



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA
TITULO DE PROYECTOS DE
INVESTIGACION**



“Evaluar las técnicas de resuspension espermática sobre la calidad post descongelado de semen equino de diferentes razas”.

**DOCUMENTO FINAL DEL PROYECTO DE INVESTIGACION COMO
REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MEDICO VETERINARIO**

AUTOR:

MIGUEL EDUARDO PROAÑO CRUZ

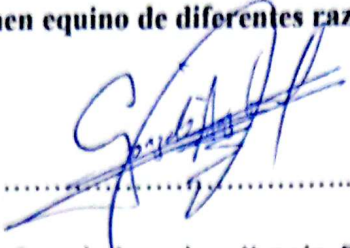
TUTOR:

ING. GONZALO ARAGADVAY

CEVALLOS, 2025

"Evaluar las técnicas de resuspensión espermática sobre la calidad post descongelado de semen equino de diferentes razas".

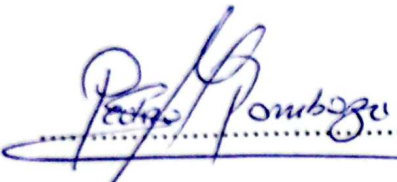
REVISADO POR:


.....
Ing. Gonzalo Aragadvay Yungán, PhD

TUTOR

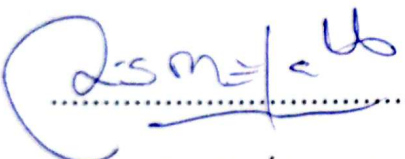
APROBADO POR LOS MIEMBROS DE CALIFICACIÓN:

Fecha


.....
Ing. Pedro Pomboza

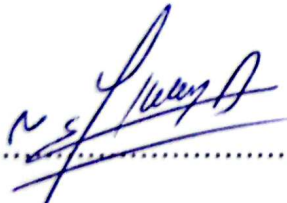
11/02/2025.....

PRESIDENTE DE TRIBUNAL


.....
Dr. Mg. Carrillo Álvarez Israel Salomón

11/02/2025.....

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE
CALIFICACIÓN


.....
Dr. Mg. Kelly Alvear Gerardo Enrique

11/02/2025.....

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE
CALIFICACIÓN

AUTORIA DE LA INVESTIGACIÓN

Yo, **MIGUEL EDUARDO PROAÑO CRUZ**, portador de cédula de ciudadanía número: **1804718128**, libre y voluntariamente declaro que el Informe Final del Proyecto de investigación titulado: **“Evaluar las técnicas de resuspension espermática sobre la calidad post descongelado de semen equino de diferentes razas”** es original, auténtico y personal. En tal virtud, declaro que el contenido es de mi sola responsabilidad legal y académica, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas.



MIGUEL EDUARDO PROAÑO CRUZ

DERECHO DE AUTOR

Al presentar este Informe Final del Proyecto de Investigación titulado “Evaluar las técnicas de resuspension espermática sobre la calidad post descongelado de semen equino de diferentes razas” como uno de los requisitos previos para la obtención del título de grado de Médico Veterinario, en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, autorizo a la Biblioteca de la Facultad, para que este documento esté disponible para su lectura, según las normas de la Universidad.

Estoy de acuerdo en que se realice cualquier copia de este Informe Final, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica potencial.

Sin perjuicio de ejercer mi derecho de autor, autorizo a la Universidad Técnica de Ambato la publicación de este Informe Final, o de parte de él.



MIGUEL EDUARDO PROAÑO CRUZ

C.I: 1804718128

AUTOR

DEDICATORIA

A mis padres, por su amor, paciencia y apoyo incondicional que me han brindado en toda mi trayectoria de vida por sus consejos sus enseñanzas para ser alguien en la vida.

A mi instructor quien me ha guiado, brindado todo su conocimiento con las puertas abiertas para poder cumplir esta meta.

A mis abuelitos que están en el cielo que siempre me ha enseñado a valorar la vida que tenga amor por el campo y los animalitos.

A toda mi familia tanto como mis hermanos, primos, sobrinos quien han sido la motivación de seguir adelante y nunca rendirme.

AGRADECIMIENTO

Primeramente, agradezco a dios, a mi papá Miguel y a mi mamá Nelly y hermanos por el sacrificio y el apoyo incondicional, también al doctor Víctor Brito que me brindo sus conocimientos, consejos para ser una persona de bien, también a mi tutor Ing. Gonzalo Aragadvay por la paciencia brindar, apoyar con sus conocimientos por eso dedico este logro a todas las personas que han estado pendiente de mí ya que este triunfo también es de aquellas personas de antemano agradezco de todo corazón por guiar el camino del bien. Sin muchas palabras agradezco a las personas que siempre han estado conmigo en las buenas y en las malas.

INDICE DE CONTENIDO GENERAL

DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTO.....	IV
INDICE DE TABLAS	IX
ABSTRACT	XII
CAPITULO I.....	16
INTRODUCCION	16
MARCO TEÓRICO.....	18
ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS.....	18
CRIOPRESERVACIÓN	18
Crio preservación de semen de equinos para fecundación asistida.....	20
Biotecnología de la reproducción.....	21
Equinos su cultura y tradición y uso de caballos	21
Parámetros de evaluación del semen equinos para criopreservación.....	21
Extracción de semen.	23
Centrifugación de material espermático en especies equinas.	23
Adición del diluyente para congelar	24
Crioprotectores.....	25
Crioprotectores no permeables.....	25
Crioprotectores permeables.....	26

Refrigeración.....	26
Congelación y almacenamiento de semen	27
Congelación con el sistema convencional de nitrógeno líquido	27
Sistema automatizado de congelación	27
Envasado de pajillas.....	27
Descongelación de semen	28
Mecanismos de crio lesión en el semen equino	28
Sensibilidad de semen equino	28
Oxidación del semen equino	29
Estrés osmótico	30
Estrés térmico.....	30
Estrés mecánico.....	31
Selección de espermatozoides.....	31
Métodos:.....	31
Características reproductivas de los equinos.....	32
OBJETIVOS	35
Objetivo General	35
Objetivos específicos	35
CAPITULO II	36
METODOLOGÍA	36
Ubicación del Estudio.	36

Características del lugar	36
Materiales, Equipos y Métodos.....	37
Material biológico experimental	37
Material de campo.....	37
Reactivos	38
Factores de Estudio	38
Unidades experimentales	39
Diseño experimental.....	39
Procesamiento de la información.....	40
Mediciones experimentales.....	40
Procedimiento experimental.....	40
Diluyente Crioprotector (Ramp Plus)	42
Cálculo de la concentración espermática	47
Motilidad espermática individual y masal	48
Preparación del reactivo HOST	49
Evaluación de resultados.....	50
CAPITULO IV.....	55
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	55
ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS:	55
Comprobación de la hipótesis	66
CAPITULO V	67

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	67
Conclusiones	67
Recomendaciones.....	67
BIBLIOGRAFIA.....	69
ANEXOS.....	74
ANÁLISIS DE VARIANZA ENTRE CABALLOS DE SEMEN FRESCO	74
Vigor	74
Motilidad individual.....	74
Morfología.....	74
Integridad de la membrana.....	75
Integridad del acrosoma	75
Concentración espermática	76
ANALISIS DE VARIANZA ENTRE CABALLOS EN EL TESTIGO	76
VIGOR	76

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.....	22
Tabla 2.....	36
Tabla 3.....	55; Error! Marcador no definido.
Tabla 4.....	56; Error! Marcador no definido.
Tabla 5.....	58
Tabla 6.....	58
Tabla 7.....	62

RESUMEN

La criopreservación del semen equino es una herramienta clave en la reproducción asistida, ya que permite la conservación del material genético de caballos de alto valor y la optimización de los programas de inseminación artificial. Sin embargo, uno de los principales desafíos de este proceso es la disminución de la viabilidad y funcionalidad espermática post descongelación, debido a factores de estrés osmótico, térmico, mecánico y oxidativo, que afectan la integridad estructural y funcional de los espermatozoides.

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de diferentes técnicas de resuspensión espermática en la calidad post descongelación del semen equino en tres razas: Árabe, Criollo Colombiano y Español. Para ello, se analizaron tres tratamientos:

1. Método convencional sin centrifugación (testigo).
2. Resuspensión espermática a 1500 rpm durante 10 minutos.
3. Resuspensión espermática a 1700 rpm durante 10 minutos.

Se evaluaron parámetros seminales clave, como la concentración espermática, movilidad, vigor, morfología e integridad de la membrana y del acrosoma, mediante pruebas especializadas en laboratorio.

Los resultados indicaron que la aplicación de técnicas de resuspensión espermática mejora significativamente la calidad del semen equino post descongelado en comparación con el método convencional. Se evidenció que los espermatozoides sometidos a resuspensión a 1500 rpm conservaron una motilidad significativamente mayor (superior al 70%) en comparación con el semen tratado con el método convencional, donde la motilidad se redujo a valores inferiores al 50%. La técnica a 1700 rpm también mejoró la motilidad espermática, aunque en menor medida que la de 1500 rpm, posiblemente debido a un incremento en el estrés mecánico.

En cuanto a la morfología espermática, los espermatozoides tratados con resuspensión presentaron menores alteraciones estructurales en comparación con los del método convencional. En particular, la resuspensión a 1500 rpm redujo la incidencia de anomalías en la cabeza y en la cola de los espermatozoides, lo que sugiere una menor afectación por el proceso de congelación-descongelación.

Los análisis de integridad de membrana a través del test de HOST (Hypoosmotic Swelling Test) revelaron que los espermatozoides sometidos a resuspensión mostraron una mejor

respuesta osmótica, lo que indica una mayor funcionalidad de la membrana plasmática. En el método convencional, la integridad de la membrana se redujo a valores cercanos al 45%, mientras que en las muestras sometidas a resuspensión a 1500 rpm se mantuvo por encima del 65%, evidenciando una mayor protección celular.

Por otro lado, el análisis de la integridad del acrosoma indicó que los tratamientos con resuspensión disminuyeron el porcentaje de espermatozoides con daños en esta estructura, lo que sugiere una mayor capacidad de fecundación en comparación con el método convencional.

Desde un enfoque comparativo entre razas, se observó que los caballos Criollo Colombiano y Español mostraron una mejor respuesta a las técnicas de resuspensión, con una mayor conservación de la motilidad y viabilidad espermática post descongelación. En cambio, los espermatozoides de caballos Árabes fueron más sensibles a los cambios en la centrifugación, presentando una ligera disminución en la motilidad en la técnica de 1700 rpm, lo que sugiere que la intensidad del procedimiento debe ajustarse según la raza y características del semen.

En general, los hallazgos de este estudio confirman que la implementación de técnicas de resuspensión espermática optimiza la calidad del semen equino post descongelación, al reducir los efectos negativos del proceso de criopreservación. Esto representa un avance significativo para mejorar la eficiencia de los programas de reproducción asistida en la industria equina, aumentando las probabilidades de éxito en la inseminación artificial y la conservación de líneas genéticas valiosas.

Palabras clave: Criopreservación, semen equino, resuspensión espermática, reproducción asistida, motilidad espermática, integridad celular, calidad espermática.

ABSTRACT

The cryopreservation of equine semen is a key tool in assisted reproduction, as it allows the preservation of genetic material from high-value horses and optimizes artificial insemination programs. However, one of the main challenges of this process is the decrease in sperm viability and functionality post-thaw, due to osmotic, thermal, mechanical, and oxidative stress factors that affect the structural and functional integrity of sperm.

The objective of this study was to evaluate the effect of different sperm resuspension techniques on the post-thaw quality of equine semen in three breeds: Arabian, Colombian Criollo, and Spanish. Three treatments were analyzed:

1. Conventional method without centrifugation (control).
2. Sperm resuspension at 1500 rpm for 10 minutes.
3. Sperm resuspension at 1700 rpm for 10 minutes.

Key seminal parameters were evaluated, such as sperm concentration, motility, vigor, morphology, and membrane and acrosome integrity, using specialized laboratory tests. The results indicated that the application of sperm resuspension techniques significantly improved the quality of post-thaw equine semen compared to the conventional method. It was found that sperm subjected to resuspension at 1500 rpm maintained significantly higher motility (above 70%) compared to semen treated with the conventional method, where motility decreased to values below 50%. The 1700 rpm technique also improved sperm motility, although to a lesser extent than the 1500 rpm technique, possibly due to an increase in mechanical stress.

Regarding sperm morphology, sperm treated with resuspension showed fewer structural alterations compared to those in the conventional method. In particular, the resuspension at 1500 rpm reduced the incidence of abnormalities in the head and tail of sperm, suggesting less damage from the freezing-thawing process.

Membrane integrity analysis through the HOST (Hypoosmotic Swelling Test) revealed that sperm subjected to resuspension showed a better osmotic response, indicating greater functionality of the plasma membrane. In the conventional method, membrane integrity decreased to values near 45%, while in the samples subjected to resuspension at 1500 rpm, it remained above 65%, showing greater cellular protection.

On the other hand, acrosomal integrity analysis indicated that resuspension treatments reduced the percentage of sperm with damage to this structure, suggesting a higher fertilizing capacity compared to the conventional method.

From a comparative approach between breeds, it was observed that Colombian Criollo and Spanish horses showed a better response to resuspension techniques, with greater preservation of motility and sperm viability post-thaw. In contrast, sperm from Arabian horses were more sensitive to centrifugation changes, showing a slight decrease in motility with the 1700 rpm technique, suggesting that the intensity of the procedure should be adjusted according to breed and semen characteristics.

Overall, the findings of this study confirm that the implementation of sperm resuspension techniques optimizes the post-thaw quality of equine semen by reducing the negative effects of the cryopreservation process. This represents a significant advance in improving the efficiency of assisted reproduction programs in the equine industry, increasing the success rates of artificial insemination and the preservation of valuable genetic lines.

Keywords: Cryopreservation, equine semen, sperm resuspension, assisted reproduction, sperm motility, cellular integrity, semen quality.

CAPITULO I

INTRODUCCION

La preservación del semen mediante criopreservación representa un avance crucial en la industria equina y en el desarrollo de tecnologías aplicadas a la reproducción asistida. Este procedimiento es ampliamente utilizado en técnicas como la inseminación artificial y la obtención de embriones tanto in vivo como in vitro. Gracias a esta metodología, es posible garantizar la distribución eficiente y la disponibilidad constante de material genético de alto valor, lo cual impulsa programas de mejoramiento genético enfocados en características comerciales mediante la selección o cruces estratégicos según las necesidades específicas. Sin embargo, uno de los mayores desafíos de esta tecnología es la baja fertilidad asociada al semen criopreservado, un problema que surge debido a los cambios que alteran la fisiología y viabilidad de los espermatozoides, producto de la manipulación intensiva y la exposición a diferentes tipos de estrés durante el proceso.

En los espermatozoides de caballos, se observa una alta sensibilidad a las alteraciones celulares que suelen generarse durante el proceso de congelación. El estrés osmótico, que aparece al exponer las células a medios hipertónicos y a los cambios osmóticos inherentes al procedimiento, está vinculado con efectos adversos como la reducción de la viabilidad, la pérdida de motilidad y alteraciones en el potencial mitocondrial de la membrana espermática. A estos problemas se suma el estrés oxidativo, causado por el incremento de especies reactivas de oxígeno (ERO), el cual resulta del choque térmico y de la acción química de los crioprotectores. Además, la extracción del plasma seminal altera la funcionalidad y disponibilidad de antioxidantes naturales, que también pueden sufrir daños estructurales debido al impacto térmico y la toxicidad del proceso de congelación.

La criopreservación de semen equino se fundamenta en tecnologías reproductivas avanzadas que permiten conservar el material genético a temperaturas extremadamente bajas, logradas mediante nitrógeno líquido. Este procedimiento tiene como objetivo proteger la fertilidad y viabilidad del semen para garantizar su uso en generaciones futuras, preservando así características genéticas de alto valor. No obstante, el proceso presenta diversos retos, como el control de variables críticas (temperatura, humedad y tiempos) durante la congelación y descongelación, lo que puede ocasionar daños a la membrana celular y afectar negativamente los índices de fertilidad. Para contrarrestar estos efectos, se

han desarrollado técnicas de resuspensión que eliminan impurezas y ayudan a recuperar la viabilidad y fertilidad del semen congelado.

Entre los beneficios principales de la criopreservación de semen se encuentran:

- La prevención del contagio de enfermedades.
- La conservación de la diversidad genética en razas valiosas.
- La optimización y garantía de procesos reproductivos en la industria equina.
- La disminución de riesgos relacionados con el transporte de sementales.
- El mejoramiento genético ajustado a las necesidades humanas.

Evolución de la criopreservación del semen

Los primeros intentos de criopreservar semen equino se realizaron en la década de 1950, empleando métodos de congelación lenta, aunque los resultados obtenidos fueron inconsistentes. Posteriormente, en la década de 1960, se introdujeron técnicas más rápidas y el uso de crioprotectores, lo que mejoró significativamente la viabilidad y fertilidad del semen congelado. Hoy en día, los protocolos han sido perfeccionados para incluir estándares específicos que optimizan el proceso de congelación y descongelación, protegiendo las células espermáticas. Los crioprotectores, como el glicerol y el dimetilsulfóxido, son esenciales para evitar la formación de cristales de hielo y garantizar una adecuada deshidratación. Estos compuestos penetran en las células espermáticas, protegiéndolas contra los daños físicos y químicos asociados al proceso (Gutiérrez y Cepeda, 2014).

MARCO TEÓRICO

ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

CRIOPRESERVACIÓN

La criopreservación tiene como finalidad preservar la viabilidad y funcionalidad celular a temperaturas reducidas o menos cero. Este proceso ha posibilitado el almacenamiento de células germinales de mamíferos durante prolongados periodos de tiempo, incluyendo la fase post-mortem, mediante la utilización de tanques criogénicos que contienen nitrógeno líquido o en otros entornos a temperaturas bajo cero (Elgueta, 2018).

La inseminación artificial fue conocida comercialmente a partir de la década de años 1950, lo cual ha posibilitado importantes avances en la reproducción dentro de la industria ganadera. Sin embargo, debido a la variabilidad entre especies y a la heterogeneidad observada en los individuos masculinos, la aplicación de la inseminación artificial (IA) utilizando semen congelado ha demostrado ser menos exitosa en especies como ovinos, porcinos y en la cría de caballos (Westreicher, 2020).

El semen equino crio preservado ha adquirido una importancia significativa en las últimas décadas, debido a los beneficios que conlleva su utilización. Entre estos beneficios, se destacan la posibilidad de almacenar el material genético de reproductores de excelencia para facilitar su distribución internacional, controlar enfermedades venéreas y aumentar la eficiencia del sistema de reproducción al permitir la inseminación de múltiples yeguas a partir de un único eyaculado. No obstante, es importante señalar que la tasa de preñez tiende a disminuir cuando se utiliza semen congelado en comparación con el semen fresco o refrigerado. Este fenómeno se debe a que el proceso de congelación y descongelación puede resultar potencialmente nocivo e incluso letal para los espermatozoides (Elgueta, 2018).

La técnica de criopreservación ejerce profundos efectos en las células, muchas de las cuales sufren daños subletales, lo que conlleva a una posterior disminución de su funcionalidad. Existen varios tipos de células que no toleran el almacenamiento a muy bajas temperaturas (por debajo de -80°C), lo que resulta en un deterioro significativo y en daños letales. Sin embargo, en presencia de crio conservantes que presentan características de alta hidrosolubilidad y baja citotoxicidad, los cuales reducen el punto de cristalización de los solventes de los agentes crioprotectores, por la cual existen diferentes tipos de células que pueden sobrevivir al almacenamiento a bajas temperaturas. Como resultado del almacenamiento criogénico, se estima que aproximadamente el 25-75% de las células almacenadas se pierden debido a la

muerte celular por necrosis y apoptosis; esta da como resultado por la función del tipo de célula de los crioprotectores y la velocidad de congelación (Rangel, 2023).

Existen diversos tipos de células que no toleran el almacenamiento a temperaturas extremadamente bajas (por debajo de -80°C), lo cual resulta en un deterioro notable y en daños letales. No obstante, en presencia de crio conservantes que poseen características de alta hidrosolubilidad y baja citotoxicidad, capaces de reducir el punto de cristalización de los solventes crioprotectores, donde existe diferentes tipos de células que pueden sobrevivir al acopio en bajas temperaturas. Se estima que, como resultado del almacenamiento criogénico se da aproximadamente entre el 25% y el 75% de las células conservadas se pierden debido a la muerte celular por necrosis y apoptosis; esta proporción varía en función del tipo celular y de la velocidad de congelación aplicada (García, 2023).

Estudios planteados por Restrepo (2016) que evaluaron los efectos de diferentes fuerzas centrífugas en varios aspectos relacionados con la integridad y función del espermatozoide equino. Las alteraciones que se presentan en la criopreservación de semen de equinos pueden ser contrarrestadas con procedimientos como la centrifugación que facilita los ajustes necesarios en el proceso de aislamiento de los espermatozoides con el plasma y las impurezas. A diferencia de los métodos tradicionales de evaluación de espermatozoides, el desarrollo de nuevas tecnologías en la actualidad permite detectar con mayor precisión los cambios celulares espermáticos en especies equinas.

La crioconservación de espermatozoides es parte importante de los programas de reproducción y selección de reproducción en especies equinas con genética pura. Si bien esta técnica es la más conocida, esta no presenta las garantías necesarias por la alta sensibilidad de las células espermáticas, especialmente en razas de alta genética. Frente a este escenario conforme Gutiérrez (2013) el desarrollo y utilización de nuevos diluyentes es esencial para la supervivencia de los espermatozoides sometidos a procedimientos físicos la criopreservación. Considerando la alta sensibilidad que tiene el espermatozoide en especies equinas al proceso de criopreservación es necesaria la utilización de compuestos o sustancias que reduzcan las afectaciones. Para Gonzáles (2015) las muestras seminales de estas especies al ser muy sensibles, el diluyente reduce el punto de fusión de la solución, reduce la concentración de solutos intra y extracelulares que previene el daño celular. Con ello asegura el autor se puede observar que el proceso de criopreservación debe ser reconsiderado y desarrollar técnicas previas para la conservación de material de alta genética y evaluar diferentes aspectos de la función espermática.

La ventaja de la centrifugación en el procesamiento y preservación de semen equino es la necesidad de eliminar el plasma seminal, que se considera perjudicial para el rendimiento de los espermatozoides. La centrifugación de semen de caballo se ha vuelto cada vez más común en la industria de la cría de caballos. Sin embargo, la centrifugación es uno de los procesos que puede afectar la viabilidad de los espermatozoides y causar varios cambios en los espermatozoides. “El aumento del tiempo de centrifugación y/o la gravedad pueden afectar la calidad y la motilidad general del espermatozoide debido a las fuerzas mecánicas involucradas”.

Crio preservación de semen de equinos para fecundación asistida.

De manera conceptual podemos establecer que conforme la crio preservación es el estudio de los mecanismos relacionados al proceso de conservación y preservación de material biológico. Para ello las muestras obtenidas como proteínas, células, tejidos, órganos serán sometidas a bajas temperaturas con la finalidad de ser preservadas por largos periodos de tiempo y ser utilizadas en el futuro con fines reproductivos. Con las bajas temperaturas se busca disminuir el deterioro de los sistemas obtenidos, pese a los efectos negativos que puede presentar también (Castro, 2016).

La crio preservación es la técnica más utilizada para la preservación de espermatozoides no obstante esta atraviesa etapas críticas cuando las células espermáticas de equinos atraviesan los -15°C a los -60°C . En esta etapa las bajas temperaturas pueden generar daños fuertes a las células por cuanto la membrana plasmática presenta alteraciones que afectan la supervivencia y calidad del material espermático, la viabilidad de espermatozoides tiene relación directa con el entorno extracelular y ello ha permitido probar que al congelar una solución acuosa de glicerol lleva al aumento de la viscosidad y aparecen núcleos de hielo (Rangel, 2023).

Conforme Wernli (2010) por las características del semen de especies equinas se han buscado desarrollar procedimientos para lograr la preservación de semen equino. Pese a ello los índices de fecundación logrados a partir de semen preservado siguen siendo bajos en relación a las demás especies de animales; el sistema de monta natural sigue siendo el ideal para garantizar la fecundación. Por ello los conceptos básicos para el manejo de semen en equinos no ha logrado importantes cambios técnico en los últimos 15 años, si bien se han implementado técnicas novedosas, estas no están a la par del manejo de otras especies de ganado (Elgueta, 2018).

Biotecnología de la reproducción

Equinos su cultura y tradición y uso de caballos

Actualmente en Ecuador es un país con una fabulosa tradición ecuestre ya que los caballos juegan un papel muy importante en la historia del país por lo tanto los criadores han tratado de mejorar genéticamente la explotación equina acorde a la necesidad e importancia de los eventos que manifiesta en diferentes provincias del país como por ejemplo se ocupa para la agricultura, fiestas, desfiles, rodeos, exposiciones, rejoneo, carreras de endurance, equitación, equino terapia etc (Gutiérrez, 2013).

La biotecnología de la reproducción ha sido un paso muy fundamental para los procesos de reproducción en todas las especies dando grandes beneficios efectivos como verificación de semen de mejor calidad, fertilización in vitro, lavado de embriones y transferencia de embriones, criopreservación de embriones y semen etc (Westreicher, 2020).

Parámetros de evaluación del semen equinos para criopreservación.

De manera general se pueden reconocer dos parámetros para la valoración de la calidad de las muestras espermáticas recolectadas. Afirma Rangel (2023) que los parámetros de evaluación de las muestras seminales de caballos son:

- Aspectos macroscópicos: volumen, aspecto y pH
- Aspectos microscópicos: motilidad, morfología y concentración de esperma.

Para el análisis subjetivo espermático conforme Wernli (2010) es necesaria la utilización de la observación de las muestras obtenidas con la utilización de un microscopio o puede ser de tipo objetivo con la utilización de modelos computarizados. En ambos casos es necesaria la dilución para garantizar la protección de las células espermáticas contras los factores exógenos que la puedan afectar como las variaciones de temperatura o la oxidación por diluyentes. Se deberá también considerar la morfología espermática para buscar la preservación de las características no solo físicas de semental sino también la preservación de las características genéticas (Elgueta, 2018).

Tabla 1

Características y componentes del semen equino.

Característica o componente	
Volumen eyaculado (ml)	60-100
Concentración espermática (millones/ml)	150-300
Espermatozoides/eyaculado (billones)	5-15
Motilidad espermática (%)	40-75
Espermatozoides normales (%)	60-90
Proteína (g/100ml)	1.0
Ph	7.2-7.8
Fructosa (mg/100ml)	2
Sorbitol (mg/100ml)	20-60
Ácido cítrico (mg/100ml)	8-53
Inositol (mg/100ml)	20-47
Ergotioneina (mg/100ml)	40-110
Sodio (mg/100ml)	257
Potasio (mg/100ml)	103
Calcio (mg/100ml)	26
Magnesio (mg/100ml)	9
Cloro (mg/100ml)	448

Mg: miligramos, ML: mililitros, % porcentaje

Fuente. Tomado de Ball, 2004.

Afirma Castro (2016) en su estudio que uno de los primeros pasos para la preservación de las muestras seminales obtenidas es la separación del plasma por medio de la centrifugación. El uso de este tipo de técnica ha permitido que se desarrollen varios diseños experimentales para la preservación de material espermático en equinos con alta probabilidad de fecundación.

Extracción de semen.

La extracción de semen tiene la finalidad de preservar las características de las razas puras de equinos es necesario que el proceso de recolección de semen de ejemplares sea sometido a estrictas normas de selección de sementales. A criterio del autor Rangel (2023) para elegir un semental de cualquier raza de caballo, se deben evaluar aspectos previos como la posible existencia de patologías, consideraciones de la genética, las características fenotípicas que se desean preservar, etc. Otro de los factores que se deben considerar es el tiempo del año por cuanto en invierno se prevé una disminución de cantidad seminal, no obstante, en países ecuatoriales esto no representa un problema (Westreicher, 2020).

Para llevar a cabo la recolección de semen, es necesario realizar una limpieza del pene, prestando atención a la fosa uretral, con el objetivo de eliminar microorganismos y smegma que puedan encontrarse en dicha área. Este procedimiento no debe interferir con la flora bacteriana normal del pene, por el uso de soluciones bactericidas que no está recomendado (Cedeño, 2023).

Tradicionalmente, la recolección de semen se lleva a cabo utilizando maniqués junto con vaginas artificiales que emulan las características de una yegua en celo. Es necesario acondicionar estas vaginas artificiales con agua caliente y aire para proporcionar un ambiente que simule el entorno natural. Además, existe la opción de lubricarlas con gel, lo cual es opcional. Este procedimiento garantiza la seguridad tanto del animal como de la persona encargada de la recolección de semen (Guzmán, 2023)

Centrifugación de material espermático en especies equinas.

Una de las técnicas más comunes previo a la criopreservación de muestras de semen en equinos es la centrifugación la cual juega un papel vital en la selección del material espermático. Para Rangel (2023) este procedimiento se lo realiza con la finalidad de separar el plasma seminal de los espermatozoides viables por cuanto este tiene efectos nocivos sobre la motilidad espermática. En ella se utilizan tubos de ensayo de entre 10ml y 50ml, pese a ser un paso necesario en el proceso de congelación del semen de equinos este puede presentar peroxidación lipídica de las membranas protectoras de los espermatozoides.

Para someter a centrifugación las muestras obtenidas para Wernli (2010) es necesario la aplicación de diluyente que debe encontrarse a temperatura ambiente al momento de la

disolución. Esto puede desarrollarse a 37°C siempre que se desarrolle inmediatamente después de la colecta o a los 22°C si se realiza un enfriamiento previo del semen como lo establece el protocolo francés de congelamiento. La aplicación de los protocolos de enfriamiento y centrifugación pueden variar en cada país, no obstante, entre los más importantes tenemos:

- Solución sacarosa al 11%
- Solución de Lactato de Ringer.
- Solución de Lactato de Ringer enriquecido con medio Kenney.
- Medios INRA 82, 96

Asegura Castro (2016) en su estudio que independientemente del tipo de centrifugación que se realice para la preservación de las muestras espermáticas de equinos de genética superior, siempre existirá una afectación de la membrana plasmática celular por el choque mecánico. Frente a ello algunos laboratorios recomiendan otra técnica de separación de material por medio de la centrifugación a 1000g por 20 minutos con una solución que contienen como sustancia el oidixanol. En ella los espermatozoides que no resistan esta técnica flotarán en el tubo de ensayo, mientras que el material ideal para la crio preservación quedará en el fondo del tubo de ensayo (Sambalache, 2022).

Existen en los protocolos estándar de congelación de semen, es imprescindible eliminar la mayor parte del plasma seminal mediante centrifugación simple, seguido de la resuspensión del pellet en un diluyente de congelación, con el fin de obtener una concentración adecuada de espermatozoides. Se sugiere que el porcentaje de plasma seminal presente se reduzca entre un 5% y un 20%, por eso su presencia puede afectar negativamente a la calidad de los espermatozoides durante el almacenamiento (Rangel, 2023).

El semen debe ser diluido en leche descremada o en un diluyente que tenga base de caseína. La proporción de dilución varía según la concentración espermática: es alta, la relación debe ser de 2:1 (volumen/volumen), mientras que en el caso de concentraciones más bajas, se recomienda una proporción mínima de 1:1. Es importante que el diluyente se agregue al semen a una temperatura de 37° C, para prevenir el choque térmico (Castro, 2016).

Adición del diluyente para congelar

Después de la centrifugación, es importante añadir un diluyente de congelación adecuado, conforme al procedimiento establecido. Estos diluyentes están formulados con diversas sustancias, entre las que se incluyen crioprotectores, azúcares, antibióticos y electrolitos. Cada

uno de estos componentes desempeña funciones específicas: proporcionan nutrientes que sirven como fuente de energía, protegen a los espermatozoides contra la caída de temperatura y el procesamiento, aseguran un equilibrio óptimo del pH, mantienen una correcta presión osmótica y un balance electrolítico, además de inhibir el crecimiento de bacterias (González et al, 2015).

Crioprotectores

Los crioprotectores son sustancias solubles en agua que reducen el punto eutéctico de las soluciones en las que se utilizan. El punto eutéctico se refiere a la temperatura máxima en la cual se produce la mayor cristalización tanto del solvente como del soluto. Al disminuir este punto, se facilita una mayor deshidratación de las células espermáticas, lo que a su vez reduce el gradiente osmótico al que estas células están expuestas. En otras palabras, se logra alcanzar la misma concentración de solutos a temperaturas más bajas, proporcionando así una mayor protección a la célula (Sambalache, 2022).

Crioprotectores no permeables

Los crioprotectores no permeables son compuestos de alto peso molecular que no pueden atravesar la membrana plasmática. Su efecto protector se manifiesta en el medio extracelular, donde generan un entorno hipertónico que propicia la salida de agua de la célula, provocando una deshidratación que reduce la probabilidad de formación de cristales de hielo en el interior celular y eviten ser reventados con la presión de los cambios radicales de la temperatura (Pérez Q y Domingo, D. 2017).

- Azúcares: El plasma seminal contiene de manera natural una variedad de azúcares, entre los cuales se destacan la glucosa, la fructosa y el sorbitol. La glucosa y la fructosa son los azúcares más comúnmente utilizados en los diluyentes para la congelación de semen en animales, aunque el sorbitol también se emplea en la criopreservación de semen tanto en toros como en humanos. Sin embargo, el uso de azúcares como la metilcelulosa no ha demostrado tener un efecto crioprotector tan eficiente, por lo que generalmente requiere combinarse con otros crioprotectores (Buitrago y Pérez 2018).
- Leche desnatada: Las caseínas, fosfocaseínas y beta-lactoglobulinas derivadas de la leche son compuestos orgánicos que desempeñan un papel protector contra el estrés por

frío. La leche desnatada en polvo o la leche entera homogeneizada se utilizan como componentes principales de los diluyentes, y también pueden estar presentes en pequeñas cantidades en diluyentes sintéticos, sin embargo, la naturaleza exacta de su mecanismo crioprotector aún no está completamente clara (Buitrago y Pérez 2018).

- Yema de huevo: Los fosfolípidos y lipoproteínas presentes en la yema de huevo son compuestos orgánicos que desempeñan un papel protector ante los daños causados por la congelación. Aunque la yema de gallina ha sido la que se ha utilizado tradicionalmente en los diluyentes de semen, también se han obtenido buenos resultados al probar con yema de otras especies, como la de pato (Buitrago y Pérez 2018).

Crioprotectores permeables

Los crioprotectores son compuestos de bajo peso molecular que pueden atravesar la membrana plasmática. Estos agentes inducen una reorganización en los componentes lipídicos y proteicos de la membrana, lo que aumenta su fluidez. Este efecto favorece la deshidratación celular a bajas temperaturas y reduce la formación de cristales de hielo en el interior de las células, lo que a su vez mejora la supervivencia de los espermatozoides durante el proceso de congelación, y favorece tanto en el medio intracelular como en el extracelular (Castro, 2016).

Glicerol: El glicerol es el crioprotector más utilizado, aunque no hay consenso sobre su concentración óptima en los diluyentes comerciales para equinos. Su uso presenta un efecto negativo evidente, siendo un posible factor que contribuye a la baja motilidad y fertilidad observadas tras la descongelación, un problema que también se ha documentado en aves y otros animales como por ejemplo los equinos. Los efectos tóxicos del glicerol provocan alteraciones en el citoplasma y desnaturalización de proteínas. Se sugiere que el principal mecanismo de toxicidad del glicerol se origina por el estrés osmótico que se genera durante su incorporación y eliminación en los procesos de congelación y descongelación. Por esta razón, se han propuesto crioprotectores alternativos que sean permeables, de menor peso molecular y viscosidad, que disminuyan el estrés osmótico y reduzcan la formación de cristales de hielo intracelulares (Castro, 2016).

Refrigeración

En la mayoría de los casos, es indispensable llevar a cabo una fase de refrigeración y equilibración de las células espermáticas en el diluyente de congelación. Este proceso facilita

una deshidratación y estabilización adecuadas de las células, lo cual depende de las diferencias en permeabilidad y peso molecular de los crioprotectores en comparación con las soluciones fisiológicas (Rangel, 2023).

En cualquier circunstancia, es fundamental que tanto las tasas de refrigeración y equilibrio de congelación se ajusten a la composición del medio de congelación empleado, con el fin de optimizar los resultados (Rangel, 2023).

Congelación y almacenamiento de semen

Congelación con el sistema convencional de nitrógeno líquido

El sistema convencional sugiere la colocación de las pajuelas en posición horizontal, a una altura de 3 a 6 centímetros por encima del nivel de nitrógeno, durante un período de 7 a 20 minutos. Se observa una variación en el ritmo de congelación en función de la altura de colocación; sin embargo, en términos generales, la velocidad de congelación es considerablemente rápida, alcanzando aproximadamente -60°C por minuto. Este sistema ofrece diversas ventajas, tales como su economía, simplicidad y la reducción de costos asociados tanto al equipamiento como al consumo de nitrógeno líquido (Guzmán, 2023).

Sistema automatizado de congelación

En la actualidad hay sistemas automatizados de congelación, los cuales, en este contexto, generalmente emplean curvas de congelación que integran diversas velocidades. Estas incluyen una primera fase de $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ entre las temperaturas de 20°C y -15°C , seguida de una segunda fase con velocidades de aproximadamente $-25^{\circ}\text{C}/\text{min}$ a $-60^{\circ}\text{C}/\text{min}$ entre -15°C y -120°C . Posteriormente, las pajuelas se sumergen en nitrógeno líquido. Este método permite una tasa de congelación más uniforme, dado que proporciona un mayor control de la temperatura, lo cual se ha asociado con una mejor calidad seminal posterior a la descongelación en comparación con el sistema convencional de congelación (Cedeño, 2023).

Envasado de pajillas

El proceso de envasado puede llevarse a cabo en macropajuelas de 4 o 5 ml, en micropajuelas de 1 ml, en pajuelas de 0,5 ml, que son las más comúnmente utilizadas, o en pajuelas de 0,25 ml. El enfriamiento se presenta de manera más uniforme y eficiente en las micropajuelas,

especialmente en aquellas de 0,5 ml destinadas al semen equino; sin embargo, es necesario utilizar varias pajuelas para concluir la dosis de inseminación (Gutiérrez, 2013).

Descongelación de semen

Existen diversos protocolos para la descongelación de dosis seminales; sin embargo, el método a emplear depende del sistema de envasado y de la velocidad de congelación. Generalmente, se recomienda que las micropajuelas sean descongeladas mediante inmersión en agua a una temperatura de 37 °C durante un periodo de 0,5 a 1 minuto. Por otro lado, para las macropajuelas de 5 o 2,5 ml, se sugiere el uso de temperaturas de 50 °C en el transcurso de 45 segundos (García, 2023).

Mecanismos de crio lesión en el semen equino

El semen equino presenta características morfológicas autóctonas de la especie, tales como una cabeza asimétrica, la posición abaxial de la cola, un acrosoma de poco volumen y la presencia de microtúbulos en el cuello. Asimismo, se ha documentado que el porcentaje de espermatozoides considerados normales oscila entre el 51% y el 89%. Las anormalidades mayores representan un 9. 5%, entre las cuales se incluyen anormalidades de la cabeza (4. 1%), cola doblada bajo la cabeza (2. 5%) y defectos en el cuello (2. 4%). Por otro lado, las anormalidades menores afectan un 10. 7%, y 6. 9% se encuentran colas dobladas, 1. 4% pérdida de porciones de la cabeza y 2% pérdida del acrosoma. Estas características morfológicas pueden ser clasificadas como anormales, indicando una calidad espermática deficiente; no obstante, se ha evidenciado que en diversos casos la morfología de los espermatozoides no guarda relación con su fertilidad. En consecuencia, un amplio rango de anormalidades morfológicas resulta aceptable en machos destinados a la reproducción (Kuisma et al, 2006).

Sensibilidad de semen equino

El espermatozo equino puede ser sensible que afectan a la viabilidad y fertilidad como muerte de espermatozo y anomalías genéticas o por otros factores como:

- Temperatura a cambios bruscos y para su almacenamiento adecuado se debe mantener a una temperatura entre 4 a 6 grados centígrados

- Humedad para evitar la secades del semen por la cual debe mantenerse a un 60% y 80%
- Oxígeno el semen equino es muy sensible a lugares con mucho oxígeno por su prematura oxidación.
- El pH es fundamental para evitar la sensibilidad del semen equino es un pH de 6,5 a 7,5
- Las toxinas de metales pesados (plomo, mercurio, cadmio, arsénico, cobre y zinc.) los pesticidas, y todos los productos químicos.
- Radiación es muy sensible a la luz solar y radiación ionizante que afecta directamente al ADN.
- Enfermedades afectan al espermatozoide algunas enfermedades específicas como arteritis viral e influenza equina.
- El estrés afecta psicológicamente a los caballos tanto maltrato entre ellos

La calidad del semen congelado y descongelado está condicionada por la capacidad de los espermatozoides para resistir estos procedimientos sin comprometer sus funciones esenciales. La disminución de cualquiera de estas funciones podría resultar en una reducción o supresión total de la fertilidad del espermatozoide. Durante los procesos de criopreservación, se generan daños tanto letales como subletales en los espermatozoides, similares a la apoptosis, que afectan su viabilidad e integridad, y, en consecuencia, su vida media y capacidad fecundante (González et al. 2015).

González, (2015) menciona que los daños experimentados durante la criopreservación seminal han sido clasificados por diversos autores según su origen, incluyendo alteraciones inducidas por cambios de temperatura, variaciones en la osmolaridad, o la acción de agentes oxidantes.

Oxidación del semen equino

La causa principal de la oxidación de semen equino se da por el daño causado de los radicales libres de oxígeno ya que estos se producen de manera natural y también se pueden generar por otros factores como la humedad, temperatura, contaminación y oxigenación en el semen (Guzmán, 2023).

Durante el proceso de metabolismo oxidativo fisiológico de las células espermáticas, se generan especies reactivas de oxígeno, comúnmente conocidas como "radicales libres" (EROs), las cuales desempeñan un papel crucial en diversas funciones espermáticas, incluyendo la capacitación, la reacción acrosómica y el mantenimiento de la capacidad

fecundante, entre otras. Sin embargo, se presenta un problema cuando existe un desequilibrio en la producción o en la degradación de estas sustancias, lo que resulta en efectos adversos sobre los espermatozoides, afectando aspectos como la membrana plasmática, el ADN y parámetros espermáticos, como la motilidad (Rangel, 2023).

La deficiencia de antioxidantes produce daño a las células espermáticas y el estrés oxidativo se da cuando los radicales libres de oxígeno superan la capacidad del semen para ser neutralizados, sin embargo, los espermatozoides dañados o anormales que integran la población heterogénea tras el proceso de descongelación generan una mayor cantidad de radicales libres en comparación con los espermatozoides viables o normales, lo que afecta de manera negativa a estos últimos (Guzmán, 2023).

Estrés osmótico

Al disminuir la temperatura por debajo de los 20°C, el espermatozoide comienza a sufrir cambios biofísicos, principalmente en su membrana plasmática. Sin embargo, cuando se expone a temperaturas que oscilan entre los 0°C y los -20°C, e incluso hasta los -60°C, el espermatozoide sufre efectos significativos de descompensación iónica y de alteraciones en su contenido líquido (Cedeño, 2023).

Los cristales de agua comienzan a formarse al descender la temperatura por debajo de -5°C. Este fenómeno de cristalización provoca la separación de todos los solutos del cristal, lo que a su vez incrementa la concentración de sales en la fracción de agua que permanece en estado líquido. Como consecuencia de este fenómeno, se produce un aumento en la presión osmótica. Debido a que el agua presente en el interior del espermatozoide cristaliza más lentamente que el agua situada en el exterior, se produce un movimiento de agua hacia el medio extracelular a través de un gradiente osmótico, mediante la membrana plasmática. Como resultado de este proceso, el espermatozoide pasa a un estado de deshidratación (Cedeño, 2023).

Estrés térmico

A lo largo del proceso de criopreservación, se presentan alteraciones en las propiedades termodinámicas y estructurales de los espermatozoides, lo cual repercute en su viabilidad. Esto se debe a los cambios bruscos de temperatura, los cuales afectan, de manera particular a la membrana plasmática y a la membrana acrosomal (Gutiérrez, 2013).

La causa del daño espermático que se produce como resultado de un choque térmico está determinada no únicamente por la disminución de la temperatura, sino también por la velocidad con la que dicha disminución se lleva a cabo. Se ha establecido que cada tipo celular presenta una velocidad óptima de congelación, la cual garantiza su supervivencia tras el proceso de

criopreservación. Si la velocidad de congelación es excesivamente rápida o demasiado lenta, el estrés originado por el proceso de criopreservación se incrementa (Gutiérrez, 2013).

Estrés mecánico

El daño en las estructuras celulares del espermatozoide podría contribuir a la comprensión de la disminución de la motilidad y, por consiguiente, de la fertilidad. Se ha documentado que los daños en las mitocondrias están relacionados con la reducción de la motilidad, sin embargo, también se ha observado que el semen con un alto grado de daño a nivel del ADN nuclear presenta una notable disminución en la motilidad y velocidad espermática tras el proceso de descongelación (García, 2023).

La viabilidad de las células espermáticas, son aquellas que presentan una membrana plasmática intacta y una función mitocondrial adecuada, ha sido seleccionada como un indicador clave para la evaluación de la calidad espermática. Esto es especialmente relevante en el contexto de la crioconservación del esperma, ya que tanto la membrana plasmática como la mitocondrial pueden sufrir daños durante dicho proceso (García, 2023).

Selección de espermatozoides

Las técnicas de selección espermática permiten la identificación de una subpoblación de espermatozoides en función de sus características específicas, emulando en cierta medida los métodos naturales de selección espermática y sea receptivo para la yegua. El objetivo de este proceso es asegurar que únicamente los espermatozoides que presentan una morfología normal, membranas celulares intactas y una cromatina espermática íntegra logren atravesar el oviducto y fertilizar el ovocito (Serres, 2015).

Métodos:

- **Técnica de migración espermática:** La técnica en cuestión se fundamenta en la capacidad de los espermatozoides móviles para desplazarse o migrar activamente hacia un medio selectivo que presenta una composición diferente a la del medio original. Los espermatozoides son seleccionados en función de su motilidad, prescindiendo de criterios relacionados con su morfología, integridad y viabilidad. Este procedimiento se lleva a cabo sobre el pellet obtenido mediante centrifugación, lo cual repercute negativamente en la calidad resultante, no solo debido a la técnica de centrifugación en sí, sino también porque en el pellet final los espermatozoides se concentran junto a

detritos que favorecen la liberación de especies reactivas de oxígeno (ERO) (González et al. 2015).

- **Técnica de adherencia espermática:** La técnica se fundamenta en la preponderante tendencia observada en los espermatozoides muertos o dañados a adherirse a los gránulos de polisacáridos que constituyen los filtros, permitiendo así que los espermatozoides con membranas plasmáticas y acrosomales intactas atraviesen las columnas de polisacáridos. Esto resulta en una mejora en la calidad de la muestra obtenida. En estudios previos, esta metodología ha mostrado una correlación positiva con el incremento de la fertilidad (González et al. 2015).
- **Técnica de centrifugación coloidal:** Se emplea una suspensión de partículas coloidales, la cual se coloca en un tubo, formando una separación continua en dos capas distintas (con 40-45% de coloide y otra con 80-90% de coloide). Sobre esta suspensión se deposita el semen, y a continuación se procede a la centrifugación, lo que permite la separación de los espermatozoides en subpoblaciones con diferentes gravidades específicas. De este modo, los espermatozoides normales atraviesan los gradientes y se localizan en el pellet, mientras que el resto de los espermatozoides no motiles o anormales quedan en el sobrenadante con sus impurezas (González et al. 2015).

Características reproductivas de los equinos

Primeramente, nos enfocamos en la edad de la madurez sexual que alcanza de 2 a 4 años, para poder evaluar unas buenas condiciones anatómicas se hizo referencia a los:

Buitrago y Pérez 2018, se enfocan en las características del pene del caballo es un órgano que forma de diferentes partes y tiene una particularidad en esta especie que eyacula por medio de presión y calor, sus partes constan de:

- **Glande:**

El glande es la parte más distal del pene y a su vez es la parte que tiene contacto con la vagina y consta de una longitud de 10 a 15 cm y con un diámetro de 4 a 5 cm.

- **Cuerpo del pene:**

Es la porción principal que forma al pene por la cual se encuentra entre el glande y el prepucio, su longitud consta de 30 a 40 cm aproximadamente y su diámetro tiene una medida de 6 a 8 cm.

- **Prepucio:**

El prepucio es un estuche de piel para guardar al pene cuando no está en actividad (erecto) y tiene una longitud de 10 a 15 cm aproximadamente.

- Frenillo:

El frenillo es una flexura de piel que está conectado desde el glande conjuntamente con el prepucio, la longitud consta aproximadamente de 2 a 5 cm.

- Testículos:

Ya que son los responsables de generar hormonas sexuales y espermatozoides, debemos fijarnos en la circunferencia testicular que se mide el diámetro de cada testículo y tiene una longitud de 20 a 25 cm en caballos adultos, también la longitud testicular que se hace referencia desde la base hasta la punta del testículo y debe tener una medida de 8 a 10 cm, y por último la anchura testicular que se mide la parte más ancha de cada testículo y tiene una medida de 5 a 6 cm en caballos en una vida adulta, a pesar que influye en algunas razas tener los testículos más pequeños como la raza del caballo árabe.

- Epidídimo:

Es un conducto ubicado en la parte posterior de los testículos donde da la función de almacenamiento y maduración de los espermatozoides, el epidídimo tiene una longitud de 30 a 40 cm y de diámetro tiene una medida de 1 a 2 cm.

- Conducto eferente:

El conducto eferente es un conducto muscular que da la función de transporte de los espermatozoides que da inicio desde el epidídimo hasta terminar en la uretra, el conducto eferente tiene una longitud de 30 a 50 cm y de diámetro una medida de 0,5 a 1 cm.

- Uretra:

Es un conducto que ayuda a la acción de orinar y a la eyaculación del caballo, la uretra tiene una longitud de 50 a 60 cm y una medida de diámetro de 2 a 3 cm.

- Próstata:

La próstata es un conducto cuya función es elaborar un líquido y a su vez forma parte del semen, su longitud tiene una medida aproximadamente de 6 a 10 cm y un diámetro de 4 a 5 cm.

- Glándulas bulbouretrales:

Son glándulas que elabora un líquido y forma parte del semen como la próstata y sus medidas de las glándulas son aproximadamente con una longitud de 5 a 8 cm y un diámetro de 2 a 4 cm.

- Escroto:

El escroto es un saco de piel que da protección a los testículos y a los epidídimos y su longitud es de 15 a 25 cm, con un diámetro de 10 a 15 cm aproximadamente.

- Espermatozoide:

Los espermatozoides de los equinos tienen su propia morfología como su cabeza es ovalada y alargada su núcleo es ovalado y compacto el acrosoma es bien desarrollado y el flagelo es largo, delgado con una particularidad de su estructura helicoidal, la dimensión de un espermatozoide equino es de 50 a 60 μm , pero la longitud de la cabeza del espermatozoide es de 5 a 7 μm con un ancho aproximado de 3 a 5 μm , y el flagelo también tiene una longitud de 40 a 50 μm y su respectivo diámetro de 0,5 a 1 μm esto varía todo depende la raza, edad y factores de la calidad espermática (Restrepo et al. 2016).

OBJETIVOS

Objetivo General

- Evaluar la técnica de resuspension espermática sobre la calidad post descongelado de semen equino de diferentes razas.

Objetivos específicos

- Aplicar las técnicas de resuspension de 1500rpm y 1700 rpm en 10 minutos en 3 diferentes razas de caballos como un caballo árabe, un caballo Criollo Colombiano y un caballo español.
- Determinar la concentración, movilidad, morfología y vigor espermático (motilidad masal) después de someter las muestras seminales a la técnica de resuspension post descongelado.
- Evaluar mediante pruebas complementarias (test de host e integridad del acrosoma) el semen equino post descongelado convencional y mediante técnicas de resuspension.

CAPITULO II

METODOLOGÍA

2.1 Ubicación del Estudio.

El presente estudio se realizó en la Hacienda San Pablo en Ecuador de América del Sur en la Provincia de Tungurahua en la Parroquia de Cunchibamba con una altura de 2720 msnm, con sus respectivas coordenadas son 1,9" O "S y 78grados 36"O wen grados minutos segundos o también se denomina en grados decimales que son -1,15 y -78,6.

2.2 Características del lugar

En la Parroquia Cunchibamba, del Cantón Ambato en donde se realizará el estudio tiene las siguientes condiciones meteorológicas en la siguiente tabla.

Tabla 2

Características del lugar de experimentación.

CARACTERISTICAS	DESCRIPCION
Temperatura, °C	10 a 17
Precipitación anual, mm	220 a 500
Clima, °C	Ecuatorial meso térmico seco
Altitud, msnm	2720
Viento, m/s	Sur oeste 3,9
Presión, hPa	1023

°C: grados centígrados, msnm: metros sobre el nivel del mar,

hPa: (hectopascal) medición de la presión atmosférica,

2.3 Materiales, Equipos y Métodos

En cuanto a los materiales utilizados para el presente trabajo experimental se los ha clasificado y diferenciado de la siguiente manera:

2.4 Material biológico experimental

Tres caballos de diferentes razas como:

- Un caballo Árabe
- Un caballo Español
- Un caballo Criollo Colombiano.

2.5 Material de campo

- Overol
- Baño maria
- Maniquí de Yegua
- Vagina artificial equina
- Botas
- Guantes
- Nitrógeno líquido
- Cooler
- Equipo de laboratorio
- Microscopio
- Gradillas
- Cofia
- Papel aluminio
- Microscopio
- Centrifugadora
- Cajas Petri
- Pipeteador
- Pajuelas

- Puntas de pipetas
- Selladores
- Tubos falcon de 15ml y 45ml
- Jeringas de 1ml
- Filtro de café
- Biberones de 160ml
- Gasas
- Poliexpander de 5mm
- Plancha térmica

2.6 Reactivos

- Crioramp
- Ramcomp
- Ramp plus
- Hiposmótica de fructosa
- Citrato de sodio
- Glutaraldehído
- Buffer fosfato salino
- Agua bidestilada
- Eosina
- Nigrosina
- Yema de huevo

2.7 Factores de Estudio

Factor 1:

- Técnica de resuspension (una velocidad de 1500 rpm en 10 minutos).

Factor 2:

- Técnica de resuspension (una velocidad de 1700 rpm en 10 minutos).

Factor 3:

- Técnica convencional. (no necesita centrifugación)

2.8 Unidades experimentales

Para la presente investigación se contó solo con 3 caballos de diferentes razas como:

- Un Caballo Árabe
- Un Caballo Español
- Un Caballo Criollo Colombiano

2.9 Diseño experimental

Para el estudio se utilizó 45 pajuelas para esta investigación se evaluó cada pajuela en el microscopio a través de pruebas y reactivos para poder tener la concentración, movilidad, morfología, vigor espermático (motilidad masal), prueba de HOST e integridad del acrosoma se ejecutó con un diseño completamente al azar (DCA), con arreglo factorial 3 x 2, que se refiere a 3 diferentes razas de caballos como donadores de semen y 2 técnicas de procesamiento seminal. La unidad experimental se considerará un eyaculado, el número de eyaculados por semana serán las repeticiones. El tiempo destinado para las extracciones de semen será de 5 semanas. La distribución de los tratamientos se describe en el cuadro #1

Cuadro 1. NUMERO DE TRATAMIENTOS EXPERIMENTALES Y REPETICIONES.

Tratamientos	# de repeticiones	# de animales	Total Repeticiones
R1T0	5 eyaculaciones		5
R1T1	5	1	5
R1T2	5		5
R2T0	5		5
R2T1	5	1	5
R2T2	5		5
R3T0	5		5
R3T1	5	1	5
R3T2	5		5
Total, de animales		3	45

R1T0: Caballo Árabe con Convencional (testigo) R1T1: Caballo Árabe con técnica de resuspension 1500 rpm.
R1T2: Caballo Árabe con técnica de resuspension 1700rpm.
R2T0: Caballo Criollo Colombiano con Convencional (testigo) R2T1: Caballo Criollo Colombiano con técnica de resuspension 1500rpm. R2T2: Caballo Criollo Colombiano con técnica de resuspension 1700rpm
R3T0: Caballo Español con Convencional (testigo) R3T1: Caballo Español con técnica de resuspension a 1500 rpm. R3T2: Caballo Español con técnica de resuspension a 1700 rpm.

Procesamiento de la información.

Los datos obtenidos serán tabulados mediante el programa de software INFOSTAT (2019).

Técnicas para tabular datos

Una vez realizada las pruebas y recopilada la información obtenida se sometieron a un ADEVA y al existir diferencias entre las medias de los distintos tratamientos se sometió a la prueba estadística de Tukey con valor de probabilidad de error del 5% (0,05).

2.10 Mediciones experimentales

Para el presente estudio nos enfocamos a considerar las siguientes variables y evaluar el semen equino postdescongelado:

- Movilidad (%)
- Vigor espermático (motilidad masal) (%)
- Morfología (%)
- Concentración (ml)
- Integridad del acrosoma (%)
- Prueba de host (%)

Procedimiento experimental

En esta investigación se utilizaron caballos de la hacienda San Pablo en Cunchibamba, de diferentes razas. Uno de ellos fue un ejemplar árabe de aproximadamente 8 años. Debido a su temperamento, se mantenía aislado de los demás caballos. Su alimentación consistía en concentrado y pastoreo, duerme en el potrero y se mantiene en sogueó, mientras que los otros caballos como el caballo criollo colombiano y el caballo español, ambos de aproximadamente 6 años. A diferencia del caballo árabe, estos ejemplares vivían en condiciones distintas, en las mañanas se le sacaba al potrero, y por las tardes en pesebrera individuales, siguiendo el mismo

manejo que el resto de los caballos que habitan en el predio. Su alimentación consistía en concentrado y heno.

Todos los caballos seguían un riguroso calendario de vacunación anual con la vacuna FLUVAC INNOVATOR 6:

- Encefalomiелitis Equina del Este (EEE)
- Encefalomiелitis Equina del Oeste (WEE)
- Encefalomiелitis Equina Venezolana (VEE)
- Rinoneumonitis Equina (Herpesvirus Equino tipo 1 y tipo 4)
- Influenza Equina (cepas A1, A2 Miami y A2 Kentucky)
- Tétanos

Asimismo, los caballos fueron sometidos a un protocolo de desparasitación y vitaminización para mejorar su condición corporal. Posteriormente, se entrenaron durante un período de 12 días para el adiestramiento al salto del maniquí, facilitando el manejo por parte del personal humano y el uso de la vagina artificial.

Procedimiento de recolección y evaluación del semen equino

En primer lugar, durante la primera semana y a lo largo de toda la investigación, se aplicó un protocolo estandarizado a todos los equinos. Para ello, los caballos fueron trasladados al establo con el propósito de realizar la limpieza del pene, un paso fundamental para prevenir la contaminación de la muestra seminal (Samper, 2009). Posteriormente, los animales fueron ubicados en un ambiente tranquilo durante aproximadamente 20 minutos, mientras se preparaba la vagina artificial equina de marca Missouri. Este dispositivo consta de un capuchón de cuero, una camisa interna de látex conectada a una válvula para el ingreso y salida de agua y aire, así como un biberón esterilizado acoplado en la parte inferior de la camisa de látex, lo que facilita la recolección del eyaculado (McKinnon & Voss, 2011).

A continuación, se introdujo agua en la vagina artificial a una temperatura de entre 45 y 50 grados centígrados, complementándola con aire para generar la presión interna adecuada. Este procedimiento permite simular condiciones similares a la monta natural, dado que la eyaculación en los equinos se produce en respuesta a estímulos de presión y temperatura (Varner et al., 2014). Asimismo, se aplicó lubricante en la parte posterior del dispositivo con el objetivo de facilitar la penetración y garantizar una eyaculación óptima.

Una vez lista la vagina artificial, el caballo fue conducido hacia el maniquí para realizar el salto correspondiente. En ese momento, cuando el animal se posicionó sobre el maniquí, su pene fue cuidadosamente desviado hacia la vagina artificial. Tras la introducción, se esperó de 20 a 30 segundos para su eyaculación, una vez tomado la muestra filtrada se le traslado al laboratorio, y se realizó la respectiva evacuación del agua y el aire, para poder volver a utilizar para las siguientes colectas y así poder ingresar agua caliente para equilibrar su temperatura (Sieme et al., 2016). Como resultado, la eyaculación del equino ocurrió aproximadamente 30 segundos después de la inserción.

Posteriormente, la muestra seminal fue trasladada al laboratorio, donde se llevó a cabo su filtración mediante papel filtro en un recipiente estéril. Luego, se midió el volumen de la muestra para determinar la cantidad total de semen recolectado (Aurich, 2012). Paralelamente, se encendió un baño maría y se programó a 37 grados centígrados para mantener la muestra en condiciones óptimas durante 30 minutos antes de añadir los diluyentes.

Durante este periodo de estabilización, se realizó un análisis microscópico del semen recién colectado. En este sentido, se evaluaron parámetros esenciales como la concentración espermática, la motilidad masal e individual, la morfología espermática y la integridad de la membrana y del acrosoma (Gibb et al., 2015). Finalmente, se procedió a la preparación de los diluyentes específicos para su procesamiento. El diluyente **Ramp Plus**, que contiene L-arginina, L-carnitina y antioxidantes como la vitamina E y el selenio, fue utilizado para la centrifugación del semen. Por otro lado, el diluyente **CrioRamp**, que incluye glicerol como crioprotector y antioxidantes como la vitamina E y el selenio, fue destinado al proceso de congelación (Aurich, 2012).

En conclusión, la recolección y evaluación del semen equino sigue un protocolo estructurado que garantiza la calidad de la muestra para su posterior procesamiento y preservación. La aplicación de procedimientos estandarizados y el uso de tecnologías avanzadas en biotecnología reproductiva permiten optimizar la fertilidad equina y mejorar la eficiencia de los programas de reproducción asistida

Diluyente Crioprotector (Ramp Plus)

El diluyente Ramp Plus es una solución diseñada para la resuspensión, refrigeración y transporte de muestras seminales equinas. En este sentido, su formulación tiene como objetivo mejorar la calidad del semen mediante la inclusión de compuestos que optimizan la

concentración, motilidad y morfología espermática. Además, este diluyente contribuye al aumento de la fertilidad gracias a la presencia de la L-arginina y la L-carnitina, sustancias que estimulan la producción de espermatozoides y mejoran su calidad (Aurich, 2012).

Por otro lado, el Ramp Plus contiene antioxidantes como la vitamina E y el selenio, los cuales desempeñan un papel crucial en la protección de los espermatozoides frente al daño oxidativo (Gibb et al., 2015). Asimismo, estos compuestos ayudan a regular la función hormonal masculina, favoreciendo la salud reproductiva del equino. Entre sus ingredientes activos más relevantes se encuentran la L-arginina, que mejora la movilidad espermática; la L-carnitina, encargada de optimizar el metabolismo energético de los espermatozoides; el zinc, esencial para la espermatogénesis y la función testicular; la vitamina E, que protege frente al estrés oxidativo, y el selenio, que contribuye a la integridad estructural de los espermatozoides (Varner et al., 2014).

Protocolo de Preparación del Diluyente

Para la preparación de 100 ml del diluyente Ramp Plus destinado a la centrifugación, refrigeración y transporte de semen equino, se siguió un protocolo específico. En primer lugar, se calentaron 100 ml de agua destilada a 37 °C, los cuales fueron vertidos en la bolsa del diluyente de 9,1gr de Ramp Plus. A continuación, la mezcla se agitó de manera lenta y constante hasta obtener una solución homogénea. Posteriormente, se añadieron 2 ml del crioprotector Ramp Plus compuesto por antioxidantes como la vitamina E y el selenio, asegurando su homogenización mediante movimientos suaves (Sieme et al., 2016).

Seguidamente, la mezcla se mantuvo a 37 °C durante 10 minutos, con el propósito de asegurar la activación de los componentes antes de su combinación con el semen. Finalmente, el diluyente fue incorporado de manera gradual y uniforme a la muestra seminal, garantizando así una distribución homogénea sin generar estrés osmótico en los espermatozoides (McKinnon & Voss, 2011). Este procedimiento asegura una resuspensión efectiva del semen equino, lo que permite preservar su viabilidad durante el transporte y almacenamiento.

Diluyente Crioprotector (CrioRamp)

El CrioRamp es un producto diseñado específicamente para mejorar la calidad y supervivencia de los espermatozoides durante los procesos de congelación y descongelación. En este sentido,

su formulación contribuye a la preservación de la viabilidad espermática, ya que protege a los espermatozoides del daño celular causado por los cambios de temperatura extremos, lo que favorece su funcionalidad tras la descongelación (Aurich, 2012).

Asimismo, este diluyente destaca por su capacidad para reducir el estrés oxidativo, gracias a la inclusión de antioxidantes que protegen a los espermatozoides frente a los radicales libres generados durante la criopreservación (Sieme et al., 2016). De igual manera, mantiene la integridad de la membrana espermática, un factor esencial para garantizar tanto la supervivencia como la fertilidad de los espermatozoides (Varner et al., 2014). Además, el CrioRamp mejora la motilidad espermática post-descongelación, lo que incrementa la probabilidad de éxito en los procedimientos de reproducción asistida. Finalmente, su compatibilidad con diversos protocolos de congelación y descongelación lo convierte en un diluyente versátil y fácil de utilizar (Gibb et al., 2015).

Entre sus principales ingredientes se encuentran el glicerol, que actúa como crioprotector, y los antioxidantes vitamina E y selenio, ambos esenciales para minimizar el daño oxidativo y preservar la integridad estructural de los espermatozoides (McKinnon & Voss, 2011).

Protocolo de Preparación del Diluyente CrioRamp

Para la preparación de 90 ml del diluyente CrioRamp destinado a la congelación de semen equino, se siguió un protocolo estructurado. En primer lugar, se tomaron 81 ml de agua bidestilada y se calentaron en un baño maría a 37 °C. Posteriormente, se adicionaron a los 8gr del diluyente CrioRamp Plus, homogenizando la mezcla de manera lenta y constante durante un período mínimo de 10 minutos.

A continuación, se añadieron 4.5 ml del crioprotector Rampco (glicerol), asegurando que la solución se mantuviera a una temperatura constante de 30 °C. Posteriormente, se llevó a cabo una segunda homogenización durante 5 minutos, manteniendo la mezcla a la misma temperatura. En la siguiente fase, se procedió a la adición de 4.5 ml de yema de huevo, la cual fue previamente separada de la clara. Esta incorporación se realizó de manera lenta y uniforme, garantizando una adecuada homogenización sin la formación de espuma (Sieme et al., 2016). Finalmente, el volumen del diluyente CrioRamp Plus se dividió para su uso inmediato, mientras que el resto se almacenó bajo condiciones de congelación óptimas hasta su próximo empleo.

Evaluación del Semen Fresco

Como parte del proceso de criopreservación, se llevó a cabo una evaluación del semen fresco antes de su procesamiento. Para ello, se consideraron variables clave como el volumen de eyaculación, morfología espermática, concentración espermática, motilidad individual y masal, integridad del acrosoma e integridad de la membrana plasmática (Varner et al., 2014). Estos parámetros fueron analizados mediante técnicas de laboratorio especializadas, con el fin de determinar la calidad de la muestra antes de proceder con la congelación.

Volumen de eyaculado

El volumen de cada eyaculación se determinó inmediatamente después de la colecta, utilizando un cilindro graduado para su medición en mililitros (Amann & Waberski, 2014). Se puede observar el volumen de eyaculado de cada caballo en diferentes semanas de recolección. tabla # 3

Morfología espermática

El análisis de la morfología espermática es un procedimiento esencial para evaluar la calidad seminal y, por ende, la fertilidad en equinos (García et al., 2020). En este sentido, la evaluación microscópica del semen permite identificar posibles anomalías en la forma y estructura de los espermatozoides, lo cual resulta determinante en su capacidad reproductiva (Pérez & Ramírez, 2018).

Para llevar a cabo este análisis, se siguió un procedimiento estructurado en varias etapas. En primer lugar, se recolectó una muestra de semen fresco y homogéneo. Posteriormente, con el fin de mejorar la visualización de las estructuras espermáticas, se fijó y tiñó una fina capa de semen sobre un portaobjetos, empleando técnicas como la tinción de Eosina-Nigrosina (Martínez et al., 2019).

A continuación, se realizó la observación microscópica utilizando un aumento de 1000x con aceite de inmersión. Se analizaron al menos 100 espermatozoides distribuidos aleatoriamente, los cuales fueron clasificados en normales y anormales. Según Rodríguez y López (2021), los espermatozoides normales presentan una morfología ovalada y simétrica, con una pieza media alineada y una cola recta sin deformidades. En contraste, aquellos con anomalías pueden presentar cabeza doble, amorfa o desproporcionada, así como defectos en la pieza media y la cola, tales como engrosamiento, torsión, fracturas o acortamiento.

Finalmente, el cálculo del porcentaje de espermatozoides normales y anormales permitió determinar la calidad de la muestra. Diversos estudios establecen que un mínimo del 60% de espermatozoides con morfología normal es un criterio fundamental para considerar una

muestra como apta para reproducción asistida (Torres et al., 2017). Este análisis, por lo tanto, resulta imprescindible en la toma de decisiones dentro de los programas de reproducción equina.

$$\text{Porcentaje de espermatozoides normales} = \left(\frac{\text{Número de espermatozoides normales}}{\text{Número total de espermatozoides observados}} \right) \times 100$$

$$\text{Porcentaje de espermatozoides anormales} = \left(\frac{\text{Número de espermatozoides anormales}}{\text{Número total de espermatozoides observados}} \right) \times 100$$

Cálculo de la concentración espermática

El cálculo de la concentración espermática es un procedimiento esencial en la evaluación de la calidad seminal, ya que permite cuantificar la densidad de espermatozoides presentes en una muestra y, por ende, su potencial reproductivo (García et al., 2020). Para ello, se utilizó la cámara de Neubauer, siguiendo un protocolo estandarizado que garantizó precisión en la medición y minimización de errores (Pérez & Ramírez, 2018).

Para llevar a cabo este análisis, se siguieron cinco etapas fundamentales. En primer lugar, se realizó una dilución 1:50 para muestras con alta concentración espermática, utilizando una solución de cloruro de sodio. La preparación consistió en mezclar 20 µL de semen con 980 µL de diluyente, con el objetivo de asegurar una adecuada homogenización y una distribución uniforme de los espermatozoides, facilitando así su observación (Martínez et al., 2019).

En segundo lugar, se procedió a la carga de la cámara de Neubauer. Se depositaron 10 µl de la muestra diluida en cada extremo de la cámara, garantizando la ausencia de burbujas que pudieran interferir en la observación. Luego, la muestra fue colocada en el microscopio para su análisis.

A continuación, se llevó a cabo el conteo espermático, un paso clave en el proceso. Para ello, se analizaron los espermatozoides presentes en los cuatro cuadrantes delimitados de la cámara de Neubauer, obteniéndose los siguientes valores: cuadrante 1 (50), cuadrante 2 (45), cuadrante 3 (46) y cuadrante 4 (50). La suma total de los conteos fue de 191 espermatozoides, lo que, al dividirse entre los cuatro cuadrantes evaluados, arrojó un promedio de 47.75 espermatozoides por cuadrante.

Posteriormente, se aplicó la fórmula matemática correspondiente. El promedio obtenido se multiplicó por la constante de 200,000, la cual representa el volumen de la cámara de Neubauer y el factor de dilución. Así, se determinó que la concentración espermática en el semen diluido fue de 9,550,000 espermatozoides/ml (Rodríguez & López, 2021).

Finalmente, se calculó el total de espermatozoides presentes en la muestra analizada. Para ello, el valor obtenido se multiplicó por el volumen total de la eyaculación (40 ml), lo que resultó en un total de 382,000,000 espermatozoides. Este resultado se encuentra dentro de los parámetros esperados para evaluar la calidad seminal en equinos, ya que un adecuado conteo espermático es un indicador clave de fertilidad en la especie (Torres et al., 2017).

Motilidad espermática individual y masal

La motilidad espermática es un parámetro fundamental en la evaluación de la calidad seminal, ya que permite determinar la capacidad de los espermatozoides para desplazarse de manera eficiente hacia el óvulo y, por ende, su potencial fertilizante (García et al., 2020). Para su análisis, se evaluaron tanto la motilidad masal como la motilidad progresiva individual mediante la observación directa bajo el microscopio, siguiendo un protocolo estandarizado (Pérez & Ramírez, 2018).

En primer lugar, para la preparación de la muestra, se extrajeron aproximadamente 5 µl de semen, los cuales fueron colocados sobre un portaobjetos limpio y posteriormente cubiertos con un cubreobjetos. Este procedimiento aseguró una distribución uniforme de los espermatozoides, facilitando su observación y evitando la evaporación de la muestra (Martínez et al., 2019).

Seguidamente, se ajustó el microscopio a un aumento de 400x, manteniendo la temperatura de la platina a 37 °C con el propósito de evitar el enfriamiento del semen, lo cual podría afectar la movilidad de los espermatozoides. La motilidad masal se evaluó observando el movimiento conjunto del grupo de espermatozoides sin enfocarse en individuos específicos. De esta manera, se clasificó el movimiento en tres categorías: buen movimiento ondulante (++), movimiento reducido (+) o ausencia de movimiento (-) (Rodríguez & López, 2021).

Por otro lado, la motilidad progresiva individual se analizó examinando un mínimo de 100 espermatozoides seleccionados al azar. Estos fueron clasificados en cuatro grupos principales: progresivo rápido, cuando el desplazamiento es rectilíneo hacia adelante; progresivo lento, cuando el avance es errático o con velocidad reducida; no progresivo, en casos donde los movimientos son circulares sin desplazamiento efectivo; e inmóvil, cuando no se observa movimiento alguno (Torres et al., 2017).

El porcentaje de motilidad progresiva se calculó mediante la división del número de espermatozoides móviles progresivos entre el total de espermatozoides analizados, multiplicando el resultado por 100. La fórmula empleada fue:

$$\text{Motilidad progresiva (\%)} = \left(\frac{\text{Número de espermatozoides móviles progresivos}}{\text{Total de espermatozoides observados}} \right) \times 100$$

De acuerdo con los estándares reproductivos en equinos, una muestra seminal se considera de buena calidad cuando al menos el 60% de los espermatozoides presentan motilidad progresiva. Este parámetro es crucial, ya que una alta motilidad espermática está directamente relacionada con mayores tasas de fertilización en biotecnologías reproductivas como la inseminación artificial y la transferencia de embriones (López et al., 2022).

Prueba de la integridad del acrosoma (Hypoosmotic Swelling Test, HOST)

La evaluación de la integridad y funcionalidad de la membrana plasmática espermática es un aspecto fundamental en el análisis de la calidad seminal, ya que permite determinar la viabilidad de los espermatozoides y su capacidad para resistir cambios osmóticos. En este contexto, la prueba de hinchamiento hipoosmótico (Hypoosmotic Swelling Test, HOST) ha sido ampliamente utilizada como un indicador confiable de la estabilidad de la membrana espermática, lo cual es crucial para garantizar su funcionalidad en procesos reproductivos asistidos (Contreras et al., 2020).

Preparación del reactivo HOST

Para llevar a cabo la prueba, se emplearon fructosa y citrato trisódico como los principales componentes del reactivo. En primer lugar, se preparó la solución hipoosmótica disolviendo 8 gramos de fructosa y 4 gramos de citrato trisódico en 270 ml de agua bidestilada. Esta mezcla proporcionó el medio adecuado para inducir la respuesta osmótica de los espermatozoides, asegurando condiciones óptimas para la evaluación (López et al., 2019).

Procedimiento de la prueba HOST

El procedimiento experimental se desarrolló en varias etapas. En primer lugar, se preparó la relación de mezcla entre la solución hipoosmótica y la muestra seminal en una proporción de 2:1, es decir, se combinaron 200 µl de la solución con 100 µl de semen descongelado. Posteriormente, la mezcla se incubó en baño maría a 37 °C durante 30 minutos, asegurando una temperatura estable para evitar alteraciones en la respuesta osmótica de los espermatozoides (Martínez et al., 2021).

Seguidamente, una gota de la muestra fue colocada sobre un portaobjetos precalentado a 35 °C, con el objetivo de minimizar posibles efectos negativos del enfriamiento sobre la motilidad espermática. A continuación, la muestra fue evaluada bajo un microscopio óptico con un aumento de 40x, permitiendo la identificación de los cambios morfológicos espermáticos inducidos por la solución hipoosmótica (Gómez & Ramírez, 2018).

Evaluación de resultados

El análisis de los espermatozoides se realizó contabilizando aquellos que presentaron colas enrolladas, lo que indica una membrana plasmática funcional y, por ende, una capacidad adecuada para mantener el equilibrio osmótico. Esta respuesta es indicativa de una integridad estructural óptima, lo que sugiere que los espermatozoides poseen el potencial necesario para participar en la fecundación (Rodríguez et al., 2017).

Por el contrario, la presencia de espermatozoides sin colas enrolladas reflejó una membrana plasmática dañada, lo que compromete la calidad seminal y disminuye las probabilidades de éxito en procesos reproductivos. En este sentido, la prueba HOST complementa otros análisis seminales, proporcionando información valiosa sobre la viabilidad espermática y su capacidad fertilizante (Torres et al., 2022).

Evaluación de la Integridad del Acrosoma Espermático

El análisis de la integridad del acrosoma espermático es un procedimiento fundamental en la evaluación de la calidad seminal, ya que permite determinar la viabilidad de los espermatozoides y su capacidad potencial para la fertilización (García et al., 2020). Para ello, se empleó una metodología específica que incluyó la preparación de un reactivo fijador y el uso de tinciones diferenciadoras con el fin de identificar estructuras celulares intactas o alteradas.

Preparación del Reactivo

En primer lugar, se preparó una solución de glutaraldehído al 0,2%, la cual se obtuvo mediante la dilución de 50 ml de buffer fosfato salino en 49,98 ml de agua destilada. Este reactivo desempeñó un papel clave como fijador, preservando la estructura del acrosoma y evitando su alteración durante el análisis microscópico (Martínez et al., 2019).

Procedimiento del Análisis, Preparación de la Muestra

Para garantizar condiciones óptimas de análisis, se tomó 0,5 µl de semen descongelado y se colocó sobre un portaobjetos previamente precalentado a 35 °C mediante una plancha térmica. Este procedimiento evitó el enfriamiento del semen y, en consecuencia, posibles alteraciones en la integridad del acrosoma (López & Ramírez, 2021).

Tinción

Posteriormente, la muestra fue sometida a un proceso de tinción diferencial, el cual consistió en la mezcla de 5 µl de semen descongelado con 1 µl de nigrosina y 1 µl de eosina. Esta combinación se agitó suavemente hasta obtener una mezcla homogénea y, finalmente, se extendió sobre el portaobjetos utilizando la técnica de frotis (Fernández et al., 2018).

Observación y Evaluación

La observación microscópica se realizó con el objetivo de diferenciar los espermatozoides vivos de los muertos mediante el análisis de su coloración. De este modo, los espermatozoides vivos presentaron una membrana acrosómica de color rosado con una base azul, lo que indicó

una estructura íntegra. En contraste, los espermatozoides muertos mostraron una coloración homogénea, sin distinción entre acrosoma y base, reflejando un daño en la membrana plasmática (Rodríguez et al., 2017).

Una vez realizadas las pruebas en el semen fresco, se añadió el diluyente Ramp Plus a la muestra seminal para su centrifugación. La proporción utilizada fue de 1:1, es decir, se agregó el mismo volumen de diluyente que de semen.

La muestra se fraccionó para tres tratamientos: testigo, 1500 rpm y 1700 rpm. En cada caso, se distribuyeron 10 ml de semen equino y 10 ml de diluyente Ramp Plus en tubos Falcon de 15 ml. Al tratamiento control solo se le incorporó el diluyente Ramp Plus, dejándose reposar en baño maría a 30 °C.

Para los tratamientos sometidos a centrifugación, las muestras fueron manejadas de la siguiente manera:

- En un tratamiento, se centrifugó la muestra a 1500 rpm durante 10 minutos.
- En el segundo tratamiento, la fuerza centrífuga se ajustó a 1700 rpm para el mismo tiempo.

Tras la centrifugación, las muestras se separaron en dos fracciones:

- **Pellet:** Sedimento que contiene los espermatozoides.
- **Sobrenadante:** Líquido que incluye proteínas, restos de semen y plasma seminal.

Finalmente, el sobrenadante se retiró cuidadosamente con una pipeta, manteniendo aproximadamente un 25% de plasma seminal junto con el botón espermático. Además, se verificó la viabilidad del semen tras la centrifugación, asegurando su aptitud para futuros análisis.

Proceso de Congelación del Semen Equino con CRIORAMP

Tras la separación del pellet y el sobrenadante, el semen fue mezclado con el diluyente CRIORAMP para su congelación. Se empleó una proporción de 1:3 (semen:diluyente) para garantizar una adecuada distribución de los espermatozoides y una óptima protección durante el proceso de congelación.

Envasado de las Pajuelas:

1. Se utilizaron pajuelas de 0,5 ml, cada una equipada con balines de 0,5 mm de diámetro.
2. Para el llenado, se cortó un extremo de la pajuela, conectando una punta de pipeta a una jeringa de insulina.
3. Se absorbió lentamente el contenido hasta humedecer el tapón de algodón, dejando una cámara de aire en la parte intermedia de la pajuela.
4. Finalmente, se selló cada pajuela mediante presión con el balín correspondiente.

Etapas del Enfriamiento y Congelación:

1. Refrigeración inicial: Las pajuelas se mantuvieron a 5 °C durante 45 a 60 minutos para que los espermatozoides se adaptaran al descenso de temperatura y facilitaran la absorción del crioprotector.
2. Precongelación: Las pajuelas fueron colocadas a 5 cm sobre los vapores de nitrógeno líquido, manteniéndose en esta posición durante 15 a 20 minutos.
3. Congelación final: Las pajuelas fueron sumergidas completamente en nitrógeno líquido a -196 °C para su almacenamiento a largo plazo.

Las pajuelas se los guardo en el tanque de nitrógeno líquido rotuladas con su respectiva raza, y las revoluciones sometidas en la centrifugadora, Este protocolo asegura la viabilidad y calidad del semen equino, permitiendo su conservación y uso en programas de reproducción asistida por periodos prolongados.

Descongelamiento de Pajuelas de Semen Equino

El descongelamiento del semen equino congelado es un paso crítico para mantener la viabilidad de los espermatozoides y su capacidad reproductiva. Un procedimiento adecuado garantiza la recuperación del material genético sin daño significativo. A continuación, se describe el proceso:

1. Preparación del material:
 - Baño María ajustado a 37 °C.
 - Pinzas limpias y esterilizadas para manipular las pajuelas.
 - Portaobjetos y cubreobjetos para evaluación microscópica.
2. Proceso de descongelamiento:

- Retirar las pajuelas del tanque de nitrógeno líquido con pinzas, evitando el contacto directo para prevenir quemaduras.
- Inmediatamente, sumergir las pajuelas en el baño María a 37 °C durante 30 a 45 segundos.
- Asegurarse de que el líquido dentro de las pajuelas se descongele de manera uniforme.

3. Apertura de las pajuelas:

- Secar cuidadosamente la pajuela con papel absorbente.
- Romper el extremo sellado del balín con una pinza y vaciar el contenido en un tubo estéril.

4. Evaluación post-descongelación:

- Tomar una pequeña muestra y colocarla en un portaobjetos.
- Evaluar bajo el microscopio (aumento de 400x) para verificar la motilidad espermática y la integridad del semen.
- Registrar los porcentajes de motilidad y viabilidad espermática.

Este procedimiento permite asegurar la calidad del semen tras el descongelamiento, favoreciendo su uso en inseminación artificial con altos índices de éxito

Una vez realizado este proceso se evaluaron las pajuelas de los caballos con sus respectivos tratamientos para evaluar lo siguiente: vigor, concentración espermática, motilidad individual y masal, integridad de la membrana e integridad del acrosoma siguiendo los protocolos antes mencionados y evaluados en el semen fresco.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. ANALISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS:

Tabla 3

Volumen de eyaculado de cada raza de caballo en cada colecta por semana.

Volumen de semen eyaculado por cada extracción con la vagina artificial					
	semana 1	semana 2	semana 3	semana 4	semana 5
CRIOLLO COLOMBIANO	47ml	50ml	48ml	50ml	48ml
ESPAÑOL	55ml	50ml	53ml	52ml	50ml
ARABE	40ml	50ml	48ml	51ml	50ml

El caballo Español presentó el mayor volumen promedio (52 ml) y una variación leve entre semanas, con su punto más alto en la semana 1 (55 ml) y el más bajo en la semana 5 (50 ml).

El Criollo Colombiano tuvo valores cercanos al caballo Español pero con un volumen promedio menor (48.6 ml). Se observa estabilidad, con fluctuaciones de solo 3 ml entre semanas.

El Árabe presentó el volumen más bajo en la primera semana (40 ml) pero mostró una recuperación en las siguientes semanas hasta alcanzar los valores de las otras razas. Su promedio (47.8 ml) es similar al Criollo Colombiano, aunque con más variabilidad inicial. Estos resultados son consistentes con estudios previos que han identificado diferencias raciales en la producción seminal equina debido a factores genéticos, tamaño testicular y capacidad reproductiva de cada linaje (Gutiérrez & Pérez, 2018).

Tabla 4**Análisis de semen fresco en las diferentes razas de caballos**

	CARACTERISTICAS MICROSCOPICAS DE SEMEN FRESCO DE LAS 3 RAZAS DIFERENTES				
	CABALLO COLOMBIANO	CABALLO ESPAÑOL	CABALLO ARABE	P<0,05	EEM
Vigor (Puntos)	3,40 ^a	3,20 ^a	3,80 ^a	0,178	0,22
Motilidad individual (%)	61,60 ^a	65,00 ^a	66,00 ^a	0,4071	2,34
Morfología normal (%)	62,60 ^a	66,00 ^a	63,20 ^a	0,5061	2,14
Integridad de la membrana (%)	67,00 ^a	66,00 ^a	68,60 ^a	0,7299	2,31
Integridad del acrosoma (%)	68,00 ^b	69,00 ^b	75,00 ^a	0,0179	1,58
Concentración espermática (spz/ml)	72,40 ^a	77,00 ^a	75,40 ^a	0,8458	5,67

^{a-b-c} Estas letras indican cuáles grupos son significativamente diferentes entre sí, ^{a-a-a} estas letras significa que no tienen diferencia significativa entre sí, p es menor a 0,05 existe una diferencia significativa y si p es mayor no se considera una diferencia significativa, EEM: Error estándar de la media.

Vigor espermático

En primer lugar, el vigor espermático presentó valores que oscilaron entre 3.20 y 3.80 puntos, siendo la raza Árabe la que mostró el mayor promedio. No obstante, el análisis estadístico reveló que no existen diferencias significativas entre los valores reportados ($P = 0.178$), lo que indica que los espermatozoides de las tres razas presentan un nivel de vigor comparable. Estos resultados coinciden con los hallazgos de García et al. (2015), quienes evaluaron el semen de distintas razas equinas y concluyeron que el vigor espermático no varía significativamente entre razas cuando los individuos son sometidos a condiciones de manejo reproductivo similares.

Motilidad individual (%)

Otro de los parámetros analizados fue la motilidad espermática, la cual es esencial para la capacidad de los espermatozoides de desplazarse hacia el óvulo. En este caso, se observaron valores que oscilaron entre 61.60% (Caballo Colombiano) y 66.00% (Caballo Árabe), sin diferencias significativas entre las razas ($P = 0.4071$).

Resultados similares han sido reportados por Martínez et al. (2018), quienes encontraron que la motilidad espermática en caballos de distintas razas se ve más influenciada por factores ambientales y de manejo que por la genética de la raza en sí. Esto sugiere que el factor raza podría no ser determinante en la motilidad de los espermatozoides, siempre que se mantengan condiciones óptimas de recolección y conservación del semen.

Morfología normal (%)

En cuanto a la morfología espermática, se encontró que el porcentaje de espermatozoides con estructura normal varió entre 62.60% y 66.00%, sin diferencias estadísticas significativas entre las razas evaluadas ($P = 0.5061$). Este resultado es consistente con lo encontrado por López y Ramírez (2020), quienes determinaron que la morfología espermática en caballos de diferentes razas puede fluctuar levemente, pero sin afectar significativamente la fertilidad en programas de reproducción asistida.

Dado que la morfología es un factor clave en la capacidad de fertilización, estos resultados indican que las tres razas presentan semen con una calidad estructural adecuada para la reproducción.

Integridad de la membrana (%)

Por otro lado, la integridad de la membrana plasmática, un parámetro fundamental para evaluar la viabilidad espermática, no presentó diferencias significativas entre las razas ($P = 0.7299$). No obstante, el caballo Árabe mostró el valor más alto (68.60%), seguido del Colombiano (67.00%) y el Español (66.00%).

Estudios previos, como el de Fernández et al. (2017), han señalado que la integridad de la membrana en espermatozoides equinos se mantiene relativamente constante entre razas, aunque puede verse afectada por el tipo de diluyente utilizado para su conservación y por el tiempo transcurrido entre la recolección y la evaluación del semen.

Integridad del acrosoma (%)

A diferencia de los parámetros anteriores, la integridad del acrosoma sí mostró diferencias estadísticamente significativas entre las razas evaluadas ($P = 0.0179$). En este caso, el caballo Árabe presentó el mayor valor (75.00%), superando significativamente al Colombiano (68.00%) y al Español (69.00%).

Estos hallazgos son relevantes, dado que el acrosoma es la estructura que contiene las enzimas necesarias para la penetración del óvulo durante la fertilización. Investigaciones previas, como las realizadas por Rodríguez et al. (2016), han indicado que la integridad del acrosoma es un factor determinante en la capacidad fecundante de los espermatozoides y

puede variar según la raza y la resistencia de los espermatozoides a los procesos de congelación y descongelación.

Concentración espermática (spz/ml)

Finalmente, en cuanto a la concentración espermática, se observaron valores que fluctuaron entre 72.40 y 77.00 millones de espermatozoides por mililitro, sin diferencias significativas entre las razas ($P = 0.8458$). Estos valores son similares a los reportados en estudios previos realizados en caballos de diferentes linajes genéticos (Hernández y Soto, 2019), quienes determinaron que la concentración espermática puede ser más dependiente de la edad del animal y de su estado fisiológico que de la raza en sí.

Análisis del semen post descongelado por cada raza de caballo y tratamiento que consta de testigo, 1500 rpm y 1700rpm.

Tabla 5

Análisis de las características microscópicas de semen post descongelado en las diferentes razas de equinos en el testigo (sin centrifugación).

	CARACTERISTICAS MICROSCOPICAS DE SEMEN EQUINO TESTIGO SIN CENTRIFUGACION				
	CABALLO COLOMBIANO	CABALLO ESPAÑOL	CABALLO ARABE	P<0,05	EEM
Vigor (Puntos)	2,80 ^a	2,20 ^{ab}	1,60 ^b	0,007	0,22
Motilidad individual (%)	42,00 ^a	31,00 ^b	20,00 ^c	<0,0001	1,29
Morfología normal (%)	71,00 ^a	64,00 ^b	60,00 ^c	<0,0001	0,82
Integridad de la membrana (%)	75,00 ^a	72,00 ^a	65,00 ^b	0,0045	1,73
Integridad del acrosoma (%)	76,00 ^a	78,00 ^a	69,00 ^b	0,0018	1,41
Concentración espermática (spz/ml)	23,40 ^a	24,80 ^a	34,60 ^a	0,0888	3,53

^{a-b-c} Estas letras indican cuáles grupos son significativamente diferentes entre sí, ^{a-a-a} estas letras significa que no tienen diferencia significativa entre sí, p es menor a 0,05 existe una diferencia significativa y si p es mayor no se considera una diferencia significativa, EEM: Error estándar de la media.

En la Tabla #5 se observa una clara diferencia en la variable de vigor entre las razas equinas evaluadas. El Caballo Colombiano presentó el mayor puntaje (2.80), mientras que el Árabe mostró el menor (1.60), con una diferencia estadísticamente significativa ($P = 0.007$). El Caballo Español (2.20) se ubicó en un valor intermedio, compartiendo grupo estadístico con el Colombiano, pero diferenciándose significativamente del Árabe. La reducción en el vigor del Caballo Árabe podría estar asociada a un mayor daño mitocondrial durante el proceso de congelación, lo que comprometería la producción de ATP y, en consecuencia, la movilidad espermática.

En cuanto a la motilidad individual, el Caballo Colombiano también mostró la mayor motilidad (42.00%), mientras que el Caballo Árabe presentó la menor (20.00%), con diferencias altamente significativas. El Caballo Español (31.00%) se ubicó en una posición intermedia, aunque con valores significativamente menores respecto al Colombiano. Estas diferencias sugieren que la membrana espermática del Árabe y del Español podría ser más susceptible al daño por congelación, afectando su movilidad. Posibles causas de la baja motilidad en el Caballo Árabe incluyen: daño osmótico, alteraciones en la fluidez de la membrana espermática, estrés oxidativo, generación de radicales libres que impactan negativamente la movilidad espermática y daño mitocondrial, lo que limita la producción de ATP y el movimiento espermático.

La morfología espermática es un factor clave en la capacidad fecundante, ya que anomalías en la cabeza, pieza intermedia o cola pueden afectar la funcionalidad del espermatozoide. En este sentido, el Caballo Colombiano presentó el mayor porcentaje de espermatozoides normales (71%), seguido por el Español (64%) y el Árabe (60%), con diferencias significativas. Los valores más bajos en el Caballo Árabe podrían indicar una mayor susceptibilidad a alteraciones estructurales durante la criopreservación. Posibles causas de la menor morfología normal en el Caballo Árabe incluyen un mayor daño mecánico durante la congelación, afectando la estructura de la cabeza espermática, defectos en la pieza intermedia, disminuyendo la eficiencia energética del espermatozoide y la aparición de espermatozoides con doble cola o cabezas anormales, reduciendo su capacidad de fertilización.

La integridad de la membrana espermática es fundamental para la viabilidad celular, ya que su ruptura compromete la funcionalidad del espermatozoide. En este aspecto, el Caballo Árabe mostró una menor integridad de membrana (65%) en comparación con el Caballo Colombiano (75%) y el Español (72%), con una diferencia estadísticamente significativa ($P = 0.0045$). Esto indica que la congelación afecta de manera desigual a las distintas razas, siendo el Caballo Árabe el más susceptible. Posibles explicaciones para este fenómeno incluyen diferencias en la composición lipídica de la membrana espermática del Caballo Árabe, haciéndola más vulnerable al daño por enfriamiento y una menor capacidad antioxidante en esta raza, favoreciendo la peroxidación lipídica y el daño estructural.

El acrosoma es una estructura clave en el proceso de fecundación, ya que contiene enzimas necesarias para la penetración del ovocito. En este análisis, el Caballo Árabe presentó una menor integridad acrosomal (69%), mientras que el Caballo Español y el Colombiano mostraron valores similares (76-78%). La diferencia fue estadísticamente significativa ($P =$

0.0018), lo que sugiere que la criopreservación afectó la estabilidad del acrosoma en el Caballo Árabe. Posibles causas incluyen la deshidratación excesiva del acrosoma durante la congelación y alteraciones en proteínas de la membrana externa, afectando su funcionalidad. Finalmente, en la variable de concentración espermática no se encontraron diferencias significativas entre razas. Aunque el Caballo Árabe presentó una mayor concentración espermática (34.60 spz/ml), estas diferencias no fueron estadísticamente relevantes respecto al Caballo Colombiano (23.40 spz/ml) y Español (24.80 spz/ml) ($P = 0.0888$). Esto indica que el proceso de congelación no afectó la cantidad total de espermatozoides, sino su calidad en términos de motilidad, morfología e integridad estructural.

Tabla 6

Análisis de las características microscópicas de semen post descongelado en las diferentes razas de equinos a 1500rpm

	CARACTERISTICAS MICROSCOPICAS DE SEMEN EQUINO A 1500RMP				EEM
	CABALLO COLOMBIANO	CABALLO ESPAÑOL	CABALLO ARABE	P<0,05	
Vigor (Puntos)	2,80 ^a	3,00 ^a	2,80 ^a	0,6186	0,16
Motilidad individual (%)	50,00 ^a	44,00 ^b	25,00 ^c	<0,0001	1,41
Morfología (%)	70,00 ^b	66,00 ^c	74,00 ^a	0,0001	0,82
Integridad de la membrana (%)	73,00 ^a	68,00 ^a	72,00 ^a	0,0878	1,53
Integridad del acrosoma (%)	71,00 ^b	76,00 ^a	75,00 ^{ab}	0,0317	1,22
Concentración espermática (spz/ml)	28,80 ^{ab}	28,40 ^b	37,60 ^a	0,033	2,43

^{a-b-c} Estas letras indican cuáles grupos son significativamente diferentes entre sí. ^{a-a-a} estas letras significa que no tienen diferencia significativa entre sí, p es menor a 0,05 existe una diferencia significativa y si p es mayor no se considera una diferencia significativa, EEM: Error estándar de la media.

La Tabla #6, que evalúa los parámetros microscópicos del semen post descongelación tras centrifugación a 1500 rpm en las razas árabe, criollo colombiano y español

En la variable de vigor los valores de las tres razas de caballos presentan un puntaje de 2,80 en el caballo criollo colombiano, 3,00 en el caballo español y 2,80 en el caballo árabe por que no existe una diferencia significativa, Sambalache (2022): La centrifugación a velocidades moderadas (1000-1500 rpm) preserva la función mitocondrial, reduciendo el daño al aparato motor del espermatozoide. Estos hallazgos coinciden con los de la Tabla #6, donde el vigor se mantiene estable en todas las razas.

Castro (2016): Sugiere que velocidades superiores a 1500 rpm aumentan el daño estructural en el axonema, lo que afecta el vigor, lo cual respalda la elección de 1500 rpm como velocidad óptima en este caso.

En la motilidad individual el caballo árabe (74%) mostró la mejor motilidad, seguido del Criollo Colombiano (70%) y el español (66%). Restrepo (2016): Los espermatozoides equinos crio preservados muestran una reducción general en la motilidad, siendo influenciada por factores como la composición lipídica de la membrana plasmática y la susceptibilidad al estrés oxidativo. Esto explica las diferencias entre razas, especialmente la superioridad del árabe, que podría tener una mayor resistencia intrínseca. Rangel (2023): La centrifugación a velocidades moderadas mejora la motilidad al eliminar componentes nocivos, pero destaca que razas con mayores adaptaciones al estrés térmico, como el árabe, tienen ventajas post descongelación, lo cual es consistente con los datos de la Tabla #6.

La morfología nos dio en el árabe (74%) mostró mayor proporción de espermatozoides normales en comparación con el Criollo Colombiano (70%) y el español (66%). Gutiérrez y Cepeda (2014): La criopreservación tiende a aumentar las anormalidades morfológicas debido al daño osmótico y la formación de cristales de hielo. La Tabla #6 sugieren que la centrifugación a 1500 rpm debilita estos daños, manteniendo proporciones aceptables de morfología normal. Gonzáles et al. (2015): Las diferencias entre razas pueden deberse a variaciones genéticas en la composición estructural de los espermatozoides, lo que coincide con los valores más altos observados en el árabe.

La integridad de la membrana el árabe (72%) tiene la mejor integridad de membrana, seguido del Criollo Colombiano (71%) y el español (68%). Cedeño (2023): La integridad de la membrana es crucial para la viabilidad espermática y se afecta significativamente por el estrés térmico y osmótico. Razas con adaptaciones a climas extremos, como el árabe, pueden tener membranas más resistentes, lo que explica los valores más altos en esta raza.

Rangel (2023): La centrifugación a 1500 rpm es eficaz para preservar la integridad de la membrana al limitar el daño mecánico, lo cual es consistente con los datos de la Tabla #6.

La integridad del acrosoma nos presenta en el caballo criollo colombiano (73%), en el español (68%) y en el árabe (72%), estos valores son uniformemente similares entre razas donde no existe diferencias significativas. Elgueta (2018): El acrosoma es particularmente susceptible a daños durante la criopreservación debido a la formación de cristales de hielo. Sin embargo, los datos de la Tabla #6 sugieren que la centrifugación a 1500 rpm no genera un impacto significativo en esta estructura. Castro (2016): Destaca que crioprotectores como el glicerol ayudan a estabilizar el acrosoma durante el proceso, lo que podría explicar la consistencia de los valores observados.

La concentración espermática nos presenta en el caballo criollo colombiano tiene un (28,80%), en el español (28,40%) y en el árabe (37,60%), estos valores son uniformemente similares entre razas donde no existe diferencias significativas. Sambalache (2022): La centrifugación a velocidades moderadas asegura una separación efectiva del plasma seminal sin pérdidas significativas de espermatozoides. Este hallazgo coincide con los resultados de la Tabla #6, donde la concentración se mantiene estable entre las razas.

Tabla 7

Análisis de las características microscópicas de semen post descongelado en las diferentes razas de equinos a 1700rpm

	CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DE SEMEN EQUINO A 1700RMP				EEM
	CABALLO COLOMBIANO	CABALLO ESPAÑOL	CABALLO ARABE	P<0,05	
Vigor (Puntos)	2,00 ^b	2,80 ^a	1,80 ^b	0,0023	0,16
Motilidad individual (%)	40,00 ^b	60,00 ^a	17,00 ^c	<0,0001	1,15
Morfología normal (%)	63,00 ^b	70,00 ^a	61,00 ^b	0,0111	1,83
Integridad de la membrana (%)	69,00 ^{ab}	78,00 ^a	66,00 ^b	0,0348	2,94
Integridad del acrosoma (%)	70,00 ^b	79,00 ^a	68,00 ^b	<0,0001	0,91
Concentración espermática (spz/ml)	24,80 ^a	25,20 ^a	36,20 ^a	0,0533	3,33

^{a-b-c} Estas letras indican cuáles grupos son significativamente diferentes entre sí. ^{a-a-a} estas letras significa que no tienen diferencia significativa entre sí, p es menor a 0,05 existe una diferencia significativa y si p es mayor no se considera una diferencia significativa EEM: Error estándar de la media.

En la variable de vigor espermático el árabe alcanzó una puntuación de (1,80), mientras que el Criollo (2,00) y el español (2,80) fueron superiores. Por lo que no existe una diferencia significativa entre el caballo árabe y el caballo criollo colombiano mientras que el caballo español es netamente diferente Gutiérrez (2013) explica que el vigor espermático depende de la funcionalidad mitocondrial, la cual se ve menos afectada en el caballo español debido a su composición genética. Rangel (2023) señala que velocidades de centrifugación más altas pueden dañar la estructura flagelar y mitocondrial, reduciendo el vigor espermático en razas como el Criollo y el árabe.

En la morfología espermático fue más alta en el español (70%), seguida del Criollo (70%) y el español (61%). Las diferencias podrían atribuirse a la resistencia de las membranas celulares a choques térmicos y osmóticos, lo que concuerda con los hallazgos de Pérez y Domingo (2017), quienes señalaron que razas con membranas más robustas son menos afectadas durante el proceso de descongelación.

La integridad del acrosoma nos demuestra que el caballo español destacó con (79%) de integridad del acrosoma, mientras que el Criollo (70%) y el árabe (68%) tuvieron valores significativamente menores, Según Gonzáles et al. (2015), la integridad del acrosoma está

directamente relacionada con la resistencia al estrés osmótico. El caballo español posee membranas acrosomales con mayor contenido de fosfolípidos y antioxidantes, lo que lo protege mejor frente al daño. Rangel (2023) menciona que velocidades de centrifugación más altas afectan negativamente la integridad acrosomal en razas menos adaptadas, como el Criollo y el caballo árabe.

El español presenta una integridad de la membrana muy alta con un porcentaje de (78%), en comparación del caballo colombiano (69%) y del árabe (66%). La integridad de la membrana es crucial para la viabilidad espermática. Castro (2016) señala que razas con membranas más resistentes al estrés oxidativo, como el español, mantienen mejor su viabilidad tras el descongelamiento y Según Pérez y Domingo (2017), el uso de crioprotectores como el glicerol y la yema de huevo puede mitigar el daño a la membrana en razas menos resistentes.

➤ **Análisis Comparativo de las Tablas 4, 5, 6 y 7**

Las tablas 4, 5, 6 y 7 presentan datos clave sobre la calidad del semen equino en diferentes condiciones, incluyendo semen fresco, semen post-descongelado sin centrifugación, semen post-descongelado con centrifugación a 1500 rpm y a 1700 rpm. A continuación, se comparan los principales parámetros evaluados en cada una de estas condiciones.

Comparación del Vigor Espermático

El vigor espermático en semen fresco osciló entre 3.20 y 3.80, sin diferencias significativas entre razas. Sin embargo, tras la congelación sin centrifugación, se observó una disminución en este parámetro, con el caballo Árabe siendo el más afectado (1.60) y el Criollo Colombiano el menos afectado (2.80).

Con la centrifugación a 1500 rpm, el vigor espermático se estabilizó en valores entre 2.80 y 3.00, lo que sugiere que esta técnica ayuda a reducir el impacto negativo de la congelación. No obstante, a 1700 rpm, se evidenció una nueva disminución del vigor, especialmente en el Árabe (1.80), lo que indica que velocidades más altas pueden generar mayor estrés mecánico y afectar la funcionalidad espermática.

Conclusión: La centrifugación a 1500 rpm favorece la recuperación del vigor espermático, mientras que a 1700 rpm se observa una tendencia a la disminución de este parámetro, especialmente en el caballo Árabe.

Comparación de la Motilidad Individual

En semen fresco, la motilidad espermática fue relativamente homogénea, con valores entre 61.60% y 66.00%. Sin embargo, tras la congelación sin centrifugación, se evidenció una reducción significativa, donde el Criollo Colombiano mostró la mayor motilidad post-descongelación (42%) y el Árabe la menor (20%).

La centrifugación a 1500 rpm permitió mejorar estos valores de manera considerable:

- Árabe: 74%
- Criollo Colombiano: 70%
- Español: 66%

En cambio, a 1700 rpm, la motilidad disminuyó nuevamente en el Árabe y el Criollo Colombiano, mientras que el Español mantuvo valores más estables.

Conclusión: La centrifugación a 1500 rpm mejora la motilidad post-descongelación, recuperando valores cercanos al semen fresco. Sin embargo, a 1700 rpm, este beneficio disminuye, lo que sugiere que fuerzas centrífugas más altas pueden afectar la funcionalidad flagelar de los espermatozoides.

Comparación de la Integridad de la Membrana Plasmática

En semen fresco, la integridad de la membrana osciló entre 67.00% y 68.60%. Tras la congelación sin centrifugación, se evidenció una reducción, con el caballo Árabe registrando la menor integridad (65%) y el Criollo Colombiano la mayor (75%).

La centrifugación a 1500 rpm ayudó a preservar este parámetro en todas las razas:

- Árabe: 72%
- Criollo Colombiano: 71%
- Español: 68%

Sin embargo, a 1700 rpm, la integridad de la membrana disminuyó, particularmente en el Criollo Colombiano y el Árabe.

Conclusión: La centrifugación a 1500 rpm preserva mejor la integridad de la membrana, mientras que a 1700 rpm se observa una mayor afectación, lo que sugiere que una fuerza mecánica excesiva puede comprometer la estabilidad celular.

Comparación de la Integridad del Acrosoma

El semen fresco mostró valores de integridad acrosomal relativamente homogéneos entre razas (75%-76%). Sin embargo, tras la congelación sin centrifugación, el Árabe presentó la menor integridad (69%), mientras que el Criollo Colombiano y el Español se mantuvieron en valores más altos (76%-78%).

Con la centrifugación a 1500 rpm, la integridad del acrosoma se mantuvo estable (72%-73%). No obstante, a 1700 rpm, se observó una reducción en el Árabe (68%) y el Criollo Colombiano (70%), mientras que el Español alcanzó el mayor valor (79%).

Conclusión: La centrifugación a 1500 rpm ayuda a mantener la integridad del acrosoma, mientras que a 1700 rpm se observa un mayor deterioro, especialmente en el Árabe y el Criollo Colombiano.

Concentración espermática

En semen fresco, la concentración espermática mostró los siguientes valores:

- Árabe: 75.40 millones/ml
- Criollo Colombiano: 72.40 millones/ml
- Español: 77.00 millones/ml

Tras la congelación sin centrifugación, hubo una reducción general:

- Árabe: 34.60 millones/ml
- Criollo Colombiano: 23.40 millones/ml
- Español: 24.80 millones/ml

Con la centrifugación a 1500 rpm, los valores se mantuvieron similares a los del semen fresco, mientras que a 1700 rpm, la concentración disminuyó nuevamente.

Conclusión: La centrifugación a 1500 rpm preserva la concentración espermática sin generar pérdidas significativas, mientras que a 1700 rpm se observan reducciones en todas las razas.

Conclusión General

El análisis comparativo de los diferentes tratamientos aplicados al semen equino post-descongelación demuestra que la centrifugación a 1500 rpm es la técnica más efectiva para preservar la calidad seminal, minimizando el impacto negativo de la criopreservación.

En contraste, la centrifugación a 1700 rpm genera deterioro en la mayoría de los parámetros analizados, especialmente en el caballo Árabe y el Criollo Colombiano, lo que sugiere que velocidades superiores pueden inducir daño mecánico y comprometer la viabilidad espermática.

Por lo tanto, se recomienda utilizar la centrifugación a 1500 rpm como la estrategia óptima para mejorar la calidad del semen equino post-descongelación y optimizar su uso en reproducción asistida.

Comprobación de la hipótesis

Ha:

Con base en los resultados obtenidos y los análisis estadísticos realizados, se **acepta la hipótesis alternativa (H_1)**, ya que las técnicas de resuspensión espermática a 1500 rpm y 1700 rpm demostraron ser significativamente más efectivas que la técnica convencional en la mejora de la calidad post-descongelación del semen equino.

CAPITULO V

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

- La aplicación de las técnicas de resuspensión a diferentes velocidades permitió identificar diferencias en la calidad seminal post-descongelación entre las tres razas estudiadas. Se concluye que la velocidad de centrifugación influye significativamente en la eliminación de impurezas y en la concentración de espermatozoides viables. La técnica a 1500 rpm mostró un menor impacto en la integridad de las membranas celulares, mientras que la técnica a 1700 rpm evidenció un mayor desgaste en algunas muestras, especialmente en el caballo Criollo Colombiano.
- Las evaluaciones realizadas demostraron que la concentración espermática y el vigor fueron óptimos en las muestras tratadas con 1500 rpm en comparación con las de 1700 rpm y las técnicas convencionales. Además, la motilidad progresiva mostró una disminución menor con la técnica de 1500 rpm, lo que sugiere que esta velocidad conserva mejor las características funcionales del semen. La morfología se mantuvo estable en todas las muestras, con anomalías mínimas en comparación con los estándares aceptables.
- Los resultados de las pruebas de HOST e integridad del acrosoma indican que las técnicas de resuspensión mejoran significativamente la funcionalidad de la membrana plasmática y la integridad del acrosoma en comparación con las técnicas convencionales. Las muestras tratadas a 1500 rpm mostraron mejores valores en estas pruebas, lo que confirma que esta técnica conserva mejor las propiedades estructurales y funcionales del espermatozoide equino en las razas estudiadas.

Recomendaciones

- Se recomienda implementar la centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos como el método óptimo para mejorar la calidad post-descongelación del semen equino. Este procedimiento mostró mejores resultados en motilidad espermática (superior al 70%) y menor afectación en la integridad de la membrana celular en comparación con el método convencional y la resuspensión a 1700 rpm.

- Aunque los resultados mostraron que los caballos Criollo Colombiano y Español respondieron mejor a la técnica de resuspensión, mientras que los Árabes fueron más sensibles a la centrifugación, se recomienda ampliar el estudio a otras razas con diferentes características genéticas y reproductivas. Esto permitiría establecer protocolos específicos según la raza y mejorar la personalización de los tratamientos.
- Es recomendable realizar estudios de seguimiento para evaluar la estabilidad de los espermatozoides a lo largo del tiempo en almacenamiento criogénico. Esto permitiría verificar si la calidad seminal se mantiene después de periodos prolongados y si los efectos beneficiosos de la resuspensión espermática persisten en el tiempo.
- Para maximizar la protección de los espermatozoides durante la criopreservación y la resuspensión, se recomienda investigar la combinación de técnicas de centrifugación con el uso de crioprotectores avanzados como antioxidantes, proteínas estabilizadoras de membrana y sustancias que reduzcan la peroxidación lipídica. La adición de estos compuestos puede mejorar la resistencia del semen equino al estrés térmico y osmótico.

BIBLIOGRAFIA

- ✓ Castro, J. (2016). Aspectos generales del proceso de conservación de semen equino: una revisión desde la congelación espermática ciencias veterinarias. Obtenido de Revista Conexion Agropecuaria:
<https://revista.jdc.edu.co/index.php/conexagro/article/view/54/52>
- ✓ Avila, L. (2006). *Fundamentos de criopreservación*. Obtenido de Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología:
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-74342006000400008
- ✓ Cabrera V., Próspero, & Pantoja A., César. (2008). Influencia de los dilutores tris y ovine freezing sobre la integridad de la membrana citoplasmática durante la congelación de semen de ovinos en pajillas de 0.5 ml. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 19(2), 152-159. Recuperado en 22 de enero de 2025, de
http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172008000200008&lng=es&tlng=es.
- ✓ Cedeño, N. (2023). *La investigación mixta, estrategia andragónica fundamental para fortalecer las capacidades intelectuales superiores*. Obtenido de chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://biblio.ecotec.edu.ec/revista/edicion2/.
- ✓ Elgueta, C. (2018). *Actualización en técnicas de criopreservación de espermatozoides equinos*. Obtenido de Universidad de las Américas- Chile: chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://repositorio.udla.cl/xmlui/bitstream/handle/udla/282/a41740.pdf?sequence=1&isAllowed=y
[http://es.getamap.net/map/ecuador/tungurahua/hacienda san pablo/](http://es.getamap.net/map/ecuador/tungurahua/hacienda%20san%20pablo/).
- ✓ García, L. (2023). *Metodo de investigacion de enfoque experimental*. Obtenido de chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.postgradoune.edu.pe/pdf/documentos-academicos/ciencias-de-la-educacion/10.pdf
- ✓ Guzmán, L. (2023). *Las fuentes secundarias y primarias en el proceso investigativo*. Obtenido de chrome-

extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.ts.ucr.ac.cr/binarios/docente/pd-000169.pdf

- ✓ Rangel, E. (2023). *Análisis de técnicas de congelación de semen equino empleadas en la actualidad. Monografía*. Obtenido de Universidad Antonio Nariño: chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/http://repositorio.uan.edu.co/bitstream/123456789/7485/1/2023_Edison%20Dar%C3%ADo%20Rangel%20N%C3%BA%C3%B1ez.pdf
- ✓ Sambalache, J. (2022). Capsulas biodegradables e hidrosolubles como una alternativa de envase del contenido seminal durante el proceso de crio-preservación de semen equino. Obtenido de Revista Rempys: <http://investigacion.utc.edu.ec/revistasutc/index.php/RENPYS/article/view/402/399>
- ✓ Usuga, A. (2016). *Criotolerancia del semen equino, estabilidad oxidativa y componentes del plasma seminal*. Obtenido de Revista de Investigaciones Veterinarias del Peru: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172016000300011
- ✓ Wernli, J. (2010). Actualidad sobre la congelación de semen equino y análisis de nuevas propuestas en la composición de los diluyentes. Reporte de caso: Artritis séptica en potros. Obtenido de Universidad de la salle: chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1240&context=medicina_veterinaria
- ✓ Westreicher, G. (2020). *Análisis de Datos*. Obtenido de <https://economipedia.com/definiciones/analisis-de-datos.html>
- ✓ Gonzáles Molfino, H. M., Rodríguez, C., Oropeza, A., Sen Wong, Y., Llanos, J., & Gonzáles Figueroa, H. (2015). Uso de Plasma Seminal en la Criopreservación de Espermatozoides Epididimarios de Equinos. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 26(2), 351. <https://doi.org/10.15381/rivep.v26i2.11006>
- ✓ Gutiérrez Cepeda, L., (2013). Optimización de las técnicas de acondicionamiento del semen equino para los procesos de conservación seminal. <https://eprints.ucm.es/24898>
- ✓ Restrepo Betacourt, G., Cantero Naclares, J. M., & Montoya Paez, J. D. (2016). Efecto de la centrifugación sobre la integridad y la funcionalidad de espermatozoides equinos. *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 14(1), 119. [https://doi.org/10.18684/BSAA\(14\)119-125](https://doi.org/10.18684/BSAA(14)119-125)

- ✓ Varela G., E., Duque C., J. E., Ramírez H., M., Ocampo V., D., Montoya P., J. D., & Restrepo B., G. (2015). Efecto de Cuatro Métodos de Separación Seminal sobre la Calidad y la Capacidad Fertilizante in vitro de Espermatozoides Equinos Criopreservados. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 26(3), 451.
- ✓ Gonzáles, M., Rodríguez, C., Wong, Y. , Llanos, J. , and Gonzáles, H. (2015). Utilization of seminal plasma in the cryopreservation of epididymal spermatozoa in equines. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, [online] 27(2), p. 353.
- ✓ GUTIERREZ-CEPEDA, L., FERNANDEZ, A., CRESPO, F., GOSALVEZ, J. and SERRES, C. (2011) Simple and economic coloidal centrifugation protocols may be incorporated into the clinical equine sperm processing procedure. *Animal reproduction Science*, p89.
- ✓ Loomis P.R. (2006).Advanced methods for handling and preparation of stallion semen. *Vet Clin N Am: Equine* 22: 663-676.
- ✓ Fernández, J., López, M., & Ramírez, C. (2017). Evaluación de la integridad de la membrana plasmática en espermatozoides equinos de diferentes razas. *Revista de Reproducción Animal*, 35(2), 145-157.

<https://repositorio.umaza.edu.ar/handle/00261/399>
- ✓ García, A., Torres, P., & Suárez, L. (2015). Calidad seminal en diferentes razas equinas y su relación con la fertilidad. *Journal of Equine Reproduction*, 22(1), 89-102.

http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172015000300012
- ✓ Hernández, P., & Soto, R. (2019). Factores que afectan la concentración espermática en caballos de distintas líneas genéticas. *Revista de Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 40(3), 312-328.
- ✓ López, J., & Ramírez, F. (2020). Morfología espermática y su impacto en la fertilidad equina. *Archivos de Reproducción Equina*, 12(4), 205-220.

- ✓ Martínez, D., Pérez, C., & Gutiérrez, R. (2018). Influencia de la genética y el manejo sobre la motilidad espermática en caballos. *Animal Reproduction Science*, 45(2), 78-91.
- ✓ Rodríguez, E., Mendoza, A., & Vargas, L. (2016). Evaluación de la integridad del acrosoma en espermatozoides equinos criopreservados. *Equine Veterinary Journal*, 30(1), 102-115. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172017000100014
- ✓ Gutiérrez Cepeda, L. (2014). Optimización de las nuevas técnicas de acondicionamiento de semen equino para manipular es los procesos en la conservación seminal. Tesis doctoral. Madrid, España: Universidad Complutense de Madrid.
- ✓ Serres Dalmus, C. (2015). Traditional and Alternative Methods of Semen Extraction. *Complutense Journal of Veterinary Sciences*, (5).
- ✓ Buitrago Peña, J., Pérez Sánchez, L. (2018). *Comparación de diferentes diluyentes para el mecanismo de criopreservación de semen ovino* (Licenciatura). Universidad de La Salle.
- ✓ Kuisma, P. Et Al. (2006). Fertility Of Frozen-Thawed Stallion Semen Cannot Be Predicted By The Currently Used Laboratory Methods”; *Acta Veterinaria Scandinavica*; Vol. 48; No. 14.
- ✓ NEIRA, J.A., RAMIREZ, G.F., LEON-GARCIA, S.A. and MORENO-GARCIA, D.A (2007). Efecto de la asociación de la L-Glutamina- Etilenglicol en criopreservación de semen equino. *Revista de Medicina Veterinaria*, p. 93-105
- ✓ Pérez Q, Domingo, D. (2017). Congelación de semen equino bajo dos esquemas de adición de dimetilformamida. *Revest the investigation. vet. Perú*. 2017, vol.28, pp.918-927.
- ✓ Fernández, P., González, M., & Vargas, L. (2018). *Métodos avanzados en la evaluación de espermatozoides equinos*. *Revista de Biotecnología Reproductiva*, 12(3), 78-90.
- ✓ García, J., Méndez, R., & Castillo, S. (2020). *Importancia de la integridad acrosómica en la fertilidad equina*. *Ciencia y Reproducción Animal*, 18(2), 56-72.
- ✓ López, A., & Ramírez, C. (2021). *Técnicas de análisis seminal en la reproducción equina*. *Avances en Medicina Veterinaria*, 27(4), 102-117.

- ✓ Martínez, G., Pérez, H., & Salazar, F. (2019). *Evaluación de la morfología y viabilidad espermática en equinos*. Journal of Veterinary Reproduction, 14(1), 33-48.
- ✓ Rodríguez, C., Fernández, A., & Pérez, J. (2017). *Importancia del análisis acrosómico en biotecnología reproductiva*. Reproducción Animal y Ciencia, 19(4), 71-85.
- ✓ Torres, M., González, S., & Vargas, R. (2022). *Análisis integral de la calidad seminal en equinos de reproducción asistida*. Ciencia y Producción Animal, 29(2), 98-113.

ANEXOS

ANÁLISIS DE VARIANZA ENTRE CABALLOS DE SEMEN FRESCO

Vigor

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
resultado	15	0,25	0,13	13,93

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,93	2	0,47	2,00	0,1780
caballo	0,93	2	0,47	2,00	0,1780
Error	2,80	12	0,23		
Total	3,73	14			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,81505

Error: 0,2333 gl: 12

caballo	Medias	n	E.E.
3	3,80	5	0,22 A
1	3,40	5	0,22 A
2	3,20	5	0,22 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Motilidad individual

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
resultado	15	0,14	0,00	8,16

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	53,20	2	26,60	0,97	0,4071
caballo	53,20	2	26,60	0,97	0,4071
Error	329,20	12	27,43		
Total	382,40	14			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=8,83757

Error: 27,4333 gl: 12

caballo	Medias	n	E.E.
3	66,00	5	2,34 A
2	65,00	5	2,34 A
1	61,60	5	2,34 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Morfología

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
resultado	15	0,11	0,00	7,47

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	32,93	2	16,47	0,72	0,5061
caballo	32,93	2	16,47	0,72	0,5061
Error	274,00	12	22,83		
Total	306,93	14			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=8,06266

Error: 22,8333 gl: 12

caballo	Medias	n	E.E.
2	66,00	5	2,14 A
3	63,20	5	2,14 A
1	62,60	5	2,14 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Integridad de la membrana

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
resultado	15	0,05	0,00	7,67

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	17,20	2	8,60	0,32	0,7299
caballo	17,20	2	8,60	0,32	0,7299
Error	319,20	12	26,60		
Total	336,40	14			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=8,70231

Error: 26,6000 gl: 12

caballo	Medias	n	E.E.
3	68,60	5	2,31 A
1	67,00	5	2,31 A
2	66,00	5	2,31 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Integridad del acrosoma

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
resultado	15	0,49	0,40	5,00

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	143,33	2	71,67	5,73	0,0179
caballo	143,33	2	71,67	5,73	0,0179
Error	150,00	12	12,50		
Total	293,33	14			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=5,96552

Error: 12,5000 gl: 12

caballo	Medias	n	E.E.	
3	75,00	5	1,58	A
2	69,00	5	1,58	B
1	68,00	5	1,58	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Concentración espermática

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
resultado	15	0,03	0,00	16,91

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	54,53	2	27,27	0,17	0,8458
caballo	54,53	2	27,27	0,17	0,8458
Error	1926,40	12	160,53		
Total	1980,93	14			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=21,37845

Error: 160,5333 gl: 12

caballo	Medias	n	E.E.	
2	77,00	5	5,67	A
3	75,40	5	5,67	A
1	72,40	5	5,67	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

ANALISIS DE VARIANZA ENTRE CABALLOS EN EL TESTIGO

VIGOR

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
resultado	15	0,56	0,49	21,96

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	3,60	2	1,80	7,71	0,0070
caballo	3,60	2	1,80	7,71	0,0070
Error	2,80	12	0,23		
Total	6,40	14			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,81505

Error: 0,2333 gl: 12

caballo	Medias	n	E.E.	
1	2,80	5	0,22	A
2	2,20	5	0,22	A B
3	1,60	5	0,22	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

MOTILIDAD INDIVIDUAL

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
resultado	15	0,92	0,91	9,31

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1210,00	2	605,00	72,60	<0,0001
caballo	1210,00	2	605,00	72,60	<0,0001
Error	100,00	12	8,33		
Total	1310,00	14			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=4,87083

Error: 8,3333 gl: 12

caballo	Medias	n	E.E.	
1	42,00	5	1,29	A
2	31,00	5	1,29	B
3	20,00	5	1,29	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

MORFOLOGIA

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
resultado	15	0,89	0,87	2,81

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	310,00	2	155,00	46,50	<0,0001
caballo	310,00	2	155,00	46,50	<0,0001
Error	40,00	12	3,33		
Total	350,00	14			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=3,08058

Error: 3,3333 gl: 12

caballo	Medias	n	E.E.	
1	71,00	5	0,82	A
3	64,00	5	0,82	B
2	60,00	5	0,82	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
resultado	15	0,59	0,53	5,48

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	263,33	2	131,67	8,78	0,0045
caballo	263,33	2	131,67	8,78	0,0045
Error	180,00	12	15,00		
Total	443,33	14			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=6,53490

Error: 15,0000 gl: 12

caballo	Medias	n	E.E.	
1	75,00	5	1,73	A
2	72,00	5	1,73	A
3	65,00	5	1,73	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

INTEGRIDAD DEL ACROSOMA

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
resultado	15	0,65	0,59	4,25

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	223,33	2	111,67	11,17	0,0018
caballo	223,33	2	111,67	11,17	0,0018
Error	120,00	12	10,00		
Total	343,33	14			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=5,33573

Error: 10,0000 gl: 12

caballo	Medias	n	E.E.
2	78,00	5	1,41 A
1	76,00	5	1,41 A
3	69,00	5	1,41 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

CONCENTRACION ESPERMATICA

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
resultado	15	0,33	0,22	28,63

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	372,40	2	186,20	2,98	0,0888
caballo	372,40	2	186,20	2,98	0,0888
Error	749,20	12	62,43		
Total	1121,60	14			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=13,33220

Error: 62,4333 gl: 12

caballo	Medias	n	E.E.
3	34,60	5	3,53 A
2	24,80	5	3,53 A
1	23,40	5	3,53 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

ANALISIS DE VARIANZA ENTRE CABALLOS A 1500 RMP.

VIGOR

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
resultado	15	0,08	0,00	12,74

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,13	2	0,07	0,50	0,6186
caballo	0,13	2	0,07	0,50	0,6186
Error	1,60	12	0,13		
Total	1,73	14			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,61612

Error: 0,1333 gl: 12

caballo	Medias	n	E.E.
2	3,00	5	0,16 A
1	2,80	5	0,16 A
3	2,80	5	0,16 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

MOTILIDAD INDIVIDUAL

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
resultado	15	0,93	0,92	7,97

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1703,33	2	851,67	85,17	<0,0001
caballo	1703,33	2	851,67	85,17	<0,0001
Error	120,00	12	10,00		
Total	1823,33	14			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=5,33573

Error: 10,0000 gl: 12

caballo	Medias	n	E.E.
1	50,00	5	1,41 A
2	44,00	5	1,41 B
3	25,00	5	1,41 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

MORFOLOGIA NORMAL

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
resultado	15	0,80	0,77	2,61

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	160,00	2	80,00	24,00	0,0001
caballo	160,00	2	80,00	24,00	0,0001
Error	40,00	12	3,33		
Total	200,00	14			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=3,08058

Error: 3,3333 gl: 12

caballo	Medias	n	E.E.
3	74,00	5	0,82 A
1	70,00	5	0,82 B
2	66,00	5	0,82 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
resultado	15	0,33	0,22	4,81

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	70,00	2	35,00	3,00	0,0878
caballo	70,00	2	35,00	3,00	0,0878
Error	140,00	12	11,67		
Total	210,00	14			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=5,76324

Error: 11,6667 gl: 12

caballo	Medias	n	E.E.
1	73,00	5	1,53 A
3	72,00	5	1,53 A
2	68,00	5	1,53 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

INTEGRIDAD DEL ACROSOMA

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
resultado	15	0,44	0,34	3,70

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	70,00	2	35,00	4,67	0,0317
caballo	70,00	2	35,00	4,67	0,0317
Error	90,00	12	7,50		
Total	160,00	14			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=4,62088

Error: 7,5000 gl: 12

caballo	Medias	n	E.E.
2	76,00	5	1,22 A
3	75,00	5	1,22 A B
1	71,00	5	1,22 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

CONCENTRACION ESPERMATICA

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
resultado	15	0,43	0,34	17,17

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	270,40	2	135,20	4,59	0,0330
caballo	270,40	2	135,20	4,59	0,0330
Error	353,20	12	29,43		
Total	623,60	14			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=9,15405

Error: 29,4333 gl: 12

caballo	Medias	n	E.E.
3	37,60	5	2,43 A
1	28,80	5	2,43 A B
2	28,40	5	2,43 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

ANALISIS DE VARIANZA ENTRE CABALLOS A 1700 RMP.

VIGOR

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
resultado	15	0,64	0,58	16,60

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2,80	2	1,40	10,50	0,0023
caballo	2,80	2	1,40	10,50	0,0023
Error	1,60	12	0,13		
Total	4,40	14			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,61612

Error: 0,1333 gl: 12

caballo	Medias	n	E.E.
2	2,80	5	0,16 A
1	2,00	5	0,16 B
3	1,80	5	0,16 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

MOTILIDAD INDIVIDUAL

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
resultado	15	0,98	0,98	6,62

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	4630,00	2	2315,00	347,25	<0,0001
caballo	4630,00	2	2315,00	347,25	<0,0001
Error	80,00	12	6,67		
Total	4710,00	14			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=4,35660

Error: 6,6667 gl: 12

caballo	Medias	n	E.E.
2	60,00	5	1,15 A
1	40,00	5	1,15 B
3	17,00	5	1,15 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

MORFOLOGIA NORMAL

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
resultado	15	0,53	0,45	6,31

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	223,33	2	111,67	6,70	0,0111
caballo	223,33	2	111,67	6,70	0,0111
Error	200,00	12	16,67		
Total	423,33	14			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=6,88839

Error: 16,6667 gl: 12

caballo	Medias	n	E.E.
2	70,00	5	1,83 A
1	63,00	5	1,83 B
3	61,00	5	1,83 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
resultado	15	0,43	0,33	9,27

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	390,00	2	195,00	4,50	0,0348
caballo	390,00	2	195,00	4,50	0,0348
Error	520,00	12	43,33		
Total	910,00	14			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=11,10720

Error: 43,3333 gl: 12

caballo	Medias	n	E.E.
2	78,00	5	2,94 A
1	69,00	5	2,94 A B
3	66,00	5	2,94 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

INTEGRIDAD DEL ACROSOMA

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
resultado	15	0,87	0,85	2,82

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	343,33	2	171,67	41,20	<0,0001
caballo	343,33	2	171,67	41,20	<0,0001
Error	50,00	12	4,17		
Total	393,33	14			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=3,44420

Error: 4,1667 gl: 12

caballo	Medias	n	E.E.	
2	79,00	5	0,91	A
1	70,00	5	0,91	B
3	68,00	5	0,91	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

CONCENTRACION ESPERMATICA

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
resultado	15	0,39	0,28	25,90

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	418,53	2	209,27	3,78	0,0533
caballo	418,53	2	209,27	3,78	0,0533
Error	664,40	12	55,37		
Total	1082,93	14			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=12,55503

Error: 55,3667 gl: 12

caballo	Medias	n	E.E.	
3	36,20	5	3,33	A
2	25,20	5	3,33	A
1	24,80	5	3,33	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

ANEXOS



Preparación del crioprotector añadir agua bidestilada a 37 grados centígrados



Mantener 10 en una temperatura de 37 grados centígrados



Separar la yema de la clara de huevo

	Añadir la yema de huevo al crioramp
	Añadir el crioprotector
	Guardar para su congelación y para diluir con el espermatozoides.

	Preparación de la vagina artificial.
	Lavando el pene del caballo
	Colecta de semen en la vagina artificial

	Separamos el plasma seminal (la gel)
	Diluimos con el crioprotector
	Llevamos a la centrifugadora.



Separación del pellet y el sobrenadante después de la centrifugación



Conteo de la concentración de espermatozoides en la cámara de Neubauer



Selladores de metal de 0,5ml, poniendo los selladores en las pajillas.

	Poner en el estabilizador de 4 a 5 grados centígrados.
	Pasamos a los vapores de nitrógeno durante 10 minutos
	Pasar al tanque de nitrógeno a una temperatura de – 196 grados centígrados

□ Aurich, C. (2012). *Artificial insemination in horses—More than a century of practice and research*. Journal of Equine Veterinary Science, 32(8), 458-463.

□ Gibb, Z., Lambourne, S. R., & Aitken, R. J. (2015). *The paradoxical relationship between stallion fertility and oxidative stress*. Biology of Reproduction, 93(6), 1-10.

- McKinnon, A. O., & Voss, J. L. (2011). *Equine reproduction*. Wiley-Blackwell.
- Samper, J. C. (2009). *Artificial insemination in horses: Current trends and techniques*. Veterinary Clinics of North America: Equine Practice, 25(2), 351-371.
- Sieme, H., Harrison, R. A., & Petrunkina, A. M. (2016). *Cryobiological determinants of frozen semen quality, with special reference to stallion*. Animal Reproduction Science, 169, 2-12.
- Varner, D. D., Gibb, Z., Aitken, R. J., & Kirk, E. K. (2014). *Biophysical and biochemical attributes of equine spermatozoa and their relationship with cryopreservation success*. Theriogenology, 81(1), 10-20.