



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS DE CONGELACIÓN DE SEMEN
EQUINO CON VAPORES DE NITRÓGENO LÍQUIDO VS CONGELACIÓN
CON DESCENSO CONTROLADO DE TEMPERATURA.

AUTOR

Karla Andrea Sonnenholzner Espinosa

AÑO

2020



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS DE CONGELACIÓN DE SEMEN
EQUINO CON VAPORES DE NITRÓGENO LÍQUIDO VS CONGELACIÓN
CON DESCENSO CONTROLADO DE TEMPERATURA.

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Médico Veterinario y Zootecnista.

Profesor Guía

MVZ. David F. Andrade O. MgSc.

Autor

Karla Andrea Sonnenholzner Espinosa

Año

2020

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

"Declaro haber dirigido el trabajo, Comparar los resultados post-congelación de material seminal equino congelados por vapores de nitrógeno líquido y descenso controlado de curva con equipo, mediante el análisis de un espermiograma clásico, en reproductores equinos., a través de reuniones periódicas con la estudiante Karla Andrea Sonnenholzner Espinosa, en el semestre 2020-20, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

A handwritten signature in blue ink, reading "David Andrade O.", with a large, stylized flourish above the name.


MVZ. David F. Andrade O. MgSc.

Médico Veterinario y

Zootecnista CI:1712693165

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

"Declaro haber revisado este trabajo, Comparar los resultados post-congelación de material seminal equino congelados por vapores de nitrógeno líquido y descenso controlado de curva con equipo, mediante el análisis de un espermiograma clásico, en reproductores equinos, de Karla Andrea Sonnenholzner Espinosa, en el semestre 2020-20, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".



Dr Martín Ortiz MSc

Viqueza

Médico

Veterinario CI

0601272925

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.”

A handwritten signature in blue ink, consisting of several overlapping loops and lines, positioned above a horizontal line.

Karla Andrea Sonnenholzner Espinosa

CI: 171663459-5

AGRADECIMIENTOS

Una etapa muy especial en mi vida termina, donde tuve la oportunidad de conocer a grandes maestros y amigos, a los cuales agradezco su enseñanza y acompañamiento durante todos estos años, enseñanza que me permitirá poder desempeñar de mejor manera mi rol como Médico Veterinario y Zootecnista.

Quiero agradecer a todos mis profesores, pero de manera muy especial al Doctor David Andrade no solo por haberme guiado durante el desarrollo de este estudio entregándome todo su apoyo, sino también de manera personal como un gran amigo que encontré en la carrera; También al Doctor Martín Ortiz por su orientación y ayuda.

Mi más amplio agradecimiento al Doctor Francisco Gallegos ya que sin el nada de esto hubiera sido posible, un amigo invaluable y un profesional admirable; a Leonardo Albán y Maricela Veloz, quienes me ayudaron en el desarrollo de la práctica del estudio y sobre todo por ser esas personas especiales que uno encuentra en el camino para ser mejores profesionales.

Y desde luego al carácter, fortaleza e inteligencia de mi madre, que me enseñó que hay que estudiar, trabajar y esforzarse para alcanzar todas las metas que uno se propone en la vida.

DEDICATORIA

Quiero dedicar esta investigación a mi abuelo, quien ha sido mi más grande ejemplo, inculcando en mi las ansias y el anhelo de superación y la obtención de triunfos en mi vida. Desde el cielo recibí todas sus motivaciones.

RESUMEN

La criopreservación se ha desarrollado bien dentro de biotecnologías en la rama de la reproducción equina; no obstante, este no ha sido tan eficaz como en otras especies de mamíferos (Janine, 2010); ya que se estima, que solo entre 30% al 40% de los reproductores equinos producen un semen de calidad que puede criopreservarse y mantener la capacidad fecundante buscada postcongelación en niveles que sean aceptables (Tamay Siguenza & Velez Sandoval, 2018). El objetivo de esta investigación fue evaluar los resultados de congelación de material seminal equino con vapores de nitrógeno líquido versus el método de descenso controlado de temperatura con equipo, mediante el análisis de un espermiograma clásico, en reproductores equinos; para expandir los genes del caballo criollo ecuatoriano dentro del proyecto UDLA-Quito Ecuestre que se halla en ejecución. Se valoró el color, pH y volumen en la evaluación macroscópica; y se evaluó motilidad de masa, motilidad progresiva, morfología y concentración espermática a nivel microscópico. En el resultado del análisis de comparación entre los 2 métodos de congelación, no se encontraron diferencias significativas en los tiempos de descongelación debido a un reducido tamaño de la muestra. Concluyendo que los resultados individuales para cada método de congelación determinaron que para el método de descenso controlado con equipo (tk-3000) hubo menor pérdida de la calidad espermática en el tiempo de evaluación; lo que quiere decir, es que ambos métodos sirven para crioconservar semen equino.

ABSTRACT

Cryopreservation has been well developed within biotechnologies in the equine reproduction branch; however, this has not been as effective as in other mammalian species (Janine, 2010); since it is estimated that only 30% to 40% of equine breeders produce quality semen that can be cryopreserved and maintain the desired post-freezing fertilizing capacity at levels that are acceptable (Tamay Siguenza & Velez Sandoval, 2018). The objective of this investigation was to evaluate the results of freezing equine seminal material with liquid nitrogen vapors versus the method of controlled descent of temperature with equipment, by means of the analysis of a classic spermogram, in equine breeders; to expand the genes of the Ecuadorian Creole horse within the UDLA-Quito Equestrian project that is underway. Color, pH and volume were assessed in the macroscopic evaluation; and mass motility, progressive motility, morphology and sperm concentration were evaluated at the microscopic level. In the result of the comparison analysis between the 2 freezing methods, no significant differences were found in the thawing times due to a small sample size. Concluding that the individual results for each freezing method determined that for the equipment-controlled descent method (tk-3000) there was less loss of sperm quality at the evaluation time; this means that both methods serve to cryopreserve equine semen.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	ALCANCE	3
1.2.	OBJETIVOS.....	3
1.2.1.	Objetivo General.....	3
1.2.2.	Objetivos Específicos	3
1.3.	Pregunta de Investigación.....	4
II.	MARCO TEÓRICO	5
2.1	Anatomía y fisiología reproductiva del aparato reproductor del caballo....	5
2.1.1.	Órganos sexuales primarios y secundarios.....	5
2.1.1.1.	Testículos.....	5
2.1.1.2.	Escroto.....	5
2.1.1.3.	Cordón espermático	6
2.1.1.4.	Epidídimo	6
2.1.1.5.	Conducto deferente.....	6
2.1.1.6.	Glándulas sexuales accesorias	7
2.1.1.7.	Ámpula	7
2.1.1.8.	Vesículas seminales.....	7
2.1.1.9.	Próstata.....	7
2.1.1.10.	Glándulas bulbouretrales	7
2.1.1.11.	Pene.....	8
2.1.1.12.	Prepucio	8
2.2.	Características del eyaculado equino	8
2.2.1.	Primera onda eyaculatoria	8
2.2.2.	Segunda onda eyaculatoria.....	8
2.2.3.	Tercera onda eyaculatoria.....	9
2.3.	Espermiograma.....	9
2.3.1.	Características macroscópicas.....	9
2.3.1.1.	Volumen del eyaculado	9

2.3.1.2.	Color o concentración de células seminales	10
2.3.1.3.	Aspecto	11
2.3.1.4.	pH.....	11
2.3.2.	Características microscópicas.....	11
2.3.2.1.	Motilidad espermática	11
2.3.2.2.	Motilidad masal	11
2.3.2.3.	Motilidad individual	12
2.3.2.4.	Morfología	13
2.4.	Métodos de congelación	14
2.5.	Parámetros Congelación.....	15
2.6.	Criopreservación.....	15
2.6.1.	Alteraciones de la célula espermática durante la congelación	15
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1.	Materiales	17
3.1.1.	De campo	17
3.1.2.	De laboratorio.....	17
3.1.2.1.	Materiales pre-congelación	17
3.1.2.2.	Materiales post-congelación.....	18
3.1.3.	Protección veterinaria.....	18
3.1.4.	De congelación.....	18
3.2.	Población y muestra.....	18
3.3.	Ubicación	19
3.4.	Selección de reproductor	19
3.5.	Colecta seminal.....	22
3.5.1.	Calidad seminal.....	22
3.5.2.	En la evaluación macroscópica del material seminal	22
3.5.3.	En la evaluación macroscópica del material seminal	23
3.5.3.1.	Motilidad masal	23
3.5.3.2.	Motilidad progresiva	24
3.5.3.3.	Morfología y viabilidad.....	24

3.5.3.4.	Concentración de espermatozoides vivos	25
3.5.3.5.	Dilución de semen.....	26
3.5.3.6.	Congelación vapores de nitrógeno líquido	26
3.5.3.7.	Congelación con descenso controlado con equipo (tk-3000) ..	27
3.5.3.8.	Descongelación seminal	27
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
4.1.	Análisis por variable	29
4.1.1.	Evaluación de los animales	29
4.1.2.	Discusión evaluación de los animales.....	29
4.1.3.	Resultados del examen clínico y andrológico de los reproductores	30
4.1.4.	Discusión del examen clínico y andrológico de los reproductores 31	
4.1.5.	Resultados del análisis de la calidad espermática macroscópica 32	
4.1.6.	Discusión del análisis de la calidad espermática microscópica	33
4.1.7.	Resultados del análisis de la calidad espermática microscópica obtenida en los reproductores equinos	33
4.1.8.	Discusión del análisis de la calidad espermática microscópica obtenida en los reproductores equinos	34
4.1.9.	Resultados del análisis de motilidad total precongelación y postcongelación a los tiempos 0 (mismo día de congelación), 1 (5 días de después de la congelación inicial), 2 (10 días de después de la congelación inicial) y 3 (15 días de después de la congelación inicial) para los métodos de vapores de nitrógeno líquido y equipo tk-3000.....	35
4.1.10.	Discusión del análisis de motilidad total	36
4.1.11.	Resultados del análisis de motilidad progresiva.....	37
4.1.12.	Discusión del análisis de motilidad progresiva	38
4.1.13.	Resultados del análisis de concentración seminal	39
4.1.14.	Discusión Resultados del análisis de concentración seminal..	40

4.1.15.	Resultados del análisis del número total de espermatozoides	41
4.1.16.	Resultados del análisis del número total de espermatozoides	42
4.1.16.1.	Discusión parámetros de motilidad total, motilidad progresiva, concentración seminal y número total de espermatozoides.....	43
4.2.	Comparación entre métodos de congelación.....	43
4.2.1.	Discusión de la comparación entre métodos de congelación..	44
4.3.	Limitaciones	45
V.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	47
5.1.	Conclusiones	47
5.2.	Recomendaciones	47
	REFERENCIAS.....	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Escala de evaluación de volumen seminal en equinos	10
Tabla 2 Escala de coloración de semen equino.....	11
Tabla 3 Escala de motilidad masal.....	12
Tabla 4 Escala de motilidad individual.....	13
Tabla 5 Criterios de selección Escala de motilidad individual.....	19
Tabla 6 Escala coloración del semen.....	22
Tabla 7 Escala pH.....	23
Tabla 8 Escala de volumen	23
Tabla 9 Escala de motilidad total.....	24
Tabla 10 Escala de motilidad progresiva.....	24
Tabla 11 Escala de morfología.....	25
Tabla 12 Escala concentración	26
Tabla 13 Protocolo de curvas de congelación de semen equino	27
Tabla 14 Reproductores, edad y hembras cubiertas.....	29
Tabla 15 Clasificación examen clínico y andrológico	30
Tabla 16 Valoraciones espermáticas macroscópicas para el grupo de reproductores.....	32
Tabla 17 Valoraciones espermáticas microscópicas para el grupo de reproductores.....	33
Tabla 18 ANOVA de los métodos de congelación.....	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Aparato reproductor de macho.....	6
<i>Figura 2</i> Esquema de movimientos en onda de masa al microscopio.....	12
<i>Figura 3</i> Estructura espermatozoide equino.....	14
<i>Figura 4</i> Diagrama de flujo para selección reproductor por medio de un examen clínico, físico, andrológico y colecta seminal.....	21
<i>Figura 5</i> Resultados de Motilidad Total a diferentes tiempos del análisis de motilidad total precongelación y postcongelación a los tiempos 0 (mismo día de congelación), 1 (5 días de después de la congelación inicial), 2 (10 días de después de la congelación inicial) y 3 (15 días de después de la congelación inicial) para los métodos de vapores de nitrógeno líquido y equipo tk-3000	36
<i>Figura 6</i> Resultados de Motilidad Progresiva a diferentes tiempos.....	38
<i>Figura 7</i> Resultados de Concentración Seminal a diferentes tiempos	40
<i>Figura 8</i> Resultados de Número Total de espermatozoides a diferentes tiempos.....	42

I. INTRODUCCIÓN

En 1.949 se dio el primer hallazgo en la viabilidad espermática post-congelación que coincide con semen equino, logrando que espermatozoides congelados a menos 79°C (-79 grados Centígrados) respondan en un 25% en su vitalidad. Este descubrimiento abrió las puertas para realizar investigaciones con otras especies (Universidad Autónoma del Estado de México, 2015).

La criopreservación se ha desarrollado bien dentro de biotecnologías en la rama de la reproducción equina; no obstante, este no ha sido tan eficaz como en otras especies de mamíferos (Janine, 2010); ya que se estima, que solo entre el 30% al 40% de los reproductores equinos producen un semen de calidad que puede criopreservarse y mantener la capacidad fecundante buscada postcongelación en niveles que sean aceptables (Tamay Siguenza & Velez Sandoval, 2018).

La crioconservación limita la diseminación de enfermedades venéreas y poder inseminar varias yeguas con la obtención de un solo eyaculado (Domingo Perez, Acosta, Restrepo, Camacho, & Perez, 2017). Durante estos últimos años se ha introducido en la industria ecuestre mejores técnicas en la criopreservación de espermatozoides, las mismas que han proporcionado una mayor facilidad en el comercio tanto nacional como internacional del material seminal equino, extendiendo de esta manera beneficios de la IA en otras especies (Domingo Perez, Acosta, Restrepo, Camacho, & Perez, 2017).

En la búsqueda de la optimización de este proceso, se debe tomar en cuenta varios factores, como: toxicidad del plasma seminal, estrés osmótico que provoca lesiones criogénicas, criocapacitación, fases de membrana en transición, peroxidaciones lipídicas y crioprotección menor a la requerida (Duque, Rojano, & Restrepo, 2016). Esto sucede por los cambios a los que la célula espermática está sometida durante el procedimiento de congelación (Domingo Perez, Acosta, Restrepo, Camacho, & Perez, 2017).

Los diferentes mecanismos de criopreservación son conocidos por disminuir la supervivencia de los espermatozoides y con ello también la habilidad fecundante, este fenómeno se debe a que la calidad espermática del semen que ha sido sometido a procesos de congelación es inferior con respecto a otros procesos de obtención seminal como semen fresco o semen refrigerado, reduciendo el porcentaje en la de tasa de preñez; todo ello con el esfuerzo para minimizar el cambio en el proceso de congelación (Domingo Perez, Acosta, Restrepo, Camacho, & Perez, 2017).

En Ecuador cada vez existen más profesionales de veterinaria que están llevando la batuta y liderando la medicina equina en diferentes áreas, en reproducción y mejoramiento genético; la brecha de evolución y las técnicas en la mayoría de regiones de nuestro país aún se manejan de forma anticuada, pese que en varias universidades cada vez existan más estudios relacionados a la inseminación artificial en equinos (Valencia, Mentuy, & Boada, 2016).

1.1. ALCANCE

Este estudio busca encontrar la metodología necesaria para expandir los genes del caballo criollo ecuatoriano dentro del proyecto UDLA-Quito Ecuestre que se halla en ejecución.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo General

Comparar los resultados post-congelación de material seminal equino congelados por vapores de nitrógeno líquido y descenso controlado de curva con equipo, mediante el análisis de un espermograma clásico, en reproductores equinos.

1.2.2. Objetivos Específicos

- Evaluar a los caballos deportivos en su función reproductiva, por medio de un examen clínico completo y andrológico, para seleccionar a los reproductores que serán sometidos a las colectas de semen.
- Valorar los parámetros seminales para la congelación, bajo el análisis de un espermograma clásico, para exámenes macro y micro del material seminal pre-congelación, de los reproductores seleccionados.
- Comparar los resultados post-congelación, mediante el análisis de un espermograma clásico, en los procedimientos de vapores de nitrógeno líquido y descenso controlado de curva con equipo, en pajillas descongeladas.

1.3. Pregunta de Investigación

¿Los métodos de congelación presentan diferencias en la calidad espermática post-congelación en los tiempos de evaluación?

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Anatomía y fisiología reproductiva del aparato reproductor del caballo

Para el desarrollo en procedimientos artificiales en la reproducción y hacer la evaluación reproductiva del semental, es imprescindible conocer sobre la anatomía de sus órganos genitales. Para su determinado estudio, el sistema reproductor del macho está compuesto por: testículo, escroto, cordón espermático, epidídimo, glándulas sexuales accesorias (ámpulas, vesículas seminales, próstata y glándulas bulbouretrales), prepucio y pene (Trejos Soto, 2009).

2.1.1. Órganos sexuales primarios y secundarios

2.1.1.1. Testículos.

Órganos sexuales primarios, en ellos se da la producción de los gametos masculinos (espermatozoides) y la síntesis hormonal (andrógenos), se localizan en la zona inguinal y se encuentran recubiertos por el escroto y su tamaño va en proporción a la edad, raza y época del año del reproductor, siendo que son de mayor tamaño durante la temporada reproductiva (Trejos Soto, 2009).

2.1.1.2. Escroto.

Brindar protección y funcionamiento normal de los testículos, así como también la función de termorregulación manteniendo a los testículos de 4-7 grados centígrados por debajo de la temperatura corporal normal para la producción de espermatozoides (Trejos Soto, 2009).

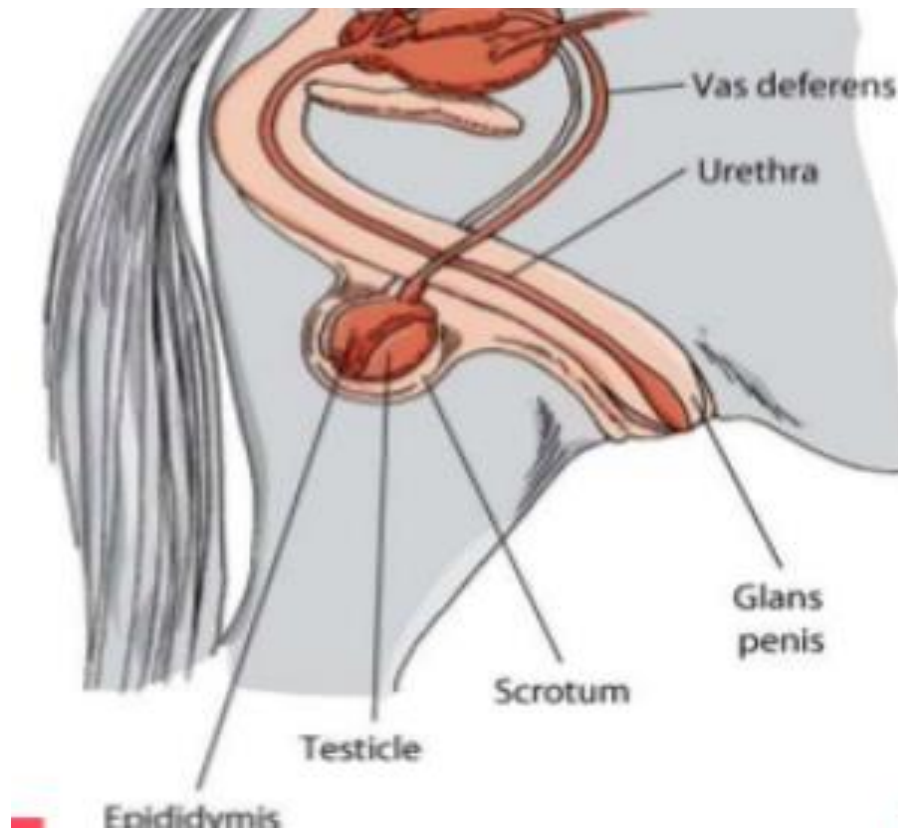


Figura 1 Aparato reproductor de macho. Tomado de (Trejos Soto, 2009).

2.1.1.3. Cordón espermático

Esta conformado por tejidos de varios tipos que se encuentran arrastrados por el testículo hasta el escroto por el canal inguinal (Trejos Soto, 2009).

2.1.1.4. Epidídimo

El epidídimo es la continuación de los conductos eferentes y su función es la de almacenamiento, maduración y transporte espermático (Trejos Soto, 2009).

2.1.1.5. Conducto deferente

Transporte de espermatozoides desde la cola del epidídimo hasta la Proción pélvica de la uretra, el del equino se caracteriza por una gruesa capa de músculos, por lo cual puede ser palpado fácilmente sobre la piel del escroto (Trejos Soto, 2009).

2.1.1.6. Glándulas sexuales accesorias

La mayoría del volumen de un eyaculado está conformado por las secreciones de estas glándulas y está compuesta por: ámpula, vesículas seminales, próstata y glándulas bulbouretrales(Trejos Soto, 2009).

2.1.1.7. Ámpula

Ensanchamiento fusiforme que forma el conducto deferente antes de llegar a la uretra(Trejos Soto, 2009).

2.1.1.8. Vesículas seminales

Sacos periformes y elongados ubicados lateralmente a las ámpulas y parte posterior de la vejiga, producen cantidad de secreciones que forman parte de la mitad del eyaculado (Trejos Soto, 2009).

2.1.1.9. Próstata

Paso del canal espermático a través de la uretra, la secreción de la próstata es de aspecto y coloración lechosa, así como también fluidos accesorios para lubricar y limpiar la uretra en estimulaciones precoitales (Trejos Soto, 2009).

2.1.1.10. Glándulas bulbouretrales

Glándulas que se encuentran situadas a cada lado de la porción pélvica de la uretra y sus secreciones se suman a una mínima porción del eyaculado (Trejos Soto, 2009).

2.1.1.11. Pene

Órgano copulatorio, en la especie equina está formado por una raíz, cuerpo y glándula, está compuesto por tejido eréctil, cuerpo cavernoso y esponjoso; sirve como depósito de material seminal en el aparato reproductor de la yegua y expulsión de orina (Trejos Soto, 2009).

2.1.1.12. Prepucio

Capa de piel que cubre al pene en estado flácido, en el caso del equino, este posee un denominado pliegue en el interior de forma circular y es irrigado al igual que el escroto por dos vasos sanguíneos de importancia como la arteria cremástica y pudenda externa (Trejos Soto, 2009).

2.2. Características del eyaculado equino

El eyaculado posee dos componentes principales: espermatozoides y plasma seminal, está formado por una denominada masa que posee un volumen considerable que puede variar entre los 50 a 300 ml, este está formado por tres ondas eyaculatorias las cuales en tiempos distintos son vertidas en el colector (Díaz, 2010).

2.2.1. Primera onda eyaculatoria

Viene de la próstata esta es abundante en estimulantes espermáticos y electrolitos (Díaz, 2010).

2.2.2. Segunda onda eyaculatoria

Se desarrolla en las ampollas de Henle y es rica en espermatozoides como tal (Díaz, 2010).

2.2.3. Tercera onda eyaculatoria

Procede en las vesículas seminales, las cuales conforman la mayor parte del contenido del eyaculado y desde un objetivo biológico conforma un medio de protección y tamponización espermática (Díaz, 2010).

2.3. Espermograma

Es un examen paraclínico para el análisis de la capacidad reproductiva y permite una primera valoración diagnóstica del macho para la evaluación de enfermedades del sistema reproductor del macho, este estudio seminal o espermograma clásico abarca la valoración de los espermatozoides, líquido seminal y presencia de otras células en el eyaculado como bacterias o células inflamatorias (Toro Montoya, Espermograma, 2009).

El análisis del material seminal brinda información de gran importancia a los procesos de espermatogénesis, funcionalidad espermática y operatividad de las glándulas sexuales accesorias (Toro Montoya, Espermograma, 2009).

2.3.1. Características macroscópicas

2.3.1.1. Volumen del eyaculado

Según Bustos y Rodríguez en el año de 1996, el volumen del eyaculado equino puede tener variaciones desde los 30 hasta los 250 ml, esto, dependiendo de diferentes características individuales, como: el método de recolección, la edad, frecuencia en montas y la época del año (Díaz, 2010).

El volumen mínimo para ser aceptado en reproductores mayores o igual a la edad de 2 años es de 30 ml y para mayores o igual a la edad de a 5 años es de 50 ml (Diaz, 2010) Ver tabla 1.

Tabla 1

Escala de evaluación de volumen seminal en equinos

PARÁMETRO	VALORES		
	I (EXCELENTE)	II (REGULAR)	III (MALO)
VOLUMEN (x 106/ ml)	160- 250	80- 160	0-80

Tomado de Protocolo Veloz, 2017.

2.3.1.2. Color o concentración de células seminales

En el equino la concentración de células espermáticas a diferencia de otras especies es muy baja, lo cual hace que no produzcan ondas notorias; quiere decir, que un semen para ser aceptable debe poseer al menos un 60% de motilidad espermática antes de la congelación, ya que, valores menores como el 50% es sugerente a factores de infertilidad (Diaz, 2010).

Las características de la coloración son directamente proporcional a la cantidad de espermatozoides presentes en el eyaculado (Veloz Veloz, 2017); Por ello varía entre blanco acuoso a blanco cremoso, la existencia de semen rosado es un indicador de fragilidad a nivel capilar o presencia de heridas y el semen amarillento es sugestivo a presencia de orina y la coloración verdosa a pus (Reproducción equina, 2016). Ver tabla 2.

Tabla 2

Escala de coloración de semen equino.

VALORACIÓN	
MUY BUENO	= CREMOSO
BUENO	= BLANCO LECHOSO
REGULAR	= BLANCO ACUOSO
POBRE	= TRANSLÚCIDO

Tomado de PROTOCOLO EQUU-DAR, 2018.

2.3.1.3. Aspecto

Debe ser de aspecto uniforme y opaco, libre de suciedad, pelos, agua, orina y otros contaminantes (Veloz Veloz, 2017).

2.3.1.4. pH

Tiene variaciones entre 6,5 a 7 (Reproducción equina, 2016).

2.3.2. Características microscópicas

2.3.2.1. Motilidad espermática

Evaluación del porcentaje (%) de la capacidad de movimiento espermático, el cual debe tener movimientos progresivos; esto, da información de la calidad de la integridad morfológica de los espermatozoides y la de membrana espermática (Veloz Veloz, 2017).

2.3.2.2. Motilidad masal

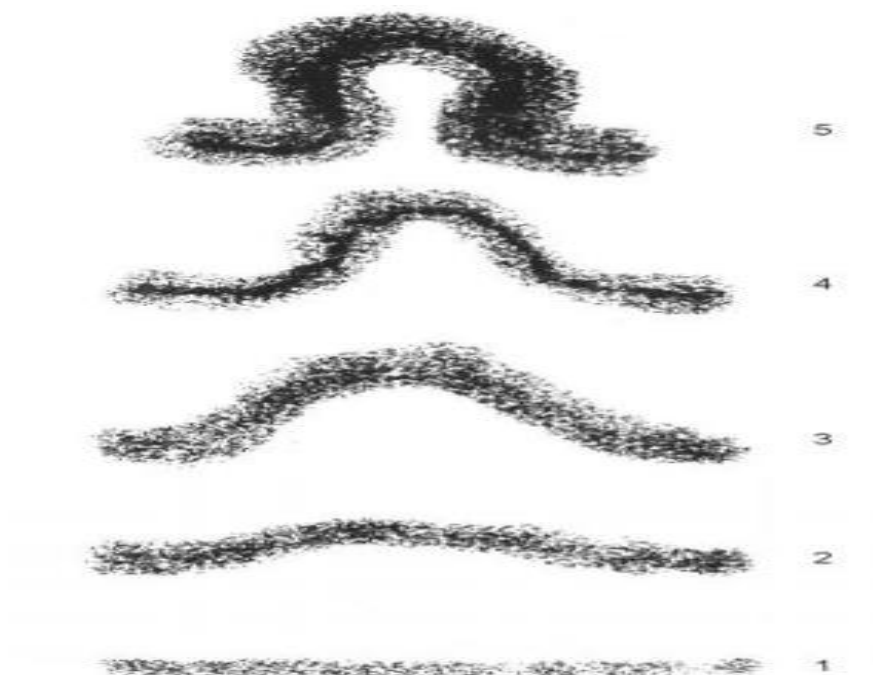
Proporción espermática que presenta cierto tipo de movimiento seminal en concentración y velocidad (Veloz Veloz, 2017) Ver tabla 3 y figura 2.

Tabla 3

Escala de motilidad masal.

VALOR DESCRIPTIVO	ASPECTO DEL MODELO	% CÉLULAS MÓVILES	CRITERIO EVALUATIVO
Muy buena	Movimiento en ondas vigorosas y en remolinos rápidos	80-90%	++++
Buena	Remolinos y ondas más lentas	60-80%	+++
Regular	Sin remolinos, pero con oscilaciones generalizadas	40-60%	++
Mala	Escasa o ninguna motilidad	0-40%	+ o -

Tomado de PROTOCOLO FEQUU-DAR, 2018.

*Figura 2* Esquema de movimientos en onda de masa al microscopio.

Tomado de (Toro Montoya, Espermograma, 2009).

2.3.2.3. Motilidad individual

Evaluación del porcentaje (%) de las células móviles en el material seminal previamente diluido; en otras palabras, basado en el movimiento individual de las células móviles (Veloz Veloz, 2017) Ver tabla 4.

Tabla 4

Escala de motilidad individual.

Valor (%)	Clasificación	Descripción
< 30	Pobre	Muy lento y errático
40-49	Aceptable	Lineal lento y generalizado
50-69	Bueno	Lineal moderadamente rápido
>70	Muy Bueno	Lineal rápido

Tomado de PROTOCOLO FEQUU-DAR, 2018.

2.3.2.4. Morfología

Se define a la forma anatómica del espermatozoide y consiste en uno de los principales factores a evaluar en una muestra seminal (Veloz Veloz, 2017). En el 50% de los casos en equinos, la inserción de la cola es abaxial y no es de forma central como en la mayoría de las especies; por ende, el patrón de motilidad progresiva no es rectilíneo (Ortega Ferrusola, 2011).

Ccomo se observa en la figura 3, en consideraciones generales el material espermático no debe tener más del 30% de anomalías en totalidad del eyaculado (Veloz Veloz, 2017).

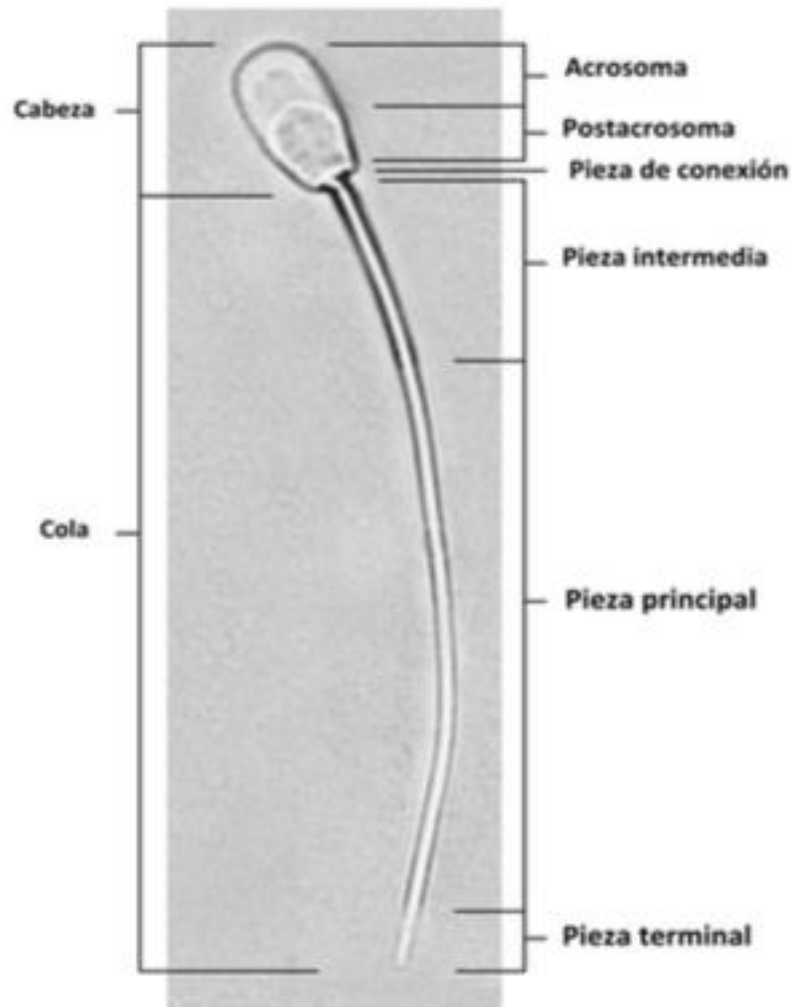


Figura 3 Estructura espermatozoide equino
Tomado de (Ortega Ferrusola, 2011).

2.4. Métodos de congelación

El semen de la especie equina es uno de los más valiosos dentro de la industria de la reproducción, lo cual exige una alta demanda en la colecta y procesamiento.

Los espermatozoides de la especie equina se diferencian porque en su membrana plasmática tienen una alta concentración de ácidos grasos polinsaturados y tienen una predisposición durante la congelación a tener daño oxidativo asociado a severos defectos en la funcionalidad espermática; ya que, existirá un aumento en la reacción del oxígeno y la peroxidación de los lípidos

en membrana (Usuga, Restrepo, & Rojano, Cryotolerance of stallion semen, oxidative stability and components of seminal plasma, 2016).

2.5. Parámetros Congelación

La calidad seminal en congelación y postcongelación depende netamente de la capacidad de los espermatozoides para no disminuir o perder su principal función de fertilidad en los diferentes procesos de crioconservación, las rutinas desarrolladas en precongelación del material seminal corresponde a la motilidad total, progresiva y el aspecto general; este debe ser analizado bajo el número de espermatozoides por mililitro y el porcentaje espermático que se encuentran en una normal motilidad y de esa manera analizar la viabilidad del eyaculado (Cepeda & Dalmau, 2014).

2.6. Criopreservación

Se refiere a los diferentes procesos que intervienen en el mecanismo para preservar y conservar órganos, tejidos, células y proteínas por periodos de tiempo extendidos en bajas temperaturas (Catro Cruz, Jefferson Abdelo; Chacon Jaramillo, Liliana, 2016).

Esta disminución en la temperatura ocasiona que el desgaste en los sistemas biológicos también disminuya; pero, también puede presentar efectos no deseados a través de este proceso, como: desnaturalización de proteínas, cambio del agua en cristales de hielo, estrés oxidativo, daño de la membrana lipídica y daño osmótico (Catro Cruz, Jefferson Abdelo; Chacon Jaramillo, Liliana, 2016).

2.6.1. Alteraciones de la célula espermática durante la congelación

Las células espermáticas son sometidas a estrés una vez que se altera su fisiología por el cambio de temperatura; es decir, cuando se pretende guardar en pajuelas el material seminal por largas instancias, siendo llevadas a condiciones de -196 grados centígrados generalmente para criopreservación (Catro Cruz, Jefferson Abdelo; Chacon Jaramillo, Liliana, 2016).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

3.1.1. De campo

- Cuerpo rígido de la vagina con válvula.
- Mango interno de látex.
- Cono de látex.
- Tubo graduado colector de semen.
- Varilla de lubricación.
- Anillos de goma.
- Termómetro de aguja.
- Lubricante no espermicida.
- Filtro para semen equino.

3.1.2. De laboratorio

3.1.2.1. Materiales pre-congelación

- Tubos de colección graduados
- Baño María
- Semen
- Diluyente
- Tiras reactivas de pH
- Pipetas de 60 µl
- Porta y cubre objetos
- Platina térmica
- Microscopio
- Eosina/nigrosina
- Tubos eppendorf
- Centrífuga de 3000 rpm

3.1.2.2. Materiales post-congelación

- Baño María.
- Tubos eppendorf
- Semen
- Pipetas y puntas de 10ul
- Porta y cubre objetos
- Platina térmica
- Microscopio de contraste
- Sistema de análisis computarizado (CASA)

3.1.3. Protección veterinaria

- Mascarilla
- Cofia
- Guantes de látex / vinilo no espermicida

3.1.4. De congelación

- Corta pajuelas
- Papel absorbente
- Equipo de congelación
- Equipo de computación

3.2. Población y muestra

Se utilizaron eyaculados de 6 reproductores (n=6) cuarto de milla seleccionados bajo criterios de inclusión y exclusión, de una población de 12 individuos existentes en 4 diferentes criaderos. Ver tabla 5.

Tabla 5

Criterios de selección

CRITERIOS DE INCLUSIÓN	CRITERIOS DE EXCLUSIÓN
Macho: entero	Macho: castrado/ vasectomizado/ monórquido
Examen clínico: sano	Examen clínico: enfermo
Examen físico: normal	Examen físico: anormal
Examen andrológico: normal	Examen andrológico: anormal
Espermiograma: factible	Espermiograma: no factible
Edad: mayor ó igual 4 años – menor ó igual 7 años	Edad: menor 4 años – mayor 7 años
Raza: Polo Argentino	Raza: Otras razas

Tomado de Protocolo Gallegos Francisco, 2019.

3.3. Ubicación

El siguiente estudio experimental se llevó a cabo en varias locaciones pertenecientes a propietarios que accedieron someter a sus caballos cuarto de milla al procedimiento.

En los Cantones: Chambo, Mejía, Checa y Yaruqui; correspondientes a las Parroquias: Troje, Uyumbicho y Checa; de las Provincias: Pichincha y Chimborazo; en Ecuador. A una altitud promedio de: 2.850 msnm y condiciones Agro-Ecológicas: templado, temperatura promedio: 15,8 grados C, humedad relativa media: 89%. Tomado de INAMHI (INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGÍA E HIDROLOGÍA, 2017).

3.4. Selección de reproductor

Para la selección del reproductor se realizó el levantamiento de información de registros de montas, un examen clínico, un examen físico y una evaluación

andrológica general de los reproductores para dar paso a la etapa de colectas seminales pre-congelación. Ver figura 4.

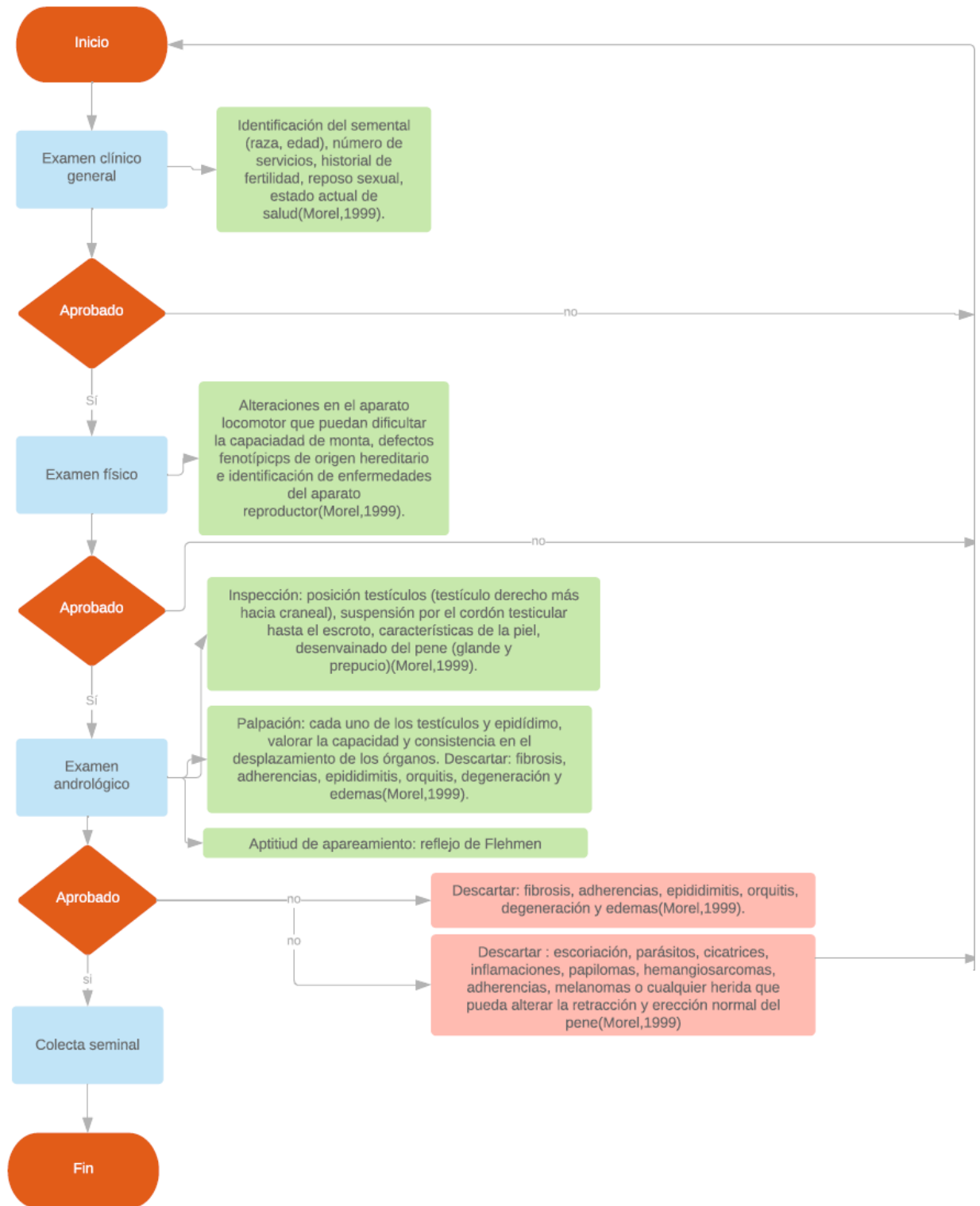


Figura 4 Diagrama de flujo para selección reproductor por medio de un examen clínico, físico, andrológico y colecta seminal.

3.5. Colecta seminal

Previamente a realizar la colecta se hace un lavado con suero fisiológico a una temperatura de 37 grados centígrados del pene (Buzon Cuevas, 2013).

Para estimular la erección se utilizó una yegua maniquí que se encontraba inmovilizada de sus extremidades para asegurar al personal presente y al padrillo seguridad, así como también debe estar vendada la cola con el fin de facilitar el desviar y colocar el pene del padrillo en la vagina artificial (Buzon Cuevas, 2013).

La vagina artificial de categoría Missouri, se encontraba llena con 2,5 litros de agua a una temperatura de 42 grados centígrados y lubricada por dentro, ya que es el espacio por donde el pene del padrillo al momento de la colecta va a estar introducido para depositar el material seminal (Dowsett & Knott, 1996).

3.5.1. Calidad seminal

Se define como al semen con alta motilidad espermática (Charles).

3.5.2. En la evaluación macroscópica del material seminal

Se evaluó el color, pH y volumen respectivamente. En la evaluación microscópica del mismo, se evaluó la motilidad de masa, motilidad progresiva, viabilidad y morfología concentración espermática y morfología anormal. Todos ellos con su escala de clasificación. Ver tablas: 6, 7 y 8.

Tabla 6

Escala coloración del semen.

COLOR	CLASIFICACIÓN
BLANCO CREMOSO	1
BLANCO LECHOSO	2
BLANCO ACUOSO	3

TRANSLÚCIDO	4
-------------	---

Tomado de Protocolo Davies Morel, 2005

Tabla 7

Escala de pH

VALOR	CLASIFICACIÓN
6,5-6,8	1
6,8-7	2
7-7,5	3
7,5-7,8	4

Tomado de Protocolo Davies Morel, 2005

Tabla 8

Escala de volumen

VOLUMEN (ml)	CLASIFICACIÓN
60-70	1
50-60	2
40-50	3
30-40	4

Tomado de Protocolo Davies Morel, 2005

3.5.3. En la evaluación macroscópica del material seminal

3.5.3.1. Motilidad masal

Se evaluó una vez finalizada la colecta, ya que se necesita, que contenga todos los elementos utilizados al obtener el material seminal, se procede a evaluar una gota del material seminal en un microscopio con el lente 32X a una temperatura de 37 grados centígrados en una platina previamente temperada a la misma temperatura para evitar un choque térmico. Ver tabla 9.

Tabla 9

Escala de motilidad total

CÉLULAS MÓVILES (%)	CLASIFICACIÓN
80-90	1
60-80	2
40-60	3
0-40	4

Tomado de Protocolo Davies Morel, 2005

3.5.3.2. Motilidad progresiva

Tras la evaluación en masa del material seminal, se procedió a colocar 1 gota del material seminal sobre un portaobjeto y se continúa cubriéndolo con un cubreobjetos, esto sobre una platina previamente temperada en un microscopio con el lente 32 a 37 grados centígrados con el fin de prolongar el mantenimiento de los espermatozoides móviles de forma individual. Ver tabla 10.

Tabla 10

Escala de motilidad progresiva

VALOR (%)	CLASIFICACIÓN
mayor 70	1
50-69	2
40-49	3
menor 30	4

Tomado de Protocolo Davies Morel, 2005

3.5.3.3. Morfología y viabilidad

Tinción de vivos y muertos (Bloom). Se realiza un frotis del material seminal, y se tiñe con eosina-nigrosina, para ser colocado sobre la platina previamente temperada a 37 grados centígrados, hasta que la muestra se seque.

La interpretación del frotis se la realiza en el microscopio, observando por medio de la división de cuadrantes de la placa, el número de espermatozoides en cada eyaculado; determinando cuales de estas se encuentran con la cabeza teñida de una coloración rosada, indicador de células muertas.

Se tiñen los espermatozoides de coloración rosada en la cabeza, ya que es un indicador de que hubo una alteración en la membrana y por ello, la tinción de eosina traspasa al interior del espermatozoide, determinando por diferencias en el porcentaje de células vivas. Ver tabla 11.

Tabla 11

Escala de morfología

(%)	CLASIFICACIÓN
80-90	1
60-80	2
40-60	3
0-40	4

Tomado de Protocolo Davies Morel, 2005

3.5.3.4. Concentración de espermatozoides vivos

Se requiere la utilización de una cámara de Neubauer, en la cual, se procede a realizar una dilución de 1 en 100 (1:100) (Cabrera, Sanchez, & Risopatron, Sperm Selection in Frozen/Thawed Semen of Equine: Evaluation of Plasma, Acrosome Membranes and Mitochondrial Membrane Potential, 2018).

Para proceder a un conteo de las células que se encuentran presentes en cada cuadrante por ambos lados, la interpretación es visual y después se obtendrá el promedio de los resultados; cada pajilla debe contener 100 millones de

espermatozoides vivos en 100 y el resultado obtenido es el número de pajillas a necesitar (ml del eyaculado x 100 millones x el porcentaje de motilidad). Ver tabla 12.

Tabla 12

Escala concentración

VALOR (10 6 ml)	CLASIFICACIÓN
400-500	1
300-400	2
200-300	3
100-200	4

Tomado de Protocolo Davies Morel, 2005

3.5.3.5. Dilución de semen

El material seminal que cumplió con los parámetros promedio de evaluación pasó a ser sometidos a la dilución, se utilizó el diluyente E-Z Freezin, el cual es específico para material seminal equino.

Se mantuvo a baño maría por el lapso de 20 min a una temperatura de 38 grados centígrados para evitar un choque térmico al semen en el momento de ser mezclados. Se utilizaron pajillas de 0,5 para almacenamiento de semen, estas pajillas fueron selladas con alcohol polivinílico para ser almacenadas en gobelets.

3.5.3.6. Congelación vapores de nitrógeno líquido

Se estabiliza por 20 minutos en refrigeración a 5 grados centígrados, después se mantiene entre 3 a 6 centímetros por encima del nivel de nitrógeno líquido durante 15-20 minutos en un cooler y en la congelación del maetrial seminal se sumergen las pajillas por completo de forma directa en un tanque de nitrógeno

líquido con capacidad de de 37 a 45 litros. Tomado del protocolo FequunDar (Equus y Taurus CIENCE, 2016)

3.5.3.7. Congelación con descenso controlado con equipo (tk-3000)

Protocolo de curvas de congelación de semen equino del mismo equipo: a partir de la temperatura ambiente. Ver tabla 13.

Tabla 13

Protocolo de curvas de congelación de semen equino

Inicio positivo	+0,25 grados centígrados / minuto
Primer descenso	- 5 grados centígrados
Primer Inicio negativo	-15 grados centígrados / minuto
Segundo inicio negativo	-10 grados centígrados / minuto
Segundo descenso negativo	-120 grados centígrados / minuto
Nivel de nitrógeno	5 centímetros

Tomado de Protocolo manual curva de congelación- (equipo TK-3000).

3.5.3.8. Descongelación seminal

La evaluación de motilidad total, motilidad progresiva, concentración seminal y número total de espermatozoides bajo los dos métodos de congelación seminal utilizados en el presente estudio se los desarrolló a su previa descongelación del material seminal almacenado en tanques de nitrógeno líquido a una temperatura de -196 grados centígrados (Dowsett & Knott, 1996).

La evaluación a semen descongelado se realizó en intervalos de tiempo 0= el mismo día de la colecta, tiempo 1= 5 días después de la colecta, tiempo 2= 10 días después de la colecta y tiempo 3= 15 días después de la colecta; tomando 1 pajilla al azar de cada uno de los tratamientos (congelación con vapores de nitrógeno líquido y a descenso controlado de temperatura con equipo- tk 3000), las cuales fueron expuestas a temperatura ambiente alrededor de 10 a 15 segundos para posteriormente ser introducidas a baño maría con una temperatura de 46 grados centígrados por 20 segundos. Cada pajilla se evaluó

para las variables indicadas y fueron promediadas con el valor obtenido para cada una de ellas, dichos datos obtenidos fueron sometidos a un análisis estadístico (Hurtgen & Johnson, 2016).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Análisis por variable

4.1.1. Evaluación de los animales

Los antecedentes reproductivos fueron tomados por medio de registros de cada reproductor, donde el número de hembras cubiertas fue de un 100% por monta natural, observando que todos los reproductores evaluados pertenecen a un mismo grupo etario (rangos entre 4-7 años), por lo que es factible agruparlos en una categoría de reproductores jóvenes. Ver tabla 14.

Tabla 14

Reproductores, edad y hembras cubiertas

REPRODUCTOR	EDAD	# montas	# crías
1	7 años	5	3
2	6 años	7	4
3	6 años	10	7
4	5 años	8	6
5	5 años	8	4
6	4 años	9	5

Tomado de Protocolo Francisco Gallegos, 2019

4.1.2. Discusión evaluación de los animales

Un notable factor a considerar es la edad al instante de realizar el examen andrológico de los reproductores según Cox Leixelard (2018); ya que, ciertas características del material seminal van cambiando. Como describe en su estudio Dowsett & Knott (1996) con la edad y la raza, el volumen de un eyaculado total en un macho que se encuentra entre 1 a 2 años es distinto al de un macho de 10 diez años, siendo para este último mejores parámetros en volumen y concentración espermática.

Ochoa, Bruno, & Fumuso, (2016) realizó un estudio en 8 reproductores entre 4 a 24 años de edad, resultando que en los equinos con mayor longevidad en el examen andrológico se puede observar en su gran mayoría una atrofia en los túbulos seminíferos y en algunos fibrosis del tejido intersticial; Jhonson & Neaves (1981) explica que en los túbulos seminíferos es el lugar donde se produce la espermatogénesis y que cualquier cambio o afección en dichos túbulos afecta directamente a la fertilidad del reproductor.

Perry (2015) resume estos dos estudios, señalando que para lograr la preñez el número de servicios tiene una variación por razas y edad, siendo las razas pequeñas y animales no lonjevos los que bajo el estudio tuvieron mejores porcentajes de índice por preñez.

4.1.3. Resultados del examen clínico y andrológico de los reproductores

Para la valoración del examen clínico de los reproductores, se consideró dentro del parámetro (Aparato locomotor) lesiones en el casco, lesiones óseas y fracturas; dentro del parámetro (Defectos fenotípicos) falla de erección, hipoplasia testicular, agenesia de las glándulas sexuales, criptorquidia y hernias inguinales o umbilicales; dentro del parámetro (Aptitud de apareamiento) el lívido sexual; y, en el parámetro (Morfología sexual) testículos, glándulas accesorias y pene. Donde los 6 reproductores (n=6) presentaron datos nulos para los parámetros: aparato locomotor y defectos fenotípicos, siendo una respuesta satisfactoria para proceder con el estudio, ya que la aptitud de apareamiento y morfología sexual resultaron favorables y se presentó en todos los sementales. Ver tabla 15.

Tabla 15

Clasificación examen clínico y andrológico

APARATO LOCOMOTOR	
LESIONES EN EL CASCO	NO
LESIONES ÓSEAS	NO

FRACTURAS	NO
DEFECTOS FENOTÍPICOS	
FALLA DE ERECCIÓN	NO
HIPOPLASIA TESTICULAR	NO
AGNESIA GLÁNDULAS SEXUALES	NO
CRIPTORQUIDIA	NO
HERNIA INGUINAL Y UMBILICAL	NO
APTITUD DE APAREAMIENTO	
LÍBIDO SEXUAL	SI
MORFOLOGÍA SEXUAL	
TESTICULOS OVOIDES Y SIMÉTRICOS	SI
GLÁNDULAS SEXUALES ACCESORIAS (SIN MALFORMACIONES)	SI
PENE (CON BUENA DESENVAINACIÓN)	SI

Tomado de Protocolo Francisco Gallegos, 2019

4.1.4. Discusión del examen clínico y andrológico de los reproductores

Cox Leixelard (2018) destaca que un buen examen clínico y andrológico del tracto reproductivo del macho es de gran importancia, ya que se puede encontrar varios microorganismos, los cuales pueden permanecer en el reproductor y que afectarían en la calidad espermática por consecuencia, tales como: *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Estreptococo betahemolítico*, *Klebsiella genitalum*, entre otros.

Indica Perry (2015) que las características seminales cambian entre las diferentes razas de equinos existentes, siendo las que producen menor índice de volumen por eyaculado las razas pequeñas, más no existe cambios en los parámetros para el pH y coloración, ya que tienen testículos de menor tamaño a comparación con reproductores de razas grandes.

Araya (2014) concluyó que existe una variación en cuanto a los meses del año y el volumen del eyaculado, ya que existe una mayor producción seminal durante los meses que predisponen a la estación de montas; Porte (2016) señala tal

estudio y añade que en países donde no existe tales estaciones se aplica la limpieza seminal una semana previa a la colecta en presencia de una yegua en calor, para aumentar el líbido y de esta manera obtener mejores resultados del eyaculado.

4.1.5. Resultados del análisis de la calidad espermática macroscópica

En el análisis estadístico de las frecuencias de las variables seminales macroscópicas para el grupo de reproductores, el volumen con los parámetros (60-70 ml) con un color (blanco-cremoso) - (blanco-lechoso) y con pH (6,5 - 6,8) - (6,8 - 7) fue de 3 reproductores - entrando en la categoría excelente; y para volumen (60-70 ml) - (50-60ml) - (40-50ml) con un color (blanco- lechoso) y con un pH (6,8 - 7) - (7 - 7,7) fue de 3 reproductores - entrando en la categoría buena (Ver tabla 16).

Tabla 16

Valoraciones espermáticas macroscópicas para el grupo de reproductores.

Reproductor	Semen			Valoración Final
	volumen	Color	pH	
1	60-70	Blanco Cremoso	6,5-6,8	Excelente
2	40-50	Blanco Lechoso	6,8-7	Buena
3	60-70	Blanco Lechoso	7-7,5	Bueno
4	50-60	Blanco Lechoso	7-7,5	Bueno
5	60-70	Blanco Cremoso	6,5-6,8	Excelente
6	60-70	Blanco Lechoso	6,8-7	Excelente

Tomado de Protocolo Francisco Gallegos, 2019.

4.1.6. Discusión del análisis de la calidad espermática microscópica

Buzon Cuevas (2013) detalla que las características de la calidad espermática macroscópica de un eyaculado son normales y las variedades tanto en apariencia como en color por diferentes factores, ejemplo, la alimentación; y en volumen. Según el estudio de Palma (2012) el volumen de la eyaculación varía en función de la raza del reproductor en un 2,13 ml en promedio, explicando que no se tiene información certera sobre el volumen libre de gel, pero si sobre el eyaculado que varía en un parámetro de 30 a 50 ml.

4.1.7. Resultados del análisis de la calidad espermática microscópica obtenida en los reproductores equinos

En el análisis estadístico de las frecuencias de las variables seminales microscópicas para el grupo de reproductores, la motilidad total con los parámetros motilidad total (80-90) - (40-60) con motilidad progresiva (mayor a 70) - (50- 69) con concentración seminal (300-400) - (200-300) - (100-200) y con un número total de espermatozoides (15-20) – (10-15) fue de 3 reproductores, entrando en la categoría excelente; y para la concentración total (60-80) -(40-60) con motilidad progresiva (50- 69) con concentración seminal (300-400) - (200-300) y con un número total de espermatozoides (15-20) – (10-15) fue de 2 reproductores, entrando en la categoría buena; y para la motilidad total (60-80) con motilidad progresiva (50- 69) con concentración seminal (300-400) y con un número total de espermatozoides (0-5) fue de 1 reproductor, entrando en la categoría regular. Ver tabla 17.

Tabla 17

Valoraciones espermáticas microscópicas para el grupo de reproductores.

Reproductor	Semen				Valoración Final
	Motilidad Total	Motilidad Progresiva	Concentración Seminal (x 10 ⁶)	Número Total De Espermatozoides (x 10 ⁹)	

1	60-80	50-69	300-400	15-20	Excelente
2	40-60	50-69	100-200	15-20	Excelente
3	40-60	50-69	200-300	15-20	Bueno
4	60-80	50-69	300-400	0-5	Regular
5	80-90	mayor a 70	200-300	10-15	Excelente
6	60-80	50-69	300-400	5-10	Bueno

Tomado de Protocolo Francisco Gallegos, 2019

4.1.8. Discusión del análisis de la calidad espermática microscópica obtenida en los reproductores equinos

de Alba (2017) definió la calidad espermática microscópica como la capacidad de fecundación del semen en cualquier especie animal y es un elemento dependiente para el éxito que se obtenga para la inseminación artificial y por consecuencia para la predicción en la crioconservación del material seminal, en concordancia con el estudio de Hidalgo Ordoñez, Tamargo Miguel, & Diez Monforte (2015), donde se explica que la calidad del material seminal es evaluada en base a un espermograma clásico, el cual pese a sus resultados siempre son subjetivos a la experticia del evaluador.

Muiño & Fernandez (2005) compara la evaluación espermática con sementales bovinos por medio del sistema CASA que cuantifica valores cinéticos espermáticos determinados, el cual se puede relacionar con la fertilidad obtenida en reproductores equinos en diferente escala de parámetros.

En un estudio de selección espermática para semen congelado y descongelado en reproductores equinos de Cabrera, Sanchez, & Risopatron (2014) menciona que en esta especie existe un elevado grado en la variabilidad de la calidad seminal entre los mismos sementales, así como en los diferentes eyaculados del mismo animal; además, en los procesos de congelación y descongelación los espermatozoides están expuestos a varios cambios en su estructura y función, como también a fragmentaciones de ADN y daños acrosomales.

4.1.9. Resultados del análisis de motilidad total precongelación y postcongelación a los tiempos 0 (mismo día de congelación), 1 (5 días de después de la congelación inicial), 2 (10 días de después de la congelación inicial) y 3 (15 días de después de la congelación inicial) para los métodos de vapores de nitrógeno líquido y equipo tk-3000

El porcentaje para la frecuencia motilidad total pre-congelación fue de un 66,67%, existiendo un descenso del 6% a tiempo 0 (mismo día de la congelación inicial), un 6% a tiempo 1 (5 días después de la congelación inicial), un 8% para la frecuencia motilidad total a tiempo 2 (10 días después de la congelación inicial) y un 11% para la frecuencia motilidad total a tiempo 3 (15 días después de la congelación inicial) en el análisis post congelación para el método de vapores de nitrógeno líquido.

El porcentaje para la frecuencia motilidad total pre-congelación fue de un 66,67%, existiendo un descenso del 3% a tiempo 0 (mismo día de la congelación inicial), un 3% a tiempo 1 (5 días después de la congelación inicial), un 5% para la frecuencia motilidad total a tiempo 2 (10 días después de la congelación inicial) y un 6% para la frecuencia motilidad total a tiempo 3 (15 días después de la congelación inicial) en el análisis post congelación para el método de descenso controlado con temperatura (equipo tk-3000). Ver Figura 5.

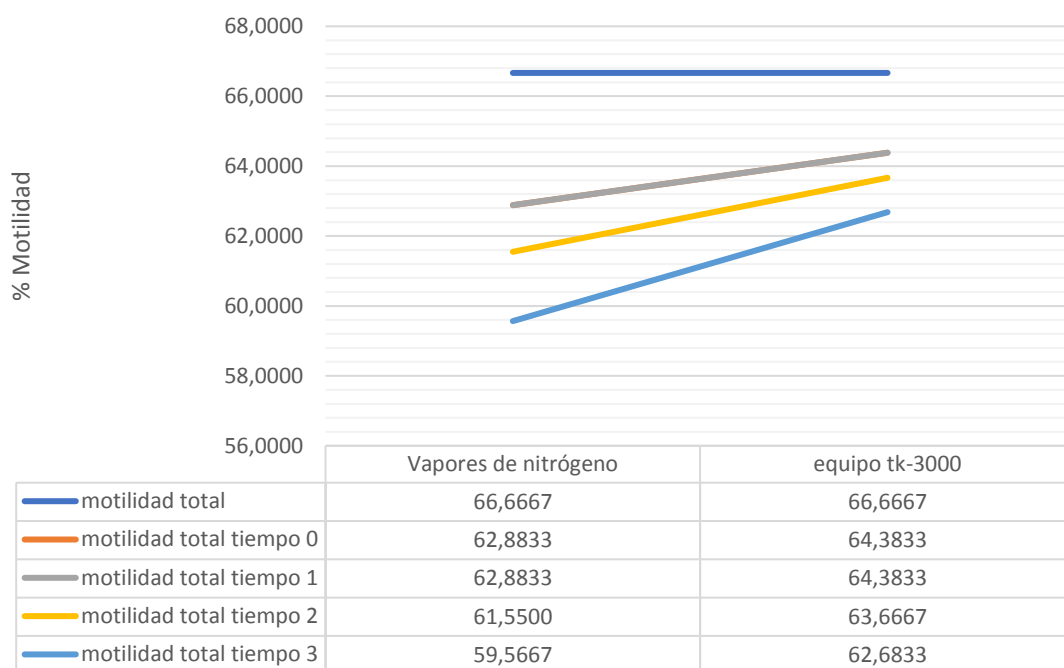


Figura 5 Resultados de Motilidad Total a diferentes tiempos del análisis de motilidad total precongelación y postcongelación a los tiempos 0 (mismo día de congelación), 1 (5 días de después de la congelación inicial), 2 (10 días de después de la congelación inicial) y 3 (15 días de después de la congelación inicial) para los métodos de vapores de nitrógeno líquido y equipo tk-3000

4.1.10. Discusión del análisis de motilidad total

Cox Leixelard (2018) menciona que la motilidad total es posible evaluarla en eyaculados que presentan buenas concentraciones espermáticas, ya que, en la especie equina posee un inferior número de células espermáticas/mm³ a diferencia de la especie bovina que tiene mayor índice de concentración espermática; pero en un estudio realizado por Hurtgen & Johnson (2016) se concluyó que los eyaculados equinos con mayor concentración presentaron mayor onda de movimiento, resultando que existe una concordancia entre vitalidad y el número de células espermáticas; es decir, que la cantidad espermática es directamente proporcional a la calidad del eyaculado, tomando en cuenta que aquellos reproductores no fueron previamente seleccionados por

su rendimiento deportivo o sus características fenotípicas, sino, por sus registros de acuerdo a las montas con respecto a su fertilidad real.

La motilidad total depende del porcentaje de células espermáticas amorfas o anormales según Hidalgo Ordoñez y asociados (2015), relacionado, probablemente, al tiempo de la recolección de los eyaculados; de acuerdo con Cox Leixelard (2018) la cola del espermatozoide es la fracción que presenta mayor índice de anomalías y la segunda es el cuello. Retomando el estudio de Hidalgo Ordoñez y asociados (2015) la motilidad total está en correlación al descanso sexual de los reproductores; es decir, que cuando estos están fuera de la etapa de montas, el epidídimo almacena células envejecidas en lugar de espermatozoides nuevos.

Por otra parte la motilidad total al ser sometida a los procesos de congelación y descongelación en el estudio de Cabrera, Sánchez, & Risopatron, Sperm Selection in Frozen/Thawed Semen of Equine: Evaluation of Plasma, Acrosome Membranes and Mitochondrial Membrane Potential (2014) indica que disminuye por el proceso de peroxidación al ser expuestos a cualquier método de congelación.

4.1.11. Resultados del análisis de motilidad progresiva

El porcentaje para la frecuencia motilidad progresiva pre-congelación fue de un 59,18%, existiendo un descenso del 4% a tiempo 0 (mismo día de la congelación inicial), un 4% a tiempo 1 (5 días después de la congelación inicial), un 7% para la frecuencia motilidad progresiva total a tiempo 2 (10 días después de la congelación inicial) y un 10% para la frecuencia motilidad progresiva a tiempo 3 (15 días después de la congelación inicial) en el análisis post congelación para el método de vapores de nitrógeno líquido.

El porcentaje para la frecuencia motilidad progresiva pre-congelación fue de un 59,18%, existiendo un descenso del 2% a tiempo 0 (mismo día de la congelación

inicial), un 2% a tiempo 1 (5 días después de la congelación inicial), un 4% para la frecuencia motilidad progresiva a tiempo 2 (10 días después de la congelación inicial) y un 5% para la frecuencia motilidad progresiva a tiempo 3 (15 días después de la congelación inicial) en el análisis post congelación para el método de descenso controlado con temperatura (equipo tk-3000) (Figura 6).

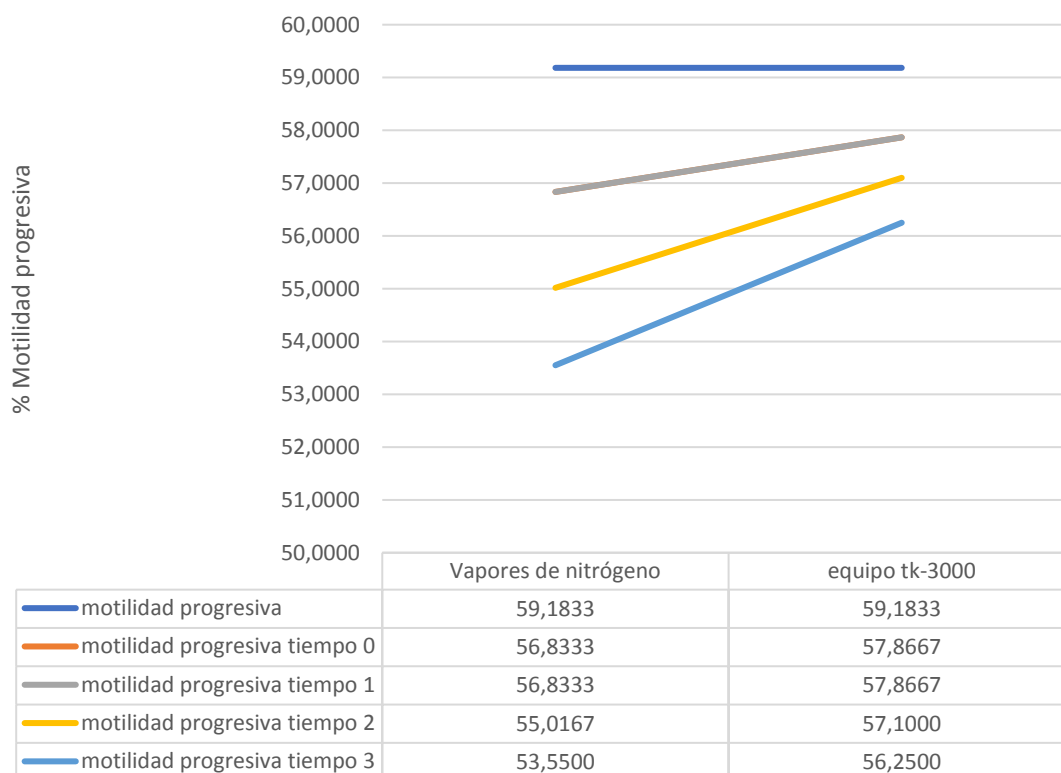


Figura 6 Resultados de Motilidad Progresiva a diferentes tiempos

4.1.12. Discusión del análisis de motilidad progresiva

Los espermatozoides al ser sometidos a procesos de congelación y descongelación pierden alrededor de un 20% en motilidad progresiva, según el estudio de Restrepo, Ocampo, & Velasquez (2019); Miro (2015) en otro estudio indica que la motilidad progresiva sometida a dichos procesos presenta gran variabilidad espermática, lo cual al ser sometidos a cambios bruscos de temperatura hace que la membrana mitocondrial produzca radicales libres

asociados a la formación de aldehídos citotóxicos originados por peroxidación lipídica, reduciendo la motilidad progresiva espermática.

Por ello Cabrera , Sanchez, & Risopatron (2014) indica en su estudio que es necesario un buen análisis del espermograma antes de congelar la muestra, ya que, es probable que con una buena concentración seminal se evite la reducción significativa de la motilidad progresiva espermática.

4.1.13. Resultados del análisis de concentración seminal

El porcentaje para la frecuencia concentración seminal pre-congelación fue de 254,26 millones, existiendo un descenso del 12% a tiempo 0 (mismo día de la congelación inicial), un 12% a tiempo 1 (5 días después de la congelación inicial), un 14% para la frecuencia concentración seminal a tiempo 2 (10 días después de la congelación inicial) y un 15% para la frecuencia concentración seminal a tiempo 3 (15 días después de la congelación inicial) en el análisis post congelación para el método de vapores de nitrógeno líquido.

El porcentaje para la frecuencia concentración seminal pre-congelación fue de un 254,26 millones, existiendo un descenso del 2% a tiempo 0 (mismo día de la congelación inicial), un 2% a tiempo 1 (5 días después de la congelación inicial), un 4% para la frecuencia concentración seminal a tiempo 2 (10 días después de la congelación inicial) y un 4% para la frecuencia concentración seminal a tiempo 3 (15 días después de la congelación inicial) en el análisis post congelación para el método de descenso controlado con temperatura (equipo tk-3000) (Figura 7).

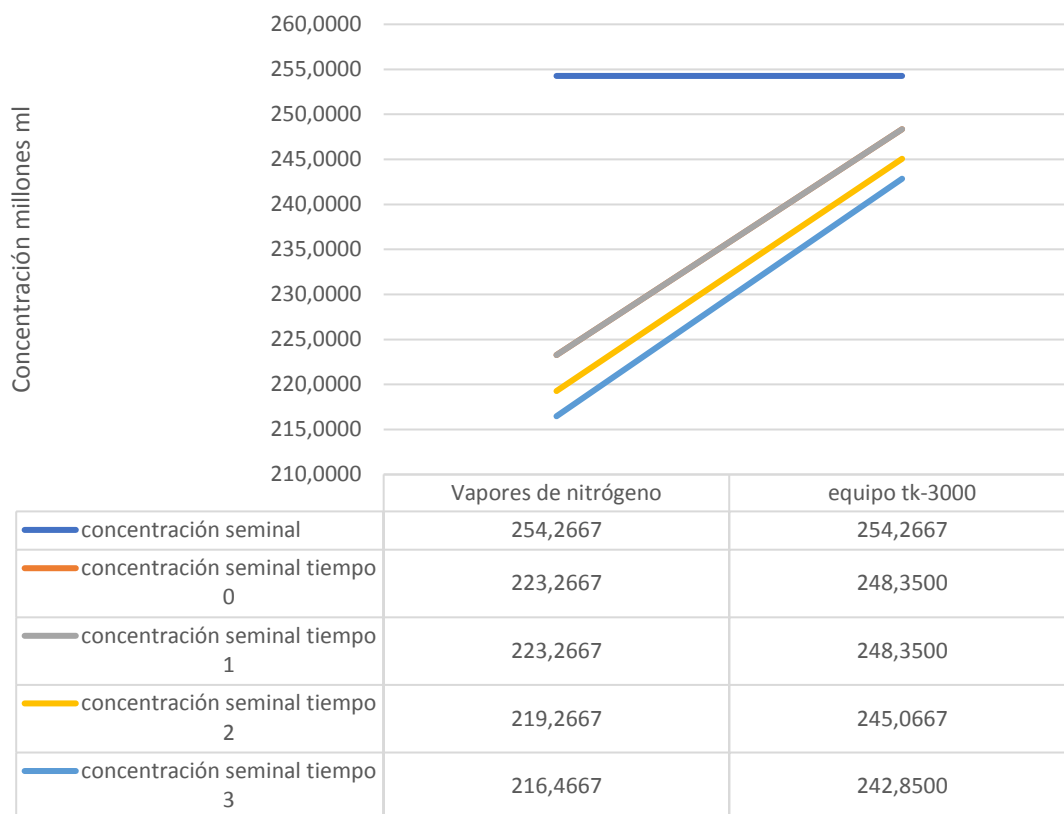


Figura 7 Resultados de Concentración Seminal a diferentes tiempos

4.1.14. Discusión Resultados del análisis de concentración seminal

La crioconservación en equinos no resulta tan efectiva como en la especie bovina u otras especies de mamíferos indica Catro Cruz y autores (2016) ya que estos muestran mejores concentraciones seminales al momento de la congelación y descongelación, incluso en reproductores de la misma raza; Cox Leixelard (2018) menciona que el semen equino que es sometido a un shock térmico no controlado presenta cambios en el metabolismo del espermatozoide y tendrá mayores variantes con el tiempo, demostrando que los mayores cambios se producen desde el inicio de congelación y por lo tanto afectan a la concentración seminal. Tamay Siguenza & Velez Sandoval (2018) encontró que existe una diferencia estadística entre el volumen inicial espermático a comparación con la concentración seminal postcongelación.

4.1.15. Resultados del análisis del número total de espermatozoides

El valor para la frecuencia número total de espermatozoides pre-congelación fue de un 12,6 millones, existiendo un descenso del 16% a tiempo 0 (mismo día de la congelación inicial), un 21% a tiempo 1 (5 días después de la congelación inicial), un 25% para la frecuencia número total de espermatozoides a tiempo 2 (10 días después de la congelación inicial) y un 31% para la frecuencia número total de espermatozoides a tiempo 3 (15 días después de la congelación inicial) en el análisis post congelación para el método de vapores de nitrógeno líquido.

El valor para la frecuencia número total de espermatozoides pre-congelación fue de un 254,26 millones, existiendo un descenso del 2% a tiempo 0 (mismo día de la congelación inicial), un 2% a tiempo 1 (5 días después de la congelación inicial), un 4% para la frecuencia número total de espermatozoides a tiempo 2 (10 días después de la congelación inicial) y un 4% para la frecuencia número total de espermatozoides a tiempo 3 (15 días después de la congelación inicial) en el análisis post congelación para el método de descenso controlado con temperatura (equipo tk-3000) (Ver Figura 8).

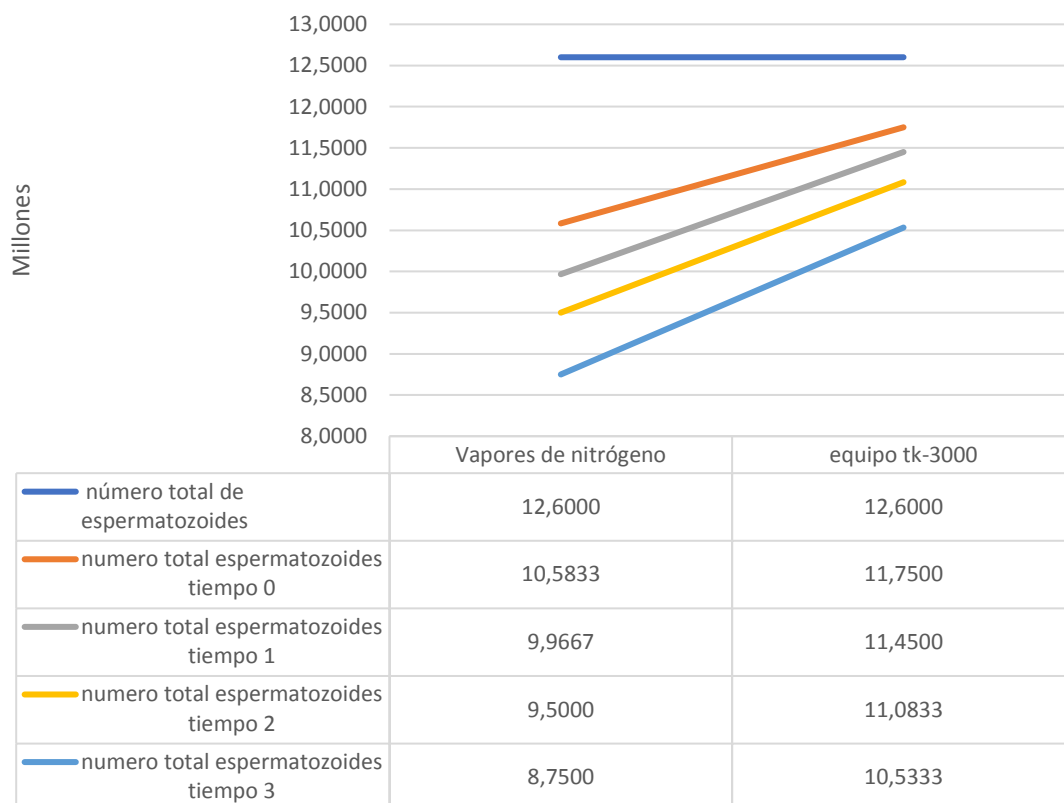


Figura 8 Resultados de Número Total de espermatozoides a diferentes tiempos.

4.1.16. Resultados del análisis del número total de espermatozoides

(Toro Montoya, Espermograma, 2009) señala que el número total de espermatozoides o también denominado recuento espermático debe incluir solo espermatozoides completos, es decir, con cabeza, dando una relación directa para la proporción de los espermatozoides anormales y cola para que puedan ser sometidos a congelación; estas se dividen en primarias: que son de origen testicular ocasionadas en el proceso de espermatogénesis, secundarias: producidas en el epidídimo en la maduración espermática; y, terciarias: por una incorrecta manipulación del material seminal tras la colecta, espermograma y proceso de descongelación. Los resultados obtenidos postcongelación en el estudio de (Toniolli, 2015) dicen que la exposición de los espermatozoides a cambios temperales drásticos producen apoptosis de las células.

4.1.16.1. Discusión parámetros de motilidad total, motilidad progresiva, concentración seminal y número total de espermatozoides

La congelación de material seminal es una de las técnicas con mayor amplitud se es utilizada para almacenamiento y transporte de espermatozoides, el semen de la especie equina es susceptible al choque térmico por cambios bruscos de temperatura a comparación a otras especies, esto relacionado a que en las membranas del espermatozoide existan menores proporciones de fosfolípidos; estas diferencias se encuentran también en los mismos reproductores aun si provienen de la misma raza, en cuanto al almacenamiento a bajas temperaturas como en cuanto a su capacidad seminal Gil Huerta y colaboradores (2019). También destaca que la membrana plasmática de un espermatozoide contiene una cantidad de ácidos grasos insaturados en gran cantidad y por ello son susceptibles a sufrir una peroxidación lipídica cuando estos son sometidos a procesos bruscos de cambio de temperatura, ocasionando que se reduzca la funcionalidad espermática por daño de la estructura normal de membrana en la región acrosómica.

4.2. Comparación entre métodos de congelación

En los resultados obtenidos para vapores de nitrógeno líquido y equipo TK-3000, en los parámetros microscópicos, se observó un P-valor mayor a 0,05 indicando que no existe diferencia significativa entre los tiempos (T0, T1, T2 y T3) de análisis post-congelación para los dos métodos de congelación empleados. Ver tabla 18.

Tabla 18

ANOVA de los métodos de congelación

Parámetros	Tiempos	Sig.
motilidad total	T0	,784
	T1	,784
	T2	,714
	T3	,612
	T0	,801

motilidad progresiva	T1	,801
	T2	,605
	T3	,518
	T0	,602
Concentración	T1	,602
	T2	,588
	T3	,578
	T0	,618
número total espermatozoides	T1	,525
	T2	,498
	T3	,434

Tomado de Protocolo Francisco Gallegos, 2019

4.2.1. Discusión de la comparación entre métodos de congelación

Los factores influyentes indirectos en la crioconservación de material seminal equino son calidad y manejo, siendo el método directo la congelación que se vaya a utilizar, explica Galarza, Serpa, & Torres (2015); ya que, la vitalidad y supervivencia espermática post-descongelación está basada en el desarrollo de protocolos en el procesamiento seminal y su dilución.

Caldevilla y autores (2016) mencionan que existen diferentes parámetros para valorar la calidad del material seminal como: motilidad total, motilidad progresiva individual o motilidad progresiva, vitalidad o concentración seminal, anomalidades o número total de espermatozoides en semen descongelado, que se afectan por los distintos tiempos de equilibrio.

Retomando con el estudio de Galarza, Serpa, & Torres (2015) desarrollado en reproductores bovinos para comparar 2 medios de congelación de material seminal bovino, obtiene que los tiempos entre 2 a 4 horas de adaptación en descenso controlado de temperatura con equipo, son apropiados para procesar una buena congelabilidad del material seminal y en este caso los diluyentes tuvieron poco efecto sobre las variables analizadas.

Caldevilla, Ferrante, Pendola, & Mirogaya (2016) a su vez, comparó el efecto en 2 métodos de congelación, automatizado y convencional en material seminal porcino, resultando que el semen congelado/descongelado con equipo es una técnica práctica, efectiva y rápida que a la evaluación de sus parámetros post-congelación no presentó morfoanomalías en el semen.

Carpio, Cadillo, & Mellisho (2017) y Ribeiro-Peres y colaboradores (2014) publicaron estudios sobre criopreservación de material seminal extraído directamente de la cola del epidídimo mediante dos métodos de congelación: automatizado y convencional en verracos y bovinos reproductores respectivamente; resultando que las muestras espermáticas frescas presentaron mejores resultados en todos los parámetros post-congelación sometidos bajo los 2 métodos; sin embargo, siempre se obtuvo parámetros más elevados para el método de congelación automatizado.

4.3. Limitaciones

- Los reproductores seleccionados para el estudio no procedieron del mismo lugar, lo cual extendió el tiempo de la metodología práctica en la realización del examen clínico y andrológico.
- Algunos de los sementales no cumplieron con las limpiezas seminales estipuladas cada 2 días por 1 semana, por motivo de tiempo y coordinación con los palafreneros de cada lugar donde se encontraban los equinos.
- Todas las colectas fueron realizadas en presencia de una yegua maniquí en celo; por ende, la programación de la colección de muestras varió en días.

- La sincronización de celo con las yeguas fue una de las mayores limitaciones, ya que hubo problemas en la coordinación de los días para las limpiezas y la colecta de la muestra.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

Los reproductores seleccionados fueron capaces de entregar un semen de calidad siendo aptos para crioconservación.

Las variables volumen, color y pH y motilidad total, motilidad progresiva, concentración seminal y número total de espermatozoides fueron valorados de manera objetiva en el análisis precongelación para cada variable por reproductor, obteniendo resultados similares.

Para el análisis de comparación entre los 2 métodos de congelación, no se encontraron diferencias significativas en los tiempos de descongelación debido a un reducido tamaño de la muestra.

Al valorar los resultados individuales de cada método de congelación se determinó que para la congelación con descenso controlado con equipo (tk-3000) hubo menor pérdida de la calidad espermática en el tiempo de evaluación; lo que quiere decir, es que ambos métodos sirven para crioconservar semen equino.

5.2. Recomendaciones

- Siendo el principal objetivo tener representantes de la raza criollo-ecuatoriana altamente fértiles para que extiendan estos genes, es importante profundizar desde la colecta seminal, precongelación y postcongelación en eficiencia reproductiva.
- La selección de los equinos debe ser lo más homogénea posible en raza, edad, registro de montas y crías, alimentación, estado físico y

clínico.

- Se debe considerar la implementación de un protocolo de caracterización andrológica específica por raza equina.
- Los reproductores seleccionados para la toma de muestra seminal, deben cumplir con al menos una semana previa de vaciamiento gonadal para obtener mejores parámetros seminales.
- Considerar un estudio de mediciones testiculares con ultrasonografía para identificar ancho y longitud de las glándulas sexuales accesorias en sementales considerados de catálogo comercial.
- El examen andrológico debe incluir mediciones testiculares de cada reproductor.
- Para determinar motilidad total, motilidad progresiva, concentración, número total de espermatozoides, morfología, fragmentaciones de ADN, leucocitos, vitalidad y reacciones del acrosoma se utiliza un analizador de esperma automático (sistema CASA), ya que la utilización de sistemas manuales, como la cámara de Neubauer consume tiempo en el momento de la evaluación seminal y los parámetros son subjetivos.
- Se recomienda la evaluación de integridad y funcionalidad de membrana para lograr un estudio con mayor especificidad en los resultados.

REFERENCIAS

- Domingo Perez, D., Acosta, M., Restrepo, G., Camacho, C., & Perez, J. (21 de julio de 2017). FREEZING OF EQUINE SEMEN UNDER TWO SCHEMES OF ADDITION OF DIMETHYLFORMAMIDE. *Vet Perú*.
- Duque, J. E., Rojano, B., & Restrepo, G. (11 de noviembre de 2016). CRYOTOLERANCE OF STALLION SEMEN FROZEN WITH ADDITIVES IN THE EXTENDER. *Vet Perú*.
- Catro Cruz, Jefferson Abdelo; Chacon Jaramillo, Liliana. (1 de junio de 2016). *Generalities of the process of equine sperm conservation: a review from the sperm freezing veterinary science*. Recuperado el noviembre de 2019, de Conexión Agropecuaria: https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=11&ved=2ahUKEwja14348tDIAhVPuVvKkHb_CAdcQFjAKegQIABAC&url=https%3A%2F%2Fwww.jdc.edu.co%2Frevistas%2Findex.php%2Fconexagro%2Farticle%2Fdownload%2F54%2F52%2F&usg=AOvVaw0YQmmBWjav4MA6hbphW1L1
- JICA. (23 de abril de 2017). *REPRODUCCIÓN ANIMAL*. Obtenido de INSTITUTO NACIONAL TECNOLÓGICO: https://www.jica.go.jp/project/nicaragua/007/materials/ku57pq0000224spz-att/Reproduccion_Animal.pdf
- J. W. (2010). *UNIVERSIDAD DE LA SALLE Facultad de Ciencias Agropecuarias Programa de Medicina Veterinaria*. Obtenido de 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.: <http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/handle/10185/6109/T14.10%20W488a.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Cepeda, L. G., & Dalmau, C. S. (2014). *UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID FACULTAD DE VETERINARIA Departamento de Medicina y Cirugía Animal*. Obtenido de Optimización de las técnicas de acondicionamiento del semen equino: <https://eprints.ucm.es/24898/1/T35236.pdf>
- Universidad Autónoma del Estado de México. (2015). EL SECTOR ECUESTRE Y LA ECONOMÍA. *ARCHIVOS DE ZOOTECNIA*, 65(252), 488.
- P. C., R. S., & J. R. (june de 2014). SPERM SELECTION IN FROZEN/THAWED SEMEN OF EQUINE: Evaluation of plasma, acrosome membranes and mitochondrial membrane potential. *International Journal of Morphology*, 32(2).
- D. D., M. A., G. R., C. C., & J. P. (21 de julio de 2017). FREEZING OF EQUINE SEMEN UNDER TWO SCHEMES OF ADDITION OF DIMETHYLFORMAMIDE. *Revista de Investigación Veterinaria de Perú*.
- Valencia, A. E., Mentuy, A. G., & Boada, M. G. (2016). *INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN CABALLOS*. Obtenido de UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BUENOS AIRES: https://ddd.uab.cat/pub/trerecpro/2009/80139/inseminacion_artificial_en_caballos.pdf

- Díaz, N. (2010). CARACTERÍSTICAS DEL EYACULADO EQUINO Y VARIACIONES ESTACIONALES. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA. *Ciencia y Tecnología Ganadera*, 4(1), 23-30.
- Tamay Siguenza, E. F., & Velez Sandoval, F. A. (2018). FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA. Recuperado el noviembre de 2019, de "Efecto de la melatonina en la criopreservación de espermatozoides equinos": <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/31065/1/trabajo%20de%20titulación.pdf>
- Veloz Veloz, D. M. (2017). "Evaluación de la calidad espermática de reproductores bovinos mediante el uso de sistemas de evaluación seminal convencional y sistema CASA (análisis seminal asistido por computadora) y su respuesta con la fertilidad por inseminación artificial". Recuperado el noviembre de 2019, de Universidad de Cuenca: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/28466/1/Trabajo%20de%20titulación.%20pdf.pdf>
- Reproducción equina. (2 de mayo de 2016). Recuperado el noviembre de 2019, de <file:///Users/macbookpro/Downloads/4993-1-14753-1-10-20101004.html>
- Ortega Ferrusola, C. (21 de enero de 2011). FACTORES IMPLICADOS EN LA VARIABILIDAD INDIVIDUAL EN LA RESPUESTA A LA CONGELACIÓN DEL EYACULADO EQUINO: ESTRUCTURA DE SUBPOBLACIONES, ESTRÉS OXIDATIVO Y CAMBIOS APOPTÓTICOS. Recuperado el noviembre de 2019, de Universidad de Extremadura: <https://biblioteca.unex.es/tesis/9788469494349.pdf>
- Toro Montoya, A. I. (20 de febrero de 2009). Espermograma. *Medicina & Laboratorio*, 15(3-4).
- Morel, D. (1999). *EQUINE Artificial Insemination* (Vol. II). New York, USA: CABI Publishing.
- INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGÍA E HIDROLOGÍA. (2017). ANUARIO ETEOROLÓGICO. Obtenido de ANUARIO ETEOROLÓGICO: http://www.serviciometeorologico.gob.ec/docum_institucion/anuarios/meteorologicos/Am_2013.pdf
- Contreras, P., Ernst, S., & Saelzer, P. (1991). *Archivos de Medicina Veterinaria* (Vol. XXIII). Casilla 567 - Valdivia, Chile.
- Toribio Sequeria, L. (2018). ANDROLOGÍA E INSEMINACIÓN ARTIFICIAL. Obtenido de Facultad de Ciencia Animal Departamento de Medicina Veterinaria: (Godoy, 1982)
- SCIELO. (octubre de 2009). Acrosomal integrity and biochemical functionality assessment of the sperm membrane in boars with persistent cytoplasmic droplets. *CIENT*, 19(5).
- Francisca Cox Leixelard, M. A. (2005). UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS INSTITUTO DE REPRODUCCIÓN ANIMAL. Obtenido de CARACTERIZACIÓN ANDROLÓGICA DE POTROS DE RAZA CHILOTA: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2005/fvc877c/doc/fvc877c.pdf>

- Restrepo Betancur, G., Usuaga Suarez, A., & Rojano, B. (enero-junio de 2013). Techniques for analyzing the potential fertility of stallion semen. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 8(1), 69-81.
- Cabrera, P., Sanchez, R., & Risopatron, J. (2014). Sperm Selection in Frozen/Thawed Semen of Equine: Evaluation of Plasma, Acrosome Membranes and Mitochondrial Membrane Potential. *International Journal of Morphology*, 32(2).
- Restrepo, G., Ocampo, D., & Velasquez, A. (2019). ASSESSMENT OF CRYOPRESERVED SPERM MOTILITY FROM COLOMBIAN CREOLE STALLIONS BY SPERM CLASS ANALYZER. Obtenido de Movilidad semen criopreservado: <http://www.scielo.org.co/pdf/rudca/v16n2/v16n2a19.pdf>
- Cabrera, P., Sanchez, R., & Risopatron, J. (2018). Sperm Selection in Frozen/Thawed Semen of Equine: Evaluation of Plasma, Acrosome Membranes and Mitochondrial Membrane Potential. *International Journal of Morphology*.
- Gil Huerta, L., Lozano Benito, D., & Alvarez San Martin, C. (julio-septiembre de 2019). Effect of seminal plasma addition on frozen-thawed equine semen. *Sanidad Militar*, 67(3).
- Cox Leixelard, M. A. (2018). *CARACTERIZACIÓN ANDROLÓGICA DE POTROS DE RAZA CHILOTA*. Recuperado el enero de 2020, de UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS INSTITUTO DE REPRODUCCIÓN ANIMAL: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2005/fvc877c/doc/fvc877c.pdf>
- Dowsett, K., & Knott, L. (Agust de 1996). The influence of age and breed on stallion semen. *PubMed*, 3(46).
- Ochoa, A., Bruno, S., & Fumuso, E. (mayo de 2016). "Evaluación de diferentes tiempos y fuerzas g en semen equino. Caracterización del sobrenadante". Recuperado el enero de 2020, de Facultad de Ciencias Veterinarias - UNCPBA-: <https://www.ridaa.unicen.edu.ar/xmlui/bitstream/handle/123456789/622/Tesis%20Ochoa%2C%20Agust%C3%ADn.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Jhonson, L., & Neaves, W. (24 de April de 1981). Age-related changes in the Leydig cell population, seminiferous tubules, and sperm production in stallions. *PubMed*, 3, 703-12.
- Perry, T. (2015). *REPRODUCTION IN DOMESTIC ANIMALS*. San Diego, California, EEUU: ACADEMIC PRESS, INC.
- Araya, O. (2014). Archivos de medicina veterinaria. *Revista Oficial de la Asociación Nacional de escuelas de Medicina Veterinaria*, XIV(1).
- Porte, E. (2016). *Equinos de tiro* (Vol. 18). Santiago de Chile, Chile: Editorial Universitaria, S.A.
- Buzon Cuevas, A. (septiembre de 2013). *Análisis cinético y morfométrico del espermatozoide del caballo empleando el sistema Sperm Class Analyzer*. Obtenido de UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA FACULTAD DE VETERINARIA DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL: <https://helvia.uco.es/bitstream/handle/10396/11586/2014000000902.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Palma, G. (2012). *Biología de la reproducción* (Vol. 1). (G. Palma, Ed.) Buenos Aires, Argentina.
- de Alba, J. (2017). *Reproducción y genética animal* (Vol. 15). (I. i. O.E.A, Ed.) Turrialba, Costa Rica: SIC.
- Hidalgo Ordoñez, C., Tamargo Miguel, C., & Diez Monforte, C. (2015). *Análisis del semen bovino*. Recuperado el enero de 2020, de GOBIERNO DEL PRINCIPADO DE ASTURIAS: <https://ria.asturias.es/RIA/handle/123456789/192>
- Muiño, R., & Fernandez, M. (2005). *NUEVAS TECNOLOGÍAS APPLICADAS AL PROCESADO Y EVALUACIÓN DEL SEMEN BOVINO EN CENTROS DE INSEMINACIÓN ARTIFICIAL*. Recuperado el enero de 2020, de http://citarea.cita-aragon.es/citarea/bitstream/10532/1154/1/10532-1064_1.pdf
- Hurtgen, J., & Johnson, L. (2016). Fertility of stallions with abnormalities of the sperm acrosome. *EUROPE PCM*.
- Miro Arias , M. (2015). *ANÁLISIS DEMOGRÁFICO Y CARACTERIZACIÓN SEMINAL DEL CABALLO DE LAS RETUERTAS DE DOÑANA*. Recuperado el enero de 2020, de DEPARTAMENTO DE GENÉTICA DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA : http://www.uco.es/zootecniaygestion/img/pictorex/02_09_37_tesis_maria_miro.pdf
- Cabrera , P., Sanchez, R., & Risopatron, J. (junio de 2014). Sperm Selection in Frozen/Thawed Semen of Equine: Evaluation of Plasma, Acrosome Membranes and Mitochondrial Membrane Potential. *International Journal of Morphology*, 32(2).
- Rodriguez , P., Franco, E., & Jimenez, C. (2008). eStAndARizACión de LA PRueBA PARA eSPeCtRofotoMetRÍA en LA MediCión de ConCentRACión de SeMen Bovino, equino, PoRCino, ovino y CAnino. *REV.MED.VET.ZOOT*, 1(55), 22-28. Obtenido de Universidad Nacional, Clínica de la Reproducción Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.: https://www.researchgate.net/publication/336870010_Estandarizacion_de_la_prueba_para_espectrofotometria_en_la_medicion_de_concentracion_de_semen_bovino_equino_porcino_ovino_y_canino
- Toro Montoya, A. I. (20 de febrero de 2009). Espermograma. *Medicina y Laboratorio*, 15(3-4), 145-169.
- Toniolli, R. (octubre de 2015). Use of powder coconut water as extender (ACP-103®) for boar semen longer preservation: in vitro and in vivo evaluations. *ARQ. BRAS. MED. VET. ZOOT*.
- Galarza, D., Serpa, V., & Torres, C. (2015). *Comparación de dos medios para congelar semen de toro y la influencia de tres tiempos de equilibración en la calidad post-descongelación* . Recuperado el enero de 2020, de MASKANA, 1er CONGRESO INTERNACIONAL DE PRODUCCIÓN ANIMAL ESPECIALIZADA EN BOVINOS, 2015 : https://www.researchgate.net/publication/297734719_Comparacion_de_dos_medios_para_congelar_semen_de_toro_y_la_influencia_de_tres_ti

- empos_de_equilibracion_en_la_calidad_post-descongelacion/link/56e1ee1b08ae3328e076b21f/download
- Caldevilla, M., Ferrante, A., Pendola, C., & Mirogaya, M. (2016). *Comparison of the effect of two freeze-thawing curves for porcine semen. preliminary results*. Recuperado el enero de 2020, de spermova: https://www.researchgate.net/publication/313287597_Comparacion_del_efecto_de_dos_curvas_de_congelacion_de_semen_porcino_Resultados_preliminares/link/58b6a89145851591c5d308fb/download
- Carpio, M., Cadillo, J., & Mellisho, E. (enero-junio de 2017). Effect of two freezing methods on sperm viability of boar semen. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 19(1).
- Ribeiro-Peres, A., Munita-Barbosa, L., Yumi-Kanazawa, M., Mello-Martins, M., & Fereira de Souza, F. (2014). Cryopreservation of bovine spermatozoa from the epididymal tail using conventional and automated methods. *Archivos de medicina veterinaria*, 46(1).
- Trejos Soto, A. A. (2009). *MANEJO REPRODUCTIVO DEL SEMEN EQUINO*. Recuperado el febrero de 2020, de UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO": <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/2952/ARTURO%20ADOLFO%20TREJOS%20SOTO.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú. (julio de 2016). Cryotolerance of stallion semen, oxidative stability and components of seminal plasma. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 27(3).
- Usuga, A., Restrepo, G., & Rojano, B. (julio de 2016). Cryotolerance of stallion semen, oxidative stability and components of seminal plasma. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 27(3).
- Equus y Taurus CIENCE. (2016). *Biotecnología de la reproducción equina*. Recuperado el 2019, de SECUENCIA PARA LA CONGELACIÓN DE SEMEN EQUINO: <http://revistas.ces.edu.co/index.php/mvz/article/viewFile/984/1920>
- Charles, C. (s.f.). Reproductive Examination of the Stallion: Evaluation of Potential Breeding Soundness.

