

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

FACULTAD AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



“EVALUACIÓN DE DOS ANTIOXIDANTES EN LA CALIDAD SEMINAL POST CONGELACIÓN DE DOS BIOTIPOS DE GANADO BOVINO CRIOLLO DE LA PROVINCIA DE LOJA”

Trabajo de tesis previo a la obtención del título de
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

AUTOR

Eduardo Andrés Ludeña Ortiz

DIRECTOR

Dr. Lenin Aguirre Riofrío Ph. D

LOJA – ECUADOR

2019

CERTIFICACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS

Dr. Lenin Aguirre Riofrío Ph.D


DIRECTOR DE TESIS

CERTIFICA

Que he revisado la presente tesis titulada “EVALUACIÓN DE DOS ANTIOXIDANTES EN LA CALIDAD SEMINAL POST CONGELACIÓN DE DOS BIOTIPOS DE GANADO BOVINO CRIOLLO DE LA PROVINCIA DE LOJA” realizada por el Sr. Egresado **Eduardo Andrés Ludeña Ortiz**, la misma que **CULMINÓ DENTRO DEL CRONOGRAMA APROBADO**, cumpliendo con todos los lineamientos impuestos por la Universidad Nacional de Loja, por lo cual, **AUTORIZO QUE SE CONTINÚE CON EL TRÁMITE DE GRADUACIÓN.**

Loja, 29 de agosto del 2019

Atentamente



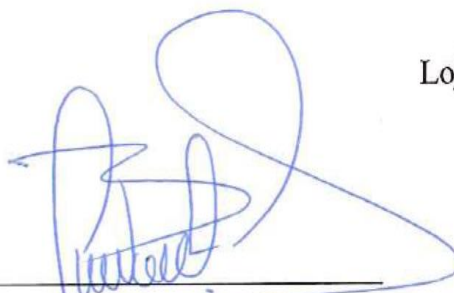
Dr. Lenin Aguirre Riofrío Ph. D
DIRECTOR DE TESIS

CERTIFICACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Que el trabajo de tesis titulado: **“EVALUACIÓN DE DOS ANTIOXIDANTES EN LA CALIDAD SEMINAL POST CONGELACIÓN DE DOS BIOTIPOS DE GANADO BOVINO CRIOLLO DE LA PROVINCIA DE LOJA”** de la autoría del señor egresado, **EDUARDO ANDRÉS LUDEÑA ORTIZ** previo a la obtención del título de Médico Veterinario Zootecnista, ha incorporado las observaciones realizadas por el tribunal en el momento de la calificación.

Por lo que se autoriza la impresión del trabajo y continuar con los trámites de graduación.

Loja, 14 de octubre de 2019



Dr. Manuel Quezada Padilla Ms. Sc
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL



Dra. Carolina Serrano Recalde PhD
VOCAL



Dr. Edwin Mizhquero Rivera Ms. Sc
VOCAL

AUTORÍA

Yo, **Eduardo Andrés Ludeña Ortiz**, declaro ser autor del presente trabajo de tesis que ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos, de posibles reclamos o acciones legales, por el contenido de esta; los conceptos, ideas, resultados, conclusiones, y recomendaciones vertidos en el desarrollo del presente trabajo de investigación, son de absoluta responsabilidad de su autor.

Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja, la publicación de mi tesis en el Repositorio Institucional-Biblioteca Virtual.

AUTOR: Eduardo Andrés Ludeña Ortiz

FIRMA: 

CÉDULA: 1104711815

FECHA: octubre 2019

**CARTA DE AUTORIZACIÓN DE TESIS POR PARTE DEL AUTOR PARA LA
CONSULTA, REPRODUCCIÓN PARCIAL O TOTAL Y PUBLICACIÓN
ELECTRÓNICA DEL TEXTO COMPLETO**

Yo **Eduardo Andrés Ludeña Ortiz**, declaro ser el autor de la tesis titulada “EVALUACIÓN DE DOS ANTIOXIDANTES EN LA CALIDAD SEMINAL POST CONGELACIÓN DE DOS BIOTIPOS DE GANADO BOVINO CRIOLLO DE LA PROVINCIA DE LOJA”, como requisito para optar al grado de Médico Veterinario Zootecnista, autorizo al Sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que con fines académicos, muestre al mundo la reproducción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera, en el Repositorio Digital Institucional (RDI): Las Personas puedan consultar el contenido de este trabajo en el RDI, en las redes de Información del país y del exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad.

La Universidad Nacional de Loja, no se responsabiliza por el plagio o copia de la tesis que realice un tercero, con fines académicos.

Para constancia de esta autorización, firmo en la ciudad de Loja, a los XX días del mes de octubre del 2019.

FIRMA: 

Autor: Eduardo Andrés Ludeña Ortiz

Cédula de identidad: 1104711815

Dirección: Loja, Azuay y Lauro Guerrero, IV Centenario

Correo electrónico: ed_andres94@hotmail.com

Teléfono: 0988453597

DATOS COMPLEMENTARIOS

Director de tesis:

Dr. Lenin Aguirre Riofrío Ph. D

Tribunal de grado:

Dr. Manuel Quezada Padilla Ms. Sc (presidente)

Dr. Edwin Mizhquero Rivera Ms. Sc (vocal)

Dra. Carolina Serrano Recalde Ph. D (vocal)

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por darme salud, fortaleza y perseverancia para poder culminar mis estudios universitarios, a mi madre Alexandra Elizabeth Ortiz Calle, mis hermanos, mis tíos y abuelita por el incondicional apoyo brindado tanto moral como económicamente y a Salomé quien supo incentivar me día a día para cumplir y culminar exitosamente esta meta.

Agradezco a la Universidad Nacional de Loja por abrirme las puertas y permitirme realizar mi formación académica en esta noble institución.

Agradezco a mi tutor de tesis el Dr. Lenin Aguirre y al Dr. Hugo Viñan quienes supieron guiarme y brindarme su apoyo durante todo el desarrollo de este trabajo de investigación.

A mis docentes gracias por su tiempo, por su apoyo, así como por su sabiduría transmitida en el desarrollo de mi formación profesional.

A mis amigos y compañeros por compartir experiencias y conocimientos durante toda esta etapa de mi vida.

Eduardo Andrés Ludeña Ortiz

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo de titulación a Dios por darme la sabiduría y capacidad para poder culminar con mis estudios universitarios, a mi madre Alexandra, mis hermanos Yarey, Dayanara, Juan José y Valentina; mis tíos, abuelita y a Salomé quienes me apoyaron incondicionalmente y no permitieron que me dé por vencido y darme las fuerzas necesarias para culminar este propósito.

A ustedes esta dedicatoria, los quiero mucho

Eduardo Andrés Ludeña Ortiz

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. BOVINO CRIOLLO DE LA REGIÓN SUR DEL ECUADOR	3
2.2. OBTENCIÓN DE SEMEN BOVINO	5
2.2.1. Evaluación física.....	5
2.2.2. Manejo nutricional.....	5
2.2.3. Conducta sexual del toro	6
2.3. MANEJO ADECUADO DE LA COLECTA Y CRIO PRESERVACIÓN	7
2.3.1. Estímulo sexual antes de la colecta.....	7
2.3.2. Colecta de semen con Vagina artificial	7
2.4. EVALUACIÓN DEL SEMEN BOVINO	9
2.4.1. Examen macroscópico	9
2.4.2. Examen microscópico	10
2.5. ANTIOXIDANTES	2
2.5.1. Antioxidantes Primarios.....	2
2.5.2. Antioxidantes Secundarios	3
2.5.3. Antioxidantes Terciarios.	3
2.5.4. Acción ROS (Especies reactivas a Oxígeno) en células espermáticas	4
2.6. CONGELACIÓN DE SEMEN BOVINO	4
2.6.1. Diluyentes Utilizados para la Congelación del Semen Bovino.....	5
2.6.2. Crio protectores	5
2.6.3. Principios de Preservación de Semen.....	6
2.6.4. Procedimiento de crío conservación.....	7
2.6.5. Proceso de descongelado.....	9
3. METODOLOGÍA	13
3.1. Materiales	13
3.1.1. Materiales de campo	13
3.1.2. Materiales de Laboratorio	13
3.1.3. Materiales de Oficina.....	14
3.2. Metodología	15
3.2.1. Ubicación	15
3.2.2. Descripción e identificación de las Unidades Experimentales (UE).....	16
3.2.3. Diseño experimental.....	16
3.2.4. Descripción de los tratamientos	17

3.2.5.	Manejo de los toros	17
3.2.6.	Método y frecuencia de recolección seminal	17
3.2.7.	VARIABLES DE ESTUDIO	17
3.2.8.	Toma y registro de datos	18
3.2.9.	Conservación del material seminal de bovinos criollos	21
3.2.10.	Análisis estadístico	22
4.	RESULTADOS	23
5.	DISCUSIÓN	29
6.	CONCLUSIONES	32
7.	RECOMENDACIONES	33
8.	BIBLIOGRAFÍA	34

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Calificación del líbido sexual.....	16
Tabla 2. Calificación del toro según el líbido.....	16
Tabla 3. Evaluación motilidad individual.....	21
Tabla 4. Características macro y microscópicas del material seminal de bovinos criollos en fresco.....	48
Tabla 5. Características microscópicas del material seminal de bovinos criollos en fresco por biotipo.....	49
Tabla 6. Características microscópicas del material seminal de bovinos criollos en fresco por tratamiento.....	50
Tabla 7. Características microscópicas del material seminal de bovinos criollos post congelación por biotipo.....	51
Tabla 8. Características microscópicas del material seminal de bovinos criollos post congelación por tratamiento.....	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Bovino Negro Lojano.....	14
Figura 2. Bovino Encerado.....	14
Figura 3. Vagina artificial bovina.....	18
Figura 4. Diluyente Andromed.....	26
Figura 5. Diluyente Triladyl.....	26

**“EVALUACIÓN DE DOS ANTIOXIDANTES EN LA CALIDAD SEMINAL POST
CONGELACIÓN DE DOS BIOTIPOS DE GANADO BOVINO CRIOLLO DE LA
PROVINCIA DE LOJA”**

RESUMEN

La investigación tuvo como objetivo comprobar si la incorporación de antioxidantes al diluyente ayuda a mantener la calidad seminal luego del proceso de crio preservación. Para ello se utilizó dos antioxidantes, vitamina E y vitamina C a una concentración de 2mM y 2,5 mM respectivamente. El estudio se llevó a cabo utilizando bovinos criollos del biotipo Encerado y Negro Lojano de 2 a 6 años, utilizando vagina artificial se colectó un total de 12 eyaculados (3 eyaculados por toro), se analizó características macroscópicas (Volumen y densidad) y microscópicas (motilidad total, motilidad progresiva, vitalidad espermática y anormalidades morfológicas). Posteriormente se dividió en 4 alícuotas para los diferentes tratamientos T1 (Control Triladyl), T2 (Control Andromed), T3 (Triladyl + vitamina C) y T4 (Triladyl + vitamina E); se realizó una pre dilución 1:1, luego se procedió a hacer la dilución total ajustando a 50 millones de spz/ml y su envasado en pajillas de 0,5 ml; se mantuvo a un tiempo de equilibrio de 12 horas a +5 °C, posteriormente se sometieron a vapores de nitrógeno a 5 cm de distancia durante 5 minutos y luego sumergidos en nitrógeno líquido a -196 °C. Luego del descongelamiento se utilizó microscopía óptica para evaluar las características de motilidad total, motilidad individual, vitalidad espermática y anormalidades morfológicas. Se empleó el Diseño de bloques completamente aleatorizado (DBCA) para evaluar el efecto de la adición de vitamina E y vitamina C al diluyente y diferencias entre biotipo. Concluyendo que existe diferencia estadística ($P < 0,05$) entre tratamientos y biotipo, donde T4 (Triladyl + vitamina E) tiene mejores características en cuanto a motilidad total, motilidad progresiva, vitalidad espermática y anormalidades morfológicas frente a los tratamientos control. El biotipo Encerado posee mejor calidad seminal ($P < 0,05$) que el biotipo Negro Lojano tanto en fresco y post congelación.

Palabras clave: Antioxidantes, vitamina E, Vitamina C, bovino criollo, crio preservación

ABSTRACT

The objective of this investigation was to verify if the addition of antioxidants to the semen extender maintain seminal quality after cryopreservation. Two antioxidants, vitamin E and vitamin C were used at a concentration of 2mM and 2.5mM respectively. The study was carried out using Creole cattle, Encerado and Negro Lojano biotype of 2 to 6 years old, a total of 12 ejaculates (3 ejaculated by bull) were collected using artificial vagina and macroscopic (Volume and density) and microscopic characteristics were analyzed (total motility, progressive motility, sperm vitality and morphological abnormalities). Later, it was divided into 4 aliquots for the different treatments T1 (Control Triladyl), T2 (Control Andromed), T3 (Triladyl + vitamin C) and T4 (Triladyl + vitamin E) and a 1: 1 pre-dilution was performed, then we proceeded to make a total dilution by adjusting to 50 million spz / ml and packaging in 0.5 ml straws; it was maintained at an equilibrium time of 12 hours at +5 ° C, subsequently subjected to nitrogen vapor 5 cm over the liquid nitrogen level for 5 minutes and then immersed in liquid nitrogen at -196 ° C. After thawing, optical microscopy was used to assess the characteristics of total motility, individual motility, sperm vitality and morphological abnormalities. The Completely randomized design (CRD) was used to evaluate the effect of the addition of vitamin E and vitamin C to semen extender and differences between biotype. In conclusion there is a statistical difference ($P < 0.05$) between treatments and biotype, where T4 (Triladyl + vitamin E) has better characteristics in terms of total motility, progressive motility, sperm vitality and morphological abnormalities versus control treatments; Encerado biotype has better seminal quality ($P < 0.05$) than the Negro Lojano biotype in both fresh and post-thaw semen.

Keywords: Antioxidants, vitamin E, Vitamin C, Creole cattle, cryopreservation

1. INTRODUCCIÓN

En la República del Ecuador evolucionaron al menos 6 razas o líneas bovinas denominadas como criollas, estos bovinos descienden directamente de animales que llegaron de la península Ibérica en el segundo viaje de Colón en 1493, estos animales llegaron a Centroamérica y desde ahí se difundieron por todo el continente adaptándose a una variedad de climas por consiguiente generando una diversidad genética, en la actualidad estos biotipos de ganado bovino están amenazadas o en peligro de extinción, dada la erosión de genes ocasionada por el cruzamiento indiscriminado con razas introducidas, aparentemente más productivas, en términos de rendimiento de carne o leche, pero con mayores exigencias nutricionales, menor adaptación al entorno, menos resistentes a enfermedades y ambientes adversos, esto obliga a que los productores realicen mayores inversiones para su mantenimiento. (Vidal, 2009 citado por Pesántez, 2015)

Como menciona Aguirre (2011), es de vital importancia no dejar desaparecer razas autóctonas de la zona como el Negro Lojano y Encerado ya que éstas poseen ciertas características de rusticidad y adaptabilidad a la alimentación con pastos de baja calidad nutritiva que han desarrollado durante más de 500 años de adaptación al medio y les permiten sobrevivir a dichas condiciones medioambientales desfavorables para otras razas que requieren un mayor cuidado.

Si bien las razas mejoradas que han sido introducidas en el país poseen características genéticas enfocadas en la productividad de leche y carne, presentan inconvenientes en adaptación a las condiciones ambientales, nutricionales y de manejo, utilizada normalmente por los ganaderos y productores, a esto sumado la poca resistencia que poseen a ectoparásitos y enfermedades.

Estas razas como el Negro lojano y Encerado son razas doble propósito, es decir, sirven para producir carne y leche, lo que beneficia a los pequeños productores en su comercialización ya que las razas mejoradas solo sirven para un propósito, leche o carne. (Aguirre, 2011)

La importancia de esta investigación incide en observar si la utilización de antioxidantes en la congelación de semen bovino como biotecnología reproductiva ayudará a conservar de mejor manera el material genético de las razas autóctonas de la provincia de Loja para su posterior uso en el mejoramiento genético local y el mantenimiento de la diversidad zoo genética, la aplicación de esta biotecnología reproductiva ha sido vista como una herramienta capaz de contribuir potencialmente a la conservación de estas razas, soportando la vitalidad de las poblaciones existentes a través del mantenimiento genético.

Esta biotecnología servirá para aprovechar las condiciones de adaptación y rusticidad de los animales criollos y la demanda de sus productos en el mercado, basándose en estas potencialidades, se debe mejorar e incrementar la crianza de los mismos, pues dichos animales son de gran importancia para el pequeño y mediano productor, puesto que solo los animales criollos han podido sobrevivir y producir algo, en condiciones medio ambientales de la zona y de manejo bastante precario en el cual un animal mejorado le sería imposible su subsistencia.

Esta investigación se planteó los siguientes objetivos:

1. Evaluar la calidad seminal post congelación utilizando dos antioxidantes (Vitamina E y vitamina C) en semen de bovinos Negro lojano y Encerado.
2. Evaluar macroscópica y microscópicamente la calidad pre y post congelación del material seminal de bovinos Negro lojano y Encerado.
3. Comprobar con cuál antioxidante (Vitamina E o vitamina C) se obtiene mejores resultados post congelación.
4. Conservar el material genético de las muestras seminales extraídas de los bovinos Negro Lojano y Encerado.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. BOVINO CRIOLLO DE LA REGIÓN SUR DEL ECUADOR

El ganado criollo ha sido parte importante del desarrollo de las ganaderías en Latinoamérica, ya que este en principio constituyó el hato fundador de la misma. La crianza de bovinos criollos aportó económicamente a las ganaderías latinoamericanas por más de 500 años y permitió desarrollar animales con condiciones de adaptación tropical únicas. El ganado bovino criollo ecuatoriano inicialmente estuvo compuesto por animales cruzados traídos por los españoles en el siglo XVI, los cuales aportaron ciertas características y en mayor grado a formar y dar estabilidad al nuevo bovino americano y ecuatoriano en particular (CIPCA, 2016).

Aguirre (2011) menciona que el ganado bovino Criollo (*Bos Taurus*) es un recurso genético que posee características deseables para el medio, las cuales se han desarrollado para la adaptación al ambiente tropical, unas de las principales características son resistencia a enfermedades, alta fertilidad, buenas cualidades maternas y longevidad, peculiaridades que benefician a los pequeños ganaderos.

La Sierra Medio-Alta de la provincia de Loja es una zona templada que se extiende en un rango de altitud comprendido entre los 1500 y 2800 m.s.n.m., la topografía de esta zona pertenece al tipo bosque seco Montano Bajo (bsMB) y bosque Montano (bM), su pluviosidad está entre 500 y 1000 mm/año, sus suelos poseen una media fertilidad y son bastante erosionados, la irregularidad de estos suelos provoca que el riego y mantención de las pasturas eleven el costo de producción (Aguirre, 2011).

En la provincia de Loja la producción de biomasa forrajera es escasa, debido a que está conformada solo por pastos naturalizados o adaptados al medio. Los bovinos criollos han desarrollado una adaptación a este tipo de pastos, pero, por manejo poco eficiente no han logrado poseer mejores características tanto productivas como reproductivas, sin embargo, se resaltan características tales como: elevado instinto materno, excepcional rusticidad y alta capacidad para aprovechar la escasa y variada vegetación natural a más de requerir una menor exigencia en la tecnificación de las condiciones de crianza (Aguirre, 2011).

Los principales biotipos de bovinos criollos que se encuentran en la provincia de Loja son el Negro Lojano y Encerado. Las características que posee el biotipo Negro Lojano son: tamaño mediano, un pelaje completamente negro brillante, corto y liso, también pueden poseer

ciertas zonas de color blanco en pecho, parte ventral, extremidades y cola, papada poco prominente, cuello corto y descarnado, orejas largas y penduladas, cuernos largos en forma de lira, su temperamento no es tan dócil. Según sus caracteres morfológicos, el bovino criollo Negro Lojano se destaca por tener cabeza fina, perfil recto y longitud larga, el 85% de estos ejemplares poseen defectos en aplomos siendo plantados de frente y remetidos de atrás, en cuanto a características morfométricas estos bovinos son ejemplares pequeños y de poca condición corporal (bajo peso), (Aguirre, 2011).



Figura 1. Bovino Negro Lojano
Fuente: Autor

De acuerdo con Aguirre (2011), los bovinos Encerado se caracterizan por su pelaje corto y liso de una tonalidad mezclada entre el café claro y café oscuro. Los bovinos Encerados son de tamaño mediano, de poca condición corporal, se destacan por tener la cabeza fina, perfil recto y de longitud larga, cuello corto y descarnado, orejas pequeñas con dirección horizontal, los cuernos se disponen en forma de lira, cerca del 80% de estos animales poseen defectos de aplomos, similar al biotipo Negro Lojano.



Figura 2. Bovino Encerado
Fuente: Autor

2.2. OBTENCIÓN DE SEMEN BOVINO

Para conocer los parámetros reproductivos de un toro éste es sometido a un proceso de colecta de semen, ya sea en campo o en un centro de inseminación artificial; cabe mencionar que la calidad seminal está influenciada directamente por el manejo de los toros durante la colecta y del conocimiento profundo e individual de cada toro, una manejo adecuado durante la colecta da como resultado un material seminal idóneo y evita estrés en los animales (Guerrero, 2014).

Algunas características que se deben tomar en cuenta antes de realizar una evaluación seminal son:

2.2.1. Evaluación física

Se realiza un examen clínico general y se analiza todas las condiciones físicas del macho, con especial interés en los genitales externos, realizando observación y palpación, otro punto muy importante al momento de realizar el examen físico es la inspección las extremidades principalmente las posteriores en búsqueda de lesiones o mala conformación que pudieran conducir a cojera, ruptura de ligamentos y meniscos o pérdida de la estabilidad, debido a que muchos animales tienen dificultad al montar debido a dolor o imposibilidad anatómica de sus miembros en el momento del salto. El macho debe caminar, trotar, ver, oler y tener la capacidad de detectar y servir hembras en celo. Cualquier factor de los antes mencionados que afecte una de estas actividades traerá como consecuencia una menor eficiencia reproductiva del macho. (Bavera & Peñafort, 2005).

2.2.2. Manejo nutricional

La condición corporal del macho debe ser óptima; de 2.5 a 3 en un rango 1-5, machos mal alimentados y con bajo peso corporal pueden tener lesionados los testículos irreversiblemente o su recuperación puede ser muy lenta es por ello por lo que se debe mantener una buena alimentación, administración de sales minerales y un correcto manejo de los reproductores para obtener características reproductivas favorables. En el caso de toretes jóvenes la pubertad podría estar atrasada. Por lo tanto, no se debe escoger machos menores a 18 meses de edad con baja condición corporal (Muñoz & Paucar, 2005).

2.2.3. Conducta sexual del toro

El comportamiento o conducta sexual del macho es de vital importancia ya que éste influye en el éxito del apareamiento y en la supervivencia de las crías. La conducta sexual se valora por el tiempo de reacción o habilidad sexual, libido y capacidad de servicio del macho, evaluados a partir de los 24 meses de edad o desarrollo de la pubertad del macho. La libido es el deseo de un toro para montar, se lo valora de acuerdo con el tiempo de reacción del toro en presencia de una hembra durante un periodo de 10 minutos (Hafez, 2002).

La libido se valora en una escala de puntaje de 0 a 10 y se mide de acuerdo con la actitud del macho al contacto con la hembra y se la interpreta de la siguiente manera:

Tabla 1. Calificación del libido sexual

0= El toro no muestra interés sexual
1= Mostró interés sexual una sola vez
2= Interés sexual por la hembra en más de una sola vez
3= Activa atención a la hembra, con persistente interés sexual
4= Una monta o intento de monta, pero sin ningún servicio
5= Dos montas o intento de monta, sin ningún servicio
6= Más de dos montas o intento de monta, sin ningún servicio
7= Un servicio sin que se prosiga el interés sexual
8= Un servicio seguido de interés sexual con monta o intento de monta
9= Dos servicios sin que se prosiga el interés sexual
10= Dos servicios seguidos de interés sexual con monta, intento de monta o servicio

Fuente: De La Torre, 1999

Y la calificación está dada de la siguiente manera:

Tabla 2. Calificación del toro según el libido

0 – 3 puntos, el toro se lo califica como malo.
4 – 6 puntos, el toro se lo califica como bueno.
7 – 8 puntos, se lo califica como muy bueno.
9 – 10 puntos, se lo califica como excelente.

Fuente: De La Torre, 1999

2.3. MANEJO ADECUADO DE LA COLECTA Y CRIO PRESERVACIÓN

Según Chamorro (2005), para realizar la crío preservación de semen lo primero que hay que hacer es realizar una adecuada colección del semen del macho. La colecta del semen se puede realizar mediante dos métodos: Electro eyaculación y con vagina artificial.

2.3.1. Estímulo sexual antes de la colecta

Guerrero (2014), menciona que los patrones de la conducta sexual o de cortejo son el despertar sexual, cortejo (exhibición sexual), erección, protrusión del pene, monta, introducción, eyaculación, desmonta y la retracción del pene. Los patrones más frecuentes son el acto de olfatear y lamer, éstos permiten una buena comunicación química. El oler la orina de la vaca, levantar la cabeza y retraer el labio superior es conocido como el reflejo de Flehmen.

El lugar donde se realiza la colecta de semen debe contar con un puesto de monta, piso sólido y anti resbalante, defensas de seguridad y un ambiente de trabajo acorde con la actividad que se realiza (evitar ruidos y distracciones), preferiblemente debe estar ubicado lo más próximo al laboratorio (Guerrero, 2014).

2.3.2. Colecta de semen con Vagina artificial

Según Mejía (2017), la vagina artificial es el método más práctico y el cual da mejores resultados debido a que se simula la monta natural. La vagina artificial bovina consiste en un tubo rígido con una manga de goma que se llena con agua tibia (40°C) con el fin de simular la temperatura corporal de la vaca (Chamorro, 2005).



Figura 3. Vagina artificial bovina
Fuente: Minitube

La vagina artificial está compuesta por:

2.3.2.1. Cuerpo

Consiste en un tubo de plástico rígido de 40-50 cm de largo y 7-10 cm de diámetro, el cual posee un orificio en el centro para añadir el agua al momento de preparar la vagina artificial.

2.3.2.2. Funda o camisa interna

Tubo de látex que pasa por dentro del cuerpo de la vagina artificial, sirve para simular las paredes de la vagina, se sujeta firmemente en ambos extremos con bandas de caucho para evitar la salida del agua que se encuentra entre la camisa interna y el cuerpo de la vagina artificial.

2.3.2.3. Cono de látex

Se coloca en el extremo opuesto por donde ingresa el pene del macho y se sujeta con bandas de caucho para evitar fugas.

2.3.2.4. Tubo colector de semen

Este tubo debe ser milimetrado y se coloca en el otro extremo del cono; se debe utilizar una cubierta que sirva de protección al semen de la luz solar y de cambios de temperatura bruscos.

Para realizar la colecta del semen primero se arma la vagina artificial y se introduce agua a una temperatura de 50-60 °C, hasta llenar los dos tercios de su capacidad total. Chamorro (2005), recomienda que, al momento de recoger el semen, la temperatura óptima dentro de la vagina artificial debe ser de 38-39°C para que exista un adecuado estímulo en el macho y eyacule con normalidad.

Para iniciar con la colecta del semen se debe tener preparada la vagina artificial con la temperatura adecuada, luego se acerca el macho a la hembra en celo o maniquí. Cabe mencionar que para un manejo adecuado este procedimiento se debe realizar entre dos personas, una sujetando al macho y otra quien realiza la colecta. La persona encargada de manejar al reproductor se sitúa al lado contrario de la persona que realiza la colecta y cuando el toro eyacula ésta lo tira a su lado, la persona que sostiene la vagina artificial se coloca a la derecha del toro y mantiene la vagina artificial en la mano derecha, al momento de realizar la monta con la mano izquierda se sostiene el prepucio para dirigir el pene hacia la abertura de la vagina artificial. Para evitar que la erección sea inhibida no debe manipularse directamente el pene, ya que el toro luego puede negarse a montar; luego de que el macho eyacula se retira la

vagina artificial y el eyaculado o semen se deposita en el tubo colector para su posterior evaluación macro y microscópica en el laboratorio siempre cuidando que la muestra no entre en contacto con la luz solar o agua ni exista cambios bruscos de temperatura. (Chamorro, 2005)

2.4. EVALUACIÓN DEL SEMEN BOVINO

Luego de realizar la colecta de semen, éste debe conservarse en un baño maría o recipiente con agua a 37°C para evitar los cambios de temperatura que afectan los parámetros de calidad, es recomendable realizar una pre dilución 1:1 con el diluyente para conservar por mayor tiempo el semen.

La evaluación de la calidad seminal consta de dos partes: 1) examen macroscópico y 2) examen microscópico.

El analizar un eyaculado tiene como función de evaluar la calidad reproductiva de un toro y las pruebas de laboratorio son útiles para evaluar la calidad seminal, estas pruebas nos permiten relacionar si el toro posee buena o mala calidad seminal y de esto dependerá si el toro conviene conservarlo o buscar un reproductor con mejores características reproductivas (Dávalos, 2005).

2.4.1. Examen macroscópico

2.4.1.1. Volumen

Un eyaculado bovino va desde uno hasta ocho centímetros cúbicos. La mayoría de los toros proporcionan de 3 a 6 ml. Teniendo en cuenta que un toro mayor de 2 años debe tener un eyaculado de no menos de 4ml. Dicho valor puede oscilar entre 2 y 12ml. El toro eyacula entre 4 a 10 ml de semen con 800 a 2500 millones de espermatozoides por mililitro (Medina, 2007).

2.4.1.2. Color

El color depende de la cantidad de espermatozoides; cuando el semen posee mayor cantidad de espermatozoides presenta una coloración blanco-cremosa y cuando posee bajo número de espermatozoides su color es blanco-lechoso (Guerrero, 2014).

2.4.1.3. Olor

El semen en buenas condiciones presenta un olor denominado “sui géneris”. Como manifiesta Guerrero (2014), El olor a orina indica que el semen está contaminado con ésta. Y cuando se presenta un olor es muy desagradable, se sospecha alguna enfermedad en los testículos o en otra parte del aparato reproductivo.

2.4.1.4. Aspecto

Depende de la concentración de espermatozoides y se mide por el mayor o menor grado de opacidad que presenta la muestra de semen.

Aspecto	Densidad-Concentración estimada
Cre moso	1.500 a 2000 x10 ⁶ spz/ml
Cre moso-Le choso	1000 a 1500 x10 ⁶ spz/ml
Le choso	750 a 1000 x10 ⁶ spz/ml
Semi acuoso	300 a 500 x10 ⁶ spz/ml
Acuoso	200 x10 ⁶ spz/ml

Fuente: (Ibañez, 2016)

2.4.1.5. pH

Se determina mediante el empleo de una cinta colorimétrica, su valor varía entre 6,4 a 6,9; valores por encima de 6,9 son indicativos de semen de baja calidad (Guerrero, 2014).

2.4.2. Examen microscópico

2.4.2.1. Motilidad Total

La motilidad total es evaluada de forma subjetiva, tomando una gota de semen fresco o diluido y directamente al microscopio de luz con objetivo de 40X, su evaluación es expresada en porcentaje, la muestra se coloca sobre una lámina portaobjetos previamente calentada y se observa (Chamorro, 2005).

2.4.2.2. Motilidad Progresiva

Se evalúa colocando sobre el portaobjetos una gota de semen diluido. Luego se coloca un cubreobjetos y se observa al microscopio con mayor aumento. De acuerdo con el movimiento progresivo, el semen se clasifica de la siguiente manera:

Tabla 3. Evaluación motilidad progresiva

Semen muy bueno	Igual o mayor de 70% de motilidad progresiva.
Semen bueno	50-69% de motilidad progresiva.
Semen regular	30-49% de motilidad progresiva.
Semen malo	Menor de 29% de motilidad progresiva.

Fuente: (Chamorro, 2005)

2.4.2.3. Morfología espermática

La morfología del semen hace referencia al estudio de la forma del esperma, se expresa en porcentaje la cantidad de esperma normal y anormal, las anomalías se las clasifica en primarias o secundarias, dependiendo si el defecto ocurre durante la formación de la célula, en la espermatogénesis en el testículo o dentro del epidídimo (Galina, 2008).

La cantidad de espermatozoides vivos puede determinarse utilizando técnicas de tinción basadas en el principio de que las células muertas cuyas membranas plasmáticas están dañadas permite la entrada de ciertos colorantes principalmente se utiliza eosina y nigrosina. La fertilidad reducida ocurre generalmente cuando el número de defectos son mayores de 18 al 20 %. Las anomalías primarias no deben superar el 5% y son determinantes de baja fertilidad, los defectos secundarios no están generalmente considerados como serios y no afecta la fertilidad (Medina, 2006).

Algunas de las anomalías morfológicas están:

Anormalidades Primarias	Anormalidades Secundarias
✓ Subdesarrollados	✓ Cabezas pequeñas normales
✓ Formas dobles	✓ Cabezas anchas pequeñas y gigantes
✓ Defectos acrosomales	✓ Cabezas normales libres
✓ Cabezas angostas	✓ Membrana acrosomales sueltas, plegadas, desprendidas
✓ Defecto cráter/diadema	✓ Implantación abaxial
✓ Defecto forma de pera	✓ Gotas distales
✓ Contorno anormal	✓ Flagelo doblado simple
✓ Cabezas pequeñas anormales	✓ Terminación del flagelo plegado
✓ Cabezas sueltas anormales	
✓ Piezas medias anormales	
✓ Gotas proximales	

Fuente: (Barth y Oko, 1989 citado por Moron & Moron, 2015)

2.4.2.4. Concentración espermática

La concentración espermática es dada por la cantidad de células en volumen del eyaculado ósea el número de espermatozoides por mililitro cubico o centímetro cubico. El procedimiento más común para obtener la concentración espermática consiste en el contaje de células en la cámara de Neubauer o la utilización de sistemas automatizados como el CASA (Galina, 2008).

2.5. ANTIOXIDANTES

Son sustancias que está presentes en concentraciones menores a las del sustrato oxidable, y es capaz de retrasar significativamente o evitar la oxidación de un sustrato. Por otro lado, en bioquímica inorgánica se define como una sustancia capaz de donar electrones resultando en la obstaculización de la reacción en cadena de oxidorreducción (Medina.& Hicks, 2001).

Los antioxidantes tienen una amplia diversidad pudiendo ser moléculas complejas, como la catalasa, peroxirredoxinas y superóxido dismutasa hasta moléculas muy sencillas como el glutatión y ácido úrico (Gutteridge & Halliwell, 2010).

Se pueden clasificar como enzimáticos y no enzimáticos. El grupo de antioxidantes no enzimáticos funcionan donando un electrón a un radical libre con la finalidad de estabilizarlo, estos se ubican en el citosol, matriz mitocondrial y nuclear además en los fluidos extracelulares (Córdova, 2009).

Se conocen tres grupos de antioxidantes:

2.5.1. Antioxidantes Primarios

Que previenen la formación de nuevos radicales libres, transformándolos en moléculas menos perjudiciales, antes de que puedan reaccionar, o evitando la formación de radicales libres a partir de otras moléculas. Entre estos antioxidantes tenemos a la enzima superóxido dismutasa (SOD), que convierte al O_2^- en peróxido de hidrógeno. La enzima glutatión peroxidasa (GPx) que convierte el peróxido de hidrógeno y los peróxidos lipídicos en moléculas inofensivas antes de que formen radicales libres. Y las proteínas de unión a metales (ej.: la ferritina y ceruloplasmina) que limitan la disponibilidad de Fe^{2+} necesaria para formar el radical OH (Bellabarba, 2005).

2.5.2. Antioxidantes Secundarios

Los cuales capturan los radicales libres, impidiendo reacciones en cadena. Entre estos tenemos: la vitamina E (Alpha- tocoferol), vitamina C (ascorbato), betacaroteno, ácido úrico, bilirrubina y albúmina (Bellabarba, 2005).

2.5.2.1. Vitamina C

El Ácido Ascórbico (AA) o Vitamina C se caracteriza por ser una molécula soluble en agua y por ser más estable en medios ácidos. Esta juega un papel importante en el organismo, ya que actúa como un cofactor y catalizador en reacciones óxido-reducción (Arce & Balderas, 2015).

El ácido ascórbico es como tal un antioxidante, su presencia ayuda a varios mecanismos en la disminución de numerosos radicales, incluyendo LPO. La adición de ácido ascórbico en un diluyente puede mejorar el rendimiento de los espermatozoides al reducir el daño celular. A través de su acción continua de barrido de radicales (Beconi *et al*, 1993).

Sierens, J. *et al* (2001) demostró, que las especies antioxidantes actúan *in vivo* para disminuir el daño oxidativo al ADN, proteína y lípidos, y este hallazgo sugirió que el ácido ascórbico podría ser necesario para proteger los espermatozoides contra el ROS. El ácido ascórbico es un antioxidante no enzimático y, por tanto, está potencialmente implicada en la protección del estrés oxidativo (Anane & Creppy, 2001 citado por Barragán, 2017).

2.5.2.2. Vitamina E

Sikka, en 2004, menciona que la vitamina E (tocoferol y sus derivados) se encuentran en pequeñas cantidades en las membranas celulares de mamíferos y en el plasma seminal, es un antioxidante soluble en grasa que protege a las células de radicales de oxígeno, contribuyendo contra el estrés oxidativo inhibiendo principalmente ROS. Pawan (2014) y Houshaimy *et.al* (2018) señalan que la adición de Vitamina E conserva de mejor manera el material seminal, actuando efectivamente contra el estrés oxidativo durante el proceso de crio conservación.

2.5.3. Antioxidantes Terciarios.

Que reparan las biomoléculas dañadas por los radicales libres. Entre ellos tenemos las enzimas reparadoras de ADN y la metionina sulfóxido reductasa (Bellabarba, 2005).

2.5.4. Acción ROS (Especies reactivas a Oxígeno) en células espermáticas

Los ROS actúan directamente sobre la fertilidad del macho, ya que son los responsables de procesos como la hiperactivación, capacitación y reacción acrosómica de los espermatozoides, así como la fecundación. Durante el paso por la cola del epidídimo, los espermatozoides se encuentran en estado inmóvil, caracterizados por la baja concentración intracelular de AMPc y calcio, así como suprimida su capacidad de producir ROS (Ball *et al.*, 2002).

Esta condición es revertida durante las primeras etapas de capacitación, en donde se constata un aumento en la concentración de calcio intracelular y AMPc, teniendo inicio la producción de ROS, en consecuencia, los espermatozoides desarrollan gran motilidad conocido como hiperexcitación. Por otra parte, el ROS también puede causar graves daños a espermatozoides cuando sus mecanismos de defensa están limitados. Las ROS cumplen una importante función en la fisiología espermática normal, pero el desequilibrio entre su producción y degradación causa efectos adversos sobre el espermatozoide (Ball *et al.*, 2002).

Holt, en 2000, menciona que las ROS afectan principalmente la membrana plasmática espermática, por lo que es de vital importancia conocer cómo actúa esta membrana en presencia de ROS, conociendo sus características biofísicas y así evitar la baja supervivencia espermática.

2.6. CONGELACIÓN DE SEMEN BOVINO

La crio preservación de semen es una importante biotecnología reproductiva, que busca promover la conservación de germoplasma de especies de interés zootécnico por tiempo indeterminado. La crio preservación de semen proporciona una economía para el productor, al reducir los costos de alimentación y transporte de los reproductores, así como los riesgos de transmisión de enfermedades reproductivas. Se debe tener en cuenta que el proceso de crio preservación posee una fertilidad reducida en comparación con semen fresco, por lo que se debe tomar en cuenta el protocolo de crioconservación para optimizar el número de sobrevivientes, y la capacidad funcional del total de espermatozoides (Watson, 2000).

La crio preservación comprende cinco etapas: la dilución con crio protectores, el envasado y enfriamiento o estabilización, la congelación, el almacenamiento y la descongelación, lo que hace que haya una articulación entre la función de la membrana y el

metabolismo espermático durante cada una de las etapas de la crioconservación. (Ávila *et.al*, 2006).

2.6.1. Diluyentes Utilizados para la Congelación del Semen Bovino

Los diluyentes empleados en la conservación de espermatozoides, deben ser isotónicos con el plasma seminal (320 mOsm/kg) cuando es utilizado en refrigeración, e hiperosmótico (400 mOsm/kg) en congelación; debe poseer un pH próximo a 7 y capacidad tampón con el fin de mantener el pH en la neutralidad, compensando la producción de ácido láctico durante la congelación, ya que el medio se puede tornarse ácido y reducir la longevidad y la fertilidad de los espermatozoides; poseer una fuente de energía siendo la glucosa y la fructosa las más utilizadas; estar libres de bacterias y contaminación, para lo cual se utilizan antibióticos en su composición (Oliveira, 2003).

2.6.1.1. Andromed

Andromed® contiene fosfolípidos, TRIS, ácido cítrico, azúcares, antioxidantes, tampones, glicerina, agua de altísima pureza y antibióticos, de acuerdo a la Directiva de la UE 88/407 (Tilosina, Gentamicina, Espectinomicina, Lincomicina).



Figura 4. Diluyente

2.6.1.2. Triladyl

Triladyl® contienen TRIS, ácido cítrico, azúcar, tampones, glicerina, agua purísima y antibióticos, de acuerdo con la Directiva 88/407 de la UE (Tilosina, Gentamicina, Espectinomicina, Lincomicina).



Figura 5. Diluyente

2.6.2. Crio protectores

El crio protector se añade al medio para proteger a los espermatozoides durante la congelación y descongelación. Estas sustancias son importantes para evitar la formación de hielo intracelular, reducir el estrés osmótico mediante la sustitución de agua necesaria para mantener el volumen celular, interactuar con iones y macromoléculas, reducir punto congelación del agua, y servir de tampón para ajustar los cambios de pH (Medeiros *et al*, 2002).

2.6.2.1. Crioprotectores intracelulares

Los Crioprotectores intracelulares o permeables a través de sus propiedades coligativas, reducen el grado crioscópico intracelular. Por lo tanto, la mayor cantidad de agua permanecerá en el estado líquido cuando se somete a baja temperatura, disminuyendo la concentración

intracelular de solutos y proporcionando así un menor perjuicio para las células espermáticas durante la congelación (Watson,1995 citado por Ramónéz, 2013).

Leboeuf *et al.* (2000), menciona que los principales crio protectores utilizados en congelación espermática son glicerol, sulfóxido de dimetilo, etilenglicol y propilenglicol, y sus combinaciones. Sin embargo, el glicerol se usa con mayor frecuencia, debido a que éste se une a la molécula de agua y baja su punto de congelación, por lo que en su presencia se forman menos cantidad de hielo intracelular. Por consiguiente, se reduce la concentración de solutos en el líquido residual. El principal daño celular se produce por concentración de solutos, por lo tanto, el glicerol, al reducir la temperatura a la cual se llega a una determinada concentración de solutos, reduce estos efectos dañinos. El glicerol penetra rápidamente el espermatozoide vivo en suspensión, y se concentra en la parte posterior de la cabeza.

2.6.2.2. Crio protectores extracelulares

Principalmente son sustancias de alto peso molecular, son más efectivas si la velocidad de congelación es alta, su principal función es promover la rápida deshidratación celular y suelen usarse asociados a agentes penetrantes, y los más utilizados son: sacarosa, glucosa, dextrosa y dextrano. Estos compuestos generalmente son polímeros que forman puentes hidrógeno con el agua, reduciendo la actividad de agua a una magnitud mucho mayor que la que se predeciría por su concentración molar. Otras sustancias, tales como lípidos, proteínas y macromoléculas, poseen una excelente eficiencia en la protección de los espermatozoides durante el proceso de congelación, sin necesidad de que ingresen en su interior. Estas sustancias se encuentran en la yema de huevo, leche, en algunos azúcares y albúmina sérica bovina. La yema de huevo contiene lecitina (fosfatidilcolina), que ayuda a proteger la membrana celular mediante la restauración de fosfolípidos celulares perdidos por espermatozoides durante el choque térmico (Watson, 1995 citado por Ramónéz, 2013).

2.6.3. Principios de Preservación de Semen

Leboeuf *et al.* en 2000 señala que el estado de la membrana plasmática de los espermatozoides es de suma importancia debido a su función, no sólo como límite de la célula, sino también para las interacciones célula a célula, por ejemplo, entre el espermatozoide y el epitelio del tracto genital femenino y entre el espermatozoide y el ovocito. La relación entre el grado de daño de los espermatozoides después de la descongelación y la fertilidad no siempre es clara, pero la fertilidad de los espermatozoides es disminuida si no se logra mantener su membrana intacta y se produce un incorrecto protocolo de congelación.

Watson en 2000, cree que el bajo porcentaje de preñez asociado a la inseminación artificial (IA) con semen crio preservado, son a consecuencia de procesos de crio conservación incorrectos, donde aproximadamente 10 a 50% de los espermatozoides de un eyaculado no resisten este proceso y sufren alteraciones fisiológicas o mueren.

Los procedimientos de congelación y descongelación causan daño celular debido al cambio brusco de temperatura, la formación de cristales de hielo, estrés oxidativo en la membrana del espermatozoide, daños del ADN, estrés osmótico, además de la toxicidad de los Crio protectores. El espermatozoide bovino es sensible al estrés osmótico y a la adición y eliminación de crio protectores (Watson,2000). El proceso de estabilización, cuando se realiza de manera incorrecta provoca un choque térmico que induce la aparición de daños parcialmente irreversible, lo cual es caracterizado por un patrón anormal de movimiento de esperma (movimiento circular o retrógrado) con rápida pérdida de la motilidad, lesiones del acrosoma, daño a la membrana plasmática, disminución de la actividad metabólica y pérdida de componentes intracelulares. Muchas de estas lesiones son producidas por cambios en la membrana celular, que se dan mientras los espermatozoides están en periodo de estabilización. (Graham, 1996 citado por Curbelo & Rodríguez, 2013)

2.6.4. Procedimiento de crio conservación

Para el proceso de crio conservación las muestras seminales deben tener un periodo de estabilización para evitar el choque térmico y evitar daños a los espermatozoides. Por lo cual es necesario diluir el semen en un medio adecuado para mantener la calidad seminal.

Holt (2000), manifiesta que el desafío inicial se produce cuando el esperma es sometido a la temperatura de refrigeración a 5 °C. Durante la congelación y descongelación los espermatozoides tienen la capacidad de soportar temperaturas mucho más bajas, sobre todo al pasar una fase crítica del proceso (-15 a -60 ° C).

Las células normalmente resisten la reducción de la temperatura, sin embargo, no soportan la formación de cristales de hielo que determina deshidratación, dando lugar a un desequilibrio osmótico con consecuente deshidratación celular (Holt, 2000). La formación de cristales de hielo se forma en el espacio extracelular generando un gradiente osmótico entre la solución intracelular inicialmente isotónica y una solución congelada extracelular que se encuentra concentrada. Dependiendo de la velocidad de refrigeración el agua se mueve a través de la membrana y se une a la fase congelada del medio extracelular o se congela formando hielo dentro de la célula.

En la mayoría de los casos, las células sometidas a la formación de cristales de hielo intracelular se tornan osmóticamente inactivas debido a la pérdida de integridad de la membrana. La célula espermática es también sensible a los efectos tóxicos de los crioprotectores, porque se tornan inviables por el uso de determinados componentes comúnmente utilizados para otras células (Watson, 2000) citado por Curbelo & Rodríguez, (2013).

Durante el proceso de crioconservación la suspensión de espermatozoides llega a temperaturas por debajo del punto de congelación del medio (súper enfriamiento), antes de que haya una formación de cristales. Cuando los cristales de hielo empiezan a formarse, ocurre un incremento de la temperatura necesaria para la cristalización, lo que puede ser perjudicial para los espermatozoides, siendo minimizado mediante el uso de curvas apropiadas de congelación (Squires, 1999 citado por Curbelo & Rodríguez, 2013).

Cuando el proceso de congelación es muy lento ocurre la congelación de agua extracelular con consecuente concentración del soluto, colocando a la célula momentáneamente en un medio hipertónico, y determinando la pérdida rápida de agua, lo que conduce a la deshidratación celular y al aumento de la concentración de soluto extracelular. Por otra parte, cuando la célula es congelada rápidamente, no hay pérdida de agua, promoviendo, por lo tanto, la formación de cristales de hielo intracelulares, a la temperatura de 5 ° C, el agua intra y extracelular permanecen súper enfriadas y no cristalizadas. Sin embargo, a temperaturas de entre -5 y -10°C se empiezan a formar cristales de hielo en el medio extracelular que permanece súper enfriado, ocurriendo intercambio de agua para mantener el equilibrio entre el medio intra y extracelular, dando lugar a deshidratación celular. En este momento, la curva de congelación debe ser lenta para evitar la congelación del agua intracelular, y lo suficientemente rápida para evitar el contacto de la célula deshidratada con el medio hiperosmótico. La deshidratación severa promueve la desnaturalización de las macromoléculas y un encogimiento excesivo de las células determinando un colapso de la membrana celular (Medeiros, 2002). La deshidratación celular es una característica deseable debido a que evita la formación de cristales de hielo dentro de la célula, lo que causa daños a estructuras internas y membrana plasmática (Squires, 1999 citado por Curbelo & Rodríguez, 2013).

El proceso de descongelación depende de cómo el semen se congeló. Los espermatozoides congelados en curvas moderadas exigen curvas adecuadas para descongelarse. En este caso, como el hielo extracelular descongela lentamente, diluye lentamente el soluto de las fracciones de agua sin congelar, lo que permite que el agua difunda lentamente hacia adentro de la célula, diluyendo el soluto intracelular hasta llegar a la concentración inicial. Si los espermatozoides se descongelan rápidamente, el hielo se derrite rápidamente diluyendo el soluto y el agua se introducirá rápidamente al espermatozoide, con lo cual se encontrará altamente concentrado y dañado (Graham, 1996).

(Chemineau *et al.* 1991 citado por Curbelo & Rodríguez, 2013) sugiere que, para pajillas de 0,5ml deben ser refrigeradas a 4 cm del nivel de nitrógeno líquido durante 5 min. Y luego sumergidas en nitrógeno líquido, mientras que las pajillas de 0,25ml debe ser colocadas a 16 cm por encima del nitrógeno líquido durante 2 min., luego bajarlas a 4 cm por 3 min. Para posteriormente sumergir en nitrógeno líquido y almacenamiento. Los congeladores programables son convenientes para la congelación de grandes cantidades de pajuelas de semen, además de controlar la tasa de congelación. El beneficio de muchos congeladores programables es que la curva de refrigeración puede ser programada, por ejemplo, de 4 a -5°C durante 4 min., de -5 a -110 °C durante 25 min. y -110 a -140 °C durante 35 min y por último sumergidas en nitrógeno líquido (Purdy, 2006).

2.6.5. Proceso de descongelado

Teóricamente, cuanto más rápido es el congelado, más rápido debe ser el descongelado. Sin embargo, el descongelado puede estar influenciado por otros factores. Existen interrelaciones entre las tasas de congelado y descongelado y los diluyentes, así como factores como concentración de glicerol, tamaño y forma del envase del semen, composición del contenido, medio de descongelado (agua, aire, etc.), temperatura y tiempo de descongelación.

No hay un procedimiento específico en cuanto a la mejor técnica de descongelado. En términos generales Cavestany (1994), sugiere que la principal norma para tener en cuenta es que el semen, desde el momento en que es retirado del termo de congelación, no debe ser sometido a oscilación de temperatura. El método más utilizado para descongelamiento de las pajuelas es el descongelado en agua a 37° C por 30 segundos.

2.7. TRABAJOS RELACIONADOS

Estudio preliminar sobre el efecto adicional de agregar antioxidantes en el semen bovino congelado (Houshaimy et.al, 2018)

Durante un largo período de tiempo, la crio preservación y la dilución de los espermatozoides representaron un papel muy importante en la mejora de la biotecnología de la inseminación artificial en los bovinos. Con respecto a este hecho, el estudio se realizó en el período 2016-2017 en el centro de mejora de material seminal, Semtest-BVN Târgu-Mureș y en el laboratorio de teriogenología de la Facultad de medicina veterinaria de Bucarest. En este estudio, se obtuvieron 7 ml de espermatozoides de un toro Holstein (SunnyBoy) usando vagina artificial. El eyaculado se dividió en 5 partes y se diluyó usando un extensor de Triladyl (250 g) agregando vitamina E con 2 concentraciones de 1 mM o 2 mM, catequina 0.1 mM, Trolox 0.1 mM y un grupo estándar sin agregar antioxidantes. Las pajillas se analizaron mediante análisis de espermatozoides asistido por computadora (CASA) para determinar la motilidad y el compuesto después de la descongelación. Como primera conclusión de este estudio, se puede decir que el grupo con vitamina E 2mM presentó una mayor movilidad que los otros grupos.

Evaluación de antioxidantes para la preservación del semen de toros cruzados con base en Tris (Rao et.al, 2017)

Este estudio tuvo como objetivo mejorar el semen de toros cruzados de baja calidad, ya que la aparición de eyaculaciones de baja calidad es uno de los principales problemas en los toros mestizos. Los antioxidantes y su combinación se intentaron superar tales problemas. Vitamina E, vitamina C y la vitamina E + C se complementaron con una dosis de 1 mg, 5 mM y 1 mg + 5 mM por ml, respectivamente, en alícuotas de eyaculado se evaluaron la calidad del semen durante la conservación a temperatura refrigerada y la crio preservación. Los resultados demostraron que las características del semen eran mejores en eyaculaciones suplementadas con antioxidantes. La anormalidad total de los espermatozoides fue significativamente menor ($p < 0.05$) en el grupo suplementado con antioxidantes. Las características seminales del semen de toro mestizo mostraron un rendimiento significativamente mejor ($p < 0.05$) en la conservación, cuando se fortificó con vitamina E en comparación con la vitamina C solo, así como vitamina E y C en combinación. El rendimiento de los aditivos de semen fue favorable al semen. Concluyendo que el enriquecimiento con vitamina E tiene un papel beneficioso en la mejora de la calidad del semen seguido de la vitamina E + C y vitamina C.

Capacidad anti oxidativa de la vitamina E, vitamina C y su combinación en semen crio preservado de toros Bhadavari (Pawan, 2014)

El semen adicionado vitamina E (5 mM), vitamina C (5 mM) y combinación de vitamina E + C causó aumentos significativos ($p < 0.01$) en los atributos seminales mientras que se observaron disminuciones significativas ($p < 0.01$) en porcentaje espermatozoides anormales en comparación con el grupo de control que indica que la suplementación de antioxidantes en forma de vitamina y su combinación mejoran la calidad del semen posterior al descongelamiento. Se observaron valores significativamente más altos de parámetros de semen en T3 seguido de T1 y T2 indicando la capacidad antioxidante de los diferentes suplementos utilizados durante el estudio.

Concluyendo que la combinación de vitamina E + C tiene el efecto más profundo en protección de los espermatozoides contra la producción de especies reactivas de oxígeno y el shock térmico en comparación con la vitamina E y la vitamina C.

Efectos de la suplementación con vitamina E en el diluyente para crio preservación de semen bovino congelado-descongelado. (Hu et.al, 2010)

El propósito de este estudio fue investigar los efectos de la suplementación con vitamina E en parámetros de calidad y actividades antioxidantes en esperma bovino congelado-descongelado. Se añadió vitamina E a concentraciones de 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg / ml al medio crio protector de semen bovino. Los resultados mostraron que la motilidad del esperma y los valores de VSL, STR en el diluyente suplementado con 1.0 y 1.5 mg / ml de vitamina E, fueron significativamente más altos que el de otras concentraciones ($P > 0,05$). Los porcentajes de espermatozoides con acrosoma intactos mejoraron significativamente ($P, 0.05$) suplementando con 1.5 mg / ml de vitamina E. En ensayos bioquímicos, el diluyente suplementado con vitamina E reportó mejora significativa en los niveles de SOD (superóxido dismutasa), en comparación con el control ($p. 0.05$). En comparación con otros grupos, los niveles de CAT (catalasa) demostraron ser mayores con la suplementación de vitamina E a 1.0 y 1.5 mg / ml ($P > 0,05$). El diluyente suplementado con 1,5 mg / ml de vitamina E causó los niveles más altos de glutatión peroxidasa (GSH-Px), en comparación con otros grupos ($P > 0.05$). La actividad de glutatión (GSH) fue significativamente mayor con la suplementación de 0.5, 1.0 y 1.5 mg / ml de vitamina E, en comparación con 2.0 mg / ml en el grupo y control de vitamina E ($P, 0.05$). Además, aumentando la dosis de vitamina E disminuyeron las actividades antioxidantes de los espermatozoides, el diluyente suplementado con 2.0 mg / ml de vitamina E, causó niveles

más bajos de actividades de GSH-Px y GSH, en comparación con otros grupos de tratamiento ($P > 0.05$). En conclusión, los efectos beneficiosos de la vitamina E observada en este estudio puede atribuirse a las características antioxidantes. Suplementos de vitamina E en el diluyente redujo el potencial de peroxidación lipídica y mejoró la calidad del semen durante la congelación-descongelación.

3. METODOLOGÍA

3.1. Materiales

3.1.1. Materiales de campo

- ✓ Vagina artificial para bovinos.
- ✓ Tubos de ensayo milimetrados
- ✓ Papel aluminio
- ✓ Termo transportador.
- ✓ Cámara fotográfica
- ✓ Cinta métrica
- ✓ Guantes de látex
- ✓ Libreta de anotaciones (Borrador)
- ✓ Lápiz
- ✓ Cabos
- ✓ Overol
- ✓ Botas de caucho

3.1.2. Materiales de Laboratorio

- ✓ Equipo de congelación (caja de poliestireno expandido y rampa de aluminio)
- ✓ Microscopio
- ✓ Baño maría
- ✓ Micropipetas
- ✓ Pajillas de 0,5 ml estériles
- ✓ Cámara de Neubauer
- ✓ Alcohol polivinílico
- ✓ Porta objetos
- ✓ Cubre objetos
- ✓ Platina caliente.

- ✓ Tubos de ensayo
- ✓ Tubos plásticos de 2 ml
- ✓ Guantes de procedimiento
- ✓ Mandil
- ✓ Nitrógeno líquido
- ✓ Vitamina C 95,5 % pura Sigma-Aldrich®
- ✓ Vitamina E 96,6% pura Sigma-Aldrich®
- ✓ Diluyente Andromed®
- ✓ Diluyente Triladyl®
- ✓ Agua bidestilada
- ✓ Yema de huevo
- ✓ Eosina
- ✓ Nigrosina

3.1.3. Materiales de Oficina

- ✓ Computadora
- ✓ Internet
- ✓ Impresora
- ✓ Hojas A4
- ✓ Libreta de apuntes
- ✓ Esferos

3.2. Metodología

3.2.1. Ubicación

El presente trabajo se realizó en dos fases, de campo y de laboratorio; la fase de campo se realizó en dos cantones de la provincia de Loja: Saraguro y Gonzanamá y la fase de laboratorio se realizó en el CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA REPRODUCTIVA ANIMAL (CEBIREA) de la Universidad Nacional de Loja.

3.2.1.1. Saraguro

Se encuentra ubicado al sur del Ecuador, al noreste de la provincia de Loja, sus coordenadas geográficas son: 3° 31'38" de latitud sur, y 79° 43'41" de longitud oeste. Limita al norte con la provincia del Azuay, al sur con el cantón Loja, al este con la provincia de Zamora Chinchipe y al oeste con la provincia de El Oro.



Se encuentra a una altura promedio de 2.525 msnm y una superficie de 1.080km, clima templado-frío en la zona andina y cálido en las zonas bajas, su temperatura oscila entre los 8 y 27° C, precipitación de 115mm y humedad relativa del 80% (INAMHI, 2018).

3.2.1.2. Gonzanamá

Se encuentra ubicado al sur de la provincia de Loja, a 81 Km. De la capital provincial, con una superficie de 699.19 km². Sus límites son: al norte con el cantón Catamayo, al sur con el cantón Quilanga, al este con los cantones Catamayo y Loja y al Oeste con los cantones Paltas y Calvas. Se encuentra a una altura promedio de 920m.s.n.m. hasta los 2080 m.s.n.m., la temperatura fluctúa entre los 16 y 20° C y una humedad relativa de 65% (INAMHI, 2018).



3.2.1.3. Laboratorio de biotecnología Reproductiva

El centro de biotecnología reproductiva Animal (CEBIREA) de la Universidad nacional de Loja se encuentra en la Quinta Experimental “Punzara” ubicado al sur de la ciudad de Loja.



3.2.2. Descripción e identificación de las Unidades Experimentales (UE)

Se utilizó para la investigación 2 reproductores bovinos criollos del biotipo Negro Lojano y 2 del biotipo Encerado, con las siguientes características técnicas: Machos mayores a 18 meses de edad, que superen un diámetro testicular de 30 cm, condición corporal de 2,5 a 3,5 y con bueno o excelente libido sexual (reflejo Flehemen). Se consideró como unidad experimental a un eyaculado de semen, por lo que se trabajó en la presente investigación con 6 unidades experimentales por biotipo, total 12 UE.

3.2.3. Diseño experimental

Se realizó un arreglo factorial 2x4 dispuesto en un diseño de bloques al azar con dos factores: raza (2) y tratamientos (4); fueron realizadas 3 repeticiones de cada tratamiento.

BIOTIPO	TORO	UE	ANTIOXIDANTE	TRATAMIENTOS	REPETICIONES
Negro Lojano (1)	1	3	Vitamina C (A)	T ₁ A	3
			Vitamina E (B)	T ₁ B	3
			Control Triladyl (C)	T ₁ C	3
			Control Andromed (D)	T ₁ D	3
	1	3	Vitamina C (A)	T ₁ A	3
			Vitamina E (B)	T ₁ B	3
			Control Triladyl (C)	T ₁ C	3
			Control Andromed (D)	T ₁ D	3
Encerado (2)	1	3	Vitamina C (A)	T ₂ A	3
			Vitamina E (B)	T ₂ B	3
			Control Triladyl (C)	T ₂ C	3
			Control Andromed (D)	T ₂ D	3
	1	3	Vitamina C (A)	T ₂ A	3
			Vitamina E (B)	T ₂ B	3
			Control Triladyl (C)	T ₂ C	3
			Control Andromed (D)	T ₂ D	3

3.2.4. Descripción de los tratamientos

En esta investigación se realizó 4 tratamientos:

T1	Control Triladyl
T2	Control Andromed
T3	Triladyl + Vitamina C (2,5 mM \approx 0.45 mg/ml)
T4	Triladyl + Vitamina E (2 mM \approx 0.95 μ l/ml)

Cada muestra de semen se colectó mediante el uso de vagina artificial, posteriormente se realizó una pre dilución 1:1 con el respectivo diluyente de congelación para la determinación de los diferentes tratamientos. Luego las muestras espermáticas fueron diluidas para obtener una concentración final de 50×10^6 spz/ml.

3.2.5. Manejo de los toros

Los reproductores fueron sometidos a un mismo tipo de manejo, fueron desparasitados y vitaminados antes de empezar con el proceso de recolección. Los toros tuvieron un periodo de entrenamiento de 15 días en el proceso de salto y recolección seminal, periodo en el cual fueron manejados con bozal hasta que se habituaron a saltar ante la hembra “maniquí”.

3.2.6. Método y frecuencia de recolección seminal

En esta investigación se utilizó como método de recolección seminal la vagina artificial y la frecuencia de colecta seminal se realizó una vez por semana, durante tres semanas dándonos como resultado tres colectas por toro, los toros permanecieron sin contacto con hembras entre cada colecta.

3.2.7. Variables de estudio

- ✓ Volumen
- ✓ Motilidad total
- ✓ Motilidad progresiva
- ✓ Vitalidad
- ✓ Morfología
- ✓ Concentración espermática

3.2.8. Toma y registro de datos

Luego de obtener la muestra seminal se procedió a diluir con Triladyl y Andromed en relación 1:1, luego se añadió los antioxidantes en su dilución total y luego mantenida a una temperatura de 37°C hasta llegar al laboratorio para realizar el examen microscópico.

Examen macroscópico

Volumen: Se midió el eyaculado en tubos de recolección milimetrados.

Densidad: El color del eyaculado obtenido nos permitió realizar una evaluación macroscópica de la concentración espermática.

Aspecto	Densidad-Concentración estimada
Cremoso	1.500 a 2000 x10 ⁶ spz/ml
Cremoso-Lechoso	1000 a 1500 x10 ⁶ spz/ml
Lechoso	750 a 1000 x10 ⁶ spz/ml
Semi acuoso	300 a 500 x10 ⁶ spz/ml
Acuoso	200 x10 ⁶ spz/ml

Fuente: (Ibañez, 2016)

Examen microscópico

- **Motilidad Total (M.T):**

Se consideró motilidad total a todos los espermatozoides que se mueven en cualquier dirección. Se realizó la visualización de 10 campos de observación y se contó un total de 100 espermatozoides, de los cuales se obtuvo un porcentaje de espermatozoides con movimiento.

- **Motilidad Progresiva (M.P):**

Se consideró motilidad progresiva a todos los espermatozoides que se mueven en forma rectilínea progresiva, siendo estos los que atraviesan el campo de observación. Se realizó la visualización de 10 campos de observación y se contó un total de 100 espermatozoides, de los cuales se obtuvo un porcentaje de espermatozoides con movimiento progresivo.

- **Vitalidad espermática:**

Se contó 100 espermatozoides y se sacó el porcentaje. Para evaluar la vitalidad del semen se realizó la siguiente tinción:

- ✓ Se Colocó 10 µl de semen , 5 µl de eosina y 5 µl de nigrosina en partes diferentes de un portaobjetos temperado a 37 °C, luego se homogeniza el semen con la eosina por 10 segundos y por último se mezcla con la nigrosina por otros 10 segundos.
- ✓ Se toma una gota de la mezcla y se realiza el frotis
- ✓ Secar al aire y observar con objetivo de 1000 aumentos
- ✓ Para la valoración de vitalidad o vivos y muertos se contó 100 espermatozoides, los espermatozoides vivos se observan sin tinción o blancos y los espermatozoides muertos se tiñen de color rosado.

- **Morfología espermática:**

Se contabilizó al mismo tiempo que vitalidad y se clasificó las malformaciones en Primarias y secundarias, se contaron 100 espermatozoides y se anotó el porcentaje.

- **Concentración seminal**

Para determinar la concentración espermática del eyaculado se utilizó el hemo citómetro o cámara de Neubauer. Se tomó una muestra de 10 µl de semen y se diluyó en 990 µl de solución formolizada y se homogeniza la muestra, siendo ésta una dilución de 1:100. Posteriormente se montó la laminilla sobre la cámara de Neubauer Luego se tomó una muestra de la solución realizada con la micropipeta y se cargó ambos lados de la cámara de Neubauer y esperar de 3 a 5 minutos para que la muestra se sedimente.

Luego se llevó la cámara de Neubauer al microscopio óptico y se observó con objetivo de 40 aumentos.

Se contó 5 cuadros de la cámara para un total de 25 cuadros en forma de X.

Ya que se obtuvo el número de espermatozoides se aplica la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración Espermática} = \frac{E * 250.000}{CD}$$

Donde:

E= Número de espermatozoides contados

C= Número de cuadros contados

D= Factor de dilución (1/100)

- **Dilución del semen**

- **Triladyl**

La composición final del diluyente Triladyl fue de un 20%, es decir, tres partes de agua bidestilada, una parte de yema de huevo y una parte de este diluyente; todo esto previamente temperado a 37 °C.

- **Andromed**

La composición final del diluyente Andromed® fue del 20%, es decir, 1 parte de este diluyente y 4 partes de agua destilada estéril previamente temperada a 37 °C.

Pre dilución y análisis de semen: Inmediatamente tras la llegada al laboratorio, el eyaculado fue evaluado (concentración, motilidad total, motilidad progresiva, vitalidad y anormalidades morfológicas). El eyaculado se mantuvo en el baño-maría a 36 °C, al momento de la pre dilución, el diluyente tenía la misma temperatura que el eyaculado , para evitar el choque térmico de los espermatozoides; y fue vertido lentamente por las paredes del tubo colector, y homogenizándose suavemente.

Una vez evaluado se efectuó la dilución final. Posteriormente el eyaculado se retira del baño maría hasta que alcanzó la temperatura de laboratorio (20°C), y a esa temperatura fueron envasados en pajillas. Con los resultados de la evaluación seminal, se determinó el número de pajillas a obtener en función a la concentración espermática del eyaculado.

Fórmula para calcular dosis de pajillas:

$$\text{N}^\circ \text{ Dosis} = \frac{(\text{volumen (ml)} \times \text{Concent esperm(millones/ml)} \times \% \text{motilidad} \times \% \text{vitalidad})}{(\text{N}^\circ \text{ de espermatozoides/dosis})}$$

Donde:

- **Volumen:** volumen del semen puro
- **Concentración espermática:** Concentración espermática en millones/ml.
- **% Motilidad:** motilidad expresada en porcentaje.
- **% Vitalidad:** Numero de espermatozoides vivos, en porcentaje.
- **N° de espermatozoides por dosis:** 50 millones.

Previamente se realizó la identificación de las pajillas (0,50 ml) codificadas con el nombre del toro, tipo de antioxidante y fecha de colección. Se selló el extremo abierto de las pajillas con alcohol polivinílico.

Luego se estabilizó las pajillas a 5 °C en un refrigerador durante 12 horas.

- **Proceso de congelación seminal**

Congelación de pajuelas:

La congelación del semen se realizó siguiendo el protocolo que utiliza el Centro de biotecnología reproductiva animal (CEBIREA) de la Universidad Nacional de Loja, utilizando nitrógeno líquido y descendiendo la temperatura de 5°C a -196°C, primero sometiendo las pajuelas a vapores de nitrógeno líquido a una altura de 5 cm durante cinco minutos, para luego ser sumergidas en nitrógeno líquido y almacenado en tanques criogénicos hasta el momento de su evaluación.

- **Evaluación del semen descongelado**

Para descongelar las pajillas se introdujeron por 15 segundos en agua a 37 °C, luego de la descongelación se evaluaron los siguientes parámetros:

- **Motilidad Total (M.T)**

Se consideró a los espermatozoides que se mueven en cualquier dirección. Se realizó la visualización de 10 campos de observación y se contó un total de 100 espermatozoides, de los cuales se obtuvo un porcentaje de espermatozoides con movimiento.

- **Motilidad progresiva (M.P)**

Se observó a los espermatozoides que se mueven en forma rectilínea progresiva, siendo estos los que atraviesan el campo de observación. Se realizó la visualización de 10 campos y se contó un total de 100 espermatozoides, de los cuales se obtuvo un porcentaje de espermatozoides con movimiento progresivo.

- **Vitalidad espermática**

Se contó 100 células espermáticas y se sacó el porcentaje.

3.2.9. Conservación del material seminal de bovinos criollos

Se conservaron las muestras seminales que presentan mejores resultados post congelación en cuanto a motilidad total, motilidad individual y vitalidad espermática en un banco de germoplasma en el Centro de Biotecnología Reproductiva Animal (CEBIREA) de la Universidad Nacional de Loja.

3.2.10. Análisis estadístico

El presente trabajo de investigación se basó en el diseño experimental de bloques completamente al azar, en cuanto a las variables de evaluación seminal tales como volumen, densidad, concentración espermática, motilidad total, motilidad progresiva, vitalidad y anormalidades morfológicas; la información recogida, fue procesada a través de una estadística descriptiva (promedios, porcentajes, desviación estándar) y se presentó en cuadros y gráficos representativos e ilustrativos. Para la comparación múltiple de medias se aplicó la prueba de Tukey.

Para evaluar el efecto biotipo, antioxidante y la interacción biotipo-antioxidante se realizó un análisis de varianza (ANOVA) en el software R versión 3.6.1 para comparar las medias de ambos factores.

4. RESULTADOS

4.1. Características macro y microscópicas del material seminal de los biotipos criollos en fresco

Como se observa en la **Tabla 4** las características macroscópicas de los eyaculados de los biotipos analizados no presentan diferencia estadística para volumen y densidad, en cuanto a las características microscópicas si hay diferencia estadística ($P < 0,05$) entre el biotipo Encerado y Negro Lojano; el biotipo Encerado tiene mejores valores en concentración espermática ($833,33 \times 10^6$ spz/ml) frente al Negro Lojano ($791,67 \times 10^6$ spz/ml); en cuanto a la motilidad total el Encerado tiene 76,67 % y el Negro Lojano 70%; en motilidad progresiva y vitalidad el Encerado posee 64 % y 75,67 % respectivamente frente al biotipo Negro Lojano con 55,67% y 70,33% respectivamente; cabe señalar que ambos biotipos poseen similares valores en anormalidades morfológicas.

Tabla 4. Características macro y microscópicas del material seminal de bovinos criollos en fresco

Biotipo	Muestra	Características macroscópicas			Características Microscópicas			
		Volumen (ml)	Densidad (0-5)	Conc. Esperm. (millones/ml)	Motilidad Total (%)	Motilidad Progresiva (%)	Vitalidad (%)	Morfología (%)
Encerado	M1	8	3	800	74	62	73	11
	M2	8	3	700	78	64	79	11
	M3	6	3	500	85	73	82	9
Encerado	M1	4	4	1000	72	58	71	5
	M2	6	4	1100	75	63	75	7
	M3	5,5	3	900	76	64	84	7
PROMEDIO		6,25 a	3,33 a	833,33 a	76,67 a	64 a	75,67 a	8,33 a
Negro Lojano	M1	8,5	4	1000	69	55	71	7
	M2	7,5	3	800	83	68	85	7
	M3	5	4	1000	72	57	71	7
Negro Lojano	M1	5	2	700	63	49	64	11
	M2	5	2	600	65	52	62	9
	M3	4,5	2	400	68	53	69	8
PROMEDIO		5,92 a	2,83 a	750 b	70 b	55,67 b	70,33 b	8,17 a

Letras diferentes en la misma columna indican diferencia estadística significativa (P<0,05)

4.2. Características microscópicas del material seminal de los biotipos criollos post congelación

El biotipo Encerado posee mejores características seminales post congelación que el biotipo Negro Lojano, independientemente del tratamiento empleado durante la congelación, en cuanto a motilidad total, motilidad progresiva y vitalidad, a excepción de morfología donde presentan valores similares como se presenta en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Características microscópicas del material seminal de bovinos criollos post congelación por biotipo

	MOTILIDAD TOTAL		MOTILIDAD PROGRESIVA		VITALIDAD		MORFOLOGÍA	
	ENCERADO	NEGRO LOJANO	ENCERADO	NEGRO LOJANO	ENCERADO	NEGRO LOJANO	ENCERADO	NEGRO LOJANO
T1 TRILADYL	48,17 ± 4,26 a	43 ± 6,63 b	35,5 ± 4,76 a	30,5 ± 5,96 b	47,5 ± 4,32 a	42,17 ± 7,70 b	8,17 ± 1,94 a	8,17 ± 1,33 a
T2 ANDROMED	47 ± 4,69 a	42,5 ± 7,71 b	34,17 ± 5,04 a	30,67 ± 6,92 b	46,33 ± 4,93 a	42 ± 6,96 b	8,67 ± 1,21 a	8,67 ± 1,03 a
T3 TRILADYL + VITAMINA C	50,17 ± 5,60 a	44,83 ± 7,52 b	37,5 ± 5,05 a	32,83 ± 7,47 b	50,5 ± 5,75 a	45 ± 6,81 b	9,5 ± 1,38 a	8 ± 0,63 a
T4 TRILADYL + VITAMINA E	56,5 ± 3,45 a	48,83 ± 7,28 b	43,83 ± 3,71 a	36,5 ± 6,28 b	55 ± 3,16 a	48,67 ± 6,68 b	9,67 ± 1,86 a	9,5 ± 0,55 a
PROMEDIO	50,46 ± 5,67 a	44,79 ± 7,27 b	37,75 ± 5,77 a	32,63 ± 6,70 b	49,83 ± 5,51 a	44,46 ± 7,13 b	9 ± 1,64 a	8,58 ± 1,06 a

Media ± Error estándar

Letras diferentes en la misma fila y variable indican diferencia estadística significativa (P<0,05)

4.3. Características microscópicas del material seminal de bovinos criollos post congelación por tratamiento

Para la evaluación seminal post congelación se tomaron en cuenta las características microscópicas como motilidad total, motilidad progresiva, vitalidad y morfología espermática por tratamiento, sin tomar en cuenta el biotipo, los resultados se presentan a continuación en la **Tabla 6**:

Tabla 6. Características microscópicas del material seminal de bovinos criollos post congelación por tratamiento

	MOTILIDAD TOTAL	MOTILIDAD PROGRESIVA	VITALIDAD	MORFOLOGÍA
T1 TRILADYL	45,58 ± 5,96 a	33 ± 5,77 a	44,83 ± 6,58 a	8,17 ± 1,59 a
T2 ANDROMED	44,75 ± 6,52 a	32,42 ± 6,05 a	44,17 ± 6,18 a	8,67 ± 1,07 a
T3 TRILADYL + VITAMINA C	47,5 ± 6,91 a	35,17 ± 6,55 a	47,75 ± 6,66 a	8,75 ± 1,29 a
T4 TRILADYL + VITAMINA E	52,67 ± 6,75 b	40,17 ± 6,24 b	51,83 ± 5,98 b	9,58 ± 1,31 a

Media ± Error estándar

Letras diferentes en la misma columna indican diferencia estadística significativa (P<0,05)

En la **Tabla 6** se puede observar que existe diferencias estadísticas significativas (p<0,05) entre tratamientos, presentando el T4 (Triladyl + Vit. E) los mejores resultados en cuanto a las características post descongelación con un 52,67% de motilidad total, 40,17% de motilidad progresiva y 51,83% vitalidad. Mientras que los T1, T2 y T3 presentan valores similares estadísticamente; en cuanto a morfología no hubo diferencia estadística en todos los tratamientos.

4.4. Conservación de las muestras del material seminal obtenido de bovinos criollos biotipos Encerado y Negro Lojano

Las muestras obtenidas fueron un total de 288 pajillas de 0,5 ml, las cuales se encuentran en el laboratorio de biotecnología reproductiva (CEBIREA) en un tanque de nitrógeno líquido de 20 kg.

Tabla 7. Número de pajillas obtenidas de bovinos criollos biotipos Encerado y Negro Lojano

BIOTIPO	MUESTRA	# DE PAJILLAS
ENCERADO	M1	24
	M2	24
	M3	24
ENCERADO	M1	24
	M2	24
	M3	24
NEGRO LOJANO	M1	24
	M2	24
	M3	24
NEGRO LOJANO	M1	24
	M2	24
	M3	24
TOTAL		288

5. DISCUSIÓN

El volumen promedio obtenido en los biotipos Encerado (6,25 ml) y Negro Lojano (5,9 ml), concuerdan con Aguirre, *et al* (2011) que obtuvieron en toros Encerados un volumen de 14 ml en dos eyaculados. Cabe mencionar lo descrito por Argüero (2012) y Palma (2009) que mencionan que el valor normal para el eyaculado de toros jóvenes (2 años) es de 2 ml, mientras que para toros adultos debe ser superior a 4 ml hasta 12 ml. Según Hafez (2002), el volumen y densidad puede variar dependiendo de varios factores como son: raza, edad, factores ambientales y habilidad del operario, así como también la frecuencia entre colectas disminuye el volumen y densidad si el tiempo entre las mismas es corto.

La concentración espermática obtenida en esta investigación fue de 833,33 millones spz/ml en el biotipo Encerado y de 750 millones spz/ml en el biotipo Negro Lojano, estos valores son menores a lo reportado por Mejía (2017) quien obtuvo una concentración de 1059,9 millones spz/ml en bovinos criollos del Azuay; sin embargo, Palma (2009) afirma que un eyaculado se considera de buena calidad si éste supera los 800 millones spz/ml.

En cuanto a la motilidad total, ésta fue de 76,67% en el biotipo Encerado y 70% en el biotipo Negro Lojano en semen fresco, estos valores son superiores a los obtenidos por Bach (2009) el cual obtuvo una motilidad total de 67,9% pre congelación en toros Holstein.

La motilidad progresiva en semen fresco presenta diferencia estadística significativa entre biotipos Encerado y Negro Lojano, 64% y 55,67% respectivamente, estos resultados coinciden con los obtenidos por Pawan (2014) quien reporta una motilidad progresiva de 63,44% en el tratamiento control en búfalos Bhadawari. Sin embargo, Mejía (2017) y Aguirre *et al* (2011), obtuvieron una mayor motilidad progresiva con 87,5% y 82,7% respectivamente en bovinos criollos del Azuay y Loja.

Zhao (2015) en su investigación con bovinos Quinchuan, obtuvo una vitalidad espermática en fresco del 73,23%, valores similares a los obtenidos en esta investigación (70,33%), sin embargo, Mejía (2017), en su estudio en bovinos criollos del Azuay obtuvo una mayor vitalidad espermática de 86,5% en semen fresco.

El porcentaje de anormalidades encontradas fue de 8,33% en bovinos Encerado y de 8,17% en bovinos Negro Lojano, siendo estos valores ligeramente inferiores a los reportados por Mejía (2017), en su estudio en bovinos criollos quien obtuvo 10,3% en semen fresco.

El T4 (Triladyl + Vit. E) es el tratamiento que obtuvo mejores resultados post congelación con un 52,67%, valor menor a los datos obtenidos por Houshaimy (2018), la cual consiguió un 72.1 % de motilidad total utilizando la misma cantidad de 2mM de Vitamina E. El motivo de la diferencia entre el T4 y el resto de los tratamientos puede ser que la formación de cristales de hielo intracelulares y producción de ROS es menor con la utilización de vitamina E, lo que da como resultado una concentración menor de solutos en la fracción no congelada lo cual evita alterar la presión osmótica y así protege la funcionalidad y vitalidad espermática post congelación. Por otra parte, Eidan (2016) realizó un trabajo adicionando 2,5 mM de vitamina C + 100 UI/ml Catalasa y obtuvo una motilidad total de 45% post congelación, valores similares a los 47,5% obtenidos en esta investigación con la utilización de vitamina C a 2,5mM.

Los efectos de la suplementación de Vitamina E (T4) sobre la motilidad progresiva son superiores (40,17%) en comparación con el grupo control (33%). Aguirre et al (2011) en un estudio con el biotipo criollo Encerado obtuvo una motilidad progresiva de 43% post congelación utilizando como diluyente Andromed®; los valores del T4 son menores a los obtenidos por Hu (2010), quien mostró un 53,86% de motilidad progresiva adicionando 1,5 mg/ml de Vitamina E, y Pawan (2014) con un 59,72% adicionando 5mM de vitamina E, afirmando que la adición de Vitamina E posee un efecto favorecedor frente al tratamiento control durante la crio preservación evitando la producción acelerada de ROS y controlando de mejor manera el estrés oxidativo durante el proceso de congelación y descongelación.

El porcentaje de espermatozoides vivos tratados con Triladyl® en el estudio de Mejía (2017) y Moncayo (2016) fue de 53,8% y 53,9% respectivamente, datos que no coinciden con los obtenidos en el tratamiento control en esta investigación donde se obtuvo un 44,83%, pero si concuerdan con el T4 (Vit. E) donde se obtuvo una vitalidad de 51,83%. Pawan (2014) en búfalos Bhadawari también reportó un valor mayor, con un 72,97% post descongelación adicionando 5mM de vitamina E. El proceso de crio preservación es un factor para considerar, ya que en otras investigaciones se utilizan equipos automatizados que controlan la curva de enfriamiento durante todo el proceso. Otro factor para mencionar es la calidad seminal en fresco, ésta influye significativamente en la calidad post congelación por lo que se debe tener en cuenta al momento de comparar los datos obtenidos en otras investigaciones y en este trabajo.

Las anomalías morfológicas obtenidas en esta investigación no tuvieron diferencia estadística entre tratamientos, presentando los 4 tratamientos un rango de anomalías entre 8,17% y 9,58% los cuales son menores a los presentados por Mejía (2017) el cual obtuvo un 15% de anomalías totales post congelación en bovinos criollos del Azuay.

En cuanto a diluyentes, no se encontró diferencia estadística ($P < 0,05$) entre Triladyl y Andromed, lo cual coincide con lo reportado por Galarza (2013) quien no obtuvo diferencias entre dichos diluyentes en la crío conservación de semen de bovinos Jersey. Sin embargo, Carballo *et al.* (2009) reporta que obtuvo mejores resultados con el diluyente Triladyl, esto puede estar influenciado por el tiempo de estabilización de 9 horas.

Tomando en cuenta el biotipo los bovinos Encerado posee mejores características seminales pre y post congelación que el biotipo Negro Lojano, una de las posibles causas serían las condiciones medio ambientales ya que bovinos del Cantón Saraguro (clima frío) obtuvieron mejores características que los bovinos ubicados en el cantón Gonzanamá (clima cálido) coincidiendo con Iñiguez (2017), quien menciona que bovinos criollos poseen mejores características seminales en época lluviosa que en época seca; otro factor a considerar es el número de ejemplares utilizados, ya que se debería tener un mayor número de ejemplares por biotipo para obtener resultados más confiables.

6. CONCLUSIONES

1. El uso de antioxidantes como la vitamina E y C adicionadas en el diluyente Triladyl® permitió conservar las características microscópicas tales como motilidad total, motilidad progresiva y Vitalidad luego del proceso de crio preservación frente a los tratamientos control con diluyente Andromed® y Triladyl®.
2. El biotipo Encerado posee mejores características tales como motilidad total, motilidad progresiva y vitalidad que el biotipo Negro Lojano pre y post congelación, a excepción de anormalidades morfológicas donde ambos biotipos poseen similares valores.
3. La Vitamina E por su función antioxidante al reducir los niveles de ROS permitió mantener de mejor manera la calidad seminal post congelación con relación a los otros tratamientos.
4. El material seminal (pajillas) en el que fue adicionado vitamina E se mantiene en crio preservación en tanques de nitrógeno líquido en el Centro de Biotecnología Reproductiva Animal (CEBIREA) debido a que éstas obtuvieron mejores características post congelación.

7. RECOMENDACIONES

- Realizar más estudios en el ámbito reproductivo de los biotipos criollos para obtener mayor cantidad de información para futuras investigaciones.
- Se recomienda a la adición de vitamina E (2mM) durante el procesamiento de muestras seminales, ya que por su característica antioxidante reduce el estrés oxidativo al cual es sometido el semen bovino y ayuda a conservar su calidad.
- Dados los mejores resultados obtenidos en otros trabajos con la adición de vitamina E en dosis mayores (5mM), se recomienda en futuros trabajos probar con cantidades mayores de vitamina E a las utilizadas en este ensayo (2mM).
- Desarrollar en el Centro de Biotecnología Reproductiva Animal (CEBIREA) de la Universidad Nacional un banco de germoplasma para conservar el material seminal de toros criollos y contribuir a la diversidad zoo genética de nuestra región.
- Difundir mediante charlas y capacitaciones a los ganaderos sobre el valor genético de las razas criollas y el beneficio de su conservación ya que éstas aportan rusticidad, adaptabilidad a las condiciones ambientales de la zona y mayor resistencia a enfermedades.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre, L., Bermeo, A., Maza, D., & Merino, L. (2011). Actas Iberoamericanas de Conservación Animal. Estudio fenotípico y zoométrico del bovino criollo de la sierra media y alta de la región sur del Ecuador (RSE), 1, 392-396.
- Aguirre, Lenin & Uchuari, Melania & Briceño, Pablo (2012). Evaluación fenotípica y seminal con fines de conservación del bovino "encerado" presente en la región altoandina del Ecuador. AICA-Actas Iberoamericanas de Conservación animal. 2. 185-89.
- Ávila, L., Madero, J., & López, C. (2006). Revista colombiana de obstetricia y ginecología. *Fundamentos de crio preservación*, 4(57), 291-300.
- Bach, K.D. 2009. "Effects of cholesterol on bovine sperm survival during cooling & freezing". Faculty of the Graduate School of Cornell University. Pag 32.
- Ball, B., Baumber, J., & Sabeur, K. (2002). Theriogenology. *Role of reactive oxygen species on normal and abnormal function of equine spermatozoa.*, 58, 299-300.
- Barragán, I. (2017). "Evaluación del efecto crio protector de diferentes fuentes de antioxidantes en el semen bovino" (INGENIERO ZOOTECNISTA). ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO, Riobamba-Ecuador. Recuperado de <http://dspace.esoch.edu.ec/bitstream/123456789/7153/1/17T1470.pdf>
- Bavera, G., & Peñafort, C. (2005). Examen reproductivo en toros (pp. 1-16). Argentina. Recuperado de www.produccionanimal.com.ar
- Beconi, M., Francia, R., Mora, G., & Affranchino, M. (1993). Theriogenology. Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation, 841–851.
- Bellabarba, G. (2005). Revista Venezolana de Endocrinología y Metabolismo. Estrés oxidativo y función espermática, 3(3), 7.
- Carballo, D., Canseco, R., García, R., & Montiel, F. (2009). Comparación de dos diluyentes comerciales para criopreservar semen de bovino bajo condiciones de campo en el trópico húmedo (Universidad Veracruzana). Recuperado de <https://www.uv.mx/veracruz/cienciaanimal/files/2013/11/Comparacion-de-dos-diluyentes-comerciales-para-preservar-semen-bovino.pdf>
- Cavestany, D. (1994). Procesamiento y Congelación de Semen de Toro (p. 23). Montevideo.

- Chamorro, J. (2005). Práctica recolección de semen bovino. Bogotá: UNIVERSIDAD DE LA SALLE. Recuperado de <https://es.scribd.com/doc/48983203/Practica-Recoleccion-de-Semen>
- CIPCA. (2016). Evaluación y contribución al rescate de la biodiversidad de las razas bovinas criollas autóctonas en la región amazónica ecuatoriana. Ecuador. Recuperado de <https://www.uea.edu.ec/cipca/images/Proyectomn.pdf>
- Córdova, I. (2009). Revista Complutense de Ciencias Veterinarias. Estrés oxidativo y antioxidantes en la conservación espermática, 38.
- Curbelo, M., & Rodríguez, Z. (2013). Relevamiento de laboratorios de procesamiento de semen bovino en Uruguay (Doctor en Ciencias Veterinarias). UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA, Uruguay. Recuperado de <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/123456789/2730/1/FV-29987.pdf>
- Dávalos, C. (2005). Prueba de libido en toros Nelore (Tesis). Bolivia. Recuperado de http://www.fcv.uagrm.edu.bo/sistemabibliotecario/doc_tesis/DANIEL%20DAVALOS-20101109-155600.pdf
- De La Torre, J. (1999). Evaluación de Sementales Bovinos (pp. 25-28). México: INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES FORESTALES AGRICOLAS Y PECUARIAS. Recuperado de <https://www.cofupro.org.mx/cofupro/images/contenidoweb/indice/publicaciones-nayarit/PUBLICACIONES%20DEL%20INIFAP/PUBLICACIONES%20EN%20PDF/FOLLETOS%20TECNICOS/folleto%20tecnico%206%20EVALUACION%20DE%20SEMENTALES%20BOVINOS.pdf>
- Eidan, S. (2016). Animal Reproduction Science. Effect on post-cryopreserved semen characteristics of Holstein bulls of adding combinations of vitamin C and either catalase or reduced glutathione to Tris extender, (167), 1-7.
- Galarza, A. (2013). Eficacia de dos diluyentes: TRIS + Lecitina de soya (AndroMed®) y Tris + yema de huevo (Triladyl ®), en la crioconservación de semen de toro de la raza Jersey en Cuenca – Ecuador (UNIVERSIDAD DE CUENCA). Recuperado de <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/526/1/TESIS.pdf>
- Galina, C. (2008). Reproducción de animales domésticos (tercera edición). editorial Limusa.

- Guerrero, G. D. (2014). Manual de procedimientos para la colecta y criopreservación de semen bovino para la empresa santa clara genética estado PARANÁ – BRASIL, 90.
- Guttridge, J., & Halliwell, B. (2010). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Antioxidants: Molecules, medicines, and myths, 393:561.
- Hafez, E. (2002). *Reproducción e Inseminación artificial en animales* (séptima edición). México D.F: Editorial McGraw-Hill.
- Holt, W. (2000). *Theriogenology*. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences, 53, 47-58.
- Houshaimy, K., Togo, D., Constantin, T., Micşa, C., & Şonea, A. (2018, July). Preliminary Study Regarding the Additional Effect of Adding Antioxidants on Bull Frozen Semen. In “Agriculture for Life, Life for Agriculture” Conference Proceedings (Vol. 1, No. 1, pp. 440-444). Sciendo.
- Hu, J., Zhao, X., Tian, Z., & Li, Q. (2010). *Animal*. Effects of vitamin E supplementation in the extender on frozen-thawed bovine semen preservation, 5(1), 107–112.
- Ibañez, F., Lisarrague, C., Callejas, S., & Cabodevila, J. (2016). Inseminación Artificial a Tiempo Fijo: ¿Conviene utilizar semen “fresco” en lugar de congelado? (Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires). Recuperado de <https://www.ridaa.unicen.edu.ar/xmlui/bitstream/handle/123456789/1191/Iba%C3%B1ez%20Federico.PDF?sequence=1&isAllowed=y>
- INAMHI. (2018). Anuario hidrológico. INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA E HIDROLOGIA.
- Iñiguez, C., Galarza, D., Argudo, D., & Albeiro, R. (2017). *MASKANA*. Efecto de la época del año sobre las características seminales de toros de fenotipo Criollo ecuatoriano, 93-95.
- Leboeuf, B., Restall, B., & Salamon, S. (2000). *Animal Reproduction Science*. Production and storage of goat semen for artificial insemination, 62, 113-141.
- Medeiros, C. (2002). Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? 57, 327-344.

- Medina, R., & Hicks, J. (2001). *Bioquímica inorgánica y biomedicina* (1 Edición). México: McGraw-Hill.
- Medina, V., Velasco, Y., & Cruz, P. (2006). *Revista Orinoquía*. Los bancos de recursos genéticos y su papel en la conservación de la biodiversidad, *10*, 71-77.
- Mejía, J. (2017). “Evaluación pre y post congelación del semen obtenido con vagina artificial y electro eyaculador en el ganado criollo” (UNIVERSIDAD DE CUENCA). Recuperado de <http://dspace.ucuenca.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/26940/1/Tesis.pdf>
- Morillo, M., Salazar, S., & Castillo, E. (2012). Evaluación del potencial reproductivo del macho bovino (pp. 23-28). Maracay: Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas.
- Moron, D., & Moron, L. (2015). Evaluación de la calidad seminal en toros reproductores en invierno y verano en el departamento del cesar (UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA). Recuperado de [http://www.iracbiogen.com/admin/biblioteca/documentos/trabajo%20final%20-OUT-MORON%20ARAUJO-%20MORON%20MORON\(2013\).pdf](http://www.iracbiogen.com/admin/biblioteca/documentos/trabajo%20final%20-OUT-MORON%20ARAUJO-%20MORON%20MORON(2013).pdf)
- Muñoz, M., & Paucar, N. (2005). Comparación de tres diluyentes para semen bovino (Tesis Med. Vet). Universidad Central del Ecuador, Quito.
- Oliveira, E. (2003). Efeito de diferentes diluidores sobre a criopreservação do sêmen canino (Dissertação Mestrado). Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Pawan, K., Mukul, A., & Madan, S. (2014). *Veterinary World*. Antioxidative capacity of vitamin E, vitamin C and their combination in cryopreserved Bhadavari bull semen, *7*(12), 1127-1131.
- Pesántez, E. (2015). “Relación entre el tamaño del folículo preovulatorio, diámetro del cuerpo lúteo y niveles de progesterona en el ganado bovino de la raza criolla” (UNIVERSIDAD DE CUENCA). Recuperado de <https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/22251/1/TESIS.pdf>
- Purdy, P. (2006). *Small Ruminant Research*. A review on goat sperm cryopreservation, (63), 215-225.

- Ramónez, J. (2013). “Evaluación de dos agentes crio protectores no permeables y un diluyente comercial (Triladyl) en la congelación de semen bovino”. UNIVERSIDAD DE CUENCA, Azuay, Ecuador.
- Rao, T., Mohanty, T., & Bhakat, M. (2017). Indian journal of animal research. Assessment of antioxidants for preservation of crossbred bull semen in Tris based extender, (1), 1-5.
- Russo, A. (2006). Bases para la evaluación de la aptitud reproductiva del toro (Segunda edición). Buenos Aires: Editorial Agro-Vet. Recuperado de <http://www.buiatriaecuador.org/wp-content/uploads/2016/12/BASES-PARA-LA-EVALUACION-DE-LA-APTITUD-REPRODUCTIVA-DEL-TORO.pdf>
- Sikka, S. (2004). Journal of Andrology. Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Andrology and Assisted Reproductive Technology, (25), 5-18.
- Vidal, V. (2009). Caracterización del comportamiento productivo y reproductivo del ganado criollo pizán. Riobamba: 1-6
- Villa, C. (2009). Enfoques sobre semen, estrés oxidativo y antioxidantes, *11*(43), 34-38.
- Watson, P. (1995). Fertility and Development. Recent developments and concepts in the cryopreservation of their post-thawing function, *7*, 871-891.
- Watson, P. (2000). Animal Reproduction Science. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen, (61), 481-492.

ANEXO I: IDENTIFICACIÓN DE EJEMPLARES Y RECOLECCIÓN DE MUESTRAS



ANEXO II. EVALUACIÓN DE LAS MUESTRAS SEMINALES EN FRESCO, CONGELACIÓN Y EVALUACIÓN POST CONGELACIÓN.

