



Universidad  
Nacional  
de Loja

**Universidad Nacional de Loja**

**Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables**

**Maestría en Reproducción Animal con mención en Rumiantes**

**“Efecto de fosfolípidos y antioxidantes en crioconservantes sobre la calidad seminal post-descongelación en bovinos en el cantón Morona”**

Trabajo de Titulación previo a la  
obtención del título de Magíster en  
Reproducción Animal con mención en  
Rumiantes

**AUTOR:**

**Ing. Luis Alberto Ramos Ludeña**

**DIRECTOR:**

**Dr. Rodrigo Medardo Abad Guamán, Ph.D**

**Loja – Ecuador**

**2024**

## **Certificación de Tesis**

Loja, 18 de diciembre de 2024

Dr. Rodrigo Abad Guamán, Ph.D.

**DIRECTOR/A DEL TRABAJO DE TITULACIÓN**

### **C E R T I F I C O:**

Que he revisado y orientado todo el proceso de elaboración del Trabajo de Titulación denominado: "Efecto de fosfolípidos y antioxidantes en crioconservantes sobre la calidad seminal post-descongelación en bovinos en el cantón Morona" de autoría del estudiante Luis Alberto Ramos Ludeña con cédula de identidad Nro. 1103915599 previo a la obtención del título de MAGISTER EN REPRODUCCIÓN ANIMAL CON MENCIÓN EN RUMIANTES. Una vez que el trabajo cumple con todos los requisitos exigidos por la Universidad Nacional de Loja, apruebo y autorizo la presentación su presentación para los trámites de titulación.

Dr. Rodrigo Abad Guamán, PhD.

**DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN**

## **Autoría**

Yo, **Luis Alberto Ramos Ludeña**, declaro ser autor/a del presente Trabajo de Titulación y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos, de posibles reclamos y acciones legales, por el contenido del mismo. Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja la publicación de mi Trabajo de Titulación o de Titulación, en el Repositorio Digital Institucional – Biblioteca Virtual.

**Firma:**

**Cédula de identidad:** 1103944631

**Fecha:** 18 de diciembre de 2024

**Correo electrónico:** luis.ramos@unl.edu.ec

**Teléfono:** 0969868656

## **Carta de autorización por parte del autor**

Titulación o de Titulación denominado: **Efecto de fosfolípidos y antioxidantes en crioconservantes sobre la calidad seminal post-descongelación en bovinos en el cantón Morona** autorizo al sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que, con fines académicos, muestre la producción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido en el Repositorio Institucional. Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo en el Repositorio Institucional, 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 del Trabajo de Titulación o de Titulación que realice un tercero.

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, a los nueve días del mes de diciembre de dos mil veinticuatro.

### **Firma:**

**Autor/a:** Ing. Luis Alberto Ramos Ludeña

**Cédula:** 1103944631

**Dirección:** Morona Santiago - Macas – San Isidro

**Correo electrónico:** luis.ramos@unl.edu.ec

**Teléfono:** 0969868656

### **DATOS COMPLEMENTARIOS:**

**Director/a del Trabajo de Titulación:** Dr. Rodrigo Abad Guamán, PhD.

## **Dedicatoria**

A mis padres, que son pilares de mi vida y fuente inagotable de amor. Sus manos me guiaron, sus palabras me alentaron y su ejemplo me inspiró. Gracias por inculcarme valores que me acompañarán siempre: la honestidad, la perseverancia y el ímpetu por lo que hago. Este logro es tan suyo como mío, un reflejo de su dedicación y sacrificio.

A mis hermanas, compañeras de aventuras y confidentes incondicionales. Crecimos juntos, compartiendo risas, secretos y sueños. Su apoyo y cariño fueron fundamentales en este camino. Gracias por estar siempre presentes, celebrando mis éxitos y levantándome en mis caídas.

A mi esposa, mi compañera de vida, mi amor eterno. Tu presencia ilumina mis días y me impulsa a ser mejor persona. Gracias por tu paciencia, comprensión y aliento constante. Juntos hemos superado muchos obstáculos y también hemos celebrado cada victoria. Este logro es nuestro, un testimonio de nuestro amor y trabajo en equipo.

A mis hijos, mi mayor tesoro, mi alegría, el bastión que sostiene mi vida y mi más grande inspiración. Ustedes son la razón por la que lucho y me esfuerzo cada día. Quiero que sepan que sus sueños son importantes y que con dedicación y esfuerzo pueden alcanzar cualquier meta. Este trabajo es para ustedes, un legado de amor y perseverancia como. Los amo más de lo que las palabras pueden expresar.

*Luis Alberto Ramos Ludeña*

## Agradecimiento

En primero y, sobre todo, agradezco a Dios, mi Señor y Salvador, quien me ha dado la fuerza, la sabiduría y la inteligencia para superar cada obstáculo y alcanzar la meta de concluir esta tesis. Sin su guía y apoyo, nada de esto habría sido posible. A mi amada esposa, Tatiana del Pilar Bolaños Chacha, quien ha sido mi compañera incondicional en este viaje. Gracias por tu amor, paciencia y apoyo en cada momento. Tu presencia ha sido un faro de esperanza y motivación en los días más difíciles. También agradezco a mis hijos, Thayra, Luis, Romeo, Valentina y Jhuliet Ramos Bolaños por su amor, comprensión, cariño y por ser siempre un pilar de inspiración. A mi madre, Primila Ludeña Lapo, por tu amor, enseñanzas y por ser siempre una fuente de inspiración. A mi padre, Raúl Abelino Ramos Ramos, gracias por tu apoyo constante y por ser una figura paterna excepcional en mi vida.

A mis hermanas, Paulina, Verónica, Nube y Primila Ramos Ludeña por su cariño y apoyo incondicional. Su confianza en mí ha sido una motivación constante. A mis asesores, el Dr. Rodrigo Abad Guamán, PhD **DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN**, quienes con su orientación y conocimientos han sido fundamentales para el desarrollo de esta investigación. Su paciencia y sus consejos han sido invaluable. A todos ustedes, mi más sincero agradecimiento.

*Luis Alberto Ramos Ludeña*

## Contenido

Certificación de Tesis .....	i
Autoría.....	ii
Carta de autorización .....	iii
Carta de autorización por parte del autor .....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimiento .....	v
1. Título.....	1
2. Resumen .....	2
Abstract .....	3
3. Introducción .....	4
4. Marco Teórico .....	6
4.1. Contexto de la Ganadería en Morona Santiago.....	6
4.2. Características físicas y reproductivas de la raza Charoláis. ....	6
4.3. Anatomía y Aparato Reproductor del Bovino.....	7
4.4. Obtención del Semen Bovino.....	8
4.5. Consideraciones Antes de Realizar una Evaluación Seminal.....	8
4.5.1. <i>Evaluación Física</i> .....	8
4.5.2. <i>Manejo Nutricional</i> .....	8
4.5.3. <i>Conducta Sexual del Toro</i> .....	8
4.6. Manejo Adecuado de la Colecta .....	9
4.6.1. <i>Estímulo Sexual Antes de la Colecta</i> .....	9
4.6.2. <i>Colecta de Semen con Vagina Artificial</i> .....	9
4.7. Evaluación del Semen Bovino .....	9
4.7.1. <i>Examen Macroscópico</i> .....	9
4.7.1.1. Volumen.....	9
4.7.1.2. Color. ....	10
4.7.1.3. Olor.....	10

4.7.1.4.	Aspecto.....	10
4.7.1.5.	pH. ....	10
4.7.2.	<i>Examen Microscópico</i> .....	10
4.7.2.1.	Motilidad Masal.....	10
4.7.2.2.	Motilidad Individual. ....	11
4.7.2.3.	Morfología Espermática. ....	11
4.7.2.4.	Concentración Espermática.....	11
4.8.	Antioxidantes y fosfolípidos.....	11
4.9.	Congelación del Semen Bovino .....	13
4.9.1	<i>Diluyentes Utilizados para la Congelación del Semen Bovino</i> .....	13
4.9.1.1.	Andromed.....	13
4.9.1.2.	Triladyl®.....	13
4.9.3.	<i>Crio protectores</i> .....	14
4.10.	Criopreservación.....	14
4.10.1.	<i>Principios de Preservación de Semen</i> .....	14
4.10.2.	<i>Procedimiento de Criopreservación</i> .....	15
4.10.3.	<i>Proceso de Descongelado</i> .....	15
4.11.	Normativas Aplicadas en el Ecuador en Criopreservación.....	15
5.	Metodología.....	16
5.1	Área de Estudio.....	16
5.2	Procedimiento .....	16
5.2.1	Enfoque Metodológico .....	16
5.2.2	Diseño de la Investigación .....	17
5.2.3	Tamaño de la muestra y tipo de muestreo .....	18
5.3	Métodos Para lo Obtención de la Muestra de Semen.....	18
5.4	Fase de Laboratorio .....	19



5.4.1	Concentración Espermática.....	19
5.4.2	Motilidad Masal .....	19
5.4.3	Motilidad Individual.....	20
5.4.4	Morfología Espermática.....	20
<b>5.5</b>	<b>Formulación y Caracterización de Diluyentes Seminales Para la Criopreservación.....</b>	<b>20</b>
5.5.1	Cálculo del Volumen Total del Diluyente y Empajillado .....	21
<b>5.6</b>	<b>Pre Dilución.....</b>	<b>21</b>
<b>5.7</b>	<b>Acondicionamiento .....</b>	<b>21</b>
<b>5.8</b>	<b>Dilución .....</b>	<b>22</b>
<b>5.9</b>	<b>Empajillado y Sellado .....</b>	<b>22</b>
<b>5.10</b>	<b>Congelación.....</b>	<b>22</b>
<b>5.11</b>	<b>Análisis Post Congelación .....</b>	<b>23</b>
<b>5.12</b>	<b>Variables de estudio.....</b>	<b>23</b>
5.12.1	Procesamiento y Análisis de la Información.....	23
5.12.2	Consideraciones Éticas .....	24
<b>6.</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>25</b>
<b>7.</b>	<b>Discusión .....</b>	<b>27</b>
<b>8.</b>	<b>Conclusiones .....</b>	<b>29</b>
<b>10.</b>	<b>Bibliografía .....</b>	<b>31</b>

## Índice de tablas

Tabla 1.....	7
Tabla 2.....	11
Tabla 3.....	12
Tabla 4.....	17
Tabla 5.....	23
Tabla 6.....	25

## Índice de figuras

Figura 1. Componentes del aparato reproductor del macho bovino .....	7
Figura 2. Ubicación de la parroquia San Isidro.....	16

## Índice de anexos

Anexo 1. Preparación de la vagina artificial.....	34
Anexo 2. Colecta del semen .....	34
Anexo 3. Dilución del semen .....	34
Anexo 4. Acondicionamiento del semen .....	35
Anexo 5. Enfriado del semen.....	35
Anexo 6. Empajillado del semen .....	35
Anexo 7. Sellado de las pajillas.....	36
Anexo 8. Congelado de las pajillas .....	36
Anexo 9. Crioconservación de las pajillas .....	36
Anexo 10. Análisis post congelación.....	37
Anexo 11. Resultados .....	45

## **1. Título**

Efecto de fosfolípidos y antioxidantes en crioconservantes sobre la calidad seminal post-descongelación en bovinos en el cantón Morona.

## 2. Resumen

La criopreservación de semen bovino es esencial para conservar y utilizar material genético de alto valor. Este estudio evaluó los efectos de los fosfolípidos y antioxidantes presentes en crioconservantes sobre la calidad seminal post-descongelación en bovinos de la raza Charoláis. La investigación se llevó a cabo en el cantón Morona, provincia de Morona Santiago, con semen de tres reproductores seleccionados por su salud, ausencia de plagas y enfermedades, y adecuada condición nutricional y corporal. La recolección del semen se realizó mediante una vagina artificial marca Minitube, y el material seminal fue recolectado en tubos Falcon de 15 mL. Las muestras fueron analizadas en fresco para evaluar su fertilidad, luego de lo cual se procedió a la predilución, acondicionamiento a 37°C durante 40 minutos y cálculo de la dilución total. Se determinó la cantidad de pajillas necesarias, seguido de su empajillado, sellado y enfriamiento a -4°C por 4 horas antes del proceso de congelación. Las pajillas fueron sometidas a una congelación gradual en un criopreservador artesanal, con tres niveles de congelación a 2, 6 y 8 cm, con distintos tiempos de exposición, antes de ser sumergidas en nitrógeno líquido. La calidad seminal post-descongelación se evaluó utilizando el sistema CASA (Computer-Assisted Semen Analysis), analizando variables como la concentración espermática y motilidad. El análisis estadístico se realizó mediante el programa SAS utilizando un modelo mixto, con los tratamientos como efecto fijo y los animales como efecto aleatorio. Los resultados mostraron que el crioconservante con fosfolípidos y antioxidantes mejoró significativamente la motilidad total (67,5%) y progresiva (55,1%) en comparación con el crioconservante base, que presentó valores de 49,7% y 41,3%, respectivamente. En conclusión, el crioconservante que contenía fosfolípidos y antioxidantes demostró una preservación superior de la calidad seminal post-descongelación en comparación con el control, en todas las variables evaluadas.

**Palabras claves:** Criopreservación, espermatozoide, congelación, fosfolípidos, antioxidantes.

## **Abstract**

The cryopreservation of bovine semen is a key tool to ensure the conservation and use of high-value genetic material. The present study investigated the effects of phospholipids and antioxidants present in cryopreservatives on post-thaw semen quality in Charolais cattle. The research was conducted in the Morona canton, Morona Santiago province, where semen was collected from three previously selected breeders, all of which were evaluated as free from pests and diseases, and with adequate nutritional and body condition. Semen collection was performed using an artificial vagina from the brand Minitube, previously conditioned, and the semen material was collected in 15 mL Falcon tubes. The obtained samples were analyzed fresh to assess their fertility, and then underwent the predilution process. They were conditioned at 37°C for 40 minutes, and the total dilution was calculated. Next, the formula was applied to determine the number of straws to be used, followed by the straw filling, sealing, and cooling to -4°C for 4 hours before beginning the freezing process. The straws were placed in a rack and underwent a gradual freezing process in a homemade cryopreservator (foam cooler), with three freezing levels set at 2, 6, and 8 cm, with varying exposure times at each level, before finally being immersed in liquid nitrogen. Post-thaw semen quality was assessed using the CASA (Computer-Assisted Semen Analysis) system, where variables such as sperm concentration and motility were analyzed. Statistical analysis was performed using a mixed model, where each animal acted as an experimental block and received both treatments. A mixed model was used in the analysis of variance, with treatment as a fixed effect and animals as a random effect. The results indicated that the cryopreservative containing phospholipids and antioxidants showed a significant improvement in total motility (67.5%) and progressive motility (55.1%) compared to the base cryopreservative, which showed values of 49.7% and 41.3%, respectively. In conclusion, the results obtained in this research demonstrated that treatment with cryopreservatives containing phospholipids and antioxidants showed significantly superior preservation of post-thaw semen quality compared to the control group in the evaluated variables.

**Keywords:** Cryopreservation, spermatozoa, freezing, phospholipids, antioxidants.

### 3. Introducción

La criopreservación de semen es una técnica de biotecnología reproductiva, que busca la preservación del germoplasma por tiempo indefinido (Baca, 2019). Molano y Lombana (2021), manifiesta que la preservación seminal es uno de los avances más significativos sobre las tecnologías reproductivas en el macho bovino que se han desarrollado en las últimas décadas permitiendo el desarrollo de biotecnologías reproductivas esenciales como la inseminación artificial.

Siendo de gran importancia en los hatos ganaderos ya que permiten mejorar genéticamente y las eficiencias productivas, tener mayor control del estatus sanitario y manipular los ciclos de producción para maximizar los parámetros de desempeño (López et al., 2023).

En Morona Santiago, la ganadería es una actividad económica importante siendo, la principal fuente de ingresos para el 87,6% de su población (Zurita, 2021). EL mejoramiento genético implementado dentro de los últimos años ha sido un puntal para el crecimiento de la economía de la provincia ya que se ha mejorado el hato ganadero del productor sin la necesidad de tener toros reproductores (GADPMS, 2023).

En este contexto la presente investigación es de gran relevancia para el sector ganadero de Morona Santiago, ya que permitirá identificar el crioconservante más adecuado para cada raza bovina, optimizando así las técnicas de inseminación artificial y favoreciendo la mejora genética de los hatos. Además, los resultados obtenidos contribuirán a fortalecer los bancos de germoplasma animal en la región, garantizando la preservación de recursos genéticos valiosos y facilitando la implementación de programas de conservación y recuperación de razas autóctonas. Para dar respuesta a esta problemática se plantearon los siguientes objetivos:

#### **Objetivo general:**

- Evaluar el efecto de la adición de fosfolípidos y antioxidantes en los crioconservantes sobre la calidad seminal post-descongelación en semen bovino de raza Charolais en el cantón Morona.

#### **Objetivos específicos**

- Determinar la efectividad de los fosfolípidos y antioxidantes en la concentración espermática post-descongelación en semen bovino.

- Analizar el efecto de los fosfolípidos y antioxidantes en la motilidad espermática post-descongelación en semen bovino.

## **4. Marco Teórico**

### **4.1. Contexto de la Ganadería en Morona Santiago**

La ganadería bovina en la Amazonía Ecuatoriana es una actividad introducida en la década de los sesenta, por tanto, la sustitución de bosques por pastos para el ganado fue una práctica habitual (Coyago, 2022).

Maurat et al., (2020) indica que en Morona Santiago la amplia difusión de crianza de ganado Charoláis se debe a su gran adaptabilidad a la zona, su precocidad, rusticidad, robustez y velocidad de crecimiento, cuyas características han sido fijadas cuidadosamente por la selección. Siendo poca estudiada dentro de la localidad, pero su potencial es enorme y de gran importancia para la provincia (Asocharolaise, 2022).

### **4.2. Características físicas y reproductivas de la raza Charoláis.**

El ganado Charolais posee un color blanco o blanco cremoso en su capa, con pelo corto en verano mientras que en invierno es espeso y largo. Su característica más apreciable es su musculatura profundamente desarrollada en las extremidades y sobre el lomo, sobre todo en sus mejores ejemplares (Ganadería, 2017).

Según la Asociación Brasileña de Criadores de Charolais (2018), las características de la raza Charolais principalmente son:

- Un color uniforme blanco o a veces cremoso, sin manchas
- Mucosa blanca rosada,
- Cabeza corta, frente ancha, cuernos redondos, escote corte, poco cargado de papada.
- Un cofre profundo, costilla redonda derretida con hombro,
- Espalda muy musculosa, caderas ligeramente borradas, muy anchas, así como la grupa.
- Cola sin protuberancia demasiado pronunciada, afilada y terminada en mechón de cabello fino.
- Piel o cuero de espesor medios, pero muy flexible.



**Tabla 1.**

*Referencias de Reproducción de la Raza Charoláis.*

<b>Reproducción</b>	
Edad Madurez hembras (meses):	12
Edad Madurez machos (meses):	17
Edad Media reproductores machos (meses):	49
Edad media reproductores hembras (meses):	96
Edad media al primer parto (meses):	33
Intervalo entre partos (días):	330

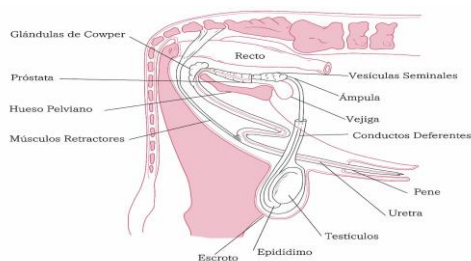
**Fuente:** *Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2020).*

### **4.3. Anatomía y Aparato Reproductor del Bovino**

Según Nabors (2021), la anatomía del sistema reproductor del toro se puede agrupar funcionalmente en los componentes de producción, transporte y transferencia de espermatozoides, para que ocurran estos procesos se incluye el pene, la musculatura del pene, la vasculatura y las inervaciones. La transferencia de espermatozoides del toro a la vaca se logra mediante el proceso de intromisión, que requiere la erección del pene y la eyaculación de los espermatozoides.

El sistema reproductor del macho está constituido por un par de gónadas denominadas testículos, y un sistema tubular de almacenamiento y conducción: las vías espermáticas (los epidídimos, los conductos deferentes, los conductos eyaculadores, la uretra y el pene, este último rodeado por el prepucio) (Plaul & Laube, 2023).

*Figura 1. Componentes del aparato reproductor del macho bovino*



#### **4.4. Obtención del Semen Bovino**

Según Guerrero (2014), para determinar la alta calidad del semen bovino y su productividad, es necesario someter al toro a procesos de recolección de semen, ya sea en el campo o en una central de inseminación artificial. Este proceso depende en gran medida del manejo adecuado de sus características particulares y del conocimiento detallado e individual de cada animal. La combinación de estos factores permite un mejor aprovechamiento del toro.

#### **4.5. Consideraciones Antes de Realizar una Evaluación Seminal**

Es fundamental considerar los siguientes aspectos:

##### ***4.5.1. Evaluación Física***

La evaluación incluye un análisis integral del estado general del toro, con especial atención a los órganos sexuales tanto externos como internos. Este examen físico abarca la evaluación de la condición corporal, la inspección de los ojos, la postura y el aparato reproductor, incluyendo pene, testículos y vesículas seminales. Su propósito es identificar posibles anomalías que puedan afectar el deseo o la capacidad de montar llevando a limitar o impedir su funcionalidad reproductiva (Páez y Corredor, 2014).

##### ***4.5.2. Manejo Nutricional***

Junqueira (2021), menciona que el manejo nutricional es uno de los principales factores que afectan la reproducción del ganado vacuno. La energía, la proteína, las vitaminas y los minerales van a incidir en la reproducción de varias maneras, ya sea por exceso o por deficiencia de nutrientes.

##### ***4.5.3. Conducta Sexual del Toro***

En los toros, la evaluación de la libido a menudo no es posible durante un examen de aptitud reproductiva rutinario. Sin embargo, si es posible, se debe observar al toro montando vacas para permitir una evaluación de su deseo de montar, facilidad para la monta, habilidad para completar la erección y estirar el pene y la presencia de desviación peniana u otras anomalías que pueden impedir un servicio con éxito (Bedford, 2014).

#### **4.6. Manejo Adecuado de la Colecta**

Para realizar la crío preservación de semen lo primero que hay que hacer es realizar una adecuada colección del semen del macho dos métodos: Electro eyaculación y con vagina artificial (Muiño, 2008).

Según López et al. (2023), la elección entre estos dos métodos depende de la evaluación de varios aspectos, como edad, temperamento y experiencia del toro donador, utilización de vacas en celo, disponibilidad de los equipos e infraestructura, y nivel de entrenamiento del personal que lleva a cabo la colecta.

##### **4.6.1. Estímulo Sexual Antes de la Colecta**

La preparación y estimulación sexual del toro antes de la colecta de semen aumenta el número de células espermáticas (López et al., 2023).

##### **4.6.2. Colecta de Semen con Vagina Artificial**

Páez & Corredor (2014), manifiestan que la vagina artificial es el método de mayor uso, debido a su semejanza con el proceso normal de monta; sin embargo, se requiere que los toros hayan sido entrenados.

En la colecta de semen con vagina artificial (VA) se persuade a los toros a montar a un animal estimulador (p. ej., un buey inmovilizado, una vaca o un maniquí), y el pene erecto se dirige a la VA por el recolector cuando el toro monta. Al preparar la VA, la temperatura, un factor crucial para estimular la eyaculación en el toro, se mantiene a 40,5-42 °C. En el caso de toros no entrenados, la recogida puede facilitarse aumentando la temperatura hasta 48 °C. La VA debe lubricarse con vaselina no espermicida (Bedford, 2014).

#### **4.7. Evaluación del Semen Bovino**

Según Guerrero (2014), después de la colecta de semen la evaluación debe ser realizada de forma rápida y eficiente, a fin de no reducir la calidad del semen obtenido, son empleadas varias técnicas de evaluación, buscando la seguridad en la selección de un buen eyaculado que presente altos índices de fertilidad entre ellos:

##### **4.7.1. Examen Macroscópico**

###### **4.7.1.1. Volumen.**

EL volumen del eyaculado varía entre 2-10 o más mililitros siendo el promedio de 5 a 6 mL, dependiendo de la edad, raza, explotación del toro y del tamaño de los testículos principalmente (Alban, 2006).

Los métodos recomendados para la medición del volumen son: Por pesada: se debe recoger el semen en un frasco pre pesado y luego se lo vuelve a pesar con el semen, dado que la densidad del semen es aproximadamente 1g/mL, el peso obtenido será igual al volumen de semen en mL (Ariagno & Mormandi, 2021).

#### **4.7.1.2. Color.**

El semen de buena calidad y de alta concentración presenta un color blanco lechoso a un tanto cremoso, y relativamente uniforme, mientras que cuando posee bajo número de espermatozoides su color es blanco-lechoso (Guerrero, 2014). López et al. (2023) manifiesta que es deseable un color de semen blanco o marfil ya que muestras de colores oscuros, rojizos o amarillentos indican sangre, pus o contaminación, y deben ser rechazadas

#### **4.7.1.3. Olor.**

Según Páez & Corredor (2014), el olor es característico de la especie, no debe tener mal olor, si lo presenta puede ser indicativo de algún proceso infeccioso. Se consideran normales los colores que van del blanco al amarillento, siendo patológicos, los colores rosado, amarronado y verdoso (Gómez y Migliorisi, 2015).

#### **4.7.1.4. Aspecto.**

Ariagno & Mormandi (2021), indica que el aspecto depende de la concentración de espermatozoides y se relaciona directamente con el volumen de eyaculado, por lo que frente a grandes volúmenes podrá presentar un aspecto menos opaco o viceversa.

#### **4.7.1.5. 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).

### **4.7.2. Examen Microscópico.**

#### **4.7.2.1. Motilidad Masal.**

Según Avalos et al (2018) la motilidad masal es definida como el movimiento en remolinos del total de espermatozoides de la muestra. Está directamente relacionada con la concentración espermática, el movimiento progresivo y el vigor de ese movimiento; así, a mayor cantidad de espermatozoides se formará una mayor cantidad de olas; se expresa en una escala de calificación subjetiva de 1 al 5 (Páez & Corredor, 2014).

Se evalúa en una gota no diluida de semen colocándola en un porta sin cubre y examinándola a pocos aumentos ( $\times 100$ ) (Bedford, 2014).

#### 4.7.2.2. Motilidad Individual.

Es una evaluación cualitativa y subjetiva, ya que se calcula el porcentaje de espermias en una muestra de semen que presentan movimiento rectilíneo progresivo; los demás movimientos se consideran anormales (Monroy et al., 2024).

#### 4.7.2.3. Morfología Espermática.

El estudio de la cantidad y tipo de anomalías espermáticas es un indicador importante de la capacidad fecundante del semen en bovinos (Bonaura, 2018). En general es considerado un valor aceptable los eyaculados que presenten valores inferiores al 30% de anomalías (Monroy et al., 2024).

#### 4.7.2.4. Concentración Espermática.

Según Alban (2006), la concentración espermática indica la cantidad de espermatozoides presentes en una unidad de volumen (mL); siendo este parámetro de vital importancia para el cálculo de la dilución a utilizar y para la clasificación de este.

Sequeira (2015), indica varios métodos de conteo espermático para estimar la concentración. Dos métodos muy utilizados a nivel de campo para medirla son Espermio densímetro de Karras o por medio de cámara de Neubauer.

### 4.8. Antioxidantes y fosfolípidos

Las funciones antioxidantes implican la reducción del estrés oxidativo, la protección del ADN contra las transformaciones malignas, así como otros parámetros de daño celular (Hidalgo, 2018).

**Tabla 2.**

*Tipos de antioxidantes*

Antioxidantes	Concepto	Tipos
Primarios	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.	- Enzima superóxido dismutasa (SOD9)
		- Enzima glutatión peroxidasa
		- Proteínas de unión a metales (ej.: la ferritina y ceruloplasmina)

Secundarios	Capturan los radicales libres, evitando las reacciones en cadena.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Vitamina E (alpha-tocoferol).</li> <li>- Vitamina C (ascorbato).</li> <li>- Betacaroteno.</li> <li>- Ácido úrico.</li> <li>- Bilirrubina.</li> <li>- Albúmina.</li> </ul>
Terciarios	Reparan las biomoléculas dañadas por los radicales libres.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Enzimas reparadoras de ADN y la metionina sulfóxido reductasa.</li> </ul>

**Fuente:** Bellabarba (2005).

**Tabla 3.**

*Tipos de fosfolípidos utilizados en criopreservación en semen bovino*

Tipo de Fosfolípido	Composición	Mecanismo de Acción	de Beneficios
Fosfatidilcolina (PC)	Glicerol + Ácido fosfatídico + Colina	Estabiliza las membranas espermáticas, evitando deshidratación y daño por cristales de hielo.	Protege la membrana celular, mejora la motilidad espermática tras descongelación, mejora la viabilidad celular.
Fosfatidiletanolamina (PE)	Glicerol + Ácido fosfatídico + Etanolamina	Facilita la fluidez de la membrana celular, esencial para la integridad post-descongelación.	Mejora la estabilidad de la membrana durante la congelación, aumenta la supervivencia espermática.
Lecitina (mezcla de PC y PE)	Mezcla de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina	Aporta ambos fosfolípidos (PC y PE) para mejorar la estabilidad y	Aumenta la viabilidad espermática, mejora la motilidad tras

		protección membrana.	descongelación.
Fosfatidilserina (PS)	Glicerol + Ácido fosfatídico + Serina	Participa en la apoptosis y la estabilidad de la membrana.	Suplementa la estabilidad de la membrana, mejora la resistencia al estrés durante la congelación.
Yema de huevo	Fosfatidilcolina (PC), Fosfatidiletanolamina (PE) y otros fosfolípidos	Aporta fosfolípidos y antioxidantes, estabilizando las membranas y protegiendo de la oxidación.	Mejora la protección de las membranas espermáticas, aumenta la motilidad y espermática post- descongelación, reduce el daño oxidativo.

**Fuente:** Díaz y López (2018).

## **4.9. Congelación del Semen Bovino**

### **4.9.1 Diluyentes Utilizados para la Congelación del Semen Bovino**

Los diluyentes de semen son necesarios en el proceso de criopreservación para proveer nutrientes y fuentes de energía, prevenir el crecimiento bacteriano, proteger los espermatozoides de los daños inducidos por choque térmico, asegurar una apropiada presión osmótica y concentración de electrolitos, y para que actúen como búfer contra cambios perjudiciales del pH (López et al., 2023).

#### **4.9.1.1. Andromed.**

Según Muiño & Peña (2009), el Andromed es un diluyente comercial compuesto por Tris, fosfolípidos, ácido cítrico, azúcar, antioxidante glicerina y antibióticos (Tilosina, Gentamicina, Espectinomicina y Lincomicina), libre de yema de huevo por lo que disminuye la probabilidad de contaminación por bacterias.

#### **4.9.1.2. 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) (Ludeña, 2019).

#### **4.9.2. Relación con los Parámetros de Calidad Seminal en Bovinos**

Galarza (2013,) indica que los dos diluyentes en cuanto a los parámetros de calidad seminal no se encuentran diferencias estadísticas ( $P < 0,05$ ) entre Triladyl y Andromed en la crioconservación de semen de bovinos Jersey resultados que coinciden con Ludeña (2019) en su estudio en bovinos criollos. 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.

#### **4.9.3. Crio protectores**

Los crioprotectores pueden clasificarse como permeables o intracelulares e impermeables o extracelulares. Los crioprotectores permeables son los que contienen compuestos que penetran la membrana celular y la deshidratan para ayudar a proteger el citoplasma. Los impermeables o extracelulares pueden subdividirse en alto peso molecular, por ejemplo: glucosa, fructosa y ficol. Estos compuestos extraen el agua libre intracelular, ayudando a proteger la estructura de las membranas utilizando la diferencia de presión osmótica (González y Pallares, 2013).

Betancourt, (2022) manifiesta que los crio protectores intracelulares y extracelulares contribuyen a una mayor resistencia de los espermatozoides porque reducen el número de poros en la membrana y las funciones dependientes de ATP, la agregación de proteínas y las aglutinaciones de lípidos.

#### **4.10. Criopreservación**

Actualmente la criopreservación es uno de los métodos más eficientes en el almacenamiento del material genético de la mayoría de especies, como también para obtener de esta manera una seguridad sanitaria y minimizar el riesgo de brotes de enfermedades (Barragán et al., 2022).

##### **4.10.1. Principios de Preservación de Semen**

Según Guerrero (2014), el principio de la técnica de congelamiento celular consiste en la disminución del metabolismo y en la deshidratación celular a través del uso de crio protectores intracelulares y extracelulares. Las soluciones crioprotectoras generalmente tienen un carácter de hiperosmolaridad, que reducen el punto de descongelamiento, integran e estabilizan las membranas celulares actuando como tapón salino en el combate de los deterioro de altas concentraciones de electrolitos de las células deshidratadas.



La congelación de semen bovino implica bajar la temperatura de la muestra de semen a un nivel biológicamente estable (Betancourt, 2022).

#### **4.10.2. Procedimiento de Criopreservación**

El proceso de criopreservación incluye cinco etapas: dilución, refrigeración, adición del crioprotector, congelación y descongelación (González y Pallares, 2013).

López et al., (2023) indica que el descenso secuencial de la temperatura se realiza con equipos de congelación especializados que permiten reducir la temperatura en cuestión de minutos, desde los 5 °C hasta los -158 °C. En este punto, las pajillas están listas para ser sumergidas en nitrógeno líquido y conservarse en termos criogénicos a una temperatura de -195.8 °C.

#### **4.10.3. Proceso de Descongelado**

Guerrero (2014) indica que el descongelamiento se debe realizar en baño maría de la siguiente manera:

- Paleta o pajilla fina mínimo a 34 a 37 grados por 21 segundos.
- Paleta o pajilla media mínimo 35 a 37 grados por 30 segundos.

#### **4.11. Normativas Aplicadas en el Ecuador en Criopreservación**

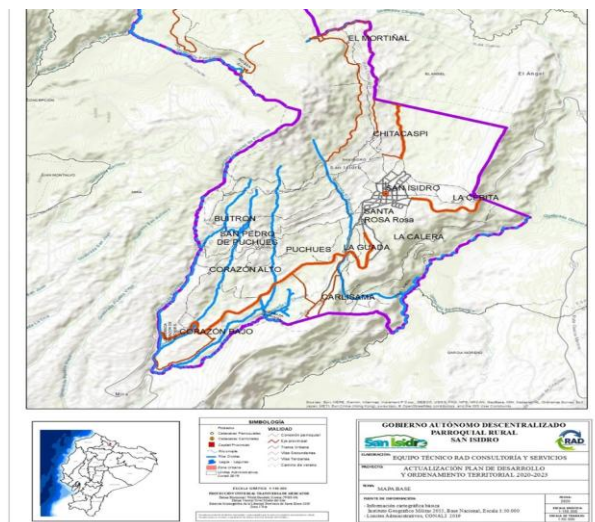
Las normativas aplicadas en Ecuador para la criopreservación de semen bovino buscan garantizar tanto el bienestar animal como la calidad sanitaria del semen, basándose en regulaciones nacionales como la Ley Orgánica de Salud Animal, el Reglamento de Bienestar Animal, el Código Orgánico del Ambiente y las directrices internacionales de la OIE. Las medidas adoptadas para asegurar el bienestar de los animales incluyen la capacitación del personal, el manejo adecuado del ambiente, el monitoreo de la salud del animal y el uso de técnicas no invasivas que minimicen el sufrimiento (Rodríguez, 2013).

## 5. Metodología

### 5.1 Área de Estudio.

El estudio fue desarrollado en la parroquia de San Isidro, que está asentada en el valle de su propio nombre, rodeada de la cordillera de Yungallí. Las coordenadas del lugar de estudio son 2216175 – 78 163841, el clima es templado, sub-húmeda, lluvioso, y muy lluvioso su temperatura fluctúa entre 12 y 18 °C. Con una extensión de 127,95 Km<sup>2</sup> o 12.795,41 has, distribuidas desde Max: 2080 m.s.n.m y Min: 1080 m s.n.m, en el que principalmente se desarrollan actividades relacionadas a la agricultura y ganadería.

Figura 2. Ubicación de la parroquia San Isidro



### 5.2 Procedimiento

#### 5.2.1 Enfoque Metodológico

Se llevó a cabo un estudio cuantitativo, dado que este enfoque permite medir de manera objetiva el impacto de la incorporación de fosfolípidos y antioxidantes en diluyentes seminales sobre los parámetros de calidad espermática post-descongelación en semen bovino. La naturaleza cuantificable de las variables analizadas, como la concentración y motilidad espermática, requiere técnicas estadísticas para establecer diferencias significativas entre los tratamientos evaluados.

Además, el uso de herramientas de análisis computarizado, como el sistema CASA (Computer-Assisted Semen Analysis), proporciona mediciones precisas y replicables, garantizando la validez y fiabilidad de los datos obtenidos. Este enfoque permite identificar tendencias, establecer relaciones causa-efecto y aportar evidencia científica rigurosa sobre la eficacia de los crioconservantes enriquecidos con fosfolípidos y antioxidantes en la preservación de la calidad seminal post-descongelación.

### 5.2.2 Diseño de la Investigación

Se realizó un estudio experimental utilizando un diseño anidado para evaluar el efecto de dos crioconservantes (Triladil y Andromed) sobre la calidad seminal de toros de la raza Charolais. Para la selección de los toros se estableció los siguientes criterios de inclusión: Salud corporal óptima, historial reproductivo satisfactorio y edad mínima de 18 meses.

Se obtuvo tres muestras seminales, las cuales se dividieron y se trataron con cada uno de los crioconservantes como lo muestra en la tabla 1. Cada muestra tratada tendrá tres réplicas, resultando en un total de 18 unidades experimentales. Las muestras fueron evaluadas en términos de concentración y motilidad espermática post-descongelación en semen bovino.

**Tabla 4.**

*Diseño experimental*

Raza	Número de animales	Medios de crioconservación	Repeticiones
Charolais	1	A	1A1
			1A2
			1A3
		T	1T1
			1T2
			1T3
	2	A	1A1
			1A2
			1A3
		T	1T1
			1T2
			1T3
3	A	1A1	
		1A2	

	1A3
	1T1
T	1T2
	1T3

**Nota:** La Tabla 4 presenta el diseño experimental utilizado en el estudio, donde se detalla la raza Charolais, el número de animales utilizados en cada grupo, los diferentes medios de criopreservación aplicados y las repeticiones correspondientes. Cada combinación de medio y repetición está identificada para facilitar el análisis de los resultados.

### 5.2.3 Tamaño de la muestra y tipo de muestreo

La unidad experimental está compuesta por una muestra de diseño anidado que incluye tres toros adultos de la raza Charolais, todos mayores de 18 meses. Estos toros han sido seleccionados de una población base que presenta características fenotípicas y genotípicas homogéneas.

Para asegurar la validez de los resultados, fue fundamental que estos animales cumplan con estrictos criterios de salud, incluyendo la ausencia de enfermedades como la aftosa, brucelosis y tuberculosis, así como estar libres de enfermedades parasitarias.

Estos animales fueron sometidos a una evaluación integral de sus características genotípicas y fenotípicas, considerando parámetros clave como la salud reproductiva, la capacidad adaptativa a condiciones ambientales adversas (clima y topografía). La dieta de los animales consistió principalmente en pasto gramalote (*Axonopus Scoparius*).

Para la identificación de los animales se implementó un sistema de identificación individual basado en aretes numerados, garantizando la trazabilidad de cada animal durante las actividades de campo.

### 5.3 Métodos Para la Obtención de la Muestra de Semen

Para la recolección de semen, se empleó una vagina artificial minitube, cuerpo con válvula, 30 cm, previamente acondicionada con aproximadamente 1 L de agua a una temperatura entre 40 y 48 °C. Esta temperatura fue ajustada según el entrenamiento individual de cada toro. Posteriormente, se reguló el flujo de aire para

optimizar la recolección. El eyaculado fue colectado en un tubo cónico graduado, el cual fue protegido con papel aluminio para preservar la calidad espermática, y posteriormente fue identificado y sellado.

Las muestras fueron trasladadas en un termo a 36-37 °C para su análisis inmediato, evitando así choques térmicos que pudieran afectar la viabilidad espermática. La elección del estímulo (macho o hembra) fue realizada de manera individualizada, considerando la respuesta sexual de cada donante.

#### **5.4 Fase de Laboratorio**

Para el examen de motilidad masal y motilidad individual se utilizó un microscopio invertido CKX 51 de marca Olympus en los lentes 4 x, 10 x, 40 x. Para el examen de morfología espermática se examinó en el microscopio marca SCIENTIFICA lente de 100x en aceite de inmersión.

La temperatura de las muestras se calentó en una mesa térmica marca WTA Slim a 37°C. Se utilizaron pipetas y punta para 5- 10 µl, 10 – 100 µl, 100 – 1000 µl; caja de porta objetos y cubre objetos. Para la concentración espermática se utilizó un fotodensímetro portátil ACCU READ marca IMV con cubetas de 4000 µl.

##### **5.4.1 Concentración Espermática**

La concentración espermática fue determinada con la ayuda de la foto densímetro

**Muy bueno (MB):** 750 - 1000 millones o más de espermatozoides por mL.

**Bueno (B)** 400 -750 millones de espermatozoides por mL.

**Regular (R):** 250-400 millones de espermatozoides por mL.

**Malo (M):** menos de 250 millones de espermatozoides por mL.

##### **5.4.2 Motilidad Masal**

Para determinar la motilidad masal, se colocó una gota de semen eyaculado de aproximadamente 5 mm de diámetro sobre un portaobjetos previamente calentado en una placa térmica. Sin añadir cubreobjetos, la muestra se observó en un campo luminoso a un aumento de 4x y 10x, y se registraron las características:

**Muy buena (MB):** movimiento en ondas vigoroso y en remolinos.

**Bueno (B):** remolinos y ondas lentas

**Regular (R):** sin remolinos, pero con oscilaciones generalizadas

**Malo (M):** escasa o ninguna motilidad individual

#### **5.4.3 Motilidad Individual**

Para evaluar la motilidad individual de los espermatozoides, se depositó una alícuota seminal de aproximadamente 5 mm de diámetro sobre un portaobjetos previamente calentado a 17°C en una placa térmica. A fin de preservar las condiciones fisiológicas de la muestra y facilitar la observación, se optó por no utilizar cubreobjetos. Posteriormente, se realizó una observación microscópica a 40x aumentos, donde se cuantificaron y clasificaron los espermatozoides según los siguientes parámetros:

**Muy buena (MB):** 80-100% de células móviles

**Bueno (B):** 60- 79 % de células móviles

**Regular (R):** 40-59% de células móviles

**Malo (M):** menos de 40 % de células móviles

#### **5.4.4 Morfología Espermática**

Para evaluar la morfología espermática, se depositó una alícuota seminal de aproximadamente 5 mm sobre un portaobjetos. A continuación, se añadió una gota de colorante eosin-nigrosina, y la muestra se homogenizó mediante movimientos suaves. Posteriormente, se realizó un extendido fino de la mezcla sobre el portaobjetos, distribuyéndola uniformemente. A fin de fijar y diferenciar las células, la preparación se incubó en una placa térmica a 37°C durante 3 horas.

Finalmente, se llevó a cabo la observación microscópica a 1000x de aumento utilizando objetivo de inmersión en aceite, evaluando un total de 100 espermatozoides para determinar las alteraciones morfológicas presentes.

### **5.5 Formulación y Caracterización de Diluyentes Seminales Para la Criopreservación.**

Los crioconservantes fueron preparados siguiendo estrictamente las indicaciones del fabricante, tal y como se detalla en el prospecto técnico adjunto (Anexos 3).

- Tryladil, 250 g, marca Minitube
- Andromed, 200 mL, marca Minitube

### **5.5.1 Cálculo del Volumen Total del Diluyente y Empajillado**

#### **Total, de espermatozoides viables**

**TEV=** Volumen del eyaculado x concentración espermática x morfología normal espermática expresada en % x motilidad espermática expresada en %

#### **Total, de pajillas**

**TP=** Total de espermatozoides viables / concentración espermática

#### **Volumen final**

**VF=** TP/ 2 con pajillas de 0,5CC

#### **Volumen del diluyente**

**VD=** Volumen final – Volumen del semen – Volumen de la predilección

Los medios nutritivos probados en este trabajo de investigación fueron los siguientes:

- Triladyl con yema de huevo
- Andromed

### **5.6 Pre Dilución**

Se preparó el diluyente seminal utilizando 2 mL de Tryladil, al cual se adicionaron 6 mL de agua bidestilada y 2 mL de yema de huevo, conformando así un volumen total de 10 mL. Previamente, tanto el semen colectado (10 mL) como los componentes del diluyente fueron termo equilibrados a 37°C.

Se convino el diluyente seminal en una proporción 4:1, empleando 8 mL de agua bidestilada y 2 mL de Andromed. Una vez homogeneizada la mezcla, se termoequilibró a 37°C junto con el eyaculado (10 mL).

### **5.7 Acondicionamiento**

Una vez mezclados los componentes del diluyente (Tryladil), se procedió a homogenizar la solución mediante agitación suave y constante. Posteriormente, se adicionó el semen al medio de dilución, homogeneizando nuevamente la mezcla. Para acondicionar los espermatozoides y permitir la interacción espermatozoide-diluyente, la muestra se incubó a 37°C durante 45 minutos.

Tras la incorporación del semen y una nueva homogeneización de la mezcla con el Andromed, se incubó la muestra a 37°C durante 45 minutos para acondicionar los espermatozoides

## **5.8 Dilución**

Se preparó los diluyentes seminales siguiendo los cálculos obtenidos a partir de las fórmulas correspondientes. Las mezclas se homogenizaron suavemente en vasos de precipitación, utilizando un agitador manual, con el fin de garantizar una distribución uniforme de los componentes sin dañar la integridad celular.

## **5.9 Empajillado y Sellado**

El proceso de llenado de pajillas se llevó a cabo mediante la técnica de aspiración, un método artesanal que depende de la habilidad y capacidad pulmonar del operador técnico.

Empleando un peene, se generó un vacío en el extremo proximal de la pajilla, aspirando una columna de 1 cm de semen diluido. Posteriormente, se sellaron las pajillas utilizando polvo polivinílico, el cual, al entrar en contacto con la humedad ambiental, formó un sello hermético. Posteriormente, la muestra seminal empajillada se refrigeró a 4°C durante 4 horas.

## **5.10 Congelación**

Una vez que las pajillas alcanzaron el periodo de refrigeración requerido, se procedió a su limpieza y secado utilizando toallas absorbentes, para luego iniciar el proceso de criopreservación. A continuación, se colocaron en un rack y se sometieron a un protocolo de congelación gradual en un crioconservador artesanal elaborado con un cooler de espuma flex. Este sistema, previamente calibrado a niveles de 2, 6 y 8 cm, permitió controlar la tasa de enfriamiento.

Inicialmente, se llenó el crioconservador con nitrógeno líquido hasta los 2 cm. Posteriormente, se introdujo el rack con las pajillas y se inició el proceso de congelación, exponiendo las muestras gradualmente a temperaturas más bajas: 8 cm durante 8 minutos, seguido de 6 cm durante 4 minutos. Finalmente, se sumergieron completamente en nitrógeno líquido para alcanzar la temperatura de almacenamiento. Las pajillas congeladas fueron transferidas a un termo de nitrógeno líquido.



## 5.11 Análisis Post Congelación

Se realizó una evaluación post congelación en el sistema CASA en esta evaluación las variables que fueron evaluadas son: - Motilidad total, motilidad progresiva e inmóviles (CASA): se colocó 10 µl de semen post congelado entre un porta y cubreobjetos precalentados a 37°C. El programa expreso el resultado en forma porcentual.

## 5.12 Variables de estudio.

**Tabla 5.**

*Variables de estudio*

Variable	Tipo de Variables	Definición operacional	Indicadores o medidas
Inclusión de antioxidantes y fosfolípidos en los criopreservantes	Variable independiente	La diferencia entre los dos medios utilizados es la presencia de antioxidante y fosfolípidos	Control y medio con antioxidante y fosfolípidos.
Motilidad	Variable dependiente	Caracterización de la motilidad considerado el porcentaje mediante el equipo casa.	Por categorías 1- 7 1: Motilidad a: total 2: Motilidad b: progresiva 3: Motilidad c: rápida 4: Motilidad d: lenta 5: Motilidad e: circular 6: Motilidad f: local 7:inmoviles
Concentración espermática	Variable dependiente.	Se determinarán los parámetros seminales a través de la concentración espermática.	Concentración: $10^6$ /mL

### 5.12.1 Procesamiento y Análisis de la Información.

El análisis estadístico se realizó utilizando SAS OnDemand for Academics, empleando un diseño anidado con un modelo mixto. En este diseño, cada animal fue

tratado como un efecto aleatorio, dado que las muestras provenientes de cada reproductor fueron expuestas a ambos tratamientos. El tratamiento se incluyó como un efecto fijo para evaluar su influencia en los parámetros de calidad espermática post-descongelación.

Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) dentro del modelo mixto, permitiendo estimar de manera precisa la variabilidad intra e interindividual. Este enfoque estadístico permitió controlar la correlación entre las observaciones dentro de cada animal, optimizando la comparación entre tratamientos y garantizando la validez de los resultados.

### **5.12.2 Consideraciones Éticas**

Los animales fueron manejados según las normas para el cuidado y uso de animales en investigación según el Código Orgánico del Ambiente (ROS N° 983, Ecuador).

## 6. Resultados

**Tabla 6.**

*Efecto del uso de fosfolípidos y antioxidantes sobre la calidad seminal en toros de la raza Charoláis.*

Variables	Unidad medida	de	Criopreservantes		EM	P-valor
			Base	Fosfolípidos + antioxidantes		
Concentración	10 <sup>6</sup> /mL		41,9	63,8	0,24	0,011
Motilidad total	%		49,7	67,5	0,12	0,014
Motilidad progresiva	%		41,3	55,1	0,64	0,076
Motilidad rápida	%		27,9	38,7	0,80	0,135
Motilidad lenta	%		12,0	15,4	0,84	0,013
Motilidad circular	%		1,38	2,12	0,41	0,142
Motilidad local	%		8,44	12,4	0,04	0,019
Inmóviles	%		50,3	32,6	0,11	0,014

Los análisis estadísticos evidenciaron que la adición de fosfolípidos y antioxidantes en el criopreservante tuvo un efecto significativo sobre la calidad espermática post-descongelación. En particular, se observó un incremento del 52,3% en la concentración espermática en comparación con el criopreservante base ( $P = 0,011$ ), lo que sugiere una mayor supervivencia celular tras el proceso de criopreservación.

La motilidad total y la motilidad progresiva mostraron un aumento del 35,8% y 33,4%, respectivamente. Aunque la motilidad total presentó una diferencia estadísticamente significativa ( $P = 0,014$ ), la motilidad progresiva no alcanzó el umbral de significancia ( $P = 0,076$ ), aunque sí mostró una tendencia favorable.

En relación con los patrones de movilidad, la motilidad lenta y la motilidad local registraron incrementos significativos ( $P = 0,013$  y  $P = 0,019$ , respectivamente). Por otro lado, la motilidad rápida y circular no presentaron diferencias significativas entre tratamientos ( $P > 0,05$ ), lo que sugiere que la mejora en la movilidad está relacionada principalmente con el aumento en la motilidad progresiva y local.

Finalmente, el porcentaje de espermatozoides inmóviles se redujo en 35,2% en el grupo tratado con fosfolípidos y antioxidantes ( $P = 0,014$ ), lo que indica una mayor viabilidad celular y potencial fertilizante tras la descongelación.

## 7. Discusión

La calidad seminal post-descongelación es un factor muy importante en la reproducción asistida de bovinos, ya que influye directamente en la tasa de fertilización. En este estudio, se evaluó el efecto de la adición de fosfolípidos y antioxidantes a los crioconservantes, encontrando que estas sustancias pueden mejorar significativamente la calidad del semen tras el proceso de congelación y descongelación.

Se ha demostrado que los fosfolípidos cumplen el papel de cubrir a la membrana celular durante el proceso de congelación. Según Pacheco et al. (2020), la inclusión de fosfolípidos en los crioconservante puede ayudar a mantener la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides, lo que es crucial para su funcionalidad y capacidad de fertilización.

Por otro lado, los antioxidantes son conocidos por su capacidad para neutralizar los radicales generados durante el proceso de congelación, causando daño oxidativo a las células espermáticas. De acuerdo con Sinha et al. (2019), el uso de antioxidantes en crioconservantes no solo protege a los espermatozoides del estrés oxidativo, sino que también mejora su capacidad de penetración en el ovocito.

En este estudio se compararon dos crioconservantes en su capacidad para preservar la calidad seminal post-descongelación en toros de la raza Charolais. Los resultados mostraron diferencias significativas en varios parámetros de calidad seminal, incluyendo concentración, motilidad total, motilidad progresiva y porcentaje de espermatozoides inmóviles.

Los resultados indicaron que el crioconservante que contenía fosfolípidos y antioxidantes reveló una mejora valiosa en la motilidad total (67,5%) y progresiva (55,1%) en comparación con el crioconservante base, que presentó valores de 49,7% y 41,3%, respectivamente. Estos hallazgos son análogos con estudios previos que han demostrado que la inclusión de fosfolípidos en los crioconservante puede mejorar la integridad de la membrana espermática y, por ende, la motilidad espermática (Ludeña, 2019; Barragán et al., 2022). Este hallazgo es respaldado por investigaciones previas que indican que la interacción entre estos compuestos puede potenciar sus efectos protectores (González et al., 2021).

Por otro lado, el porcentaje de espermatozoides inmóviles encontrados fue significativamente menor en el grupo tratado con fosfolípidos y antioxidantes (32,6%) en comparación con el grupo control (50,3%). Este resultado sugiere que la utilización de criopreservantes con combinación de fosfolípidos y antioxidantes no solo protege a los espermatozoides del daño durante el proceso de congelación, sino que también mejora su viabilidad post-descongelación. Según Hidalgo (2018), el estrés oxidativo es uno de los principales factores que contribuyen a la disminución de la calidad seminal durante la criopreservación, y el uso de antioxidantes puede mitigar este efecto.

Además, el estudio de González y Pallares (2013) respalda la idea de que la elección del diluyente es crucial para la criopreservación del semen. En su investigación, se observó que diferentes diluyentes pueden afectar la calidad del semen de manera significativa, lo que resalta la importancia de optimizar las formulaciones de criopreservantes para maximizar la calidad seminal.

La calidad seminal observada en este estudio también se alinea con los hallazgos de Junqueira (2021), quien destacó que la nutrición y el manejo adecuado de los reproductores son factores determinantes en la calidad del semen. La inclusión de antioxidantes en los criopreservantes puede ser vista como una extensión de estas prácticas de manejo, proporcionando un entorno más favorable para la preservación de la calidad seminal.

## **8. Conclusiones**

El uso de criopreservantes que incorporan fosfolípidos y antioxidantes demostró ser significativamente más efectivo en la preservación de la calidad seminal post-descongelación en toros de la raza Charolais en comparación con el criopreservante base.

El incremento significativo en la concentración espermática post-descongelación con el uso de criopreservantes enriquecidos sugiere una mayor supervivencia celular tras la criopreservación. Esta mejora es clave para optimizar la dosis seminal utilizada en inseminación artificial, permitiendo un uso más eficiente del material genético de alto valor. En la práctica, este hallazgo se traduce en la posibilidad de reducir la cantidad de eyaculados necesarios para la producción de pajillas, optimizando la rentabilidad del proceso sin comprometer la calidad espermática.

La incorporación de fosfolípidos y antioxidantes en los criopreservantes mejoró significativamente la motilidad total y redujo el porcentaje de espermatozoides inmóviles tras la descongelación. Estos resultados indican que el uso de criopreservantes enriquecidos puede optimizar la viabilidad espermática, favoreciendo el desplazamiento eficiente de los espermatozoides y, por tanto, aumentando las probabilidades de éxito en la inseminación artificial. Su aplicación en programas de reproducción asistida permitiría mejorar la eficiencia en la fertilización, especialmente en sistemas de producción bovina que dependen de la criopreservación para el manejo genético de los reproductores.

## **9. Recomendaciones**

Se recomienda la utilización de crioconservantes que contengan fosfolípidos y antioxidantes. Los resultados del estudio indican que estos componentes mejoran significativamente la calidad seminal post-descongelación, lo que puede aumentar las tasas de fertilidad.

Se sugiere establecer un protocolo de monitoreo regular de la calidad seminal en los toros utilizados como donantes de semen para la inseminación. Esto permitirá identificar variaciones en la calidad del semen y ajustar los métodos de manejo y conservación según sea necesario.

Se sugiere llevar a cabo investigaciones complementarias que analicen diversas concentraciones de fosfolípidos y antioxidantes, así como su impacto en distintas razas de bovinos. Este enfoque permitirá identificar las formulaciones más efectivas para optimizar la calidad del semen bajo variadas condiciones.

Es fundamental garantizar que todas las actividades asociadas con la recolección y el manejo del semen se adhieran a las normativas éticas y de bienestar animal. Esto implica cumplir con las directrices estipuladas en el Código Orgánico del Ambiente, así como con otras regulaciones relevantes en la materia.

Difundir los resultados de esta investigación entre la comunidad ganadera y científica mediante seminarios, talleres y publicaciones es fundamental. Esta estrategia promoverá la implementación de prácticas fundamentadas en evidencia y facilitará el progreso del conocimiento en el ámbito de la reproducción animal.



## 10. Bibliografía

- Alban, A. E. (2006). *Efecto de la variación de temperatura en la curva de enfriamiento y en el proceso de empaque sobre la calidad biológica del semen bovino* (Doctoral, Zamorano: Escuela Agrícola Panamericana, 2016).
- Ariagno, J., y Mormandi, E. (2021). *Guía práctica para la evaluación del semen*. *Revista Bioquímica y Patología Clínica*, 80(3), 29-36.
- Baca, D. (2019). *Procesamiento de semen bovino*. Obtenido de Repositorio digital UAAAN:<http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/45631/DAVID%20ALONSO%20BACA%20DE%20LA%20FUENTE.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Barragán, I., Usbeck, A. S., Condolo, L., Villafuerte, A., y Mira, J. M. (2022). *Evaluación del efecto crioprotector de diferentes fuentes de antioxidantes en el semen bovino*. *Polo del Conocimiento*, 7(7), Article 7. <https://doi.org/10.23857/pc.v7i7.4294>
- Bedford, S. (2014). *Examen de aptitud reproductiva de toros—Manejo y nutrición*. Manual de veterinaria de MSD. <https://www.msdrvetermanual.com/es/manejo-y-nutricion/examen-de-aptitud-reproductiva-del-macho/examen-de-aptitud-reproductiva-de-toros>
- Bellabarba, G. (2005). *Revista Venezolana de Endocrinología y Metabolismo*. Estrés oxidativo y función espermática, 3(3), 7
- Betancourt, E. (2022). *Automatización de un Sistema Criogénico de Preservación de Semen Bovino por medio de un RST*. <https://rinacional.tecnm.mx/jspui/handle/TecNM/5709>
- Gobierno Autónomo Descentralizado Provincial de Morona Santiago (GADPMS). 2023. *Plan de Desarrollo y Ordenamiento Territorial de la Provincia de Morona Santiago 2019-2023*. Morona Santiago. Ecuador.
- Bonaura, M. C. (2018). *Morfología Espermática*. En Atlas de reproducción de animales de producción y de compañía. Universidad Nacional de La Plata. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/163063>
- 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-dosdiluyentes-comerciales-para-preservar-semen-bovino.pdf>

- Coyago, S., (2022). *Caracterización de los sistemas productivos de bovinos de carne en la parroquia Sinaí, cantón Morona, provincia Morona Santiago.*
- Díaz Duque, N. A., y López Castaño, P. A. (2018). Protocolos de criopreservación de semen bovino.
- 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>
- González, A. K., y Pallares, J. D. (2013). *Eficiencia comparativa entre dos diluyentes para la criopreservación de semen en toros brahmán en el departamento de Antioquia.*
- González, M., et al. (2021). "Synergistic effects of phospholipids and antioxidants on sperm quality." *Animal Reproduction Science.*
- Guerrero, G. D. V. (2014). *Manual de procedimientos para la colecta y criopreservación de semen bovino para la empresa santa clara genética estado paraná – Brasil.*
- Hidalgo, M. Á. G. (2018). *Estrés oxidativo y antioxidantes. Avances en Investigación Agropecuaria*, 22(1), 29-46.
- Junqueira, B. (2021). *Estrategias para la nutrición de reproductores.* Totalpec. [https://totalpec.com/blog/115/estrategias-para-la-nutricion-de-reproductores-](https://totalpec.com/blog/115/estrategias-para-la-nutricion-de-reproductores)
- López, D. L. G., Escobar, M. de los Á. C., y Rocha, J. F. M. (2023). *Guía del manejo del semen bovino durante su colecta y envío para procesos de criopreservación de pajillas seminales* [Text.Chapter]. Editorial AGROSAVIA. <https://editorial.agrosavia.co/index.php/publicaciones/catalog/view/336/356/2063-1>
- Ludeña, O. E. A. (2019). Evaluación de dos antioxidantes en la calidad seminal post congelación de dos biotipos de ganado bovino criollo de la provincia de Loja. *Universidad Nacional de Loja*, 29-31.
- Maurat, E. R., Oleas, E. R., Vaca, M. L., y Condolo, L. A. (2020). *Valoración de la calidad seminal en toros charoláis de la provincia de Morona Santiago. Polo del Conocimiento*, 5(4), Article 4. <https://doi.org/10.23857/pc.v5i4.1365>
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (2020). *Datos productivos de la raza Charolés.* Gobierno de España.

- Molano, D. A., y Lombana, H. E. (2021). *Fundamentos y métodos para la dilución y congelación de semen en bovinos*. Universidad Cooperativa de Colombia, Facultad de Ciencias de la Salud, Medicina Veterinaria y Zootecnia. <https://hdl.handle.net/20.500.12494/34389>
- Monroy, C. L., Hincapié, J. J., y Matamoros, I. A. (2024). *Efecto de la recongelación sobre la membrana plasmática, morfología, viabilidad y motilidad individual en los espermatozoides bovinos*. *Archivos de Zootecnia*, 73(282), Article 282. <https://doi.org/10.21071/az.v73i282.5840>
- Muiño, R. (2008). *Evaluación de la motilidad y viabilidad del semen bovino mediante el uso de sistemas CASA y citometría de flujo: Identificación de subpoblaciones espermáticas*. Univ Santiago de Compostela.
- Muiño, R., y Peña, A. (2009). *Estudio comparativo de tres diluyentes: Andromed®, Biociphos Plus® y Biladyl®*. Evaluación de la supervivencia y longevidad espermáticas post-descongelación de espermatozoides bovinos . XXXIX Jornadas de Estudio. XIII Jornadas sobre producción Animal, 1, 714-716. Recuperado de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3209305>
- Nabors, B. (2021). Anatomía del sistema reproductor del toro. En *Reproducción bovina*, RM Hopper (Ed.). <https://doi.org/10.1002/9781119602484.ch1>
- Sequeira, L.T (2015). *Andrología e Inseminación Artificial*. Recuperado de <https://cenida.una.edu.ni/textos/nl10s480.pdf>
- Sinha, A., et al. (2019). "Antioxidants in cryopreservation: A review." *Reproductive Biology and Endocrinology*.
- Pacheco, J., et al. (2020). "Effects of phospholipids on sperm membrane integrity during cryopreservation." *Journal of Animal Science*.
- Plaul, S., y Laube A., (2023). Capítulo 21. Sistema reproductor del macho.
- Páez, E. M., y Corredor, E. S. (2014). *Evaluación de la aptitud reproductiva del toro*. CIENCIA Y AGRICULTURA, 11(2), 49. <https://doi.org/10.19053/01228420.3837>
- Zurita, M. (2021, noviembre 22). *Morona Santiago es la quinta provincia en producción de ganado bovino*. Teleamazonas. <https://www.teleamazonas.com/ganado-bovino-morona-santiago/>

## 11. Anexos.

### **Anexo 1. Preparación de la vagina artificial**



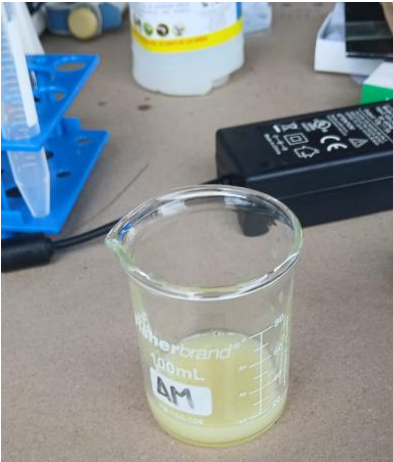
### **Anexo 2. Colecta del semen**



### **Anexo 3. Dilución del semen**



**Anexo 4. Acondicionamiento del semen**



**Anexo 5. Enfriado del semen**



**Anexo 6. Empajillado del semen**



**Anexo 7. Sellado de las pajillas**



**Anexo 8. Congelado de las pajillas**



**Anexo 9. Crioconservación de las pajillas**



**Anexo 10. Análisis post congelación**



**Anexo 11. Resultados**

Malcon	75	Triladyl	3	51,72	68,49	60,85	44,18	13,8	2,88	7,64	31,51
Malcon	75	AndroMed	1	76,11	81,67	70,34	48,97	18,71	2,66	11,32	18,33
Malcon	75	AndroMed	2	50,35	70,02	60,36	41,26	16,69	2,41	9,66	29,98
Malcon	75	AndroMed	3	7,34	43,34	26,66	14,42	11,91	0,33	16,38	56,96
Madaga scar	76	Triladyl	1	54,25	42,05	33,42	21,29	11,8	0,33	8,62	57,95
Madaga scar	76	Triladyl	2	34,98	34,02	25,31	15,88	8,48	0,95	8,71	65,98
Madaga scar	76	Triladyl	3	44,34	40,68	32,74	21,65	9,7	1,38	7,94	59,32
Madaga scar	76	AndroMed	1	64,62	85,2	78,36	58,45	15,58	4,33	6,84	14,8
Madaga scar	76	AndroMed	2	32,97	72,15	58,8	38,46	17,83	2,5	13,35	27,85
Madaga scar	76	AndroMed	3	49	59,25	45,43	29,4	13,58	2,46	13,81	40,75



Dytroit	77	Triladyl	1	4,38	50,05	41,36	29,37	10,7	28	7	49,
Dytroit	77	Triladyl	2	56,55	40,47	57	17,25	12,71	0,62	9,89	59,53
Dytroit	77	Triladyl	3	41,77	35,	25,72	10,3	15,29	0,13	9,98	64,3
Dytroit	77	AndroMed	1	51,01	56,08	46,23	34,46	10,27	1,5	9,85	43,92
Dytroit	77		2	71,73	63,9	43,17	24,47	17,82	0,87	20,73	36,1
Dytroit	77	AndroMed	3	91	75,81	66,55	58,12	16,38	2,06	9,26	24,19