



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

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Título:

**“EVALUACIÓN DE DOS DILUYENTES COMERCIALES BOTUCRIO® E
INRA96 MEDIANTE EL PROCESO DE CRIO PRESERVACIÓN DE
CELULAS ESPERMATICAS EN CABALLOS ARABE Y CRIOLLO
DE 4 A 5 AÑOS – EN LA PROVINCIA DE COTOPAXI CANTÓN
LATACUNGA”**

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

Autor:

Garzón Zambonino Sixto Gabriel

Tutor:

Garzón Jarrin Rafael Alfonso

LATACUNGA – ECUADOR

Agosto 2023

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Garzón Zambonino Sixto Gabriel, con cédula de ciudadanía No. 0503730459, declaro ser autora del presente proyecto de investigación “Evaluación de dos diluyentes comerciales Botucio® e INRA96 mediante el proceso de criopreservación de células espermáticas en caballos árabe y criollo de 4 a 5 años en la provincia de Cotopaxi cantón Latacunga.”, siendo el Médico Veterinario Zootecnista Ph.D. Rafael Alfonso Garzón Jarrín, Tutor del presente trabajo; y, eximimos expresamente a la Universidad Técnica de Cotopaxi y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

Además, certificamos que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son nuestra exclusiva responsabilidad.

Latacunga, 10 de agosto del 2023



Sixto Gabriel Garzón Zambonino
Estudiante
CC:0503730459



PhD.Rafael Alfonso Garzón Jarrín.
Docente Tutor
CC: 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 **SIXTO GABRIEL GARZÓN ZAMBONINO** identificado con cédula de ciudadanía **050373045-9** 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 comerciales Botucrío® e INRA96 mediante el proceso de criopreservación de células espermáticas en caballos árabe y criollo de 4 a 5 años en la provincia de Cotopaxi 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: Octubre 2018 - Marzo 2019

Finalización de la carrera: Abril 2023 – Septiembre 2023

Aprobación en Consejo Directivo: 30 de noviembre del 2022

Tutor: Médico Veterinario y Zootecnista, Ph.D. Rafael Alfonso Garzón Jarrín

Tema: “Evaluación de dos diluyentes comerciales Botucrío® e INRA96 mediante el proceso de crio preservación de células espermáticas en caballos árabe y criollo de 4 a 5 años en la provincia de Cotopaxi 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:

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.

La publicación del trabajo de grado.

La traducción, adaptación, arreglo u otra transformación del trabajo de grado con fines académicos y de consulta.

La importación al territorio nacional de copias del trabajo de grado hechas sin autorización del titular del derecho por cualquier medio incluyendo mediante transmisión.

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 10 días del mes de agosto del 2023.

Sixto Gabriel Garzón Zambonino

EL CEDENTE

Dra. Idalia Eleonora Pacheco Tigselema,

LA CESIONARIA

AVAL DEL TUTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

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

“EVALUACIÓN DE DOS DILUYENTES COMERCIALES BOTUCRIO® E INRA96 MEDIANTE EL PROCESO DE CRIOPRESERVACIÓN DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS EN CABALLOS ÁRABE Y CRIOLLO DE 4 A 5 AÑOS EN LA PROVINCIA DE COTOPAXI CANTÓN LATACUNGA.”, de Garzón Zambonino Sixto Gabriel, 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, 10 de agosto del 2023



PhD.Rafael Alfonso Garzón Jarrín.

DOCENTE TUTOR


CC: 050109722


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, el postulante Garzón Zambonino Sixto Gabriel, con el título del Proyecto de Investigación “EVALUACIÓN DE DOS DILUYENTES COMERCIALES BOTUCRIO® E INRA96 MEDIANTE EL PROCESO DE CRIOPRESERVACIÓN DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS EN CABALLOS ÁRABE Y CRIOLLO DE 4 A 5 AÑOS EN LA PROVINCIA DE COTOPAXI 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, 10 de agosto del 2023


Lector 1 (presidente)
Dr. Miguel Ángel Gutierrez Reinoso, PhD.
C.C. 0502236623


Lector 2
Dr. Luis Alonso Chicaiza Sanchez, Mg.
CC: 0501308316


Lector 3
Dra. Blanca Mercedes Toro Molina. Mg.
CC: 0501720999

AGRADECIMIENTO

Agradezco primeramente a mi madre que a pesar de no estar presente ha sido un pilar fundamental para no rendirme, a mi padre y madre de crianza Blas Salguero y Adela Garzón por haberme dado su apoyo incondicional a lo largo de mi vida, a mis hermanas, cuñados, sobrinos, tíos y primos que siempre han estado para mí en lo que he necesitado apoyándome.

Un agradecimiento especial a mi tutor de tesis doctor Rafael Garzón al haberme guiado en la realización del proyecto de grado y por su apoyo en toda mi carrera universitaria, a los doctores Diego Oñate, Gonzalo Pillajo y Eddie Molina que me apoyaron desinteresadamente en toda la realización de este proyecto.

A mi gran amigo David Espín que siempre cuando lo he necesitado ha estado presente en las buenas y en las malas.

Sixto Gabriel Garzón Zambonino.

DEDICATORIA

Este nuevo reto culminado se lo dedico infinitamente a mi madre Graciela Garzón que gracias a que nunca me desamparo llegue a culminar este reto, y como no dedicar a toda mi querida familia que siempre han estado en las buenas y en las malas conmigo.

Sixto Gabriel Garzón Zambonino.

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

TITULO: “EVALUACIÓN DE DOS DILUYENTES COMERCIALES BOTUCRIO® E INRA96 MEDIANTE EL PROCESO DE CRIOPRESERVACIÓN DE CELULAS ESPERMATICAS EN CABALLOS ARABE Y CRIOLLO DE 4 A 5 AÑOS – EN LA PROVINCIA DE COTOPAXI CANTÓN LATACUNGA.”

AUTOR: Garzón Zambonino Sixto Gabriel

RESUMEN

La investigación se llevó a cabo con el fin evaluar la crio preservación de semen equino en la provincia de Cotopaxi, cantón Latacunga, sector Salache Bajo, en las instalaciones de la Universidad Técnica de Cotopaxi, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, con el objetivo de evaluar los caracteres espermáticos pos descongelación con el uso de dos diluyentes Botucrio® e INRA96 para la conservación y preservación de semen equino de 4 donantes entre estos de razas criollas y árabes, se procedió a una dilución seminal de 1 ml en 1 ml con diluyente (Botucrio®) e (INRA 96) como crio conservante, con una valoración inicial de color, olor, ph, aspecto, motilidad en masa, motilidad individual, morfología, concentración espermatica, espermatozoides vivos y muertos, usando como base la técnica de empaquetamiento con pajillas equinas, con la adecuación de las pajuelas a gradientes de temperatura hasta llegar a -196°C la misma que corresponde al medio de conservación, valores espermáticos pos descongelación, sus variables con relación a la muestra inicial. Obteniendo un nivel de integridad favorable pre y pos congelación sin deformación estructural de las características del semen. Obteniendo una viabilidad del esperma del 80% de promedio en lo que conlleva al caballo árabe teniendo este una mejor valoración de estructura seminal dentro de los parámetros de pos descongelación valorados por el investigador y su equipo de trabajo.

Palabras Clave: Semen, Espermatozoide, Equino, Criollo, Árabe, Crio preservación.

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

THEME: EVALUATION OF TWO COMMERCIAL DILUENTS BOTUCRIO® AND INRA96 THROUGH THE PROCESS OF CRYOPRESERVATION OF SPERM CELLS IN ARABIAN AND CRIOLLO HORSES FROM 4 TO 5 YEARS OLD – IN THE PROVINCE OF COTOPAXI, CANTON LATACUNGA.

Author: Garzón Zambonino Sixto Gabriel

ABSTRACT

The research was carried out to evaluate the cryopreservation of equine semen in the province of Cotopaxi, Latacunga Canton, Salache Bajo sector, in the facilities of the Technical University of Cotopaxi, Faculty of Agricultural Sciences and Natural Resources, with the objective of evaluating the sperm characteristics after thawing with the use of two diluents Botucrio® and INRA96 for the conservation and preservation of equine semen from 4 donors among these of Creole and Arabian breeds, a seminal dilution of 1 ml in 1 ml with diluent (Botucrio®) and (INRA 96) as cry preservative was performed, with an initial evaluation of color, odor, pH, aspect, mass motility, individual motility, morphology, sperm concentration, live and dead spermatozoa, using as a basis the packing technique with equine straws, with the adaptation of the straws to temperature gradients until reaching -196°C, the same that corresponds to the preservation medium, sperm values after thawing, its variables in relation to the initial sample. Obtaining a favorable level of integrity pre and post freezing without structural deformation of the semen characteristics. Obtaining an average sperm viability of 80% in the Arabian horse with a better evaluation of semen structure within the post-thawing parameters evaluated by the researcher and his team.

KEYWORDS: Semen, Spermatozoa, Equine, Criollo, Arabian, Cryopreservation.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DECLARACIÓN DE AUTORÍA	ii
CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR.....	iii
AVAL DEL TUTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.....	v
AVAL DE LOS LECTORES DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.....	vi
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT	x
1. INFORMACIÓN GENERAL	1
2. JUSTIFICACIÓN.....	2
3. BENEFICIARIOS	3
3.1. Directos.....	3
3.2. Indirectos	3
4. EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	3
5. OBJETIVOS.....	4
5.1. Objetivo general:.....	4
5.2. Objetivos específicos	4
6. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA.....	4
6.1. CARACTERÍSTICAS DEL SEMEN EQUINO.....	4
6.2. ANÁLISIS DEL SEMEN EQUINO.....	5
6.3. ANÁLISIS MACROSCÓPICO DEL SEMEN EQUINO.....	5
6.3.1. Volumen.....	5
6.3.2. Color.....	5
6.3.3. Olor.....	5
6.3.4. El pH.....	5
6.3.5. Aspecto del semen.....	6
6.4. ANÁLISIS MICROSCÓPICO DEL SEMEN EQUINO.....	6
6.4.1. Concentración espermática.....	6
6.4.2. Motilidad espermática.....	6
6.4.3. Motilidad en masa.....	7
6.4.4. Motilidad individual.....	7
6.4.5. El Vigor.....	7
6.5. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL EYACULADO.....	7
6.5.1. Semen del caballo criollo y árabe.....	7

6.5.2.	Extracción y recolección del semen equino.	8
6.5.3.	Selección del reproductor.	8
6.6.	EL CABALLO CRIOLLO.	9
6.6.1.	Características fenotípicas.	9
6.6.2.	Características genotípicas.	10
6.6.3.	Morfología del caballo criollo.	10
6.7.	EL CABALLO ÁRABE.	12
6.7.1.	Características fenotípicas.	12
6.7.2.	Características genotípicas.	13
6.7.3.	Morfología del caballo árabe.	13
6.8.	CRIOPRESERVACIÓN.	14
6.8.1.	Criopreservación del semen equino.	15
6.8.2.	Choque térmico.	17
6.8.3.	Estrés por la crio preservación.	17
6.8.4.	Formación de cristales.	17
6.9.	DILUYENTE PARA CONGELACIÓN.	18
6.9.1.	MEDIOS DILUYENTES.	18
7.	VALIDACIÓN DE LAS PREGUNTAS CIENTÍFICAS O HIPÓTESIS.	21
8.	METODOLOGÍAS Y DISEÑO EXPERIMENTAL.	21
8.1.	LOCALIZACIÓN Y DURACIÓN DEL PROYECTO.	21
8.2.	UNIDADES EXPERIMENTALES.	21
8.3.	DISEÑO EXPERIMENTAL.	21
9.	METODOLOGÍA.	22
9.1.	CAMPO.	22
9.1.1.	Medidas de seguridad del personal.	22
9.1.2.	Preparación del espacio físico.	22
9.1.3.	Preparación de la yegua.	22
9.1.4.	Preparación del semental.	22
9.1.5.	Estimulo del semental.	22
9.1.6.	Limpieza del pene del semental.	23
9.1.7.	Armado de la vagina artificial.	23
9.1.8.	Colecta del material seminal.	23
9.1.9.	Evaluación Macroscópica del material seminal.	24
9.1.10.	Dilución del semen fresco para transporte.	24
9.1.11.	Empacado de la muestra seminal y transporte.	24

9.2. LABORATORIO.....	24
9.2.1. Evaluación de motilidad total.....	24
9.2.2. Concentración espermática.....	24
9.2.3. Determinación de vivos/muertos- tinción eosina- nigrosina.	25
9.2.4. Evaluación de la morfología espermática.....	25
9.2.5. PREVIO A LA CRIOPRESERVACIÓN.....	25
9.2.6. CONGELACIÓN DE MUESTRAS SEMINALES.	26
10. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....	27
11. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	31
11.1. Conclusiones.....	31
11.2. Recomendaciones.....	31
13. ANEXOS.....	38
ANEXOS 1. FOTOGRÁFICOS.....	38
ANEXOS 2. INSTRUCTIVOS DE USO.....	43
ANEXOS 3. AVAL DEL TRADUCTOR.....	45

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1 Composición del diluyente Botucrio®</i>	19
<i>Tabla 2 Características macroscópicas de los eyaculados de los sementales árabes y criollos, previas a la crio preservación</i>	27
<i>Tabla 3 Características microscópicas de las eyaculadas previas a la criopreservación</i>	28
<i>Tabla 4 Características microscópicas pos descongelación con diluyente BotuCrio®</i>	29
<i>Tabla 5 Características microscópicas pos descongelación con diluyente INRA96</i>	30
<i>Tabla 6 Análisis estadísticos de caballos árabe con crio preservante Botucrio®/ INRA96 post congelación</i>	30

1. INFORMACIÓN GENERAL

Título del Proyecto:

Evaluación de dos diluyentes comerciales BotuCrio® y INRA96 mediante el proceso de criopreservación de células espermáticas en caballos árabe y criollo de 4 a 5 años en la provincia de Cotopaxi cantón Latacunga.

Fecha de inicio: abril 2023

Fecha de finalización: agosto 2023

Lugar de ejecución:

Provincia de Cotopaxi.

Cantón Latacunga.

Unidad Académica que auspicia

Universidad Técnica de Cotopaxi.

Carrera que auspicia:

Carrera de Medicina Veterinaria

Proyecto de investigación vinculado:

Proyecto de Mejoramiento Genético Equino.

Equipo de Trabajo:

Tutor: PhD. Rafael Garzón Jarrin

Estudiante: Sixto Gabriel Garzón Zambonino.

Área de Conocimiento: Agricultura

Sub Área de Conocimiento: Veterinaria

Línea de investigación: Análisis, conservación y aprovechamiento de la biodiversidad local.

Sub líneas de investigación de la Carrera: Biodiversidad, mejora y conservación de recursos zoogenéticos.

2. JUSTIFICACIÓN.

La biotecnología en la medicina veterinaria y en la producción equina ha contribuido al desarrollo de mecanismos y técnicas que sirven de apoyo a la producción animal. Con relación a los equinos, una de las alternativas más requeridas es la criopreservación del semen ya que de eso permite el aprovechamiento de una manera más eficiente su material genético de los animales que cuenten con características fenotípicas y genotípicas deseadas en la reproducción equina. (1)

La criopreservación de semen es un método y una herramienta que tiene muchas ventajas como son: la evaluación de la calidad del semen por eyaculado o pos congelamiento, ayuda con la disminución de enfermedades de transmisión sexual; nos permite el almacenamiento seminal por periodos largos de tiempo por su congelación y nos permite 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 consumidor. (2)

La importancia de dar realce a los progresos y avances que han obtenido en los países vecinos con la criopreservación en el área de la biotecnología de la reproducción animal en relación con los equinos como se dan los casos en Colombia, en donde, los equinos son más importantes día tras día, esto se debe a su amplia participación de actividades ecuestres como son, actividades deportivas, actividades de trabajo. (2) Actividades de exposición y su comercialización a nivel del mundo de material genético equino criopreservado.

El manejo de las técnicas actuales de criopreservación de semen equino da variabilidad en los resultados ya que son varios los diluyentes que se dan uso, las composiciones de estos diluyentes se basan en la leche, huevos, glicerol y amidas. (3)

En el Ecuador existe actualmente una deficiencia en investigaciones de técnicas sobre la criopreservación de semen equino ya que el material seminal no es aprovechado de una manera correcta y eficiente. (4) Por lo cual, este estudio constituirá en un reporte de técnicas de criopreservación de semen equino, para que sea de provecho la calidad genética de los equinos, ya que son animales ampliamente propagados en todo el mundo. En Ecuador existen muchas ganaderías equinas muy importantes y con reproductores con alta calidad genética y comercial que no se han realizado muchos estudios para realizar la criopreservación del semen equino.

3. BENEFICIARIOS

3.1.Directos

- Propietarios de los animales que participan en el estudio.
- Investigadores principales del proyecto, requisito previo a la obtención de título de médico veterinario.

3.2.Indirectos

- Pobladores y propietarios de equinos en la provincia de Cotopaxi, cantón Latacunga.

4. EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.

En el mundo del manejo de la criopreservación del semen equino es complejo ya que se debería tener variedad de diluyentes con buena efectividad, para no tener costos elevados al llevar a cabo una criopreservación debido a la calidad de semen equino, a más de eso se toma en consideración el transporte y tiempo de vida del semen equino. (3)

Los costos elevados y la efectividad de los diluyentes para la criopreservación y tiempo de vida útil de semen equino nos llevan a realizar una comparación entre dos diluyentes, para que en futuros proyectos estos sean utilizados ya sabiendo su eficiencia en la criopreservación. (4)

La criopreservación del semen se ha vuelto precaria en la provincia de Cotopaxi a lo largo del tiempo, donde la genética de los equinos se ha notado perjudicada debido a que los pequeños productores de equinos han tomado por mantener el método tradicional de la monta para su reproducción. La criopreservación del semen permite conservar y almacenar material genético por largos periodos de tiempo y después de ellos con la ayuda de los diluyentes poder tener una satisfactoria inseminación. (5) La inseminación artificial con semen congelado, es una herramienta importante en la utilización de sementales. Se ha tomado en consideración la evaluación de diluyentes para la criopreservación de las células espermáticas en caballos.

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. (6)

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general:

- Comparar la efectividad de dos diluyentes comerciales para la criopreservación de células espermáticas (BotuCrio® e INRA96) en caballos árabes y criollos de Latacunga, con edades que oscilan entre 4 y 5 años.

5.2. Objetivos específicos

- Evaluar parámetros macroscópicos del semen de los caballos seleccionados en relación al volumen, color, consistencia, pH.
- Medir parámetros microscópicos del material seminal: motilidad total, supervivencia, anormalidades morfológicas espermáticas previas y pos criopreservación.
- Comparar la efectividad de los dos diluyentes, BotuCrio® e INRA96, para mantener la funcionalidad de los espermatozoides esquinos pos descongelación.

6. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA.

6.1. CARACTERÍSTICAS DEL SEMEN EQUINO.

En los caballos el semen fresco debe presentarse en una apariencia de color blanca opaco con un aspecto uniforme, los grumos en los eyaculados estos pueden ser signos de una infección en los órganos reproductivos de los caballos, y estos pueden afectar la viabilidad de los espermatozoides. Los eyaculados de color amarillento rojizo están probablemente contaminados con orina o sangre, respectivamente. La contaminación con orina se detecta oliendo el eyaculado o bien midiendo el potencial osmótico de este, por ende, estos serán descartados a primera vista. (5)

El semen del caballo es opaco, blanco-grisáceo y constituido por tres fracciones de valor similar lo que conlleva a:

- Una primera de aspecto acuoso que solo contiene un escaso número de espermatozoides
- La segunda, clara, que contiene grandes masas de zoospermos.
- Y la tercera, viscosa, que corresponde al producto de secreción de las vesículas seminales y las glándulas de Cowper. (6)

6.2. ANÁLISIS DEL SEMEN EQUINO.

El análisis seminal rutinario evalúa ciertas características de la célula espermática que son necesarias para la fertilización del óvulo, aunque algunos autores coinciden en afirmar que no existe relación alguna entre los parámetros básicos de calidad seminal y la fertilidad, de hecho, ningún parámetro del análisis seminal rutinario explica más del 30% de la fertilidad de dicho semen. El análisis de la calidad seminal incluye el estudio de varios parámetros utilizando diferentes metodologías. (17)

6.3. ANÁLISIS MACROSCÓPICO DEL SEMEN EQUINO.

El análisis macroscópico del semen es de mucha importancia que se lo realice al instante después de la colecta del semen, es simplemente el estudio de la muestra de semen comprendida desde lo que es observable con el ojo humano, a partir, del volumen de la eyaculación, su aspecto, el color, o en ocasiones también se mide su viscosidad y el PH de la muestra seminal, para que este sea con resultados confiables en este análisis seminal.

6.3.1. Volumen.

El volumen de semen equino filtrado, libre de gel. El volumen oscila entre 20 – 60ml de semen. Existen importantes variaciones en función del individuo, raza, régimen sexual, estación del año, método de recolección, etc. (18)

6.3.2. Color.

Varía desde blanco acuoso a crema en función de la concentración espermática. El color del semen de potro normal, varía entre blanco acuoso a blanco cremoso dependiendo de la concentración espermática. (19) 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.

6.3.3. 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 del olfato podría servir para distinguir algunas infecciones. (20)

6.3.4. El pH

La evaluación de pH es inmediatamente después de la recolección seminal (tiras de pH). Entre 7,2-7,6 en equino. Está inversamente relacionado con la concentración espermática. (21) El

metabolismo espermático acidifica el medio y con la presencia de sustancias contaminantes como la orina y procesos inflamatorios le dan valores más altos de pH en el semen. Normalmente el pH debería ser ligeramente mayor en el segundo eyaculado. Los pH ácidos tienen un efecto espermicida, por el contrario, los pH alcalinos pueden indicar la presencia de material extraño o infección. (22)

6.3.5. Aspecto del semen.

Después de la separación del gel el aspecto del semen es evaluado, teniendo en cuenta como base su coloración y consistencia. La coloración del semen varía de gris ceniza a blanco y la consistencia puede variar de acuoso a lechoso. (7) El aspecto del semen da una idea de la concentración espermática. Cuanto más blanco lechoso, mayor es su concentración. Además de eso, la apariencia permite establecer la presencia de urospermia y hemospermia. En caso de urospermia, su presencia puede ser detectada por el olor a orina en el semen.

6.4. ANÁLISIS MICROSCÓPICO DEL SEMEN EQUINO.

El examen microscópico del semen equino es una de las fases esenciales después de la macroscópica para la criopreservación, ya que será a partir de la observación a través de un microscopio los parámetros que este conlleva si la colecta será útil para la criopreservación.

6.4.1. Concentración espermática.

Tiene como objetivo evaluar la capacidad de producción de espermatozoides del semental y calcular el número de dosis a producir por eyaculado seminal. Existe correlación entre la concentración y fertilidad. Se observan variaciones en función del individuo, estación del año, frecuencia y técnica de recolección, etc. si bien la concentración media de semen equino oscila $60-350 \times 10^6$ (equino) espermatozoides/ml. (23)

6.4.2. Motilidad espermática.

Es muy importante para la valoración del semen, para la determinación de la concentración de una muestra espermática debemos tomar un volumen predeterminado de semen puro y mezclarlo con un volumen predeterminado de diluyente. Esto puede ser llevado a cabo usando un hematocitómetro (cámara de Neubauer). (24)

La motilidad debe de ser evaluada hasta que cae por debajo de un 25%. El tiempo que transcurrió hasta que la motilidad alcanza dicho valor, debe ser registrado. El semen refrigerado,

no debería de almacenarse por más tiempo del que fue registrado, ya que no sería de utilidad para la inseminación artificial. (25)

Bajo condiciones naturales la regulación de la motilidad espermática ocurre en tres puntos críticos. La reserva epididimal, supresión de la motilidad; eyaculación- activación de la motilidad; reserva oviductal- hiperactivación de la motilidad. (26)

6.4.3. Motilidad en masa.

El porcentaje de espermatozoides motiles es de (60% a 90%) en equinos, debido a la elevada concentración espermática, se habla de motilidad masal (escala de 1 a 5), evaluando como 1 al semen que no presenta ondas y 5 cuando las ondas se mueven rápidamente formando remolinos. (27)

6.4.4. Motilidad individual.

El porcentaje de espermatozoides con trayectoria progresiva en línea recta. El rango posible comprende desde un 40% a un 90%, siendo el valor mínimo aceptable del 50%. (28)

6.4.5. El Vigor.

El vigor se evalúa al mismo tiempo que la motilidad individual, teniendo en cuenta la velocidad con la que estos espermatozoides atraviesan el campo. (29) La escala que se utiliza es de 0 a 5 (rangos posibles), evaluando como 0 los espermatozoides inmóviles y como 5 los que avanzan rápidamente por el campo y son difíciles de seguir visualmente.

6.5. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL EYACULADO.

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.

6.5.1. Semen del caballo criollo y árabe.

Las condiciones del semen equino tanto del caballo criollo como del caballo árabe todas sus características son fundamentales para que se dé una criopreservación, este sea como el olor, el

color, la concentración, el volumen y el pH depende de muchos factores, estas son condiciones o características del caballo, las cuales se refieren a la edad del caballo, altura del caballo, condición corporal, tamaño testicular, alimentación, condiciones físicas externas, y muchos factores los cuales tienen influencia en las características fundamentales del semen equino.

6.5.2. Extracción y recolección del semen equino.

La recolección del semen debe hacerse lo más natural posible con la finalidad de que la muestra no se vea alterada en su calidad principalmente en relación a su concentración y volumen. La vagina artificial es el medio más adecuado para obtener semen en los equinos. Todos los otros métodos (esponja, recolección vaginal, colectores vaginales y electroeyaculadores) no siempre resultan lo suficientemente útiles. El semen del reproductor se recolecta para realizar inseminación artificial después de su valoración guardado hasta 48h después la recolección conservándose está a 5°C o criopreservación. esta segunda parte es muy importante de realizar ya que podemos encontrar animales de alto valor genético pero estas características no podrán ser transmitidas.

6.5.3. Selección del reproductor.

Para la selección de un buen semental se deben examinar los órganos reproductores poniendo especial atención en el tamaño y forma de los testículos y epidídimos, órganos que pueden ser palpados a través del escroto. Los testículos deben ser firmes y elásticos, carentes de lesiones o deformidades y moverse libremente dentro del saco escrotal, también inspeccionar anomalías en el prepucio, pene y conducto eyaculatorio.

El estado de salud corporal del caballo debe ser evaluado. Se debe examinar que el animal se encuentre libre de malformaciones o lesiones crónicas, como cojera o lesiones dorsales, lo que limitaría el desplazamiento y monte del caballo en el agostadero. La integridad de los dientes del animal también es importante porque una dentadura incompleta o desgastada afecta la habilidad del caballo para mantener una adecuada condición corporal. Se debe checar que el animal esté libre de defectos hereditarios. Examen de los órganos genitales externos: El pene, el prepucio y la fosa uretral pueden examinarse cuando el pene y prepucio son lavados, en la preparación para la colección del semen.

El escroto, testículos y epidídimo pueden revisarse en cualquier momento debiéndose revisar, la posición, tamaño, forma y consistencia de estos órganos. En el caso del escroto este debe ser delgado, elástico y con un cuello bien demarcado. Este órgano también debe estar libre de

laceraciones, edemas, excoriaciones, inflamación y hemorragias. Los testículos deben tener una consistencia uniforme, con una textura ligeramente túrgida y flexible en todo el estroma. El tamaño de los testículos presenta una alta correlación con la producción diaria de espermatozoides, por lo que la medición de los testículos nos permite estimar la cantidad de la producción de células espermáticas. Los testículos de un caballo fuerte y maduro miden en un promedio de 8.5 a 11 cm. de longitud, y de 4.5 a 6 cm. de ancho. La anchura total escrotal considerando los 2 testículos es de 9.5 a 11.5 cm. Otra estructura que debe examinarse son los cordones espermáticos los cuales pueden palpase a través del cuello del escroto. Los cordones espermáticos deben ser de la misma longitud y diámetro (de 2 a 3 cm.). Examen de los órganos internos: Si se sospecha de anormalidades es recomendable el examen de estos a través de la palpación rectal o el uso de equipo de ultrasonido. Estos problemas son poco comunes.

6.6.EL CABALLO CRIOLLO.

Los conquistadores se suponía que trajeron en mayor cantidad caballos inferiores para los soldados, pues eran de menor precio, reservándose los mejores para los jefes únicamente. Muchos de ellos fueron abandonados o perdidos en el nuevo continente y fue así que se criaron salvajes, multiplicándose libremente dentro de las condiciones irregulares de estas regiones, realizándose en ellos una selección natural en la que triunfaba el más apto para sobrevivir a las dificultades de orden climático, alimenticio y epizootico, a más de la originada por la persecución del hombre y de las fieras; esta selección natural efectuada durante cuatro siglos y que continuo con una obligada consanguinidad, imprimió a la raza extraordinarias características rústicas y de resistencia. (8) Manifiesta que es casi siempre de pequeño tamaño, las características del caballo de la pampa demuestran la facultad de adaptación al medio ambiente que le permitió a la raza Criollo sobrevivir. Descendiente de los caballos árabes y andaluces importados por los conquistadores españoles, volvió al estado salvaje antes de ser utilizado y criado por los indios de la pampa. Sirvió a todos los partidarios en busca de su libertad; los gauchos, los indios y los ejércitos de los colonos europeos. Hoy es la montura de los peones para el trabajo ganadero y los desplazamientos. (9)

6.6.1. Características fenotípicas.

El caballo criollo fenotípicamente se caracteriza en Sudamérica por ser descendiente del caballo antiguo andaluz, entre sus principales características raciales son la rusticidad para realizar trabajos, su rápida adaptación ambiental, longevidad y óptimo para realizar trabajos agropecuarios. Se manifiesta que anatómicamente están desarrollados para recorrer cordilleras

de hasta 4200 (msnm) por lo cual esta raza de caballos son los más deseados para el trabajo arduo en el campo con ganado bravo. La caracterización de un individuo nos sirve para establecer la variabilidad de ejemplares existentes en nuestro medio

6.6.2. Características genotípicas.

Es un caballo resistente adaptado rústicos o portador para resistir el escasez de alimentos o la de abundancia de agua en la época de lluvia o de plagas ectoparásito, parásito interno, son caballos resistentes a cualquier suelo que no es necesario el uso de herradura eso se logra solamente a través de una selección y eso viene dado por genes supuestamente mejorando lo que hacemos es debilitar cambiar ese genoma que ha sido logrado por años para que este caballo sea el mejor individuo, el más adaptado a este medio ambiente y pueda cumplir su función de manera eficiente.

Al pasar el tiempo estan cambiando ese genoma y lo estás debilitando porque se están perdiendo genes que fueron logrados por años de mutaciones para adaptarse a que sobreviva el más fuerte, aquí sobrevive el que pueda superar todos estos inconvenientes en los llanos de los páramos ecuatorianos, el caballo criollo luego de 500 años de selección natural se ha adaptado perfectamente a vivir en las condiciones de llano y por supuesto que esta selección debemos valorarla y está perfectamente demostrado que cuando algún productor del caballo criollo, bien sea por necesidades de mercado porque haya exigencias para la parte de deporte o bien sea porque erróneamente se trate de mejorar algunas cuestiones fenotípicas con la introducción de otras razas adaptación que tiene de por sí el caballo criollo y conlleva a que el atajo es más susceptible a las enfermedades más susceptibles a los cambios climáticos y disminuye la vida útil de aquel caballo originalmente es mucho más resistente que el mestizo

6.6.3. Morfología del caballo criollo.

La conformación general: Eumétrico y mesomorfo (medidas y formas medianas). Rectilíneo o subconvexilíneo (perfil recto o subconvexo). Su tipo es de un caballo muy musculoso modelado en fuerza, pero ágil y rápido en sus movimientos. (10)

- **Carácter:** Activo y dócil
- **Talla:** con fluctuaciones para los machos entre 1,40 y 1,48. Hembras 2cm menos.
- **Perímetros torácicos:** alrededor de 1,78 m, hembras 2 cm más.
- **Perímetro de la caña:** Alrededor de 19 cm. Hembras 1cm menos.
- **Pelajes:** con exclusión del del pintado y el tobiano se aceptan todas las variedades.

- Cabeza: En conjunto corta de base ancha y verticilo, frente amplia, proporcionalmente mucho cráneo y poca cara, orejas más bien chicas, ojos inteligentes y expresivos, ollares dilatados.
- Cuello: de largo mediano, bien unido a sus dos extremidades, ligeramente convexo en su línea superior y casi recto en la inferior.
- Cruz: musculosa no muy destacad.
- Dorso: de un ancho y expresión proporcionada para completar superiormente un ancho tórax.
- Riñón; corto, ancho y musculoso bien unido al dorso y a la grupa.
- Grupa: de largo y ancho mediano, fuertemente musculad, bien desarrollada y semi oblicua.
- Cola: con una inserción que continúa la línea superior de la grupa, el maslo corto y grueso con cerdas abundantes y gruesas.
- Pecho: ancho y musculado; en descendido y los encuentros bien separados.
- Tronco: de gran desarrollo, costillas bien arqueadas, vientre profundo y lleno, continuando increíblemente el perfil interior del tórax.
- Flanco: corto y lleno.
- Espalda; medianamente largas e inclinadas, fuertemente musculadas, ambos encuentros bien separados.
- Brazo y codo: brazos levemente inclinados con el codo bien desprendido del tórax, ambos fuertemente musculados.
- Antebrazo: bien aplomado, largo y fuertemente musculado, que se afina a la rodilla.
- Rodillas: anchas, fuertes, medianamente largas y nítidas.
- Muslos y piernas: muslo bien musculado con las nalgas alargadas. Pierna ancha y musculada interior y exteriormente; la cuerda del corvejón bien destacada.
- Garrones: amplios, anchos, fuertes, secos y musculosos, paralelos al plano mediano del cuerpo y bien aplomados. El ángulo del garrón medianamente abierto.
- Cañas: de mediano desarrollo y solo súbrela cara posterior del nudo.
- Cuartillas: fuertes, de longitud mediana, anchas, espesas, nítidas y medianamente inclinadas.
- Cascos: de volumen proporcionado al cuerpo, duros tensos y sólidos, bien aplomados y negros de preferencia. (11)

6.7. EL CABALLO ÁRABE.

En el Ecuador, es muy probable que caballos árabes hayan llegado durante la Conquista o en los movimientos que se dieron a raíz de las guerras por la Independencia. Sin embargo, no se mantuvieron como líneas puras y no es sino en la segunda mitad del siglo XX que se empezó a importar caballos árabes registrados. (12)

Además de ser un caballo especial para el Endurance Ecuestre, cuyos éxitos son reconocidos hbmundialmente, el Pura Sangre Árabe se destaca también en disciplinas tan diversas como el adiestramiento, el salto, las carreras de corta distancia, el atalaje, así como en las pruebas de Halter donde se premia su belleza. (13)

6.7.1. Características fenotípicas.

Su apariencia esbelta y única se puede decir que es una de las razas más bellas que existen. Sus ojos expresivos, sus orejas pequeñas y puntiagudas, y la elegancia en sus proporciones, les hacen inconfundibles.

Con respecto a sus ojos, cabe destacar que, aunque creamos que el color azul en los mismos hace a un ejemplar árabe caballo aún más destacable.

En relación a la cabeza de la pura sangre árabe, la manera de girarla en el cuello es debida a la forma de unión entre ambas partes, algo que los beduinos denominaban “mitbah”, y que, además, le permite una mayor facilidad de movimientos.

Aunque no hay límite de alzada, ésta es de aproximadamente 1.50m; y muchos de ellos presentan una hendidura a la altura de la tabla del cuello (reconocida con el nombre de “Huella del Profeta”).

La composición tan peculiar está en la base de su gran resistencia, lo que le permite portar cargas más pesadas.

Otro de los aspectos especialmente destacables del físico del árabe pura sangre es que su cola se ubica en alto, dado que presenta un trasero nivelado y largo. Además, suele decirse que los mejores linajes tienen unas caderas anguladas y profundas.

6.7.2. Características genotípicas.

Lo que más destaca de la personalidad del caballo pura raza árabe es su carisma y buen temperamento. Sus habilidades, entre las que destaca especialmente su velocidad y su capacidad física de resistencia, le convierten en un animal activo, fogoso y fuerte.

Su gran resistencia y velocidad ya quedaron demostradas en sus orígenes, al soportar las duras condiciones del desierto; cualidades que hoy sigue mostrando en los diversos deportes de los que es partícipe (como la equitación o las carreras de caballos).

6.7.3. Morfología del caballo árabe.

En vista lateral, tiene forma de cuña, el carrillo ancho y la mandíbula reduciendo hacia un hocico fino que cabe en la palma de la mano. La posición del ojo es relativamente más baja que en otras razas y el ojo es de un color marrón muy oscuro. No se considera un defecto que se vea blanco alrededor del ojo, igual que en el ojo humano. (14) Los ollares, cuando el animal está en reposo, tienen una orientación en paralelo con el perfil de la cara y pueden ser muy expresivos. Los huesos maxilares son grandes y bien definidos, con bastante espacio entre uno y otro dejando sitio a la garganta. Las ramas de la mandíbula inferior son rectas y no convexas y se juntan en un bien marcado surco de la barbilla. (15)

- La cabeza: muy refinada y con la estructura ósea muy destacada, es una de las características más distintivas del caballo árabe.
- El labio inferior: es estrecho y algunas yeguas lo pueden llevar suelto, incluso colgando cuando están relajadas, pero si algo les llama la atención o están excitadas, lo aprietan contra los dientes.
- La boca: es larga y con una expresión amable. Cierta concavidad (negativo), en el perfil, por debajo de los ojos, es deseable, pero de ninguna manera, imprescindible.
- La frente: puede ser plana o ligeramente convexa.
- Una característica del árabe, que lo distingue de las otras razas, es su porte de cola elevado, arqueando desde los cuartos traseros, o llevado en vertical como una bandera, sobre todo si el caballo está en movimiento o excitado. Si está muy excitado, el árabe puede doblar la cola sobre su grupa.
- Las manos: son más redondeadas y abiertas.
- Los pies: más ovalados, ambos con una superficie lisa, que parece pulida.

- El casco: es muy duro y el ángulo del casco, parecido al de la cuartilla, aproximadamente de unos 45°, aunque los posteriores suelen tener algo menos inclinación que las anteriores.
 - El pelaje: es muy fino y sedoso, tan fino que se pueden ver las venas y las marcas en la piel, a través de él. Hay muy poco pelo alrededor de los ojos y en el hocico, lo que les da el aspecto de llevar maquillaje.
 - La piel: es muy refinada con un tacto aterciopelado y de color negro muy oscuro, menos en las zonas en las que hay marcas blancas naturales, donde la piel es rosada. La finura de la piel es tal que se ven los vasos sanguíneos a través de ella.
 - La crin y la cola: son finas y sedosas, no excesivamente pobladas y de una longitud natural.
 - Alzada: no hay límite de alzada, los árabes suelen medir entre 1'48m y 1'58m a la cruz.
- (16)

6.8. CRIOPRESERVACIÓN.

La criopreservación seminal trata de la congelación y almacenamiento de células germinales a bajas temperaturas con fines reproductivos, siendo una herramienta fundamental en reproducción asistida. (30) La criobiología ha estudiado los efectos de las bajas temperaturas sobre las células germinales y su relación con el tiempo de exposición, generando el conocimiento base y conciso para realizar los procesos de criopreservación. En el proceso de congelamiento de células se producen cambios en la estructura y composición de las membranas plasmáticas y de acuerdo a su sensibilidad se delimitará los índices de supervivencia de las células germinales. (31)

La criopreservación de espermatozoides ha facilitado el comercio nacional e internacional del semen equino, además de ayudar a mitigar la propagación de patologías venéreas, permitiendo a su vez la inseminación de varias yeguas con el semen proveniente de un solo eyaculado. Sin embargo, el semen descongelado tiene una calidad inferior en relación al semen refrigerado o fresco lo cual se evidencia con tasas de preñez menores. (32) Los espermatozoides congelados pierden su integridad y la función de la membrana plasmática se ve alterada atribuido al choque térmico, al estrés osmótico, al estrés oxidativo, a la formación de cristales de hielo y a la apoptosis.

La criopreservación de semen equino, a pesar de su impacto en los programas de cruzamiento y mejora genética, no es una tecnología totalmente establecida. Durante los últimos años, se

han propuesto una serie de modificaciones al proceso de congelación, sin embargo, una gran población de caballos aún tiene calidad deficiente del semen y en efecto, bajas tasas de fertilidad después de la inseminación artificial (IA) con semen congelado-descongelado. Posiblemente, la toxicidad del glicerol (GLY) podría ser una razón para la variación en la capacidad de congelación de los espermatozoides equinos. (33) Existen reportes limitados sobre el uso de agentes crioprotectores penetrantes alternativos para el esperma equino. Las amidas, han demostrado ser una buena opción para congelar el semen de estas especies. Informes recientes han mostrado datos alentadores con respecto al uso de amidas como crioprotectores para sementales, con mejoras más notables para el semen equino que se congelan mal cuando se usa glicerol. (34) El proceso de criopreservación provoca cambios ultraestructurales, bioquímicos y funcionales en los espermatozoides que al final se ven reflejados en una reducción de la viabilidad, motilidad y capacidad fecundante.

Existen dos métodos de mantener conservado el material seminal: refrigerado (5 °C) y criopreservado (-196 °C). La viabilidad del semen refrigerado es capaz de mantenerse hasta por 48 horas de almacenamiento; sin embargo, para poder obtener ventajas en la inseminación artificial, es necesario un periodo prolongado de almacenamiento. Esto se logra mediante la criopreservación del esperma ya que así se detiene el proceso metabólico de los espermatozoides y permite un almacenamiento indefinido sin que exista una pérdida de la fertilidad (34). La criopreservación 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 su conservación por un largo tiempo (35). En la criopreservación 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.

6.8.1. Criopreservación del semen equino.

La reproducción es un proceso fundamental en el mejoramiento genético de los equinos ya que permite el uso de los mejores caballos reproductores; por lo que la criopreservación 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.

La criopreservación 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 de 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 de semen es menos costoso que transportar una yegua o un semental, 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 lapsos de tiempos muy largos. El desarrollo de protocolos confiables de criopreservación permite el intercambio de semen entre diferentes subpoblaciones que son geográficamente distantes lo que ayuda a diversificar la variabilidad genética de cualquier tipo de semental. Además, existen varias ventajas cuando se trabaja con espermatozoides en laboratorio. Por ejemplo, se puede coleccionar material seminal y realizar evaluaciones microscópicas; una simple observación de la motilidad de espermatozoides in vitro provee una prueba bastante sensible para evaluar la actividad funcional de las células espermáticas. Asimismo, en varias muestras criopreservadas se puede evaluar el daño causado por la congelación y descongelación en diversas condiciones, para así poder determinar futuras congelaciones de material seminal de un caballo y mejorar los protocolos de congelación.

El éxito de la criopreservación celular se ha logrado gracias a la utilización de sustancias crioprotectoras que reducen la formación de cristales de hielo intracelular durante la congelación.

Además, estas sustancias inhiben la actividad de varias enzimas disminuyendo o eliminando la actividad de radicales libres responsables de lisis celular, antes, durante y después de la congelación y descongelación del material seminal. Sin embargo, los crioprotectores pueden producir dos tipos de alteraciones en las células; una funcional, caracterizada por la inactivación proteica y enzimática; y otra estructural, relacionada con el estrés osmótico ocasionado por los cambios en volumen experimentados por la célula espermática. Algunas alteraciones son: la cristalización de los lípidos, separación de lípidos de la membrana, reordenamiento de los componentes de la membrana y la agregación de proteínas.

La congelación y descongelación son condiciones de daño irreversible y son eventos inevitables con las técnicas actuales. No obstante, las células que logran sobrevivir muestran algún grado

de daño, lo que disminuye su esperanza de vida en el tracto femenino. Además, factores como la amplia variabilidad en la calidad del semen y la falta de protocolos estandarizados para manejar yeguas con semen congelado-descongelado, hacen de la criopreservación una tarea ardua.

El principio básico y fundamental de la criopreservación es la eliminación del agua del espacio intra celular. Es así como la microbiología ha demostrado que los daños y lesiones que se producen en los tejidos durante la crioconservación y los procesos de calentamiento se deben principalmente a tres factores principales los cuales son:

6.8.2. Choque térmico.

El choque térmico se refiere que se considera como el factor principal que causa injurias a la célula. El daño que sufren los espermatozoides se relaciona al cambio brusco de temperatura. Demostrándose que el cambio en la temperatura entre los 20 a 5°C conlleva la letalidad de la muestra como consecuencia de la velocidad y tiempo de enfriamiento, el intervalo de temperatura y el rango de temperatura que se lleva a cabo. (35)

6.8.3. Estrés por la crio preservación.

En la crio-preservación del semen equinos, la célula espermática sufre diferentes procesos de cambio que producen estrés, que podrían conllevar a un desequilibrio osmótico, cambios en la membrana plasmática, daños en la estructura lipídica, deterioro en la membrana mitocondrial y disminución de la respuesta celular a los cambios de osmolaridad. (36)

6.8.4. Formación de cristales.

Los descensos de temperatura de -5°C a -10°C, podrían inducir la formación de cristales de hielo en el espacio intra y extracelulares. Ello puede generar cambios en la osmolaridad por la migración del agua al medio extracelular, llevando a una deshidratación y concentración de solutos en la célula. (36) Sin embargo, los resultados pueden ser variantes en función a la curva de congelamiento, es decir al aumentar el ritmo de enfriamiento, el agua intracelular no alcanza a salir y lleva a la formación de cristales, son de menor tamaño a mayor velocidad de congelación (10-20°C/ min). (37)

Estos cristales tienden a reagruparse en el proceso de descongelación siendo perjudiciales para las células, de manera que el proceso de descongelación debe ser rápido. (37)

6.9.DILUYENTE PARA CONGELACIÓN.

El diluyente para congelación generalmente se compone de yema de huevo, detergente aniónico hidrosoluble y humectante para solubilizar las proteínas incluyendo las activas de la yema de huevo, sustancia tampón, electrolitos, antibióticos y glicerol. (38) La cantidad de diluyente que se añade al botón espermático, post centrifugación, depende de la concentración y calidad espermática.

Un medio diluyente exitoso en los programas de congelación de semen, se encuentra compuesto por proporciones estandarizadas de agua, iones esenciales, tampones, 11 macromoléculas, hidratos de carbono, antibióticos y crioprotectores. Favoreciendo la supervivencia y resistencia espermática, al reducir el número de poros de la membrana, las funciones dependientes de ATP, la agregación proteica y la formación de bloques lipídicos. (39)

6.9.1. MEDIOS DILUYENTES.

Los medios diluyentes son componentes que mitigan los efectos negativos que le producen al semen en lo congelado y favorecer la viabilidad fisiológica de las células espermáticas y en los mecanismos básicos para la criopreservación. Estos diluyentes contienen nutrientes, tampones, antibióticos y un agente crioprotector celular. (40)

Los medios diluyentes tienen como funciones:

- 1) Mantener la viabilidad prolongando el tiempo de vida de los espermatozoides.
- 2) Mantener la actividad metabólica y de nutrición espermática.
- 3) Ayuda en la regulación o al amortiguar el pH.
- 4) Protector sobre el choque térmico al material seminal.
- 5) Ayuda aumentar la motilidad espermática.
- 6) Ayuda a tener un efecto antibiótico para evitar la transmisión de patógenos.
- 7) Incrementar el volumen de la dosis para las inseminaciones.
- 8) Mantener una presión osmótica compatible (300 a 400 mOsm).
- 9) Neutralizar productos tóxicos producidos.
- 10) Estabilizar los sistemas enzimáticos y la membrana celular. (41)

6.9.1.1. Diluyente Botucrio®.

El Botucrio® es un medio diluyente para congelación de semen equino, el cual conserva la viabilidad, motilidad e integridad de los espermatozoides, además de que mantiene una adecuada velocidad post-descongelación de semen que combina glicerol metilformamida como crioprotector aumentando la motilidad, debido a ello la tasa de fecundación es mayor en comparación de semen procesado con otros diluyentes y 20 aminoácidos diferentes en el diluyente base. (42)

La evaluación in vitro de semen congelado en Botucrio®, sugiere que los parámetros de la motilidad se incrementan en comparación con semen descongelado procesado en los diluyentes que contienen glicerol como único crioprotector. (42)

Por causa de su bajo peso molecular las amidas pueden atravesar la membrana plasmática y acrosomal de los espermatozoides, permitiendo la integridad de la membrana y reduce el daño osmótico. (43)

Tabla 1 Composición del diluyente Botucrio®.

• <i>Aminoácidos</i>	20
• <i>Agua no pirogénica</i>	-
• <i>Amidas</i>	dimetil- formamida
• <i>Carbohidratos</i>	Glucosa
• <i>Excipientes</i>	-
• <i>Gentamicina</i>	0.5 g/L
• <i>Glicerol</i>	1%
• <i>Metilformamida</i>	4%
• <i>Penicilina</i>	1.0 g/L
• <i>Yema de huevo</i>	5%

Las altas tasas de gestación obtenidas con BotuCrio® se traducen en tasas más altas de gestación por ciclo y menos inseminaciones, por ende, se reduce el costo de reproducción por yegua. (46)

6.9.1.2. 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. (47)

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. (48)

- INRA 96 mejora notablemente la conservación y mantiene el potencial de fertilidad hasta 48 horas.
- Esterilizado y listo para su uso, está formulado a base de proteínas micelares purificadas de la leche cuyo poder protector sobre los espermatozoides está avalado.
- Contiene antibióticos (penicilina y gentamicina) y un fungicida (amfotericina B). (49)

La presentación del INRA 96 viene en frasco de 200 ml. Unidad de 200 ml. en envase PET (material biocompatible e irrompible), la composición del, medio es a base de leche existentes en el mercado contienen la totalidad de las proteínas solubles y micelarias. La originalidad del medio INRA 96 es la de contener únicamente la fracción pura de las proteínas micelarias de la leche altamente protectoras de los espermatozoides. El medio INRA 96 contiene antibióticos (Penicilina y Gentamicina) y un fungicida (Amfotericina B).

6.9.1.2.1. Indicaciones de uso.

El medio INRA 96 permite la conservación y por tanto el transporte de semen equino, sea a + 4°C (condiciones anaeróbicas), sea a + 15 °C (condiciones aeróbicas).

6.9.1.2.2. Precauciones de empleo.

Proceder a la dilución del semen para obtener una concentración final de 20x10⁶ espermatozoides /ml. el volumen de la dosis es de 10 ml. El operador si lo desea puede utilizar cantidades

superiores a 200x10⁶ espermatozoides totales por dosis. Advertencia: no utilizar jeringas con pistón de caucho butyl negro por problemas de citotoxicidad frente a los espermatozoides.

6.9.1.2.3. Conservación antes de usar

El medio INRA 96 puede ser transportado a temperatura ambiente inferior a + 34°C. Para una conservación prolongada, es necesario conservarlo entre +2°C y +8°C.

6.9.1.2.4. Caducidad.

El diluyente INRA96 tiene 1 año a partir de la fecha de fabricación (nº lote y fecha de caducidad indicadas en la etiqueta).

7. VALIDACIÓN DE LAS PREGUNTAS CIENTÍFICAS O HIPÓTESIS.

- **Ha:** La crio preservación con dos diluyentes (BotuCrio®/INRA96) es eficiente para mantener células espermáticas equinas viables pos congelación.
- **Ho:** La crio preservación con dos diluyentes (BotuCrio®/INRA96) no es eficiente para mantener células espermáticas equinas viables pos congelación.

8. METODOLOGÍAS Y DISEÑO EXPERIMENTAL.

8.1. LOCALIZACIÓN Y DURACIÓN DEL PROYECTO.

La investigación se llevó a cabo en el sector Salache Bajo, en las instalaciones de la Universidad Técnica de Cotopaxi, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales dedicada a la investigación del proyecto de producción en equinos, esta investigación fue realizada 60 días.

Este se encuentra ubicado en el Cantón Latacunga, parroquia Eloy Alfaro, Salache Bajo; tiene una altitud de 2757.591 msnm y sus coordenadas geográficas son: latitud 00 59" 47.68" N, longitud 78 37" 19.16" E, con una temperatura que oscila entre 13°C y 15°C.

8.2. UNIDADES EXPERIMENTALES.

Para el desarrollo de la presente investigación, se utilizó colectas de semen fresco de equinos de origen árabe de 2 donantes y criollo de 2 donantes que oscilan entre 4 y 5 años de edad, dos de ellos propiedad de la Universidad Técnica de Cotopaxi perteneciente al cantón de Latacunga, sector Salache Bajo, los otros dos donantes de la provincia de Cotopaxi, las cuales se obtuvieron las cantidades de semen promedio de 20 a 25ml de cada uno.

8.3. DISEÑO EXPERIMENTAL.

En el diseño experimental de la 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.CAMPO.

9.1.1. 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 ala colecta el personal usó: botas con punta de acero y overol para garantizar su integridad y seguridad. Además, los caballos fueron manipulados por personal que conozcan el comportamiento de cada animal, para tranquilizarlos y poder realizar las colectas de manera eficiente.

9.1.2. Preparación del espacio físico.

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

9.1.3. Preparación de la yegua

Para los procesos de colecta se seleccionó una yegua disponible en los distintos sitios de colecta. Una vez tranquilizada la yegua, 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. Después, se vendó la cola de la yegua.

9.1.4. Preparación del semental.

A los sementales se los trasladó desde su área de pastoreo hasta un establo, una vez ahí se le dio cuerda para que los sementales estén dóciles para la extracción y recolección del semen, con la finalidad de que la muestra no se vea alterada en su calidad principalmente en relación a su concentración y volumen

9.1.5. Estimulo del semental

El semental fue llevado cerca de la yegua ya tranquilizada con el objetivo de que sea estimulado con mayor rapidez. Una vez estimulado, y cuando el pene estuvo totalmente protruido se lo alejo de la yegua para seguir con su preparación.

9.1.6. Limpieza del pene del semental.

Una vez que se tenga el pene del caballo totalmente protruido se procedió a lavar el pene con agua tibia, esto se lo realiza de la manera más natural posible para que la colecta de semen no sea alterada. Esto permitió eliminar el esmegma u otros detritus presentes en la superficie del pene.

9.1.7. Armado de la vagina artificial.

Para realizar las colectas de material seminal, se utilizó una vagina artificial tipo Hannover. Ya que la misma vagina artificial fue utilizada para todos los sementales, durante su armado se procedió a colocar y retirar (antes y después de cada colecta) una funda vaginal. La funda vaginal se sujetó a un extremo de la vagina con cinta adhesiva. En el extremo distal de la vagina artificial, se colocó un frasco de colecta (biberón estéril), el cual fue cubierto con papel aluminio y cinta adhesiva para proteger el semen de la luz.

Luego, se procedió a llenar la vagina artificial con agua a una temperatura inicial entre los 48 °C y 50° C, la presión de la vagina se la debe ajustar a la presión que permita la introducción del brazo y lubricando con el gel no espermicida la entrada de la vagina. 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.

9.1.8. Colecta del material seminal.

A cada uno de los sementales utilizados en el proyecto se les realizó dos colectas en días distintos con pausa de 21 días, los caballos estaban en total descanso, permanecieron en pastoreo hasta cumplir con las colectas propuestas en el proyecto, sin cubrir a las yeguas y sin colectas, por lo cual se los utilizaron en ese periodo de tiempo específicamente para la extracción de semen para utilizar en la comparación de la efectividad de dos diluyentes comerciales para la criopreservación de células espermáticas (BotuCrio® e INRA96).

Después de haberlo preparado y estimulado al semental, se volvió a acercar el semental a la yegua para que este se estimule, se le permitió reconocer a la yegua y cuando el pene estuvo totalmente erecto y protruido, se dejó que monte a la yegua. El pene fue desviado hacia el interior de la vagina artificial para que el caballo pudiera eyacular con facilidad.

Se sostuvo la vagina artificial en una posición ligeramente elevada para simular el ángulo del tracto reproductivo de la yegua. Inmediatamente después de la eyaculación, se vació aproximadamente dos tercios de agua de la vagina artificial, para disminuir la presión y facilitar

el drenaje del semen. Cuando, el pene del caballo empezó a perder tono y empezó a retroceder, se bajó lentamente la vagina artificial hasta que fue colocada en una posición casi vertical al final del proceso. El semen colectado cayó en tubos graduados (biberones estériles). Finalmente, se alejó al caballo de la yegua.

9.1.9. Evaluación Macroscópica del material seminal.

Se registró datos de la calidad de cada eyaculado como: color, olor, consistencia, volumen (mL) y pH.

9.1.10. Dilución del semen fresco para transporte.

Se calentó leche descremada (UHT) a 37 °C; la muestra de semen colectada fue vertida en un tubo estéril, previamente calentado, y se diluyó en proporción 1:1 con la leche, esta se añadió lentamente por un lado del envase de tal manera que se añadió ¼ de diluyente a la vez y se mezcló suavemente. Se mantuvo la muestra en baño María, a 37 °C, hasta que su temperatura descendiera gradualmente hasta temperatura ambiente. Luego se colocó la muestra en un cooler a 5°C para su transporte hasta el laboratorio. La leche fue usada como diluyente para transportar el semen desde el lugar de colección hasta el laboratorio

9.1.11. Empacado de la muestra seminal y transporte.

Para evitar que existan filtraciones se colocó cinta de teflón en la parte superior del tubo que contenía la muestra, y se lo cerró firmemente. Con un marcador permanente, se etiquetó el tubo con el nombre del caballo y número de muestra.

9.2.LABORATORIO.

9.2.1. 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%

9.2.2. 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.

9.2.3. Determinación de vivos/muertos- tinción eosina- nigrosina.

En un portaobjetos, previamente calentado a 37°C o 38°C, se colocó una gota de 20-50µL de semen con una gota del mismo volumen 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. Se evaluó 50 espermatozoides a 100X. Los espermatozoides blancos, sin teñir, se clasifican como “vivos”, y los que poseen alguna coloración rosa o roja se clasifican como “muertos”

9.2.4. Evaluación de la morfología espermática

Se evaluó la morfología o estructura del espermatozoide con un microscopio de luz a 100x. Se evaluó 50 espermatozoides para evidenciar defectos morfológicos, empleando el mismo método que para la evaluación de vivos/muertos. Se anotó el porcentaje de anomalías en la cabeza, parte, media y cola de los espermatozoides.

9.2.5. PREVIO A LA CRIOPRESERVACIÓN.

9.2.5.1.Preparación del diluyente BotuCrio®

El diluyente BotuCrio®, se mantuvo almacenado a -20°C, se lo descongeló únicamente para su uso, éste permaneció durante 20 minutos a 5°C previo a su uso.

9.2.5.2.Preparación del diluyente INRA96.

El diluyente INRA96, se mantuvo en cadena de frío de 3°C a 8°C, se lo sacó al ambiente únicamente para su uso, se lo puso a 35°C en baño maría previo a su uso.

9.2.5.3.Dilución de las muestras en medio crioprotector.

Las muestras seminales almacenadas se las colocó en tubos graduados de 10mL para centrifugar. Las muestras se centrifugaron a 2000 rpm por 10 minutos. Se retiró el sobrenadante. El sedimento (*pellet*) fue resuspendido con el diluyente correspondiente (BotuCrio® / INRA96), y dependiendo de la concentración espermática inicial. Una vez se determinó la relación de dilución, se añadió lentamente por un lado del envase, la cantidad de diluyente apropiada al semen. Se añadió ¼ de diluyente a la vez, y se mezcló suavemente con ayuda una jeringa estéril.

9.2.5.4.Criopreservación.

Se empezó el llenado de las pajuelas de 0.5mL con ayuda de jeringuillas, dejando un espacio de aire para poder sellarlas con la selladora. Las pajuelas llenas y selladas fueron sometidas a

la estabilizadora por el tiempo de 2 horas hasta ser estabilizadas paulatinamente de 4° hasta que tome la temperatura del nitrógeno -196°C, se las transportaron hasta que vapores de nitrógeno líquido en la congeladora que tenía como base 9cm de nitrógeno líquido donde se colocaban las pajuelas 12 minutos, colocadas de manera horizontal, a 2 cm de la superficie del nitrógeno de este en un recipiente apropiado para este proceso. Una vez transcurrido este tiempo, se sumergieron inmediatamente en el nitrógeno líquido y finalmente fueron almacenadas en un tanque de almacenamiento.

9.2.6. CONGELACIÓN DE MUESTRAS SEMINALES.

- Filtrado del semen: Separación del gel seminal del semen.
- Dilución uno a uno del semen puro más diluyente de transporte (BotuCrio® e INRA96).
- BotuCrio®: Colocamos en la centrifugadora los tubos falcón con semen a 2000 rpm por 10 minutos.
- INRA96: Colocamos en la centrifugadora los tubos falcón con semen a 2000 rpm por 10 minutos.
- 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.
- Con los mililitros de pellet obtenidos procedemos a realizar la combinación con el diluyente criocervante (temperatura baño maría) el número de pajuelas y la cantidad de espermatozoides varía de acuerdo a los resultados obtenidos en la formula.
- Procedemos a empajillar (pajillas 0.5).
- 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 °C x 15mts.
 - Cuarto descenso de temperatura: sumergimos las pajuelas al nitrógeno líquido a -196 °C.
 - Evaluación de pajuelas pos descongelación.

10. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

10.1 Características macroscópicas de los eyaculados de los sementales, previos a la crío preservación.

Tabla 2 Características macroscópicas de los eyaculados de los sementales árabes y criollos, previas a la crío preservación.

Código	Nombre	Color	Volumen (ml)	pH	Olor	Aspecto
Caballos						
1	Azim	Blanco opaco	27	7.2	Suigeneris	Líquida/cremoso
2	Moro	Blanco opaco	35	7.4	Suigeneris	Altamente viscoso
3	Cagancho	Blanco grisáceo	22	7.6	Característico	Acuoso/ Lechoso
4	Pegazo	Blanco grisáceo	20	7	Característico	Lechoso
Promedio			26	7,3		

Los datos del presente estudio en la Tabla 2 muestran que los sementales presentaron un volumen promedio de 26ml de eyaculado y un pH estimado de 7,3. El volumen seminal varía entre 20-60 ml lo que depende del reproductor y el número de colectas que se realicen por semana. (14)

En lo que se refiere al olor se tiene 2 caballos que presentan un olor suigeneris, mientras que los eyaculados de los caballos “Cagancho” y “Pegazo” presentaron un olor característico. El eyaculado del semental “Azim” y “Moro” tuvieron un aspecto líquido/ cremoso y altamente viscoso. La consistencia de los eyaculados fue líquida, cremosa y lechoso, excepto en el caballo Moro el cual mostro material seminal altamente viscoso. (58)

Por otro lado, estudios de Vélez (58), mencionan que los eyaculados de bajo volumen pueden estar relacionados al régimen de entrenamiento que conlleve el caballo como para competencias deportivas. Adicionalmente, esto puede deberse a que la calidad del semen de caballo depende, no solamente del animal, sino de otros factores como: edad del animal, el intervalo entre colectas, y la estación.

Un notable factor a considerar es la edad al instante de realizar el examen andrológico de los reproductores según Cox Leixelard (20); ya que, ciertas características del material seminal van cambiando. Como describe en su estudio Dowsett & Knott (52) con la edad y la raza, el volumen de un eyaculado total en un macho que se encuentra entre 1 a 2 años es distinto al de un macho de 10 diez años, siendo para este último mejores parámetros en volumen y concentración espermática.

Ochoa, Bruno, & Fumuso (28), realizó un estudio en 8 reproductores entre 4 a 24 años de edad, resultando que en los equinos con mayor longevidad en el examen andrológico se puede observar en su gran mayoría una atrofia en los túbulos seminíferos y en algunos fibrosis del tejido intersticial; Jhonson & Neaves (35), explica que en los túbulos seminíferos es el lugar donde se produce la espermatogénesis y que cualquier cambio o afección en dichos túbulos afecta directamente a la fertilidad del reproductor.

Buzon Cuevas (34) detalla que las características de la calidad espermática macroscópica de un eyaculado son normales y las variedades tanto en apariencia como en color por diferentes factores, ejemplo, la alimentación; y en volumen. Según el estudio de Palma (37) el volumen de la eyaculación varía en función de la raza del reproductor en un 2,13 ml en promedio, explicando que no se tiene información certera sobre el volumen libre de gel, pero si sobre el eyaculado que varía en un parámetro de 30 a 50 ml.

10.2 Características microscópicas de los eyaculados de los sementales, previos a la crio preservación.

Tabla 3 Características microscópicas de las eyaculadas previas a la criopreservación.

Código	Nombre del Caballo	Motilidad %	Concentración (Espermatozoides x10 ⁶ /mL)	Espermatozoides Vivos (%)	Espermatozoides Muertos (%)	Alteraciones Morfológicas (%)
1	Azim	72	340	67	32	5
2	Moro	62	265	52	47	9
3	Cagancho	67	190	62	37	11
4	Pegazo	57	115	57	42	15
Promedio		64,5	227,5	59,5	39,5	10

Los eyaculados de los cuatro caballos mostraron una motilidad que fluctuó entre 64.5%. Las concentraciones espermáticas de las muestras seminales fueron de 227,5x10⁶ /mL. El porcentaje de células espermáticas vivas de las muestras seminales de un 59,5% y el restante

fueron espermatozoides muertos. Por otro lado, se observó un porcentaje de alteraciones morfológicas que son de un 10% (Tabla 3).

Alba Cristoper (42) definió la calidad espermática microscópica como la capacidad de fecundación del semen en cualquier especie animal y es un elemento dependiente para el éxito mnque se obtenga para la inseminación artificial y por consecuencia para la predicción en la crioconservación del material seminal, en concordancia con el estudio de Corrales Mafla (60) donde se explica que la calidad del material seminal es evaluada en base a un espermograma clásico, el cual pese a sus resultados siempre son subjetivos a la experticia del evaluador, los animales dan referentes cuantitativos de tal manera que se encuentran en dar servicio optimo porque sus características se encuentran dentro de los rangos dichos.

10.3 Características microscópicas post congelación con el medio- BotuCrio®.

Tabla 4 Características microscópicas pos descongelación con diluyente BotuCrio®.

Código	Nombre Caballo	del Motilidad %	Concentración (Espermatozoides x10 ⁶ /mL)	Espermatozoides Vivos (%)	Espermatozoides Muertos (%)	Alteraciones Morfológicas (%)
1	Azim	57	40	47	53	36
2	Moro	57	40	32	68	45
3	Cagancho	55	40	25	75	41
4	Pegazo	50	40	23	77	58
Promedio		54,75	40	31,75	68,25	45

Respecto a las características microscópicas después de la criopreservación con el medio BotuCrio® se obtuvieron los siguientes resultados: el promedio de los eyaculados de los cuatro caballos mostró una motilidad de 54,75%. En cuanto a la concentración espermática, todos los eyaculados mostraron un valor de 40x10⁶ /mL. Después de la criopreservación con este diluyente el porcentaje de espermatozoides vivos en las muestras seminales de 31,75% y el porcentaje restante corresponde a los espermatozoides muertos, el porcentaje de alteraciones morfológicas del semen oscila entre el 45% (Tabla 4.)

10.4 Características microscópicas de los eyaculados luego de la criopreservación con el medio- INRA96

Tabla 5 Características microscópicas pos descongelación con diluyente INRA96

Código	Nombre del Caballo	Motilidad %	Concentración (Espermatozoides x10 ⁶ /mL)	Espermatozoides Vivos (%)	Espermatozoides Muertos (%)	Alteraciones Morfológicas (%)
1	Azim	47	40	38	62	36
2	Moro	47	40	30	70	47
3	Cagancho	65	40	18	82	41
4	Pegazo	65	40	15	85	38
Promedio		56	40	25,25	74,75	40,5

Después de la crioconservación con el medio INRA96 las muestras seminales evaluadas de los cuatro caballos mostraron como promedios las siguientes características microscópicas: la motilidad espermática estuvo entre 56%. Con respecto a la concentración, ésta fue de 40x10⁶ /mL para todas las muestras seminales. Por otro lado, el porcentaje de espermatozoides vivos luego de la criopreservación con el mencionado medio estuvo entre el 25,25%. El porcentaje de espermatozoides muertos es una relación entre el 74,75% corresponde a los espermatozoides muertos. Finalmente, las alteraciones morfológicas para las muestras seminales estuvieron entre 40,5%. (Tabla 5.)

10.5 Valoración de los crio preservante Botucrio®/ INRA96 post descongelación

Tabla 6 Análisis estadísticos de caballos árabe con crio preservante Botucrio®/ INRA96 post congelación.

CARACTERISTICAS	BOTUCRIO®	INRA 96	P. VALUE
MICROSCOPICA			
Motilidad total	54,75	56	0,826
Concentración espermática.	40	40	1
Espermatozoides Vivos	31,75	25,25	0,426
Espermatozoides Muertos	68,25	74,75	0,426
Alteraciones Morfológicas	45	40,5	0,4270

Estadísticamente no hay diferencias significativas, pero existe una diferencia numérica de sus porcentajes entre los 2 tratamientos.

El uso de los diluyentes, de buena calidad y con renombre en el mercado (BotuCrio®) apporto con la obtención de mejores resultados numéricos por su composición rica en aminoácidos en la estabilización y mejoramiento del semen contenido. El estudio en valoración de crio

preservantes equinos propuesto por Almeida (50) denoto superioridad de Botucrio® en lo que conlleva a porcentajes numéricos, a lo cual se concuerda con su estudio.

11. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

11.1. Conclusiones.

- En este estudio los mejores resultados de la criopreservación de semen de caballos tanto en Árabe y Criollo se dio usando el diluyente BotuCrio® en caballos de entre 4 y 5 años de edad.
- Los parámetros macroscópicos fueron acorde a una buena calidad seminal que esta ayuda para que estos ayuden a una buena criopreservacion.
- La alta variabilidad entre los reproductores, inclusive entre los eyaculados de un mismo reproductor determina la concentración espermática, volumen de eyaculado, motilidad total espermática, porcentaje de espermatozoides vivos y alteraciones en los espermatozoides.
- La capacidad de resistencia de las células espermáticas de cada animal y la composición de los dos diluyentes utilizados determinan las diferencias en la motilidad total espermática, porcentaje de células espermáticas vivas y anomalías en el espermatozoide después del proceso de criopreservación.

11.2. Recomendaciones.

- No existe un diluyente que sea ideal para ser utilizado en todos los sementales, ni que brinde la misma efectividad final por lo que lo ideal sería optimizar los diluyentes ya existentes, la velocidad de enfriamiento y descongelación para cada caballo.
- En el caso del diluyente INRA96, se recomienda evaluar el uso de distintos volúmenes de la misma, que el recomendado por la casa comercial, para así poder evaluar si de esta manera se obtienen mejores tasas de supervivencia de las células espermáticas luego de la criopreservación.
- Se recomienda continuar con más estudios en el campo de la criopreservación de células espermáticas de caballos árabes y criollos, ya que este sería un primer paso para la creación de un banco de germoplasma de estos animales en el Ecuador.
- Se recomienda el uso del diluyente BotuCrio® para la criopreservación de células espermáticas de caballos árabes y criollos.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. S. S. Pérez-Garnelo MOCBCTMDEMNPATPaJ. jstor. [Online].; 2006 [cited 2023 02 04]. Available from: <https://www.jstor.org/stable/20096570>.
2. ACUÑA JPP. cybertesis. [Online].; 2011 [cited 2023 02 04]. Available from: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2011/fvp896c/doc/fvp896c.pdf>.
3. Villafuerte JP. repositorio.utc. [Online].; 2018 [cited 2023 02 05]. Available from: <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/5222/6/PC-000297.pdf>.
4. JEFFERSON CC. Users/alenm. [Online].; 2015 [cited 2023 02 07]. Available from: <file:///C:/Users/alenm/Downloads/admin,+ASPECTOS+GENERALES+DEL+PROCESOS+DE+CONSERVACION+DE+SEMEN+EQUINO+UNA+REVISION+DESDE+LA+CONGELACION+ESPERM%C3%81TICA-ilovepdf-comp.pdf>.
5. Garcia A. slideshare. [Online].; 2013 [cited 2023 02 07]. Available from: <https://es.slideshare.net/AlejandrinaG/recoleccion-y-evaluacion-de-semen-equino>.
6. LUNA EIR. repositorioinstitucional.uabc.mx. [Online].; 2019 [cited 2023 02 08]. Available from: <https://repositorioinstitucional.uabc.mx/server/api/core/bitstreams/543833ae-2ba54b45-8e1e-a3aab7e6ab6d/content>.
7. Humaco. humeco.net. [Online].; 2022 [cited 2023 02 10]. Available from: <https://www.humeco.net/noticias/material-para-semen-equino>.
8. González CC. helvia. [Online].; 2017 [cited 2023 02 10]. Available from: https://helvia.uco.es/bitstream/handle/10396/18596/tfm_cesar_consuegra_gonzalez.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
9. Guillen JDO, Palacios DAA. dspace.ucuenca. [Online].; 2022 [cited 2023 02 12]. Available from: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/39449/1/Trabajo%20de%20Titulacion.pdf>.
10. S. S. Pérez-Garnelo MOCBCTMDEMNPATPaJ. jstor. [Online].; 2006 [cited 2023 02 12]. Available from: <https://www.jstor.org/stable/20096570>.
11. Pickard A. researchgate. [Online].; 2001 [cited 2023 02 12]. Available from: https://www.researchgate.net/publication/11874410_Use_of_computerassisted_sperm_

motility_assessment_and_multivariate_pattern_analysis_to_characteri
ze_ejaculate_quality_in_Mohor_gazelles_Gazella_dama_mhorr_Effects_of_body_wei
ght_electroejaculation_te.

12. Alipour H, Sharbatoghli M, Yazdi PE, Shahverdi A, Daneshzadeh MT, Afshani M. [Online].; 2013 [cited 2023 02 15. Available from: https://vbn.aau.dk/ws/portalfiles/portal/188209181/Alipour_JEVS.pdf.
13. Parejo S, Artiles R. Users. [Online].; 1992 [cited 2023 02 18. Available from: <file:///C:/Users/alenm/Downloads/Dialnet-ElCaballosEspanolDeEstirpeCartujanaEnAmerica-278717.pdf>.
14. Jerry C. Haigh ASDaAW. jstor. [Online].; 1993 [cited 2023 02 18. Available from: <https://www.jstor.org/stable/20095306>.
15. Rahul Rathi BCMMBBMG. bioone. [Online].; 2001 [cited 2023 02 18. Available from: <https://bioone.org/journals/biology-of-reproduction/volume-65/issue-2/biolreprod65.2.462/Evaluation-of-In-Vitro-Capacitation-of-StallionSpermatozoa1/10.1095/biolreprod65.2.462.short>.
16. Jamie Anderson MP. equine-reproduction. [Online].; 2012 [cited 2023 02 18. Available from: <https://equine-reproduction.co.uk/articles/spermiostasis>.
17. Knightbridge R. books.google. [Online].; 2002 [cited 2023 02 19. Available from: <https://books.google.com/ec/books?id=rcNw1sUPmdsC&pg=PA370&dq=horse+se&hl=es#v=onepage&q&f=false>.
18. Zootec. RB. scielo. [Online].; 2018 [cited 2023 02 19. Available from: <https://www.scielo.br/j/rbz/a/n3Qv5BpNbDYGS3KH67JNc6d/?format=pdf&lang=pt>
19. Q. DDP. redalyc. [Online].; 2017 [cited 2023 03 05. Available from: <https://www.redalyc.org/pdf/3718/371854393017.pdf>.
20. Bailey JL JByNC. pubmed.ncbi. [Online].; 2000 [cited 2023 03 05. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10670514/>.
21. Canisso IF FAJOGRMDECJDyAL. redalyc. [Online].; 2008 [cited 2023 03 10. Available from: <https://www.redalyc.org/pdf/3718/371838849002.pdf>.

22. Almeida Sosa MR. dspace.esoch. [Online].; 2012 [cited 2023 03 19. Available from: <http://dspace.esoch.edu.ec/handle/123456789/1285>.
23. González González J. invitrosperm.blogspot. [Online].; 2013 [cited 2023 03 20. Available from: <http://invitrosperm.blogspot.com/2013/01/analisis-seminal-equino-ybovino.html>.
24. Juan E. Sambache Tayupanta JFPV. investigacion. [Online].; 2022 [cited 2023 03 20. Available from: <http://investigacion.utc.edu.ec/revistasutc/index.php/RENYPYS/article/view/402>.
25. VICENTÉ RA. repositorio.uaaan. [Online].; 2006 [cited 2023 03 22. Available from: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/5946/T15362%20VICENTE%20CID%20DE%20LEON,%20RODOLFO%20ANTONIO%20%20MONOG.pdf?sequence=1#:~:text=El%20m%C3%A9todo%20preferido%20de%20recolecci%C3%B3n,el%20momento%20de%20la%20recolecci%C3%B3n>.
26. Flórez CDR. agronegocios. [Online].; 2018 [cited 2023 04 08. Available from: <https://www.agronegocios.co/aprenda/conozca-cuales-son-las-caracteristicas-que-deben-tener-un-buen-amental-equino-2769409>.
27. Flórez. CR. agromundo. [Online].; 2018 [cited 2023 04 12. Available from: agromundo.co/blog/caracteristicas-buen-amental-equino/.
28. Ayuda TC. eae-publishing. [Online].; 2012 [cited 2023 04 12. Available from: <https://www.eae-publishing.com/catalog/details/store/es/book/978-3-659-053375/extracci%C3%B3n-de-semen-en-caballos-mediante-el-colector-cervical>.
29. Canelón JL. redalyc. [Online].; 2005 [cited 2023 04 12. Available from: <https://www.redalyc.org/pdf/495/49520716.pdf>.
30. Salamanca Carreño A. repository.ucc. [Online].; 2016 [cited 2023 04 15. Available from: <http://repository.ucc.edu.co/>.
31. Salamanca C.A. PCPM. cloudfront. [Online].; 2016 [cited 2023 04 15. Available from: https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/51083424/Articulo_Indices_zoometricos_caballosAICA2016_Trabajo004-libre.pdf?1482888731=&response-contentdisposition=inline%3B+filename%3DUSO_DE_INDICES_ZOOMETRICOS_EN_LA_DIFEREN.pdf&Expires=1692569329&Signature=E3y4s.

32. García Neder A. redalyc. [Online].; 2009 [cited 2023 04 20. Available from: <https://www.redalyc.org/pdf/636/63617144003.pdf>.
33. Salamanca CA, Parés-Casanova PM, Crosby RAYMN. redalyc. [Online].; 2017 [cited 2023 04 20. Available from: <https://www.redalyc.org/pdf/495/49551221015.pdf>.
34. Vidal DFS. evistasojs.ucaldas. [Online].; 2012 [cited 2023 04 20. Available from: <https://revistasojs.ucaldas.edu.co/index.php/vetzootec/article/view/4448>.
35. Fuentes FC,GC,SJL,HM,&V. revistas. [Online].; 1987 [cited 2023 05 10. Available from: <https://revistas.um.es/analesvet/article/view/22641>.
36. Delgado Pérez MM. idus.us. [Online].; 2007 [cited 2023 05 10. Available from: <https://idus.us.es/handle/11441/75482>.
37. Muñiz DCM. medievalistas. [Online].; 2008 [cited 2023 05 20. Available from: <https://medievalistas.es/wp-content/uploads/attachments/00189.pdf>.
38. A. SC. researchgate. [Online].; 2022 [cited 2023 05 20. Available from: researchgate.net/profile/Arcesio-Salamanca/publication/361705514_EVALUACION_ALOIDICA_DE_LA_CABEZA_UN_EJEMPLO_EN_EL_CABALLO_ARABE_PROFILE_ASSESSMENT_OF_THE_HEAD_AN_EXAMPLE_ON_ARABIAN_HORSE/links/62c080ac0bf6950edea53ac4/EVALUACION-ALOIDICA-DE-LA-CABEZA-UN-.
39. Neira JA. dialnet.unirioja. [Online].; 2007 [cited 2023 05 23. Available from: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4943765>.
40. Restrepo G. scielo. [Online].; 2013 [cited 2023 05 23. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S012342262013000200019&script=sci_arttext.
41. S. AU. scielo. [Online].; 2016 [cited 2023 05 23. Available from: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S160991172016000300011&script=sci_arttext.
42. Betancur GR. scielo. [Online].; 2016 [cited 2023 05 23. Available from: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S160991172016000200014.

43. Sonnenholzner Espinosa KA. dspace.udla. [Online].; 2020 [cited 2023 05 27. Available from: <https://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/12501>.
44. Arcia. SAL. ciencia.lasalle. [Online].; 2019 [cited 2023 05 27. Available from: https://ciencia.lasalle.edu.co/medicina_veterinaria/115/.
45. Caldevilla M. redalyc.org. [Online].; 2020 [cited 2023 05 27. Available from: <https://www.redalyc.org/journal/1791/179171136006/179171136006.pdf>.
46. ANASAGASTI IEL. cdigital.uv. [Online].; 2019 [cited 2023 05 29. Available from: <https://cdigital.uv.mx/bitstream/handle/1944/50886/LepeAnasagastiItziar.pdf?sequence=1>.
47. Stornelli MC. sedici.unlp. [Online].; 2005 [cited 2023 05 28. Available from: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/11180>.
48. Lascarro AKG. ciencia.lasalle. [Online].; 2029 [cited 2023 05 29. Available from: https://ciencia.lasalle.edu.co/medicina_veterinaria/208/.
49. Pérez Osorio J. ciencia.lasalle. [Online].; 2014 [cited 2023 05 29. Available from: https://ciencia.lasalle.edu.co/maest_ciencias_veterinarias/38/.
50. Almeida R. repositorio.uta. [Online].; 2018 [cited 2023 06 10. Available from: <http://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/27295>.
51. Dalmau CS. researchgate. [Online].; 208 [cited 2023 06 05. Available from: https://www.researchgate.net/profile/Consuelo-Serres/publication/272492707_METODOS_TRADICIONALES_Y_ALTERNATIVOS_DE_EXTRACCION_DE_SEMEN/links/54e64db40cf277664ff4f946/METODOS_TRADICIONALES-Y-ALTERNATIVOS-DE-EXTRACCION-DE-SEMEN.pdf.
52. Juan E. Sambache Tayupanta JFPV. investigacion.utc. [Online].; 2022 [cited 2023 06 05. Available from: <http://investigacion.utc.edu.ec/revistasutc/index.php/RENPyS/article/view/402>.
53. R. AS, O. ACPyMB. scielo. [Online].; 2017 [cited 2023 05 10. Available from: scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1609-91172006000100001&script=sci_arttext.
54. Jefferson CC, Liliana CJ. revista.jdc. [Online].; 2026 [cited 2023 06 18. Available from: <https://revista.jdc.edu.co/index.php/conexagro/article/view/54>.

55. Restrepo G. scielo. [Online].; 2013 [cited 2023 06 10. Available from:
http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S012342262013000200019&script=sci_arttext.
56. Rangel Núñez ED. repositorio.uan. [Online].; 2011 [cited 2023 06 11. Available from:
<http://repositorio.uan.edu.co/handle/123456789/7485>.
57. Q. DDP. scielo. [Online].; 2017 [cited 2023 06 11. Available
from: scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1609-91172017000400017&script=sci_arttext&tlng=en.
58. Rivera. JW. ciencia.lasalle. [Online].; 2019 [cited 2023 06 14. Available from:
https://ciencia.lasalle.edu.co/medicina_veterinaria/241/.
59. Vélez Henao V. repositorio.unal. [Online].; 2016 [cited 2023 06 14. Available from:
<https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/58842>.
60. Corrales Mafla E. repositorio.utp. [Online].; 2020 [cited 2023 06 16. Available from:
<https://repositorio.utp.edu.co/items/782f376c-809b-400b-85b1-348b4d99ad05>.

13.ANEXOS

ANEXOS 1. FOTOGRAFICOS

Gráfico 1 Armado de la vagina artificial



Se procedió con la introducción de la boya de neumático dentro del tubo de PVC, se dobló en los límites y se colocaron tiras de caucho para asegurar un extremo, posteriormente se introdujo la funda que sirvió como preservativo, se la lleno con agua a 40 grados centígrados, se selló por completo, se colocó el recolector, finalmente se lubricó la entrada de la vagina artificial con lubricante KY.

Gráfico 2 Preparación de caballos (yegua y caballo)



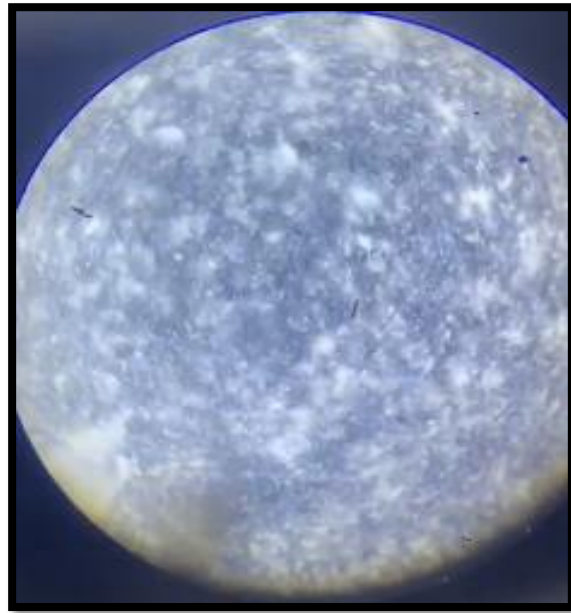
Se preparó a la yegua en celo y se le colocó medios de contención física, posteriormente al semental se le realizó una limpieza.

Gráfico 3 Montaje para la colecta de semen.



El semental se calentó junto a la yegua para liberar su líquido sexual, una vez desenvainado el pene se procedió a desviarlo y colocarlo dentro de la vagina artificial para la recolección del semen.

Gráfico 4 Análisis Seminal



Toma de muestra de semen para posteriormente realizar el proceso de análisis y valoración espermática.

SEMENTALES				
Nombre	Azim	Moro	Cagancho	Pegaso
Edad (años)	5	4	4	4
Raza	árabe	árabe	criollo	criollo
Color	Capuli	Moro	Alazán tostado	Bayo
Alimentación	Pasto	Pasto	Pasto	Pasto
Peso aproximado (Kg)	500	450	450	450
Ubicación	Salache bajo UTC	Salache bajo UTC	Cotopaxi	Cotopaxi
Lugar de mantenimiento (Potrero- Establo)	Potrero	Potrero	Potrero	Potrero
Actividad que realiza	Alta escuela	Caballo no amansado	Rejoneo	Caballo de exhibición
Montas naturales	6	2	5	6
Colectas con vagina Artificial	2	2	2	2

ANEXOS 2. INSTRUCTIVOS DE USO

BotuCrio®

Intended Use: summary and explanation

BotuCrio® is a freezing extender optimized for freezing of equine sperm. It is suitable for both fresh as well as for **EquiPure™** treated sperm.

Components

Egg yolk	Gentamidin (0.5 g/l)
Carbo hydrates	Exipients
Amino acids	Cryo protectants
Preservatives	Ultra Pure Water
Penidilin K (1.0 g/l)	

Bottles and screw corks are M.E.A. tested

Storage and Stability

The temperature of the product should be below +10° C upon arrival. If not to be used immediately, store at -20°C. After opening, store at 2-8° C for up to 3 days.

Precautions and Warnings

- Do not use any solution which shows evidence of bacterial contamination or if screw cork accidentally comes in contact with unsterile surfaces
- Do not use contents if tamper-evident seal is broken

Ordering Information

Description	Volume	Article No.
BotuCrio®	25mL*	BTC-025
BotuSemen®	400mL	BTS-400
SpermFilter®	1 pcs	BTF-001
EquiPure™	2 x 20mL	EPB-040
EquiPure™	100mL	EPB-100

*minimum order 4 x 25mL

Procedures for using BotuCrio®

Freezing EquiPure™ treated sperm

- Process the sperm according to the instructions for **EquiPure™**
- Transfer the pellet to a new tube containing **BotuCrio®**
- Continue from instruction no. 3 below. Be careful not to dilute the sperm pellet too much. The ratio should be 1/3 sperm pellet and 2/3 **BotuCrio®**

Freezing untreated sperm

- Dilute raw semen 1:1 with **BotuSemen®** (room temperature)
- Concentrate sperm
 - by using BotuPharma **SpermFilter®** or;
 - by using a cushion-Centrifugation for 10 minutes (room temperature) at 500 x g and then remove the supernatant
- Resuspend (room temperature) with sufficient amount of **BotuCrio®** to achieve the number of straws to be frozen. (The final concentration should be 200-400 million per ml depending on the number of straws, usually 4-6 per dose. The total number of sperm per dose should be 250 million motile and normal sperm after thawing)
- Load the 0.5 ml straws (room temperature)
- Place the straws directly at 4-6°C for 20-30 minutes (refrigerator)
- Freeze in Nitrogen vapor (3-6 cm above the surface) for 15-20 minutes or if machine is used: 20-40°C per minute until minus 120°C
- Plunge in Liquid Nitrogen
- Thaw at 46°C for 20 seconds for optimum results (or 37°C for 1 minute), using a water bath
- Check survival 10 minutes after thawing



www.nidacon.com

Manufacturer:
Nidacon, Råjelbergsgatan 16 B, SE-431 37 Hölödal, Sweden
Tel: +46-31-703 06 30, Fax: +46-31-40 54 15
E-mail: contact@nidacon.com, www.nidacon.com

For further technical information or assistance, please contact your distributor or the manufacturer.

Nidacon

DILUYENTE SEMEN EQUINO FRESCO INRA 96

Presentación

Frasco de 200 ml. Unidad de 200 ml. en envase PET (material biocompatible e irrompible).

Características técnicas

Suspensión de aspecto blanco lechoso, estéril.
pH: 7,10+/-0,10. Osm : 330 a 360 m Osm /kg

Composición

Los medios a base de leche existentes en el mercado contienen la totalidad de las proteínas solubles y micelarias. La originalidad del medio **INRA 96** es la de contener únicamente la fracción pura de las proteínas micelarias de la leche altamente protectoras de los espermatozoides.

El medio **INRA 96** contiene antibióticos (Penicilina y Gentamicina) y un fungicida (Amfotericina B).

Indicaciones

El medio **INRA 96** permite la conservación y por tanto el transporte de semen equino, sea a + 4°C (condiciones anaeróbicas), sea a + 15 °C (condiciones aeróbicas).



Precauciones de empleo

Proceder a la dilución del semen para obtener una concentración final de 20x106 espermatozoides /ml.

El volumen de la dosis es de 10 ml. El operador si lo desea puede utilizar cantidades superiores a 200x106 espermatozoides totales por dosis.

Advertencia: no utilizar jeringas con pistón de caucho butyl negro por problemas de citotoxicidad frente a los espermatozoides.

Conservación antes de usar

El medio **INRA 96** puede ser transportado a temperatura ambiente inferior a + 34°C. Para una conservación prolongada, es necesario conservarlo entre +2°C y +8°C.

Caducidad

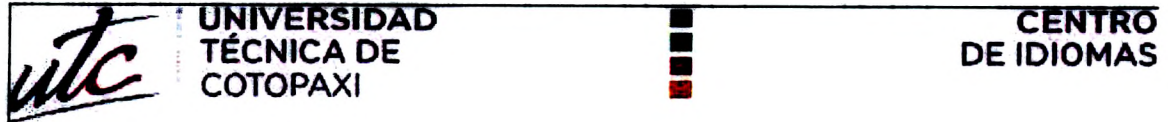
1 año a partir de la fecha de fabricación (n° lote y fecha de caducidad indicadas en la etiqueta).

Certificado de calidad

Trazabilidad ascendente y descendente

Fabricación bajo campana de flujo laminar clase 100 según norma GMP

ANEXOS 3. AVAL DEL TRADUCTOR

*AVAL DE TRADUCCIÓN*

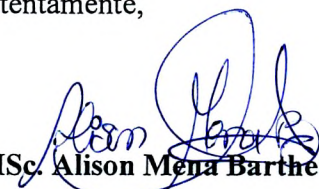
En calidad de Docente del Idioma Inglés del Centro de Idiomas de la Universidad Técnica de Cotopaxi; en forma legal **CERTIFICO** que:

La traducción del resumen al idioma Inglés del proyecto de investigación cuyo título versa: **“EVALUACIÓN DE DOS DILUYENTES COMERCIALES BOTUCRIO® Y INRA96 MEDIANTE EL PROCESO DE CRIOPRESERVACIÓN DE CELULAS ESPERMATICAS EN CABALLOS ARABE Y CRIOLLO DE 4 A 5 AÑOS – EN LA PROVINCIA DE COTOPAXI CANTÓN LATACUNGA.”** presentado por: **Garzón Zambonino Sixto Gabriel** egresado de la Carrera de Medicina Veterinaria perteneciente a la **Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales**, lo realizó 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,


MSc. Alison Mena Barthelotty
DOCENTE CENTRO DE IDIOMAS-UTC
CI: 0501801252

