

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y ZOOTECNIA
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA AGROPECUARIA



TESIS

**EVALUACIÓN DE CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DE MUESTRAS
SEMINALES OBTENIDAS DEL EPIDÍDIMO DE BOVINOS CRIOLLOS
MANTENIDAS EN CONDICIONES DE REFRIGERACIÓN Y
CRIOPRESERVADAS**

PRESENTADO POR:

Br. FERNANDO MAMANI CCOTOHUANCA

**PARA OPTAR AL TITULO PROFESIONAL DE
INGENIERO AGROPECUARIO.**

ASESOR:

PhD. GONZALO GONZALES APARICIO

CO-ASESOR:

PhD. MANUEL JOSE MORE MONTOYA

CUSCO – PERÚ

2025



Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco

INFORME DE SIMILITUD

(Aprobado por Resolución Nro.CU-321-2025-UNSAAC)

El que suscribe, el Asesor GONZALO WLADIMIR GONZALES APARICIO.....
..... quien aplica el software de detección de similitud al
trabajo de investigación/tesis titulada: EVALUACIÓN DE CARACTERÍSTICAS
MICROSCÓPICAS DE MUESTRAS SEMINALES OBTENIDAS DEL
EPIDÍDIMO DE BOVINOS CRTILOS MANTENIDAS EN CONDICIONES
DE REFRIGERACION Y CRIOPRESERVADAS.....

Presentado por: FERNANDO MAMANI CCOTIHUANCA..... DNI N° 76073359.....;
presentado por: DNI N°:
Para optar el título Profesional/Grado Académico de INGENIERO AGROPECUARIO.....

Informo que el trabajo de investigación ha sido sometido a revisión por 03 veces, mediante el
Software de Similitud, conforme al Art. 6° del **Reglamento para Uso del Sistema Detección de**
Similitud en la UNSAAC y de la evaluación de originalidad se tiene un porcentaje de 2.....%.

Evaluación y acciones del reporte de coincidencia para trabajos de investigación conducentes a grado académico o título profesional, tesis

Porcentaje	Evaluación y Acciones	Marque con una (X)
Del 1 al 10%	No sobrepasa el porcentaje aceptado de similitud.	☒
Del 11 al 30 %	Devolver al usuario para las subsanaciones.	☐
Mayor a 31%	El responsable de la revisión del documento emite un informe al inmediato jerárquico, conforme al reglamento, quien a su vez eleva el informe al Vicerrectorado de Investigación para que tome las acciones correspondientes; Sin perjuicio de las sanciones administrativas que correspondan de acuerdo a Ley.	☐

Por tanto, en mi condición de Asesor, firmo el presente informe en señal de conformidad y **adjunto**
las primeras páginas del reporte del Sistema de Detección de Similitud.

Cusco, 11 de NOVIEMBRE..... de 2025.....

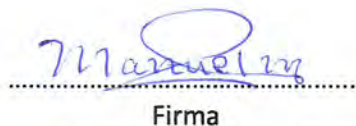

Firma

Post firma Ing. PhD GONZALO W. GONZALES APARICIO

Nro. de DNI 41285829.....

ORCID del

Asesor 0000-0002-4682-6591.....


Firma

Post firma Mv. PhD MANUEL JOSE MORE MONTAYA

Nro. de DNI 47302787.....

ORCID del Asesor 0000-0001-8677-993X.....

Se adjunta:

- Reporte generado por el Sistema Antiplagio.
- Enlace del Reporte Generado por el Sistema de Detección de Similitud: oid: 27259:479730816.....

Fernando Mamani

TESIS FINAL FERNANDO MAMANI 2025.pdf



Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco

Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid:::27259:479730816

Fecha de entrega

8 ago 2025, 10:55 a.m. GMT-5

Fecha de descarga

8 ago 2025, 11:12 a.m. GMT-5

Nombre de archivo

TESIS FINAL FERNANDO MAMANI 2025.pdf

Tamaño de archivo

1.4 MB

91 Páginas

16.122 Palabras

97.659 Caracteres

2% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

Filtrado desde el informe

- Bibliografía
- Texto citado
- Texto mencionado
- Coincidencias menores (menos de 12 palabras)

Exclusiones

- N.º de coincidencias excluidas

Fuentes principales

- 1%  Fuentes de Internet
- 0%  Publicaciones
- 2%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Marcas de integridad

N.º de alertas de integridad para revisión

No se han detectado manipulaciones de texto sospechosas.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a Dios y agradezco por darme la vida y el valor para seguir adelante, que hasta el día de hoy ha sabido guiar mi camino en circunstancias difíciles y por darme la oportunidad de llegar hasta este momento tan importante de mi formación profesional.

A mis queridos padres, que siempre estuvieron presentes durante toda mi formación académica mostrándome su apoyo incondicional, y por siempre darme la motivación y el ánimo para seguir adelante.

A mis hermanos que de igual manera pudieron estar ahí mostrándome su apoyo y motivación a no rendirme.

Gracias a todas las personas que me mostraron su apoyo y haberme ayudado en la culminación de este proyecto de investigación.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco por brindarme la oportunidad de estudiar y pertenecer a una de las universidades más prestigiosa a nivel de la Región del Cusco.

Mi más profundo agradecimiento para mi Asesor de tesis Ing. PhD. Gonzalo Wladimir Gonzales Aparicio y co-asesor MV. PhD. Manuel José More Montoya, quienes, por medio de sus conocimientos, experiencia y rectitud pudieron guiarme por el camino de la investigación y ayudarme en la culminación del presente trabajo de tesis.

Agradezco a la Municipalidad Distrital de San Jerónimo, provincia de Cusco, al encargado del camal y a los matarifes, quienes me acogieron gentilmente en las instalaciones del camal, ya que sin su apoyo no hubiera podido realizar este trabajo de investigación.

A todos mis amigos y familiares cercanos que me apoyaron motivacionalmente en los momentos más difíciles de mi vida.

A mis profesores de la universidad quienes supieron guiar durante los años de estudio y brindarme enseñanzas que sirvieron para mi formación profesional.

ÍNDICE

RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xiv
INTRODUCCIÓN	15
I. PROBLEMA OBJETO DE INVESTIGACIÓN.....	17
1.1. Identificación del problema objeto de investigación	17
1.2. Planteamiento del problema.....	17
1.3. Preguntas de investigación	18
1.3.1. Pregunta general	18
1.3.2. Preguntas específicas.....	18
2.1. Objetivos	19
2.1.1. Objetivo general.....	19
2.1.2. Objetivos específicos	19
2.2. Justificación	19
III. HIPOTESIS	21
3.1. Hipótesis general	21
3.2. Hipótesis específicas	21
IV. MARCO TEÓRICO.....	22
4.1. Antecedentes de la investigación.....	22
4.1.1. Antecedentes a nivel nacional e internacional.....	22

4.2. Generalidades.....	25
4.3. Descripción zoológica	26
4.4. Anatomía reproductiva del macho.....	26
4.4.1. Testículo	26
4.4.2. Epidídimo.....	27
4.4.3. Conducto deferente.....	27
4.4.4. Vesículas seminales	28
4.4.5. Glándulas bulbo uretrales	28
4.4.6. Próstata	29
4.4.7. Pene	29
4.5. Espermatozoide de la cola del epidídimo.....	30
4.6. Evaluación de calidad de semen.....	31
4.6.1. Evaluación macroscópica.....	31
a) Volumen	31
b) Color	31
c) Viscosidad	32
4.6.2. Evaluación microscópica.....	32
a) Motilidad o movimiento en masa.....	32
b) Motilidad individual progresiva	33
c) Morfología espermática.....	33

d)	Concentración espermática.....	34
e)	Vitalidad	34
f)	Funcionalidad de membrana (HOST Test)	35
4.7.	Conservación del semen bovino <i>post mortem</i>	35
4.7.1.	Criopreservación de espermatozoides de epidídimo.....	35
4.7.2.	Protocolos de criopreservación	36
4.8.	Diluyentes utilizados para la congelación del semen bovino.....	36
4.8.1.	Optixcell®	37
4.8.2.	Andromed®.....	38
V.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
5.1.	Ubicación espacial de la investigación	40
5.1.1.	Ubicación	40
a)	Ubicación geográfica	40
c)	Ubicación hidrográfica.....	40
5.2.	Duración del estudio	41
5.3.	Materiales y equipo.....	41
5.3.1.	Equipos de laboratorio	41
5.3.2.	Reactivos	42
5.3.3.	Materiales de laboratorio	42
5.3.4.	Materiales de campo.....	43

5.3.5. Equipo de campo.....	44
5.3.6. Equipo de protección de campo y laboratorio	44
5.4. Unidades experimentales.....	44
5.5. Instalación.....	45
5.7. Metodología de investigación.....	45
5.7.1. Registro de datos de bovinos criollos en el camal de san jerónimo <i>in vivo</i>	45
a) Selección de animales	45
b) Registro de peso.....	46
c) Medición de la circunferencia escrotal.....	46
d) Largo, ancho y profundidad testicular	47
5.7.2. Registro de datos <i>post mortem</i> en las instalaciones del camal	47
a) Pesado de testículos <i>post mortem</i>	47
b) Extracción y almacenamiento de epidídimos.....	48
5.7.3. Recuperación de fluido seminal de epidídimos	48
5.7.4. Evaluación de características macroscópicas de la suspensión espermática recuperada de epidídimos	49
a) Volumen	49
5.7.5. Evaluaciones microscópicas de semen epididimario.....	49
a) Concentración espermática	49
b) Vitalidad espermática.....	50

c)	Funcionalidad de membrana plasmática.....	51
d)	Motilidad progresiva individual espermática.....	53
5.7.6.	Empajillado y refrigerado de la suspensión espermática epididimaria de bovinos criollos	54
5.7.7.	Criopreservación y descongelado de pajillas	54
5.8.	Variables de estudio	55
5.8.1.	Variables independientes	55
5.8.2.	Variables dependientes.....	55
5.9.	Análisis estadístico.....	55
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	57
6 1.	Determinación de la concentración espermática epididimaria obtenida.....	57
6.2.1.	Vitalidad espermática.....	59
6.2.2.	Evaluación de la funcionalidad de la membrana plasmática (host) .	61
6.2.3.	Motilidad espermática epididimaria	62
VI.	CONCLUSIONES.....	66
VII.	RECOMENDACIONES	67
IX.	REFERENCIAS.....	68
ANEXOS.		81

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Descripción zoológica de bovinos	26
Tabla 2 Coloración espermática.....	32
Tabla 3 Promedios espermáticos para concentración espermática de epidídimos derecho e izquierdo de bovinos criollos.....	57
Tabla 4 Promedios de vitalidad espermática de muestras refrigeradas y criopreservadas de bovinos criollos.....	59
Tabla 5 Promedios epididimarios evaluados para funcionalidad de la membrana plasmática por Test Hiposmótico refrigerado y criopreservado en bovinos criollos	61
Tabla 6 Promedios de motilidad espermática refrigerados y criopreservados de bovinos criollos.....	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Mapa de ubicación del distrito de San Jerónimo	41
Figura 2 Fotografía referencial de bovino criollo usado en el estudio	46
Figura 3 Procedimiento de para la evaluación de vitalidad espermática.....	51
Figura 4 Procedimiento para la evaluación de la funcionalidad de la membrana espermática mediante la tinción HOST	52

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1.	Pesado de epidídimos recuperados de bovinos criollos <i>post mortem</i>	81
Anexo 2.	Cortes longitudinales realizadas, después de la asepsia de cada epidídimo con agua bidestilada.	81
Anexo 3.	Recuperación de fluido espermático mediante la técnica de lavado seminal por corte a nivel del epidídimo.	82
Anexo 4.	Muestras espermáticas recuperadas en tubos graduados de 12 ml, y almacenadas bajo refrigeración en refrigeradora a temperatura de 5 °C	82
Anexo 5.	Empajillado de muestras espermáticas en pajillas de 0.25 mL post refrigeradas.	83
Anexo 6.	Estabilización de las pajillas bajo refrigeración por 24 horas a 5 °C.....	83
Anexo 7.	Atemperamiento de muestras espermáticas en pajillas, a vapor de nitrógeno líquido, a una altura aproximada de 4 cm	84
Anexo 8.	Evaluación de la vitalidad espermática de muestras recuperadas de epidídimo de bovinos criollos post mortem	84
Anexo 9.	Evaluación de la funcionalidad de la membrana plasmática por medio de la evaluación de Test Hiposmótico	85
Anexo 10.	Evaluación de la motilidad espermática epididimaria, por medio del Software Sperm Motility Tracker 2.V. de acceso libre.	85
Anexo 11.	Composición para la preparación de solución Eosina al 9 %.	86
Anexo 12.	Composición para la preparación de solución la solución Hiposmótica.	86
Anexo 13.	Análisis estadístico evaluado por programa R- studio.	86

ACRÓNIMOS

INEI	Instituto Nacional de Estadística e Informática.
HOST	Hipoosmotic Swelling Test.
POST MORTEM	Después de la muerte
IN VIVO	En vida
IN VITRO	Estudio realizado bajo condiciones controladas
CE	Cola del epidídimo
YHC	Yemas de huevo de codorniz
YHG	Yema de huevo de gallina
TRIS	Hidroximetil aminometano
FAO	Organización para la Alimentación y la Agricultura

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó en el distrito de San Jerónimo, provincia del Cusco, departamento del Cusco, a una altitud de 3999 m.s.n.m., con el objetivo de evaluar las características microscópicas de muestras seminales obtenidas de epidídimos de bovinos criollos, mantenidas en condiciones de refrigeración y criopreservadas. Tuvo como unidad muestral 25 epidídimos de bovinos criollos, donde fueron recuperadas *post mortem*. Se realizaron tres cortes longitudinales a nivel de la cola del epidídimo (CE) y se recuperaron fluidos espermáticos mediante el método de lavado con dilutor, estas muestras espermáticas fueron almacenadas a una temperatura de 5 °C por 24 horas, y criopreservadas en nitrógeno líquido. Los parámetros evaluados fueron, concentración espermática post recuperado, vitalidad espermática, funcionalidad de la membrana espermática HOST y motilidad (antes y después de la criopreservación). Se hallaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en muestras refrigeradas y criopreservadas para cada tratamiento en todos parámetros evaluados. En conclusión, es posible recuperar espermatozoides de los epidídimos *post mortem* de bovinos criollos, obteniendo fluidos seminales viables, a pesar de la clara disminución ocasionada por la criopreservación habiendo aun posibilidad de que estas muestras puedan ser utilizadas para la conservación genética y en programas de reproducción asistida.

Palabras claves: Bovinos criollos, Semen epididimario, Criopreservación, Refrigeración.

ABSTRACT

This research study was conducted in the district of San Jerónimo, Cusco Province, Cusco Department, at an altitude of 3999 meters above sea level (m.a.s.l.), with the objective of evaluating the microscopic characteristics of seminal samples obtained from the epididymides of Creole bovines, maintained under refrigeration and cryopreservation conditions. Twenty-five epididymides from Creole bovines, recovered *post mortem*, served as the sample unit. Three longitudinal cuts were made at the tail of the epididymis (CE), and spermatoc fluids were recovered using the flushing method with a diluent. These spermatoc samples were then stored at 5 °C for 24 hours and cryopreserved in liquid nitrogen. The evaluated parameters included post-recovery sperm concentration, sperm vitality, HOST sperm membrane functionality, and motility (before and after cryopreservation). Significant differences ($P < 0.05$) were found in both refrigerated and cryopreserved samples for each treatment across all evaluated parameters. In conclusion, it is possible to recover viable spermatozoa from the *post mortem* epididymides of Creole bovines, obtaining viable seminal fluids. Despite the clear decrease in quality caused by cryopreservation, there remains a possibility that these samples can be utilized for genetic conservation and in assisted reproduction programs.

Keywords: Creole bovine, Epididymal semen, Cryopreservation, Refrigeration.

INTRODUCCIÓN

La población de ganado vacuno en el Perú, de acuerdo al último censo agropecuario del 2012, es de 5'156,000 cabezas de ganado. Donde la raza que predomina es la criolla representando el 63,9% del total de la distribución, seguida por la raza Brown Swiss con 17.6%, la Holstein con 10.3%, Gyr/Cebú con 3.4% y otras razas con 4.8% respectivamente (INEI, 2013).

El material genético de animales de interés puede perderse en cualquier momento, para poder evitar la pérdida total, existe una posibilidad de recuperar espermatozoides del epidídimo *post mortem* (Martins *et al.*, 2007). Los avances biotecnológicos han demostrado que la recuperación y criopreservación de espermatozoides epididimales de especies domesticas son modelos experimentales de suma importancia que podrían ser utilizados para animales en vías de extinción (Gonzáles *et al.*, 2013).

Mediante la biotecnología de criopreservación de semen promoverá a la conservación del germoplasma bovino por un tiempo indefinido y asociada a la inseminación artificial hace que el mecanismo sea eficiente para la promoción y difusión de material genético de excelente calidad. El uso de espermatozoides congelados del epidídimo representa un material importante para los programas de inseminación artificial (Ribeiro *et al.*, 2014).

La problemática radica que, durante los últimos años se viene presentando una disminución en la población total de bovinos criollos, esto a causa de la absorción genética por reemplazo. Y que, a decir de *Hidalgo et al.* (2015) “la población de los «verdaderos» bovinos criollos viene descendiendo por erosión genética ante la introducción de razas exóticas”. Por ello, con el fin de prevenir la pérdida intempestiva de estos recursos, se deben considerar medidas de conservación de las razas. Una de las opciones es la conservación

in vitro de material genético en nitrógeno líquido pudiendo ser un complemento valioso a los enfoques *in vivo* (FAO, 2007).

Por ello esta investigación está orientada a evaluar la posibilidad de recolectar muestras de semen del epidídimo de ganado bovino criollo que se beneficia en camales, estudiando las características microscópicas de semen para luego ser conservada en nitrógeno líquido, pudiendo estas muestras ser utilizadas en procedimientos de inseminación artificial y de esta manera se podrá tener muestras de material genético que se orienten a evitar una erosión genética en la población de bovinos criollos.

I. PROBLEMA OBJETO DE INVESTIGACIÓN

1.1. Identificación del problema objeto de investigación

La conservación del material genético de bovinos criollos en el Perú es uno de los desafíos más importantes frente a evidentes situaciones de erosión y pérdida genética a causas del reemplazo por razas más especializadas (Rivas *et al.*, 2007). A pesar de la predominancia de la población criolla, este denota una disminución a través del tiempo, donde las razas más especializadas vienen siendo mayormente utilizadas en producción de carne y leche (INEI, 2013). A ello se suma la utilización de la población de bovinos criollos como base en los programas de mejoramiento genético, que en específico se tratan programas de sustitución de esta población criolla, por razas especializadas, con el afán de mejorar la cantidad de producción en la crianza familiar (Rivas *et al.*, 2007).

1.2. Planteamiento del problema

De acuerdo al último censo agropecuario, la crianza de ganado vacuno se concentra con predominancia en la sierra con 3774.3 cabezas de ganado, y un claro incremento de 14.7% en la población de ganado vacuno comparado al censo agropecuario de 1994, donde los datos indican un mayor interés por parte de los productores en la crianza familiar, en especial en las comunidades altas de la provincia del Cusco (INEI, 2013). Considerando que la población total los bovinos criollos tuvieron participación importante durante muchos años, jugado un rol muy importante en el ingreso familiar y seguridad alimentaria, destacándose la rusticidad y adaptabilidad a condiciones agrestes (Aquino *et al.*, 2008), Sin embargo, frente a la pérdida genética, que se presenta a causa de la absorción por parte de animales especializados, crea la necesidad de obtener muestras de semen de toros criollos, para el análisis y posterior conservación genética.

Una opción para la conservación del bovino criollo será coleccionar semen a nivel del epidídimo previos a su beneficio, acompañado del estudio de las características de muestras de semen obtenidas del epidídimo en bovinos criollos *post mortem*, y que permitirá analizar y conservar las muestras seminales, favoreciendo de esta manera lograr conservar el semen para su uso a futuro como material genético.

1.3. Preguntas de investigación

1.3.1. Pregunta general

¿Cuáles son las características microscópicas de muestras seminales, obtenidas de epidídimos de bovinos criollos, mantenidas en condiciones de refrigeración y criopreservación?

1.3.2. Preguntas específicas

- a) ¿Cuál es la concentración espermática obtenida a partir de la extracción de las muestras seminales de epidídimo de bovinos criollos beneficiados en el camal de San Jerónimo?
- b) ¿Qué diferencias se observaron entre las características microscópicas de las muestras seminales mantenidas en refrigeración a 5°C por 24 horas y criopreservadas en nitrógeno líquido?

II. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN

2.1. Objetivos

2.1.1. Objetivo general

Evaluar las características microscópicas de muestras seminales, obtenidas de epidídimos de bovinos criollos, mantenidas en condiciones de refrigeración y criopreservadas.

2.1.2. Objetivos específicos

- a) Calcular la concentración espermática que se puede obtener a partir de la extracción de las muestras seminales de epidídimo de bovinos criollos beneficiados en el camal de San Jerónimo.
- b) Comparar las características microscópicas de las muestras seminales mantenidas en refrigeración a 5°C por 24 horas y criopreservadas en nitrógeno líquido.

2.2. Justificación

La región del Cusco cuenta con una población total de 407,267 cabezas de ganado bovino, posicionándose cuarto lugar de entre todas las regiones, del cual Cajamarca lidera con un total de 724,478 cabezas de ganado bovino, Puno con 617,163 y Ayacucho con 414,066, donde la raza criolla encabeza con 251,549 unidades pecuarias, Brown Swiss con 126,986 y Holstein 14,785 (INEI, 2013).

La recuperación y posterior criopreservación, de espermatozoides epididimarios, representa al día de hoy, como uno de los avances tecnológicos que posibilitará la preservación del material genético presente en el fluido epididimario de especies

domésticas, y como tal representa un modelo experimental para ser utilizados en programas de conservación de fauna silvestres en vías de extinción (Díaz y Ojeda, 2000).

Rivas *et al.* (2007) menciona que, “en la actualidad los bovinos criollos en nuestro país son un conjunto de poblaciones muy heterogéneas, con numerosos morfotipos y adaptaciones locales escasamente estudiadas”. Donde esta población de bovinos criollos posee características apreciables como la rusticidad y la adaptabilidad a diferentes condiciones ambientales, la eficiente utilización de recursos forrajeros y a la vez considerado como animal multipropósito (trabajo, leche y carne) (Quispe, 2021). Al ser estas cualidades estimables surge la necesidad de estudiar las características microscópicas de fluido seminal de epidídimo *post mortem*.

El presente trabajo de investigación brindará información sobre las características microscópicas de fluidos epididimarios evaluando la concentración espermática, motilidad, vitalidad, y funcionalidad de la membrana espermática. Y mediante la criopreservación de las muestras espermáticas permitirán su disponibilidad en cualquier momento, y su uso a futuro para trabajos de inseminación y conservación de las características propias de toros criollos en Bancos de material genético.

III. HIPOTESIS

3.1. Hipótesis general

Las características microscópicas de muestras seminales de epidídimos provenientes de bovinos criollos beneficiados en el camal de San Jerónimo - Cusco, presentarán valores adecuados para ser sometidos al proceso de refrigeración y criopreservación en nitrógeno líquido.

3.2. Hipótesis específicas

- a) La concentración espermática que se puede obtener del epidídimo de bovinos criollos beneficiados en el camal de San Jerónimo está dentro de los valores reportados en investigaciones similares.
- b) Existen diferencias en las características microscópicas de las muestras seminales mantenidas en refrigeración a 5°C por 24 horas respecto de las muestras criopreservadas en nitrógeno líquido.

IV. MARCO TEÓRICO

4.1. Antecedentes de la investigación

4.1.1. Antecedentes a nivel nacional e internacional

Ccoñas (2017) en su trabajo de investigación “Efecto del dilutor TRIS con yema de huevo de codorniz sobre características espermáticas epididimarias en refrigeración de bovinos machos criollos *post mortem*” evaluó la motilidad, vitalidad y la integridad funcional de la membrana plasmática (HOST) de espermatozoides epididimarios provenientes de bovinos machos criollos *post mortem*, usando como dilutor TRIS con yema de huevo de codorniz (YHC); donde evaluó tres tratamientos diluidas con TRIS - YHC a concentraciones de 10, 15 y 20% considerando que cada grupo fuera evaluado a 0, 12, 24, 48 y 72 horas *post* refrigeración a 4.5°C. Llegando a concluir que las concentraciones de dilutor TRIS - YHC a 10, 15, y 20% no afectaron las características espermáticas evaluadas, pudiendo ser utilizados estos dilutores, para la refrigeración de espermatozoides.

En un estudio similar por Huamanñahui (2017) denominado “Evaluación del dilutor TRIS con yema de huevo de codorniz antes y después de la congelación de espermatozoides epididimarios de bovinos machos criollos *post mortem*” donde evaluó la motilidad y vitalidad de espermatozoides epididimarios pre y post congelados de bovinos criollos *post mortem*. Fue utilizado dilutor tris yema de huevo de codorniz (YHC) Y yema de huevo de gallina (YHG), a concentraciones YHC 15 %, YHC 20% Y YHG 20%. Este estudio llegó a concluir que el dilutor TRIS YHC 15%, 20% y YHG 20% no afecto en gran medida en muestras espermáticas antes y después de ser congeladas.

En otro estudio realizado por Olivo *et al.* (2017) titulado “criopreservación de semen obtenido del epidídimo vs conducto deferente de bovinos *post mortem*”, analizó 10

testículos intactos y recuperó espermatozoides de la cola del epidídimo (CE) y conducto deferente (CD), mediante la técnica de flujo retrógrado donde evaluó motilidad progresiva (MP), viabilidad (V) y morfología anormal (MA). Los resultados de espermatozoides de la cola del epidídimo y conducto deferente no fueron significativos para motilidad progresiva y viabilidad en muestras *post* descongeladas. Pero en la evaluación de la morfología anormal hubo diferencias en muestras frescas y *post* descongeladas con valores altos a nivel de la cola de epidídimo y para viabilidad obtuvo valores altos a nivel del conducto deferente.

Quispe (2015) evaluó la sobrevivencia *in vitro* y la fertilidad *in vivo* de espermatozoides recuperados de la cola del epidídimo de bovinos machos criollos *post mortem*, donde utilizó 18 pares de testículos de bovinos criollos almacenados bajo refrigeración a 5°C por 0, 12 y 24 horas. Donde evaluó motilidad total, motilidad progresiva, test hiposmótico e integridad acrosomal antes y después de ser congeladas. Llegando a concluir que la congelación y posterior descongelación en nitrógeno líquido de muestras espermáticas epididimarias afectan negativamente de manera directa en las características de motilidad, Test hiposmótico e integridad acrosomal; encontrando mejores resultados en muestras refrigeradas a 0 horas.

Albers y Barrios (2011) en su trabajo de investigación “Concentración y morfología de los espermatozoides epididimarios obtenidos de toros *post mortem*” utilizaron 90 pares de testículos donde recolectó fluido espermático mediante la técnica de flujo retrogrado con dilutor TRIS-yema-glicerol bajo dos protocolos de refrigeración 35°C y 25°C. Dicho estudio, llegó a concluir que los dos protocolos no tuvieron ningún efecto en muestras evaluadas, además de que la temperatura de almacenamiento no modificó la calidad espermática recuperada de epididimos.

En un estudio similar Naranjo (2015) evaluó los parámetros morfométricos respecto a las características macroscópicas y microscópicas del fluido epididimario de toros *post*

mortem, el estudio se realizó con 10 bovinos mestizos utilizando la técnica de desmenuzamiento epididimario para obtener fluido de epidídimos, donde reportó resultados superiores para espermatozoides muertos de 73.9% con respecto a espermatozoides vivos, para concentración espermática obtuvo un valor de 2.48×10^6 , y promedios para motilidad individual de 57.91%. Llegando a concluir que los espermatozoides epididimarios mantienen viabilidad espermática para ser utilizadas en programas de reproducción asistida.

Luzón (2015) como producto de su investigación concluyó que el método de lavado retrogrado es más eficaz que el proceso de desmenuzamiento epididimario, registrándose resultados superiores en muestras de semen leídas en el grupo de 1 h a 2 h *post mortem*, con respecto a las demás horas (2-4 horas, 3-8 horas), resaltando que la colecta de semen de epidídimo presenta mayor sobrevivencia, pero menor movilidad en comparación a otros métodos convencionales.

En un estudio realizado por Benítez *et al.* (2018) donde evaluaron el método de recuperación espermática epididimaria por lavado retrogrado y slicing, en 50 toros de distintas razas, siendo cada testículo almacenados durante 2, 4, 8, 12 y 24 horas a 5 °C y evaluó volumen, concentración, vitalidad, motilidad masal, motilidad individual, y espermatozoides normales. Este estudio concluyó que ambos métodos, son eficientes para recuperar espermatozoides vivos de la cola del epidídimo y que la vitalidad está directamente relacionado con el tiempo de almacenamiento.

Valverde *et al.* (2018) realizó la evaluación de la calidad espermática pre congelado y después de ser sometido a nitrógeno líquido de espermatozoides recuperados de la cola del epidídimo en bovinos; todas las muestras fueron almacenadas a temperaturas de 5 °C y 20 °C durante 6 horas, donde utilizó el método de recuperación de flujo retrogrado y procesó las muestras con dilutor AndroMed® evaluando variables de motilidad, vitalidad

espermática, anormalidades morfológicas totales y concentración espermática. Llegando a concluir que el almacenamiento de espermatozoides epididimarios por corto tiempo, disminuye los daños ocasionados al someter a nitrógeno líquido.

4.2. Generalidades

El arribo de los bovinos criollos por primera vez en América se dio en el año 1521, a partir de ello comenzó el proceso de establecimiento y constante evolución resultando animales adaptados a un nuevo medio (Ginja *et al.*, 2019). Se dice que el desarrollo de los bovinos criollos tuvo como cimientos ganados traídos de Portugal y España. Por otro lado, recientes investigaciones indican que el ganado criollo peruano tiene un nivel de relación alto con las razas nativas africanas (Arbizu *et al.*, 2022).

En el Perú, los animales criollos o nativos, de interés productivo en los diferentes sistemas de producción tradicional han sido históricamente considerados marginales y fáciles de sustituir por algunas especies consideradas de mayor capacidad productiva o por razas exóticas (INIA, 2004). Estos animales poseen características y cualidades rescatables como: elevado instinto materno, una rusticidad excepcional y una alta capacidad para aprovechar la escasa y variada vegetación natural, además de que no requieren una mayor exigencia en la forma de crianza (Aguirre *et al.*, 2011).

Los bovinos criollos al ser animales adaptados a medios difíciles, y a causa del manejo deficiente, no han podido tomar relevancia en cuanto a niveles productivos y reproductivos de una manera significativa. De igual manera, Bracho *et al.* (2002) indica que, al ser el ganado criollo una raza primitiva, y por las variadas diferencias raciales y etnológicas no sería adecuado comparar solo la productividad con respecto a las razas más especializadas.

Hasta mediados del siglo XIX en la gran mayoría de las crianzas sudamericanas prevalecía la multiplicación y avance como pilar de la crianza ganadera, pero a partir de la fecha varios países entre ellos el Perú comenzaron con la importación de razas británicas especializadas llevando reducir a la población de bovinos criollos. Es por ello que, en los últimos años, el tamaño poblacional de bovinos criollos está teniendo una constante disminución, a consecuencia de diversos cruzamientos con razas foráneas que no tienen niveles adecuados de adaptación al medio ambiente de la sierra, y estas prácticas están llevando a ocasionar una grave erosión genética y consecuentemente a una pérdida de la rusticidad en el ganado bovino criollo (Parra *et al.*, 2021).

4.3. Descripción zoológica

Tabla 1

Descripción zoológica de bovinos

Reino: Animal
Subreino: Vertebrados
Clase: Mamíferos
Orden: Ungulados
Rama: Rumiantes
Familia: Bóvidos
Género: Bos
Especie: <i>Bos Taurus</i> y <i>Bos Indicus</i> .
Fuente: Babera (2011).

4.4. Anatomía reproductiva del macho

4.4.1. Testículo

Los testículos del toro y pequeños rumiantes, se localizan cerca de la curvatura sigmoidea formando el “S” peneano (Frandsen *et al.*, 2009). Estos órganos se encuentran

dentro del escroto, presentando una forma ovalada, en ellas albergan una masa de túbulos seminíferos, que están cubiertas por la túnica albugínea. Los espermatozoides se forman dentro de los túbulos seminíferos, mientras que las testosteronas son secretadas por las células intersticiales o de Leydig (Gloobe, 1989).

Los espermatozoides producidos en los túbulos seminíferos son transportados hasta el epidídimo, donde el sistema tubular permite la maduración y almacenamiento de los espermatozoides, de igual manera se encarga del movimiento correspondiente de los espermatozoides (Nabors, 2021).

4.4.2. Epidídimo

El epidídimo es un órgano que tiene forma alargada, con diversos relieves a nivel del ducto epididimario. Presenta fijación en un extremo del borde del testículo, a partir de ahí se extiende hacia ambos polos testiculares (Echevarría *et al.*, 2021).

Esta estructura se localiza en el borde caudo-medial del testículo, en estas se pueden identificar tres porciones: cabeza, cuerpo, y cola. En la zona del epidídimo se lleva a cabo la maduración de espermatozoides y el almacenamiento antes de ser expulsados al exterior (Gloobe, 1989).

El epidídimo según Frandson *et al.* (2009) indican que, alberga espermatozoides inmaduros, las cuales antes de ser expulsados por eyaculación, son sometidos a un proceso de maduración dentro del epidídimo, que comprende de 10 a 15 días aproximadamente.

4.4.3. Conducto deferente

El conducto deferente tiene una función de transporte de espermatozoides al exterior, es una continuación del canal epididimario y la cual se encuentra conectada con

la porción pélvica de la uretra. Tiene un inicio en la cola del epidídimo, y forma parte del cordón espermático. Se encuentra incorporada por el canal inguinal a la cavidad abdominal, para terminar en la cavidad pelviana incorporado al pliegue genital (Junta de Andalucía, Consejería de agricultura y pesca, 1998).

El transporte de espermatozoides a la uretra es una función resaltante de los conductos deferentes al momento de la eyaculación, al igual que sirven de almacenamiento de espermatozoides (Knobil y Neill, 2006).

4.4.4. Vesículas seminales

Son un par de glándulas vesiculares y presentan una forma alargada y una superficie lobulada, presenta una medida de 10 a 12 cm de longitud; en el cuello de vejiga se presentan extremidades libres situadas de forma dorsal y de forma lateral en la que se encuentran a los uréteres y a las ampollas del ducto deferente en la plica urogenital (Gloobe, 1989).

En los rumiantes, las vesículas seminales cumplen la función de evacuar por medio del conducto excretor el contenido de las vesículas seminales hacia la uretra uniéndose a la parte terminal del conducto deferente para formar posteriormente el conducto eyaculador. Las vesículas seminales producen secreciones esenciales ricas en fructuosa que posteriormente son utilizadas como fuente de energía para los espermatozoides (Echevarría *et al.*, 2021).

4.4.5. Glándulas bulbo uretrales

Las glándulas bulbouretrales están situadas en la parte dorsal de la uretra pélvica justo antes del arco isquiático. La motilidad y la vida de los espermatozoides una vez

eyaculados, son asegurados por las glándulas accesorias, estas glándulas son irrigadas por ramas de la arteria prostática (Gloobe, 1989).

La función principal de las glándulas bulbouretrales son secretar un fluido con características químicas mucoprotéicas descargados como pre-eyaculados a la uretra pelviana que sirven para lubricar y neutralizar el pH uretral del macho con el fin de crear un ambiente favorable para la supervivencia de los espermatozoides (Echevarría *et al.*, 2021).

4.4.6. Próstata

Esta glándula es impar bilobulada, presenta dos porciones, una parte dorsal ubicada en la región dorsal de la uretra pélvica y la porción diseminada que se encuentra distribuida a lo largo de las paredes dorsales de la uretra (Gloobe, 1989). La glándula prostática posee múltiples conductos, las cuales tienen aberturas en dos filas paralelas, que desembocan a cada luz de la uretra. El semen producido por la próstata posee un pH alcalino, esta característica confiere al semen su olor peculiar (Frandsen *et al.*, 2009).

4.4.7. Pene

En los rumiantes, el pene es un órgano copulador, tiene su origen en el hueso isquion, extendiéndose a lo largo de su extremo libre hasta el glande, encontrándose entorno a la parte terminal de la uretra, es así que dicho órgano tiene doble funcionalidad como aparato reproductor y urinario (Echevarría *et al.*, 2021).

Es un órgano copulador, formado por tejido eréctil, músculos y uretra. El pene posee tres porciones: raíz, cuerpo y extremidad libre. Este órgano tiene una forma delgada, cilíndrica, alargada y dura, rodeada por la túnica albugínea. La flexura sigmoidea que el pene posee tiene una forma de “S” localizado en el cordón espermático, cuya terminación del este órgano culmina en el glande que es la parte final y distal de pene (Gloobe, 1989).

4.5. Espermatozoide de la cola del epidídimo

La pérdida del material genético en animales de importancia económica o silvestres podría ocurrir en cualquier momento, ya sea por muerte u otras causas suscitadas, por tal motivo se crean esfuerzos para preservar o recuperar el material genético por medio de técnicas de reproducción asistida, evitando así la pérdida total del material genético de especies de importancia (Melo *et al.*, 2011).

Es así que la recuperación *post mortem* de espermatozoides con potencial fecundante de órganos reproductivos representa al día de hoy una técnica válida para la criopreservación y almacenamiento de espermatozoides epididimarios permitiendo así obtener material genético de animales de gran valor en vías de extinción y mantenerlas bajo resguardo (Tittarelli *et al.*, 2007).

Gonzales *et al.*, (2013) evaluaron espermatozoides obtenidos de la cola de epidídimo en caninos después de 3, 24, 48 y 72 *post mortem* antes y después de ser criopreservados. La recolección se realizó por técnicas de orquiectomía, evaluando la movilidad progresiva, viabilidad e integridad acrosomal de muestras refrigeradas y criopreservadas a -196°C en nitrógeno líquido, llegando al resultado, que la movilidad progresiva disminuye después de las 48 horas, de igual manera el porcentaje de espermatozoides vivos va disminuyendo significativamente después de las 72 horas *post mortem*, a pesar de ello llegaron a recuperar espermatozoides viables.

Ribeiro *et al.* (2014) utilizaron 22 muestras de epidídimos y realizaron la comparación de los métodos de criopreservación convencional y automatizado, de espermatozoides colectados del epidídimo *post mortem* en toros. De estas muestras se analizaron, la motilidad espermática, el vigor, la integridad estructural y funcional de la membrana plasmática, así como la viabilidad, actividad mitocondrial e integridad del ADN.

Los resultados evidenciaron diferencias de muestras en fresco siendo superiores a las muestras criopreservadas con métodos de congelación convencional y automatizado. Concluyendo que las técnicas de criopreservación mantienen la viabilidad espermática, a pesar de que los parámetros de calidad espermática criopreservadas fueron menores a lo de las muestras frescas.

4.6. Evaluación de calidad de semen

4.6.1. Evaluación macroscópica

a) Volumen

La producción de semen por gramo de tejido testicular está muy relacionada con la circunferencia escrotal, donde la producción por gramo de parénquima varía de 10 a 20 millones de espermatozoides por día (Acuña, 2012). El volumen seminal se ve afectado de manera directa por la edad del animal, la condición física y la raza del animal, de igual manera el método de colecta. Uno de los aspectos que también se tiene que tomar en cuenta es la frecuencia de recolección de semen (Pabón y Pullido, 2021).

b) Color

La calidad de semen es buena cuando la coloración del semen es blanca, marfil o amarilla en caso contrario, cuando la muestra presenta un color opalescente o transparente es significado de baja calidad y el color de las muestras depende mucho de la cantidad de espermatozoides (Tarazona *et al.*, 2014).

Páez y Corredor (2014) señalan que las riboflavinas se encargan de determinar el color del semen, y varían de acuerdo a la concentración espermática del eyaculado, las

cuales van desde un líquido blanquecino claro hasta un líquido color lechoso oscuro (ver Tabla 2).

Tabla 2

Coloración espermática

Consistencia	Descripción referencial
Blanco acuoso	Indica una baja concentración espermática.
Blanco lechoso	Mediana concentración espermática.
Blanco cremoso	Alta concentración espermática.

Fuente: Allende y Arisnabarreta (2021)

c) Viscosidad

La viscosidad en el semen de toro está relacionada con el porcentaje de concentración de células espermáticas y por tal el aspecto del eyaculado esta referido a la viscosidad. Presentando así una variabilidad de tonalidades de muestra de eyaculado (Carvajal, 2006).

4.6.2. Evaluación microscópica

a) Motilidad o movimiento en masa

La motilidad masal, es el movimiento en remolinos del total de espermatozoides en muestra. La valoración se realiza de forma subjetiva en una escala de 0 a 5, donde una puntuación de 5 es cuando se observan oleadas o remolinos con movimientos rápidos y vigorosos y 0 cuando no se observan movimiento en ondas. Al momento de la dilución del eyaculado fresco o al momento de descongelar semen congelado, se puede estimar los

movimientos progresivos o no progresivos de espermatozoides de forma individual (Muiño, 2008).

Existen tres factores que dan lugar al movimiento masal, la concentración, el porcentaje de células con movimiento progresivo y la velocidad de movimiento de espermatozoides. Por tal si se presentan disminuciones porcentuales en cualquier de estos factores mencionados, los resultados de ondas rápidas son severamente deprimidas o eliminadas (Brogliatti, 2013).

b) Motilidad individual progresiva

La motilidad individual muestra resultados relacionados con la integridad de la membrana y la morfología espermática. Para lo cual la evaluación consiste en colocar una gota de 3 µl sobre el porta y cubre objetos, previamente limpios y temperados a una temperatura adecuada. Para este estudio existen descripciones, en donde se consideran como: muy buena 80-100% de células móviles (CM), buena de 60-79%, regular de 40-59% y finalmente, pobre menos de 40% de células móviles (Brogliatti, 2013).

La importancia de la motilidad individual progresiva se dice que está relacionada con la tasa de preñez, que, al ser aplicado con criterios estrictos de morfología de espermatozoides y evaluación morfológica, brinda una predicción de fertilidad que es alta (Flores *et al.*, 2012).

c) Morfología espermática

La morfología espermática es un parámetro muy importante al momento de valorar la fertilidad de los animales, permitiendo poder establecer porcentajes de espermatozoides normales, y clasificar anormalidades. Posee un valor definido al momento de estudiar patologías testiculares y en estudio de defectos hereditarios, debido a que existe una

elevada correlación entre los defectos espermáticos y la infertilidad, es decir a mayor normalidad morfológica mayor fertilidad (Agüero, 2012).

Por otro lado, Puerta *et al.*, (2014) indicaron que la morfología es un criterio de evaluación espermática que permite el análisis de características morfométricas de la cabeza, pieza media y cola del espermatozoide, esto obedeciendo criterios establecidos, es por ello que se considera como un parámetro difícil de analizar por ser subjetivo.

d) Concentración espermática

La concentración espermática hace mención al total de espermatozoides por unidad de volumen de semen y que refiere a la cantidad de espermatozoides emitidos y dicho valor indicará la dilución que será utilizada para el material seminal (OMS, 2010). Por otro lado, Love (2016) mencionó que la medida de la concentración de espermatozoides es un estudio similar en volumen de semen permitiendo el cálculo del total de espermatozoides, y estas pueden ser evaluadas por el método de hematocitómetro.

En el manual de la OMS, (2010) se indica que la producción de espermatozoides en los testículos no necesariamente se relaciona de manera directa con la concentración de espermatozoides, debido a que también existe una influencia de otros órganos reproductivos, por tal motivo el número total de espermatozoides eyaculados es la concentración de espermatozoides multiplicado por el volumen de semen.

e) Vitalidad

La vitalidad espermática permite comprobar la evaluación de la motilidad, en el cual porcentaje de células muertas no debe de sobrepasar el porcentaje de espermatozoides inmóviles. Suele suceder que el porcentaje de células viables supera a las células móviles (OMS, 2010).

La cantidad de espermatozoides vivos es evaluada utilizando técnicas de tinción en las que las membranas de células muertas toman cierta coloración que indica la pérdida de la integridad y funcionalidad, para esta evaluación se usan colorantes como la eosina y la nigrosina (Sarabia, 2016).

f) Funcionalidad de membrana (HOST Test)

La prueba hipoosmótica denominado también como HOST Test, consiste en una prueba seminal no muy compleja y de bajo presupuesto, esta prueba tiene como objetivo la evaluación de integridad funcional de membranas plasmáticas de muestras de espermatozoides (Jeyendran *et al.*, 1984).

4.7. Conservación del semen bovino *post mortem*

4.7.1. Criopreservación de espermatozoides de epidídimo

La criopreservación espermática tuvo sus principios aproximadamente en los años cincuenta del siglo XX (Ávalos *et al.*, 2018). Mediante el empleo de nitrógeno líquido (N₂L) con diferentes curvas de congelación, es uno de los métodos más conocidos para conservar muestras de semen por tiempos indeterminados (Benson *et al.*, 2012).

La técnica de preservación de espermatozoides *post mortem*, es una herramienta que resulta viable para la conservación del material genético de especies que se encuentran en peligro de extinción, autóctonos o nativos (Olivo *et al.*, 2017). De igual manera Woods *et al* (2004) indican, que la criopreservación de células espermáticas en especies bovinas y en humanos son muy exitosos para conseguir el resguardo de material genético.

Es por ello que el aspecto más útil de la criopreservación, es que ayuda a la conservación de poblaciones vivas, considerado como un complemento de programas de

conservación más amplio y representa un seguro en caso de catástrofes o problemas genéticos (Ávalos *et al.*, 2018).

4.7.2. Protocolos de criopreservación

De acuerdo a Medina *et al.*, (2007) indican que existen diversos protocolos de criopreservación, utilizadas para cada especie. Debido a que la criopreservación depende de la eficiencia en reducción de la temperatura durante el congelamiento como las curvas de congelamiento, y que debido a ello ocasionan daños celulares por deshidratación y la formación de cristales de hielo intracelular.

Los métodos usualmente utilizados para la congelación de semen de bovinos, es el método convencional y el automatizado. Según Ribeiro *et al.*, (2014) El método convencional sigue una serie de pasos no estandarizados los cuales utilizan materiales de uso cotidiano como la nevera para el enfriamiento y posteriormente cajas de poliestireno expandido con nitrógeno en su interior para la congelación de las muestras espermáticas. Mientras que el método automatizado utiliza un equipo de congelación programable, siguiendo un ritmo de congelamiento estandarizado de manera que controla las curvas de enfriamiento constante para muestras espermáticas.

4.8. Diluyentes utilizados para la congelación del semen bovino

Un diluyente es una solución acuosa que se utiliza para aumentar el volumen del eyaculado. Este procedimiento se realiza mientras se preservan las características funcionales de espermatozoides, de tal manera asegurar un equilibrio de tasa de fertilidad (Gadea, 2003).

Los diluyentes de semen presentan componentes protectores, haciendo posible la sobrevivencia espermática una vez fuera del tracto reproductivo (Pineda y Pinilla, 2007).

Teniendo como principal función la protección de la integridad y funcionalidad de la membrana plasmática. Proveyendo de sustratos energéticos y manteniendo en un punto estable el pH y osmolaridad en el medio extracelular (Batellier *et al.*, 2001).

La capacidad de tampón es una característica que resalta en los diluyentes, además de que funciona como neutralizante, por tal motivo los antibióticos son adicionados en los diluyentes con la finalidad de retardar o eliminar a las bacterias que se podrían presentar al momento de recolectar muestras de semen (Pineda y Pinilla, 2007).

El pH de los diluyentes puede variar entre 6.7 y 7.2 por ello no afecta la calidad espermática durante el almacenamiento (Pineda y Pinilla, 2007).

4.8.1. Optixcell®

Es un preservante de semen producido por la empresa IMV Technologies Francia, basado en liposomas sintetizados sin proteína animal, tiene una combinación de fosfolípidos preparados de manera artificial que imitan las características de la yema de huevo y las reemplaza. OptiXcell®, además de contener carbohidratos, sales minerales, tampón, antioxidantes entre otras mas no contiene proteína de origen animal, permitiendo una preparación segura y de alta calidad de las dosis de semen en fresco y congelado (IMV Technologies, 2017).

Andrade y Palma (2020), evaluaron 12 eyaculados en tres toros, obtenidos por con electro eyaculador, este estudio tuvo como objetivo la evaluación del efecto de dos diluyentes Optixcell® y Andromed® sobre el tiempo de permanencia de viabilidad en el semen, llegando a la conclusión de que el uso de Andromed® y Optixcell® tanto en semen fresco y refrigerado no modifica las variables de motilidad, normalidad, vitalidad espermática, calidad morfológica, tanto integridad estructural y funcional de membranas, teniendo unos resultados óptimos a la evaluación.

Cabrera (2021) en su trabajo de investigación “Integridad de la membrana citoplasmática en semen refrigerado y congelado de toros usando dos dilutores sintéticos”, evaluó muestras de semen colectadas en toros por medio de la vagina artificial y utilizó dilutores comerciales Andromed® y Optixcell® para las muestras correspondientes. Concluyendo de que el dilutor de semen Optixcell® tuvo un buen resultado para la conservación de la membrana citoplasmática con respecto a Andromed®, de igual manera la reacción a la prueba HOST por parte de Optixcell® fue positiva para semen refrigerado y descongelado.

4.8.2. Andromed®

Es un diluyente sintético, libre de yema de huevo, de alto rendimiento. Para congelar y preservar semen fresco de rumiantes, este producto en composición contiene antibiótico. Presentando en su composición fosfolípidos, TRIS, ácido cítrico, azúcares, antioxidantes, tampones, glicerina, agua de altísima pureza y antibiótico. Permitiendo una microscopia más eficiente, su consistencia transparente permite entregar imágenes en alta calidad en microscopio, de igual manera es eficiente para la preservación de semen fresco a +5°C hasta +10°C (Minitube, 2021).

Carballo *et al.* (2009) evaluaron Andromed® comparandola con el dilutor Triladiyl®, donde utilizaron 18 muestras de eyaculado en bovinos por el metodo de electroeyaculacion, la presente investigacion tuvo como resultado que el Triladyl®, obtuvo mejor significancia sobre la motilidad pos descongelado en comparacion con el Andromed®. A pesar de ello concluyeron que ambos dilutores son aceptables para la criopreservacion de semen de toro.

Maravi y Cayo (2020) realizaron una investigacion con el objetivo de evaluar los efectos de dos dilutores comerciales en la calidad seminal *post* congelado. Para la colecta de semen se utilizó el metodo de vagina artificial, cada muestra colectada fue diluida en

proporción de 1:5. Concluyendo que los dilutores comerciales Andromed® y Triladyl® no presentaron diferencias significativas en los resultados en cuanto a las características obtenidas en semen fresco con respecto al congelado.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Ubicación espacial de la investigación

El presente trabajo de investigación se realizó en el camal municipal de San Jerónimo, provincia del Cusco, ubicado en la zona sur oriental, en la sierra del Perú.

5.1.1. Ubicación

a) Ubicación geográfica

Altura: 3,399 m.s.n.m.

Latitud Sur: 13° 30' 45"5

Longitud Oeste: 71° 58' 33"

c) Ubicación hidrográfica

Cuenca: Vilcanota

Sub cuenca: Watanay

Microcuenca: Wanakauri

Figura 1

Mapa de ubicación del distrito de San Jerónimo



Fuente: (Corporacion Allin Puriy S.A.C., 2013).

5.2. Duración del estudio

Las evaluaciones correspondientes al estudio tuvieron una duración de 180 días comprendidas entre los meses de octubre del 2022 a marzo del 2023. Donde se obtuvieron las medidas testiculares antes y después del beneficio realizadas en el camal de San Jerónimo ciudad del cusco, junto a ello la evaluación en laboratorio de características microscópicas de espermatozoides epididimarios de bovinos criollos en las instalaciones de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco facultad de Agronomía y Zootecnia.

5.3. Materiales y equipo

5.3.1. Equipos de laboratorio

- Microscopio Óptico triocular
- Refrigeradora

- Balanza de 0.01% de precisión
- Software Sperm Motility Tracker v2.0

5.3.2. Reactivos

- Dilutor de semen Andromed®
- Tinción de eosina
- Medio HOST (Citrato de sodio y fructuosa)

5.3.3. Materiales de laboratorio

- Porta objetos
- Cubre objetos
- Micropipetas
- Viales cónicos de 2 ml
- Tubos cónicos estéril con tapa rosca de 15 ml
- Agua destilada
- Solución salina
- Tanque de criogénico de 3 Kg
- Nitrógeno líquido
- Pajillas de 0.57ml
- Termo descongelador de pajillas
- Hojas de bisturí

- Papel toalla
- Algodón
- Equipo de cirugía menor
- Placas Petri
- Sujetador clip metálico a presión tipo tirante
- Bolsas plásticas herméticas

5.3.4. Materiales de campo

- Cinta bovino métrica
- Cinta métrica
- Marcador para animal tipo crayón
- Vernier digital
- Mocheta
- Cajón de Tecnopor
- Gel refrigerante
- Soga
- Plataforma de vidrio 25x25
- Cuaderno de campo
- Lapiceros

5.3.5. Equipo de campo

- Balanza digital con plataforma para animales mayores
- Balanza gramera con sensibilidad de 0.1 gr

5.3.6. Equipo de protección de campo y laboratorio

- Cascos de protección
- Botas punta acero
- Guantes de badana
- Mameluco
- Mandil
- Barbijo
- Guantes quirúrgicos
- Cubrebocas
- Gorras quirúrgicas

5.4. Unidades experimentales

La investigación se llevó a cabo en el camal de San Jerónimo Cusco, donde se trabajó con 25 bovinos machos de fenotipo criollo, entre las distintas edades, dichas muestras fueron tomadas de testículos de bovinos que arribaron a los corrales de espera del camal, provenientes de varios puntos de venta o tabladas ganaderas de la región del Cusco.

De cada bovino criollo en estudio, se tomaron medidas testiculares in vivo y post mortem y se recuperaron las colas de epidídimos de cada testículo en plásticos herméticos identificados por código animal y almacenados en una caja de poliestireno expandido conservadas en gel refrigerante. Las muestras epididimarias fueron llevadas al laboratorio donde realizó la higienización de los epidídimos con agua estéril y posteriormente fueron evaluados.

5.5. Instalación

La investigación fue realizada en dos ubicaciones, el primero estuvo ubicado en los corrales de espera del camal municipal de San Jerónimo Cusco, donde se realizó la obtención del peso vivo de cada bovino criollo y medidas testiculares, antes y después de ser beneficiados, la segunda etapa de trabajo se realizó en el laboratorio de ciencia animal, de la Facultad de Agronomía y Zootecnia K'ayra, donde se analizaron muestras epididimarias de semen refrigerado y criopreservado.

5.7. Metodología de investigación

De los 25 bovinos criollos elegidos, se recuperaron sus testículos *post mortem*, luego de ello se recuperaron sus epidídimos para su evaluación y empleo, siguiendo las actividades que a continuación se detallan.

5.7.1. Registro de datos de bovinos criollos en el camal de san jerónimo *in vivo*

a) Selección de animales

Se seleccionaron bovinos de fenotipo criollo, machos de diversas edades y con condiciones corporales promedio de 2 a 5 de acuerdo a las escalas utilizadas por Niekerk

y Louw (1980). Las características fenotípicas de los criollos para la exclusión o inclusión de animales fueron: el color de manto, tamaño corporal, cuernos pronunciados entre otros, tal como se aprecia en la siguiente figura.

Figura 2

Fotografía referencial de bovino criollo usado en el estudio



b) Registro de peso

El peso vivo se obtuvo con una balanza pecuaria con plataforma usado para animales mayores de marca JR® con una sensibilidad de 100 gr, la obtención de los pesos se efectuó en los corrales de espera, antes del beneficio de estos animales.

c) Medición de la circunferencia escrotal

La medición de circunferencia escrotal se realizó con una cinta bovino métrica fijada por la parte central o la parte más ancha del testículo donde este fue sujetado firmemente con el objetivo de provocar el descenso testicular completo.

d) Largo, ancho y profundidad testicular

Las medidas para largo, ancho testicular y profundidad fueron evaluadas de manera individual (testículo derecho, testículo izquierdo) y de manera general (ambos testículos) solo fueron medidos el largo y ancho testicular. Todas las medidas fueron realizadas con vernier digital, donde cada testículo fue sujetado con la mano con el objetivo de provocar el descenso completo del testículo.

Para la medición del largo testicular se tomó como referencia la parte superior del testículo a la altura de la cabeza del epidídimo hasta la base del testículo. De igual manera el ancho testicular fue medido con vernier digital por la parte central o parte más ancha del testículo. Mientras que la profundidad testicular fue medida con vernier digital tomando cada testículo por separado derecho e izquierdo y realizando cada medida lo más centrado posible.

5.7.2. Registro de datos *post mortem* en las instalaciones del camal

a) Pesado de testículos *post mortem*

Después del beneficio de bovinos criollos se registraron los pesos de cada testículo de manera individual (testículo derecho e izquierdo) donde cada cuerpo bovino *post mortem* se encontraban suspendidos en el aire y de esta manera fueron pesados con una balanza gramera de 0.1gr de sensibilidad.

Todas las medidas testiculares realizados *in vivo* a bovinos criollos, siguieron los mismos procedimientos para *post mortem* con la excepción de que ya no se realizaron medidas de profundidad testicular.

b) Extracción y almacenamiento de epidídimos

Una vez tomadas las medidas de cada testículo *post mortem*, fueron recuperados los epidídimos del testículo derecho e izquierdo, con el uso del bisturí se realizó el corte a la capa que protege a los testículos denominada como túnica dartos. Procediendo a la localización de los epidídimos con lo que se realizó el corte correspondiente a la altura del cuerpo del epididimario, manteniendo la cola del epidídimo estos siendo desprendidos del testículo, evitando contaminar la muestra espermática presente en la cola del epidídimo por cortes accidentales.

Las colas de epidídimos colectados, fueron sellados por el extremo de las zonas de corte con la ayuda de un sujetador metálico a presión desinfectado y siendo recuperadas en bolsas plásticas con cierre adhesivo, enmarcadas con el código del bovino del cual fue extraído el epidídimo y al lado del testículo del cual fue recuperado (epidídimo derecho e izquierdo). Todas las muestras epididimarias recolectadas fueron almacenadas en una caja de poliestireno expandido con gel en hielo para su conservación y fueron llevados al laboratorio en un lapso de una hora.

5.7.3. Recuperación de fluido seminal de epidídimos

El método utilizado para la recuperación de fluido seminal epididimario fue mediante el método de lavado por enjuague como lo realizado por Gonzales *et al.* (2022), con algunas variaciones, para ello los epidídimos recuperados *post mortem* mantenidas con sujeción por el sujetador metálico a presión a nivel de corte, son extraídas del almacenamiento para ser lavadas con agua destilada; con el objetivo de quitar impurezas que pudieran contaminar la muestra y posteriormente fueron secadas con papel toalla. Cada cola de epidídimo higienizado fue pesada en una balanza de sensibilidad de 0.01 gr de precisión de la marca SF-400D.

La recuperación del fluido seminal para cada epidídimo consistió en realizar tres cortes longitudinales profundos en la porción de la cola del epidídimo por medio de un bisturí estéril. Seguidamente se realizó el lavado seminal mediante una micropipeta con dilutor que previamente fue pre-diluido, realizando un lavado con 1,000 µl de dilutor Andromed® por cada corte. Donde cada lavado de fluido epididimario fue rescatado en placas Petri esterilizadas y estas muestras fueron transferidas a tubos cónicos estériles de 15 ml, para finalmente ser almacenadas bajo refrigeración a 5 °C.

5.7.4. Evaluación de características macroscópicas de la suspensión espermática recuperada de epidídimos

a) Volumen

El volumen de suspensión espermática de epidídimos recuperados en tubos cónicos graduados (ml) fueron rotulados con código de bovino criollo evaluado, y la lectura volumen se efectuó por observación directa.

5.7.5. Evaluaciones microscópicas de semen epididimario

La evaluación microscópica de semen epididimario como la evaluación de concentración espermática, vitalidad, funcionalidad de la membrana y motilidad progresiva individual, se realizaron de la siguiente manera:

a) Concentración espermática

Inicialmente se determinó la concentración espermática refrigerada por medio de la cámara de Neubauer, donde las muestras anteriormente recuperadas mediante el método de lavado por enjuague, fueron diluidas con agua bidestilada a un factor de 1:50, y por medio de una micropipeta se extrajeron 15 µl suspensión espermática homogenizada para

ser contabilizada en la cámara de Neubauer por medio de un microscopio óptico. Donde se contabilizó cabezas de espermatozoides en siete cuadrantes por cada cámara. Este procedimiento fue realizado para cada epidídimo (derecho e izquierdo). Al culminar el conteo de cada cámara del Neubauer, se determinó el total de espermatozoides presentes en cada epidídimo por medio de una fórmula. Posteriormente las muestras espermáticas de epidídimo derecho e izquierdo fueron combinados en un solo tubo cónico, sometiéndolo a una dilución final para obtener una concentración de 35×10^6 espermatozoides/ml.

La concentración espermática fue determinada por medio de la siguiente formula:

$$\text{con. Espermática} = ((AA / BB) \times 1000) \times Cb$$

Donde:

AA: Número de células espermáticas contadas.

BB: Volumen de la cámara de New Bauer.

Cb: Factor de dilución.

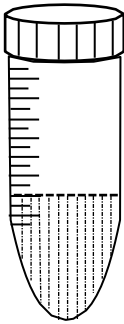
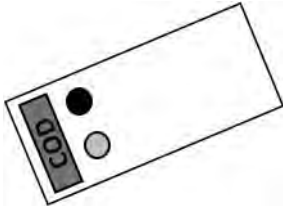
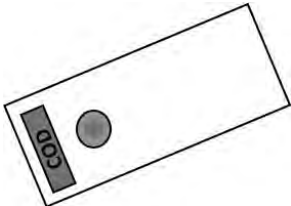
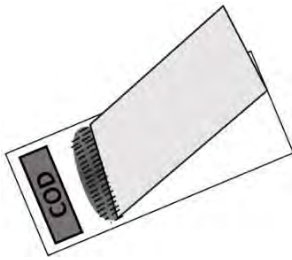
b) Vitalidad espermática

La vitalidad espermática fue evaluada en muestras epididimarias refrigeradas y criopreservadas con tinción de eosina, para lo cual se usaron porta objetos marcados con código del bovino criollo a ser evaluado y por medio de una micropipeta se extrajo 10 µl de suspensión espermática homogenizada y fue colocado en uno de los extremos del porta objeto junto con 10 µl de eosina para posteriormente ser homogenizada para el extendido (frotis) de la muestra. Los extendidos fueron secados a temperatura ambiente y posteriormente evaluados en microscopio óptico a un aumento de 10X realizando como mínimo un conteo de 200 espermatozoides por cada muestra. Donde se pudieron identificar

espermatozoides con cabeza transparente (espermatozoides vivos) y tinción rosada a nivel de cabeza (espermatozoides muertos).

Figura 3

Procedimiento de para la evaluación de vitalidad espermática

	 • 10 µl de solución eosina • 10 µl de suspensión espermática
1) Muestra espermática recuperada bajo refrigeración a 5°C.	2) Deposición de muestra espermática y eosina.
	
2) Muestra homogenizada	3) Frotis y secado

Fuente: Elaboración propia.

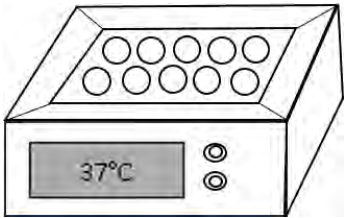
c) Funcionalidad de membrana plasmática

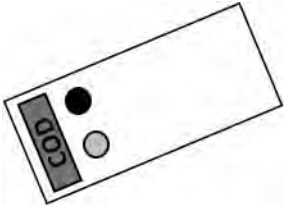
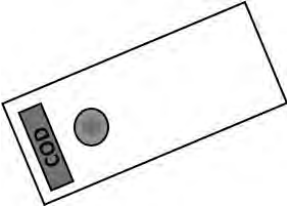
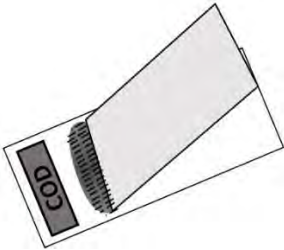
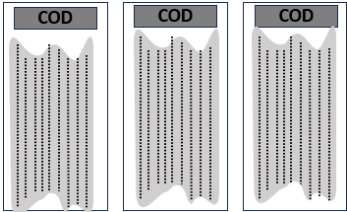
La evaluación de la funcionalidad de membrana plasmática mediante la prueba de test hipoosmótica (HOST) fue evaluada en muestras refrigeradas y criopreservadas, para ello se utilizaron crio viales cónicos de 2 ml marcados con el código del bovino criollo evaluado para lo cual mediante una micropipeta se extrajo 60 µl de suspensión espermática

homogenizada y luego fue agregada 200 µl de solución hipoosmótica (100 mOsm/L) a cada crio vial y estas muestras fueron puestas en gradillas de baño maría regulada a 37 °C por 40 minutos. Una vez culminada la incubación en baño maría se extrajo con una micropipeta 20 µl de suspensión espermática incubada sobre un porta objetos rotulado con código del bovino y sobre esta muestra fue agregada 15 µl de eosina y posterior a ello fue homogenizado y se hizo el extendido dejándose secar a temperatura ambiente. Las muestras secas de extendido fueron evaluadas en microscopio óptico a un aumento de 10X realizando un conteo de 200 espermatozoides como mínimo por muestra. Con ello se identificaron espermatozoides con cola hinchada o enrollada considerado a estos, como positivos para el test hipoosmótico, y aquellas con aspecto normal fueron consideradas con endosmosis negativa.

Figura 4

Procedimiento para la evaluación de la funcionalidad de la membrana espermática mediante la tinción HOST

	
1) muestra espermática refrigerada	2) Incubación de muestras espermáticas en baños maría a 37°C.

 • 200 µl solución HOST • 60 µl suspensión espermática • 15 µl eosina	
3) Deposición de muestra espermática incubada y eosina.	4) Muestra homogenizada para el frotis.
	
5) Deposición de muestra espermática incubada y eosina para el frotis.	6) secado de muestras después del frotis.

Fuente: Elaboración propia.

d) Motilidad progresiva individual espermática

La evaluación de motilidad progresiva individual fue evaluada en muestras uniformizadas a $35 \times 10^6/\text{ml}$ para muestras refrigeradas y crio preservadas, colándolas en una platina caliente y usando microscopio óptico. Para ello, con una micropipeta se extrajo 20 µl de muestra seminal epididimaria homogenizada que fueron colocadas en porta objetos diferenciados por código, atemperadas a 38 °C sobre una platina caliente, siendo cubiertos con un cubreobjetos. Luego de ello se efectuó la observación con un microscopio a un aumento de 10X y se grabaron videos en seis sectores distintos para cada muestra con una

duración de cinco segundos. Los videos grabados de motilidad fueron evaluados mediante el Software Sperm Motility Tracker 2.V de acceso gratuito, que de acuerdo a Buchelly *et al.* (2018) indica que el programa es de acceso libre y con la capacidad de analizar la motilidad en diferentes concentraciones, pudiendo ser utilizado en la evaluación de motilidad espermática en cualquier otra especie.

5.7.6. Empajillado y refrigerado de la suspensión espermática epididimaria de bovinos criollos

Las muestras uniformizadas y homogenizadas con dilución final fueron empajilladas de forma manual por medio de absorción mecánica a temperatura ambiente, donde cada pajilla de 0.57 ml fueron selladas con alcohol polivinílico y posteriormente sumergidas en una bandeja con agua atemperada a 5°C y después fue refrigerada por 24 horas a una temperatura de 5°C.

5.7.7. Criopreservación y descongelado de pajillas

Las pajillas con muestras espermáticas ya estabilizadas bajo refrigeración por 24 horas, fueron extraídas del recipiente para ser secadas y posteriormente congeladas en nitrógeno líquido (N₂L), para ello las pajillas fueron colocadas a una altura promedio de 4 cm al nivel de N₂L que contenía la caja de poliestireno expandido, y fueron expuestos a vapores de N₂L durante un tiempo de 7 minutos, luego de ello, las pajillas fueron sumergidas completamente en el N₂L y posterior a ello transferidas a un tanque criogénico para su conservación.

El descongelado, se realizó tomando una pajilla del tanque criogénico y fue descongelada en termo descongelador de pajillas en agua temperada a 37 °C por 20 segundos. Para finalmente evaluar las características microscópicas respectivas de cada muestra.

5.8. Variables de estudio

5.8.1. Variables independientes

- Método de conservación (refrigeración y crio preservación)

5.8.2. Variables dependientes

- Volumen espermático recuperado
- Concentración espermática en suspensión recuperada
- Vitalidad espermática
- Motilidad espermática
- Funcionalidad de membrana plasmática

5.9. Análisis estadístico

El tipo de investigación con la cual se va llevó a cabo el presente trabajo es un diseño del tipo experimental, evaluando el efecto de la criopreservación de la suspensión espermática obtenida de los epidídimos recuperados del camal, detallando que las características microscópicas del semen dependerán únicamente de cada muestra obtenida de epidídimo de bovinos criollos y al grado de sometimiento de las muestras a refrigeración y criopreservación.

Se utilizó la prueba T de medidas para datos pareados el cual tiene la siguiente ecuación.

$$t = \frac{\bar{d}}{S_d/\sqrt{n}}$$

Donde:

d: media muestral de la diferencia entre las observaciones antes y después de ser congeladas.

n: tamaño de la muestra.

Sd: desviación estándar de variables.

Los análisis se efectuaron usando el lenguaje de programación R v 4.2, y el entorno de trabajo Rstudio.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES

6.1. Determinación de la concentración espermática epididimaria obtenida

En la Tabla 3 se presentan los promedios generales de concentración espermática y número total de espermatozoides recuperados de la cola del epidídimo donde se obtuvo una concentración post recuperada de 294.3×10^6 y el total de espermatozoides recuperados fue de $1,849.8 \times 10^6$.

Tabla 3

Promedios espermáticos para concentración espermática de epidídimos derecho e izquierdo de bovinos criollos

Variable	N	General
		Promedio
Concentración espermática ($\times 10^6/\text{ml}$)	25	294.3×10^6
*Total, de espermatozoides recuperados $\times 10^6/\text{spz}$)	25	$1,849.8 \times 10^6$

Leyenda: La variable enmarcada con “*” no fue discutida.

En un estudio realizado por Chaveiro *et al.* (2015) donde recuperaron espermatozoides de la cola del epididimo por el metodo de aspiracion con pipeta, obtuvieron resultados muy cercanos a nuestro estudio en muestras frescas de epididimos, donde obtuvieron una concentracion de $216 \pm 27.5 \times 10^6$ células/ml. Por otro lado, Formighieri *et al.* (2013) donde evaluaron muestras refrigeradas de espermatozoides epididimarios a 5°C , reportaron promedios menores para concentracion espermatica de

181.875 $\times 10^6$ células/ml. De acuerdo a estas investigaciones las diferencias estarían relacionados al uso de diferentes metodos o técnicas de recuperación de espermatozoides epididimarios.

Por otro lado, Martins *et al.* (2009), reportaron promedios mucho más altos para concentración espermática de $432 \pm 77 \times 10^6$ células/ ml. De igual manera en otro estudio realizado por Melo *et al.* (2011) donde recuperaron espermatozoides de la cola del epididimo por el metodo de presión manual, utilizando dilutores a base de medio TRIS yema de huevo y glicerol al 7%, cuya concentracion obtenida fue de $380 \pm 55 \times 10^6$ células/ml. También Quispe (2015), reportó promedios para concentración espermática epididimaria en muestras refrigeradas a 5 °C de $339.2 \pm 240.4 \times 10^6$ espermatozoides/ml. Las posibles diferencias entre promedios en comparación con los resultados obtenidos en nuestro estudio, podrían deberse a las condiciones de evaluación en las que fueron mantenidas los animales. Donde la principal diferencia es que nuestro estudio, se realizó en un local de beneficio animal, donde no existe un control estricto de los animales bajo estudio, de igual manera la población estudiada es privada de alimentación por varios días hasta su beneficio, pudiendo también estos estar en contacto con hembras bovinas ocasionando una probable disminución a nivel de la concentración espermática como lo contrastado por Amann y Schanbacher, (1983) que la concentración de espermatozoides es mayor cuando no eyaculan por 7 días, a diferencia que cuando un animal eyacula diariamente la concentración se reduce en un 25%.

6.2. Evaluación de características microscópicas de las muestras seminales mantenidas por 24 horas en refrigeración a 5°C

6.2.1. Vitalidad espermática

En la Tabla 4 se presentan promedios de vitalidad espermática epididimaria refrigerado y criopreservado de bovinos criollos *post mortem*, donde el promedio de porcentaje de vivos refrigerados $69 \pm 14.0\%$ y en muestras criopreservadas fue de $34.0 \pm 19.0\%$ crio preservados indican que existe una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre medias.

Tabla 4

Promedios de vitalidad espermática de muestras refrigeradas y criopreservadas de bovinos criollos

Variable		Refrigerado	Criopreservado	P-value
		media ± DS	media ± DS	
Vitalidad	Número	25	25	6.847e-06
	%vivos	69 ± 14.0 a	34 ± 19.0 b	
	Conteos vivos	174.76 ± 38.07	79.33 ± 45.42	
	conteo total	254.71 ± 27.1	233.48 ± 12.18	

Leyenda: Letras distintas entre filas indican diferencias estadísticas de significancia $P < 0.05$.

Los resultados obtenidos en nuestra investigación son comparables a los reportados en la misma especie por Olivo *et al.* (2017) donde obtuvieron para viabilidad espermática de muestras extraídas del epididimo en fresco de $68.7 \pm 4.8\%$ y $40.5 \pm 9.8\%$ en muestras criopreservadas; de igual manera Ribeiro *et al.* (2014) reportaron porcentaje de espermatozoides vivos en muestras frescas de $69.4 \pm 10.7\%$ y $53.9 \pm 11.8\%$ para muestras criopreservadas. Las coincidencias observadas en muestras refrigeradas, podrían deberse a las mismas condiciones y tiempo en la que fueron almacenadas las muestras espermáticas, en cambio los promedios altos reportados en muestras después de ser

criopreservados, podrían deberse al uso de diferentes dilutores y crioprotectores, de igual manera el uso de yema de huevo para criopreservar y proteger a los espermatozoides contra el descenso de temperaturas como lo contrastado por Ávalos *et al.* (2018) que indican que la yema de huevo aporta una cierta protección a nivel de membranas espermáticas, contra el descenso de temperaturas o shock por frío.

Promedios menores fueron reportados por Strand *et al.* (2016) para viabilidad en muestras refrigeradas a 5 °C por 24 horas donde obtuvieron 60.6% y 46.3% para muestras después de ser crio preservadas. De igual manera Benítez *et al.* (2018) obtuvieron promedios para espermatozoides vivos, en muestras refrigeradas a 5 °C a 8 horas de $63.04 \pm 3.7\%$. Por otro lado, Valverde *et al.* (2018) encontraron valores muy superiores en muestras pre congeladas donde reportó $84.2 \pm 2.31\%$ y $63.0 \pm 2.61\%$ para muestras *post* criopreservadas. Igualmente, Quispe (2015) reportó valores para vitalidad espermática en muestras refrigeradas de 74.41%; igualmente Ccoñas, (2017) reportó para muestras refrigeradas a 4.5 °C por 24 horas evaluadas con TRIS yema de codorniz a concentración de 20% valor de $70.0 \pm 10.95\%$ de espermatozoides vivos. Las diferencias encontradas en muestras refrigeradas podrían estar sujetas al tiempo transcurrido desde la muerte del animal hasta el procesamiento de las muestras espermáticas y a las curvas de congelamiento a las que fueron expuestas los espermatozoides en la criopreservación, donde Moore *et al.* (2006) indican que el tipo de curva que se utilice determina el grado de lesión celular, y de ello depende el grado de deshidratación y formación de cristales de hielo a nivel celular.

Por otro lado, la principal causa del descenso de vitalidad espermática observada en muestras criopreservadas respecto a las refrigeradas, estarían relacionadas a la temperatura de dilución a la que fueron expuestas las muestras espermáticas, donde Segura *et al.* (2023) indican que se tienen que manejar adecuadamente las temperaturas

de dilucion, ya que podria afectar negativamente en los parámetros de vitalidad del espermatozoide al momento de criopreservar.

6.2.2. Evaluación de la funcionalidad de la membrana plasmática (host)

En la Tabla 5 se muestran los promedios de espermatozoides reactivos y no reactivos al test de HOST para muestras refrigeradas y criopreservadas, donde el porcentaje de espermatozoides con reacción en muestras refrigeradas fue de $79 \pm 8.0\%$ y $39 \pm 2.0\%$ en muestras criopreservadas, siendo estos promedios diferentes ($p < 0.05$).

Tabla 5

Promedios epididimarios evaluados para funcionalidad de la membrana plasmática por Test Hiposmótico refrigerado y criopreservado en bovinos criollos

Variable	Refrigerado	Criopreservado	P-value
	media ± Ds	media ± Ds	
Reacción HOST	Número	25	1.854e-08
	%vivos	79 ± 8.0 a	
	Conteos vivos	177.62 ± 21.94	
	Conteo total	223.48± 12.02	
		25	
		39 ± 20 b	
		86.19 ± 45.64	
		218.38 ± 12.73	

Leyenda: Letras distintas entre filas indican diferencias estadísticas de significancia $P < 0.05$.

En un estudio evaluado por Martins *et al.* (2009) reportaron similares promedios para integridad de la membrana espermática en muestras refrigeradas a 5°C por 24 horas, donde criopreservaron espermatozoides epididimarios con yema de huevo, TRIS y glicerol, obteniendo para muestras refrigeradas promedios de $72.3 \pm 17.5\%$ y $36.2 \pm 14.5\%$ después de ser criopreservadas. De igual manera Melo *et al.* (2011) obtuvieron promedios para integridad de membrana plasmática en muestras refrigeradas por 24 horas a 5°C entre $72.12 \pm 25.20\%$ y $50.30 \pm 30.46\%$ para muestras criopreservadas. En otro estudio Ccoñas

(2017) encontró promedio para endosmosis positivo donde utilizo dilutor yema de huevo de codorniz al 10% para muestras refrigeradas por 24 horas reportando $76,2 \pm 10.11\%$. Aunque los metodos de recuperacion difieren en cada estudio citado anteriormente, la temperatura de almacenamiento son las mismas y por tal motivo podria estar relacionada a la similitud no muy lejana observada en cada estudio.

Por otro lado Pérez *et al.* (2022) obtuvieron promedios menores a lo reporta en nuestro estudio, en muestras refrigeradas de $60.31 \pm 7.91\%$ y $27.47 \pm 4.86\%$. De igual manera Valverde *et al.* (2018) reportaron promedios mediante la prueba de test Hiposmotico (HOST) para muestras después de ser criopreservado $31.3 \pm 1.99\%$. También Cunha *et al.* (2016) obtuvo para muestras refrigerado $69.7 \pm 5.2\%$ y para criopreservado $50.0 \pm 6\%$. En un estudios realizado por Ribeiro *et al.* (2014) reportaron promedios para integridad funcional de la membrana de espermatozoide epididimarios en fresco de 69.7 ± 9.2 y promedios para muestras despues de ser criopreservado de $60.2 \pm 10.0\%$. De acuerdo a nuestros resultados obtenidos las evidentes diferencias en promedios estarian relacionadas al tipo de diluyente que fue utilizado, el proceso de criopreservacion y tambien el tiempo de almacenamiento *postmortem* de los epididimos como lo sustentado por Guijarro (2011) donde indica que el porcentaje de espermatozoides con daño a nivel de la membrana plasmatica y acrosomal aumentan proporcionalmente al tiempo de conservacion *postmortem* de epididimos, aunque la integridad es afectados en gran medida por el proceso de congelacion y descongelacion.

6.2.3. Motilidad espermática epididimaria

En la Tabla 6 se muestran resultados de promedios de motilidad espermática, para los variables de espermatozoides estáticos fue de $34.82 \pm 14.43\%$ vs $54.04 \pm 16.11\%$, mientras que para espermatozoides con movimiento medio $4.32 \pm 5.76\%$ vs $6.86 \pm 3.23\%$.

Tabla 6

Promedios de motilidad espermática refrigerados y criopreservados de bovinos criollos

Variable	N		Refrigerado Promedio ± Ds	Criopreservado Promedio ± Ds	P-value
*Espermatozoides estáticos	25	% conteo	34.82 ± 14.43 a 571.28 ± 328.5	54.04 ± 16.11 b 706.85 ± 388.79	9.47e-4
*Movimiento medio	25	% conteo	4.32 ± 5.76 a 73.64 ± 133.3	6.86 ± 3.23 b 97.03 ± 84.19	2.356e-4
*Movimiento rápido	25	% conteo	60.18 ± 18.05 a 1097.03 ± 699.89	37.15 ± 18.46 b 526.83 ± 422.78	1.324e-13
Motilidad total	25	% conteo	65.18 ± 14.43 a 1181.2 ± 689.7	45.96 ± 16.11 b 654.31 ± 453.	1.903e-13
Motilidad progresiva total	25	% conteo	43.44 ± 14.02 a 793.49 ± 532.45	27.9 ± 11.29 b 402.29 ± 289.08	1.683e-11

Leyenda: Letras distintas en la misma fila indican diferencias estadísticas de significancia $P < 0.05$. La variable enmarcada con “*” no fue discutida.

Los espermatozoides con movimiento rápido estuvieron en $60.18 \pm 18.05\%$ vs $37.15 \pm 18.46\%$, mientras que aquellos con y motilidad progresiva total fueron de $43.44 \pm 14.02\%$ vs $27.9 \pm 11.29\%$ teniendo claras diferencias entre muestras refrigeradas respecto de las muestras criopreservadas ($P < 0.05$).

Los resultados que se obtuvieron en este estudio son comparables, a los reportado por Strand *et al.* (2016) donde obtuvieron promedios no muy lejanos para motilidad total, donde utilizaron el método de lavado retrogrado para la recuperación espermática en muestras refrigeradas a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas, reportando para muestras *pre* congeladas valores de 62.1% y 47.0% para *post* congeladas. De igual manera Martins *et al.* (2009) reportaron valores muy similares en motilidad total espermática para muestras refrigeradas a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ que se situaron entre $67.8 \pm 7.5\%$ y valores de $45.0 \pm 20.2\%$ para muestras *post* criopreservadas. En otro estudio Melo *et al.* (2011) reportaron promedios para motilidad

total de muestras refrigeradas a 5 °C por 24 horas de 65.0 ± 9.74 y 49.00 ± 10.0 después de ser criopreservadas. Las similitudes observadas con los autores mencionados estarían relacionadas al tiempo y temperatura en que los epidídimos fueron recuperados y almacenados bajo refrigeración y la objetividad a la que fue evaluada por medio de un software especializado en el análisis de parámetros espermáticos.

Por otro lado, Cunha *et al.* (2016) donde recupero espermatozoides por medio de cortes a nivel de la cola del epidídimo, los resultados que obtuvieron son muy consistentes al nuestro, en muestras espermáticas refrigeradas reportaron $46.1 \pm 3.5\%$ y $35.2 \pm 4.1\%$ en muestras *post* descongeladas. De igual manera Valverde *et al.* (2018) reportaron valores para motilidad progresiva, de espermatozoides recuperados por el metodo de flujo retrogrado, donde obtuvieron promedios después de ser sometidas a nitrógeno líquido de $27.5 \pm 7.77\%$. Por otro lado, Nichi *et al.* (2016) obtuvo promedios para motilidad progresiva muy por debajo de lo obtenido en nuestro estudio, reportando promedios para muestras refrigeradas $29.49 \pm 1.81\%$ y $10.43 \pm 3.15\%$ para muestras criopreservadas. Las principales discrepancias entre estudios anteriormente mencionados, estarían sujetas al uso de diferentes métodos de recuperación espermática, de igual manera resalta el uso de dilutores con diferentes composiciones adicionados a ello el uso de yema de huevo, pudiendo así obtener mejor protección al momento de someter a bajas temperaturas, concerniente a ello Guijarro (2011) indica que el uso de diluyentes a base de yema de huevo confieren mayor protección espermática en los parámetros de movilidad individual y progresiva en muestras refrigeradas de espermatozoides.

Las diferencias observadas en muestras refrigeradas con respecto a las muestras criopreservadas, las posibles causas del descenso en las variables evaluadas podrían deberse al daño ocasionado al momento de someter a bajas temperaturas de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ y la posterior descongelación, como lo indicado por White (1993) donde, explica que los

espermatozoides almacenados en el epidídimo a pesar de poseer la movilidad necesaria, llegan a ser más susceptibles a choques térmicos relacionados al nitrógeno líquido. La posible causante del descenso en la motilidad podría estar relacionada por la calidad inicial de las muestras espermáticas recuperadas y el tiempo de almacenamiento de estos, también corroborados por Martins *et al.* (2009) donde indican que la motilidad está relacionada directamente con el tiempo de almacenamiento provocando su disminución.

VI. CONCLUSIONES

- La concentración espermática obtenida utilizando el método de lavado por corte a nivel de la cola del epidídimo, representa una forma sencilla de obtener muestras espermáticas con concentraciones aceptables como lo obtenido en nuestro estudio de 294.3×10^6 espermatozoides/ml, pudiendo ser útiles para uso en la criopreservación.
- Las características microscópicas de muestras refrigeradas a 5 °C por 24 horas, reportaron valores adecuados en vitalidad con promedio de $69 \pm 14.0\%$, de igual manera la evaluación de la funcionalidad de membrana espermática reporto valores aceptables de $79 \pm 80\%$, mientras los valores de motilidad total fueron de $65.18 \pm 14.43\%$ y motilidad progresiva de $43.44 \pm 14.02\%$, siendo estos valores adecuados y viables para ser preservados y utilizados en programas de biotecnología de acuerdo a otros estudios relacionados al tema.
- Las características espermáticas de bovinos criollos, después de ser sometidos a criopreservación mostraron una disminución en todas las variables evaluadas afectando gradualmente en los parámetros de calidad evaluadas, obteniendo para vitalidad espermática promedios de $34 \pm 19.0\%$, de igual manera en la funcionalidad de la membrana espermática se obtuvo $39 \pm 20\%$, para motilidad total se obtuvo $45.96 \pm 16.11\%$ y motilidad progresiva $27.9 \pm 11.29\%$. Evidenciándose una clara reducción respecto a las muestras refrigeradas, a pesar de la reducción observada, podrían ser aun estas muestras viables para ser almacenadas y posteriormente utilizadas en programas de inseminación artificial.

VII. RECOMENDACIONES

- Evaluar la fertilidad de las muestras recuperadas de epidídimos de toros criollos después de ser criopreservadas.
- Evaluar otros dilutores que ayuden a obtener mejores resultados al momento de criopreservar las muestras espermáticas.
- Comparar el método utilizado en el presente estudio con otras técnicas, que podrían brindar mejores resultados en la obtención de muestras espermáticas.
- Evaluar la influencia del factor ambiental y estrés en animales, que podría afectar en la cantidad y calidad espermática recuperadas de epidídimos.

IX. REFERENCIAS

- Acuña, C. (2012). Circunferencia escrotal. *Sitio Argentino de Producción Animal*, 1-4. Obtenido de <http://www.produccion-animal.com.ar/>.
- Agüero, G. (2012). *Evaluación de las características seminales de sementales bovinos mediante el analizador seminal computarizado (CASA)*. Universidad Central de Venezuela, Venezuela.
- Aguirre, L., Bermeo, A., Maza, D., y Merino, L. (2011). Estudio fenotipo y zoometrico del bovino criollo de la sierra media y alta de la region sur del Ecuador. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal*, 392-396.
- Albers, M., y Barrios , D. (2011). Concentración y morfología de los espermatozoides epididimarios obtenidos de toros postmortem. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias*. 52(2): 91-97. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/3731/373139078004.pdf>.
- Allende , R., y Arisnabarreta , E. (5 de Marzo de 2021). Fisiología espermática, producción de semen y evaluación de calidad seminal. Santa Fe, Argentina.
- Amann P., R., y Schanbacher D., B. (1983). Physiology of male reproduction. *Journal of animal science*. 2(57): 380-403.
- Andrade, G., y Palma, R. (2020). Efecto de dos diluyentes y tiempo de permanencia sobre la viabilidad del semen de bovinos mestizos lecheros. *Informe de trabajo de titulación previa a la obtención del título de médico y veterinario*.

Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López,
Calceta.

Aquino, Y., Veli , E., Rivas , E., Rivas, V., y Estrada , R. (2008). Variabilidad genética de bovinos criollos de Perú utilizando marcadores microsatélites. *Sitio Argentino de Producción animal*. 57(219): 337-340.

Arbizu, C., Ferro, R., Chavez, J., Vasquez, H., Maicelo, J., Poemape, C., . . . Corredor, F. (2022). The Complete Mitochondrial Genome of a Neglected Breed, the Peruvian Creole Cattle (*Bos taurus*), and Its Phylogenetic Analysis. *Data*, 7-76. doi:10.3390/data7060076.

Ávalos, A., Gonzales, J., Vargas, A., y Herrera, J. (2018). *Recolección y manipulación seminal in vitro*. Mexico: Primera edición.

Babera, Guillermo. (2011). *Razas bovinas y bufalinas de la Argentina*. (Primera ed.). Rio Cuarto, Argentina. Obtenido de <https://www.produccion-animal.com.ar/>.

Batellier, F., Vidament, M., Fauquant, J., Duchamp, G., Arnaud, G., . . . Magistrini, M. (2001). Advanced in cooled semen technology. *Animal Reproduction Science*. 68(3-4): 181-190. doi:10.1016/s0378-4320(01)00155-5.

Benítez, E., Chamba, H., Sánchez, E., Luzón , F., y Sánchez, J. (2018). Evaluación comparativa de dos métodos de recuperación espermática de epididímos bovinos post-mortem. *Abanico Veterinario*. 8(1): 59-74. doi:http:10.21929/abavet2018.81.

- Benson, J., Woods, E., Walters, E., y Critser, J. (2012). The cryobiology of spermatozoa. *Theriogenology*. 78(8): 1683-1699. doi:10.1016/j.theriogenology.2012.06.007.
- Bracho, I., Contreras, G., Pirela, M., y Zambrano, S. (2002). La raza criollo limonero: una realidad para la ganadería de doble propósito. En C. Gonzáles Stagnaro, E. Soto Belloso, y L. Ramirez Iglesia, *Avances en la ganadería de doble propósito* (págs. 10-25). Maracaibo, Venezuela: Ediciones Astro Data S.A.
- Brogliatti, G. (2013). Evaluación de la capacidad reproductiva del toro y su impacto de calidad seminal. *XLI Jornadas Uruguayas de Buiatría*. Páginas 120-124.
- Buchelly, F., Zalazar, L., Pastore, J., Greco, M., Iniesta, M., Garde, J., Cesari, A. (2018). Objective evaluation of ram and buck sperm motility by using a novel sperm tracker software. *Reproduction*. 156(1): 11-21. doi:10.1530/REP-17-0755.
- Cabrera, P. (2021). Integridad de la membrana citoplasmática en semen refrigerado y congelado de toros usando dos dilutores sintéticos. *Tesis para optar al Título profesional de Ingeniero Zootecnista*. Universidad Nacional Agraria la Molina, Lima.
- Carballo, D., Canseco, R., Garcia, R., y Montiel, F. (2009). Comparación de dos diluyentes comerciales para criopreservar semen de bovino bajo condiciones de campo en el trópico húmedo. *Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias*. Páginas 355-361.

- Carvajal, C. (2006). Relación entre la prueba de reducción del azul de metileno con la actividad metabólica y los parametros macro y microscópicos del semen fresco bovino. *Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniero Agrónomo*. Universidad Zamorano, Zamorano, Honduras.
- Ccoñas, P. (2017). Efecto del dilutor tris con yema de huevo de codorniz sobre características espermáticas epididimarias en refrigeracion de toros criollos post mortem. *Tesis para optar al título profesional de Médico veterinario y Zootecnista*. Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac, Abancay, Perú.
- Chaveiro, A., Cerqueira, C., Silva, J., Franco, J., y Moreira da Silva , F. (2015). Evaluation of frozen thawed cauda epididymal sperm and in vitro fertilizing potential of bovine sperm collected from the cauda epididymal. *Iranian Journal of Veterinary Research, Shiraz University*. 16(2): 188-193.
- Corporacion Allin Puriy S.A.C. (2013). *Estudio geodinámico del distrito de San Jerónimo, Cusco*. Cusco. Obtenido de <https://sigrid.cenepred.gob.pe/sigridv3/documento/825>.
- Cunha, A., Carvalho, J., Kussano, N., Martins , C., Mourão, G., y Dode, M. (2016). Bovine epididymal spermatozoa: Resistance to cryopreservation and binding ability to oviductal cells. *Cryobiology*. 3(73): 348-355. doi:10.1016/j.cryobiol.2016.09.170.

- de Melo, P., Martins, C., de Oliveira , V., Fonseca , L., Bezerra , J., y Ferreira , H. (2011). Birth of normal calves after artificial insemination using cryopreserved spermatozoa obtained from refrigerated epididymides of death bovine. *Ciencia Rural*. 41(5): 869-874. doi:10.1590/S0103-84782011005000045.
- Diaz, G., y A. Ojeda, R. (2000). *Libro Rojo de Mamíferos Amenazados de la Argentina*. Argentina: Sociedad Argentina para el Estudio de los Mamíferos (SAREM).
- Echevarría , L., Mendoza, G., Fouilloux, A., y Torres, A. (2021). Anatomía funcional de los órganos genitales del macho y de la hembra. En C. S. Galina Hidalgo, y J. A. Balcázar Sánchez, *Reproducción de los animales domésticos*. México: DR© 2021.
- FAO. (2007). La situación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación y la agricultura-resumen. Italia, Roma.
- Flores, E., Lobo, A., Chelhod, M., Rojas, L., Salazar, R., y Albarado, L. (2012). Motilidad y morfología espermática, en estudiantes de la Universidad de Oriente. *Revista Obstetrica Ginecologica Venezuela*. 72(1): 52-57.
- Formighieri, M., Weiss, R., Soccol, V., Kozicki, L., Fujita, A., Azevedo, R., y Thandile, K. (2013). Viability of bull spermatozoa collected from the epididymis stored at 18-20°C. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 56(5): 777-783. doi:10.1590/S1516-89132013000500008.
- Frandsen, R., Wilke, L., y Dee Fails, A. (2009). *Anatomy and Physiology of Farm Animals*. John Wiley y Sons, Inc., Publication.

- Gadea, J. (2003). Review: Semen extenders used in the artificial insemination of swine. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 1(2): 17-27. doi:10.5424/sjar/2003012-17.
- Ginja, C., Telo, L., Cortés, O., Burriel, I., Vega, J., Penedo, C., . . . Martinez, A. (07 de Agosto de 2019). The genetic ancestry of American Creole cattle inferred from uniparental and autosomal genetic markers. *Scientific Reports*. 9(1): 1-16. doi:10.1038/s41598-019-47636-0.
- Gloobe, H. (1989). *Anatomía aplicada del bovino* (Primera ed.). San José, Costa Rica: IICA.
- Gonzales, V., Valdes, Y., Herrera, J., Manríquez, O., y Lazalde, R. (2022). Recuperación de semen post-mortem por medio de lavado epididimal en borregos de pelo. *South Florida Journal of Environmental and Animal Science*. 2(2): 116-120. doi:10.53499/sfjeasv2n2-009.
- González, J., Tadeo, J., Ortega, C., Toledano, A., Vergara, M., y Ávalos, A. (2013). Criopreservación de espermatozoides epididimales a diferentes tiempos postmortem en caninos. *Revista de Salud Animal*. 35(2): 137-141.
- Guijarro, R. (16 de Diciembre de 2011). Influencia del tiempo de almacenamiento post mortem del epidídimo, del medio de dilución y de la técnica de selección espermática en fecundación in vitro, en la calidad del semen de toro de lidia. 239. León, España.

- Hidalgo, C., Tamargo, C., y Fernández, Á. (2015). Recursos zoogenéticos. Banco de razas domésticas autóctonas en peligro de desaparición. *Tecnología Agroalimentaria*. (15): 45-52.
- Huamánahui, A. (2017). Evaluación del dilutor TRIS con yema de huevo de codorniz antes y después de la congelación de espermatozoides epididimarios de toros criollos post mortem. *Tesis para optar al título profesional de Médico Veterinario y Zootecnista*. Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac, Abancay, Perú.
- IMV Technologies. (2017). *Optixcell®*. Obtenido de <https://www.imv-technologies.es/producto/optixcell#brochures>.
- INEI. (Julio de 2013). IV Censo Nacional Agropecuario. *Resultados definitivos IV Censo Nacional Agropecuario 2012*. Lima, Perú.
- INIA. (2004). *Primer Informe Nacional sobre la situación de los Recursos Zoogenéticos*. Lima: Instituto Nacional de Investigación Agraria-INIA. Obtenido de <http://repositorio.inia.gob.pe/handle/20.500.12955/320>.
- Jeyendran, R., Van der Ven, H., Perez, M., Crabo, B., y Zaneveld, L. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil*. 70(1): 219-228. doi:10.1530/jrf.0.0700219.
- Junta de Andalucía, Consejería de agricultura y pesca. (1998). *Reproducción y mejora de pequeños rumiantes*. (C. d. Pesca, Ed.) Granada: Tecnographic S.L., Sevilla.

- Knobil, E., y Neill, J. (2006). *Physiology of reproduction*. (Fourth ed., Vol. I Male reproductive system). Elsevier Inc.
- Love, C. (2016). Modern Techniques for Semen Evaluation. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*. 32(3): 531-546. doi:10.1016/j.cveq.2016.07.006.
- Luzon, F. (2015). Estudio de dos métodos de colecta de espermatozoides epididimarios en toros post mortem. *Tesis de Grado, previa a la obtención del título de Médico Veterinario Zootecnista*. Universidad Nacional de Loja, Loja, Ecuador.
- Maravi, C., y Cayo, I. (2020). Efecto de dos dilutores comerciales en la calidad de semen congelado de Bos taurus. *Revista de Investigación Científica UNTRM: Ciencias Naturales e Ingeniería*. 3(3): 62-67. doi:10.25127/ucni.v3i3.638.
- Martins, C. F., Rumpf, R., Pereira, D., y Dode, M. (2007). Cryopreservation of epididymal bovine spermatozoa from dead animals and its uses in vitro embryo production. *Animal Reproduction Science*. 101(3-4): 326-331. doi:doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.01.018.
- Martins, C., Driessen, K., Melo, P., Carvalho, J., de Sousa, R., Rumpf, R., y Dode, M. (2009). Recovery, cryopreservation and fertilization potential of bovine spermatozoa obtained from epididymides stored at 5°C by different periods of time. *Animal Reproduction Science*. 116(1-2): 50-57. doi:10.1016/j.anireprosci.2008.12.018.

Medina , M., Sanchez, E., Velasco, M., y Cruz , E. (2007). Crioconservación de semen bovino usando un congelador programable (CL-8800) y determinacion de su calidad postdescongelacion por medio de un sistema de análisis espermático asistido por computador (CASA). *ORINOQUIA*. 11(1): 75-86. Obtenido de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=89611108>.

Minitube. (12 de 2021). *Minitube*. Obtenido de <https://www.minitube.com/catalog/es/andromed-p4722/>.

Moore, A., Squires, E., Bruemmer, J., y Graham , J. (2006). Effect of cooling rate and cryoprotectand on the cryosurvival of equine spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*. 26(5): 215-218. doi:10.1016/j.jevs.2006.03.003.

Muiño, R. (2008). Evaluación de la motilidad y vialidad del semen bovino mediante el uso de sistemas CASA y Citometría de flujo: Identificacion de subpoblaciones espermáticas. *Tesis presentado para la optención del grado de Doctor*. Universidad de Santiago de Compostela, España.

Nabors, B. (2021). Anatomy of the reproductive system of the bulls. En R. Hopper, *Bovine reproduction*. (págs. 5-10). Alabama: 111 River Street, Hoboken, NJ 07030,USA.

Naranjo, E. (2015). Evaluación de los parámetros seminales epididimarios post-mortem en la especie bovina en la Universidad Técnica de Cotopaxi Campus Salache. *Tesis de grado previo a la obtención del título Médico Veterinario Zootecnista*. Universidad Tecnica de Cotopaxi, Latacunga, Ecuador.

- Nichi, M., Rijsselaere, T., Losano, J., Angrimani, D., Kawai, G., Goovaerts, I., . . . Bols, P. (2016). Evaluation of epididymis storage temperature and cryopreservation conditions for improved mitochondrial membrane potential, membrane integrity, sperm motility and in vitro fertilization in bovine epididymal sperm. *Reproduction in Domestic Animals*. 52: 257-263. doi:10.1111/rda.12888.
- Olivo, Z., Flores, P., Núñez, A., Val, A., y Toscano, T. (2017). Criopreservación de semen obtenido de epidídimo vs conducto deferente de bovinos post-mortem: resultados preliminares. *Actas Iboamericanas en Conservación Animal*. 10: 189-194.
- OMS. (2010). WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5th ed. *Exame e processamento do sêmen humano*, 5. Rio de Janeiro, Tijuca. Obtenido de <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44261>.
- Pabón, H., y Pullido, M. (2021). Circunferencia escrotal como criterio de selección para carneros de reemplazo. *Pensamiento y Acción*. 31: 52-73. doi:10.19053/01201190.n31.2021.12583.
- Páez, E., y Corredor, E. (2014). Evaluación de la aptitud reproductiva del toro. *Ciencia y Agricultura*. 11(2): 49-59.
- Parra, R., Martínez, G., y Valderrama, M. (2021). Situación actual y perspectivas de la ganadería de bovinos criollos en América Latina. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*. 29(3-4): 79-90. doi:10.53588/alpa.293401.

- Pérez, M., Luque , N., Quispe, A., Condori, E., Rodríguez, F., Manrique , Y., y Perez, U. (2022). Evaluación de la sobrevivencia y fertilidad in vivo de espermatozoides del epidídimo de toros criollos post mortem. *Ariotake-Revista de Investigacion Veterinaria y Amazonía*. 1(2): 1-7. doi:10.55873/ariva.v1i2.186.
- Pineda, S., y Pinilla, S. (2007). Comparación de dos diluyentes (Lactosa-Glicerol-yema de huevo; inra-dformamida-yema de huevo) en la preservación de semen equino. *Trabajo para optar al título de Médico Veterinario*. Universidad de la Salle, Bogotá. Obtenido de https://ciencia.lasalle.edu.co/medicina_veterinaria/315.
- Puerta, J., Mayorga, J., Ospina, L., Berdugo, J., y Cardona, W. (2014). La calidad espermática evaluada mediante metodologías no convencionales. *Medicina y Laboratorio*. 20(3-4): 153-168.
- Quispe, A. (2015). Evaluación de la sobrevivencia y fertilidad in vivo de espermatozoides del epidídimo de toros criollos post mortem. Páginas 1-84. Puno, Puno, Perú.
- Quispe, J. (2021). *El bovino criollo del Altiplano: Desarrollo, biología, avances en zoomorfometría y aptitudes para la producción* (Primera ed.). (J. E. Coaquira, Ed.) Puno, Perú. Obtenido de <https://www.researchgate.net/profile/Jesus-Quispe-Coaquira>.
- Ribeiro, A., Munita, L., Yumi , M., Mello, M., y Ferreira, F. (2014). Criopreservación de espermatozoides bovinos extraídos de la cola del epidídimo utilizando los

métodos convencional y automatizado. *Archivos de medicina veterinaria*. 46(1): 31-38. doi:10.4067/S0301-732X2014000100005.

Rivas, E., Veli, E., Aquino, Y., Rivas, V., Pastor, S., y Estrada, R. (2007). Acciones para la caracterización y conservación del bovino criollo Peruano (*Bos taurus*). *Animal Genetic Resources Information*. 40: 33-42. doi:10.1017/S1014233900002170.

Sarabia, L. (29 de Agosto de 2016). Espermigrama. *Espermiograma. Segun los criterios de OMS*. Chile.

Segura, G., Quispe, H., Saucedo, J., Poclín, A., Murga, N., Cortez, J., y Ampuero, G. (2023). Efectos de dos temperaturas de dilución sobre la calidad de semen en ganado cebuino del Trópico peruano. *Revista Veterinaria*. 1(34): 33-39. doi:10.30972/vet.3416608.

Strand, J., Ragborg, M., Pedersen, H., Kristensen, T., Pertoldi, C., y Callesen, H. (2016). Effects of post-mortem storage conditions of bovine epididymides on sperm characteristics: investigating a tool for preservation of sperm from endangered species. *Conservation Physiology*. 4(1): 1-8. doi:10.1093/conphys/cow069.

Tarazona, A., Cadavid, D., Olivera, M., y López, Á. (2014). Procedimientos para la evaluación del semen utilizado en la producción de embriones bovinos. En A. Lopez, *Cultivo de tejidos reproductivos y reproducción y manipulación de embriones bovinos* (págs. 95-107). Medellín, Colombia: Fondo Editorial Biogenésis.

Tittarelli, C., Stornelli, M., Gimenez, F., Savignone, C., de la Sota, R., y Stornelli, M. (2007). Recuperación espermática epididimal como medio para preservar material genético. *Veterinaria Cuyana*. 2(1-2): 16-20.

Tittarelli, C., Stornelli, M., Giménez, F., Savignone, C., de la Sota, R., & Stornelli, M. (2007). Recuperación espermática epididimal como medio para preservar material genético. *Veterinaria Cuyana*, II(1-2), 16-20. Obtenido de <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/119154>

Valverde , E., Argudo, D., Bueno, H., Quintero, A., y Galarza, D. (2018). Efecto de la temperatura de almacenamiento de epidídimos toro sobre la calidad de espermática de semen criopreservado. *Revista Científica. FVC-LUZ*, 28(6): 454-460.

van Niekerk, A., y Louw, B. (1980). Condition scoring of beef cattle. *Department of Agriculture and Fisheries*. (2): 80.

White, I. (1993). Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reprod Fertil Dev*. 5(6): 639-658. doi:10.1071/rd9930639.

Woods, E., Benson, J., Agca, Y., y Critser, J. (2004). Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Elsevier Inc*. 48: 146-156. doi:10.1016/j.cryobiol.2004.03.002.

ANEXOS

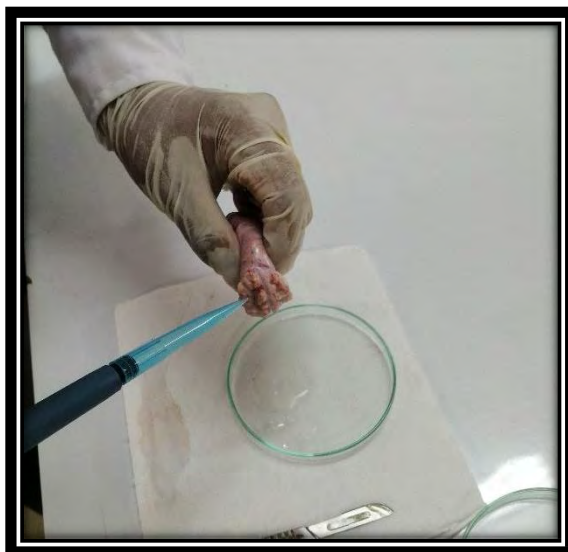
Anexo 1. Pesado de epidídimos recuperados de bovinos criollos *post mortem*.



Anexo 2. Cortes longitudinales realizadas, después de la asepsia de cada epidídimo con agua bidestilada.



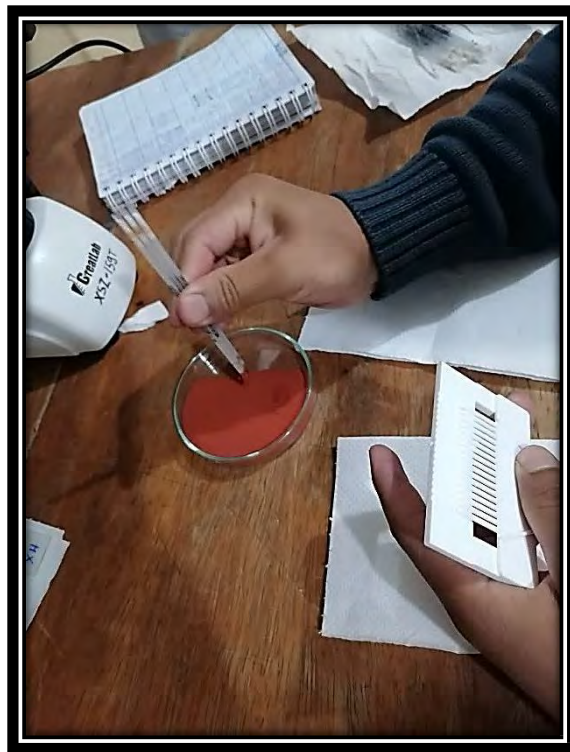
Anexo 3. Recuperación de fluido espermático mediante la técnica de lavado seminal por corte a nivel del epidídimo.



Anexo 4. Muestras espermáticas recuperadas en tubos graduados de 12 ml, y almacenadas bajo refrigeración en refrigeradora a temperatura de 5 °C.



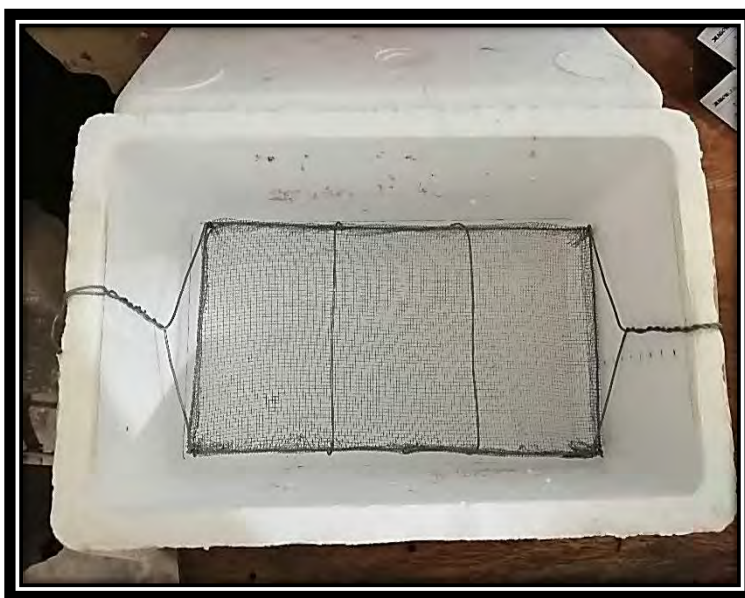
Anexo 5. Empajillado de muestras espermáticas en pajillas de 0.25 mL post refrigeradas.



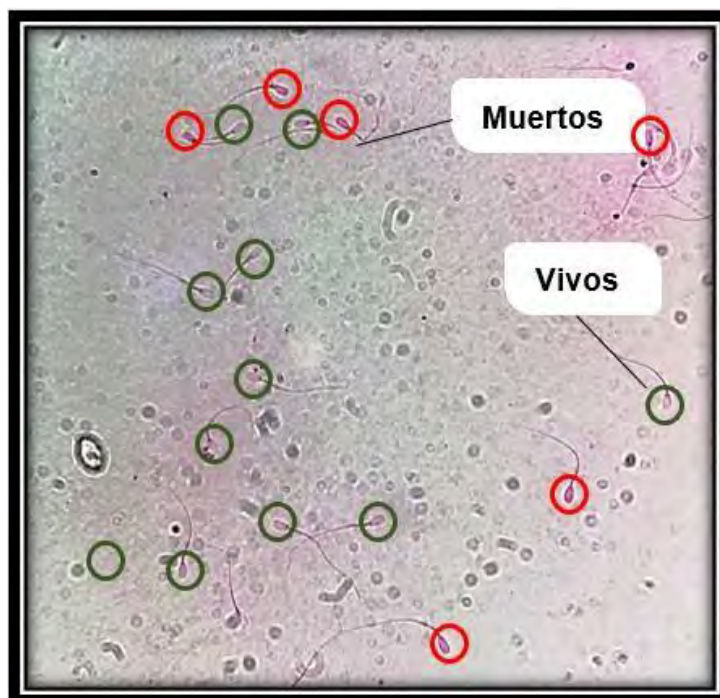
Anexo 6. Estabilización de las pajillas bajo refrigeración por 24 horas a 5 °C.



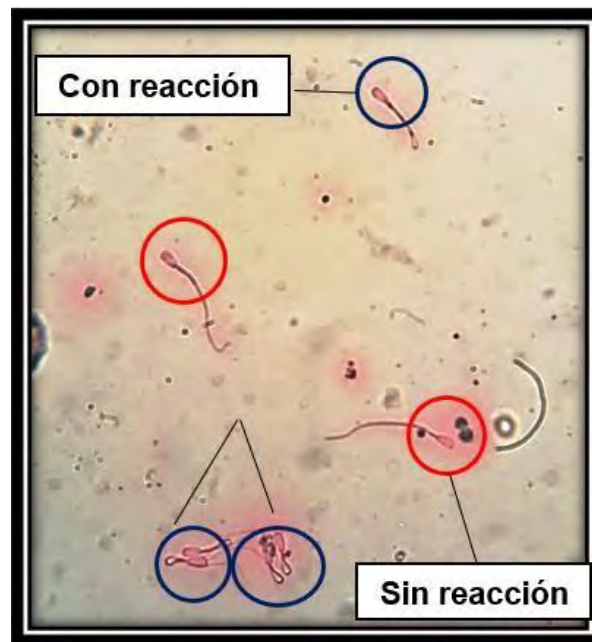
Anexo 7. Atemperamiento de muestras espermáticas en pajillas, a vapor de nitrógeno líquido, a una altura aproximada de 4 cm.



Anexo 8. Evaluación de la vitalidad espermática de muestras recuperadas de epidídimo de bovinos criollos post mortem.



Anexo 9. Evaluación de la funcionalidad de la membrana plasmática por medio de la evaluación de Test Hiposmótico.



Anexo 10. Evaluación de la motilidad espermática epididimaria, por medio del Software Sperm Motility Tracker 2.V. de acceso libre.



Anexo 11. Composición para la preparación de solución Eosina al 9 %.

Componente	Cantidad (gr)
Eosina	0.9 mL
Solución salina	29 mL
Agua destilada	1000 mL

Fuente: (OMS, 2010).

Anexo 12. Composición para la preparación de solución la solución Hiposmótica.

Componente	Cantidad (gr)
Fructuosa	9 gr
Citrato de sodio	4.9 gr
Agua destilada	1000 mL

Fuente: (Jeyendran *et al.*, 1984).

Anexo 13. Análisis estadístico evaluado por programa R- studio.

```
### VITALIDAD EOSINA- NIGROSINA, REFRIGERADO VS CONGELADO
> # estadisticos descriptivos
> #
> a <- DATOS1$X.Vit1_e.n (% de vivos)refri
> b <- DATOS1$X.Vit2_e.n (% de vivos) criopre
> a1 <- DATOS1$V_e.n (conteo de vivos)refr
> b1 <- DATOS1$V2_e.n (conteo de vivos)crio
> c <- DATOS1$N_e.n (conteo vivos vs muertos)refri
> c1 <- DATOS1$N2_e.n (
> #
> summary(a)
  Min. 1st   Median     Mean      3rd   Max.
   Qu.
0.5108 0.5650 0.6773 0.6871 0.7830 0.9304
> summary(b)
  Min. 1st   Median     Mean      3rd   Max.
   Qu.
0.5108 0.5650 0.6773 0.6871 0.7830 0.9304
```

```

0.0178 0.1920 0.3362 0.3365 0.5155 0.6387
> summary(a1)
  Min. 1st Qu. Median    Mean    3rd Qu.    Max.
 117.0  143.0  171.0  174.8  196.0  245.0
> summary(b1)
  Min. 1st Qu. Median    Mean    3rd Qu.    Max.
   4.00   47.00   78.00   79.33  114.00  152.00
> summary(c)
  Min. 1st Qu. Median    Mean    3rd Qu.    Max.
 223.0  235.0  244.0  254.7  270.0  325.0
> summary(c1)
  Min. 1st Qu. Median    Mean    3rd Qu.    Max.
 217.0  225.0  230.0  233.5  239.0  258.0

> #
> library(psych)
> describe(a)
vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1 1 21 0.69 0.14 0.68 0.68 0.17 0.51 0.93 0.42 0.27 -1.42 0.03
> describe(b)
vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1 1 21 0.34 0.19 0.34 0.34 0.26 0.02 0.64 0.62 -0.04 -1.35 0.04
> describe(a1)
vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1 1 21 174.76 38.07 171 173.59 41.51 117 245 128 0.19 -1.16 8.31
> describe(b1)
vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1 1 21 79.33 45.42 78 79.24 53.37 4 152 148 0.06 -1.32 9.91
> describe(c)
vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1 1 21 254.71 27.1 244 251.94 26.69 223 325 102 0.83 -0.13 5.91
> describe(c1)
vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1 1 21 233.48 12.18 230 232.47 11.86 217 258 41 0.61 -0.74 2.66
> #
> #pruebas de7 normalidad
> #metodo grafico
> par(mar = c(2, 2, 2, 2))
> par(mfrow = c(1, 2))
> qqnorm(a, xlab = "", ylab = "", main = "% VITALIDAD E-N
REFIGREDADO")
> qqline(a)
> qqnorm(b, xlab = "", ylab = "", main = "% VITALIDAD E-N
CRIOPRESERVADO")
> qqline(b)
> #
> boxplot(a,col = "blue",main ="% VITALIDAD E-N REFIGREDADO")
> boxplot.stats(a)
$stats

```

```

[1] 0.5108 0.5650 0.6773 0.7830 0.9304

$n
[1] 21

$conf
[1] 0.602137 0.752463

$out
numeric(0)

> boxplot(b,col = "blue",main = "% VITALIDAD E-N CRIOPRESERVADO")
> boxplot.stats(b)
$stats
[1] 0.0178 0.1920 0.3362 0.5155 0.6387

$n
[1] 21

$conf
[1] 0.2246623 0.4477377

$out
numeric(0)

> #
> #TEST DE SHAPIRO
> shapiro.test(a)

      Shapiro-Wilk normality test
data: a
W = 0.92198, p-value = 0.09507

> shapiro.test(b)

      Shapiro-Wilk normality test
data: b
W = 0.95986, p-value = 0.5134

> #
> #PRUEBA DE KOLMOGOROV SMIRNOV
> ks.test(x = a,"pnorm", mean(a), sd(a))

      Exact one-sample Kolmogorov-Smirnov test
data: a
D = 0.17521, p-value = 0.4857
alternative hypothesis: two-sided

> ks.test(x = b,"pnorm", mean(b), sd(b))

      Exact one-sample Kolmogorov-Smirnov test

```

```
data: b
D = 0.11743, p-value = 0.9022
alternative hypothesis: two-sided
```

```
> #
> # PRUEBA DE HOMOGENIDAD DE VARIANZA DE BARTLETT
> #
> bartlett.test(list(a,b))
```

Bartlett test of homogeneity of variances

```
data: list(a, b)
Bartlett's K-squared = 1.679, df = 1, p-value = 0.1951
```

```
> #
> ### PRUEBA DE T
> #
> t.test(x = a, y = b, alternative = "two.sided",
+        mu = 0, paired = TRUE, conf.level = 0.95)
```

Paired t-test

data: a and b

```
t = 6.0257, df = 20, p-value = 6.847e-06
alternative hypothesis: true mean difference is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 0.2292199 0.4719516
sample estimates:
mean difference
 0.3505857
```

```
> #
> # DISTANCIA DE COHEN
> library(effsize)
```

Attaching package: 'effsize'

The following object is masked from 'package:psych':

cohen.d

```
> cohen.d(d = a, f = b, paired = TRUE)
```

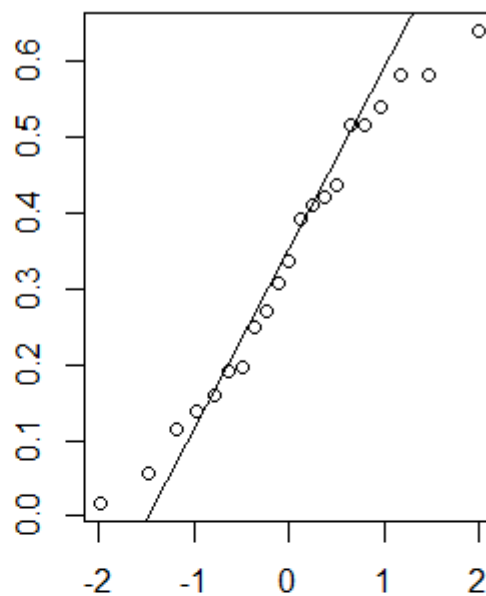
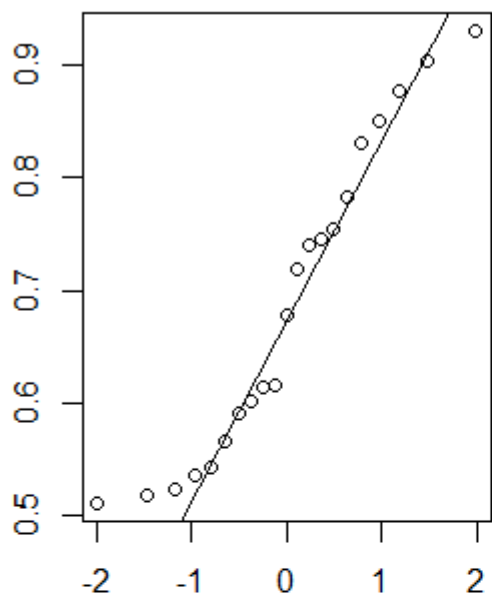
Cohen's d

```
d estimate: 2.146767 (large)
95 percent confidence interval:
  lower    upper
```

0.8378772 3.4556573

```
> #cohen.d(d = DATOS1$Ps_T_D, f = DATOS1$Ps_T_I, paired=TRUE)
> #cohen.d(d = a, b, paired = TRUE)
> #
```

, VITALIDAD E-N REFIGREDAD/ITALIDAD E-N CRIOPRESERVA



, VITALIDAD E-N REFIGREDAD/ITALIDAD E-N CRIOPRESERVA

