamente%20a%20los%20espermatozoides.

29. B.M. Conservacion de semen. [Internet] bmeditores.mx 2020 [citado 02 de julio 2023] Disponible en: <https://bmeditores.mx/porcicultura/conservacion-de-semen-de-cerdo-en-fresco-y-refrigerado/>
30. Ramírez Germán. Criopreservación de semen equino. [Internet] dialnet.unirioja.es 2020 [citado 05 de julio 2023] Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4943765>
31. Samper, J. Breeding with cooled transported semen. In A. Mckinnon, & J. Voss, Equine Reproduction. [Internet] repositorio.usfq.edu.ec 2015 [citado 10 de julio 2023] Disponible en: <https://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/4269/1/120505.pdf>
32. Morris, C., & Samper, J. Current methodology for Stallion semen cryopreservation: An international survey. [Internet] repositorio.usfq.edu.ec 2015 [citado 10 de julio 2023] Disponible en: <https://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/4269/1/120505.pdf>
33. Almeida, M. 2010. Caracterización zoométrica y diagnóstico de los sistemas de producción de caballos mestizos de vaquería en el cantón Rumiñahui. [Internet] repositorio.espam.edu.ec 2010 [citado 10 de junio 2023] Disponible en: <https://repositorio.espam.edu.ec/bitstream/42000/526/1/TMV105.pdf>

16. ANEXOS

Fotografía 1: Selección de sementales equinos con la comunidad.



Fotografía 2: Preparación y limpieza de los sementales previo a su colecta.



Fotografía 3: Preparación y sujeción a la yegua.



Fotografía 4: Armado y preparación de la vagina artificial.



Fotografía 5: Calentamiento del semental y que realice el pre eyaculado.



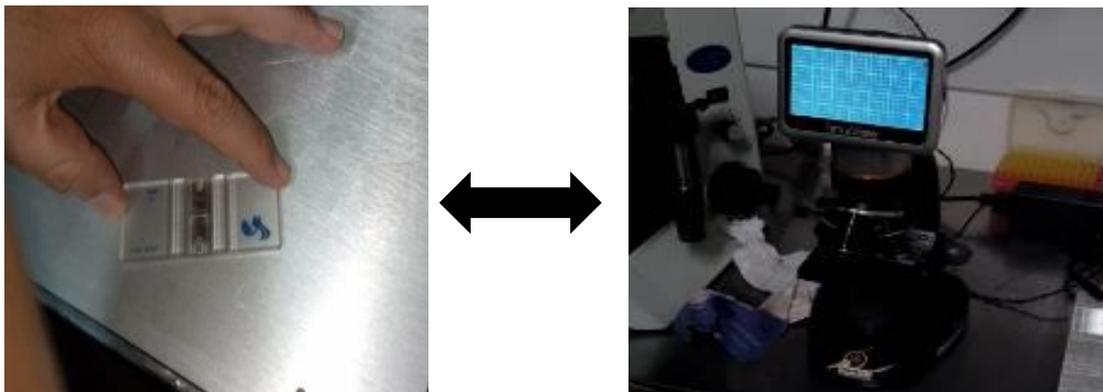
Fotografía 6: Colecta de semen.



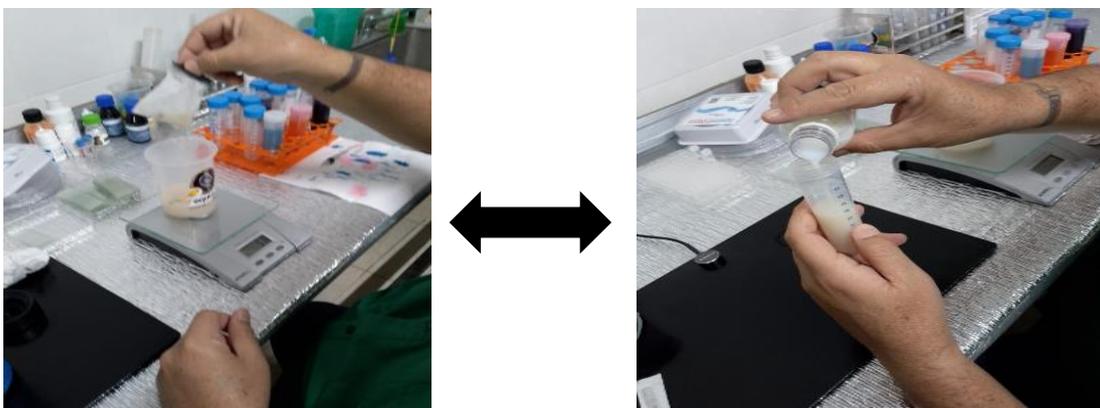
Fotografía 7: Medición de parámetros macroscópicos del semen: volumen, color, olor y pH.



Fotografía 8: Realización de muestras de laboratorio para evidenciar los parámetros microscópicos: la concentración espermática, motilidad total y motilidad progresiva de las muestras seminales.



Fotografía 9: Filtración del semen y Dilución seminal con diluyentes de transporte o refrigeración 1:1.

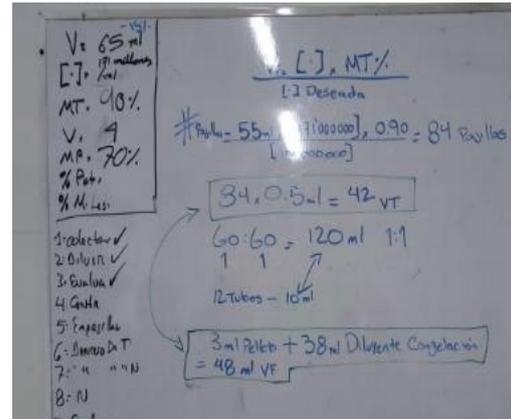


Fotografía 10: Colocación de las muestras seminales en tubos falcón para proceder a centrifugar.

Botucio: 1000 rpm.
Inra96: 10000 rpm.



Fotografía 11: Aplicación de la fórmula para evidenciar el volumen del diluyente y la concentración de espermatozoides vamos a requerir.



Fotografía 12: Separación del sobrenadante del pellet o sedimento y diluimos con diluyente de crio conservación.



Fotografía 13: Empajillado del material seminal.



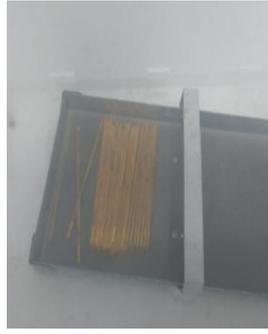
Fotografía 14: Descensos de temperatura de las pajuelas elaboradas del material seminal.

Primero: 4 grados centígrados

Segundo: - 15 grados centígrados

Tercero: vapores de nitrógeno: -126 grados centígrados

Cuarto: Sumergimos las pajuelas en el nitrógeno -196 grados centígrados.



Fotografía 15: Descongelación de pajuelas.

Fotografía 16: Análisis de muestras seminales pos descongelación.

Temperatura del agua 37 grados centígrados.

Pruebas microscópicas: porcentaje de espermatozoides vivos y muertos, porcentaje de motilidad progresiva y total.



Aval del Traductor

UNIVERSIDAD
TÉCNICA DE
COTOPAXICENTRO
DE IDIOMAS***AVAL DE TRADUCCIÓN***

En calidad de Docente del Idioma Inglés del Centro de Idiomas de la Universidad Técnica de Cotopaxi; en forma legal **CERTIFICO** que:

La traducción del resumen al idioma Inglés del proyecto de investigación cuyo título versa: **“EVALUACIÓN DE DOS DILUYENTES BOTUCRIO® E ÍNRA96 MEDIANTE CRIOCONSERVACIÓN DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS EN CABALLOS LUCITANO Y ARABE EN EL CANTÓN LATACUNGA.”** presentado por: **Tigse Vargas Ángel Fernando**, egresado de la Carrera de Medicina Veterinaria, perteneciente a la **Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales**, lo realizo bajo mi supervisión y cumple con una correcta estructura gramatical del Idioma.

Es todo cuanto puedo certificar en honor a la verdad y autorizo al peticionario hacer uso del presente aval para los fines académicos legales

Latacunga, agosto del 2023

Atentamente,

BLANCA GLADYS
SANCHEZ AVILACENTRO
DE IDIOMAS

MSc. Blanca Gladys Sánchez A.

DOCENTE CENTRO DE IDIOMAS-UTC

CI: 2100275375