



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

**“CRIOCONSERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES OBTENIDOS
MEDIANTE LAVADO RETRÓGRADO DE LA COLA DEL
EPIDÍDIMO POST MORTEM EN BOVINOS A BASE DE DOS
CRIOPROTECTORES”**

Proyecto de Investigación presentado previo a la obtención del Título de Medicina Veterinaria

Autora:
Arguero Peralta Martha Leticia

Tutora:
Veloz Veloz Dina Maricela

LATACUNGA – ECUADOR
Febrero 2025

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Arguero Peralta Martha Leticia, con cédula de ciudadanía No. 1727506493, declaro ser autora del presente Proyecto de Investigación: **“CRIOCONSERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES OBTENIDOS MEDIANTE LAVADO RETRÓGRADO DE LA COLA DEL EPIDÍDIMO POST MORTEM EN BOVINOS A BASE DE DOS CRIOPROTECTORES”**, siendo la Doctora Mg. Dina Maricela Veloz Veloz, Tutora del presente trabajo; y, eximo expresamente a la Universidad Técnica de Cotopaxi y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

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

Latacunga, 17 de febrero del 2025



Martha Leticia Arguero Peralta
C.C: 1727506493
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 **ARGUERO PERALTA MARTHA LETICIA**, identificada con cédula de ciudadanía **1727506493** 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. - **EL CEDENTE** es una persona natural estudiante de

la carrera de Medicina Veterinaria, titular de los derechos patrimoniales y morales sobre el trabajo de grado “**CRIOCONSERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES OBTENIDOS MEDIANTE LAVADO RETRÓGRADO DE LA COLA DEL EPIDÍDIMO POST MORTEM EN BOVINOS A BASE DE DOS CRIOPROTECTORES**”, la cual se encuentra elaborada según los requerimientos académicos propios de la Facultad; y, las características que a continuación se detallan:

Historial Académico

Inicio de la carrera: Octubre 2019 – Marzo 2020

Finalización de la carrera: Octubre 2024 – Febrero 2025

Aprobación en Consejo Directivo: 12 de diciembre del 2024

Tutor: Dra. Dina Maricela Veloz Veloz, Mg.

Tema: “**CRIOCONSERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES OBTENIDOS MEDIANTE LAVADO RETRÓGRADO DE LA COLA DEL EPIDÍDIMO POST MORTEM EN BOVINOS A BASE DE DOS CRIOPROTECTORES**”

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.

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

- c) La traducción, adaptación, arreglo u otra transformación del trabajo de grado con fines académicos y de consulta.
- d) La importación al territorio nacional de copias del trabajo de grado hechas sin autorización del titular del derecho por cualquier medio incluyendo mediante transmisión.
- e) Cualquier otra forma de utilización del trabajo de grado que no está contemplada en la ley como excepción al derecho patrimonial.

CLÁUSULA QUINTA. - El presente contrato se lo realiza a título gratuito por lo que **LA CESIONARIA** no se halla obligada a reconocer pago alguno en igual sentido **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 17 días del mes de febrero del 2025.

Martha Leticia Arguero Peralta

LA CEDENTE

Dra. Idalia Pacheco Tigselema, Ph.D.


LA CESIONARIA

AVAL DE LA TUTORA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

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

“CRIOCONSERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES OBTENIDOS MEDIANTE LAVADO RETRÓGRADO DE LA COLA DEL EPIDÍDIMO POST MORTEM EN BOVINOS A BASE DE DOS CRIOPROTECTORES”, Presentado por Arguero Peralta Martha Leticia, de la carrera de Medicina Veterinaria, considero que el presente trabajo investigativo es merecedor del Aval de aprobación al cumplir las normas, técnicas y formatos previstos, así como también ha incorporado las observaciones y recomendaciones propuestas en la Pre defensa.

Latacunga, 17 de febrero del 2025


Dra. Dina Maricela Veloz Veloz, Mg.
C.C: 1720299302
DOCENTE TUTORA

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: Arguero Peralta Martha Leticia con el título del Proyecto de Investigación: **“CRIOCONSERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES OBTENIDOS MEDIANTE LAVADO RETRÓGRADO DE LA COLA DEL EPIDÍDIMO POST MORTEM EN BOVINOS A BASE DE DOS CRIOPROTECTORES”**, ha considerado las recomendaciones emitidas oportunamente y reúne los méritos suficientes para ser sometido al acto de sustentación del trabajo de titulación.

Por lo antes expuesto, se autoriza grabar los archivos correspondientes en un CD, según la normativa institucional.

Latacunga, 17 de febrero del 2025



MVZ. Cristian Beltrán Romero, Mg.

C.C: 0501942940

LECTOR 1 (PRESIDENTE)



MVZ. Edie Gabriel Molina Cuasapaz, Mg.

C.C: 1722547278

LECTOR 2 (MIEMBRO)



MVZ. Cristian Neptali Arcos Alvarez, Mg.

C.C: 1803675634

LECTOR 3 (MIEMBRO)

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por ser mi guía y fortaleza en este camino. A mi hija, mi mayor inspiración, por darme la fuerza para seguir adelante. A mis padres, por su amor incondicional y enseñanzas que me forjaron. A mis hermanos, por su apoyo y compañía inquebrantable. A toda mi familia, por sus palabras y gestos de aliento. A mis doctores y mentores, especialmente a mi tutora Dra., Dina Maricela Veloz Veloz por su paciencia y enseñanzas que enriquecieron mi crecimiento. A todos los que formaron parte de este proceso, gracias por dejar una huella imborrable en mi vida. Este logro es de todos.

Arguero Peralta Martha Leticia.

DEDICATORIA

A ti, mi querida hija Paula, el motor de mis días y la razón de mi esfuerzo inagotable. Cada logro que alcanzo es por y para ti, para demostrarte que con dedicación y amor no hay sueños imposibles. Eres mi más grande inspiración, mi orgullo y mi amor infinito.

A mis padres, Marco Arguero y Lidia Peralta quienes me enseñaron el valor del esfuerzo, la perseverancia y la honestidad. Su apoyo incondicional, sus palabras de aliento en los momentos difíciles y su amor inquebrantable han sido la base sobre la cual construí este camino. Gracias por creer en mí incluso cuando yo dudé, por cada consejo, por cada sacrificio que hicieron para darme oportunidades y por ser el ejemplo de fortaleza y dedicación que me ha guiado.

A mis hermanos, Paul y Nathaly, por su apoyo incondicional y por acompañarme en cada desafío. A mis sobrinas, Sofía y Alejandra, por ser un refugio en los momentos difíciles y una fuente de motivación.

A mis primas Melany y Karen, aquellas que han estado en las buenas y en las malas, las que me han brindado su apoyo incondicional. Gracias por cada palabra de ánimo, por cada risa compartida, por su paciencia.

A toda mi familia y amigos, a cada uno de ustedes que, de una u otra manera, ha sido parte de este camino. Su apoyo, sus palabras de aliento y su presencia han sido un pilar fundamental para mí. Este logro no es solo mío, sino de todos los que han creído en mí y me han acompañado en esta travesía

Este trabajo es el fruto de sacrificios, esfuerzo y perseverancia, pero, sobre todo, del amor y la confianza que he recibido de todos ustedes. Gracias de corazón.

Con amor y gratitud eterna

Arguero Peralta Martha Leticia.

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

**TÍTULO: “CRIOCONSERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES OBTENIDOS
MEDIANTE LAVADO RETRÓGRADO DE LA COLA DEL EPIDÍDIMO POST
MORTEM EN BOVINOS A BASE DE DOS CRIOPROTECTORES”.**

Autora:

Arguero Peralta Martha Leticia

RESUMEN

La crioconservación de espermatozoides bovinos es la clave en la mejora genética y sostenibilidad de la ganadería a largo plazo. En Ecuador, Latacunga el ingreso a estas tecnologías es limitado, y la recuperación de espermatozoides mediante el lavado retrogrado es un método importante para preservar genética valiosa tras el descenso del animal. Tuvo como objetivos evaluar las células espermáticas recuperadas a través de lavado retrógrado epididimarios, para comparar la calidad seminal del semen con distintos crioprotectores de proteína animal (Optixcell) y vegetal (Triladyl). Se empleó un diseño experimenta con comparación de grupos independientes, en el que se asignaron aleatoriamente 16 testículos de toros adultos (post mortem) a dos tratamientos Optixcell y Triladyl. Las muestras de semen se obtuvieron mediante la técnica de lavado regresivo de la cola del epidídimo evaluando parámetros de capacidad de supervivencia de los espermatozoides, como la motilidad masal, individual, concentración, vigor y volumen (antes y después de la crioconservación). En las pruebas complementarias, para evaluar las células espermáticas recuperadas a través de lavado retrógrado epididimarios, los datos obtenidos no mostraron diferencias significativas desde el punto de vista estadístico de la reducción de motilidad entre OPTIXCELL y TRIDALYL, ($p>0,05$). Al evaluar la funcionalidad espermática se analizó la pérdida de vigor y el índice de recuperación poscongelación (IRC%). Con OPTIXCELL, la pérdida de vigor fue MODERADO para el 31,25%, mientras que en el 68,75%, “no hubo pérdida de vigor”. En cambio, con TRILADYL, hubo una pérdida “moderada” del 18,75% y en un 81,25% “no hubo pérdida de vigor”. En este caso TRILADYL fue ligeramente superior a pesar de no encontrarse diferencias significativas entre los dos. Para IRC% ($p>0,05$), no hay diferencia significativa. Al comparar la calidad seminal de los crioprotectores, no se pudo evidenciar ninguna diferencia estadísticamente significativa. En conclusión, ambos crioprotectores pueden utilizarse para conservar la calidad seminal con unas pequeñas preferencias hacia TRILADYL.

Palabras clave: crioconservación, lavado retrógrado, motilidad, funcionalidad espermática

TECHNICAL UNIVERSITY OF COTOPAXI
FACULTY OF AGRICULTURAL SCIENCE AND NATURAL RESOURCES

**THEME: “CRYOPRESERVATION OF SPERMATOZOA OBTAINED BY
RETROGRADE WASHING OF THE EPIDIDYMAL TAIL POST MORTEM IN
CATTLE BASED ON TWO CRYOPROTECTANTS.”**

Author:

Arguero Peralta Martha Leticia

ABSTRACT

The cryopreservation of bovine sperm is key to genetic improvement and the long-term sustainability of livestock farming. In Ecuador, specifically in Latacunga, access to these technologies is limited, and sperm recovery through retrograde washing is an important method for preserving valuable genetics after the animal's death. The objective of this study was to evaluate sperm cells recovered through epididymal retrograde washing to compare the semen quality using different cryoprotectants: animal protein-based (Optixcell) and plant-based (Triladyl). An experimental design with independent group comparisons was employed, randomly assigning 16 post-mortem bull testicles to two treatments: Optixcell and Triladyl. Semen samples were obtained through retrograde washing of the epididymal tail, evaluating sperm viability parameters such as mass and individual motility, concentration, vigor, and volume (before and after cryopreservation). In complementary tests evaluating the sperm cells recovered through epididymal retrograde washing, the data did not show statistically significant differences in motility reduction between Optixcell and Triladyl ($p>0.05$). Sperm functionality was assessed by analyzing the loss of vigor and post-thaw recovery rate (PRR%). With Optixcell, 31.25% showed moderate vigor loss, while 68.75% showed no loss of vigor. In contrast, with Triladyl, 18.75% showed moderate vigor loss, and 81.25% showed no loss of vigor. Although no statistically significant differences were found, Triladyl showed slightly superior results. For PRR% ($p>0.05$), no significant difference was observed. Therefore, no statistically significant differences were found when comparing the semen quality of the cryoprotectants. In conclusion, both cryoprotectants can be used to preserve semen quality, with a slight preference for Triladyl.

Keywords: cryopreservation, retrograde washing, motility, sperm functionality.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DECLARACIÓN DE AUTORÍA	ii
CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR	iii
AVAL DE LA TUTORA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN	v
AVAL DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE TITULACIÓN	vi
AGRADECIMIENTO	vii
DEDICATORIA	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
ÍNDICE DE CONTENIDOS	xi
INDICE DE TABLAS	xiv
INDICE DE FIGURAS	xv
1. INFORMACIÓN GENERAL	1
2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO	2
3. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO	2
3.1. Beneficiarios directos	2
3.2. Beneficiarios indirectos	3
4. EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN:	3
5. OBJETIVOS	4
5.1. Objetivo	4
.....	General
5.2. Objetivos	5
.....	Específicos
6. ACTIVIDADES Y SISTEMA DE TAREAS EN RELACIÓN CON LOS OBJETIVOS PLANTEADOS	5
7. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA	6
7.1. Aparato reproductor del macho	6
7.2. Testículos	6

7.3.	Epidídimo	8
7.4.	Maduración de los espermatozoides en el epidídimo	8
7.5.	Conductos deferentes	9
7.6.	Glándulas anexas	9
7.7.	La espermatogénesis	10
7.8.	Proceso eyaculatorio	10
7.8.1.	Efectos de la presencia de líquido seminal	11
7.8.2.	Efectos de la ausencia de líquido seminal	11
7.9.	Métodos de colecta	11
7.9.1.	Vagina artificial	11
7.9.2.	Electroeyaculador	11
7.9.3.	Lavado retrógrado post-mortem	12
7.10.	Crioconservación	12
7.11.	Efectos de la crioconservación en los espermatozoides.....	13
7.12.	Evaluación espermática.....	15
7.12.1.	Evaluación macroscópica	15
7.12.2.	Evaluación microscópica	16
7.13.	Diluyentes	16
8.	VALIDACIÓN HIPÓTESIS	17
9.	METODOLOGÍA	18
9.1.	Localización de estudio	18
9.2.	Tipo de investigación	18
9.3.	Diseño del estudio	18
9.4.	Enfoque Metodológico del estudio	18
9.5.	Variables identificadas	18
9.6.	Muestra	19
9.7.	Técnicas Utilizadas en la Investigación	19
9.8.	Análisis Estadístico	20

9.9. Procesamiento de Datos	20
9.10. Materiales y equipos	20
9.10.1. Materiales	20
9.10.2. Equipos	21
9.11. Procedimiento	21
10. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	26
11. IMPACTOS (TÉCNICOS, SOCIALES, AMBIENTALES O ECONÓMICOS)	38
11.1. Impacto técnico	38
11.2. Impacto ambiental	38
11.3. Impacto económico	39
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	40
BIBLIOGRAFÍA	42
ANEXOS	50
INDICE DE TABLAS	
Tabla 1. Actividades y sistema de tareas en relación con los objetivos planteados	5
Tabla 2. Comparación general de los valores promedios de los retrolavados con OPTIXCELL y TRILADYL	26
Tabla 3. Prueba T para muestras independientes (reducción de motilidad)	28
Tabla 4. Cálculo de pérdida de vigor y el índice IRC para evaluar funcionalidad espermática	29
Tabla 5. Prueba t para determinar diferencias significativas del IRC%	31
Tabla 6. Comparación de la cantidad seminal con los crioprotectores	33
Tabla 7. Promedio de las medias de pérdida de vigor, IRC (%) y la motilidad después para comparar la calidad seminal de semen con distintos crioprotectores (OPTIXCALL y TRIDALYL)	34
Tabla 8. Prueba T para comprobar las diferencias significativas de la pérdida de vigor, la reducción de motilidad y el IRC% al utilizar OPTIXCELL y TRILADYL	37

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del testículo del toro (Hernández, 2018)	7
Figura 2. Epidídimo-mundo pecuario (Gelvez, s/f).....	9

1. INFORMACIÓN GENERAL

Título del Proyecto:

Crioconservación de espermatozoides obtenidos mediante lavado retrógrado de la cola del epidídimo post mortem en bovinos a base de dos crioprotectores.

Fecha de inicio:

Octubre 2024

Fecha de finalización:

Enero 2025 **Lugar**

de ejecución:

Parroquia: Latacunga.

Provincia: Cotopaxi

Cantón: Latacunga

Zona: 3

Institución: Universidad Técnica De Cotopaxi.

Facultad que auspicia

Facultad De Ciencias Agropecuarias Y Recursos Naturales.

Carrera que auspicia: Carrera

de Medicina Veterinaria

Equipo de Trabajo:

Investigador 1: Martha Leticia Arguero Peralta (ANEXO1) Tutor

de titulación: Dra. Veloz Veloz Dina Maricela (ANEXO2) **Área**

de Conocimiento:

3109.02 Ciencias Agrarias, Ciencias Veterinarias, Genética.

Línea de investigación:

Análisis, Conservación y Aprovechamiento de la Biodiversidad **Sublíneas**

de investigación de la carrera:

Biodiversidad, mejora y conservación de recursos zoogenéticos.

2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

Se centra en la crioconservación de espermatozoides bovinos, un elemento clave en la preservación de la biodiversidad y el mejoramiento genético a través de la producción animal (Segura, y otros, 2023). En el contexto ecuatoriano, y particularmente en el cantón Latacunga, donde la ganadería representa un pilar económico importante, esta técnica cobra especial relevancia dado el valor genético que tiene la investigación. Sin embargo, la obtención de semen de alta calidad para la crioconservación puede verse limitada por factores como la muerte inesperada de especies de alto rendimiento genético. En estos casos, recatar los espermatozoides del epidídimo después de la muerte se presenta como una alternativa viable para preservar material genético valioso

Esta investigación busca abordar esta problemática mediante la extracción y crioconservación de espermatozoides del epidídimo, evaluando su eficacia sobre dos tipos de crioprotectores (animal y vegetal) en la criopreservación espermática. Se busca generar conocimiento sobre las mejores prácticas para la crioconservación de semen bovino obtenido post mortem, adaptándolas a las condiciones locales de Latacunga.

Los centros de investigación y universidades también se beneficiarán al generar nuevo conocimiento científico y formar profesionales en el área de biotecnología animal. El impacto de esta investigación radica en su contribución a el mantenimiento de la variedad biológica, el mejoramiento genético y el crecimiento sostenible del sector ganadero en Latacunga. Su relevancia se basa en la búsqueda de soluciones prácticas para la preservación de recursos genéticos y la mejora de la productividad ganadera.

La utilidad práctica de este estudio se materializa en la disponibilidad de semen de alta calidad para la inseminación artificial, incluso después de la muerte del animal. Además, se espera optimizar los procesos de crioconservación, aumentando la eficiencia y reduciendo costos, a la vez que se desarrollan protocolos adaptados a las condiciones y recursos locales.

3. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO

3.1. Beneficiarios directos

Criadores de ganado bovino en la provincia de Cotopaxi

3.2. Beneficiarios indirectos

Estudiantes, centros de investigaciones, diversas instituciones académicas.

4. EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN:

La crioconservación de espermatozoides se ha consolidado como una herramienta esencial en la reproducción animal, con un impacto significativo en el resguardo del ecosistema y el desarrollo biotecnológico. Sin embargo, su aplicación, eficiencia y acceso varían considerablemente según el contexto global, nacional y local (Martínez y Pineda, 2024).

A nivel global, la crioconservación de espermatozoides ha experimentado avances significativos, impulsados por la creciente demanda, la necesidad de preservar la biodiversidad genética y el desarrollo de nuevas tecnologías reproductivas (Castaño y Mesa, 2022). La globalización ha facilitado el intercambio de material genético, permitiendo la introducción de razas mejoradas en diferentes regiones y ofreciendo acceso a recursos genéticos valiosos para la producción ganadera y la adaptación al cambio climático.

No obstante, este avance también conlleva desafíos importantes. Existen disparidades en el acceso a estas tecnologías entre países desarrollados y en desarrollo, enfrentando retos muy importantes, así como la inexistencia de infraestructura, equipamiento y personal capacitado. Estas limitaciones afectan la aplicación de técnicas avanzadas, incrementando las desigualdades en la producción y limitando los beneficios de la biotecnología en muchas regiones (López, 2023). Además, la crioconservación plantea desafíos éticos y técnicos que deben ser considerados en su implementación (Segura et al., 2023).

En Ecuador, la crioconservación de espermatozoides representa una herramienta clave para mejorar la productividad ganadera, la competitividad del sector y la sostenibilidad de los sistemas productivos. Sin embargo, su aplicación enfrenta varios obstáculos (Rosete et al., 2021).

Uno de los aspectos más relevantes tenemos lo que es la carencia de infraestructura y tecnología apropiada. La disponibilidad de centros de crioconservación es limitada, sobre todo en las áreas rurales, donde se concentran la mayoría de los pequeños ganaderos. Además, la escasez de equipos especializados y la falta de personal capacitado restringen la aplicación de técnicas avanzadas, dificultando la mejora genética del ganado y la eficiencia reproductiva (Valdivieso, 2021).

Otro desafío importante es la ausencia de políticas claras y regulaciones específicas para la crioconservación de espermatozoides. La falta de un sistema nacional de registro y control de material genético afecta la trazabilidad y el aprovechamiento de los recursos genéticos, lo que

podría generar pérdida de diversidad genética y propagación de enfermedades (Martínez y Pineda, 2024).

En el cantón Latacunga, la ganadería desempeña un papel fundamental en la economía local, con sistemas productivos que van desde pequeños productores familiares hasta empresas con mayor grado de tecnificación. Si bien la crioconservación de espermatozoides tiene el potencial de fortalecer el desarrollo del sector ganadero local, su implementación enfrenta desafíos específicos.

Uno de los principales obstáculos es el acceso limitado a la tecnología y los servicios de crioconservación. Actualmente, la oferta de estos servicios en Latacunga es escasa, lo que obliga a los ganaderos a recurrir a centros ubicados en otras ciudades, incrementando los costos y la complejidad del proceso. La falta de acceso a equipos y materiales de calidad afecta la eficiencia de la crioconservación, dificultando su aplicación, especialmente para los pequeños productores.

Otro desafío importante es la conservación de razas bovinas locales. En la región existen razas adaptadas a las condiciones agroecológicas del área, pero su conservación se ve amenazada por la introducción de razas exóticas y la falta de programas de mejoramiento genético que valoren y preserven su diversidad. La crioconservación de espermatozoides podría jugar un papel clave en la preservación del patrimonio genético local, asegurando su adaptación al entorno y su potencial productivo a largo plazo (Almeida et al., 2021).

Ante este contexto, surge la siguiente cuestión: ¿Cuál es la eficacia de los crioprotectores a base de proteína animal y vegetal en la crioconservación de espermatozoides bovinos obtenidos mediante lavado retrógrado de la cola del epidídimo en condiciones post mortem?

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Evaluar los efectos de crioprotectores a base de proteína animal y vegetal sobre las características de semen de bovinos obtenidas mediante lavado retrógrado, de la cola del epidídimo en post mortem.

5.2. Objetivos Específicos

- Evaluar las células espermáticas recuperadas a través de lavado retrógrado epididimarios.

- Comparar la calidad seminal con distintos crioprotectores.

6. ACTIVIDADES Y SISTEMA DE TAREAS EN RELACIÓN CON LOS OBJETIVOS PLANTEADOS

Este apartado tiene como propósito describir las funciones del sistema de trabajo que se llevan a cabo para lograr todos los objetivos planteados en la investigación denominada “Crioconservación de espermatozoides obtenidos mediante lavado retrógrado de la cola del epidídimo tras la muerte en bovinos a base de dos crioprotectores”. En la tabla 1, se observan dichas actividades.

Tabla 1. Acciones y estructura de tareas alineadas con los objetivos planteados.

OBJETIVOS	ACTIVIDAD	METODOLOGÍA	RESULTADOS
Evaluar las células espermáticas recuperadas a través de lavado retrógrado epididimarios.	<ul style="list-style-type: none"> - Recolectar muestras de semen de bovinos post mortem mediante lavado retrógrado de la cola del epidídimo. - Realizar análisis morfológico de los espermatozoides mediante la observación en microscopio óptico. - Clasificar las alteraciones morfológicas observadas (defectos de cabeza, pieza intermedia, cola, etc.). - Cuantificar la frecuencia de cada tipo de alteración. 	<ul style="list-style-type: none"> - Utilizar un protocolo uniforme para la obtención y procesamiento del semen. - Aplicar técnicas de tinción específicas para la evaluación morfológica espermática - Utilizar un sistema de clasificación de alteraciones morfológicas estandarizado. - Utilizar un protocolo estandarizado para la crioconservación. 	<ul style="list-style-type: none"> - Obtener datos cuantitativos sobre la motilidad espermática (porcentaje de espermatozoides móviles, velocidad, etc.). - Determinar las alteraciones morfológicas en los espermatozoides crioconservados.

OBJETIVOS	ACTIVIDAD	METODOLOGÍA	RESULTADOS
	<ul style="list-style-type: none"> - Evaluar la motilidad y funcionalidad espermática. 		
Comparar la calidad seminal de semen con distintos crioprotectores.	<ul style="list-style-type: none"> - Comparar los resultados de movimiento, forma y viabilidad espermática obtenidos con los dos crioprotectores. - Realizar análisis estadísticos para verificar si existe hay disparidades entre los dos grupos. - Analizar la relación entre la calidad seminal y el tipo de crioprotector utilizado. 	<ul style="list-style-type: none"> - Aplicar técnicas de análisis estadístico para comparar los parámetros de calidad seminal entre los dos grupos de tratamiento. - Utilizar métodos de correlación para analizar la relación entre las variables. 	<ul style="list-style-type: none"> - Establecer si hay variaciones significativas en la calidad seminal (motilidad, morfología, funcionalidad) entre las muestras criopreservadas con crioprotector a base de proteína animal y vegetal. - Identificar el crioprotector que ofrece mejores resultados en términos de calidad seminal postdescongelación.

7. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA

7.1. Aparato reproductor del macho

Los ejemplares de las diversas especies domesticadas poseen órganos sexuales que varían según su anatomía, el ambiente en el que evolucionaron y sus necesidades específicas. A pesar de esta variabilidad, existen estructuras que, aunque tienen formas distintas, desempeñan funciones equivalentes en todas las especies. El sistema reproductivo del toro consta de las siguientes partes: (San Juan, 20023)

7.2. Testículos

Los testículos del toro son órganos esenciales en el sistema reproductor masculino, fundamentales en la generación de espermatozoides (espermatogénesis) así como hormonas reproductivas, siendo la testosterona la principal. Estos órganos están alojados en el escroto, una textura cutánea que ayuda a controlar la temperatura ligeramente inferior a la corporal,

condición necesaria para la producción eficiente de espermatozoides (Arbaiza & Cabrera, 2021).

La ubicación externa de los testículos permite un control térmico adecuado, ya que la espermatogénesis requiere un ambiente más fresco que el del interior del cuerpo. Internamente, los testículos están compuestos por una red de tubos espermáticos, que son canales tubulares enrollados donde ocurre la espermatogénesis. Estos túbulos están revestidos por células germinales en varias fases de maduración, desde las espermatogonias (células madre) hasta los espermatozoides completamente formados (Loor, 2022). Entre estas células germinales se encuentran las células de Sertoli, o células de sostén, que tiene una función crucial en la nutrición y el soporte acerca de las células germinales durante su desarrollo. Además, las células sustentaculares producen la hormona supresora, que regula dicha producción de espermatozoides utilizando un mecanismo de retroalimentación negativa con misma la hipófisis (Quijano & Ramírez, 2023).

En el tejido intersticial, ubicado entre los conductos están las células de Leydig. Estas células se consideran responsables sobre la producción del andrógeno principal, la hormona masculina que controla el desarrollo de los rasgos sexuales secundarios, como la masa muscular y la voz profunda, así como aquel comportamiento sexual y la espermatogénesis. La testosterona también es esencial para mantener la libido y la capacidad reproductiva del toro (Almeida & Conceicao, 2024).

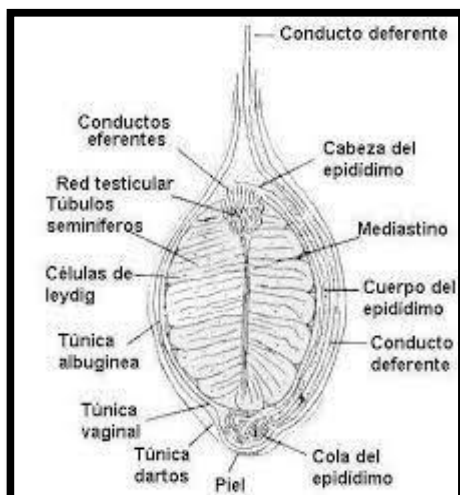


Figura 1. Esquema del testículo del toro (Hernández, 2018)

7.3. Epidídimo

El epidídimo es un órgano alargado compuesto por múltiples vueltas del conducto epididimario. Se encuentra adherido a uno de los bordes del testículo y puede extenderse ligeramente hacia

ambos polos testiculares. Se divide en tres secciones: la cabeza, que se encuentra unida a la cápsula testicular y recibe los conductos eferentes que se combinan para formar el conducto epididimario, donde los espermatozoides maduran; el cuerpo, que está menos adherido a la zona superficial y forma una cavidad conocida como bolsa testicular; y la cola, que se conecta hacia el testículo a través de un ligamento denominado ligamento propio. En esta zona, la medida del conducto disminuye y da origen al conducto deferente. El lumen del conducto epididimario permanece vestido mediante un epitelio cilíndrico pseudoestratificado con estereocilios, cuyas células también tienen una función secretora (Galina C, 2021).

En este proceso, los espermatozoides son transportados, concentrados, madurados y almacenados hasta el momento de la eyaculación, cuando pasan al conducto deferente para ser expulsados. Si no ocurre la eyaculación, las células de la cola del epidídimo los absorben (Torrez,2012).

7.4. Maduración de los espermatozoides en el epidídimo

Cuando los espermatozoides de mamíferos que abandonan el testículo, no poseen la capacidad de identificar ni fusionarse con los óvulos. Para desarrollar estas habilidades, deben pasar por varias modificaciones durante su paso a lo largo del epidídimo. Estos cambios comprenden modificaciones morfológicas, como el desplazamiento de la gota citoplasmática hacia aquella parte inferior de la cola, la fijación de la cromatina nuclear por medio enlaces de sulfurados, modificaciones en la formación de las membranas, un incremento en la vulnerabilidad al daño por choque frío, así como el progreso de la motilidad y la obtención de la capacidad reproductiva (Valverde E, 2016).

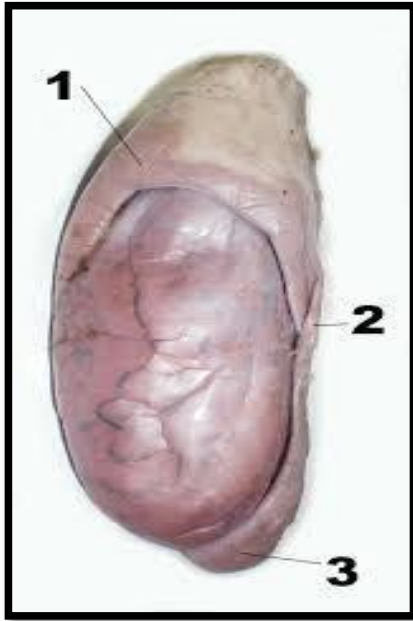


Figura 2. Epidídimo-mundo pecuario (Gelvez, s/f)

7.5. Conductos deferentes

Los conductos espermáticos, dos conductos con tejidos musculares, que trasladan espermatozoides desde la cola del epidídimo hasta el conducto urinario. En este trayecto, los espermatozoides se mezclan con las secreciones de las glándulas accesorias: las vesículas seminales, que aportan un líquido rico en fructosa para proporcionar energía a los espermatozoides; la próstata, que secreta un líquido alcalino para neutralizar la acidez de la vagina y activar la motilidad espermática; y las glándulas bulbouretrales, que producen un líquido mucoso para lubricar la uretra (Martínez & Pineda, 2024).

7.6. Glándulas anexas

Las glándulas accesorias del sistema reproductor, ubicadas donde los conductos deferentes se unen para formar la uretra, producen la mayor parte del líquido en el semen, además de activar los espermatozoides. Las vesículas seminales, conectadas a la uretra, son responsables de esta secreción.

La próstata, más pequeña en los toros, también contribuye a la secreción, aunque en menor cantidad. Las glándulas de Cowper, ubicadas a los lados de la uretra, secretan un fluido claro que limpia la uretra antes de la cópula. En ocasiones, estas glándulas pueden infectarse, causando semen turbio o amarillo, especialmente en los toros, donde las vesículas seminales

pueden inflamarse. En general, el problema se resuelve con antibióticos o de forma espontánea con el tiempo. University of Missouri Extension. (2017)

7.7. La espermatogénesis

La espermatogénesis es la serie de eventos biológico por medio del cual se crean los espermatozoides en los túbulos seminíferos de los testículos. Este proceso, comienza en la pubertad y persiste a lo largo de toda la vida del toro, está estrictamente regulado por una serie de hormonas, principalmente la hormona estimulante del folículo (FSH) y la hormona luteinizante (LH) (Taibe et al., 2022). Durante la maduración, los espermatozoides se desplazan al epidídimo, donde adquieren motilidad y la capacidad de fertilizar un óvulo.

La eyaculación es el proceso mediante el cual el semen es expulsado a través del pene, donde los espermatozoides se integran con los fluidos de las glándulas accesorias. Este proceso es parte integral de la función reproductora del toro, la cual se ve regulada por un complejo sistema hormonal que están relacionados con el hipotálamo, la hipófisis y los testículos.

El hipotálamo secreta la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), que a su vez activa a la hipófisis para liberar FSH, así como LH. La FSH desempeña una función crucial dentro de la estimulación de la producción espermática, mientras que la LH influye en las células de Leydig en los testículos, favoreciendo la generación de testosterona. Esta hormona es esencial no solo para el crecimiento y la correcta función de los órganos reproductores, sino también para el comportamiento sexual y la manifestación de caracteres sexuales secundarias en el toro (Echegaray, 2024).

7.8. Proceso eyaculatorio

El músculo de la cola del epidídimo se activa durante la excitación sexual, moviendo los espermatozoides se trasladan al conducto deferente. A pesar de aquella estimulación reproductiva, la duración de tránsito par espermatozoides no cambia. Cuando no hay eyaculaciones frecuentes, los espermatozoides se acumulan en la cola del epidídimo y se eliminan poco a poco por la orina. Los testículos producen espermatozoides de forma continua, y estos se almacenan en las colas del epidídimo y en las ampollas del conducto. Los espermatozoides avanzan en orden según el día en que fueron producidos, y los más viejos están en la parte final de las vías, donde tienen menor viabilidad. Cuando el macho no eyacula, los espermatozoides envejecen y se eliminan gradualmente por la micción. Sara, R. Capdevielle, E. (2018)

7.8.1. Efectos de la presencia de líquido seminal

1. Capacidad reproductiva: La existencia de fluido seminal es esencial para la reproducción, ya que transporta los espermatozoides durante la eyaculación.
2. Calidad del semen: La calidad del líquido seminal puede afectar la fertilidad del toro. Un líquido seminal de buena calidad debe tener una adecuada concentración de espermatozoides, movilidad y morfología.
3. Salud reproductiva: La presencia de líquido seminal puede ser un indicador de la salud reproductiva del toro. Problemas como la inflamación o infección del tracto reproductivo pueden afectar la calidad y cantidad del líquido seminal. Vásquez et al. (2016)

7.8.2. Efectos de la ausencia de líquido seminal

1. Infertilidad: La ausencia de líquido seminal puede ser un indicador de infertilidad en el toro.
2. Problemas de salud: La ausencia de líquido seminal puede originarse por afecciones de salud internos, como infecciones, inflamaciones o lesiones en el tracto reproductivo.
3. Dificultades para la reproducción: La ausencia de líquido seminal puede hacer que la reproducción sea más difícil o imposible, lo que puede afectar la productividad y la eficiencia de la ganadería. Vásquez et al. (2016)

7.9. Métodos de colecta

7.9.1. Vagina artificial

Se considera un método efectivo con el fin de obtener eyaculados de algunas especies animales, como bovinos, ovinos, caprinos y équidos. Su temperatura y presión adecuadas simulan de forma más precisa las condiciones naturales del depósito de semen en la vagina de las hembras, lo que permite obtener eyaculados con características normales y representativas (Avaloz J, 2021).

7.9.2. Electroeyaculador

Es otro método comúnmente utilizado cuando no es posible entrenar a los toros para la recogida de semen. El voltaje requerido para la recolección varía según el toro, al igual que los posibles efectos secundarios, como la contracción muscular generalizada. Esta técnica presenta algunos inconvenientes, como la posible contaminación del semen con orina y la variabilidad en la calidad de los eyaculados obtenidos. En algunos casos, para reducir la intensidad de los efectos

secundarios en los toros, se han probado dos enfoques: la anestesia epidural y la sedación (Issu,2022).

7.9.3. Lavado retrógrado post-mortem

El lavado retrógrado es una técnica utilizada para obtener espermatozoides del epidídimo de toros, especialmente después de la muerte (post mortem). El epidídimo es un conducto largo y estrecho ubicado junto al testículo donde los espermatozoides maduran y se almacenan (Delgado & Morocho, 2023). El procedimiento implica insertar una aguja en el conducto deferente (responsable de transportar los espermatozoides desde el epidídimo hasta la fase de uretra) y luego se inyecta un líquido de lavado en dirección opuesta al flujo normal de los espermatozoides. Este líquido ayuda a desprender los espermatozoides del epidídimo y a arrastrarlos hacia afuera, donde se recolectan en un tubo (Villamil, Pinzón, & Buitrago, 2024).

El lavado retrógrado encuentra su principal aplicación en dos escenarios distintos. En primer lugar, se erige como un recurso fundamental en la recuperación de espermatozoides post mortem, especialmente cuando un toro de valor genético excepcional fallece. Esta técnica permite preservar su material genético con el fin de ser empleado en programas de inseminación artificial, perpetuando así su valiosa contribución genética a pesar de su ausencia física (Rosas, 2019).

En segundo lugar, el lavado retrógrado puede ser empleado como una herramienta diagnóstica en casos de infertilidad masculina. Cuando un toro presenta dificultades para procrear sin una causa aparente, este procedimiento puede revelar la presencia de obstrucciones en el conducto deferente, impidiendo el paso de los espermatozoides (Calderón & Pintado, 2023). A pesar de su utilidad, el lavado retrógrado no está exento de limitaciones. Requiere personal altamente capacitado para llevar a cabo el procedimiento de manera efectiva y garantizar la calidad de los espermatozoides recuperados. Además, su eficacia puede verse influenciada por factores como el tiempo transcurrido desde la muerte del toro, su edad, raza y estado de salud previo.

7.10. Crioconservación

La crioconservación es una técnica que permite preservar células y tejidos a temperaturas extremadamente bajas (-196°C). Esta tecnología ha revolucionado la biología, la medicina y la agricultura. Su aplicación en la reproducción animal, especialmente en la conservación de espermatozoides, ha impulsado el mejoramiento genético, la conservación de la biodiversidad y la eficiencia en la producción de alimentos (Mocé, y otros, 2023). Para comprender esta

fascinante técnica, es esencial adentrarse en los fundamentos que la sustentan, explorando los principios fisicoquímicos que rigen la congelación y descongelación, y cómo estos procesos inciden sobre la estructura y la operatividad de las células.

Cuando una solución acuosa, como el semen, descienden a temperaturas por debajo de su punto de congelación, el agua comienza a formar cristales de hielo. Este proceso, denominado nucleación, puede ser homogéneo, cuando se forma hielo en el seno del líquido sobre enfriado, o heterogéneo, cuando la formación de hielo se inicia sobre partículas o superficies presentes en la solución.

La formación de estructuras cristalinas de hielo tiene algún impacto significativo sobre las células. A medida que el agua se congela, se produce una deshidratación celular, lo que aumenta la densidad de solutos dentro de la célula. Este aumento de la osmolaridad puede causar daño celular por estrés osmótico (Echegaray, 2024). La descongelación, al igual que la congelación, es un proceso crítico que puede afectar la viabilidad celular. Durante la descongelación, los cristales de hielo se funden, y el agua vuelve a ingresar a las células. Si la descongelación es demasiado lenta, los cristales de hielo pueden crecer y causar mayor daño celular. Por otro lado, si la descongelación es demasiado rápida, puede producirse un choque osmótico debido al rápido ingreso de agua a las células (Choez, Zambrano, & Marini, 2024).

Efectos de la crioconservación en los espermatozoides

□ Daño a la membrana plasmática

La membrana celular de los espermatozoides es esencial para regular el intercambio de sustancias con el medio externo, mantiene la integridad celular y participa en procesos clave como la preparación y la activación acrosómica. Durante el proceso de crioconservación, la cristalización del hielo y la pérdida de agua que pueden alterar la flexibilidad y la capacidad de permeabilidad de la membrana, provocando la pérdida de componentes esenciales, la entrada de sustancias dañinas y la desestabilización de su estructura (Borbona, y otros, 2022).

Estos cambios pueden resultar en:

- ❖ **Disminución de la motilidad:** La alteración de la membrana puede afectar la función de las proteínas transmembrana que participan en la generación de energía y el movimiento del flagelo.
- ❖ **Reducción de la viabilidad:** El daño en la membrana puede llevar a la muerte celular.
- ❖ **Incapacidad para la habilidad de respuestas acrosómica:** Es aquella alteración de la composición lipídica de la membrana puede con los procesos de capacitación y reacción

acrosómica, esenciales para la fertilización (Chaves, Murchie, & Koyess, 2020). □ Daño al acrosoma

El acrosoma es una estructura vesicular en la cabeza del espermatozoide que alberga enzimas hidrolíticas necesarias para atravesar la zona pelúcida del óvulo durante la fertilización. La crioconservación puede dañar la membrana acrosomal, provocando la liberación prematura de enzimas o la incapacidad para liberarlas en el momento adecuado.

El daño acrosomal puede manifestarse como:

- ❖ Reacción acrosómica espontánea: La liberación prematura de enzimas acrosomales incapacita al espermatozoide para fertilizar el óvulo.
- ❖ Incapacidad para la reacción acrosómica: La alteración de la membrana acrosomal puede impedir la liberación de enzimas en el momento de la fertilización, impidiendo la penetración en el óvulo (Almeida & Conceicao, 2024).
 - Daño al ADN

El ADN del espermatozoide, portador de la información genética paterna, es susceptible al daño durante la crioconservación. La cristalización del agua en el hielo, el estrés osmótico, además de la generación de especies reactivas de oxígeno pueden provocar roturas en las cadenas de ADN, alteraciones en su estructura y mutaciones.

El daño al ADN puede tener consecuencias como:

- ❖ Disminución de la fertilidad: La fragmentación del ADN puede interferir con la fertilización y el desarrollo embrionario.
- ❖ Aumento de la incidencia de anomalías congénitas: Las mutaciones en el ADN espermático pueden transmitirse a la descendencia, aumentando el riesgo de malformaciones y enfermedades genéticas (Segura, y otros, 2023).
 - Alteraciones en la motilidad

La motilidad espermática es un parámetro crucial para la fertilidad, ya que permite a los espermatozoides desplazarse recorriendo el tracto reproductor femenino para llegar al óvulo. La crioconservación puede afectar la motilidad de diversas maneras, reduciendo la velocidad, la progresividad y la viabilidad de los espermatozoides.

Las alteraciones en la motilidad pueden deberse a:

- ❖ Daño a la membrana plasmática: Como se mencionó anteriormente, la alteración de la membrana puede afectar el rol de las proteínas asociadas al movimiento flagelar.
- ❖ Daño a las mitocondrias: Las mitocondrias, responsables de la producción de energía para el movimiento, pueden ser dañadas durante la crioconservación, lo que reduce la motilidad espermática.
- ❖ Alteraciones en el axonema: El axonema, estructura interna del flagelo, puede sufrir daños durante la crioconservación, afectando la capacidad de movimiento (Yáñez, Becerra, Herradón, Peña, & Quintela, 2022).

7.11. Evaluación espermática

La calidad del semen de un toro se puede apreciar influenciada debido a causa de diferentes factores, como la edad, y el estado nutricional, las enfermedades y el estrés. La evaluación espermática se convierte en una herramienta invaluable para monitorear la salud reproductiva de los toros a lo largo del tiempo. Al realizar evaluaciones periódicas, los ganaderos pueden identificar cualquier cambio en la calidad del semen y tomar medidas preventivas o correctivas para preservar la fertilidad de sus reproductores (Valverde, 2021). La evaluación espermática también se extiende al ámbito de la conservación genética. Al evaluar la calidad del semen antes de su congelación, los ganaderos pueden asegurar la viabilidad de los espermatozoides a largo plazo. Esta práctica permite preservar el material genético de toros valiosos, ya sea por su raza, características productivas o valor histórico, garantizando así la continuidad de su legado para generaciones futuras.

7.11.1. Evaluación macroscópica

Se evalúa mediante criterios fundamentados en el rango de concentración de esperma, según la turbidez de las muestras, lo cual refleja una mayor o menor densidad espermática. Esta evaluación inicial debe ser confirmada con el análisis microscópico, en la que se determina con precisión la concentración de espermatozoides utilizando una cámara de Neubauer o cualquier otra técnica de medición (Valle T, 2024).

En los bovinos, la densidad visible del semen se categoriza de la siguiente manera:

- ❖ Azoospermico: Es la carencia de espermatozoides en el eyaculado.
- ❖ Disminución de epz: ≤ 200 millones de espermatozoides/mL.

El volumen se evalúa directamente con tubos falcón, con la consideración de que un toro de más de 2 años debe presentar un eyaculado de al menos 4 ml (Gomez M,2024). El volumen puede oscilar en testículos post-mortem el cual tiene 0.4 a 0.5ml

7.11.2. Evaluación microscópica

- ❖ Motilidad masal: Podemos observar por un movimiento de masa esto se entiende porque tiene ondas omegas, observamos con el lente microscópico de 10 X o de 40X
- ❖ Motilidad individual: Esto se expresa como el porcentaje de espermatozoides en movimiento bajo la observación de un microscopio esta evaluación de motilidad debe de realizarse con un aumento de 10 X a una temperatura de 37 °C
- ❖ Vigor: nos ayuda a tener en cuenta la velocidad del espermatozoide, aquí contamos con una escala donde 0 – 4.
- ❖ Concentración: se refiere a la cantidad de espermatozoides presentes en un mililitro (ml) de semen, utilizando la cámara de Neubauer para determinar la concentración espermática, nos permite contabilizar los espermatozoides vivos. Funciona colocando una gota de semen diluido en la cámara. Se observa al microscopio en las cuadrículas de la cámara. Se realiza un cálculo matemático para obtener la concentración por ml. Agüero, G. (2015).

7.12. Diluyentes

La criopreservación de espermatozoides de toros permite conservar el material genético de los reproductores de alto valor con el objetivo de ser usado a futuro en programas (Mallma, Quintanilla, & Quispe, 2021). No obstante, el proceso de congelación y descongelación puede ser perjudicial para los espermatozoides, ya que pueden sufrir daños en sus membranas celulares, su ADN y su capacidad de movimiento.

- **TRILADYL:** Para preparar los diluyentes Triladyl®, se añade al concentrado agua destilada además de yema de huevo fresca. La dilución de los eyaculados ofrece un amplio margen de variabilidad, sin influir negativamente los resultados de fertilidad. El Triladyl se emplean con resultados favorables tanto en la eyaculación con baja densidad espermática al igual que muestras de semen con baja concentración celular (Minutvet,2022).

Esto quiere decir que contiene componentes que protegen a los espermatozoides durante el proceso de congelación y descongelación, lo que ayuda a mantener su viabilidad y motilidad, mejorando así las posibilidades de éxito en los procedimientos de inseminación artificial.

También puede contener nutrientes y agentes antioxidantes que protegen a los espermatozoides durante el almacenamiento.

Es un componente clave en los laboratorios de reproducción animal para asegurar que los espermatozoides se mantengan en buenas condiciones antes de ser utilizados en la inseminación

- **OPTIXCELL:** Se trata del primer preservador de semen basado en liposomas fabricados, sin proteína animal. Los liposomas ofrecen una solución eficaz para reemplazar la yema de huevo Este producto garantiza una separación y preservación segura de alta calidad para las dosis de semen, tanto fresco como congelados (IMV,2020)

Esta suatancia diluyente se menciona que contiene una combinación de nutrientes, antioxidantes y protectores celulares que ayudan a preservar la integridad de los espermatozoides mientras están almacenados en nitrógeno líquido, asegurando su motilidad y capacidad de fecundación cuando se utilizan posteriormente en la inseminación artificial. En resumen, Optixcell permite una mejor calidad y mayor tasa de éxito en los procedimientos de inseminación artificial, especialmente cuando se utilizan semen congelado.

8. VALIDACIÓN HIPÓTESIS

En lo que respecta a las hipótesis del presente estudio se tomaron en consideración las siguientes:

- **Hipótesis alternativa:** Existe una diferencia significativa en la calidad seminal (motilidad, morfología, funcionalidad) de espermatozoides bovinos obtenidos mediante lavado retrógrado de la cola del epidídimo post mortem, criopreservados con crioprotectores a base de proteína animal y vegetal.
- **Hipótesis nula:** No existe diferencia significativa en la calidad seminal (motilidad, morfología, funcionalidad) de espermatozoides bovinos obtenidos mediante lavado retrógrado de la cola del epidídimo post mortem, criopreservados con crioprotectores a base de proteína animal y vegetal.

9. METODOLOGÍA

9.1. Localización de estudio

Provincia de Cotopaxi, cantón Latacunga (Camal municipal) no existe límites claramente identificados.

Posee las siguientes características climatológicas:

- Altura: 2.276 m.s.n.m.
- Clima: templado andino
- Temperatura: 13°C- 26°C
- Precipitación: 800 mm a 1200 mm

9.2. Tipo de investigación

La investigación realizada es de carácter experimental y transeccional, puesto que se manipulan variables con comparación de grupos independientes. La investigación experimental se caracteriza por la aplicación de un diseño controlado en el que se comparan dos tratamientos (crioprotectores) para evaluar su eficacia en la criopreservación de espermatozoides. Con respecto a la investigación transeccional, se caracteriza por recopilar datos en un único punto en el tiempo o en un corto periodo de tiempo, sin u seguimiento longitudinal o repetido.

9.3. Diseño del estudio

La investigación obedece a un diseño experimental, comparativo y de campo

9.4. Enfoque Metodológico del estudio

El estudio sigue un enfoque cuantitativo, experimental y comparativo, con la finalidad de evaluar la calidad seminal postdescongelación, utilizando dos crioprotectores diferentes (OPTIXCELL y TRILADYL).

9.5. Variables identificadas

- Variable independiente: tipo de crioprotector utilizado para criopreservar el semen.
- Variables dependientes:
 - Motilidad individual antes y después de la congelación (M. Individual)

- ☐ Vigor espermático
- ☐ Índice de Recuperación de la Criopreservación (IRC%)
- ☐ Reducción de motilidad

9.6. Muestra

Se utilizaron muestras seminales de 8 toros con edades comprendidas entre 15 y 18 meses, las cuales fueron recolectadas inmediatamente después del sacrificio de los animales (recolección de los testículos).

9.7. Técnicas Utilizadas en la Investigación

Para evaluar la calidad seminal y comparar el desempeño de los crioprotectores OPTIXCELL y TRILADYL, se aplicaron las siguientes técnicas:

1. Técnica de recolección y procesamiento del semen
 - Lavado retrógrado de la cola del epidídimo tras su sacrificio: Se recuperaron espermatozoides a través de un lavado con solución fisiológica.
2. Técnicas de Criopreservación
 - Uso de crioprotectores (OPTIXCELL y TRILADYL): Se prepararon dos grupos de muestras con estos crioprotectores.
 - Enfriamiento progresivo y congelación en nitrógeno líquido: Se aplicó un protocolo estandarizado de congelación para evitar daños celulares.
 - Descongelación controlada: Se usó un baño de agua a temperatura controlada para recuperar los espermatozoides.
3. Evaluación de la Calidad Espermática
 - Motilidad Masal y Motilidad Individual
 - ☐ Observación en microscopio de contraste de fase.
 - ☐ Clasificación de la movilidad espermática en función de la actividad de los espermatozoides.
 - Vigor Espermático
 - ☐ Escala visual de 0 a 5 para medir la intensidad del movimiento espermático.
 - Índice de Recuperación de la Criopreservación (IRC%) Se calculó con la ecuación:

$$IRC\% = \left(\frac{\text{Motilidad posdescongelación}}{\text{Motilidad precongelación}} \right) \times 100$$

- Reducción de Motilidad

Se determinó la diferencia porcentual entre la motilidad antes y después de la criopreservación.

9.8. Análisis Estadístico

- Test de Levene: Esta nos ayuda analizar la homogeneidad de fluctuación.
- Prueba t Student: Para comparar la motilidad postdescongelación, la reducción de motilidad y el IRC% entre los dos crioprotectores.
- Cálculo de promedios y desviaciones estándar para describir la variabilidad en la calidad espermática.

En este enfoque me permitió establecer la presencia o ausencia de diferencias estadísticamente significativas en relación de los crioprotectores y las diferentes variables, para determinar su impacto en la calidad espermática poscriopreservación.

En general, el estudio utilizó una combinación de técnicas de laboratorio (procesamiento y crioconservación), técnicas microscópicas (evaluación de motilidad, vigor, entre otros) y técnicas estadísticas (comparación de valores y varianzas) para investigar los efectos entre los crioprotectores en la calidad seminal.

9.9. Procesamiento de Datos

Se llevó a cabo el procedimiento de datos mediante software IBM SPSS Statistics, versión 28, además de la herramienta de hoja de cálculo Excel de Microsoft. La información se presentó en tablas para su mayor comprensión, utilizándose para ello estadísticas descriptivas e inferenciales.

9.10. Materiales y equipos

9.10.1. Materiales

- Testículos bovinos (16 unidades)
- Diluyente Optixcell (100 ml)
- Diluyente Triladyl (100 ml)
- Yema de huevo fresca
- Agua bidestilada
- Solución salina fisiológica (0.9%)
- Tubos Falcón

- Jeringas de insulina
- Bisturí estéril
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Cámara de Neubauer
- Pajuelas (0.5 ml)
- Alcohol polivinílico
- Gradillas para pajuelas
- Caja de poliestireno expandido (EPS)
- Material de laboratorio general (pipetas, probetas, vasos de precipitación.)
- Termómetro
- Tubos de eppendorf
- Puntas amarillas
- Micropipetas

9.10.2. Equipos

- Tanque de nitrógeno líquido
- Microscopio óptico
- Baño María
- Refrigerador
- Hielera – Cooler
- Platina térmica

9.11. Procedimiento

El procedimiento en general estuvo compuesto por los siguientes pasos:

- Obtención y preparación del semen.
- División de las muestras en dos grupos según el crioprotector.
- Criopreservación y descongelación bajo condiciones controladas.
- Evaluación de la motilidad y vigor espermático antes y después del proceso.

A continuación, se describe el procedimiento con todos los detalles que amerita el caso de estudio.

1. Obtención de las muestras:

- Adquisición de testículos: Trabajamos con 16 testículos con edades comprendidas entre 15 y 18 meses.

- Recolección de los testículos: Inmediatamente después del sacrificio de los animales en el camal, se procedió a la recolección de los testículos. Se realizó una incisión escrotal y se extrajeron los testículos con cuidado, evitando dañar el tejido testicular y el epidídimo.
 - Transporte al laboratorio: Los testículos se colocaron en un cooler a una temperatura de 5°C para su transporte al laboratorio. El tiempo de transporte se mantuvo dentro de las 3 horas posteriores al sacrificio para minimizar el daño espermático por el tiempo post mortem.
2. Técnica del lavado retrógrado de la cola del epidídimo:
- Lavado de los testículos:
 - Se lavaron los testículos con cloruro de sodio para eliminar restos de sangre y otros contaminantes que puedan interferir con el análisis espermático. Posteriormente, se secaron con papel absorbente para eliminar el exceso de humedad.
 - Preparación de los diluyentes:
 - Triladyl:
 - Se separó la yema de huevo fresca de la clara con movimientos suaves con el fin evitar la generación de espuma, se descartó la clara restante con papel absorbente hasta obtener yema pura.
 - Se preparó la solución diluyente Triladyl en tubos Falcon, mezclando 0.5 ml de yema de huevo, 3 ml de Triladyl y 9 ml de agua bidestilada. El diluyente se incorporó a la yema de huevo inmediatamente homogenizamos la mezcla evitando la formación de espuma, que puede dañar a los espermatozoides.
 - Optixcell:
 - Se preparó la solución diluyente Optixcell en tubos Falcon, mezclando 4 ml de Optixcell con 8 ml de agua bidestilada. Se realizaron movimientos lentos para homogenizar la mezcla y evitar la formación de burbujas que puedan afectar la calidad del mismo.
 - Identificación y disección:

- Se realizaron cortes precisos para extraer los testículos de las bolsas escrotales.
 - Los distintos vasos y la cola del epidídimo fueron separados mediante técnicas asépticas con un bisturí y tijeras.
 - Se identificaron las estructuras anatómicas del epidídimo en cada testículo mediante observación directa y palpación.
 - Lavado retrógrado:
 - Se inyectaron los diluyentes (Triladyl u Optixcell) en el conducto deferente, a través de una jeringa de insulina de 1 ml, con movimientos suaves y ligeros para evitar dañar el conducto y asegurar una distribución uniforme del diluyente en el epidídimo.
 - A medida que se iba introduciendo los diluyentes podíamos observar un abultamiento en la cola del epidídimo. ○ Se realizaron pequeñas incisiones en el epidídimo para permitir la salida del diluyente y la recolección del semen en una caja Petri era un fluido viscoso y de color claro, cuya naturaleza dependía de cada testículo.
 - Almacenamiento:
 - El semen recolectado de ambos testículos con los diferentes diluyentes se colocó en tubos Falcon, debidamente etiquetados con la identificación del animal, el diluyente utilizado y la fecha, para su posterior análisis.
3. Evaluación:
- Observación microscópica:
 - Se evaluó la motilidad masal, en la cual se detectó la existencia o ausencia de desplazamiento medial o la formación de remolinos (ondas omegas). Para su evaluación se utilizó una clasificación de 1 - 5, donde 1 señala la falta de ondas, así como 5 señala la presencia de ondas bien definidas y visibles. Se utilizó una muestra de 10 microlitros de semen puro, que fue colocada sobre un portaobjetos precalentado a 37°C. La observación se realizó utilizando un microscopio con lente de 10X. ○ La motilidad individual fue evaluada observando los espermatozoides que presentan movimientos circulares o avanzan de forma aleatoria. Para la observación, se utilizó porta y cubreobjetos precalentados, los

cuales permiten una mejor visualización del movimiento espermático. Se preparó una muestra de 10 microlitros de semen, a la que se adicionaron 0.5 microlitros de diluyente para reducir la concentración y facilitar la observación. El análisis se llevó a cabo mediante un microscopio utilizando los objetivos de 40X y 60X.

- El vigor consideramos la rapidez con la que los espermatozoides atraviesan el área de la escala donde 0 son inmóviles y 4 avanzan. Observamos con el lente 60X del microscopio para tener mayor visibilidad.
- En la concentración utilizamos la cámara de Neubauer y un cubreobjetos, colocando una muestra de 10 microlitros de semen con la micropipeta, donde podemos visualizar el conteo de los espermatozoides donde la cantidad que me salga la multiplico por 10.000. El precalentamiento ayuda a mantener la temperatura del semen y a evitar un choque térmico que pueda afectar la calidad espermática.
 - El volumen fue medido mediante el procedimiento de lavado, el cual proporcionó un rango de 0.4 a 0.5 ml. Para obtener las muestras, se emplearon tubos Falcón, lo que posibilitó una adecuada captura y manejo del volumen durante el proceso.
- Análisis de anomalías:
 - Se observaron anomalías en la morfología de los espermatozoides, como defectos en la cola doblada en cualquier dirección, cabeza desprendida y gota citoplasmática pueden afectar su capacidad de fecundación.

4. Enfriamiento, Congelación y Conservación:

- Preparación de pajuelas:
 - Se llenaron pajuelas de 0.50 ml con el semen diluido, todo el proceso fue mediante absorción manual y el sellado con alcohol polivinílico. Se rotularon las pajuelas con la fecha y el número del toro para su identificación.
 - Se envaso cada pajuela con un promedio entre 2 o 3 millones de espermatozoides viables, utilizando esta formulación para determinar su almacenamiento.

Volumen x concentración x motilidad individual% x anormalidad%.

- Enfriamiento:

- Se colocaron las pajuelas en una gradilla y se enfriaron a 5°C durante 3 horas en un refrigerador para reducir gradualmente la temperatura del semen antes de la congelación.
- Congelación:
 - Se colocaron las gradillas en una caja de espuma Flex con nitrógeno líquido durante 15 minutos para someter las pajuelas a un enfriamiento rápido en vapores de nitrógeno bajo -186°C.
 - Se sumergieron las pajuelas en nitrógeno líquido durante 5 minutos adicionales para completar la congelación a -196°C.
- Conservación:
 - Se colocaron las pajuelas en porta pajuelas y se conservaron tanque de nitrógeno líquido a -196°C para su conservación a largo plazo.

5. Descongelación:

El descongelamiento se realizó después de 5 a 7 días de haber criopreservado pajuelas.

- Preparación:
 - Se extrajo la porta pajuelas del tanque de nitrógeno líquido con precaución, utilizando guantes criogénicos para evitar quemaduras por frío.
- Descongelación:
 - Se sacudieron las pajuelas para eliminar el nitrógeno líquido restante en el exterior, evitando que la pajuela estalle al descongelarse debido a la expansión del nitrógeno líquido.
 - Se sumergieron las pajuelas en agua destilada a 36°C durante 20 segundos (contando de 1001 a 1020) para descongelar rápidamente el semen y minimizar el daño celular. El uso de agua destilada previene la contaminación de la muestra y la aparición de estructuras cristalinas en la descongelación.
- Observación microscópica:
 - Se cortaron las pajuelas con tijeras y se depositó una pequeña gota de semen en un portaobjetos con un cubreobjetos para su observación en el microscopio, evaluando la motilidad y el vigor de los espermatozoides después de la descongelación.

6. Evaluación de la descongelación:

- Se evaluó la calidad espermática de cada muestra inmediatamente después de la descongelación.
- Se realizaron las siguientes evaluaciones motilidad individual y el vigor donde los porcentajes eran mínimos ya que pasando este procedimiento siempre disminuye un 1520% de la viabilidad espermática.

10. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

❖ Para realizar la recolección de espermatozoides se realizó el lavado retrógrado de la cola del epidídimo después de su muerte. Luego se realizó el análisis de las alteraciones morfológicas (defectos en cabeza, pieza intermedia y cola) mediante microscopía óptica, para posteriormente cuantificar los porcentajes de espermatozoides normales y anormales con criterios de la OMS. En la tabla 2, se analizan los resultados de porcentajes de anomalías encontradas.

Para obtener un resumen de los lavados con OPTIXCELL y TRILADYL, se realizó la siguiente tabla.

Tabla 2. Comparación general de los valores promedios de los retrolavados con OPTIXCELL y TRILADYL

	OPTIXCELL (PROMEDIO)	TRILADYL (PROMEDIO)
CONCENTRACIÓN (10 ⁶ /ML)	98.56 ^a	102.75 ^b
% ANOMALÍAS	12.31% ^a	8.91% ^b
ÍNDICE DE ANOMALÍAS	0.0926 ^a	0.0679 ^b (10 ⁶ /ML)

Según los resultados obtenidos mediante la prueba T, Triladyl mostró menor porcentaje de anomalías espermáticas (8.91%) en comparación con Optixcell (12.31%), demostrando que los dos son mayores al (valor p 0.05). Asimismo, el índice de anomalías también es menor con Triladyl (0.0679 vs. 0.0926), indicando menor proporción de espermatozoides defectuosos por millón. Del mismo modo, la concentración espermática promedio es ligeramente mayor en Triladyl, lo que sugiere mejor recuperación celular.

Es importante señalar que, al analizar las observaciones por Bovino, Triladyl reduce consistentemente el % de anomalías en la mayoría de los casos. En algunos toros con mayor alteración inicial (T13 y T16 en Optixcell), Triladyl sigue mostrando valores más controlados de anomalías. Los Toros con menor concentración inicial (T13, T14, T15, T16) muestran

mayores anomalías en ambos tratamientos, indicando que la calidad del semen inicial influye en la respuesta a la criopreservación.

En este sentido, Ramón et., al. (2017), realizó un estudio donde comparó Trehalosa (33,85%) y Sacarosa con Triladyl para evaluar cual conservaba mejor y no producía anomalías en el semen bobino. Sus estudios mostraron que el diluyente Triladyl (46,50%), fue mejor al valor p, en relación al Trehalosa (33,85%) y Sacarosa (31,85%) y sin identificar diferencias ($p > 0.05$) en cuanto a la variable de las anomalías entre los tratamientos.

Se pudo observar que las bajas tasa de alteraciones morfológicas de 12,31% y 8,91% ($< 15,00\%$) sugieren que los espermatozoides recuperados por lavado retrógrado epididimario post mortem mantienen una estructura adecuada para fertilización. Así, el lavado retrógrado epididimario post mortem no genera un impacto negativo significativo en la morfología espermática. Por otro lado, TRILADYL mostró una menor tasa de alteraciones morfológicas (8.91%) que OPTIXCELL (12.31%), lo que sugiere que podría ser el medio más adecuado para la criopreservación en estos casos.

❖ Se centró en evaluar la motilidad y funcionalidad espermática con el crioprotector a base de proteína animal y vegetal (anexo 4). Para lograrlo, se realizaron varios pasos, los cuales se muestran a continuación.

1. Organización de los datos correspondientes separados por crioprotector (OPTIXCELLL y TRILADYL).
2. Comparar la motilidad espermática:
 - Motilidad individual antes y después de la congelación
 - Reducción de la reducción de motilidad (antes y después de descongelar) Para el cálculo de la reducción de motilidad se utilizó la ecuación:

$$\%Reducción\ de\ motilidad = \left(\frac{Motilidad\ antes - motilidad\ después}{Motilidad\ antes} \right) \times 100$$

A continuación, se muestra el desarrollo de la ecuación sustituyendo valores:

Para Toro 1 (OPTIXCELL-proteína vegetal) antes y después:

$$\%Reducción\ de\ motilidad = \left(\frac{15 - 5}{15} \right) \times 100 = 66,67\%$$

Para Toro 1 (TRIDALYL-proteína animal) antes y después:

$$\%Reducción\ de\ motilidad = \left(\frac{40 - 10}{40} \right) \times 100 = 75,00\%$$

Para Toro 2 (OPTIXCELL-proteína vegetal) antes y después:

$$\%Reducción\ de\ motilidad = \left(\frac{60 - 25}{60} \right) \times 100 = 58,33\%$$

Para toro 2 (TRIDALYL-proteína animal) antes y después:

$$\%Reducción\ de\ motilidad = \left(\frac{40 - 15}{40} \right) \times 100 = 62,50\%$$

Tabla 3. Test student para muestras independientes (reducción de motilidad)

	Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias					95% de intervalo de confianza de la diferencia	
	F	Sig.	T	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	Inferior	Superior
Reducci_motil Se asumen varianzas iguales	,243	,626	,240	30	,812	,00875	,03647	-,06573	,08323
No se asumen varianzas iguales			,240	29,285	,812	,00875	,03647	-,06581	,08331

La tabla 3, muestra los valores del test de Levene (Homogeneidad de desviación) que son F (0,243) y Sig. (0,626). Esta prueba tiene un valor p-valor de 0,626, que es mayor a 0,05, indicando que las varianzas son iguales.

En cuanto a la prueba T para la igualdad de medias, se dispone:

El valor de t de 0,240, es bajo, indicando que la diferencia entre los grupos no es considerable.

P-valor es 0,812. Esto indica que es >0,05 y que no se evidencia una diferencia significativa desde el punto de vista estadístico entre los crioprotectores OPTIXCELL así como TRILADYL en términos de reducción de motilidad. Esto significa que, a nivel estadístico, ambos crioprotectores tienen un efecto similar en la motilidad espermática.

- ❖ Para evaluar la funcionalidad espermática, se realizó una comparación entre el vigor antes y después de la congelación, y también se analizó el Índice de Recuperación de la Criopreservación (IRC %). Este procedimiento evalúa la capacidad de movimiento y energía de los espermatozoides antes y después de la criopreservación. La funcionalidad espermática se asocia con la calidad del semen postdescongelación y su potencial fertilizante. Además, se calculó el Índice de Recuperación tras la congelación (IRC%). Este

mede qué tan bien se mantienen los espermatozoides funcionales tras la descongelación El parámetro referido a Pérdida de vigor, indica si hubo una disminución notable en el vigor espermático después del proceso de congelación y descongelación. En la tabla 4, algunos toros tienen vigor 2 antes de la congelación y vigor 1 después, lo que indica una pérdida de movimiento progresivo tras el proceso de criopreservación. Se reportó que “NO HUBO PERDIDA DE VIGOR” (0), cuando no se observó una disminución significativa, o “MODERADO” (1), cuando si hubo una reducción en la calidad del vigor espermático. Este parámetro se calculó según la ecuación:

$$\text{Pérdida de vigor} = \text{vigor antes} - \text{vigor después}$$

Tabla 4. Cálculo de pérdida de vigor y el índice IRC para evaluar funcionalidad espermática

Toros	Crioprotector	M. Masal	Lavado retrogrado		Descongelación		Vigor	Pérdida de vigor		Categorización de la pérdida de vigor
			Vigor	M.individual	M. Individual	Reducción de motilidad		IRC (%)		
T1	OPTIXCELL	1	1	15,00%	5,00%	1	66,67%	33,33	0	No hubo pérdida de vigor
T2	TRYLADYL	1	1	40,00%	10,00%	1	75,00%	25,00	0	No hubo pérdida de vigor
	OPTIXCELL	1	2	60,00%	25,00%	1	58,33%	41,67	1	Moderado
T3	TRYLADYL	1	1	40,00%	15,00%	1	62,50%	37,50	0	No hubo pérdida de vigor
	OPTIXCELL	1	1	40,00%	15,00%	1	62,50%	37,50	0	No hubo pérdida de vigor
T4	TRYLADYL	1	1	40,00%	10,00%	1	75,00%	25,00	0	No hubo pérdida de vigor
	OPTIXCELL	1	1	40,00%	15,00%	1	62,50%	37,50	0	No hubo pérdida de vigor
T5	TRYLADYL	1	1	30,00%	10,00%	1	66,67%	33,33	0	No hubo pérdida de vigor
	OPTIXCELL	1	2	50,00%	20,00%	1	60,00%	40,00	1	Moderado
T6	TRYLADYL	1	1	40,00%	15,00%	1	62,50%	37,50	0	No hubo pérdida de vigor
	OPTIXCELL	1	1	40,00%	10,00%	1	75,00%	25,00	0	No hubo pérdida de vigor
T7	TRYLADYL	1	1	40,00%	10,00%	1	75,00%	25,00	0	No hubo pérdida de vigor
	OPTIXCELL	1	2	50,00%	20,00%	1	60,00%	40,00	1	Moderado
T8	TRYLADYL	1	1	40,00%	20,00%	1	50,00%	50,00	0	No hubo pérdida de vigor
	OPTIXCELL	1	1	40,00%	25,00%	1	37,50%	62,50	0	No hubo pérdida de vigor
T9	TRYLADYL	1	2	50,00%	20,00%	1	60,00%	40,00	1	Moderado
	OPTIXCELL	1	2	50,00%	10,00%	1	80,00%	20,00	1	Moderado
T10	TRYLADYL	1	1	40,00%	10,00%	1	75,00%	25,00	0	No hubo pérdida de vigor
	OPTIXCELL	1	2	55,00%	15,00%	1	72,73%	27,27	1	Moderado
T11	TRYLADYL	1	2	50,00%	20,00%	1	60,00%	40,00	1	Moderado
	OPTIXCELL	1	1	40,00%	10,00%	1	75,00%	25,00	0	No hubo pérdida de vigor
T12	TRYLADYL	1	1	30,00%	5,00%	1	83,33%	16,67	0	No hubo pérdida de vigor
	OPTIXCELL	1	1	40,00%	10,00%	1	75,00%	25,00	0	No hubo pérdida de vigor
T13	TRYLADYL	1	2	50,00%	20,00%	1	60,00%	40,00	1	Moderado
	OPTIXCELL	1	1	40,00%	15,00%	1	62,50%	37,50	0	No hubo pérdida de vigor

TRYLADYL	1	1	40,00%	10,00%	1	75,00%	25,00	0	No hubo perdida de vigor
T14 OPTIXCELL	1	1	35,00%	10,00%	1	71,43%	28,57	0	No hubo perdida de vigor
TRYLADYL	1	1	40,00%	20,00%	1	50,00%	50,00	0	No hubo perdida de vigor
T15 OPTIXCELL	1	1	30,00%	5,00%	1	83,33%	16,67	0	No hubo perdida de vigor
TRYLADYL	1	1	30,00%	10,00%	1	66,67%	33,33	0	No hubo perdida de vigor
T16 OPTIXCELL	1	1	20,00%	5,00%	1	75,00%	25,00	0	No hubo perdida de vigor
TRYLADYL	1	1	15,00%	5,00%	1	66,67%	33,33	0	No hubo perdida de vigor

Interpretación

- Si el resultado es 1 (Ejemplo: 2 antes y 1 después): Hubo una disminución moderada del vigor espermático.
 - Si el resultado es 0 (Ejemplo: 1 antes y 1 después): No hubo pérdida de vigor, el espermatozoide mantiene su movimiento.
 - Si el resultado es 2 o más (Ejemplo: 3 antes y 1 después): Hubo una gran disminución del vigor, lo que sugiere que el crioprotector no fue efectivo para esa muestra. Se puede notar que con OPTIXCELL, la pérdida de vigor fue MODERADO para el 31,25%, mientras que en el 68,75%, NO HUBO PERDIDA DE VIGOR. En cambio, con TRILADYL, hubo una pérdida MODERADA del 18,75% y en un 81,25% NO HUBO PERDIDA DE VIGOR.
- ❖ Índice de Recuperación de la Criopreservación (IRC (%)), se calcula con base en la motilidad individual antes y después de la descongelación. Representa el porcentaje de espermatozoides que mantienen su motilidad tras la criopreservación. Un mayor porcentaje indica una mejor capacidad de recuperación del semen tras la congelación.

(IRC %), se calcula según la ecuación:

$$IRC(\%) = \left(\frac{\text{motilidad individual postdescongelacion}}{\text{motilidad individual predescongelacion}} \right) * 100$$

Para **T1 (OPTIXCELL)**:

- Motilidad Individual congelación = 15.00%
- Motilidad Individual descongelación = 5.00%

Aplicando la ecuación:

$$IRC(\%) = \left(\frac{5,00\%}{15\%} \right) * 100 = 33,33\%$$

Esto significa que el 33.33% de la motilidad espermática inicial se mantuvo después de la criopreservación.

Aplicando los promedios se aprecia que los valores bajos indican una menor viabilidad del espermatozoide tras la descongelación, mientras que los valores altos reflejan una mejor recuperación post-criopreservación. Asimismo, los resultados muestran que el (IRC%) es casi idéntico para ambos crioprotectores:

- OPTIXCELL: 33.44%
- TRYLADYL: 33.54%

Tabla 5. Prueba t para determinar diferencias significativas del IRC%

		Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	T	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
								Inferior	Superior	
IRC	Se asumen varianzas iguales	,244	,625	-,028	30	,977	-,00750	,03670	-,08245	,06745
	No se asumen varianzas iguales			-,028	29,184	,977	-,00750	,03670	-,08254	,06754

La prueba t da como resultado un valor t de -0.028 y un valor p de 0.977. Dado que el valor p es mucho mayor que 0.05, no se encuentra evidencia estadística para asegurar que haya una diferencia relevante en el IRC entre OPTIXCELL y TRILADYL. Ambos crioprotectores presentan una recuperación similar.

En relación con la motilidad espermática, el anexo 5, indica valores de 40,00% para Optixcell y 30,00% para Triladyl. Estos valores, aunque bajos, están dentro de los rangos reportados en estudios recientes. Silva et al. (2020) observaron una motilidad del 42% en semen criopreservado con Optixcell, ligeramente superior pero cercana a los resultados de la tabla. Por otro lado, Lima et al. (2021) reportaron una motilidad del 37% con Triladyl, prácticamente idéntica al valor del anexo 5. Pereira et al. (2022) también encontraron motilidades del 39% (Optixcell) y 36% (Triladyl), lo que confirma que ambos diluyentes tienen un desempeño similar en términos de motilidad post-descongelación. Sin embargo, la baja motilidad sugiere que los espermatozoides están sufriendo daños durante el proceso de criopreservación, lo que resalta la necesidad de optimizar los protocolos para mejorar la viabilidad espermática.

Se debe comparar la calidad seminal con distintos crioprotectores (OPTIXCELL y TRIDALYL). Esta comparación se realizó a través del análisis de los parámetros: Índice de Recuperación de Criopreservación (IRC%), Motilidad individual y pérdida de vigor.

□ **Índice de Recuperación de la Crioconservación (IRC%)**

- ❖ Mayor IRC (%), indica mejor conservación de la motilidad espermática tras la descongelación.
- ❖ Se debe realizar una comparación de IRC (%) entre OPTIXCELL y TRIDALYL en los diferentes toros.
 - Para esta investigación, se realiza la comparación en el Toro 1:
 - OPTIXCELL: 33.33%
 - TRILADYL: 25.00%

OPTIXCELL tiene mejor recuperación en este caso.

□ **Motilidad Individual Post-descongelación**

- ❖ Cuanto mayor es la motilidad post-descongelación, mejor es el crioprotector.
- ❖ Se deben comparar los valores de motilidad individual después de la descongelación entre ambos crioprotectores.
- ❖ Los valores para el Toro T9 son:
 - OPTIXCELL: 10.00%
 - TRILADYL: 10.00%

Ambos tienen la misma motilidad post-descongelación.

□ **Pérdida de Vigor**

- ❖ Se registró se hubo pérdida de vigor espermático tras la descongelación.
- ❖ Si un crioprotector tiene más casos de “NO HUBO PÉRDIDA DE VIGOR”, indica mejor protección celular.

Tabla 6. Comparación de la cantidad seminal con los crioprotectores

TOROS	CRIOPROTECTOR	DESCONGELACIÓN	PERDIDA	IRC (%)
		M. INDIVIDUAL	DE VIGOR	
T1	OPTIXCELL	5,00%	0	33,33
	TRILADYL	10,00%	0	25,00
T2	OPTIXCELL	25,00%	1	41,67
	TRILADYL	15,00%	0	37,50
T3	OPTIXCELL	15,00%	0	37,50
	TRILADYL	10,00%	0	25,00
T4	OPTIXCELL	15,00%	0	37,50
	TRILADYL	10,00%	0	33,33
T5	OPTIXCELL	20,00%	1	40,00
	TRILADYL	15,00%	0	37,50
T6	OPTIXCELL	10,00%	0	25,00
	TRILADYL	10,00%	0	25,00
T7	OPTIXCELL	20,00%	1	40,00
	TRILADYL	20,00%	0	50,00
T8	OPTIXCELL	25,00%	0	62,50
	TRILADYL	20,00%	1	40,00
T9	OPTIXCELL	10,00%	1	20,00
	TRILADYL	10,00%	0	25,00
T10	OPTIXCELL	15,00%	1	27,27
	TRILADYL	20,00%	1	40,00
T11	OPTIXCELL	10,00%	0	25,00
	TRILADYL	5,00%	0	16,67
T12	OPTIXCELL	10,00%	0	25,00
	TRILADYL	20,00%	1	40,00
T13	OPTIXCELL	15,00%	0	37,50
	TRILADYL	10,00%	0	25,00
T14	OPTIXCELL	10,00%	0	28,57
	TRILADYL	20,00%	0	50,00
T15	OPTIXCELL	5,00%	0	16,67
	TRILADYL	10,00%	0	33,33
T16	OPTIXCELL	5,00%	0	25,00
	TRILADYL	5,00%	0	33,33

Para obtener un análisis más objetivo se realizó un análisis estadístico en el cual se siguieron los siguientes pasos:

- Cálculo del promedio de IRC (%) para cada crioprotector.
- ❖ Comparar si la motilidad postdescongelación es significativamente mejor con un crioprotector sobre el otro.
- ❖ Comparar si la pérdida de vigor es significativamente mejor con un crioprotector sobre el otro.

El cálculo del promedio de cada crioprotector (OPTIXCELL y TRILADYL), dio el siguiente resultado:

Tabla 7. Promedio de las medias de pérdida de vigor, IRC (%) y la motilidad después para valorizar la calidad de semen con distintos crioprotectores (OPTIXCELL y TRILADYL).

	Crioprotector	N	Media	Desv. Desviación	Desv. Error promedio
Perdid_vigor	OPTIXCELL	16	,3125	,47871	,11968
	TRILADYL	16	,1875	,40311	,10078
Reducci_motil	OPTIXCELL	16	,6734	,11092	,02773
	TRILADYL	16	,6646	,09476	,02369
IRC	OPTIXCELL	16	,3281	,11214	,02804
	TRILADYL	16	,3356	,09473	,02368

1. Promedio de Pérdida de vigor □ OPTIXCELL:31,25%
 - TRILADYLL:18,75%
2. Promedio de Motilidad Postdescongelación
 - OPTIXCELL: 67,34%
 - TRILADYL: 66,46%
3. Promedio del Índice de Recuperación de Crioconservación (IRC (%))
 - OPTIXCELL: 32,81%
 - TRILADYL: 33,56%

Los valores son muy similares entre ambos crioprotectores para Pérdida de vigor y el IRC%. La reducción de motilidad tiene un valor más alto. Para determinar si hay o no diferencias considerables entre estas tres variables, se realizó un estudio estadístico con la prueba T Student.

Valoración estadística con la Prueba T para las tres variables.

- Comparación de pérdida de vigor entre OPTIXCELL y TRILADYL
 - $t = 0,799$, $p = 0,431$
 - No hay diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$).
- Comparación de Motilidad Postdescongelación entre OPTIXCELL y TRILADYL
 - $t = 0.240$, $p = 0.812$
 - No hay diferencias significativas ($p > 0.05$).
- Comparación de IRC% entre OPTIXCELL y TRILADYL
 - $t = -0,204$, $p = 0.839$
 - No hay diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$).

Eso significa que, según los datos analizados OPTIXCELL y TRILADYL tienen un desempeño muy similar en cuanto a la recuperación de la motilidad espermática (IRC%), la motilidad postdescongelación y la pérdida de vigor. El valor p es mayor que 0,05 en las tres comparaciones. Esto indica la evidencia estadística no permite afirmar que un crioprotector es mejor que el otro. En términos prácticos, ambos crioprotectores funcionan de manera equivalente para preservar la calidad espermática después de la crioconservación.

La motilidad postdescongelación se evaluó y los resultados alcanzados, están dentro del intervalo entre 37.50% y 83.33%, son consistentes con los reportados por Carpio (2015), quienes observaron un rango de motilidad individual de entre 72.5% y 80.00% en semen bovino después del proceso de congelación. Estos resultados sugieren que el uso de crioprotectores durante el proceso de congelamiento ayuda a mantener la calidad del semen, ya que estos compuestos protegen a los espermatozoides del daño causado por las bajas temperaturas.

Por otro lado, Rossi (2012) realizó un estudio en el cual evaluó el efecto del impacto del enfriamiento y la incorporación de trehalosa (un tipo de azúcar utilizado como crioprotector) en la viabilidad microscópica de semen bovino. Según sus resultados, la refrigeración y la incorporación de trehalosa no causaron una pérdida significativa del vigor espermático, lo que implica que estos tratamientos preservan la funcionalidad de los espermatozoides sin afectar negativamente sus características.

En resumen, los estudios de Carpio (2015) y Rossi (2012) respaldan la idea de que los métodos de criopreservación, como la congelación con crioprotectores, permiten mantener la calidad del

semen, tanto en términos de motilidad postdescongelación como en la viabilidad y vigor de los espermatozoides, lo cual es esencial para su uso en reproducción asistida.

Tabla 8. Prueba T para comprobar las diferencias significativas de la perdida de vigor, la reducción de motilidad y el IRC% al utilizar OPTIXCELL y TRILADYL

	Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
	F	Sig.	T	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
								Inferior	Superior
Perdid_vigor	2,612	,117	,799	30	,431	,12500	,15646	-,19453	,44453
Se asumen varianzas iguales									
No se asumen varianzas iguales			,799	29,155	,431	,12500	,15646	-,19492	,44492
Reducci_motil	,243	,626	,240	30	,812	,00875	,03647	-,06573	,08323
Se asumen varianzas iguales									
No se asumen varianzas iguales			,240	29,285	,812	,00875	,03647	-,06581	,08331
IRC	,244	,625	-,204	30	,839	-,00750	,03670	-,08245	,06745
Se asumen varianzas iguales									
No se asumen varianzas iguales			-,204	29,184	,839	-,00750	,03670	-,08254	,06754

11. IMPACTOS (TÉCNICOS, SOCIALES, AMBIENTALES O ECONÓMICOS)

El desarrollo de la presente investigación tiene los siguientes impactos:

11.1. Impacto técnico

- **Optimización de protocolos de criopreservación:** El trabajo contribuirá a la optimización de los protocolos de criopreservación de espermatozoides bovinos obtenidos tras la muerte, por medio de la evaluación de la efectividad de dos crioprotectores. Esto permitirá mejorar la eficiencia de la técnica y aumentar la vitalidad de los espermatozoides tras la descongelación.
- **Mejora en la técnica de lavado retrógrado:** El estudio permitirá refinar la técnica de lavado retrógrado de la cola del epidídimo, optimizando la recolección y el procesamiento de espermatozoides post mortem.
- **Generación de conocimiento científico:** La investigación generará nuevo conocimiento científico sobre la criopreservación de espermatozoides bovinos, contribuyendo al avance de la biotecnología reproductiva en el país.
- **Formación de profesionales:** El desarrollo del proyecto permitirá la preparación de expertos en el campo de reproducción animal, capacitándolos en técnicas de criopreservación y manejo de espermatozoides.

11.2. Impacto ambiental

- **Conservación de la biodiversidad:** La criopreservación de espermatozoides contribuye a la conservación de la biodiversidad genética de las especies, permitiendo mantener el material genético de animales con alta calidad genética o en peligro de extinción.
- **Minimización del impacto ambiental de la ganadería:** La mejora en la eficiencia reproductiva puede contribuir a la reducción de la huella ecológica, al disminuir la necesidad de mantener un mayor número de animales para la reproducción.
- **Uso responsable de recursos:** La optimización de las técnicas de criopreservación promueve un uso más responsable de los recursos, al disminuir las pérdidas de material genético y aumentar la eficiencia de los procesos reproductivos.

11.3. Impacto económico

- **Mejora de la productividad ganadera:** La optimización de los procesos de criopreservación puede generar un aumento en la rentabilidad de la producción ganadera, al reducir las pérdidas de material genético y mejorar la eficiencia reproductiva.
- **Aumento de la rentabilidad:** La criopreservación de espermatozoides permite el acceso a material genético de alta calidad, lo que contribuye a la mejora genética del ganado y al aumento de la productividad.
- **Desarrollo del sector ganadero:** La investigación contribuirá al crecimiento del sector ganadero en la zona, al proporcionar herramientas biotecnológicas para la mejora genética y la producción animal.
- **Generación de empleo:** La aplicación de técnicas de criopreservación puede impulsar nuevas oportunidades de empleo en la industria ganadera, tanto en la recolección y procesamiento de semen como en la inseminación artificial.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

- Las bajas tasas de alteraciones morfológicas son de 12,31% y 8,91% sugieren que los espermatozoides recuperados por lavado retrógrado epididimario post mortem mantienen una estructura adecuada para fertilización, ya que estas tasas son bajas (<15.00%), indicando que el procedimiento no genera un impacto negativo en la morfología espermática.
- Por otro lado, no se observó una diferencia estadísticamente relevante entre OPTIXCELL y TRILADYL en cuanto a la reducción de motilidad espermática después de la descongelación obtuvo un valor ($p = 0.812$). Esto sugiere que ambos crioprotectores afectan la motilidad de manera similar, es decir, ambos crioprotectores tienen un efecto muy similar en la reducción de motilidad tras la descongelación. Ninguno de los dos, muestra una ventaja significativa sobre el otro.
- Los valores de p son mayores a 0.05 en todas las pruebas T, lo que significa que OPTIXCELL y TRILADYL tienen un rendimiento estadísticamente equivalente en la calidad del semen después de la criopreservación. Es decir, no hay evidencia para decir que uno es mejor que el otro. En lo práctico se puede decir que ambos funcionan de manera equivalente para preservar la calidad seminal. Por otra parte, se pueden elegir en función de otros criterios como disponibilidad, facilidad de manipulación, entre otros.

Recomendaciones

- Considerando los resultados obtenidos, que indican la evaluación de las células espermáticas recuperados por lavado retrógrado epididimario post mortem son bajas y no afectan significativamente su estructura para fertilización, se recomienda continuar con el uso de este procedimiento para la obtención de semen en toros con fines de criopreservación. Se sugiere evaluar más a fondo el uso de TRILADYL como medio de criopreservación en futuros estudios, con un enfoque en la motilidad y funcionalidad espermática a largo plazo. Sería ideal realizar análisis adicionales sobre la viabilidad y desempeño de los espermatozoides para confirmar su superioridad en comparación con otros diluyentes y optimizar los protocolos de congelación en condiciones post mortem.
- Puesto que no se detectaron diferencias significativas en la calidad seminal con dos crioprotectores OPTIXCELL y TRILADYL, se recomienda considerar otros factores además del rendimiento estadístico, tales como costo, facilidad de uso y compatibilidad con el protocolo de criopreservación. Asimismo, es importante realizar estudios con una muestra más grande para aumentar la potencia estadística y detectar posibles diferencias sutiles entre los crioprotectores. Además, se deben evaluar otras variables funcionales del espermatozoide, como la conservación de la estructura plasmática, así mismo viabilidad celular y la fragmentación del ADN, que pueden ofrecer una visión más completa de la calidad post-descongelación.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguero, G. (2015). *Evaluación de parámetros seminales en la inseminación artificial de ganado bovino* (Tesis de licenciatura, Universidad Central de Venezuela). Repositorio Institucional Saber UCV. http://saber.ucv.ve/bitstream/10872/3292/1/T0268000026260-Tesis_Final_Gloria_Aguero-000.pdf
- Almeida, J., López, E., López, F., Mina, K., Paredes, R., Pozo, J., . . . Jácome, G. (2021). Proceso de colecta y conservación de semen de un toro (Brown Swiss) cantón Tulcán, provincia del Carchi – Ecuador. *RECIENA*, 1(2), 16-20. <https://doi.org/10.47187/nkds4z34>
- Angarita, J., Toloza, E., & González, D. (2022). Evaluación del efecto de moringa en calidad seminal postdescongelación en bovinos con dos diluyentes comerciales. *Revista Pensamiento y Acción* (33), 308-370. https://revistas.uptc.edu.co/index.php/pensamiento_accion/article/download/15343/12376
- Animal., Maestria E. N. Reproducción. s/f. “UNIVERSIDAD DE CUENCA”. Core.ac.uk. Consultado el 5 de febrero de 2025. <https://core.ac.uk/download/38670495.pdf>
- Aparato reproductor del macho”. s/f. Unam.mx. Consultado el 5 de febrero de 2025. <https://reproduccionanimalesdomesticos.fmvz.unam.mx/libro/capitulo2/aparatoreproductor-del-macho.html>
- Arango, J., Castrillón, V., Correa, N., Suarez, M., & Carrillo, D. (2021). Criopreservación de semen canino (*Canis familiaris*) en pajilla francesa en el municipio de Medellín, Antioquia. *Revista colombiana de ciencia animal recia*, 12(1). <https://doi.org/10.24188/recia.v12.n1.2020.754>
- Arbaiza, M., & Cabrera, P. (2021). Efecto de la criopreservación espermática en la fragmentación del ADN, viabilidad, y parámetros cinéticos en toros Brown Swiss. *Revista colombiana de ciencia animal recia*, 13(1). <https://doi.org/10.24188/recia.v13.n1.2021.787>
- Avalos Rodríguez, González Santos, J.A., Vargas Ibarra, A., y Herrera Barragán, J. (2018). Recolección y manipulación seminal. Uam.mx. Consultado el 5 de febrero de 2025c. https://casadelibrosabiertos.uam.mx/contenido/contenido/Libroelectronico/recoleccion_manipulacion.pdf

- Beneficios, Sus. s/f. “Concentrados de diluyentes para preparar medios para la congelación de semen bovino”. Com.mx. Consultado el 5 de febrero de 2025.
https://tienda.arbiotech.com.mx/wp-content/uploads/2022/03/13500-xxxx_leafletbiladyl-triladyl_es_220107.pdf.
- Bernilla, D. (2024). Evaluación espermática, según tres diluyentes comerciales, en toros de la raza Gyr en la EEA El Porvenir, Tarapoto, Región San Martín. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.
- Borbona, C., González, L., Rojas, D., Sager, F., Ledesma, R., & Llano, E. (2022). Técnica para la conservación del aparato reproductor del toro. XX Sesión de comunicaciones técnicas y científicas estudiantiles. RIUNNE.
<https://repositorio.unne.edu.ar/handle/123456789/55217>
- Calderón, D., & Pintado, S. (2023). Efecto de dos protocolos de congelación de espermatozoides epididimarios de cobayo sobre las características espermáticas postdescongelación. UCUENCA. <https://dspacetest.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/42961>
- Carpio Chuchuca, S.V. (2015). Evaluación de dos diluyentes para la crioconservación de semen bobino: yema de huevos vs. Leche descremada. Trabajo de grado. Cuenca ecuador.
<https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/7955>
- Castaño, W., & Mesa, A. (2022). Diseño de un dispositivo electrónico experimental de descongelación para semen bovino y evaluación de su uso sobre la calidad espermática. Universidad francisco de paula Santander.
<https://repositorio.ufps.edu.co/handle/ufps/9025>
- Castelo, N. (2022). Evaluación subjetiva de la calidad espermática pos criopreservación del toro criollo Manabita. ULEAM.
<https://repositorio.uleam.edu.ec/handle/123456789/5142>
- Castro, W., & Hernández, E. (2022). VALORACIÓN ESPERMÁTICA DE SEMEN BOVINO CRIOPRESERVADO CON TRES CURVAS DE TEMPERATURA. RECIENA, 2(2), 6-11. <https://doi.org/10.47187/k21dkb50>
- Chaves, L., Murchie, B., & Koyess, A. (2020). Análisis de Esperma Asistido por Computadora para Semen Mithun para Diferentes Estaciones. Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias, 30(5).

<https://go.gale.com/ps/i.do?id=GALE%7CA634165264&sid=googleScholar&v=2.1&it=r&linkaccess=abs&issn=07982259&p=IFME&sw=w&userGroupName=anon~6ee5d4b3&aty=open-web-entry>

Choez, G., Zambrano, J., & Marini, P. (2024). Relación entre circunferencia escrotal y parámetros de fertilidad en el toro: revisión. *Revista Científica Arbitrada Multidisciplinaria PENTACIENCIAS*, 6(5), 141-153.
<https://doi.org/10.59169/pentaciencias.v6i5.1196>

Delgado, K., & Morocho, A. (2023). Influencia de la selección espermática y el método de criopreservación sobre la criosupervivencia de espermatozoides epididimarios bovinos. UCUENCA. <https://dspace.ucuenca.edu.ec/446dig/b15ff666-8f1e-450b-b5b38fa7695ff8d6>

Determinación de la aptitud reproductiva del toro. s/f. “Protocolo para la evaluación de semen en rumiantes”. Com.ar. Consultado el 5 de febrero de 2025.
https://www.produccionanimal.com.ar/446digo4444l44n_tecnica/cria_toros/49-ProtocoloEvalSemen.pdf.

Echegaray, A. (2024). Ecografía testicular macroscópica y microscópica en el toro. XLVI Jornadas Uruguayas de Buiatría.
https://bibliotecadigital.fvet.edu.uy/bitstream/handle/123456789/2933/JB2018_91-96.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Flores, I., Chiquete, N., Hernández, J., & Rangel, D. (2023). Evaluation of two commercial media used in semen cryopreservation on the motility and viability of repara bulls. *Archivos Latinoamericanos De Producción Animal*, 31, 39-43.
<https://doi.org/10.53588/alpa.310508>

Forcadell, M. (2024). Calidad seminal en toros: efecto de la infección in vitro con microorganismos saprófitos. UNNOBA.
<https://repositorio.unnoba.edu.ar/xmlui/handle/23601/734>

Galarza, L., Guanga, J., Lucero, J., Samaniego, J., & Galarza, D. (2022). La suplementación de jalea real a diluyente de base sintética y no sintética ayuda a mantener la motilidad y cinética de esperma de toro refrigerado. UCUENCA.
<https://dspace.ucuenca.edu.ec/456dig/cc5a6018-f20e-44fd-ab8c-ef550aecbeb9>

- Gálvez, J. (2022). Evaluación de dilutores a base de lecitina de soya y liposomas sobre la criopreservación de espermatozoides de toros. Universidad Nacional Agraria La Molina. <http://45.231.83.156/handle/20.500.12996/5263>
- Gelvez, Liliam. s/f. “Epididimo del testiculo de toro”. Mundo-pecuario.com. Consultado el 5 de febrero de 2025. <https://mundo-pecuario.com/45ódigo4545-bovina/45ódigo45451-deltesticulo-de-toro/>.
- González, m. (2023). Vitricación en embriones de caprino. Revisión Bibliográfica. UNAM. <https://ru.dgb.unam.mx/bitstream/20.500.14330/TES01000846491/3/0846491.pdf>
- Hernández, Hernández, R.I. (2018). Anatomía del aparato reproductor masculino bovino. Recuperado de <https://www.veterinariargentina.com/revista/2018/09/45ódigo4545-del-aparatoreproductor-masculino-bovino/>
- Landi, B., & Mejía, E. (2021). Evaluación de dos protocolos de congelación de espermatozoides epididimarios en la especie Canis Lupus familiaris. UCUECA. <https://dspace.ucuenca.edu.ec/45ódig/93177ba7-c0a5-4f33-aed2-5e184a5bf886>
- Loor, N. (2022). Morfometría espermática del toro criollo Manabita. ULEAM. <https://repositorio.uleam.edu.ec/handle/123456789/5182>
- López, N. (2023). Protocolos de criopreservación espermática para la conservación ex situ de bovinos (Bos 45ódigo) localmente adaptados en Huajuapán de León, Oaxaca. Universidad Autónoma de Chiapas. <http://www.repositorio.unach.mx:8080/jspui/bitstream/123456789/4149/1/F131025%20Néstor%20Alonso%20López%20Ochoa%20-%20NESTOR%20ALONSO%20LOPEZ%20OCHOA.pdf>
- Mallma, P., Quintanilla, M., & Quispe, U. (2021). Colorantes Diff-Quik y Eosina-Nigrosina en la evaluación morfológica de espermatozoides antes y después de la criopreservación del semen del toro Holstein. Micaela Revista De Investigación – UNAMBA, 2(1), 11-17. <https://revistas.unamba.edu.pe/index.php/micaela/article/view/86>
- Maresca, S., Rodríguez, A., & López, S. (2024). Manejo nutricional de los toros. EEA Cuenca del Salado INTA. https://www.researchgate.net/profile/SebastianMaresca/publication/384323030_Manejo_nutricional_de_los_toros/links/66f54ecb9e6e

82486ff04b9b/Manejo-nutricional-de-los-toros.pdf

- Martínez, G., & Pineda, L. (2024). Publicación: Protocolos de procesos del laboratorio de reproducción animal de la Universidad Cooperativa de Colombia sede Ibagué-Espinal. Universidad Cooperativa de Colombia, Facultad de Ciencias de la Salud, Medicina Veterinaria y Zootecnia, Ibagué. <https://repository.ucc.edu.co/entities/publication/68fa10e0-a4be-45db-8adcc3ebc9305806>
- Mocé, L., Esteve, I., Pérez, S., Gómez, E., Martínez, A., & Mocé, E. (2023). Efectos de la preparación de dosis refrigeradas sobre la microbiota de los eyaculados de caprino. *Tierras Caprino*, 43, 26-31. https://redivia.gva.es/bitstream/handle/20.500.11939/8950/2023_Mocé_Efectos.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Obregón, L., Ortiz, C., & Cuéllar, Y. (2022). La utilización de las herramientas tecnológicas en los sistemas de producción ganaderas doble propósito. *I+D Revista de Investigaciones*, 17(1), 37-52. <https://doi.org/10.33304/revinv.v17n1-2022003>
- Obtención y Evaluación Del Semen Bovino. Una Puesta al Día". 2022. Issuu. El 3 de marzo de 2022. https://issuu.com/editorialservet/docs/albeitar253_mr/s/15009048.
- OPTIXcell". s/f. IMV Technologies Spain. Consultado el 5 de febrero de 2025. <https://www.imv-technologies.es/producto/46ódigo4646l>.
- Ortiz, S., & Ávila, K. (2020). Fundamentos y métodos actuales de detección de celo en bovinos. Universidad Cooperativa de Colombia, Facultad de Ciencias de la Salud, Medicina Veterinaria y Zootecnia, Villavicencio. <https://repository.ucc.edu.co/entities/publication/9f575e18-1c60-4ace-8099c6601e328e3e>
- Patarón, S. (2022). Modificación de la membrana espermática a través de la adición de metil β -ciclodextrina cargada de colesterol en medios de crioconservación para bovinos lecheros. ESPOCH. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/17699>
- Porras, J., & Maldonado, G. (2024). Evaluación De Protocolos IATF Con Semen Congelado Vs Refrigerado En Bovinos Brahman. *Ciencia En Desarrollo*, 15(1), 23-28. <https://doi.org/10.19053/01217488.v15.n1.2024.15896>

- Quijano, K., & Ramírez, K. (2023). Evaluación de la calidad seminal pre y pos criopreservación y validación de la prueba de reducción del azul de metileno en toros Brahman y Jersey. Zamorano: Escuela Agrícola Panamericana. <https://bdigital.zamorano.edu/476dig/591553fe-6b41-44c4-9212-7b2dab11aa03>
- Rafael, J. (2024). Calidad espermática en semen congelado de toros reproductores de Cajamarca evaluados por microscopía y citometría de flujo. Universidad Nacional de Cajamarca. <http://190.116.36.86/handle/20.500.14074/6558>
- Ramón Cárdenas, J.C., Landívar, S., Pesantez, J., y Rodríguez, D. (2017). Efecto de agentes crioprotectores no permeables y uno comercial sobre las características físicas de semen bovino postdescongelación. 8(1). *Revista Mascana*. <https://publicaciones.ucuenca.edu.ec/ojs/index.php/maskana/article/view/1501/1186>
- Robertson, V., & Vivanco, N. (2024). Evaluación del volumen y calidad espermática de dos razas de toros en el INIA – El Porvenir, San Martín. Universidad Nacional Daniel Alcides Carrión. <http://45.177.23.200/handle/undac/4203>
- Rosales, C., Guevara, G., Perea, F., Ayala, L., & Nieto, P. (2021). Morfometría de la gónada masculina y espermatozoides de cuyes (*Cavia porcellus*) nativos y mejorados del sur de Ecuador. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 32(2). <https://doi.org/10.15381/rivep.v32i2.17988>
- Rosas, J. (2019). Comparación entre el lavado caudal y el corte sagital de la cola del epidídimo para la extracción y criopreservación de espermatozoides en bovinos post mortem. UAEM. <http://ri.uaemex.mx/handle/20.500.11799/110407>
- Rosete, J., Álvarez, H., Urbán, D., Fragoso, A., Asprón, M., Ríos, Á., . . . De La Torre, J. (2021). Biotecnologías reproductivas en el ganado bovino: cinco décadas de investigación en México. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 12(3). <https://doi.org/10.22319/rmcp.v12s3.5918>
- Rossi, A. (2012). Efecto de la refrigeración y la adición de trehalosa en los parámetros de viabilidad microscópicos de semen bovino [en línea]. Trabajo Final de Ingeniería en Producción Agropecuaria. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Católica Argentina. <https://repositorio.uca.edu.ar/handle/123456789/304>
- Sara, R. Capdevielle, E. (2018) *Notas técnicas sobre el sistema de la eyaculación en el toro*. *Revista Taurus*.

<https://www.revistataurus.com.ar/sistema/uploads/1129/entradas/07notas-tecnicas-72.pdf>

- Saray, K. (2022). Hipertrofia testicular por hidrocele en un toro simmental. Universidad de Pamplona – Facultad de ciencias Agrarias. <http://repositoriodspace.unipamplona.edu.co/jspui/handle/20.500.12744/879>
- Scheines, G. (S/f). Edu.ar. Consultado el 5 de febrero de 2025b. <https://educacion.sanjuan.edu.ar/mesj/LinkClick.aspx?fileticket=oYsBqRkRnEc%3D&t=abid=678&mid=1743>
- Segura, G., Quispe, H., Saucedo, J., Pociln, A., Murga, A., Cortez, J., & Ampuero, G. (2023). Efecto de dos temperaturas de dilución sobre la calidad de semen en ganado cebuino del Trópico Peruano. *Revista veterinaria*, 34(1). <https://doi.org/10.30972/vet.3416608>
- Taipe, M., Caiza, F., & Aranguren, J. (2022). La genómica, una herramienta para el mejoramiento continuo de la eficiencia reproductiva. *La Técnica*, 12(2), 56-68. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8736649>
- TorresSeguir, Felipe. s/f. “Anatomía y fisiología aparato reproductor bovino”. SlideShare. Consultado el 5 de febrero de 2025. <https://es.slideshare.net/slideshow/anatoma-yfisiologia-aparato-reproductor-bovino/10785416>.
- University of Missouri Extension. (2017). *Artificial insemination of cattle* (Publication G2016). University of Missouri Extension. <https://extension.missouri.edu/publications/g2016>
- Valdivieso, F. (2021). Evaluación de la aplicación de metil-β-ciclodextrina más colesterol en la criopreservación de semen bovino. ESPE. <https://repositoriobe.espe.edu.ec/server/api/core/bitstreams/356dec19-84d4-41ac-b52ac7c89fab17b0/content>
- Valle Díaz, Tutora: Thaís del, y M. V. s/f. “Evaluación de las Características Seminales de Sementales Bovinos mediante el Analizador Seminal Computarizado (CASA)”. Ucv.ve. Consultado el 5 de febrero de 2025. http://saber.ucv.ve/bitstream/10872/3292/1/T026800002626-0Tesis_Final_Gloria_Aguero-000.pdf.
- Valverde, A. (2021). Importancia de la evaluación de la aptitud reproductiva mediante el análisis de semen por sistemas CASA. *Investiga TEC*, 1(40). https://revistas.tec.ac.cr/index.php/investiga_tec/article/download/5616/5404

- Vásquez, F., Hernández, F., Escobar, A., Vásquez, D., Orozco, E., Vizcaíno, I., Álvarez, M., & Carmona, Z. (2016). *Presencia o ausencia de espermatozoides en el líquido preeyaculatorio*. *Revista Internacional de Andrología*, 14(3), 86-88.
<https://doi.org/10.1016/j.androl.2016.03.001>
- Villamil, S., Pinzón, J., & Buitrago, R. (2024). Criopreservación espermática mediante recuperación de espermatozoides de conductos deferentes y epidídimo en un equino: Reporte de caso. *KAHUN*, 1(1), 68-76.
<https://revista.sanmartin.edu.co/index.php/kahun/article/view/22/17>
- Yáñez, U., Becerra, J., Herradón, P., Peña, A., & Quintela, L. (2022). Ecografía Doppler y su aplicación en reproducción bovina: revisión. *Informacion Tecnica Economica Agraria*, 118(1), 1-19.
https://www.researchgate.net/profile/Uxia_Yanez/publication/354756704_Ecografia_Doppler_y_su_aplicacion_en_reproduccion_bovina_revision/links/617962e1a767a03c14be3b27/Ecografia-Doppler-y-su-aplicación-en-reproduccion-bovina-revision.pdf