



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

“EVALUACIÓN DEL TIEMPO DE ESTABILIZACIÓN DE CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN EQUINO UTILIZANDO DOS DILUYENTES DE ORIGEN ANIMAL EN EQUINOS DEL CEASA - SALACHE BAJO – LATACUNGA”

Proyecto de Investigación presentado previo a la obtención del Título de Médicas Veterinarias

Autor:

Guato González Karen Mishell
Herrera Ariza Kamila Mileysha

Tutor:

Beltrán Romero Cristian Fernando

LATACUNGA – ECUADOR

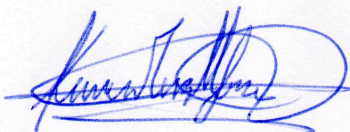
Agosto 2024

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Guato González Karen Mishell , con cédula de ciudadanía No. 0502921430 y Herrera Ariza Kamila Mileysha, con cédula de ciudadanía No. 1723119077, declaramos ser autoras del presente Proyecto de Investigación: **“EVALUACIÓN DEL TIEMPO DE ESTABILIZACIÓN DE CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN EQUINO UTILIZANDO DOS DILUYENTES DE ORIGEN ANIMAL EN EQUINOS DEL CEASA – SALACHE BAJO - LATACUNGA”**, siendo el Médico veterinario y zootecnista Mg. Cristian Fernando Beltrán Romero, 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 de nuestra exclusiva responsabilidad.

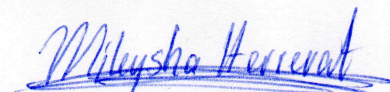
Latacunga, 14 de agosto del 2024



Karen Mishell Guato González

C.C: 0502921430

ESTUDIANTE



Kamila Mileysha Herrera Ariza

C.C: 1723119077

ESTUDIANTE

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 **GUATO GONZÁLEZ KAREN MISHELL**, identificada con cédula de ciudadanía **0502921430** de estado civil soltera, a quien en lo sucesivo se denominará **LA 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. - **LA 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 DEL TIEMPO DE ESTABILIZACIÓN DE CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN EQUINO UTILIZANDO DOS DILUYENTES DE ORIGEN ANIMAL EN EQUINOS DEL CEASA – SALACHE BAJO - 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: Mayo - Septiembre 2020

Finalización de la carrera: Abril – Agosto 2024

Aprobación en Consejo Directivo: 29 de febrero del 2024

Tutor: MVZ Mg. Cristian Fernando Beltrán Romero

Tema: “**EVALUACIÓN DEL TIEMPO DE ESTABILIZACIÓN DE CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN EQUINO UTILIZANDO DOS DILUYENTES DE ORIGEN ANIMAL EN EQUINOS DEL CEASA – SALACHE BAJO - 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, **LA 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 **LA CEDENTE**, transfiere definitivamente a **LA CESIONARIA** y en forma exclusiva los siguientes derechos patrimoniales; pudiendo a partir de la firma del contrato, realizar, autorizar o prohibir:

- a) La reproducción parcial del trabajo de grado por medio de su fijación en el soporte informático conocido como repositorio institucional que se ajuste a ese fin.
- b) La publicación del trabajo de grado.

- c) La traducción, adaptación, arreglo u otra transformación del trabajo de grado con fines académicos y de consulta. La importación al territorio nacional de copias del trabajo de grado hechas sin autorización del titular del derecho por cualquier medio incluyendo mediante transmisión.
- d) 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 **LA 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 **LA 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 **LA 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 14 días del mes de agosto del 2024.

Karen Mishell Guato González
LA CEDENTE

Dra. Idalia Pacheco Tigselema, Ph.D.
LA CESIONARIA

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 **HERRERA ARIZA KAMILA MILEYSHA**, identificada con cédula de ciudadanía **1723119077** de estado civil soltera, a quien en lo sucesivo se denominará **LA 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. - LA 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 DEL TIEMPO DE ESTABILIZACIÓN DE CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN EQUINO UTILIZANDO DOS DILUYENTES DE ORIGEN ANIMAL EN EQUINOS DEL CEASA – SALACHE BAJO - 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: Mayo - Septiembre 2020

Finalización de la carrera: Abril – Agosto 2024

Aprobación en Consejo Directivo: 29 de febrero del 2024

Tutor: MVZ Mg. Cristian Fernando Beltrán Romero

Tema: **“EVALUACIÓN DEL TIEMPO DE ESTABILIZACIÓN DE CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN EQUINO UTILIZANDO DOS DILUYENTES DE ORIGEN ANIMAL EN EQUINOS DEL CEASA – SALACHE BAJO - 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, **LA 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 **LA 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:

- e) 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.

- f) La publicación del trabajo de grado.
- g) La traducción, adaptación, arreglo u otra transformación del trabajo de grado con fines académicos y de consulta.
- h) La importación al territorio nacional de copias del trabajo de grado hechas sin autorización del titular del derecho por cualquier medio incluyendo mediante transmisión.
- i) 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 **LA 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 **LA CEDENTE** podrá utilizarla.

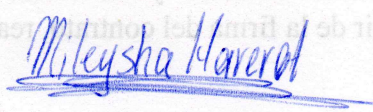
CLÁUSULA OCTAVA. - LICENCIA A FAVOR DE TERCEROS. - LA CESIONARIA podrá licenciar la investigación a terceras personas siempre que cuente con el consentimiento de **LA CEDENTE** en forma escrita.

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 14 días del mes de agosto del 2024.



Kamila Mileysa Herrera Ariza
LA CEDENTE

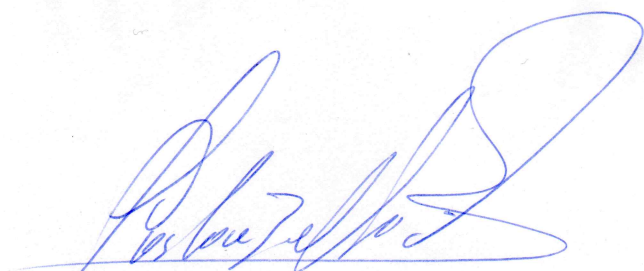
Dra. Idalia Pacheco Tigselema, Ph.D.
LA CESIONARIA

AVAL DEL TUTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

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

“EVALUACIÓN DEL TIEMPO DE ESTABILIZACIÓN DE CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN EQUINO UTILIZANDO DOS DILUYENTES DE ORIGEN ANIMAL EN EQUINOS DEL CEASA – SALACHE BAJO - LATACUNGA”, de Guato González Karen Mishell, y Herrera Ariza Kamila Mileysa, 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 han incorporado las observaciones y recomendaciones propuestas en la Pre defensa.

Latacunga, 14 de agosto del 2024



MVZ. Cristian Fernando Beltrán Romero Mg.
C.C: 0501942940
DOCENTE TUTOR

AVAL DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE TITULACIÓN

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, los postulantes: Guato González Karen Mishell y Herrera Ariza Kamila Mileysha, con el título del Proyecto de Investigación: **“EVALUACIÓN DEL TIEMPO DE ESTABILIZACIÓN DE CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN EQUINO UTILIZANDO DOS DILUYENTES DE ORIGEN ANIMAL EN EQUINOS DEL CEASA – SALACHE BAJO - LATACUNGA”**, han 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 grabar los archivos correspondientes en un CD, según la normativa institucional.

Latacunga, 14 de agosto del 2024

Dr. Jorge Washington Armas Cajas, Mg.
C.C: 0501556450
LECTOR 1 (PRESIDENTE)

MVZ. Edie Gabriel Molina Cuasapaz, Mtr.
C.C: 1722547278
LECTOR 2 (MIEMBRO)

MVZ. Cristian Neptali Arcos Alvarez, Mg.
C.C: 1803675634
LECTOR 3 (MIEMBRO)

AGRADECIMIENTO

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento primero a Dios que siempre me ha guiado con sabiduría en cada momento, a mi familia, quienes me brindaron su amor incondicional y apoyo emocional durante todo este proceso. Gracias por creer en mí y por ser mi pilar en los momentos más desafiantes. A todas las personas que han contribuido de manera significativa a la realización de esta tesis.

Karen Mishell Guato González

AGRADECIMIENTO

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento. En primer lugar, agradezco a mi Dios por su constante bendición y protección. A las personas que hicieron posible la realización de este proyecto de investigación, les estoy profundamente agradecido. Sin su apoyo, dedicación y orientación, este trabajo no habría sido posible.

También quiero agradecer a mis padres por su amor incondicional, sacrificio y constante apoyo. Ellos han sido mi fuente de inspiración y motivación a lo largo de este proceso. A mis docentes y asesores, les agradezco por su valioso conocimiento, retroalimentación y guía. Su compromiso con mi formación académica fue fundamental para el desarrollo exitoso de esta investigación.

Por último, reconozco mi propia perseverancia, esfuerzo y dedicación en cada etapa de este proyecto. Ha sido un camino desafiante, pero estoy orgullosa de los resultados obtenidos.

Kamila Mileysa Herrera Ariza

DEDICATORIA

Con todo mi amor y gratitud, dedico esta tesis a ustedes. Gracias por su apoyo incondicional, su paciencia infinita y por ser mi fuente constante de inspiración. Su amor y sacrificio han sido el motor que me ha impulsado a alcanzar mis metas. Esta tesis es un reflejo de su esfuerzo y dedicación, y no habría sido posible sin ustedes.

Gracias por creer en mí y por enseñarme el valor del trabajo duro y la perseverancia. Les debo todo lo que soy y todo lo que he logrado.

Karen Mishell Guato González

DEDICATORIA

A mis queridos padres, hermano/hermana y mis adoradas mascotas:

Este logro no habría sido posible sin su amor incondicional, apoyo constante y comprensión. Gracias por estar a mi lado en cada paso del camino. A ustedes, que son mi fuente de inspiración y fortaleza, dedico este trabajo con todo mi corazón.

Con cariño, su querida hija

Kamila Mileysa Herrera Ariza

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

TÍTULO: “EVALUACIÓN DEL TIEMPO DE ESTABILIZACIÓN DE CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN EQUINO UTILIZANDO DOS DILUYENTES DE ORIGEN ANIMAL EN EQUINOS DEL CEASA – SALACHE BAJO – LATACUNGA”

Autores:

Guato González Karen Mishell

Herrera Ariza Kamila Mileysa

RESUMEN

El presente proyecto de investigación se realizó con el objetivo de evaluar el tiempo de estabilización de crioconservación de semen equino utilizando diluyentes de origen animal en Cotopaxi – Salache bajo los criadores de equinos carecen de estrategias y centros de reproducción especializados, debido a las complicaciones en su manejo y los altos costos económicos, generando limitaciones en eficiencia y evaluación reproductiva de sementales de alto valor genético, la crioconservación aumenta la capacidad reproductiva de cada semental y permite la distribución eficiente del material genético, este proceso reduce la propagación de enfermedades reproductivas. El desarrollo de la investigación fue elaborado en la Universidad Técnica de Cotopaxi y control de dos sementales; Moro (Lusitano) y Azim (Arabe), el tipo de recolección fue mediante vagina artificial tres extracciones en intervalo de una semana, se analizaron las muestras de manera macroscópica tomando en cuenta olor, ph, color, volumen y de forma microscópica se valoró cuatro parámetros principales (tiempo de estabilización, crioconservación, diluyente, reproductor) comparados en tres tiempos de 3,6 y 9 horas, pre congelación y post congelación. Los resultados obtenidos fueron medidos por intervalos de confianza que no tienen diferencia significativa entre los cuatro parámetros evaluados, la evaluación por biplot el vigor no tiene relación entre motilidad individual y progresividad, a menor tiempo de estabilización se encuentra una mayor viabilidad en cuanto al semen equino, evitando parámetros que dañen la membrana celular del espermatozoide como el estrés oxidativo, térmico y osmótico, el equino con mayor calidad espermática fue el de raza Lusitano, se pudo establecer un protocolo de extracción para investigaciones futuras.

Palabras clave: crioconservación, tiempo de estabilización, semen, equino.

**TECHNICAL UNIVERSITY OF COTOPAXI
FACULTY OF AGRICULTURAL SCIENCE AND NATURAL RESOURCES**

**THEME: “EVALUATION OF THE STABILIZATION TIME OF EQUINE SEMEN
CRYOPRESERVATION USING TWO DILUENTS OF ANIMAL ORIGIN IN
EQUINES FROM CEASA - SALACHE BAJO - LATACUNGA”**

Author:

Guato González Karen Mishell
Herrera Ariza Kamila Mileysa

ABSTRACT

The present research project was carried out with the objective of evaluating the stabilization time in the process of cryopreservation of equine semen using diluents of animal origin in Cotopaxi - Salache bajo, equine breeders lack strategies and specialized reproduction centers, due to complications in their management and high economic costs, generating limitations in efficiency and reproductive evaluation of stallions of high genetic value, cryopreservation increases the reproductive capacity of each stallion and allows for the efficient distribution of genetic material, this process reduces the spread of reproductive diseases. The development of the research was carried out at the Technical University of Cotopaxi and the control of two stallions; Moro (Lucitano) and Azim (Arabe), the type of collection was by artificial vagina three extractions at an interval of one week, the samples were analyzed macroscopically taking into account odor, pH, color, volume, and microscopically four main parameters were evaluated (stabilization time, cryopreservation, diluent, reproducer) compared in three times of 3, 6 and 9 hours, pre-freezing and post-freezing. The results obtained were measured by confidence intervals that have no significant difference between the four parameters evaluated, the evaluation by biplot that vigor has no relationship between individual motility and progressivity, the shorter the stabilization time, the greater the viability of the equine semen, avoiding parameters such as oxidative, thermal and osmotic stress that damage the sperm cell membrane, the equine with the highest sperm quality was the Lucitano breed, and an extraction protocol could be established for future research.

Keywords: cryopreservation, stabilization time, semen, equine

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DECLARACIÓN DE AUTORÍA.....	II
AVAL DEL TUTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN	VII
AVAL DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE TITULACIÓN	VIII
<i>AGRADECIMIENTO.....</i>	IX
<i>DEDICATORIA.....</i>	XI
<i>RESUMEN.....</i>	XIII
<i>ABSTRACT.....</i>	XIV
1. INFORMACIÓN GENERAL	1
2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO.....	2
3. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO	2
4.1. BENEFICIARIOS DIRECTOS:.....	2
4.2. BENEFICIARIOS INDIRECTOS:	3
4. EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN:.....	3
5. OBJETIVOS:.....	5
5.1. GENERAL:.....	5
5.2. ESPECÍFICOS:.....	5
6. SISTEMA DE TAREAS EN RELACIÓN A LOS OBJETIVOS PLANTEADOS	5
7. MARCO TEÓRICO.....	6
7.1. ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA REPRODUCTIVA EQUINA.....	6
<i>7.1.1. Órganos reproductores externos</i>	6
<i>7.1.2. Órganos reproductores internos.....</i>	6
<i>7.1.3. Fisiología.....</i>	6
<i>7.1.4. Comportamiento sexual.....</i>	6
<i>7.1.5. Fertilidad.....</i>	7
<i>7.1.6. Relevancia en la industria equina.....</i>	7

7.2. RAZAS EQUINAS	7
7.2.1. Raza Lusitano	7
7.2.1.1. Origen:	7
7.2.1.2. Físico:	7
7.2.1.3. Carácter	8
7.2.2. Raza Arabe	8
7.2.2.1. Origen	8
7.2.2.2. Físico.	8
7.2.2.3. Carácter	9
7.3. CRIOPRESERVACIÓN	9
7.3.1. Investigaciones sobre la crioconservación	9
7.3.2. Métodos (protocolos) de la crioconservación de semen equino	10
7.3.3. Preparación del reproductor	11
7.3.4. Recolección de semen	12
7.3.5. Dilución y centrifugación	14
7.3.6. Adición del diluyente de congelación	15
7.3.7. Composición de los diluyentes	18
7.3.8. Envasado	19
7.3.9. Refrigeración	19
7.3.10. Congelación y almacenamiento	20
7.3.11. Descongelación del semen	21
7.4. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DEL SEMEN	21
7.4.1. Características macroscópicas del semen equino	22
7.4.1.1. Volumen	22
7.4.1.2. pH	22
7.4.1.3. Color	22
7.4.1.4. Olor	22
7.4.2. Características microscópicas del semen equino	22
7.4.2.1. Motilidad Masal	22
7.4.2.2. Motilidad Individual o progresividad	23
7.4.2.3. Concentración Espermática	24
7.4.2.4. Vigor	24
7.4.3. Control de calidad post descongelación	24
7.5. MECANISMO DE CRIO LESIÓN EN EL SEMEN EQUINO	24

7.5.1. <i>Estrés Oxidativo</i>	25
7.5.2. <i>Estrés Osmótico</i>	25
7.5.3. <i>Estrés Térmico</i>	26
7.5.4. <i>Apoptosis</i>	26
8. METODOLOGÍA	26
8.1. DISEÑO PRE-EXPERIMENTAL	27
8.2. CONDICIONES AMBIENTALES:	27
8.3. UNIDADES EXPERIMENTALES	28
8.4. PROTOCOLO PARA LA EVALUACIÓN DEL TIEMPO DE ESTABILIZACIÓN DE CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN EQUINO	29
8.4.1. PROCEDIMIENTO METODOLÓGICO PARA LA APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE CRIOCONSERVACIÓN	29
8.5. FLUJO DEL PROTOCOLO PARA LA EVALUACIÓN DEL TIEMPO DE ESTABILIZACIÓN DE CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN EQUINO	33
8.6. INSUMOS DE LABORATORIO PARA LA EVALUACIÓN DEL TIEMPO DE ESTABILIZACIÓN DE CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN EQUINO.	34
9. RESULTADOS DE ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	35
CONCLUSIONES:	47
10. RECOMENDACIONES:	47
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
12. ANEXOS	59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Control del efecto de la quercetina, la L-ergotioneina y la pentoxifilina en la conservación de la calidad del semen equino post descongelación.....	10
Tabla 2 Preparación del diluyente Crio RAMP (48)	18
Tabla 3. Categorías Motilidad Masal	23
Tabla 4 Categorías de motilidad progresiva (69)	23
Tabla 5 Datos de los sementales.....	28
Tabla 6. Análisis Macroscópico	35

INDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Motilidad Progresiva por tiempo de estabilización	36
Gráfico 2. Motilidad Individual por tiempo de estabilización.....	36
Gráfico 3. Vigor por tiempo de estabilización	37
Gráfico 4. Motilidad Progresiva Pre y Post congelación.....	38
Gráfico 5. Motilidad Individual por tiempo Pre y Post congelación.....	39
Gráfico 6. Vigor por tiempo Pre y Post congelación.....	39
Gráfico 7. Motilidad Progresiva por tiempo pre y post congelación.....	40
Gráfico 8 Motilidad Individual por diluyente.....	41
Gráfico 9 Motilidad Progresiva por diluyente	41
Gráfico 10. Vigor por diluyente	42
Gráfico 11. Motilidad Individual por Reproductor	43
Gráfico 12 Motilidad Progresiva por Reproductor.....	43
Gráfico 13. Vigor por reproductor.....	44
Gráfico 14. Intervalos de confianza con variables	45
Gráfico 15. Análisis exploratorio de los datos PCA - Biplot	45

INDICE DE IMAGENES

Imagen 1 Captura satelital de la clínica veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi (80)	
.....	27

1. INFORMACIÓN GENERAL

Título del Proyecto:

Evaluación del tiempo de estabilización de crioconservación de semen equino utilizando dos diluyentes de origen animal en equinos del CEASA - Salache bajo - Latacunga

Fecha de inicio: abril 2024**Fecha de finalización:** agosto 2024**Lugar de ejecución:**

Barrio Salache- Parroquia Eloy Alfaro- Cantón Latacunga- Provincia Cotopaxi

Facultad que auspicia

Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales

Carrera que auspicia:

Carrera de Medicina Veterinaria

Proyecto de investigación vinculado:

Proyecto de mejoramiento genético en equinos del CEASA

Equipo de Trabajo:**Postulantes:**

- Kamila Mileysa Herrera Ariza
- Karen Mishell Guato Gonzalez

Docente:

- MVZ. Cristian Fernando Beltrán Romero, Mg.

Área de Conocimiento: Veterinaria**Línea de investigación:**

Producción y biotecnología animal

Sub líneas de investigación de la Carrera:

Biodiversidad, mejora y conservación de recursos zoogenéticos

Línea de vinculación de la carrera:

Salud y Bienestar animal del proyecto de vinculación de la provincia de Cotopaxi

2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

La criopreservación del semen desempeña un papel crucial en la conservación y distribución eficaz del material genético también mejorar los procedimientos de criopreservación no solo impulsa el progreso de las técnicas de reproducción asistida en equinos, sino que también posibilita la obtención de un valor genético elevado. Además, facilita la selección cuidadosa, contribuyendo así a prevenir la propagación de enfermedades reproductivas entre otros beneficios. (1)

A la vez una de las grandes ventajas de desarrollar un protocolo referente al tiempo de estabilización es el no requerir transporte de animales, pues no solo es un evento estresante para los caballos, es además un proceso que requiere trámites y que al no cumplirse llevan al fracaso de la criopreservación. (1)

Por otro lado, puede ofrecer datos valiosos que contribuyan a la comprensión de los procesos biológicos asociados a la criopreservación del semen equino puesto que los descubrimientos obtenidos tienen el potencial de enriquecer el conocimiento científico de los criadores de equinos adicionalmente, un correcto uso del tiempo de estabilización en la inseminación con espermatozoides criopreservados facilita los procesos de elección y mejoramiento, además de que, aumenta el pencil reproductivo de cada semental, pudiendo fecundar varias hembras con espermatozoides de un solo macho (2).

Al asegurar la calidad del semen criopreservado, se pueden reducir los costos asociados con intentos fallidos de reproducción. Así mismo, a la eficiencia mejorada, se pueden obtener beneficios en ganadería, deportes, terapias de rehabilitación psicológica, física (equinoterapia) y en el transporte en determinados contextos rurales (3).

En cuanto a la contribución al avance de la biotecnología reproductiva, se proporciona información valiosa para la investigación y el avance en el conocimiento de los procesos biológicos involucrados en la crioconservación del semen equino (4).

3. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO

4.1. Beneficiarios directos:

- Investigadores del proyecto

4.2. Beneficiarios indirectos:

- Médicos veterinarios y criadores de caballos
- Estudiantes de la carrera de medicina veterinaria

4. EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN:

Actualmente, la Universidad Técnica de Cotopaxi cuyo ámbito de formación a sus estudiantes está enmarcada entre una de sus carreras Medicina Veterinaria; la misma que está ligada a cumplir con los enfoques en producción y reproducción animal, el bienestar animal y el manejo clínico veterinario.

En el ámbito de la producción y reproducción animal, es fundamental identificar y abordar diversas necesidades para proponer nuevas estrategias que optimicen esta área y mejoren la formación de futuros profesionales. La monta directa en equinos, se sabe que es un método natural de reproducción. Sin embargo, puede conllevar varias consecuencias negativas tanto para los animales involucrados como para la gestión del criadero. Entre las principales preocupaciones se encuentran la transmisión de enfermedades reproductivas y el riesgo de lesiones físicas durante el apareamiento (5). Por ende, como un componente crucial en este campo es la crioconservación, que consiste en mantener células, tejidos u organismos vivos (semen equino) a temperaturas extremadamente bajas con el fin de reducir o suspender sus funciones vitales y preservarlos vivos durante largos periodos de tiempo (6). De esta manera, al obtener pajuelas, podemos conservar material genético valioso, transportar semen a nivel nacional, minimizar la transmisión de enfermedades y mejorar las tasas de éxito reproductivo.

Cabe recalcar que la crioconservación se aplica principalmente para espermatozoides, embriones y ovocitos. La presente investigación se centra en la crioconservación de espermatozoides.

Un estudio investigó el impacto de la quercetina, la L-ergotioneina y la pentoxifilina en la preservación de la calidad del semen equino después de la descongelación. Se criopreservaron 15 eyaculados de cinco caballos (utilizando el semen de uno de los caballos como control) siguiendo un protocolo de congelación convencional. La movilidad y la cinética espermática se evaluaron a los 0, 6, 12 y 24 horas de estabilización (7).

Así mismo, en un estudio realizado en el año 2011 por la Universidad Federal Fluminense, se evaluó la eficiencia de los diferentes tiempos de estabilización dando como resultado que los tiempos de equilibrio más largos de 85 o 145 minutos antes de la criopreservación no mejoraron la calidad del semen descongelado en comparación con un tiempo de equilibrio más corto de 25 minutos, es decir que no hubo diferencia entre los tratamientos en la calidad del semen equino, no hubo diferencias significativas ya que en un tiempo de estabilización más largo como los 85 o 145 min tienen más tiempo para ajustarse al medio y recuperarse de los efectos del procesamiento previo. Sin embargo, incluso un tiempo de estabilización más corto como los 25 minutos puede ser suficiente para lograr un equilibrio básico (8).

En este contexto la presente investigación: *Evaluación del tiempo de estabilización de crioconservación de semen equino utilizando dos diluyentes de origen animal en equinos del CEASA - Salache bajo – Latacunga*; pretende caracterizar los tiempos de estabilización para optimizar la crioconservación del semen equino.

Consecuentemente con los resultados de la presente investigación podría aportar a los criadores de equinos en la provincia de Cotopaxi, toda vez que según referencias bibliográficas habrían encontrado renuencia a la criopreservación de semen, debido a complicaciones de manejo al momento de estabilizar las muestras y por los altos costos económicos, pues no se cuenta con estrategias y/o centro de reproducción en equinos. Como dato referencial se conoce que a menor tiempo de estabilización mayor calidad espermática por lo cual la disponibilidad de muestras de semen equino puede ser limitada, especialmente si se trabaja con sementales de alto valor genético esto puede dificultar la obtención de datos suficientes para realizar análisis estadísticos significativos (9).

También la inadecuada aplicación de protocolos de bioseguridad con respecto al tiempo de congelación, post recolección disminuye la calidad de la muestra, la criopreservación implica almacenar el semen a temperaturas bajas por lo tanto los problemas relacionados con la manipulación y el almacenamiento de tiempo en las muestras, pueden afectar la viabilidad del semen y complicar la interpretación de los resultados (2).

5. OBJETIVOS:

5.1. General:

Evaluar el tiempo de estabilización de crioconservación de semen equino utilizando dos diluyentes de origen animal en equinos del CEASA - Salache Bajo - Latacunga

5.2. Específicos:

- Estimar la calidad del semen equino durante el proceso de estabilización de 3,6 y 9 horas, pre congelación y post congelación.
- Identificar factores en el tiempo de estabilización que afectan la calidad del semen criopreservado.
- Comparar la calidad del semen homogenizado en los diluyentes INRA freeze y Crio RAMP en dos sementales, uno de raza árabe y otro de raza lusitana.

6. SISTEMA DE TAREAS EN RELACIÓN A LOS OBJETIVOS PLANTEADOS

Objetivo	Actividad	Resultado de la actividad	Descripción de la actividad (técnicas e instrumentos)
Objetivo 1	Estimar la calidad del semen equino durante el proceso de estabilización de 3,6 y 9 horas, pre congelación y post congelación	Espermiograma	Recolección de muestras seminales
Objetivo 2	Identificar factores en el tiempo de estabilización que afectan la calidad del semen criopreservado.	Problemas de criopreservación en la recolección de semen	Comparar dos muestras, una muestra previa congelada y una muestra recién recolectada
Objetivo 3	Comparar la calidad del semen homogenizado en los diluyentes INRA freeze y Crio RAMP en dos sementales, uno de raza árabe y otro de raza lusitana.	Mayor calidad espermática en pajuelas	Analizar la calidad espermática a través del microscopio durante todo el proceso de práctica

7. MARCO TEÓRICO

7.1. Anatomía y Fisiología Reproductiva Equina

7.1.1. Órganos reproductores externos

- Pene: órgano sexual masculino utilizado para la cópula y la deposición de semen.
- Escroto: bolsa de piel que contiene los testículos.
- Testículos: gónadas masculinas que producen espermatozoides y testosterona (hormona sexual masculina). (10)

7.1.2. Órganos reproductores internos

- Epidídimo: tubo en espiral donde maduran los espermatozoides y se almacenan.
- Conducto deferente: tubo que transporta los espermatozoides que viajan del epidídimo y llegan a la uretra.
- Vesículas seminales: glándulas que ejecutan un líquido que alimenta y protege a los espermatozoides.
- Glándula prostática: glándula que produce un fluido alcalino que neutraliza la acidez de la vagina.
- Glándulas bulbouretrales: glándulas que producen un líquido que lubrica la uretra y el pene.
- Uretra: tubo que transporta el semen desde la vejiga urinaria hasta el exterior del pene. (11)

7.1.3. Fisiología

- Espermatogénesis: proceso de producción de espermatozoides en los testículos.
- Espermiación: liberación de espermatozoides maduros desde el epidídimo.
- Eyaculación: expulsión del semen del pene durante la cópula.
- Testosterona: hormona masculina fundamental que regula el crecimiento de los caracteres sexuales, la libido y la conducta sexual. (11)

7.1.4. Comportamiento sexual

- Sementales: los machos enteros (no castrados) son poliestricos y presentan un comportamiento sexual activo durante todo el año.

- Comportamiento de cortejo: incluye relinchos, mordiscos, persecución y monta.
- Reflejo de erección: el pene se endurece y se llena de sangre.
- Reflejo de eyaculación: el semen se expulsa del pene en dos o tres fracciones (12).

7.1.5. Fertilidad

- Edad: la fertilidad del semental alcanza su punto máximo entre los 4 y los 12 años.
- Calidad del semen: la calidad del semen se evalúa en términos de concentración, motilidad, morfología y viabilidad de los espermatozoides.
- Factores ambientales: la temperatura, la nutrición y el manejo pueden afectar la fertilidad del semental. (11)

7.1.6. Relevancia en la industria equina

- Reproducción: la cría de caballos requiere un conocimiento profundo de la anatomía, fisiología y comportamiento reproductivo del macho.
- Mejora genética: la inseminación artificial con semen de sementales de alto rendimiento permite mejorar la calidad genética de la población equina.
- Control de enfermedades: el uso de técnicas para la reproducción asistida como es la inseminación artificial y la transferencia de embriones ayuda a controlar la transmisión de enfermedades venéreas. (13)

7.2. Razas equinas

7.2.1. Raza Lusitano

7.2.1.1. Origen:

El caballo Pura Raza Española, también conocido como el Andaluz, pertenece a una distinguida raza cuyas raíces se remontan a miles de años atrás en la región de Andalucía, en la Península Ibérica. Estos equinos han desarrollado notables habilidades, fuerza y belleza al enfrentarse al terreno accidentado y a los animales salvajes de la zona, incluyendo los imponentes toros. (14)

7.2.1.2. Físico:

Tamaño y Peso: Los caballos andaluces son de tamaño medio, con una altura a la cruz que oscila entre 150 y 160 cm centímetros y un peso de 400 a 650 kilogramos. Su esperanza de vida está entre los 20 y 35 años. (14)

Cuerpo: Tienen un cuerpo musculoso y proporciones armónicas. El tórax es amplio, la espalda robusta y el lomo ancho. Las patas son largas y fuertes. (15)

Cabeza y Ojos: La cabeza es característica de tener un tamaño mediano, con ojos altivos y expresivos de color negro o tordo. Las orejas también son de medio tamaño y móviles. (16)

Pelaje: Aunque el color más común es el gris, también se encuentran en otros colores. Los ejemplares negros son especialmente cotizados. (15)

7.2.1.3. Carácter

Son caballos inteligentes, sensibles y dóciles. En cuanto a la reproducción, los caballos andaluces han sido reconocidos como una raza única desde el siglo XV. Jueces profesionales evalúan a los sementales y yeguas elegibles para determinar su aptitud como reproductores. (16) (15)

7.2.2. Raza Árabe

El caballo árabe, también conocido simplemente como “árabe”, es una de las razas equinas más antiguas y apreciadas en todo el mundo. Aquí tienes algunas de sus características:

7.2.2.1. Origen

El caballo árabe se desarrolló en la Península Arábiga, en Oriente Medio. Su historia se remonta a más de 3.000 años atrás, y se cree que descende de los caballos que ayudaron a florecer civilizaciones como la egipcia. Actualmente, existe un programa nacional en Arabia Saudita para preservar y mantener sus características físicas. (17)

7.2.2.2. Físico.

El árabe es de tipo mesomorfo, lo que significa que tiene una constitución ligera pero resistente. Su altura a la cruz oscila entre 145 y 155 cm, y su peso varía entre 350 y 450 kg. Las capas de pelaje más raras y estimadas son la blanca, negra y dorada.

Cabeza refinada: Tienen una cabeza con frente ancho y una nuca alargada.

Cuello arqueado: Su cuello es arqueado y esterilizado.

Grupa y cola: Poseen una grupa larga y nivelada, con la cola siempre en alto.

Patitas finas: Sus patitas son delgadas y estilizadas.

Pelaje: El pelaje es corto y suele ser poco abundante en la cola y las crines. (18)

7.2.2.3. Carácter

Es un caballo noble, inteligente y poco exigente. Pertenece al grupo de “sangre caliente”, lo que se traduce en un temperamento inquieto y vivaz. Además, tiene una gran capacidad para el aprendizaje. (17) (18)

7.3. Criopreservación

La criopreservación requiere que las células sigan siendo viables y funcionales a altas temperaturas. Debido a la diversidad de especies y las diferencias entre sexos, las células germinales pueden almacenarse durante largos períodos de tiempo, incluida la muerte, utilizando tanques criogénicos llenos de nitrógeno líquido u otros ambientes de baja temperatura. (19) (20)

La inseminación artificial y la criopreservación desempeñaron un papel importante en la historia de la cría de caballos. Según un estudio sobre conservación de recursos genéticos, el Instituto Panruso de Investigación para la Cría de Caballos (ARRIH) inició estudios sobre la crioconservación en la década de 1950, y en 1954 obtuvo el primer potro del mundo mediante inseminación artificial con espermatozoides criopreservados. El estudio refiere que dicho Instituto cuenta desde 1972 con bancos criogénicos que contribuye a la conservación de diversas razas; señalan disponer espermatozoides criopreservados de 56 sementales de 16 razas de nacionales y extranjeras. (21)

El estudio, señala que la congelación y descongelación de los espermatozoides equinos producen una disminución de la motilidad progresiva de los espermatozoides y un crecimiento en la cantidad de espermatozoides con patologías estructurales, durante el proceso de crioconservación. Así mismo, refieren que la microscopía electrónica es uno de los métodos más exactos para evaluar la integridad estructural de los espermatozoides. (21)

7.3.1. Investigaciones sobre la crioconservación

Investigaciones sobre la optimización de espermatozoides equinos sugiere que la preservación mediante la criopreservación es una técnica fundamental en las metodologías reproductivas equinas contemporáneas, cuyo objetivo es mantener la vitalidad de los espermatozoides para la inseminación artificial. Se han investigado varios enfoques para mejorar la calidad del espermatozoides después de la descongelación, como la integración de la centrifugación coloidal de una sola capa para aumentar la cantidad de eyaculados aptos para la crioconservación. Concluyen que,

usando la centrifugación coloidal, el porcentaje de eyaculados disponibles para ser congelados se habría incrementado del 35% al 71%. (22)

Otro estudio refiere que se han profundizado en el impacto de la concentración de espermatozoides en la calidad después de la descongelación, lo que sugiere que la criopreservación en concentraciones reducidas, como 50 millones por ml, puede mantener la calidad del espermatozoide en sementales criopreservados (23).

Así mismo, estudios sobre la motilidad (habilidad de moverse espontánea e independientemente) de los espermatozoides, utilizando suplementos como el iodixanol durante la crioconservación ha demostrado resultados alentadores en la mejora de los parámetros espermáticos tras la descongelación, tanto en lo que respecta a la viabilidad como a la integridad del ADN (24).

Por otro lado, una publicación sobre embriones criopreservados, habrían determinado que el proceso de crioconservación puede tener un impacto en el desarrollo de los embriones cuando se utilizan espermatozoides congelados y posteriormente descongelados. Este impacto podría influir en el crecimiento y la supervivencia de los embriones, debido a las alteraciones en las proteínas espermáticas provocadas por el procedimiento de crioconservación. (25)

7.3.2. Métodos (protocolos) de la crioconservación de semen equino

Con el propósito de observar resultados de estudios relacionados, haremos una búsqueda en plataformas con google académico, Scielo y revistas especializadas.

Un estudio evaluó el efecto de la quercetina, la L-ergotioneína y la pentoxifilina en la conservación de la calidad del semen equino post descongelación; se criopreservó el semen de cinco caballos, 15 eyaculados, (el semen de uno de los caballos se usó como variable de control) mediante un protocolo congelación convencional. Evaluaron la movilidad y la cinética espermáticas para 0, 6, 12 y 24 horas.

La observación concluyó que el uso de la L-ergotioneína y la quercetina mostraron un efecto posdescongelación favorable sobre la movilidad progresiva, velocidad curvilínea y media. Ver gráfico adjunto del semen equino, a las 6 horas. (7)

Tabla 1 Control del efecto de la quercetina, la L-ergotioneína y la pentoxifilina en la conservación de la calidad del semen equino post descongelación

Tiempo	Tratamiento	MT	MP	VSL	VCL	VAP
0	Control	62,8 ± 12,0 ^a	41,6 ± 13,1	38,6 ± 10,0	90,7 ± 13,6	59,8 ± 13,4
6	Control	68,6 ± 10,4	36,1 ± 8,14	33,1 ± 7,6	81,8 ± 8,9	52,4 ± 12,4
12	Control	54,3 ± 8,2	31,1 ± 8,9	36,1 ± 9,0	84,4 ± 6,8	55,3 ± 9,2
24	Control	51,6 ± 16,2	31,2 ± 11,8	32,9 ± 7,1	90,3 ± 18,7	50,7 ± 12,4

Por otro lado, un estudio se propuso a evaluar dos diluyentes para la congelación de semen de equinos de raza criolla colombiana; tomaron el semen de cuatro sementales, criopreservaron el producto y, mediante congelación rápida con los diluyentes Equipro y Gent, evaluaron la movilidad total, progresiva, velocidad curvilínea, lineal y media (26).

La investigación concluyó que la mayor movilidad total posdecongelación se obtiene con la utilización del diluyente Equipro. Importante considerar que la descongelación de las muestras tomadas, se descongelaron a la semana, en baño María a 37°C (26).

Así mismo, la investigación experimental sobre la evaluación de 3 protocolos de crioconservación en sementales de raza árabe y pura sangre inglesa, se definió tres protocolos basados en el tiempo y la fuerza de centrifugación previa a la crioconservación: T1 (15min - 2000 RPM), T2 (20min - 1500 RPM) y T3 (25min-1000 RPM). Utilizaron el diluyente RAMP PLUS para la centrifugación y CRIO RAMP para la crioconservación. Evaluaron características del semen fresco y poscongelado, a fin de determinar la eficiencia de protocolo. La técnica consistió en enfriar el semen equino a 4 grados Celsius durante cuatro horas y su posterior congelación en nitrógeno durante 10 minutos (27).

Los resultados obtenidos se validaron en función de la variable “integridad de la membrana”; es decir, los mejores resultados los obtuvieron para el protocolo 3 (T3: 25min-1000 RPM), el cual habría producido el menor daño a la membrana (50,07%) (27).

Técnica de criopreservación

Todos los protocolos de congelación de semen equino requieren un procesado que incluye:

7.3.3. Preparación del reproductor

La manera correcta y segura para trasladar a un semental de un lugar a otro se empieza situándose a su izquierda. Sosteniendo el extremo del ramal con la mano izquierda y con la derecha agarrar el ramal a unos 20 cm del enganche. Usando el codo derecho para mantener al caballo a una distancia adecuada y para dirigirlo en caso de que intente escapar corriendo (28).

Para atar al semental una vez trasladado al lugar deseado se debe atar a dos vientos, es decir, con dos cadenas o cuerdas a ambos lados de la cabezada, lo que evitara que se golpee contra la pared o incluso con otro caballo atado al lado, es crucial realizar un nudo de seguridad para evitar que el caballo se quede colgado si intentara soltarse violentamente. La argolla debe estar siempre por encima de la altura del hocico para evitar que el caballo se enganche. Jamás debe atarse un caballo a una ventana o elemento similar que pudiera desprenderse si el animal tirase violentamente, pudiendo causar graves lesiones. Además, es muy peligroso atar al caballo por la cabezada de montar, ya que esto puede causar daños significativos en su boca (29).

Una vez que el semental esté ubicado, se procede a lavar el prepucio y el glande con agua tibia y jabón. Es importante no usar antisépticos en el pene del semental, ya que esto podría favorecer la colonización de bacterias dañinas; los antisépticos solo deben usarse para tratar patógenos específicos. Este lavado es necesario si el animal no ha sido utilizado recientemente, debido a la acumulación de esmegma en estas áreas (30). En caballos que han montado yeguas recientemente, esta limpieza puede no ser necesaria. Si se desea detectar la presencia de bacterias patógenas en el pene del caballo, se deben tomar muestras del glande y la uretra distal con un hisopo de algodón antes de la eyaculación, para realizar cultivos bacterianos posteriores (31).

El equipo o material que entra en contacto con los órganos genitales deben ser estériles y de un solo uso como: toallas, protector de cola, forro interior de vagina artificial, bolsa de plástico en la parte posterior de la montura reproductora, que debe cambiarse después de cada recolección, catéter de inseminación, guantes, vaginoscopios, etc (31).

7.3.4. Recolección de semen

La obtención de muestras seminales en caballos puede realizarse principalmente mediante cuatro procedimientos:

Vagina artificial.

Los tres modelos más comunes de vaginas artificiales para la recolección de semen de caballos son: Colorado, Missouri y Japonesa. La vagina artificial es un instrumento diseñado para simular las condiciones naturales de la vagina de la yegua, estimulando la eyaculación del macho al introducir su pene en ella. Busca replicar tres factores clave: temperatura, presión y lubricación. Existen varios modelos, todos consisten en un cilindro, rígido o flexible, con una

cubierta interior (generalmente de látex) que forma una cámara donde se introduce agua caliente para alcanzar la temperatura y presión adecuadas. La lubricación se aplica solo en el primer tercio para evitar contaminar el semen (32).

Debe ser llenada con agua a 58 o 60°C, de manera que, al cabo de 15 a 20 minutos, la temperatura interna de la vagina sea de 45 a 50°C. Algunos animales muestran cierta preferencia por temperaturas altas (50 – 52 °C) o bajas (42°C – 46°C). Los recipientes de recogida más utilizados son de plástico específicos o biberones, que deben mantenerse entre 36-38°C para evitar el choque térmico de los espermatozoides y protegidos de la luz solar directa. Es crucial mantener la vagina artificial siempre limpia. (33) (32)

Uso del preservativo

Se trata de un dispositivo de goma que se ajusta al pene del caballo y permite recoger el eyaculado directamente sin mezclarlo con las secreciones vaginales. Sin embargo, el eyaculado se mezclará con el esmegma peneano del semental, por lo que se recomienda lavar el pene antes de usar el dispositivo para evitar la contaminación con bacterias y detritus del exterior. Para evitar la pérdida de esperma al retirarlo o del propio condón, que en ocasiones suele ser bastante frecuente, debe colocarse sobre el pene en erección y de una hembra en celo para que se recupere inmediatamente después de la cubrición (34).

Prevención de la recolección de esperma en caballos. Los inconvenientes incluyen la posibilidad de que la muestra seminal se contamine con orina o defecaciones de la hembra y el contacto prolongado con el látex pueden alterar su motilidad. Además, no todos los caballos toleran la presencia de un preservativo; en ocasiones, esto dificulta la colocación y en otras ocasiones impide el orgasmo, principalmente en caballos que rechazan la vagina artificial. No debe usarse como primera opción para la obtención del semen debido a su exposición e incomodidad en su uso. Sin embargo, esta técnica es adecuada para sementales acostumbrados a la monta natural que no aceptan la recogida en una vagina artificial o cuando no hay una vagina artificial disponible. Como ventaja principal, destacamos que la muestra obtenida por preservativo es completa y representativa (34).

Administración de agentes farmacológicos

El uso de fármacos para provocar la eyaculación de los sementales puede ser una solución para problemas de libido, erección, monta o eyaculación. Aunque las vías nerviosas y receptores

implicados no están completamente claras, la teoría más aceptada sugiere que los receptores alfa adrenérgicos median la eyaculación. Diversos fármacos han sido usados para este propósito en equinos, como la xilacina (contiene efectos sedantes y analgésicos que induce a un estado de relajación y disminución del estrés y la ansiedad en el semental, facilitando la respuesta sexual y la eyaculación) (35), la imipramina (actúa sobre el sistema nervioso simpático, aumentando la disponibilidad de neurotransmisores como la norepinefrina y la serotonina, lo que facilita el reflejo eyaculatorio) (36), también se puede usar clomipramina, detomidina, prostaglandinas y HCG en combinación con prostaglandinas (37).

La imipramina se administra generalmente por vía oral, la dosis recomendada es de 1.0-2.0 mg/kg y se administra aproximadamente 1-2 horas antes de intentar la recogida de semen para permitir que el medicamento alcance niveles efectivos en el organismo del caballo.

Luego de la administración de imipramina, se administra xilacina para potenciar el efecto, la dosis recomendada para administrar es de 0.4 mg/kg por vía intramuscular o intravenosa, unos 20 minutos después de la imipramina (38).

Manipulación manual del pene

La técnica descrita consiste en colocar al semental en un potro de contención y estimularlo con una yegua en celo. Cuando el pene está erecto, se coloca una bolsa sobre el glande y se masajea con compresas a 45 °C en el glande y la base del pene hasta que se produce la eyaculación. Esta técnica es ideal para caballos con problemas locomotores, ataxia o incoordinación, ya que permite una eyaculación en una postura más estable. Además, ofrece varias ventajas: la muestra de semen obtenida es representativa y con mínima contaminación, permite la recolección fraccionada del semen, requiere poco equipamiento y solo una persona para recolectar. Una vez entrenado el semental, la técnica se puede repetir con la frecuencia necesaria sin afectar su comportamiento sexual (37).

7.3.5. Dilución y centrifugación

Los dilutores empleados previo a la centrifugación del semen varían de acuerdo al país. En Ecuador los más utilizados son Kenney, Botucio®, inra96, inrafrezer y Crio ramp.

El semen y el medio extensor deben encontrarse a la misma temperatura en el momento de la dilución. Se puede hacer a 37 °C si se realiza inmediatamente después de la colecta, o a los 22 °C si se realiza un enfriamiento del semen, conforme al protocolo de congelamiento (39).

A lo largo del tiempo, la proporción de dilución del semen ha experimentado cambios. Sin embargo, en la actualidad, tanto investigadores como extensionistas coinciden en que la mezcla de dilución debe ser una porción de diluyente y la otra porción de semen. (1:1) (39).

La centrifugación simple se utiliza comúnmente para mejorar la calidad del semen en equinos, especialmente en aquellos con dificultades para refrigerar y congelar el semen. Esta técnica elimina parte del plasma seminal pero no discrimina entre espermatozoides viables y no viables, acumulándolos todos en el "pellet" (40).

Por otro lado, la centrifugación coloidal es una técnica efectiva para mejorar la calidad del semen en diversas especies animales, incluyendo los caballos. Esta técnica selecciona los mejores espermatozoides y elimina agentes patógenos, células inflamatorias y espermatozoides muertos que liberan especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que deteriora la calidad del semen. Se recomienda su uso para aumentar la fertilidad de sementales infértiles. Sin embargo esta técnica es clínicamente no factible debido a dificultades técnicas y económicas (40).

En un estudio se describe el impacto de la centrifugación en la viabilidad y funcionalidad de los espermatozoides equinos, se evaluó el impacto de la centrifugación en la calidad del semen de diez reproductores de raza criollo colombiano. El semen se dividió en cuatro proporciones iguales, tres de las cuales se centrifugaron a diferentes fuerzas (600 x g, 1200 x g y 1800 x g) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se analizaron la movilidad total, la movilidad progresiva, el potencial de membrana mitocondrial, la vitalidad espermática y la integridad del acrosoma (41).

El resultado de este estudio dio por conclusión que incluso niveles bajos de fuerza de centrifugación pueden afectar la calidad del semen equino (41).

7.3.6. Adición del diluyente de congelación

Importancia del crioprotector para la crioconservación

En la actualidad, existen muchos tipos de crioprotectores que se agrupan según las posibilidades de penetración o no en las membranas celulares. poseen componentes que permiten la supervivencia de los espermatozoides fuera del sistema reproductor reduciendo la cantidad de hielo presente a cualquier temperatura durante la congelación, moderando así los cambios en la concentración de solutos. Las lipoproteínas que están presentes en la leche o la yema de huevo protegen a los espermatozoides del choque térmico, también contiene sustratos metabolizables,

como la glucosa, que proporciona una fuente abundante de energía. Los diluyentes también incluyen antibióticos para prevenir el crecimiento de bacterias. (42) (43)

Crioprotectores permeables

Estos crioprotectores son de bajo peso molecular, como el glicerol, el etilenglicol, propilenglicol, dimetil sulfóxido y los compuestos pertenecientes al grupo de las amidas como la metilformamida o la dimetilformamida. Son permeables a través de la membrana celular y ayudan a reorganizar la membrana lipídica, incrementando su fluidez. Estos compuestos reducen la formación de hielo intracelular durante la criopreservación, mejorando la supervivencia de los espermatozoides. Además, actúan como solventes para azúcares y sales en el medio de congelación. Un crioprotector ideal penetra la membrana sin causar deshidratación osmótica ni toxicidad celular, evitando la deshidratación excesiva a concentraciones adecuadas. (44)

Glicerol: Sustancia protectora, no hay consenso sobre su concentración óptima en los diluyentes comerciales para equinos, lo que puede afectar negativamente la motilidad y fertilidad tras la descongelación de la muestra. En altas cantidades puede ser tóxico causando alteraciones citoplasmáticas y desnaturalización de proteínas. Este efecto tóxico principal puede ser provocado por el estrés osmótico durante las fases de incorporación y eliminación en el proceso de congelación y descongelación. (45)

Dimetil Sulfóxido: Este agente protector, debido a su bajo peso molecular (78.13 g/mol), puede atravesar rápidamente la membrana celular, evitando la formación de cristales intracelulares durante el proceso de criopreservación celular. (45)

Crioprotectores no permeables

Los crioprotectores no permeables son compuestos de alto peso molecular que no penetran la membrana plasmática del espermatozoide y funcionan externamente. Estos agentes, como la lactosa, la sacarosa, la glucosa y la trehalosa, se incorporan a los medios de congelación, generando una presión osmótica que previene la deshidratación celular y reduce la formación de hielo intracelular. Estos azúcares aumentan la fluidez de la membrana y protegen a los espermatozoides durante la congelación y descongelación. Los monosacáridos como la glucosa y la fructosa también son comunes en estos medios, proporcionando estabilización osmótica. El sorbitol, con una estructura similar al glicerol, es otro compuesto protector. (44)

Yema de huevo: Las lipoproteínas y fosfolípidos presentes en la yema de huevo actúan como protectores contra el daño por congelación. Aunque comúnmente se utiliza yema de huevo de gallina, también se han obtenido buenos resultados con yemas de huevo de otras especies como los patos. Hay diluyentes comerciales que incluyen fosfolípidos derivados de la lecitina de soya, mientras que otros no los contienen, por lo que se añade yema de huevos frescos. Normalmente, los huevos se limpian y se utilizan separadores de yema para retirar el exceso de clara con papel filtro antes de añadir la yema al diluyente. (45)

Leche descremada: Los diluyentes a base de leche descremada en polvo son frecuentemente utilizados para diluir semen en la Inseminación Artificial, ya sea con semen fresco o refrigerado, debido a su capacidad para mantener la motilidad espermática y la fertilidad. La leche descremada UHT o la leche descremada en polvo reconstituida (10 g de leche en polvo con 0,1% de grasa en 100 ml de agua destilada) pueden usarse como diluyentes para la preservación de semen equino refrigerado. Se recomienda evaluar diferentes marcas de leche descremada en polvo y UHT, ya que los resultados pueden variar entre ellas. Estos diluyentes proporcionan caseína, fosfocaseinato y beta lactoglobulinas, que protegen contra el estrés por frío. (45)

El uso de yema de huevo y leche en los diluyentes de congelación para caballos presenta problemas, principalmente por el riesgo higiénico asociado a productos de origen animal. Esta práctica puede introducir contaminación microbiana en las muestras de semen, llevando a la producción de endotoxinas que afectan la fertilidad de los espermatozoides. (44)

En una investigación se comparaba un diluyente de Lactosa-glicerol-yema de huevo y un diluyente de INRA-D-formamida-yema de huevo, para el desarrollo de esta investigación se tomó muestras de semen de doce sementales que fueron analizadas por examen macroscópico y microscópico. Los resultados mostraron que el diluyente INRA-D-formamida-yema de huevo obtuvo mejores resultados en términos de motilidad y cantidad de espermatozoides vivos. Sin embargo, no hubo diferencia significativa en las morfoanomalías entre los dos diluyentes. También menciona que el semen diluido con INRA 96 y mantenido a 15 °C durante 72 horas resultó en un 48% de fertilidad por ciclo. (46)

Alternativas de diluyente:

La soya contiene lecitina, una fracción de fosfolípidos que puede reemplazar a las lipoproteínas de alto peso molecular y los fosfolípidos de la yema de huevo, ayudando a prevenir el daño a la membrana plasmática del espermatozoide durante el enfriamiento y la conservación. Los

diluyentes basados en lecitina de soya han sido evaluados para el procesamiento y congelación del semen, siendo una alternativa viable. (45)

7.3.7. Composición de los diluyentes

INRA Freeze®: Es un diluyente de congelación que contiene: glicerol y plasma de yema de huevo, así como antibióticos sulfato de gentamicina, penicilina sódica y anfotericina. (47)

El almacenamiento de este diluyente es a temperatura ambiente, se debe asegurar que este correctamente cerrado apartado de lugares que ocasionen su contaminación y para su utilización se debe mantener a una temperatura de 37,5° en la plancha térmica. (47)

Crio RAMP: Es un diluyente de origen animal, que viene como un kit de reconstitución para la crioconservación de semen equino, contiene principios activos como aminoácidos, promotores de energía, protectores de membrana como antioxidantes. Contiene un crioprotector que evita el daño del DNA y bacteriostáticos en bajas temperaturas. Permite conservar la integridad espermática desde su interior hasta sus membranas, facilitando la capacidad de fertilización tras descongelar. (48)

Preparación para un volumen de 90ml

Tabla 2 Preparación del diluyente Crio RAMP (48)

PASOS	PROCEDIMIENTO
1	Adicionar al contenido 81 ml de agua estéril a 37°C
2	Homogenizar por un periodo mínimo de 10 minutos
3	Adicionar 4,5 ml de CRIOPROTECTOR RAMPCO
4	Mantener a 30°C
5	Homogenizar por un periodo mínimo de 5 minutos
6	Agregar 4,5 ml de yema de huevo
7	Homogenizar por un periodo mínimo de 10 minutos.
8	Dividir el volumen para uso inmediato y futuras congelaciones

Cabe recalcar que el diluyente debe mantenerse en un lugar fresco, seco alejado de la luz a temperatura de 15 – 20° y una vez que se encuentre reconstituido puede permanecer congelado por un máximo de 90 días. (48)

7.3.8. Envasado

El semen se envasa en pajuelas medianas de 0,5ml o pajuelas finas de 0,25ml mediante equipos automatizados o manualmente. Una vez llenas, las pajuelas deben sellarse utilizando una de las diversas técnicas disponibles, como alcohol polivinílico en polvo, bolas de metal y vidrio o selladores ultrasónicos. Es importante que haya una burbuja de aire en el centro de la pajuela para permitir la expansión del fluido durante la crioconservación y evitar la rotura de la pajuela durante la descongelación. (49)

Este tipo de envasados aseguran niveles adecuados de fertilidad, facilitan el procesamiento, optimizando el uso del espacio en el botellón y brindan protección sanitaria al semen durante los procesos de congelación y descongelación. (50)

7.3.9. Refrigeración

En la mayoría de los casos, se requiere una etapa de enfriamiento y equilibrio de las células espermáticas en el diluyente de congelación. Esto permite cierta deshidratación y estabilización de las células, dependiendo de las diferencias en permeabilidad y peso molecular entre los crioprotectores y las soluciones fisiológicas. Tanto las tasas de equilibrio y enfriamiento como las de congelación deben ajustarse según la composición del medio de congelación utilizado para optimizar los resultados. (20)

La temperatura del semen puede bajar de 37 °C al momento de la extracción a 20 °C sin efectos adversos para la motilidad, pero reducirlo a temperaturas de entre 19 °C y 8 °C son perjudiciales para el esperma equino. Posteriormente el enfriamiento entre 8 °C y 5 °C puede ser rápido y es aquí donde la membrana espermática transita de una fase líquida cristalina al estado de gel y por lo tanto la ocurrencia de un choque térmico ocasionaría la pérdida de motilidad y fertilidad de los espermatozoides. (27)

Según el artículo titulado sobre los efectos de la temperatura y el almacenamiento de semen equino, evaluó los efectos de la temperatura de refrigeración (5°C y 15°C) y el tiempo de almacenamiento (0, 12, 24, 48 y 72 horas) en los marcadores apoptóticos del semen equino. Se analizaron el índice de translocación de fosfatidilserina de la membrana, el índice de activación de caspasa y el índice de fragmentación de ADN mediante microscopía de epifluorescencia. Los resultados demostraron que, para una duración de transporte inferior a 24 horas, la calidad del semen se mantuvo cuando se almacenó a 5°C o 15°C. Se recomienda una temperatura de

almacenamiento de 5°C cuando sea necesario transportar el semen durante más de 24 horas. Después de 48 horas de refrigeración, se observó una disminución significativa en la calidad del semen. (51)

Por otra parte, se ha investigado sobre el congelamiento de semen de burro, donde se propuso un método de enfriamiento casero para el semen, en el cual la temperatura se reduce gradualmente de 22 a 8 °C durante 35 minutos, Después, el semen se estabiliza en la nevera durante 25 minutos antes de iniciar el proceso de congelación. Este enfoque ha demostrado resultados favorables en la fertilidad de caballos de las razas Bretón y Mangalarga Marchador. Es crucial enfriar gradualmente el semen dentro del rango de temperatura donde los espermatozoides son más susceptibles al choque térmico. Las tasas de enfriamiento se dividen en tres categorías: lentas (<-0.33 °C/min), medias (-0.33 a -1.0 °C/min) y rápidas (>-1.0 °C/min). Sin embargo, para asnales con semen mantenido a 5 °C, las curvas de enfriamiento óptimas fueron de -0.6 a -1.0 °C/min. (39)

7.3.10. Congelación y almacenamiento

Las células espermáticas deberán atravesar un proceso de descenso de temperatura entre -15°C hasta -50 °C, en donde existe el mayor riesgo de pérdida de motilidad y fertilidad. El espermatozoide alcanza un estado de anabiosis al llegar a -196 °C. (27)

Cuando la temperatura desciende por debajo de los -5 °C, se forman cristales de hielo en el líquido extracelular. En este punto, la tasa de enfriamiento debe ser lenta para permitir cierta deshidratación, ya que una congelación muy rápida del líquido intracelular forma grandes cristales. Sin embargo, no debe ser demasiado lenta dado que esto lleva a una condición hiperosmótica por deshidratación severa, lo cual puede causar desnaturalización de macromoléculas, encogimiento excesivo y un irreversible colapso de la membrana celular. (52)

Sistemas de congelación:

Criopreservación con nitrógeno líquido manual

Emplea una curva de congelación en la que las pajuelas experimentan un descenso gradual de la temperatura. Esto asegura que los espermatozoides no mueran durante el proceso. Inicialmente, las pajuelas se colocan horizontalmente a unos 4 a 6 cm por encima del nivel del nitrógeno durante 7 a 20 minutos. La velocidad de congelación puede variar según la altura de la pajuela, pero generalmente es rápida. Luego, las pajuelas se sumergen en nitrógeno líquido,

donde pueden almacenarse indefinidamente, manteniendo una viabilidad del 30-35% después de la descongelación. (20) (53)

Criopreservación mediante sistemas automatizados (bio congeladores)

Son dispositivos modulares que regulan la temperatura. Están equipados con una criocámara, un criobañero y un estuche para transporte. Estos biocongeladores permiten una congelación precisa y uniforme de un gran número de dosis en un período de tiempo determinado. Se ha registrado la capacidad de congelar más de 500 dosis seminales, asegurando condiciones de congelación consistentes en cada una de ellas. (54)

Estos sistemas de congelación utilizan curvas de congelación que combinan diferentes velocidades de enfriamiento, una primera velocidad de $-10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ para cambiar la temperatura del semen desde $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y una segunda velocidad de $-25\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ a $-60\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ para reducir la temperatura hasta $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$. (27)

7.3.11. Descongelación del semen

Estudios previos recomiendan la descongelación rápida del semen en baños de agua tibia ($35\text{-}37^{\circ}\text{C}$) por 30-35 segundos. Sin embargo, los protocolos varían según el sistema de envasado y la velocidad de congelación, por ejemplo, con micropajuelas la descongelación sería a 37°C por 0,5-1 minuto o a 75°C por 7 segundos seguidos de 37°C por 15 segundos, y en macropajuelas a 50°C por 45 segundos. (55) (20)

7.4. Evaluación de la Calidad del Semen

Antes de la evaluación del semen, se debe eliminar la fracción de gel, que es la última secreción y contiene pocos espermatozoides. Esto se puede hacer mediante aspiración con una jeringa estéril o filtración que incluye en la vagina artificial. (56)

El examen clínico no sólo ayuda a identificar patologías en el tracto genital, sino también a estimar la producción espermática prevista. En el laboratorio, el semen se evalúa básicamente analizando el volumen, la concentración espermática, la motilidad y la morfología de los espermatozoides. Estos parámetros permiten evaluar la producción y la calidad del esperma, así como predecir la eficacia de la monta natural y la producción potencial de dosis de semen fresco o refrigerado. (57)

7.4.1. Características macroscópicas del semen equino

7.4.1.1. Volumen

Durante la recolección, se filtra el semen para obtener un volumen libre de gel. El volumen del eyaculado en caballos puede variar entre 20 y 250 ml. Es importante señalar que existen varios factores que pueden afectar el volumen de semen en un semental, como la edad, la raza, el régimen sexual, los métodos de recolección, el nivel de estimulación y la época del año. (58) (59)

7.4.1.2. pH

El pH del semen en los caballos oscila entre 7.2 y 7.7. Existe una relación inversa entre el pH y la concentración de espermatozoides, es decir cuando la concentración es menor, el pH es más alto. Para medir el pH, se puede utilizar un potenciómetro o, de manera menos precisa, cintas indicadoras de pH. Es importante medir el pH inmediatamente después de la recolección, ya que el reposo del eyaculado puede generar la formación de ácido láctico. (60) (46)

7.4.1.3. Color

El color normal del semen equino va desde blanco acuoso hasta blanco grisáceo-crema, dependiendo de la concentración espermática. Sin embargo, cualquier cambio en la coloración u olor del semen puede ser un indicador de problemas. Por ejemplo: un tono rosado podría señalar heridas o fragilidad capilar, color amarillo podría indicar la presencia de orina y si es de un tono amarillo verdoso se entendería como un indicador de pus. (59)

7.4.1.4. Olor

Propio, dado por la espermina o denominado sui generis. (61)

7.4.2. Características microscópicas del semen equino

7.4.2.1. Motilidad Masal

La evaluación de la motilidad de los espermatozoides de los sementales es crucial en la reproducción equina. Se evalúa el movimiento colectivo de los espermatozoides en una muestra de semen (62), observada bajo un microscopio de campo claro, generalmente a un aumento de 100x a 200x, la evaluación suele ser subjetiva y se basa en la observación de patrones de movimiento globales, como remolinos o ondas. (63)

Los estudios han demostrado que se pueden emplear varios métodos para evaluar la motilidad con precisión, incluidos los sistemas de análisis de semen asistido por computadora (CASA) como el analizador de motilidad de Hamilton-Thorn (HTMA). (64) (65)

Los criterios de evaluación de la motilidad masal se clasifica típicamente en una escala cualitativa que puede variar según el laboratorio, pero generalmente incluye categorías como: (66)

Tabla 3. Categorías Motilidad Masal

CATEGORIA	CRITERIO
Excelente	Movimiento masal muy activo con patrones claros y rápidos de remolinos.
Bueno	Movimiento masal activo con patrones claros pero más lentos.
Regular	Movimiento masal débil con patrones menos definidos.
Pobre	Poco o ningún movimiento masal visible.

7.4.2.2.Motilidad Individual o progresividad

Se calcula como el porcentaje de espermatozoides móviles observados bajo un microscopio óptico con un aumento de 40X, a una temperatura de 37°C. (67)

La progresividad del semen indica el porcentaje general de espermatozoides que se mueven más o menos en línea recta. Generalmente para que un espermatozoide equino se considere progresivo, debe demostrar un 75% o más de rectitud. (68)

Tabla 4 Categorías de motilidad progresiva (69)

CATEGORÍA	MOVILIDAD PROGRESIVA (%)
MUY BUENA	80 – 100
BUENA	60 – 79
REGULAR	40 – 59
Pobre	menos del 40 %

7.4.2.3. Concentración Espermática

La concentración espermática es un parámetro crucial para estimar la fertilidad de un semental. Para calcularla, se utiliza una cámara de Neubauer, esta cámara posee dos compartimentos reticulados independientes, por lo tanto, se realiza el recuento en las dos cámaras y se promedia el resultado. En total, hay 256 cuadraditos en la cámara, cada uno con una superficie individual de $1/400 \text{ mm}^2$. El cubre cámara debe adherirse a la superficie de manera tal que en los bordes se observe un fenómeno de difracción de la luz comúnmente denominado “anillos de Newton”. El cubre debe quedar fijo y adherido sin deslizarse. Para realizar el recuento, se debe diluir una proporción de 20 μl de semen con 4 ml (4000 μl) de una solución espermicida. Después de diluir la muestra de semen, se cuentan los espermatozoides en 80 cuadraditos (5 cuadrados grandes), generalmente se eligen los cuatros de las esquinas y uno central. (70)

7.4.2.4. Vigor

Se evalúa a la par con la motilidad individual, teniendo en cuenta la velocidad con la que estos espermatozoides atraviesan el campo. La escala que se utiliza es de 0 (espermatozoides inmóviles) a 5 espermatozoides que avanzan rápidamente por el campo, con dificultad para visualizarlos.) (59)

7.4.3. Control de calidad post descongelación

El semen utilizado para la producción de pajuelas ya tiene su apto reproductivo, por lo tanto, la evaluación post descongelado tiene como finalidad conocer si ese semen fue capaz de superar el proceso de congelación-descongelación. Los factores que pueden afectar los valores de evaluación corresponden a factores intrínsecos del semen, o factores de manejo del mismo como la falta de Nitrógeno líquido en el termo de almacenamiento, incorporación de las pajuelas bruscamente al termo de almacenamiento etc. (71)

7.5. Mecanismo de crio lesión en el semen equino

Las criolesiones alteran la capacidad de unificación de las membranas y las vías de transducción de señales, afectando y disminuyendo las respuestas bioquímicas normales y la durabilidad de los espermatozoides tras la descongelación. (72)

7.5.1. Estrés Oxidativo

Ciertos niveles de radicales libres son necesarios para el funcionamiento normal de los espermatozoides, incluidos procesos como la capsulación, la hiperactivación, la reacción acrosómica, la fusión con el ovocito y la fecundación. Sin embargo, la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS), como el anión superóxido (O_2^-), el anión hidroxilo (OH^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como precursor de los radicales libres, puede desbordar la capacidad antioxidante del semen. Esto provoca un "estrés oxidativo" que daña la estructura de la cromatina, las membranas y las proteínas de los espermatozoides. (73) (74)

Los espermatozoides equinos producen ROS de forma natural, principalmente a través del metabolismo mitocondrial y de una enzima específica de los espermatozoides, la NADPH oxidasa (NOX5), localizada en la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide equino. El peróxido de hidrógeno es la especie más reactiva implicada en el daño del espermatozoide equino y se genera a partir del anión superóxido, la principal ROS producida en el espermatozoide debido a la rápida acción de la superóxido dismutasa. Puede afectar a la membrana del espermatozoide durante diversos tratamientos del semen, como la adición de diluyentes, la centrifugación y la refrigeración a 4-6°C. (75)

7.5.2. Estrés Osmótico

Durante la criopreservación, los espermatozoides equinos están expuestos a medios con diferentes osmolaridades (76).

El estrés osmótico se ha asociado a efectos negativos sobre la motilidad, la viabilidad y el potencial de membrana mitocondrial de los espermatozoides equinos. Esto podría estar relacionado con el estrés oxidativo, ya que el estrés osmótico puede aumentar la producción de aniones superóxido en los espermatozoides de caballo tanto en condiciones hipotónicas como hipertónicas (77).

En resumen, durante la criopreservación del semen equino, se produce un doble estrés osmótico. Primero, los cristales extracelulares generan un medio hiperosmótico que provoca la pérdida de agua intracelular y la disminución del volumen celular. Segundo, en la descongelación, el medio extracelular recupera su osmolaridad inicial, exponiendo a los espermatozoides a un ambiente hipoosmótico que aumenta su volumen debido a la entrada de agua en las células (40).

7.5.3. Estrés Térmico

Se sabe que enfriar rápidamente el semen desde 30 °C hasta 0 °C causa un estrés severo en algunas células, y este estrés está relacionado con la velocidad de enfriamiento. Por lo tanto, es crucial manejar con cuidado el enfriamiento dentro de este rango de temperaturas (78).

Durante el enfriamiento, la membrana plasmática de los espermatozoides se encuentra principalmente entre 5 °C y 15 °C. La composición lipídica de esta membrana es crucial, ya que está relacionada con el daño causado por el enfriamiento. Agregar preparaciones lipídicas purificadas a los espermatozoides reduce significativamente el impacto negativo del ‘shock de frío’ y el daño durante la congelación y descongelación (78).

Por ejemplo, cuando se agrega trehalosa al diluyente seleccionado, esta interactúa con los lípidos de la membrana, aumentando su estabilidad y limitando la fase de transición. Esto ejerce un efecto estabilizador en la membrana, lo cual explica su acción crioprotectora (78).

7.5.4. Apoptosis

La apoptosis puede producirse en todas las células, dando lugar a la muerte celular programada. Este proceso fisiológico afecta a células individuales induciendo cambios morfológicos y bioquímicos que conducen a la muerte celular. Se ha demostrado que la apoptosis ocurre durante la espermatogénesis como un evento homeostático, ayudando a equilibrar las células nuevas y viejas, contribuyendo al desarrollo normal de las células germinales. La apoptosis espermatogénica también ayuda a mantener el equilibrio entre células germinales y somáticas (79).

Al momento del procesamiento del semen se suele pasar por alto la presencia de microbios en la muestra del eyaculado esto a causa de la apoptosis. A partir de un estudio realizado recientemente se ha demostrado que el eyaculado de los sementales es más similar al de los humanos debido a las bacterias que inducen a la apoptosis y necrosis de los espermatozoides; a la par la flora microbiana juega un papel crítico en el daño apoptótico subletal que experimentan los espermatozoides de los sementales durante la criopreservación y el almacenamiento en frío (79).

8. METODOLOGÍA

La metodología empleada en esta investigación responde a los siguientes parámetros:

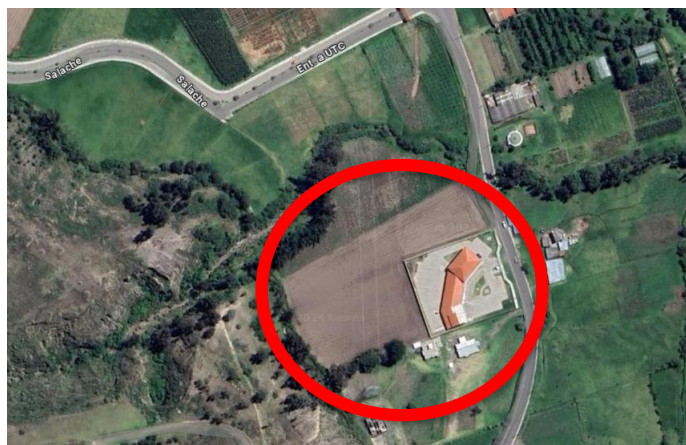
8.1. Diseño pre-experimental

En esta investigación el diseño utilizado fue el pre-experimental, que basó en un enfoque de investigación de un solo grupo con controles mínimos como primera aproximación para el aporte y resolución para marcos teóricos de investigaciones futuras.

8.2. Condiciones ambientales:

La investigación se llevó acabo en las instalaciones de la Clínica Veterinaria que pertenece a la Universidad Técnica de Cotopaxi, Facultad CAREN (Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales) en el barrio Salache bajo en la ciudad de Latacunga de la provincia de Cotopaxi, se localiza a una Latitud de 00 59' 47.68" N a una longitud de 78 37' 19.16" E y a una altitud de 2757.591 msnm.

Imagen 1 Captura satelital de la clínica veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi
(80)



El clima es subhúmedo temperado, con una temperatura media anual que oscila entre los 12 y 18° C y la precipitación media anual es superior a 300mm., e inferior a 600mm. Los meses que presentan un ligero aumento en la temperatura mensual son: enero, febrero, marzo y abril mientras que los meses que presentan una disminución de temperatura son: junio, julio y agosto, que coinciden con los meses de heladas. La temporada lluviosa comienza a partir del mes de octubre y se intensifica desde enero hasta abril, intercalada con una estación seca que va desde mayo hasta septiembre. Alrededor de seis y siete meses son ecológicamente secos, y va de mayo hasta noviembre. Ecológicamente no hay meses húmedos (81).

Los suelos del lugar se caracterizan por ser suelos profundos, medios y superficiales; las texturas van de franco areno y hasta franco arcilloso. El pH varía de neutro a ligeramente alcalino (82).

8.3.Unidades experimentales

Para el desarrollo de esta investigación, se utilizó muestras seminales de dos equinos previamente entrenados, uno de raza árabe y otro de raza lusitano, ambos con edades comprendidas entre los 4 y 5 años. Se obtuvieron un total de 50 pajuelas de los dos sementales mediante la técnica de extracción con vagina artificial, realizada durante un día cada semana por tres semanas. Las muestras fueron crioconservadas en nitrógeno líquido a -196°C , con tiempos de estabilización de 3, 6 y 9 horas.

Tabla 5 Datos de los sementales

DATOS DE LOS SEMENTALES		
Nombre	Azim	Lusitano
Edad (años)	6	4
Raza	árabe	española
Color	Capulí	Negro
Alimentación	Pasto y balanceado	Pasto y balanceado
Peso (aproximado)	500	500
Ubicación	Salache bajo UTC	Salache bajo UTC
Lugar de mantenimiento	Potrero	Potrero
Actividad que realiza	Alta escuela	Proceso de doma

Montas naturales	2	0
Colectas con vagina artificial	5	5

8.4. Protocolo para la evaluación del tiempo de estabilización de crioconservación de semen equino

Todo procedimiento en relación para la producción y reproducción animal requiere el cumplir sistemáticamente pasos que garanticen resultados fiables y comparables, lo cual permita la aplicación en futuros proyectos relacionados al tema de la crioconservación de semen equino. A continuación, se detalla el procedimiento.

8.4.1. Procedimiento metodológico para la aplicación de la técnica de crioconservación

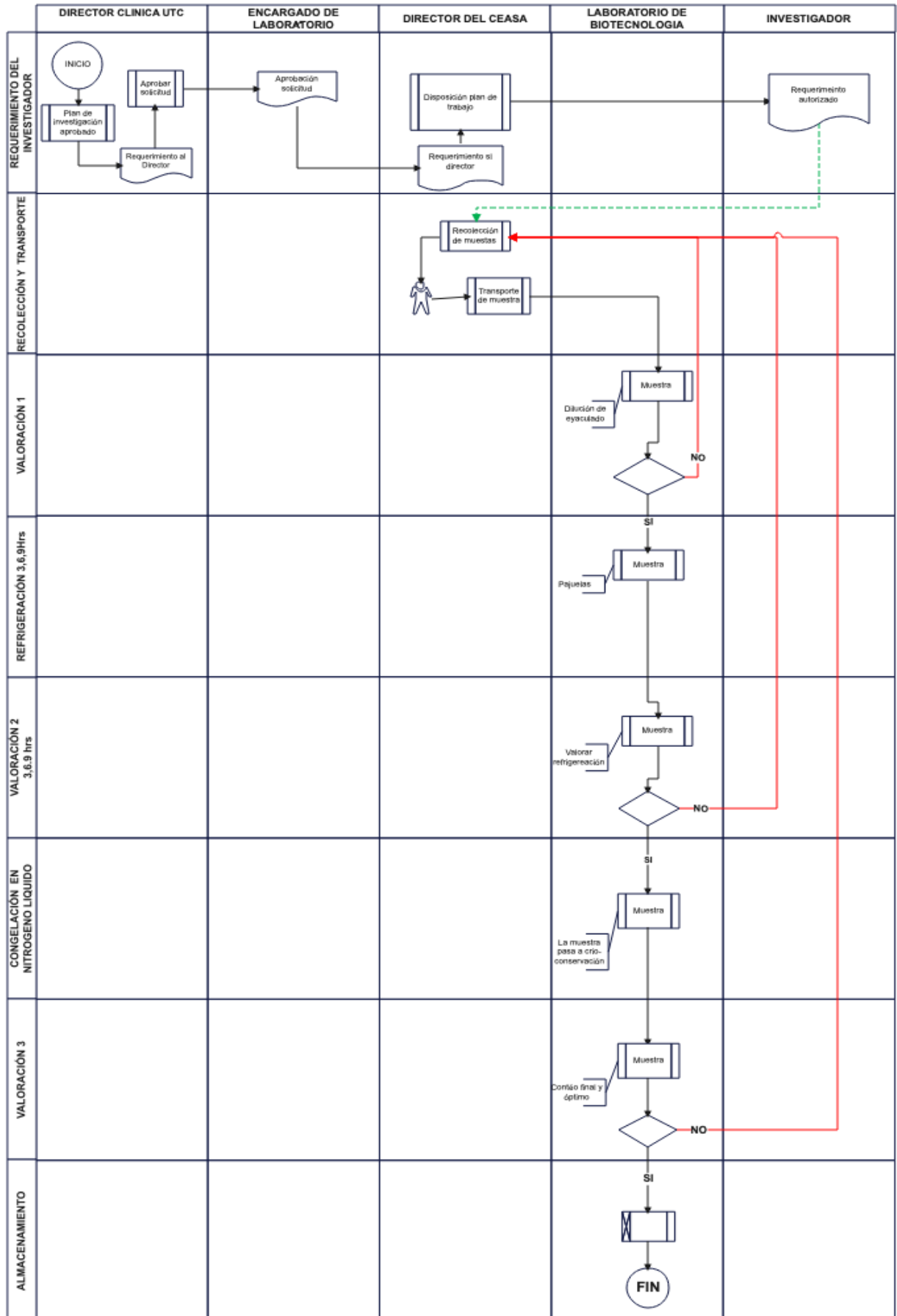
FASES	DESCRIPCIÓN PROCESOS Y ACTIVIDADES
I	APROBACIÓN DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN
II	INICIO DE LA ACTIVIDAD
	Evaluación del tiempo de estabilización de crioconservación de semen equino utilizando dos diluyentes de origen animal en equinos del CEASA - Salache bajo – Latacunga
III	REQUERIMIENTO DEL INVESTIGADOR
	Presentar una solicitud dirigida al Director encargado del CEASA, solicitando la utilización de los equinos.
	Presentar una solicitud dirigida al director encargado de la clínica veterinaria, solicitando la utilización de los laboratorios; documento que luego de ser aprobado será remitido al encargado de los laboratorios para proceder a ejecutar lo solicitado.
IV	RECOLECCIÓN Y TRANSPORTE
	Día de recolección de la muestra seminal
	Para garantizar la vialidad y calidad del semen es importante la desinfección del área de trabajo y la preparación del equipo, todo material que se incluya en el análisis del eyaculo debe estar temperado a 37,5°C.

FASES	DESCRIPCIÓN PROCESOS Y ACTIVIDADES
	Comenzamos con la preparación de la vagina artificial específicamente diseñada para equinos en esta investigación utilizaremos la vagina Colorado, debe contener todos los componentes necesarios para filtrar y almacenar el semen temporalmente.
	Es crucial que la vagina artificial mantenga una temperatura de 40° a 47°C junto con una presión adecuada.
	La vagina artificial debe ser lubricada con una cantidad generosa de gel no espermicida esto para asegurar la estimulación adecuada del equino y facilitar la eyaculación.
	Al semental se lo pone en presencia de una yegua en estro y se mantiene ahí hasta que alcance una erección completa.
	Al momento del salto del semental el operador dirige el miembro del animal hacia la entrada de la vagina artificial.
	El operador puede identificar fácilmente la eyaculación
	El eyaculado obtenido es trasladado hacia el laboratorio de biotecnología para su respectiva evaluación.
V	VALORACIÓN # 1
	La muestra obtenida se somete a un análisis exhaustivo tanto macroscópico como microscópico. La decisión de incluir la muestra en la siguiente evaluación para la criopreservación se basa en su viabilidad.
	Para utilizar la cámara de Neubauer, se mezclan 95 microlitros de agua con 5 microlitros de eyaculado. Esto permite observar la concentración espermática. Luego, se realiza el recuento en ambas cámaras y se calcula el promedio de los resultados.
	Se recalca que la muestra y diluyentes debe permanecer a 37°C, para ser evaluada correctamente
	Luego del análisis, se divide el eyaculado en dos tubos Falcon de 15 ml, con igual cantidad de semen en cada uno.
	La dilución del eyaculado se realizará utilizando dos tipos de diluyentes de origen animal.
	El primer diluyente comercial utilizado se denomina INRA FREEZE. Se añadirá al tubo en la misma proporción que el eyaculado, es decir, en una relación 1:1

FASES	DESCRIPCIÓN PROCESOS Y ACTIVIDADES
	El segundo diluyente utilizado se denomina CRIO RAMP (diluyente en polvo) para la preparación de este diluyente se deberá seguir instrucciones específicas del producto.
	Una vez preparado el diluyente CRIO RAMP se añade al segundo tubo en la misma proporción que el eyaculado, es decir, en una relación 1:1
	Después de homogeneizar el eyaculado con el diluyente, se colocarán los tubos en la máquina centrifugadora a una velocidad de 4,000 gauss durante 15 minutos
	Transcurridos los 15 minutos, se retiran los tubos y se puede observar el sedimento que se encuentra en la parte inferior. El sobrante se desecha
	Al sedimento obtenido se le añade más diluyente en una proporción de 1:7 y se debe homogeneizar hasta que el sedimento esté completamente mezclado con el diluyente.
	En el anterior paso la proporción de diluyente que se añade dependerá de la concentración de semen que se desee. Ejem:(1:5)(1:6), etc.
VI	REFRIGERACIÓN 3 - 6 - 9 hrs
	Para la refrigeración de la muestra se debe depositar en pajuelas de 0,5 ml.
	La cantidad de pajuelas dependerá de la concentración obtenida.
	Para saber el número de pajuelas que se obtendrán se debe realizar el cálculo de V (volumen) x C (concentración) x MI (motilidad individual) x A (anormalidades)= ?
	las pajuelas deberán ser marcadas y selladas.
	El proceso de sellado se realiza utilizando un polvo de polivinilico que, al entrar en contacto con el agua, se endurece. También es posible sellar las muestras con un sellador manual de esferas.
	El total de pajuelas se dividió en 3 grupos para su respectiva refrigeración de cada tiempo establecido.
VII	VALORACIÓN # 2: (3-6-9 hrs)
	Transcurrido las 3 , 6 , 9 horas de cada grupo de pajuelas, se selecciona una para la respectiva evaluación, una para su congelación y las restantes para su almacenamiento.
	Se debe cortar el extremo distal de la pajuela, introducirlo en un tubo eppendorf 2ml y cortar el extremo proximal. El contenido caerá en el tubo.

FASES	DESCRIPCIÓN PROCESOS Y ACTIVIDADES
	En este contenido se debe evaluar tres parámetros: motilidad individual (%), vigor (1-5) y progresividad (%)
VIII	CONGELACIÓN EN NITRÓGENO LÍQUIDO
	En una unidad de congelación para pajuelas se añade de 4 a 6 cm de nitrógeno líquido.
	Las pajuelas que van saliendo de refrigeración, se las coloca a la unidad de congelación para pajuelas.
	Estas deberán estar de 15 a 20 min en congelación.
IX	VALORACIÓN # 3
	Para la evaluación de la muestra, se debe descongelar la pajuela a una temperatura de 37°C a baño maría por 30 seg.
	Secar la pajuela externamente
	Se debe cortar el extremo distal de la pajuela, introducirlo en un tubo eppendorf 2ml y cortar el extremo proximal. El contenido caerá en el tubo.
	Para la valoración microscópica se debe añadir 5 microlitros de la muestra sobre un portaobjetos y colocar el cubreobjetos, esta muestra va directamente bajo el microscopio.
	Nuevamente se evalúa los tres parámetros: motilidad individual, progresividad y vigor.
X	ALMACENAMIENTO
	<p>Una vez que las muestras han sido aprobadas, se almacenan en goblets, los cuales a su vez se colocan en escalerillas metálicas dentro de un termo con nitrógeno líquido a una temperatura de -195°C.</p> <p>Cabe mencionar que mientras se almacenan las pajuelas en los globets tiene que ser dentro de la unidad de congelación para que no pierdan la temperatura en la que se encuentran.</p>

8.5. Flujo del Protocolo para la evaluación del tiempo de estabilización de crioconservación de semen equino



8.6. Insumos de laboratorio para la evaluación del tiempo de estabilización de crioconservación de semen equino.

Proceso	Ítems	Cantidad	Descripción
Recolección	Equipo	1	Vagina artificial colorado 53 cm (21")
	Paquete	1	Bandas de elástico
	Paquete	1	Filtros de nylon
	Individual	2	Mangas de látex
	Rollo	2	Mangas interiores desechables
	Paquete	1	Gel estéril no espermicida
Laboratorio	Frasco	2	Vasos de precipitación de 100 ml - 200ml
	Caja	1	Punta de pipeta amarilla
	Equipo	2	Pinza Quirúrgica o anatómica
	Equipo	1	Unidad de congelación para pajuelas
	Equipo	1	Pipeta mecánica 10 – 100 μ L
	Paquete	1	tubos eppendorf 2ml
	Paquete	1	tubos falcon 10 - 15 ml
	Paquete	1	pajuelas de 0,25ml o 0,50ml
	Equipo	1	placa calefactora
	Equipo	1	Termómetro
	Equipo	1	Termómetro para refrigeradora
	Equipo	1	Centrifugadora
	Equipo	1	Gradilla
	Equipo	1	cámara de neubawer
	Equipo	1	Microscopio
	Contenedor	1	contenedor de nitrógeno 690 mm
	Equipo	1	refrigerador
	Paquete	2	Guantes de nitrilo
	Paquete	2	Mascarillas
	Paquete	5	Cubre objetos
Paquete	5	Porta objetos	
Litros	30	Nitrógeno líquido	

Diluyentes	Frasco	1	INRAFreeze: Diluyente de congelación (animal)
	Frasco	1	CrioRAMP: diluyente de congelación (animal)

9. RESULTADOS DE ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Para obtención de los resultados que a continuación se describen el proceso de investigación se dio en un lapso de 6 meses.

Tabla 6. Análisis Macroscópico

Reproductor	Extracción	Color	Olor	Ph	Volumen(ml)	Concentración (millones/ml)
1	1	Gris	sui generis	7	15	128
1	2	Gris	sui generis	8	35	494
1	3	Gris	sui generis	7	25	297
2	1	Gris	sui generis	6,5	5	131
2	2	transparente	sui generis	8	4	112
2	3	transparente	sui generis	0	0	0

Fuente: Elaboración propia.

Según la tabla obtenida, se observa que el color del eyaculado del primer y segundo reproductor se torna grisáceo debido a la contaminación ambiental y los desechos que se encuentran alrededor del aparato reproductor del semental. Una de las causas de estos factores es el temperamento de los sementales, ya que no han sido habituados a este tipo de actividades. Por ende, no se logró realizar la debida limpieza del aparato reproductor. Además, el sitio donde se recolectó tenía elevaciones de tierra, lo cual provocaba que, al movilizar a los sementales, se levantara polvo.

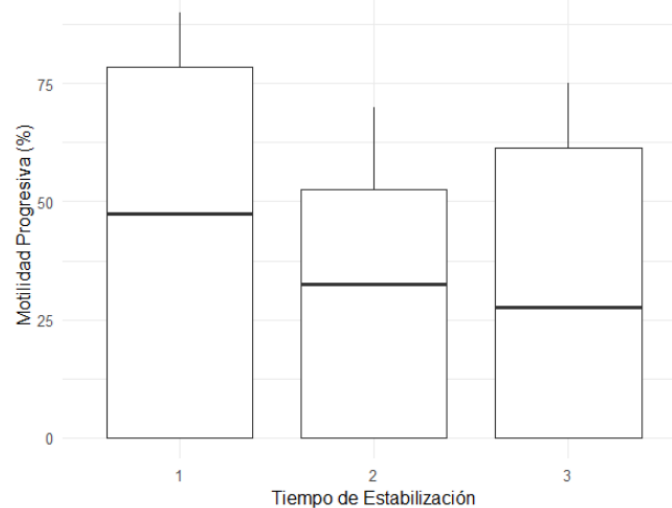
El olor es propio de la raza. El pH nos muestra que está dentro de los valores normales del semen equino. Sin embargo, en caso de existir un aumento o disminución notable en los valores, esto puede deberse a infecciones o inflamaciones en el tracto reproductor, afectando la fertilidad y calidad seminal.

Según la literatura, el volumen típico de un equino macho suele ser de 30 a 250 mililitros (83). No obstante, los resultados observados indican que el volumen del segundo reproductor de raza

pura árabe tiene un promedio de 4,5 mililitros de eyaculado (84). Por ende, hay que tomar en consideración que estos valores pueden variar según el manejo, la frecuencia de recolección, el clima, las infecciones y las deficiencias nutricionales

La concentración de espermatozoides suele variar entre 200 millones y 800 millones (85). Los valores obtenidos del primer reproductor se encuentran dentro de los rangos típicos, mientras que los del segundo reproductor son menores. Esto sugiere que hay influencias tanto internas (congénitas) como externas (estrés, nutrición, clima, manejo).

Gráfico 1. Motilidad Progresiva por tiempo de estabilización

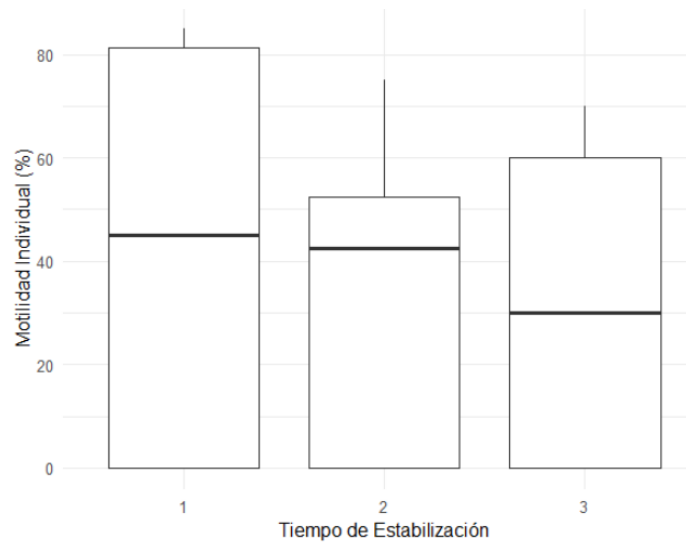


Nota. 1=3 horas; 2=6 horas; 3=9 horas.

Los resultados indican que la motilidad progresiva de los espermatozoides está relacionada de forma negativa con el tiempo de estabilización. A medida que aumenta el tiempo de estabilización, la motilidad de los espermatozoides disminuye, en el tiempo de 3 horas la motilidad de los espermatozoides disminuye al 50%; en el tiempo de 6 horas, la motilidad disminuye al 25%; y en el tiempo de 9 horas la motilidad disminuye a un porcentaje aún menor.

La mediana obtenida del primer tiempo de estabilización es de 47,5 el segundo tiempo 32,5 y del tercer 27,5 dándonos un valor de $p=0,779$.

Gráfico 2. Motilidad Individual por tiempo de estabilización

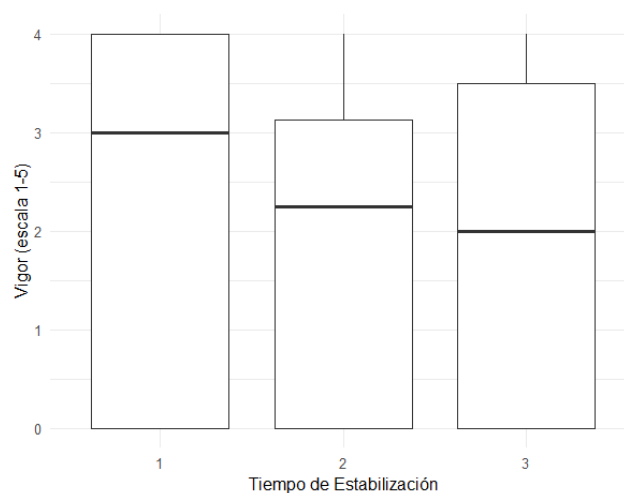


Nota. 1=3 horas; 2=6 horas; 3=9 horas

El gráfico 2 muestra que la viabilidad de los espermatozoides individuales de los caballos disminuye con el aumento del tiempo de estabilización. En el grupo con el tiempo de estabilización más largo de 9 horas muestra que la viabilidad de los espermatozoides individuales fue del 20 %, el de 6 horas es de 40% y el de 3 horas es del 80%. este hallazgo es importante para el almacenamiento y el transporte de muestras de semen.

Las medianas dadas fueron de 45, 42,5 y 30 respectivamente, el valor de $p=0,715$

Gráfico 3. Vigor por tiempo de estabilización



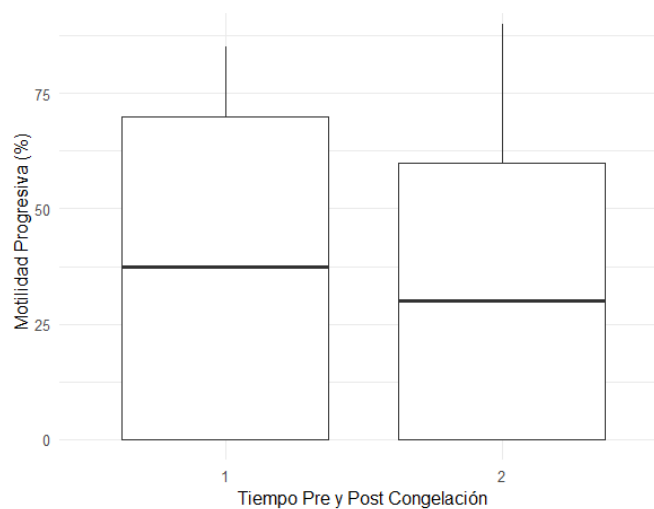
Nota. 1=3 horas; 2=6 horas; 3=9 horas

Los resultados del gráfico 3 nos indican que los tiempos de estabilización de 6 horas y 9 horas parecen tener un vigor más alto y consistente en comparación con el tiempo de estabilización de 3 horas eso quiere decir que a medida que aumenta el tiempo de estabilización, el vigor tiende a aumentar

Aun así no existe una diferencia significativa en la media de los tiempos, en el artículo de Remezovski, Azcurra, et al; se debe a la trahalosa que tiene un efecto protector sobre los espermatozoides, manteniendo la estructura de la membrana protegiéndola de la creación de cristales al congelar, viene incluida como crioprotector de ambos diluyentes utilizados en el proyecto a través de lactosa y la yema de huevo (86). Sin embargo, la disminución de la motilidad individual sigue afectando a la crioconservación con un tiempo de estabilización largo.

Restrepo, Úsuga y Rojano en la investigación de técnicas para aumentar la fertilidad en el semen equino apoyan que, si los espermatozoides permanecen viables y activos durante un largo periodo de tiempo, esto puede indicar una alta viabilidad y calidad de la muestra, en la práctica, esto significa que los espermatozoides que permanecen estables y activos durante un largo periodo de tiempo son probablemente más fértiles y eficaces durante la inseminación artificial debido a que existe una recuperación del estrés de la eyaculación permitiendo que los espermatozoides interactúen entre sí y se aglutinen, acrecentando su aptitud de fecundar el óvulo. (87)

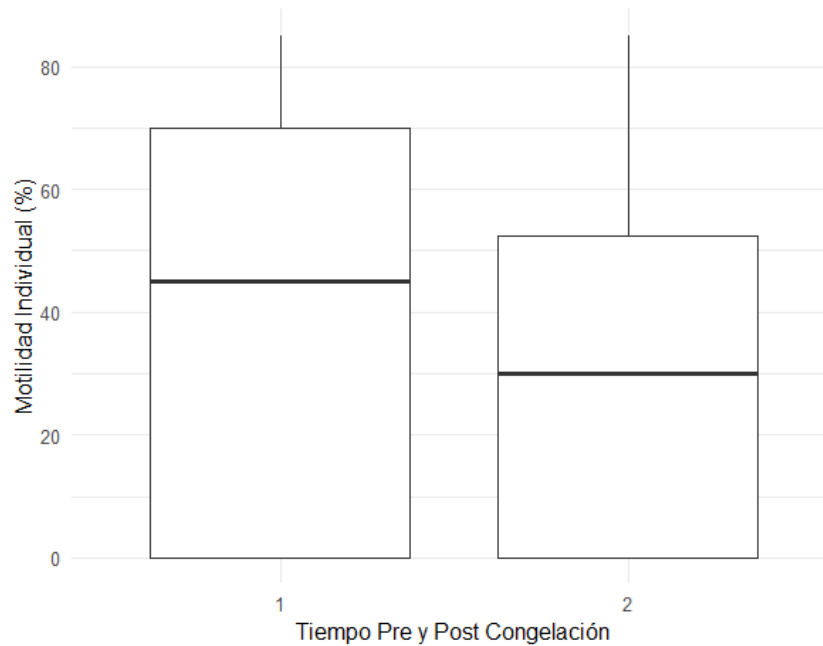
Gráfico 4. Motilidad Progresiva Pre y Post congelación



Nota. 1= pre congelación; 2=post congelación

Las medianas obtenidas fueron de 32,25 y 20 respectivamente, con un valor de $p=0,716$

Gráfico 5. Motilidad Individual por tiempo Pre y Post congelación

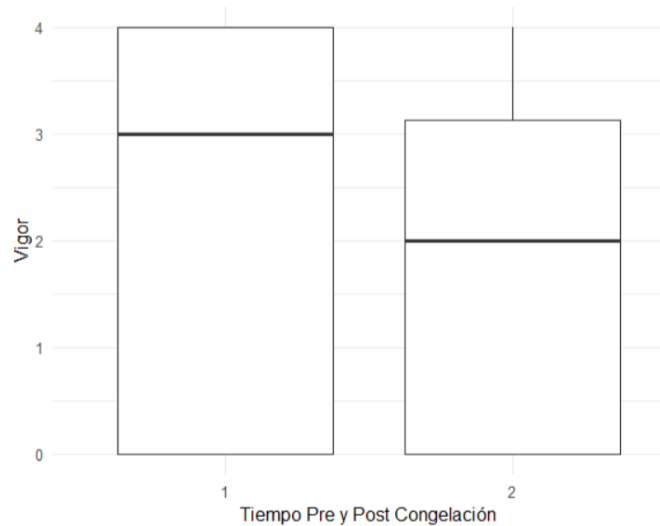


Nota. 1= pre congelación; 2=post congelación

El gráfico 5 de caja muestran una comparación de la movilidad de los individuos antes y después de la congelación, entendemos que las muestras analizadas post congelación indican una reducción notable en la motilidad individual debido a la destrucción y cambio de estructura en la membrana celular a través de la formación de cristales de hielo debido al cambio brusco de temperatura por el manejo inadecuado de las pajuelas al transportarla de la refrigeración a congelación.

Las medianas obtenidas de la pre congelación fue 45 y de post congelación fue de 30, con un valor de $p=0,772$

Gráfico 6. Vigor por tiempo Pre y Post congelación

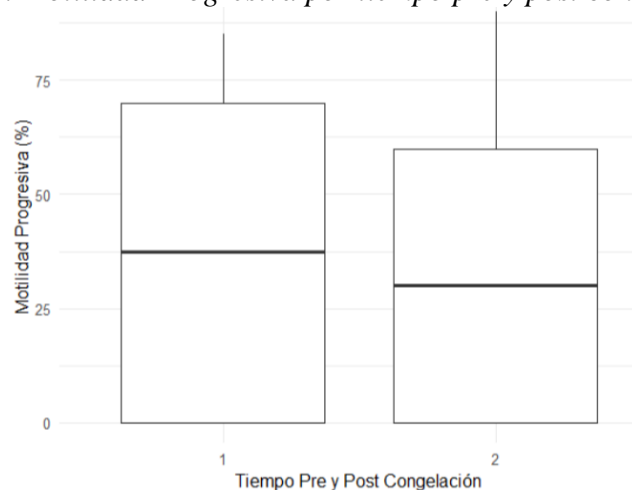


Nota. 1= pre congelación; 2=post congelación

Gráfico 6 compara la resistencia de las muestras antes y después de la congelación indicando que la congelación reduce el vigor de la muestra pues la mediana se reduce notablemente a un nivel de dos que nos indica un vigor pobre, deduciendo que el tiempo de exposición al frío tiene un impacto directo con las proteínas y enzimas.

La media para el tipo de pre congelación fue de 3 y para el segundo tiempo post congelación de 2. El valor de $p=0,56$

Gráfico 7. Motilidad Progresiva por tiempo pre y post congelación



Nota. 1= pre congelación; 2=post congelación

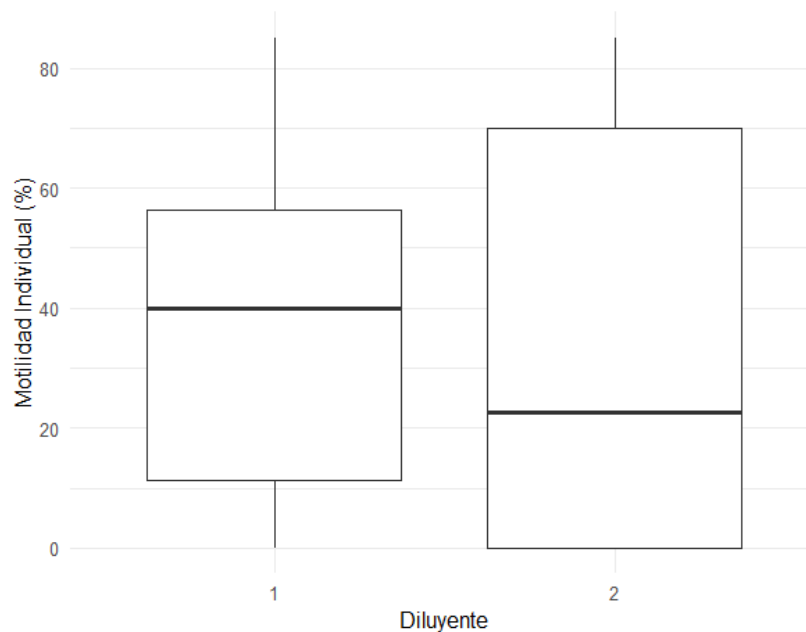
Gráfico 7 compara cómo cambia la motilidad progresiva de una muestra antes y después de la congelación. La congelación parece tener un efecto negativo en la motilidad progresiva de la muestra. Antes de la congelación la mediana de la motilidad progresiva es más alta, lo que indica que, en general, las muestras tienen una mejor capacidad de movimiento hacia adelante

antes de ser congeladas y después de la congelación la mediana es más baja, lo que sugiere una reducción en la motilidad progresiva después de la congelación.

Las medianas obtenidas en el gráfico fueron de 37,5 y 30 respectivamente. El valor de $p=0,773$

Ponthier J, et al; mencionan el problema actual de la congelación subóptima, debido al aumento del anión superóxido (O_2^-), el anión hidroxilo (OH^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) produce lisis celular por ser un agente oxidante que daña los espermatozoides (88). La congelación parece tener un efecto negativo en la motilidad progresiva de la muestra. Antes de la congelación la mediana de la motilidad progresiva es más alta, lo que indica que, en general, las muestras tienen una mejor capacidad de movimiento hacia adelante antes de ser congeladas y después de la congelación la mediana es más baja, lo que sugiere una reducción en la motilidad progresiva después de la congelación.

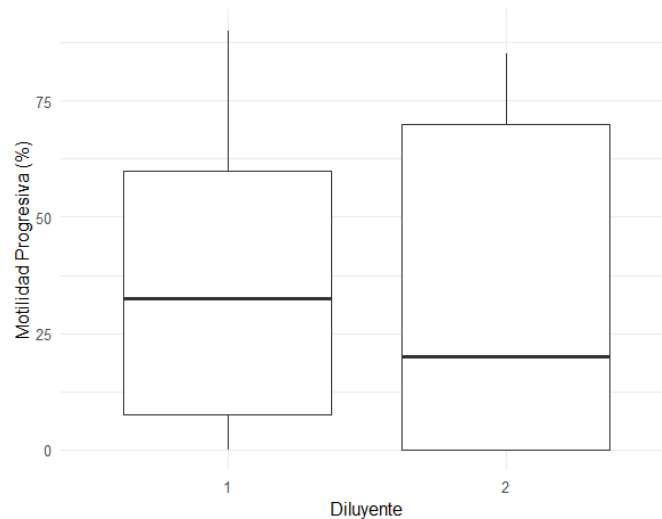
Gráfico 8 Motilidad Individual por diluyente



Nota. 1=INRAFreezer; 2=CRYORamp

En el gráfico 8 analizado estadísticamente la motilidad individual por tipo de diluyentes, encontramos que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las medianas de motilidad de los espermatozoides entre los diluyentes InraFreezer (categoría 1) 40 y CrioRamp (categoría 2) 22,50, el valor de es $p = 0,772$.

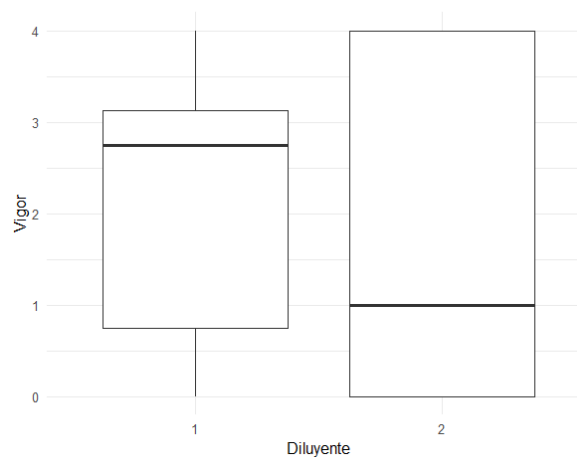
Gráfico 9 Motilidad Progresiva por diluyente



Nota. 1=INRAFreezer; 2=CRYORamp

No hay diferencias estadísticamente significativas entre las medianas de motilidad de los espermatozoides entre los diluyentes 1 con un valor de mediana de 32,50 y 2 con una mediana de 20. El valor de $p = 0,773$.

Gráfico 10. Vigor por diluyente



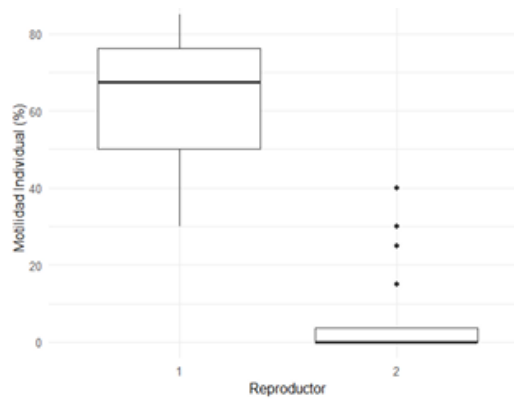
Nota. 1=INRAFreezer; 2=CRYORamp

No hay diferencias estadísticamente significativas entre las medianas de vigor de los espermatozoides entre los diluyentes 1 con una mediana de 2,75 y 2 con una mediana de 1, valor de $p = 1,000$.

Un estudio menciona que la preservación del semen equino usando dos diluyentes diferentes (extensor a base de leche desnatada y extensor que contiene glicina) y temperaturas de preservación. Encontró que el extensor con glicina mantuvo mejor la viabilidad del espermatozoides más allá de las 24 horas a 72 horas comparado con el de leche desnatada (89). Esto se debe a que la glicina ayuda a estabilizar las membranas celulares de los espermatozoides durante los

procesos de congelación y descongelación, reduciendo el daño osmótico causado por los cambios en la concentración de solutos. Además, la glicina actúa como antioxidante, protegiendo a los espermatozoides del daño causado por los radicales libres durante la criopreservación (90).

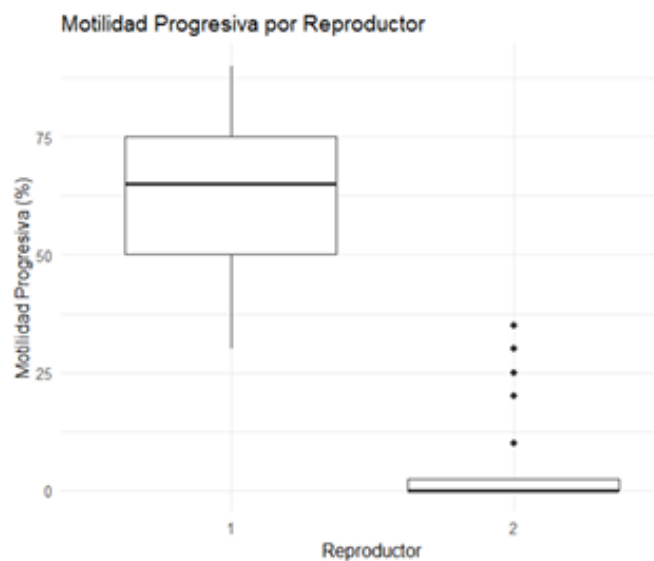
Gráfico 11. Motilidad Individual por Reproductor



Nota. 1=Raza lusitano; 2=Raza árabe

La motilidad individual del primer reproductor tiene una mediana alrededor del 60%, con un rango intercuartílico que varía aproximadamente entre el 45% y el 70%. Mientras que del segundo reproductor la motilidad individual tiene una mediana muy baja, alrededor del 10%.

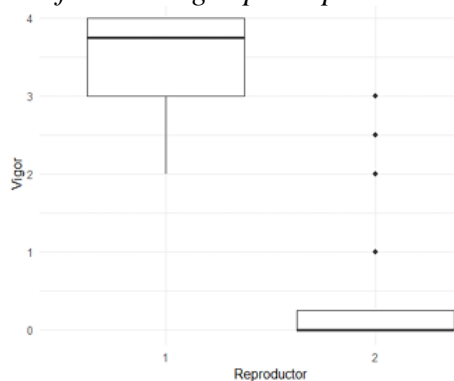
Gráfico 12 Motilidad Progresiva por Reproductor



Nota. 1=Raza lusitano; 2=Raza árabe

La motilidad progresiva del primer reproductor tiene una mediana cercana al 70%, con un rango intercuartílico que varía entre aproximadamente el 55% y el 75%, esto sugiere que una alta proporción de los espermatozoides son capaces de moverse de manera eficiente y en línea recta. El segundo reproductor presenta una motilidad progresiva es extremadamente baja, con una mediana cercana al 5%, lo que indica una baja calidad espermática en términos de capacidad de movimiento progresivo.

Gráfico 13. Vigor por reproductor



Nota. 1=Raza lusitano; 2=Raza árabe

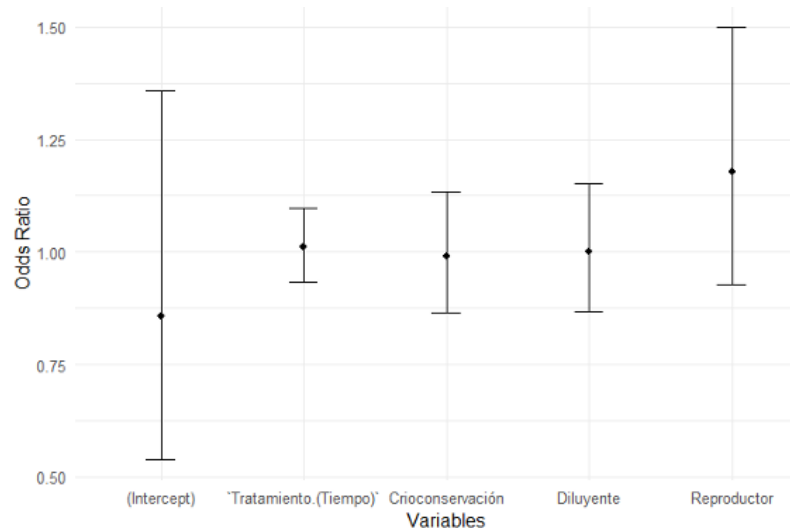
El vigor tiene una mediana de aproximadamente 3.5, con un rango intercuartílico entre 3 y 4. esto indica que los espermatozoides del reproductor Lusitano tienen una alta vitalidad y energía. Mientras que el vigor del segundo reproductor es muy bajo, con una mediana de aproximadamente de 1, lo que nos indica que la calidad espermática en términos de vigor es baja para este reproductor.

Los resultados muestran una clara diferencia en la calidad espermática entre los dos reproductores de diferentes razas. El reproductor Lusitano (Reproductor 1) presenta significativamente mejores resultados en términos de motilidad individual, motilidad progresiva y vigor en comparación con el reproductor Árabe (Reproductor 2).

Un estudio comparativo sobre la calidad del semen en diferentes razas de caballos, encontró que los caballos de raza Lusitano tienden a tener una mejor calidad espermática en términos de motilidad y vigor en comparación con otras razas, esto debido a al tipo de condiciones ambientales en las que viven, teniendo una mayor diversidad genética y condiciones de manejo menos intensas, evitando el estrés de este (91). Por otro lado, la consanguinidad es común en los caballos pura sangre como la raza Árabe debido a la selección de características específicas. Esto puede llevar a una acumulación de mutaciones genéticas dañinas, resultando en una menor fertilidad y problemas reproductivos (92). También al ser estos caballos sometidos a

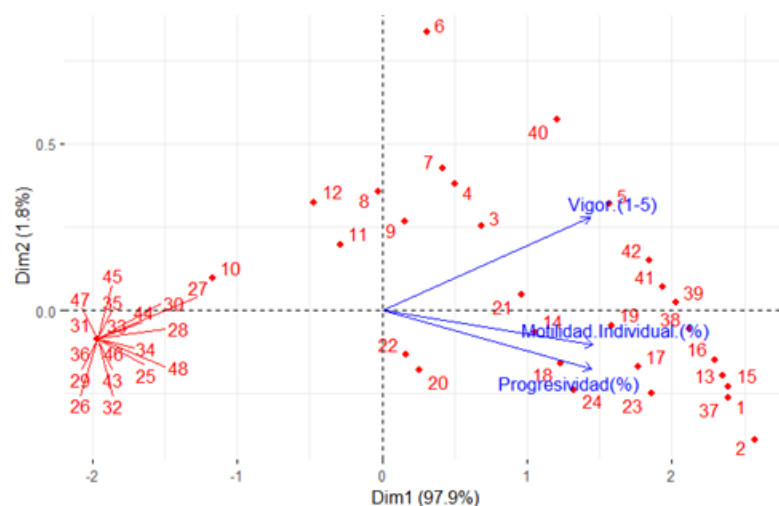
entrenamiento y competiciones están sujetos a altos niveles de estrés afectando negativamente la reproducción del semental (93).

Gráfico 14. Intervalos de confianza con variables



El resultado del Gráfico 14 sugiere que las variables analizadas (tiempo de estabilización, crioconservación, tipo de diluyente y raza del reproductor) no tienen un valor estadísticamente significativo por sí solas en la calidad espermática, es decir que todas las variables cumplen con la perspectiva estimada. Según el estudio de Gottschalk et al. (2015) valida estos resultados, mostrando que mientras estos factores pueden influir en la calidad del semen, su impacto no es suficientemente fuerte como para ser considerado significativo en un análisis aislado. Estos hallazgos subrayan la necesidad de considerar múltiples factores, incluyendo la genética individual, el manejo, y posiblemente interacciones complejas entre las variables, para comprender completamente la calidad espermática en caballos (94).

Gráfico 15. Análisis exploratorio de los datos PCA - Biplot



El análisis de componentes principales muestra que la mayor parte de la variabilidad en la calidad espermática está explicada por la primera dimensión (Dim1), la motilidad individual como la motilidad progresiva están fuertemente correlacionadas entre sí, el vigor tiene una correlación con positiva con Dim1, indicando mejor calidad espermática.

En un estudio se evaluaron los efectos de diferentes extensores (HF-20, Tris, INRA Freeze y EquiPlus Freeze) en la criopreservación del semen equino dando como resultado que no hubo diferencias significativas entre los extensores antes de la congelación. El diluyente HF-20, INRA Freeze y EquiPlus Freeze mostraron una capacidad de conservación similar mostró mejor motilidad, viabilidad e integridad de la membrana plasmática que el extensor Tris que necesita mejoras (95).

CONCLUSIONES:

- ✓ La calidad de semen evaluado en los diferentes tiempos de estabilización nos mostró que un menor tiempo de estabilización se correlaciona con una mayor calidad espermática. Esto se debe a que la pajuela debe someterse a varios cambios de temperatura controlados para evitar daños a las células espermáticas. Durante la evaluación de pajuelas de semen, se observó una disminución en las variables de motilidad individual, progresividad y vigor en todos los tiempos de estabilización.
- ✓ Entre los factores que afectaron la calidad de las muestras seminales se pudo detectar el estrés oxidativo, osmótico y térmico que al tener el impacto de cambio de temperatura con el oxígeno terminan ampliando la cantidad de radicales libres y termina existiendo una fragmentación de ADN y viabilidad.
- ✓ El semental de raza Árabe experimentó dificultades para eyacular, las posibles causas incluyen estrés, falta de actividad sexual o patologías debido a lesiones traumáticas o infecciones; por lo cual no se realizó una adecuada comparación con los diluyentes, contrario al semental de raza Lusitano que eyaculó con normalidad y las muestras obtenidas mostraron concentración, viabilidad y motilidad regulares que al correlacionarse con el diluyente Crio RAMP se obtuvo un mejor resultado de motilidad. Se observó que los dos diluyentes utilizados son eficientes en la preservación del semen. Sin embargo, el diluyente Crio RAMP demostró ser ligeramente mejor que el diluyente INRA freeze, por lo que no se descarta ninguno.

10. RECOMENDACIONES:

- ✓ Para evitar la pérdida de muestras seminales, así como de material, se debe implementar buenas prácticas de manejo, no solo al momento de extraer semen, sino también un estilo de enseñanza para incrementar la probabilidad de obtener pajuelas eficientes tanto en caballos de raza árabe como en sementales de raza andaluza.
- ✓ Para mejorar los datos de calidad espermática hay que tomar en cuenta distintos factores que nos ayuden con la obtención de datos como morfología o evaluación de membrana para reconocer si el daño de la muestra ocurre en la recolección o en la congelación de pajuelas de mejor manera se podría utilizar también tecnología más avanzada para evitar errores en el conteo de espermatozoides.
- ✓ Estandarizar un protocolo de recolección de semen equino, que minimice el estrés del equino durante la recolección, escoger un método de recolección adecuado para el

animal y manipular cuidadosamente el semen eyaculado para preservar su capacidad fertilizante. Además, se debe considerar todos los aportes e iniciativas de investigaciones realizadas por estudiantes, con la finalidad de incorporar y mejorar las áreas de aprendizaje, lo cual redunde en la formación de nuevos profesionales.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. I YO, J C, JE RG, J M, M. Y. dvances in sperm cryopreservation in farm animals: Cattle, horse, pig and sheep. Anim Reprod Sci. 2022.
2. J A, J K, A TC, Aurich. Efficiency of Semen Cryopreservation in Stallions. Animals(basel). 2020.
3. Enciclopedia Humanidades. Caballo. 2023..
4. Z AK, JM M. Freezing Stallion Semen-What Do We Need to Focus on for the Future? Vet.sci. 2024.
5. Martinez KG. Monta natural en equinos. 2018..
6. MONFORTE CD, LLAMOSAS MM, GUALDONI JNC, PIÑEIRO EG. Biotecnologías reproductivas: Producción y criopreservación de embriones in vitro. 2010..
7. RESTREPO G, DUQUE CORTES , ROJANO A. Efecto de la quercetina, la L-ergotioneina y la pentoxifilina en el semen equino posdescongelado. 2016..
8. Pugliesi G, Fürst R, Carvalho GRd. Efecto de diferentes tiempos de equilibrio en la criopreservación de semen de semental. 2011..
9. Fracaro PL CC,SGN,FJ, IB A, JS F, FP H, BD RC, AS VJ. Freezing of equine semen is influenced by exposure time and concentration of the cryoprotectan. 2023..
10. Barrios LR. ANATOMIA Y FISILOGIA DEL SISTEMA REPRODUCTIVO EN EQUINOS (YULEIDYS).pdf. 2024..

11. Echevarría L, Mendoza G, Fouilloux A, Torres A. anatomía funcional de los órganos genitales del macho y de la hembra. 2021..
12. Castrillo P. La conducta sexual de los caballos. Mayo, 2018..
13. Amado AGA. Más Allá de las Riendas: La Industria Equina en Colombia. 2024..
14. Mandina ML, Rey JR. El Caballo Pura Raza Española. 2024..
15. zooplus Magazine logo. Caballo lusitano. 2024..
16. Harto L. CABALLO LUSITANO: TODO SOBRE LA RAZA. 2024..
17. zooplus Magazine logo. Caballo árabe. 2024..
18. equspaddock. ¿QUE CARACTERISTICAS TIENE EL CABALLO ARABE? 2024..
19. Luz Mábel Ávila-Portillo B, Madero JI, López C. FUNDAMENTOS DE CRIOPRESERVACIÓN. 2006..
20. Vera CJE. Actualización en técnicas de criopreservación de espermatozoides equinos. 2018..
21. Atroshchenko MM, Bragina EE, Zaitsev1 AM, Kalashnikov1 VV, Naumenkova VA. CONSERVATION OF GENETIC RESOURCES IN HORSE BREEDING AND MAJOR STRUCTURAL DAMAGES OF SPERM DURING SEMEN CRYOPRESERVATION IN STALLIONS. 2019..

22. Crespo , Blazquez JC, Serres C, Gutiérrez L. Optimization of the Equine-Sperm freeze Test in Purebred Spanish Horses by Incorporating Colloidal Centrifugation Animals. 2023..
23. Wolfe B, Bleach E, Kershaw. An Investigation of Equine Sperm Quality Following Cryopreservation at Low Sperm Concentration and Repeated Freeze-Thawing. [Online].; 2022 [cited 2023 julio 06. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0737080622003033>.
24. Beehan DP. The effects of iodixanol present during equine semen. 2012..
25. Ortiz J, Martín F, Gaitskell , Barrientos , Rodríguez H, Peña F, et al. Sperm cryopreservation impacts the early development of equine embryos by downregulating specific transcription factors. 2021 mayo 14..
26. Restrepo Betancur G, Usuga Suarez , Montoya Páez D, Celis , Henao A. Evaluación de dos diluyentes para la criopreservación de semen de caballos de la raza criollo colombiano. 2014..
27. PABAÑA LAL. Evaluación de 3 protocolos de crioconservación de semen equino Anglo Arabe y Pura Sangre Inglés (psi) en la Estación Experimental Tunshi de la Espoch. 2023..
28. Medina ME. Manejo y sujeción del caballo. 2012..
29. Rafael PL. Manejo y cuidado del caballo. 2007..
30. LEÓN RAVCD. EXTRACCION, EVALUACION Y PROCESAMIENTO DE SEMEN EQUINO. 2006..

31. HUMECO. Buenas prácticas de Higiene en Reproducción Equina. 2019..
32. Estévez Valencia A, Garcia Mentuy , Gispert Boada M. INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN CABALLOS. 2009..
33. RUIZ MA. INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN EQUINOS. 1997 Noviembre..
34. Dpto. de Medicina y Cirugía Anima. OBTENCION Y EVALUACION DEL ESPERMA EQUINO. 2006..
35. Papudesi BN, Malayala SV, Regina ÁC. Toxicidad de la xilacina. 2023..
36. CORREA SC, BOZZO MIO. Inducción farmacológica de la eyaculación ex copula en padrillos Holsteiner en entrenamiento. 2016..
37. Dalma CS. MÉTODOS TRADICIONALES Y ALTERNATIVOS DE EXTRACCIÓN DE SEMEN. 2012 abril..
38. Johnston PF, DeLuca JL. Chemical Ejaculation of Stallions After the Administration of Oral Imipramine Followed by Intravenous Xylazine. 1998..
39. Canisso IF, Souza FA, Ortigoza JM, Carvalho GRd, Morel MCD, Erotides , et al. CONGELAMIENTO DE SEMEN DE BURRO (Equus asinus). 2008..
40. Cepeda LG. Optimización de las técnicas de acondicionamiento del semen equino para los procesos de conservación seminal. 2014..

41. RESTREPO-BETANCUR G, CANTERO-NANCLARES JM, MONTOYA-PAEZ JD. EFECTO DE LA CENTRIFUGACIÓN SOBRE LA INTEGRIDAD Y LA FUNCIONALIDAD DE ESPERMATOZOIDES EQUINOS. 2016..
42. Library. [Online].; 2024 [cited 2024 julio 07. Available from: https://1library.co/article/crioprotectores-criopreservaci%C3%B3n-de-semen-bovino.dzx03lvz#google_vignette.
43. Brinsko SP. Inseminación artificial y conservación del semen. 1992..
44. RODRIGUEZ AM. Evaluación de crioprotectores alternativos, glicerol y antioxidantes en la congelación del eyaculado equino. 2013..
45. Galvis KTA. IMPORTANCIA DE LOS DILUYENTES PARA SEMEN. 2023..
46. González SP, Arenas SMP. Comparación de dos diluyentes Lactosa-glicerol-yema de huevo; inra-dformamida-yema de huevo en la preservación de semen equino. 2007..
47. IMV Technologies. [Online].; 1963. Available from: <https://www.imv-technologies.com/product/inrafreeze>.
48. RAMPCO group. linkedin. [Online].; 1992 [cited 2024 julio 22. Available from: <https://es.linkedin.com/company/rampco>.
49. Alvarenga MA, Papa FO, Neto CR. Advances in Stallion Semen Cryopreservation. 2016..
50. FERNANDO VCA. PROPUESTA DE UN CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA EN BIOTECNOLOGIAS REPRODUCTIVAS. 2021..

51. Freitas-Dell'Aqua CdP, Monteiro GA, Júnior JAD, Papa FO. The Effects of Refrigeration Temperature and Storage Time on Apoptotic Markers in Equine Semen. 2012..
52. López DLG, Escobar MdlÁC, Rocha JFM, Agrosavia. La tecnología de la criopreservación de semen bovino. 2024..
53. Núñez EDR. ANÁLISIS DE TÉCNICAS DE CONGELACIÓN DE SEMEN EQUINO EMPLEADAS ACTUALIZADAS. 2023..
54. Martínez FCR. COMPARACIÓN DE LOS DOS DIFERENTES TIPOS DE CONGELACIÓN EN EQUINOS. 2023..
55. Bernardi SF, Di Prinzio M, Maglione D, Rinaudo A, Marini PR. Efecto del protocolo de descongelación de semen sobre el porcentaje de preñez en bovinos lecheros..
56. Cabalgandes Uniandinos. El Espermatozoide de un Caballo. 2022..
57. Egyptien S, Deleuze S, Ledeck J, Ponthier J. Sperm Quality Assessment in Stallions: How to Choose Relevant Assays to Answer Clinical Questions. 2023..
58. Quiroga AJM, Pichardo EH, Martínez AM, Rodríguez JP, Suástegui JLR. Durante la recolección, se filtra el semen para obtener un volumen libre de gel. El volumen del eyaculado en caballos puede variar entre 20 y 250 ml. Es importante señalar que existen varios factores que pueden afectar el volumen de semen en un semental. 2022..
59. Illescas MAM. ESTUDIO DE LA CONDUCTA SEXUAL Y CALIDAD SEMINAL EN FRESCO EN 3 GRUPOS RACIALES EN EQUINOS. 2019..

60. CUEVAS AB. Análisis cinético y morfométrico del espermatozoide del caballo empleando el sistema Sperm Class Analyzer. 2013..
61. Sitio Argentino de Producción Animal. Reproducción animal..
62. Samper JC. Equine Breeding Management and Artificial Insemination. 2008..
63. Jasko D. Evaluación del semen de sementales. 1992..
64. Freitag GP, Lima LGFd, Kozicki LE, Felicio LCS. Evaluation of stallion sperm motility with ImageJ using a cell phone camera and a light microscope. 2020..
65. Varner DD, Johnson VDdS. Uso de un sistema computarizado para la evaluación de la motilidad espermática equina. 1991..
66. Varner DD, Brinsko SP, Love CC, Taylor TS,. LJ. Techniques for evaluating selected reproductive disorders of stallions. 2000..
67. MONTES PLC. “INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA CITOPLASMÁTICA EN SEMEN REFRIGERADO Y CONGELADO DE TOROS USANDO DOS DILUTORES SINTÉTICOS. 2021..
68. Equine-Reproduction. How Progressively Motile Are Those Sperm? 2024..
69. Hernández MM. EVALUACIÓN DE LA MOTILIDAD DEL SEMEN -FRESCO UTILIZANDO DOS DILUYENTES COMERCIALES EN DIFERENTES HORAS DE EXTRACCIÓN. 2020..

70. Teriogenologia Veterinaria. RECOLECCIÓN, EVALUACIÓN Y CONSERVACIÓN DE SEMEN EQUINO. 2009..
71. Usuga A, Restrepo G, Benjamín. R. Criotolerancia del semen equino. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú. 2016.
72. SANDOVAL TBV. Efecto de diferentes metodos de congelacion y descongelacion en la criopreservacion de los espermatozoides de alpaca (*Vicugna pacos*). 2023..
73. Betancur GR, Pizarro EJ, Rojano BA. Estrés oxidativo en el semen equino criopreservado. 2012..
74. Baumber J, Ball BA, Gravance CG, Medina V, Davies-Morel MC. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. 2000..
75. Aurich C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. 2005 octubre..
76. Cueva FICdl. Estudio sobre la resistencia al estres osmotico de espermatozoides porcinos y equinos. 2024..
77. Betancur GR, López EP, Rojano BA. Estrés oxidativo en el semen equino criopreservado. 2012..
78. Stornelli M, Tittarelli C, Savignone C, Stornelli M. EFECTO DE LOS PROCESOS DE CRIOPRESERVACIÓN SOBRE LA FERTILIDAD SEMINAL. 2005..

79. Iacovides SM. CRYOPRESERVATION OF EQUINE SEMEN WITH A MECHANICAL CONTROL RATE FREEZER. 2014..
80. GOOGLE maps. GOOGLE maps. [Online].; 2024 [cited 2024 julio 23. Available from: <https://www.google.com/maps/dir/-1.0421893,-78.5907367/Universidad+Tecnica+de+Cotopaxi,+KM+7.53+VIA+SALACHE/@-1.0017265,-78.6197574,100m/data=!3m1!1e3!4m10!4m9!1m1!4e1!1m5!1m1!1s0x91d462563a35aa99:0xa3a059adae90fa63!2m2!1d-78.6191374!2d-0.9994491!3e2?entr>.
81. Marlene LTM. GUÍA FOTOGRÁFICO–DESCRIPTIVA DE LA FLORA DEL CAMPUS SALACHE DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI. 2022..
82. Gobierno autonomo descentralizado de la provincia de cotopaxi. Plan de desarrollo y ordenamiento territorial de cotopaxi 2025. 2018..
83. McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD. Equine Reproduction, 2nd Edition. 2011..
84. Quiroga AJM, Pichardo JEH, Martínez AM, Rodríguez JP, Suástegui LR. Características seminales antes y después de la criopreservación de seis razas de equinos en latitudes cercanas al Ecuador. 2022..
85. Samper JC, F J, Pycock , O A. Current Therapy in Equine Reproduction. 2007..
86. Remezovski , Azcurra , Benitez , Miragaya , Stornelli. Crioconservacion seminal en equinos: efecto de la trahalosa sobre la celula espermatica. CIENTIAMERICA, Revista Multidisciplinarl. 2018 Marzo; 5(1).

87. Giovanni Restrepo Betancur ZMMc, Alexandra Úsuga Suárez M, Benjamín Alberto Rojano QMPD. Técnicas para el análisis de la fertilidad potencial del semen equino. CES Medicina Veterinaria y Zootecnia. 2013 Enero-Junio; 8(69-81).
88. Ponthier J FTDJMESDDS. Asociación entre la concentración en semen equino congelado y los parámetros posteriores a la descongelación. *Reprod Domest Anim.* 2009 Apr 15; 1(1).
89. N Tekin AWEK. Capacidad de conservación del semen de caballo mediante el uso de dos diluyentes y temperaturas de conservación. 1989..
90. Rodríguez AM. Evaluación de crioprotectores alternativos, glicerol y antioxidantes en la congelación del eyaculado equino. 2013..
91. Cochran C. Guía de la Raza del Caballo Criollo: Características, Salud y Nutrición. 2023..
92. Todd ET, Hamilton NA, Velie BD, Thomson PC. Los efectos de la endogamia en el éxito de cobertura, la duración de la gestación y la proporción de sexos de potros en caballos pura sangre australianos. 2020..
93. Card C. Problemas reproductivos de los sementales (Actas). 2011..
94. Gottschalk M, Sieme H, Martinsson G, Distl O. Analysis of breed effects on semen traits in light horse, warmblood, and draught horse breeds. 2015..
95. Alamaary M, Haron AW, Ali M, Hola M, Adamu L. Efectos de cuatro diluyentes sobre la calidad del semen congelado en sementales árabes. 2019..