



Universidad
Nacional
de Loja

Universidad Nacional de Loja

Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales

Renovables

Carrera de Medicina Veterinaria

Maestría en Reproducción Animal con Mención en Rumiantes

**Evaluación de protocolos de transporte de semen bovino
congelado bajo diferentes temperaturas y tiempos de
descongelación**

Trabajo de Titulación, previo a la
obtención del título de Magister en
Reproducción Animal con Mención
en Rumiantes

Autor:

Xavier Octavio Zambrano Intriago

Director:

Dr. Wilmer Augusto Vacacela Ajila, Mgtr.

Loja – Ecuador

2025

Educamos para Transformar

Certificación

CERTIFICADO DE CULMINACIÓN Y APROBACIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, **VACACELA AJILA WILMER AUGUSTO**, director del Trabajo de Titulación denominado **Evaluación de protocolo de transporte de semen bovino congelado bajo diferentes temperaturas y tiempos de descongelación**, perteneciente al estudiante **XAVIER OCTAVIO ZAMBRANO INTRIAGO**, con cédula de Identidad N° **0923334577**.

Certifico:

Que luego de haber dirigido el **Trabajo de Titulación**, habiendo realizado una revisión exhaustiva para prevenir y eliminar cualquier forma de plagio, garantizando la debida honestidad académica, se encuentra concluido, aprobado y está en condiciones para ser presentado ante las instancias correspondientes.

Es lo que puedo certificar en honor a la verdad, a fin de que, de así considerarlo pertinente, el/la señor/a docente de la asignatura de **Titulación**, proceda al registro del mismo en el Sistema de Gestión Académico como parte de los requisitos de acreditación de la Unidad de Titulación del mencionado estudiante.

Loja, 20 de Diciembre de 2024



F) _____
DIRECTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN



Certificado TIC/TT.: UNL-2024-003188

Autoría

Yo, **Xavier Octavio Zambrano Intriago**, declaro ser autor del presente trabajo de titulación, **Evaluación de protocolos de transporte de semen bovino congelado bajo diferentes temperaturas y tiempos de descongelación** y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos, de posibles reclamos o acciones legales, por el contenido de la misma.

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

Firma:



Cédula: 0923334577

Fecha: Loja, 14 de Marzo del 2025

Correo Electrónico: xavier.zambrano@unl.edu.ec

Teléfono: 0959233405

Carta de autorización por parte del autor, para consulta, reproducción parcial o total y/o publicación electrónica del texto completo del Trabajo de Titulación.

Yo, **Xavier Octavio Zambrano Intriago**, declaro ser el autor del trabajo de Titulación denominado: **Evaluación de protocolos de transporte de semen bovino congelado bajo diferentes temperaturas y tiempos de descongelación**, como requisito para optar el título de **Magíster en Reproducción Animal con Mención en Rumiantes**, 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 que realice un tercero.

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, a los catorce días del mes de marzo del dos mil veinticinco.

Firma: 

Autor: Dr. Xavier Octavio Zambrano Intriago

Cédula: 0923334577

Correo Electrónico: xavier.zambrano@unl.edu.ec

Teléfono: 0959233405

DATOS COMPLEMENTARIOS

Director de Tesis: Dr. Wilmer Vacacela Ajila, Mgtr

Agradecimiento

Agradezco a Dios por darme la oportunidad de tener de salud y vida para adquirir más conocimientos en esta majestuosa Maestría en Reproducción Animal, gracias a mi mamá Dr. Glenda Intriago y mi papá Dr. Xavier Zambrano por guiarme al buen camino para ser un excelente Médico Veterinario Zootecnista.

Al Dr. Manuel Quezada Director de la maestría junto al Dr. Wilmer Vacacela Director de mi trabajo de Titulación gracias por sus enseñanzas, por su tiempo, por su dedicación para que este trabajo salga perfecto.

Mis compañeros de la maestría un excelente grupo de colegas por lo cual se estableció una amistad muy espectacular que compartimos muchos conocimientos técnicos en el área de ganadería en diferentes regiones del Ecuador como la costa, sierra y oriente.

Pablo Villavicencio, Jefferson Lasso, Luis Chávez, Jonathan Delgado, Ing. Patricio Cevallos, Sergi Quirumbay, gracias por su apoyo, y siempre les deseare lo mejor en la vida profesional.

Xavier Octavio Zambrano Intriago

Dedicatoria

Esta dedicatoria va exclusivamente para mí por el cual mi esfuerzo, mi tiempo, mis conocimientos ayudaron para culminar el objetivo que me propuse al comenzar la maestría.

Lo logre, gracias Padre celestial por tus bendiciones que haces llegar a mi vida.

Xavier Octavio Zambrano Intriago

Índice de contenidos

Portada.....	i
Certificación	ii
Autoría.....	iii
Carta de autorización	iv
Agradecimiento.....	v
Dedicatoria.....	vi
Índice de contenidos	vii
Índice de tablas	ix
Índice de anexos.....	x
1. Título.....	1
2. Resumen.....	2
2.1 Abstract.....	3
3. Introducción.....	4
4. Marco Teórico.....	6
4.1 El espermatozoide	6
4.2 Morfología del espermatozoide.....	6
4.3 Recolección de semen	6
4.3.1 Recolección a través de vagina artificial.....	6
4.3.2 Recolección por electro eyaculación	6
4.4 Evaluación de la calidad de semen	7
4.4.1 Motilidad espermática.....	7
4.4.2 Morfología espermática	7
4.5 Congelamiento del semen del bovino.....	7
4.5.1 Descongelamiento del semen	8
4.5.2 Protocolo de descongelamiento	8
4.5.3 Evaluación del semen descongelado	8
4.6 Importancia de la temperatura en la calidad del semen	8
4.7 Impacto de la temperatura en la calidad del semen.....	9
4.8 Impacto del tiempo de transporte en la calidad del semen.....	9
4.9 Trabajos de investigación relacionados.....	9
5. Metodología	10
5.1 Área de estudio.....	10
5.2 Procedimiento.....	10

5.2.1 Enfoque metodológico	10
5.2.2 Diseño de la investigación	10
5.2.3 Tamaño de la muestra y tipo de muestreo.....	11
5.2.4 Técnicas	11
5.2.4.1 Materiales de laboratorio	11
5.2.4.2 Proceso de descongelamiento de las pajuelas	12
5.2.5 Protocolos de estudio	12
5.2.5.1 Protocolo A: temperatura de 5°C	12
5.2.5.2 Protocolo B: temperatura de 39° C	12
5.2.5.3 Protocolo C: temperatura de 42° C	12
5.2.6 Como medir la motilidad	13
5.2.7 Evaluación de la viabilidad espermática	13
5.2.8 Variables	14
5.2.8.1 Variable independiente	14
5.2.8.2 Variables dependientes:	14
5.3 Procesamiento y análisis de la información.....	14
5.4 Consideraciones éticas	14
6. Resultados	15
6.1 Comparación de la motilidad de los espermatozoides en muestras de semen de bovino descongeladas a diferentes temperaturas.....	15
6.2 Análisis del efecto de diferentes tiempos de descongelación en la viabilidad espermática de semen de bovino congelado	16
6.3 Identificación de las mejoras prácticas que se podrían implementar al momento de la descongelación para reducir al mínimo el daño espermático	18
7. Discusión..	19
8. Conclusiones	20
9. Recomendaciones.....	21
10. Bibliografía	22
11. ANEXOS	26

Índice de tablas

Tabla 1.	Organización de los grupos experimentales	11
Tabla 2.	Clasificación de la motilidad del semen descongelado	13
Tabla 3.	Efectos de la temperatura y tiempo en la motilidad individual	15
Tabla 4.	Análisis de la Varianza (SC tipo III) de la motilidad individual	15
Tabla 5.	Efectos de la temperatura y tiempo en la proporción de espermatozoides vivos.....	16
Tabla 6.	Análisis de la Varianza (SC tipo III) de la proporción de espermatozoides vivos según protocolo	16
Tabla 7.	Efectos de la temperatura y tiempo en la proporción de espermatozoides muertos.....	17
Tabla 8.	Análisis de la Varianza (SC tipo III) de la proporción de espermatozoides muertos según protocolo.....	17

Índice de anexos

Anexo 1. Análisis estadístico de las variables de estudio mediante un arreglo factorial 3x3, con la ayuda del programa Infostat 2020.....	26
Anexo 2. Recolección de pajuelas para los protocolos	29
Anexo 3. Pajuelas que se utilizaron para los tratamientos	30
Anexo 4. Protocolo de descongelación de pajuelas	30
Anexo 5. Método CASA	30
Anexo 6. Análisis de los resultados por el método CASA.....	31

1. Título

Evaluación de protocolos de transporte de semen bovino congelado bajo diferentes temperaturas y tiempos de descongelación.

2. Resumen

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Universidad Nacional de Loja, con el objetivo de comparar protocolos de temperatura de transporte de pajuelas, analizando la motilidad y viabilidad en diferentes intervalos de tiempo. El primer protocolo consistió en transportarlo a una temperatura de 5°C, el segundo protocolo a 39°C y el tercer protocolo a 42°C. Se evaluaron 9 pajuelas por protocolo, en cada uno de ellos se hicieron análisis en tres intervalos de tiempo, a los 30, 60 y 90 minutos. Las variables que se analizaron fueron: motilidad individual, porcentaje de espermatozoides vivos, porcentaje de espermatozoides muertos. El tipo de diseño experimental utilizado fue un diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial 3x3. Según el análisis de varianza de las tres variables de estudio no existe un efecto de la temperatura, del tiempo ni de la interacción de estos dos factores sobre la motilidad espermática, la proporción de espermatozoides vivos y la proporción de espermatozoides muertos. Sin embargo, los resultados mostraron que el mejor protocolo de transporte es en un medio con una temperatura de 39 grados centígrados, pues el promedio de motilidad individual fue 48,69% y el intervalo de tiempo con mejores valores en motilidad individual fue a los 30 minutos, ya que se logró tener un promedio de 50,82%. Con respecto a la viabilidad, el mejor promedio de espermatozoides vivos se registró en la temperatura de 39 grados centígrados (50,56%), mientras que el tiempo en el que mejor promedio de espermatozoides vivos se registró, fue a los 30 minutos (54,44%). En conclusión, el protocolo de transporte a 39°C es el más adecuado para preservar la calidad de semen bovino, ya que garantiza una mayor motilidad individual y una mayor proporción de espermatozoides vivos, especialmente en los primeros 30 minutos post-descongelación.

Palabras clave: motilidad, reproducción, rumiantes, semen

2.1 Abstract

The present work was carried out at the Animal Reproduction Laboratory of the Universidad Nacional de Loja, with the objective of comparing temperature protocols for transporting straws, analyzing motility and viability at different time intervals. The first protocol consisted of transporting them at a temperature of 5°C, the second protocol at 39°C, and the third protocol at 42°C. Nine straws per protocol were evaluated, and each protocol was analyzed at three time intervals, at 30, 60 and 90 minutes. The variables analyzed were: individual motility, percentage of live spermatozoa, percentage of dead spermatozoa. The type of experimental design used was a completely randomized design with a 3x3 factorial arrangement. According to the analysis of variance of the three study variables, there is no effect of temperature, time or the interaction of these two factors on sperm motility, the proportion of live spermatozoa and the proportion of dead spermatozoa. However, the results showed that the best transport protocol is in a medium with a temperature of 39 degrees Celsius, since the average individual motility was 48.69% and the time interval with the best values in individual motility was 30 minutes, since an average of 50.82% was achieved. With respect to viability, the best average of live spermatozoa was recorded at a temperature of 39 degrees Celsius (50.56%), while the time interval with the best average of live spermatozoa was 30 minutes (54.44%). In conclusion, the transport protocol at 39°C is the most suitable for preserving the quality of bovine semen, as it ensures higher individual motility and a greater proportion of live sperm, especially in the first 30 minutes post-thawing.

Keywords: *motility, reproduction, ruminants, semen*

3. Introducción

La demanda de carne vacuno a nivel mundial sigue en aumento debido a la creciente demanda de alimento, además que esta es una fuente de proteína con características muy deseadas en la población. Que este sistema sea sostenible con el tiempo depende de una serie de factores entre los cuales está la alta eficiencia y el aumento de la productividad en las explotaciones pecuarias (Greenwood, 2021). El crecimiento poblacional, los recursos limitados que existen, y la presión que ejercen ciertos organismos con respecto a la emisión de gases de efecto invernadero procedente de la ganadería, hacen que se le exija a la industria alimentaria que se evalúen y optimice la producción agropecuaria (Gleason & White, 2019).

En Ecuador la demanda de productos, sobre todo de aquellos denominados como orgánicos, ya sean estos productos agrícolas o procedentes de producción animal, están en aumento, muchas personas tienen la intención de pagar un poco más por este tipo de productos, ya que generalmente se lo asocia a buena salud, pero la baja oferta de estos productos hace que este mercado aún no se logre desarrollar. También afecta que no existen lugares específicos que ofrezcan regularmente este tipo de productos, ya que se los comercializa en ferias especiales que se realizan con poca frecuencia (Andrade & Ayaviri, 2018).

La inseminación artificial (IA) es una técnica que se ha venido implementando en todo el mundo, pues ha mejorado el rendimiento reproductivo en los rebaños y ha permitido mejorar la genética de los animales. Con el objetivo de aprovechar aún más esta técnica se han implementado protocolos de inseminación artificial a tiempo fijo (IATF), que permiten controlar el crecimiento de los folículos y la ovulación, por lo que se puede usar la IA en determinados días y sin la complejidad que involucra la detección del estro. Actualmente en Brasil, el 86% de las inseminaciones que se realizan en ese país es bajo este método. Este método ha permitido que las hembras en edad reproductiva aumenten de 5.8% a 13.1% en un periodo de dieciséis años (Baruselli, y otros, 2019).

La inseminación artificial ha permitido el avance genético en los rebaños, y aumentar el retorno económico de los sistemas de producción ganadera. En el trópico el uso de IA permite que se use semen de animales tipo *B. taurus* en cruzamientos, ya que, en condiciones naturales, por monta natural, los animales usados como reproductores no tendrían las condiciones para adaptarse al medio ambiente (Fernández, 2010). La IATF presenta algunos beneficios además del económico, pues evita el problema relacionado con la detección del

celo, permite disminuir los días de anestro post parto, y permite concentrar los partos en un determinado periodo de tiempo (Fischman et al., 2014).

En la inseminación artificial el manejo de la pajuela con el contenido seminal una vez descongelada es un punto en el cual hay que tener mucha precaución, ya que se debe tener cuidado con el producto debido a los choques térmicos que puede sufrir durante el transcurso del descongelamiento hasta el momento de su implantación en el cuerpo del útero (Quintero, 2022). Se recalca el manejo de la pajuela descongelada, el protocolo que se debe llevar a cabo es muy importante, pues necesita ser protegido de los cambios de temperatura, de frío o calor, además que esta, una vez descongelada el tiempo máximo en la cual debe utilizarse es entre 6 y 8 minutos después del descongelamiento (Diskin, 2018). Los inseminadores por lo general descongelan el semen según su propia experiencia, en parte por la existencia de varios protocolos para realizar el descongelamiento, pero muchas veces debido a la variación en tiempo y temperatura que no son los indicados, las características de los espermatozoides se ven afectadas y por consecuencia el rendimiento reproductivo se ve mermado (García, 2015).

En la presente investigación se plantearon los siguientes objetivos:

- Comparar la motilidad de los espermatozoides en muestras de semen bovino descongeladas a diferentes temperaturas
- Analizar el efecto de diferentes tiempos de descongelación en la viabilidad espermática de semen bovino congelado
- Identificar las mejoras prácticas que se podrían implementar al momento de la descongelación para reducir al mínimo el daño espermático

4. Marco Teórico

4.1 El espermatozoide

Todo el aparato reproductor del macho actúa de forma conjunta con el fin de producir espermatozoides y posteriormente depositarlos en tracto femenino. En los testículos se lleva a cabo la espermatogonia que consiste en un proceso largo en el cual células madre conocidas como espermatogonias se dividirán y diferenciarán hasta dar como resultado los espermatozoides. El espermatozoide maduro cuenta con una cabeza, una sección intermedia y una cola (Bradley, 2014)

4.2 Morfología del espermatozoide

En la cabeza está el material genético que va a proceder a combinarse con el material que se encuentra en el oocito durante el proceso de la fecundación. Encima de la cabeza del espermatozoide se encuentra el acrosoma, que contiene enzimas muy importantes que cumplen con el trabajo de ayudar en el proceso de penetración en el oocito. El segmento intermedio se encarga en parte de la movilidad ya que contiene mitocondrias que se van a encargar de proveer la energía necesaria para que los microtúbulos ubicados en la cola produzcan el movimiento del espermatozoide (Bradley, 2014).

4.3 Recolección de semen

El procedimiento de la recolección de semen de bovino se hace válido cuando se prepara los animales para la colecta, se los procede a inmovilizar, se hace una evaluación del recto, se hace una limpieza, y posterior estimulación de las glándulas anexas, se procede a hacer la colecta y posterior análisis al microscópico (Choque-Lopez, Bueno, López, & Valerio, 2015).

4.3.1 Recolección a través de vagina artificial

El uso de una vagina artificial es el método favorito para la recolección en algunas especies, pues a través del uso de esta, se puede recolectar una muestra de semen del animal que conserve las mismas características que se podría recolectar en una monta natural. Se usa una caja que en su interior tiene una funda de látex, en donde se coloca agua o aire a una temperatura adecuada con el fin de generar una presión similar al de una vagina real y así lograr que el semental eyacule (Serres, 2015).

4.3.2 Recolección por electro eyaculación

El uso del dispositivo electro eyaculador para obtener el semen de los sementales, consiste en primero realizar un masaje tras-rectal, con el propósito de excitar al animal, posteriormente

se introduce el dispositivo elegido, este provoca pulsaciones que van de 0 MA a 150 de manera gradual y con breves pausas, hasta poder conseguir la erección del miembro del animal y eventualmente la eyaculación del mismo (Mejía, 2017).

4.4 Evaluación de la calidad de semen

Para determinar la aptitud reproductiva que tiene un animal que se quiere tener como reproductor, se necesita inspeccionar tres aspectos clave que no involucran mucho costo, y que consiste en un examen sencillo y práctico. Se realiza un examen físico tanto de los órganos sexuales internos como externos, se analiza la libido del animal, y por último la evaluación de la colecta del semen del animal. Realizar este examen permite determinar la fertilidad que puede tener un animal y determinar el éxito del uso de material seminal en un programa reproductivo (Páez & Corredor, 2014).

4.4.1 Motilidad espermática

La motilidad espermática se puede evaluar como motilidad masal, o motilidad individual, en ambas se coloca una muestra del contenido seminal sobre una placa porta objetos a temperatura de 37-38°C, además que se usa una platina térmica para conservar la temperatura. En la motilidad masal se observa el movimiento en masa de los espermatozoides y se evalúa con una escala subjetiva, mientras que la motilidad individual se evalúa el porcentaje de espermatozoides con un movimiento rectilíneo y continuo (Benítez, Chamba, Sánchez, Luzón, & Sánchez, 2018).

4.4.2 Morfología espermática

La morfología espermática de los reproductores es uno de los principales indicadores que utilizan los médicos veterinarios como parámetro para evaluar la precocidad sexual de los futuros reproductores. Este aspecto se considera incluso como más confiable cuando los reproductores aún están en la etapa de desarrollo sexual (Freneau, 2011).

Los defectos se pueden clasificar por la región afectada, pues así tenemos defectos de la cabeza, de la parte intermedia y defectos de la cola.

4.5 Congelamiento del semen del bovino

Debido a la composición variable del dilutor, y a los tipos de crioprotectores, en los protocolos de congelación no se ha establecido la curva ideal a seguir para la congelación de las pajuelas con el material seminal. En algunas fuentes se indica que primero se expone al vapor del nitrógeno las pajuelas de forma horizontal, sin sumergirlas aun, después ya se las

sumerge dentro del tanque de nitrógeno líquido en donde se podrán almacenar por un tiempo indeterminado siempre y cuando las condiciones del tanque se conserven (Canniso et al., 2008).

4.5.1 Descongelamiento del semen

Dependiendo de la forma y tamaño del recipiente en el cual se envasó el semen puede variar el tiempo en el cual se produce la correcta descongelación del material seminal. Además, un adecuado proceso de descongelamiento va a variar en función del medio que se use para descongelar las pajuelas, de la temperatura del medio a la cual queramos someter las pajuelas, y sobre todo del tiempo que empleemos en descongelar las mismas (Bernardi, Di Prinzio, Maglione, Rinaudo , & Marini, Efecto del protocolo de descongelación de semen sobre el porcentaje de preñez en bovinos lecheros, 2014).

4.5.2 Protocolo de descongelamiento

Según la literatura, la forma más ideal de realizar un correcto descongelamiento del material seminal contenido en las pajuelas, es sumergir estas en agua tibia, la cual debe estar a una temperatura de entre 35°C y 37°C en periodos de tiempo de entre 30 y 35 segundos de manera controlada. Este procedimiento se hace para que de manera progresiva las pajuelas alcancen una temperatura ideal, similar al del útero de la vaca y no se produzca el shock térmico que provoca la muerte de los espermatozoides (Bernardi, Di Prinzio, Maglione, Rinaudo , & Marini, Efecto del protocolo de descongelación de semen sobre el porcentaje de preñez en bovinos lecheros, 2014).

4.5.3 Evaluación del semen descongelado

Debido a que someter el material seminal a técnicas de crío preservación puede afectar tanto la morfología como la parte funcional del espermatozoide, se deben hacer análisis pos-descongelamiento para seleccionar aquellos espermatozoides que logren ser altamente funcionales. Directamente después del descongelamiento se puede analizar morfología, viabilidad y fragmentación del ADN (Cabrera, Sánchez, & Risopatron, 2014).

4.6 Importancia de la temperatura en la calidad del semen

La importancia de la temperatura a la cual debe estar el semen al momento de la monta o de la inseminación artificial utilizando pajuelas de un reproductor, si influye con respecto a la categoría que se la asigna a las hembras (nulíparas, multíparas, primíparas) y con respecto al porcentaje de partos, ya que los mejores valores se obtienen en aquellas hembras en las cual se utilizó el semen a una temperatura de 37°C (Alemán , Alfaro, & Hurtado, 2006).

4.7 Impacto de la temperatura en la calidad del semen

El impacto que tiene la temperatura en el semen se ha logrado evidenciar al comparar semen congelado con semen refrigerado, ya que la técnica de criopreservación afecta la integridad de los espermatozoides, pues el semen refrigerado ha demostrado ser relativamente superior al congelado, en el semen refrigerado la relación entre espermatozoides moriles y la motilidad progresiva individual es superior, también es superior la tasa de preñez en aquellas hembras inseminadas con semen refrigerado (Porrás, Maldonado , & Rodríguez, 2024) .

4.8 Impacto del tiempo de transporte en la calidad del semen

El impacto que tiene el tiempo de retención antes de proceder a realizar la crio preservación de los espermatozoides es evidente solo hasta cuando se sobrepasa las 24 horas, mientras que en conjunto con la temperatura, la calidad del esperma si se ve afectada, cuando se realiza el descongelamiento a 70°C durante 8 segundos, la viabilidad de los espermatozoides, la motilidad y otras variables cinéticas son mayores en comparación a cuando se descongela el material seminal a 37°C por 20 segundos (Tomás, Gómez, Gómez, & de Mercado, 2012).

4.9 Trabajos de investigación relacionados

Anchatuña (2017) evaluó el efecto de distintos tiempos de equilibrio sobre la calidad espermática pre y post congelación, en la viabilidad espermática en los resultados post congelación se encontró un 68,69% de espermatozoides vivos a las dos horas de tiempo de equilibrio.

En el trabajo de Segura et al. (2023) con el objetivo de comparar dos temperaturas de dilución sobre la calidad de semen, ambos tratamientos con diluciones iniciales a 34°C, pero con la diferencia de un dilutor final a 34°C y a 5°C. Después de 16 horas de refrigeración, el tratamiento con dilución inicial y final de 34°C influyo de manera positiva en la vitalidad de los espermatozoides (80,89%)

En el trabajo de García (2015) con el objetivo de estudiar protocolos de temperatura de transporte de pajueta que no usen nitrógeno líquido, y evaluar el impacto en la calidad del semen. Se utilizaron tres tipos de temperatura, entre 1,5 y 5°C, a 18°C, y a 38°C, evaluados a 30, 45 y 60 minutos. Se determinó que el mejor porcentaje de motilidad y viabilidad fue en el protocolo de transporte de entre 1.5 y 5°C y que en los tres tiempos de transporte los valores no variaron mucho y fueron aceptables.

5. Metodología

5.1 Área de estudio

El estudio se efectuó en la Finca Punzara, en el laboratorio de reproducción animal del campus de Medicina Veterinaria de La Universidad Nacional de Loja, ubicada en la Avenida Pío Jaramillo Alvarado y Reinaldo Espinosa. El lugar se encuentra a 2150 msnm, con temperatura promedio de 16,5 °C y humedad relativa de 75%.

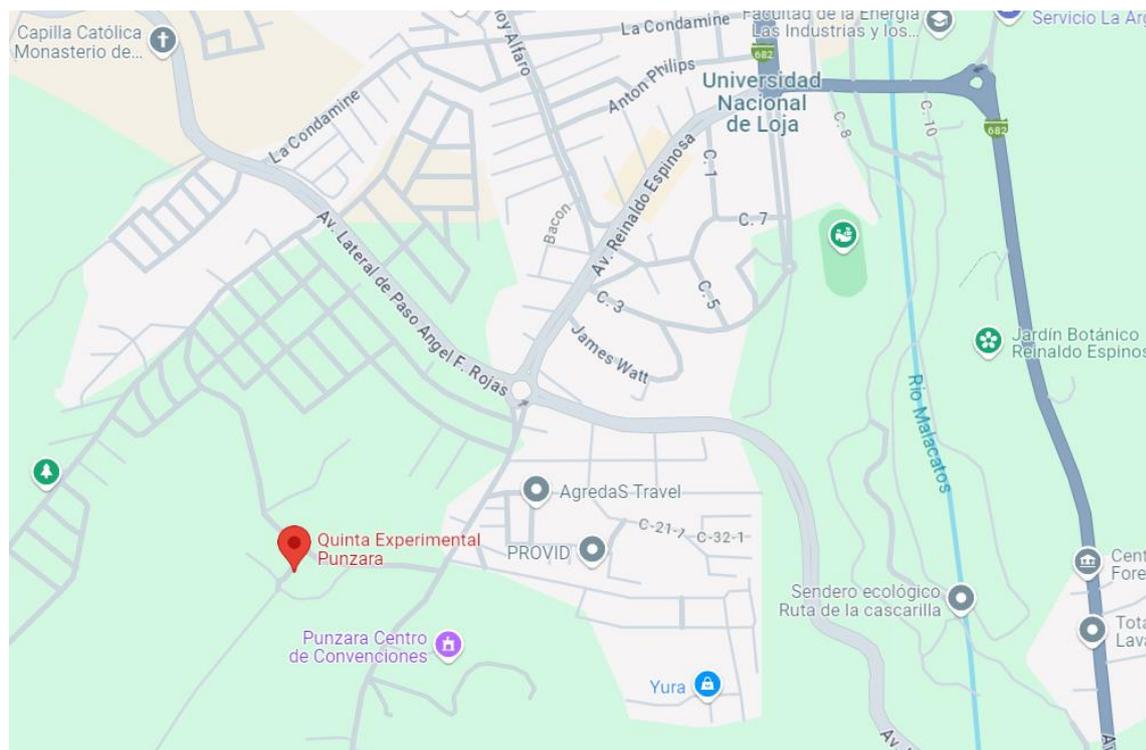


FIGURA 1. Ubicación del laboratorio donde se realizó el estudio

5.2 Procedimiento

5.2.1 Enfoque metodológico

El tipo de trabajo fue de análisis cuantitativo, ya que nos permitió considerar el porcentaje de motilidad de los espermatozoides.

5.2.2 Diseño de la investigación

El diseño de tipo experimental fue con arreglo factorial, las muestras se distribuyeron de manera aleatoria y homogénea en un arreglo factorial 3x3, en donde está contemplado 3 diferentes temperaturas (a 5°C, a 39°C y 42°C) y 3 tiempos para el análisis, a 30, 60 y 90 minutos. Cada protocolo contempló 9 repeticiones.

5.2.3 Tamaño de la muestra y tipo de muestreo

Las unidades experimentales utilizadas en este estudio fueron pajuelas de animales de raza Charoláis, el tamaño de la muestra se determinó con la fórmula para calcular la muestra de una población finita. Luego de aplicar la formula respectiva se determinó que el tamaño de la muestra fueran 27 unidades experimentales.

$$n = \frac{N * Z^2 * p * q}{e^2 * (N - 1) + (Z^2 * p * q)}$$

El tipo de muestreo para esta investigación fue aleatorio estratificado porque nos permite dividir la población en diferentes subgrupos o estratos que comparten características similares (en este caso, las pajuelas se pueden considerar dentro de los estratos definidos por las combinaciones de temperatura y tiempo). Luego, se seleccionan muestras aleatoriamente de cada estrato de manera proporcional o igualitaria.

La organización de los grupos experimentales fue como se indica en la tabla 1.

Tabla 1.

Organización de los grupos experimentales

Grupo	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Número de Pajuelas
1	5	30	3
2	5	60	3
3	5	90	3
4	39	30	3
5	39	60	3
6	39	90	3
7	42	30	3
8	42	60	3
9	42	90	3

5.2.4 Técnicas

5.2.4.1 Materiales de laboratorio

- Microscopio
- Platina térmica
- Esterilizador de material de vidrio y plástico
- Tubos falcon de 50ml
- Tubos eppendorf de 2 ml

- Porta y cubre objetos
- Colorante eosina-nigrosina
- Micropipetas
- Puntas
- Cronómetros
- Hielo

5.2.4.2 Proceso de descongelamiento de las pajuelas

- Se extrajo la pajueta del termo de nitrógeno líquido
- Se sacudió y se limpió la pajueta con una toalla de papel
- Se dividió el número de pajuelas destinados a un protocolo en cuatro porciones
- Inmediatamente se descongelaron las pajuelas que se iban a utilizar en agua a temperatura de 38°C durante dos minutos para evaluar la motilidad inicial, luego se procedió a evaluar en los tres tiempos de estudio (30, 60 y 90 minutos) en los distintos protocolos a evaluar.
- Transcurrido el tiempo, se procede a realizar los análisis de motilidad, supervivencia y morfología en cada protocolo

5.2.5 Protocolos de estudio

5.2.5.1 Protocolo A: temperatura de 5°C

La pajueta luego de sacarla del termo del nitrógeno líquido, se lo puso en un cooler de plumafon con cubos de hielo hasta alcanzar la temperatura indicada de 5 grados centígrados. A los 30 minutos se puso a calentar la pajueta a 38°C por 15 segundos para el primer análisis, posteriormente se procedió a hacer el análisis a los 60 y 90 minutos respectivamente.

5.2.5.2 Protocolo B: temperatura de 39° C

Se transportó las pajuelas en un cooler con hielo. Se monitoreó todo el tiempo la temperatura, y se procedió con el respectivo método de descongelación a 39 grados por 15 segundos para hacer los análisis a los 30, 60 y 90 minutos.

5.2.5.3 Protocolo C: temperatura de 42° C

Se transportó las pajuelas en un cooler con hielo. Se monitoreó todo el tiempo la temperatura, y se procedió con el respectivo método de descongelación a 42 grados por 15 segundos para hacer los análisis a los 30, 60 y 90 minutos.

5.2.6 Como medir la motilidad

Se pudo evaluar de manera tradicional, esto se lo hace inmediatamente después de descongelado y luego de haber sido incubado a 37°C por dos horas. Se colocó una gota del semen entre un porta y cubre objetos que debe estar tibio y se evaluó con 100 aumentos al microscopio. Un semen descongelado presenta en 40% y 50% espermatozoides con motilidad progresiva, después de dos horas los valores disminuyen entre un 10 y 15% (Morillo, Salazar, & Castillo, 2012). La clasificación del semen descongelado se realizó en base a la tabla 2.

Tabla 2.

Clasificación de la motilidad del semen descongelado

Escala	Clasificación
0	Sin movimiento
1	Ligera ondulación de cola sin progresión
2	Progresión lenta, incluye detención y comienzo de movimiento
3	Movimiento progresivo continuo y velocidad moderada
4	Movimiento progresivo rápido
5	Movimiento progresivo muy rápido

La motilidad espermática se evaluó a través del sistema CASA (Computer Assited Sperm Analysis), en este sistema computarizado, entre los parámetros que evalúa este sistema se encuentran la velocidad curvilínea, velocidad rectilínea, velocidad lineal, índice de linealidad, índice de rectitud, índice de oscilación y amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide. Al ser un análisis realizado por un sistema computarizado, se minimiza el error humano que está sujeto a la subjetividad de la persona que realiza el análisis cuando se lo realiza al microscopio (Hernandez, Nivia , Hernandez, Rubio, & Quintero, 2013).

5.2.7 Evaluación de la viabilidad espermática

El método que se usó para medir la viabilidad posdescongelación es en base al porcentaje de acrosomas intactos. Par llevar a cabo esta técnica el espermatozoide debió ser detenido con glutaraldehído bufferado a 0,2%. Se tuvo que examinar 200 células a 1000 aumentos y los valores mínimos para considerar una clasificación satisfactoria era 50% de acrosoma intacto inmediatamente después de la descongelación y 35% de acrosomas intactos luego de dos horas de descongelación (Morillo, Salazar, & Castillo, 2012).

5.2.8 Variables

5.2.8.1 Variable independiente

- Temperatura de transporte
- Tiempo de exposición
- Protocolo de transporte pos-descongelamiento

5.2.8.2 Variables dependientes:

- Motilidad individual
- Número de espermatozoides vivos
- Número de espermatozoides muertos

5.3 Procesamiento y análisis de la información

Para analizar si existen diferencias significativas entre al menos un protocolo se utilizó un análisis de varianza, y para establecer cuáles son los que presentan diferencias en los promedios se usó la prueba de Turkey.

5.4 Consideraciones éticas

En este estudio, se siguieron estrictamente las normas éticas relacionadas con la manipulación de material biológico, asegurando que las prácticas de recolección, almacenamiento y transporte de semen bovino se realicen de manera responsable y sin causar daño innecesario a los animales. Además, se garantizó la transparencia en la presentación de los resultados, evitando cualquier tipo de manipulación de datos que pueda llevar a conclusiones erróneas.

6. Resultados

6.1 Comparación de la motilidad de los espermatozoides en muestras de semen de bovino descongeladas a diferentes temperaturas

En cada protocolo de temperatura de transporte, se determinó en cada intervalo de tiempo los valores de motilidad individual que fueron obtenidos por el Método CASA. Los valores se detallan en la tabla 3.

Tabla 3.

Efectos de la temperatura y tiempo en la motilidad individual

Variable	Temperatura de transporte(°C)		
	5°C	39°C	42°C
Motilidad individual	38,44%	48,69%	46,14%
	Tiempo de transporte(minutos)		
	30 min	60 min	90 min
	50,82%	40,57%	41,88%

Fuente: Investigación de campo

Autor: Zambrano Octavio

Tabla 4.

Análisis de la Varianza (SC tipo III) de la motilidad individual

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1476,07	8	184,51	0,62	0,7515
Temperatura	240,07	2	120,04	0,4	0,6745
Tiempo	662,52	2	331,26	1,11	0,3509
Temperatura*Tiempo	573,48	4	143,37	0,48	0,7496
Error	5368,67	18	298,26		
Total	6844,74	26			

Fuente: Investigación de campo

Autor: Zambrano Octavio

Como se indica en la tabla 3, la temperatura en la que se registró una mayor motilidad fue en 39°C. En cambio, según el tiempo de transporte, a los 30 minutos fue donde se registró una mayor motilidad individual. Según el análisis estadístico mostrado en la tabla 4, no existe un efecto significativo de la temperatura sobre la motilidad, tampoco existe un efecto significativo del tiempo sobre la motilidad individual. Además, no existe un efecto

significativo de la interacción temperatura y tiempo sobre la motilidad individual de los espermatozoides.

6.2 Análisis del efecto de diferentes tiempos de descongelación en la viabilidad espermática de semen de bovino congelado

Proporción de espermatozoides vivos según protocolo de transporte

En cada protocolo de temperatura de transporte, en cada intervalo de tiempo, se determinó el porcentaje de espermatozoides vivos. Los resultados se detallan en la tabla 4

Tabla 5.

Efectos de la temperatura y tiempo en la proporción de espermatozoides vivos

Variable	Temperatura de transporte(°C)		
	5°C	39°C	42°C
Espermatozoides vivos	43,44%	50,56%	48,44%
	Tiempo de transporte(minutos)		
	30 min	60 min	90 min
	54,44%	43,33%	44,67%

Fuente: Investigación de campo

Autor: Zambrano Octavio

Tabla 6.

Análisis de la Varianza (SC tipo III) de la proporción de espermatozoides vivos según protocolo

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1476,07	8	184,51	0,62	0,7515
Temperatura	240,07	2	120,04	0,4	0,6745
Tiempo	662,52	2	331,26	1,11	0,3509
Temperatura*Tiempo	573,48	4	143,37	0,48	0,7496
Error	5368,67	18	298,26		
Total	6844,74	26			

Fuente: Investigación de campo

Autor: Zambrano Octavio

Como se indica en la tabla 5, el mejor promedio de espermatozoides vivos se registró en la temperatura de 39 grados centígrados, mientras que el tiempo en el que mejor promedio de espermatozoides vivos se registró, fue a los 30 minutos. Según el análisis estadístico mostrado en la tabla 6, no existe un efecto significativo de la temperatura sobre viabilidad, tampoco

existe un efecto significativo del tiempo sobre la viabilidad. Además, no existe un efecto significativo de la interacción temperatura y tiempo en la proporción de espermatozoides vivos.

Proporción de espermatozoides muertos según protocolo de transporte

En cada protocolo de temperatura de transporte, en cada intervalo de tiempo, se determinó el porcentaje de espermatozoides muertos. Los resultados se detallan en la tabla 7

Tabla 7.

Efectos de la temperatura y tiempo en la proporción de espermatozoides muertos

Variable	Temperatura de transporte(°C)		
	5°C	39°C	42°C
Espermatozoides muertos	50,56%	49,44%	51,56%
	Tiempo de transporte(minutos)		
	30 min	60 min	90 min
	45,56%	56,67%	55,33%

Fuente: Investigación de campo

Autor: Zambrano Octavio

Tabla 8.

Análisis de la Varianza (SC tipo III) de la proporción de espermatozoides muertos según protocolo

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1476,07	8	184,51	0,62	0,7515
Temperatura	240,07	2	120,04	0,4	0,6745
Tiempo	662,52	2	331,26	1,11	0,3509
Temperatura*Tiempo	573,48	4	143,37	0,48	0,7496
Error	5368,67	18	298,26		
Total	6844,74	26			

Fuente: Investigación de campo

Autor: Zambrano Octavio

Como se muestra en la tabla 7, el promedio donde se registró la mayor cantidad de espermatozoides muertos fue en la temperatura de 42 grados centígrados, mientras que el tiempo en el cual fue mayor el promedio de espermatozoides muertos, fue a los 60 minutos. Según el análisis estadístico mostrado en la tabla 8, no existe un efecto significativo de la temperatura sobre la proporción de espermatozoides muertos, tampoco existe un efecto

significativo del tiempo. Además, no existe un efecto significativo de la interacción temperatura y tiempo sobre la proporción de espermatozoides muertos.

6.3 Identificación de las mejoras prácticas que se podrían implementar al momento de la descongelación para reducir al mínimo el daño espermático

Luego de haber realizado el trabajo práctico y de haber consultado trabajos similares, se podrían tomar ciertas medidas en cuanto al proceso de descongelación con el fin de reducir el impacto tanto de la temperatura como del tiempo sobre los espermatozoides. Las mejoras prácticas a criterio personal serían:

- Usar métodos de descongelación adecuados y probados, tomar en cuenta el tiempo y la temperatura correcta para descongelar las pajuelas
- Evitar usar métodos poco convencionales durante el proceso de descongelación como el posicionar la pajuela en los bolsillos o en la región axilar de los que manipulan el producto, ya que esta práctica poco convencional puede dañar la integridad de la membrana espermática (Villa, Amaya, García, Nieto, & Terán, 2016)
- Mantener una temperatura constante en el medio de descongelación
- De tener que transportar y no poder movilizar o contar con un tanque de nitrógeno líquido, usar un medio con la temperatura adecuada e intentar utilizar el producto en los primeros 30 minutos, ya que hasta este punto se registran los mejores valores de motilidad y viabilidad espermática.

7. Discusión

Tanto en el trabajo de García (2015) que utilizó tres protocolos de temperatura: 1,5°C a 5°C, 18°C y 38°C en tres intervalos de tiempo(30, 45 y 90 minutos), como en el presente trabajo que se usó tres protocolos de temperatura, entre ellos 5°C, 39°C y 42°C y con intervalos de tiempo similares(30, 60 y 90 minutos), en ambos trabajos se determinó a través de un análisis de varianza que la interacción de la temperatura y tiempo no influyó de manera significativa en la motilidad individual de los espermatozoides. Al contrario del trabajo de Bernardi et al., (2015) donde se demostró que dejar el material seminal en agua caliente para su respectiva descongelación por periodos de tiempo de más de un minuto, si afecta a los espermatozoides motiles y progresivos, por lo que se recomienda usar inmediatamente para evitar cambios bruscos de temperatura que comprometan aún más la dosis seminal.

En este trabajo se determinó que los valores de motilidad disminuyeron en los protocolos de temperatura de 42°C y cuando pasaran más de 60 minutos, esto puede ser ya que como lo indica Diaz y López (2018) tanto los procesos de congelación como de descongelación del semen del bovino afectan directamente la membrana y el acrosoma, por lo tanto, afecta la función del espermatozoide. Como se puede demostrar en el estudio de Bernardi et al., (2011) en donde al usar determinadas temperaturas en el proceso de descongelación (35°C, 37°C, y 40°C) el porcentaje de daño del acrosoma fue mayor, por lo tanto, además de verse afectada la motilidad, se vería afectada la viabilidad espermática.

Pero los efectos producidos por la temperatura, y que afectan a la movilidad y viabilidad del espermatozoide, según Kowalczyk y Czerniawska (2021) se podrían evitar si se usan agentes crioprotectores como el Elamipretide puede mejorar la funcionalidad de los espermatozoides congelados y una vez descongelados, mejorando la supervivencia de estos debido al estrés oxidativo. Además, según Villa et. al, (2016) aparte de la temperatura y el tiempo, se ha comprobado que existen otros factores que pueden afectar las características de los espermatozoides como lo son las practicas poco convencionales de descongelamiento que pueden afectar la integridad de la membrana espermática.

8. Conclusiones

- El protocolo de transporte a 39°C asegura una mayor motilidad individual en el semen
- Independientemente de la temperatura, una mayor motilidad individual mayor a los 30 minutos, eventualmente conforme pasa el tiempo esta decae.
- En el protocolo de transporte de 39°C se obtuvo la mayor proporción de espermatozoides vivos y a los 30 minutos se registran los valores más altos de espermatozoides vivos
- La temperatura menos adecuada para transportar material seminal es 42°C, ya que en dicha temperatura se registran los valores más elevados de espermatozoides muertos.
- El mejor protocolo de transporte es en un medio con una temperatura de 39°C y durante los primeros 30 minutos, ya que se logran tener los valores más altos tanto en motilidad individual como en proporción de espermatozoides vivos.

9. Recomendaciones

- Utilizar el semen seleccionado durante los primeros 30 minutos, ya que es donde los valores de motilidad individual son más altos
- Utilizar medios a 42°C ya que son ideales para conservar una motilidad y viabilidad aceptable
- Realizar más estudios con protocolos que estén por debajo de los 30 minutos para conocer si los valores de motilidad y viabilidad son mejores que los presentados en este estudio.
- Contemplar usar otro factor de estudio en el modelo, además de la temperatura y el tiempo, analizar el efecto de la adición de sustancias antioxidantes a los medios de descongelación.
- Seguir las pautas para realizar un correcto descongelamiento, usar el material apropiado y evitar prácticas poco convencionales.

10. Bibliografía

- Alemán , D., Alfaro, M., & Hurtado, E. (2006). EFFECT OF SEMEN TEMPERATURE ON THE REPRODUCTIVE ANSWER OF SOWS. *Idesia (Arica)*, 24(3), 33-37. doi:<http://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292006000300005>
- Anchatuña Quinga, C. (2017). Efecto de distintos tiempos de equilibrio sobre la calidad espermatocaria pre y post-congelación de semen bovino de toros reproductores Holstein Friesian. Universidad Central del Ecuador. Obtenido de <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/10145>
- Andrade, C., & Ayaviri, D. (2018). Demand and Consumption of Organic Products in the Riobamba Cantón, Ecuador. *Información tecnológica*, 29(4), 217-22. doi:<http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642018000400217>.
- Baruselli, P., Catussi, B., Abreu, L., Elliff, F., Silva, L., Batista, E., & Crepaldi, G. (2019). Evolução e perspectivas da inseminação artificial em bovinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 43(2). Obtenido de <http://cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v43/n2/p308-314%28RB812%29.pdf>
- Benítez, E., Chamba, H., Sánchez, E., Luzón, F., & Sánchez, J. (2018). Evaluación comparativa de dos métodos de recuperación espermática de epidídimos bovinos post-mortem. *Abanico veterinario*, 8(1), 59-74. doi:<https://doi.org/10.21929/abavet2018.81.6>
- Bernardi , S., Allende, R., Mazzeo, R., Monti, J., & Marini, P. (2011). Evaluación de los cambios ocasionados en espermatozoides bovinos por variaciones en el manejo de las dosis durante su manipulación en inseminación artificial. *InVet*, 13(2), 25-38. Obtenido de https://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S1668-34982011000200003&script=sci_arttext&tlng=pt#tab2
- Bernardi, S., Di Prinzio, M., Maglione , D., Rinaudo, A., & Marini, P. (2015). Efecto del protocolo de descongelación de semen sobre el porcentaje de preñez en bovinos lecheros. *Revista veterinaria*, 26(1), 27-32. Obtenido de https://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S1669-68402015000100005&script=sci_arttext&tlng=en
- Bernardi, S., Di Prinzio, M., Maglione, D., Rinaudo , A., & Marini, P. (2014). Efecto del protocolo de descongelación de semen sobre el porcentaje de preñez en bovinos lecheros. *Revista veterinaria*, 26(1), 27-32. Obtenido de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S1669-68402015000100005&script=sci_arttext&tlng=en
- Bradley, K. (2014). *Cunningham Fisiología Veterinaria* (Quinta ed.). Elsevier.
- Cabrera, P., Sánchez, R., & Risopatron, J. (2014). Selección Espermática en Semen Congelado/Descongelado de Equino: Evaluación de las Membranas Plasmática, Acrosomal y Potencial de Membrana Mitocondrial. *International Journal of Morphology*, 32(2), 725-731. doi:<https://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022014000200057>

- Canniso, I., Souza, F., Ortigoza, J., Ribeiro, G., Davies, M., Capistrano, E., . . . Linhares, A. (2008). Congelamiento de semen de burro (*Equus asinus*). *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, *19*(2), 113-125. Obtenido de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1609-91172008000200002&script=sci_arttext
- Choque-Lopez, J., Bueno, J., López, M., & Valerio, D. (2015). Protocolo de recolección de semen de razas bovinas y caprinas tropicales en el Centro Especializado en Biotecnología Reproductiva. *APF*, *4*(1), 37-40. Obtenido de <https://www.sodiaf.org.do/apf/index.php/apf/article/view/44>
- Dagnino, J. (2014). Análisis de varianza. *Revista chilena de anestesia*, *43*(4), 306-310. Obtenido de <https://revistachilenadeanestesia.cl/PII/revchilanestv43n04.07.pdf>
- Diaz, N., & López, P. (2018). Protocolos de criopreservación de semen bovino. *Tesis*. Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira. Obtenido de <https://hdl.handle.net/11059/9496>
- Diskin, M. (2018). Review: Semen handling, time of insemination and insemination technique in cattle. *Animal : an international journal of animal bioscience*, *12*, s75–s84. doi:doi:10.1017/S1751731118000952
- Fernández, A. (2010). Manejo Eficiente de la Inseminación Artificial. Obtenido de <http://hdl.handle.net/10872/4993>
- Fischman, M., González, L., Ghirardosi, M., Torres, P., Malcervelli, D., Fratto, M., . . . Cisale, H. (2014). Evaluación integral de la calidad seminal bovina: valor agregado para la inseminación artificial a tiempo fijo. *V Jornadas Académicas de la RedVitec*. Córdoba. Obtenido de <http://hdl.handle.net/11086/2453>
- Freneau, G. (2011). Aspectos da morfologia espermática em touros. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, *35*(2). Obtenido de <http://cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v35n2/RB370%20Freneau%20pag160-170.pdf>
- García Sanchez, P. (2015). Evaluación del semen de bovino pos descongelación según temperaturas de transporte. *Tesis de Grado*. Loja, Ecuador: Universidad Nacional de Loja. Obtenido de <https://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/11489/1/Priscila%20Salom%C3%A9%20Garc%C3%ADa%20S%C3%A1nchez.pdf>
- García, P. (2015). EVALUACIÓN DEL SEMEN DE BOVINO POS DESCONGELACIÓN SEGÚN TEMPERATURAS DE TRANSPORTE. Loja. Obtenido de <https://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/11489/1/Priscila%20Salom%C3%A9%20Garc%C3%ADa%20S%C3%A1nchez.pdf>
- Gleason, C., & White, R. (2019). BEEF SPECIES-RUMINANT NUTRITION CACTUS BEEF SYMPOSIUM: A role for beef cattle in sustainable U.S. food production1. *Journal of animal science*, *97*(9), 4010-4020. doi:10.1093/jas/skz173
- Greenwood, P. (2021). Review: An overview of beef production from pasture and feedlot globally, as demand for beef and the need for sustainable practices increase. *Animal* :

an international journal of animal bioscience, 15(1), 100295.
doi:10.1016/j.animal.2021.100295

- Hernandez, L., Nivia, A., Hernandez, D., Rubio, J., & Quintero, A. (2013). Evaluación de la motilidad espermática a través del sistema C.A.S.A de semen caprino criopreservado bajo diferentes medios diluyentes. *Respuestas*, 18(2), 16–27. doi:https://doi.org/10.22463/0122820X.443
- Kowalczyk, A., & Czerniawska, E. (2021). Antioxidant effect of Elamipretide on bull's sperm cells during freezing/thawing process. *Andrology*, 9(4), 1275–1281. doi:10.1111/andr.12996
- Mejía, J. (2017). Evaluación pre y post congelación del semen obtenido con vagina artificial y electroeyaculador en el ganado criollo. Obtenido de <https://www.semanticscholar.org/paper/Evaluaci%C3%B3n-pre-y-post-congelaci%C3%B3n-del-semen-con-y-Guti%C3%A9rez-Esteban/b81fa5f7ff6d4d7fc73be6a452bc8653017b5f14>
- Morillo, M., Salazar, S., & Castillo, E. (2012). *Evaluación del potencial reproductivo del macho bovino*. (C. N. Agropecuarias, Ed.) Maracay: Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas.
- Páez, E., & Corredor, E. (2014). Evaluación de la aptitud reproductiva del toro. *Ciencia y Agricultura*, 11(2), 49-59. Obtenido de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=560058659007>
- Porras, J., Maldonado, G., & Rodriguez, C. (2024). Evaluación De Protocolos Iatf Con Semen Congelado Vs Refrigerado En Bovinos Brahman. *Ciencia en Desarrollo*, 15(1), 23-28. doi:https://doi.org/10.19053/01217488.v15.n1.2024.15896
- Quintero, A. (2022). Artificial Insemination Strategies in Cattle: From the Conventional to the Use of Sexed Semen. *Archivos Latinoamericanos De Producción Animal*, 30(2), 21-30. doi:https://doi.org/10.53588/alpa.300603.
- Rodriguez, M., & Mora, R. (2001). Análisis de regresión simple. En M. Rodriguez, & R. Mora, *Estadística informática : casos y ejemplos con el SPSS*. Alicante: Publicaciones de la Universidad de Alicante.
- Segura Portocarrero, G., Quispe Ccasa, H., Saucedo Uriarte, J., Poclín Rojas, A., Murga Valderrama, N., Cortez Polanco, J., & Ampuero Trigroso, G. (2023). Efecto de dos temperaturas de dilución sobre la calidad de semen en ganado cebuino del Trópico Peruano. *Revista Veterinaria*, 34(1), 33-39. doi:https://doi.org/10.30972/vet.3416608
- Serres, C. (2015). MÉTODOS TRADICIONALES Y ALTERNATIVOS DE EXTRACCIÓN DE SEMEN. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/272492707_METODOS_TRADICIONALES_Y_ALTERNATIVOS_DE_EXTRACCION_DE_SEMEN?enrichId=rgreq-b2ec2526e4f287c768437ae91d2746ac-XXX&enrichSource=Y292ZXJQYWdlOzI3MjQ5MjcwNztBUzoxOTg2NzU0MDcwODU1NzJAMTQyNDM3OTMxNjc0Mw%3D%3D&el

- Tomás, C., Gómez, J., Gómez, E., & de Mercado, E. (2012). Effect of the holding time at 15 °C prior to cryopreservation, the thawing rate and the post-thaw incubation temperature on the boar sperm quality after cryopreservation. *Animal reproduction science*, *144*(3-4), 115–121. doi:<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.12.011>
- Villa, N., Amaya, C., García, D., Nieto, N., & Terán, N. (2016). Efecto de la manipulación del semen criopreservado de bovinos *Bos Taurus* sobre la integridad espermática. *Ciencia y Agricultura*, *13*(1), 9-18. Obtenido de <https://www.redalyc.org/journal/5600/560062814001/html/>

11. ANEXOS

Anexo 1. Análisis estadístico de las variables de estudio mediante un arreglo factorial 3x3, con la ayuda del programa Infostat 2020.

Motilidad Individual

Nueva tabla: 18/12/2024 - 21:20:40 - [Versión : 30/4/2020]

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Respuesta	27	0,16	0,00	46,30

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1435,59	8	179,45	0,42	0,8914
Temperatura	513,06	2	256,53	0,61	0,5561
Tiempo	561,03	2	280,51	0,66	0,5274
Temperatura*Tiempo	361,50	4	90,37	0,21	0,9274
Error	7614,03	18	423,00		
Total	9049,62	26			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=24,74419

Error: 423,0018 gl: 18

Temperatura	Medias	n	E.E.	
a1	38,44	9	6,86	A
a3	46,14	9	6,86	A
a2	48,69	9	6,86	A

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

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=24,74419

Error: 423,0018 gl: 18

Tiempo	Medias	n	E.E.	
b2	40,57	9	6,86	A
b3	41,88	9	6,86	A
b1	50,82	9	6,86	A

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

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=58,83998

Error: 423,0018 gl: 18

Temperatura	Tiempo	Medias	n	E.E.	
a1	b2	34,66	3	11,87	A
a1	b3	35,21	3	11,87	A

a3	b2	36,10	3	11,87	A
a2	b3	42,17	3	11,87	A
a1	b1	45,44	3	11,87	A
a3	b3	48,25	3	11,87	A
a2	b2	50,93	3	11,87	A
a2	b1	52,97	3	11,87	A
a3	b1	54,06	3	11,87	A

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

% Epermatozides vivos

C:\Users\Usuario\Desktop\ZAMBRANO\Nueva.tabla.IDB2 : 21/1/2025 - 21:10:47 -
[Versión : 30/4/2020]

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Respuesta	27	0,22	0,00	36,37

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1476,07	8	184,51	0,62	0,7515
Temperatura	240,07	2	120,04	0,40	0,6745
Tiempo	662,52	2	331,26	1,11	0,3509
Temperatura*Tiempo	573,48	4	143,37	0,48	0,7496
Error	5368,67	18	298,26		
Total	6844,74	26			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=20,77778

Error: 298,2593 gl: 18

Temperatura Medias	n	E.E.	
a1	43,44	9	5,76 A
a3	48,44	9	5,76 A
a2	50,56	9	5,76 A

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

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=20,77778

Error: 298,2593 gl: 18

Tiempo Medias	n	E.E.	
b2	43,33	9	5,76 A
b3	44,67	9	5,76 A
b1	54,44	9	5,76 A

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

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=49,40812

Error: 298,2593 gl: 18

Temperatura	Tiempo	Medias	n	E.E.	
a1	b2	35,00	3	9,97	A
a1	b3	37,67	3	9,97	A
a3	b2	41,67	3	9,97	A
a2	b3	46,00	3	9,97	A
a3	b3	50,33	3	9,97	A
a2	b1	52,33	3	9,97	A
a3	b1	53,33	3	9,97	A
a2	b2	53,33	3	9,97	A
a1	b1	57,67	3	9,97	A

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

%Espermatozoides muertos

C:\Users\Usuario\Desktop\ZAMBRANO\Nueva.tabla.IDB2 : 21/1/2025 - 21:14:26 -
[Versión : 30/4/2020]

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Respuesta	27	0,22	0,00	32,88

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1476,07	8	184,51	0,62	0,7515
Temperatura	240,07	2	120,04	0,40	0,6745
Tiempo	662,52	2	331,26	1,11	0,3509
Temperatura*Tiempo	573,48	4	143,37	0,48	0,7496
Error	5368,67	18	298,26		
Total	6844,74	26			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=20,77778

Error: 298,2593 gl: 18

Temperatura	Medias	n	E.E.	
a2	49,44	9	5,76	A
a3	51,56	9	5,76	A
a1	56,56	9	5,76	A

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

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=20,7778

Error: 298,2593 gl: 18

Tiempo	Medias	n	E.E.	
b1	45,56	9	5,76	A
b3	55,33	9	5,76	A
b2	56,67	9	5,76	A

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

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=49,40812

Error: 298,2593 gl: 18

Temperatura	Tiempo	Medias	n	E.E.	
a1	b1	42,33	3	9,97	A
a2	b2	46,67	3	9,97	A
a3	b1	46,67	3	9,97	A
a2	b1	47,67	3	9,97	A
a3	b3	49,67	3	9,97	A
a2	b3	54,00	3	9,97	A
a3	b2	58,33	3	9,97	A
a1	b3	62,33	3	9,97	A
a1	b2	65,00	3	9,97	A

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

Anexo 2. Recolección de pajuelas para los protocolos



Anexo 3. Pajuelas que se utilizaron para los tratamientos



Anexo 4. Protocolo de descongelación de pajuelas



Anexo 5. Método CASA



Anexo 6. Análisis de los resultados por el método CASA

