RESUMEN – TRABAJO DE GRADO

AUTORES	Zoo, Esp. Leonardo Andrés Molina Cabrales
FACULTAD	**Facultad de Ciencias Agrarias y del Ambiente**
PLAN DE ESTUDIOS	**Maestría en Producción Animal**
DIRECTOR	MSc. Johann Fernando Hoyos Patiño
CODIRECTOR	M.V.Z., PhD(c)-M.Sc-Esp. Norberto Villa Duque
TÍTULO DE LA TESIS	Evaluar el Efecto de la Criopreservación del Semen de Toros Chino Santandereano sobre la Calidad Seminal.
TITULO EN INGLES	Evaluate the Effect of Cryopreservation of Semen from Santandereano Chinese Bulls on Seminal Quality.

RESUMEN

La investigación evalúa el impacto de la criopreservación del semen de toros chino santandereano en su calidad seminal, preservando esta raza bovina amenazada. Obteniendo muestras de semen de 5 toros, mediante electroeyaculación tomadas en intervalos de 15 días. Dando resultados que criopreservación afecta la motilidad y viabilidad de los espermatozoides, mantienen valores aceptables usando los programas de inseminación artificial, lo que permite la conservación y aprovechamiento de la raza chino.

RESUMEN EN INGLES

The research evaluates the impact of cryopreservation of semen from Santander Chinese bulls on their semen quality, preserving this endangered bovine breed. Semen samples from 5 bulls were obtained by electroejaculation taken at 15-day intervals. The results showed that cryopreservation affects the motility and viability of the spermatozoa, maintaining acceptable values using artificial insemination programs, which allows the conservation and use of the Chinese breed.

PALABRAS CLAVES	Semen bovino, Electoeyaculacion, Biotecnología reproductiva, Calidad seminal Motilidad y Vitalidad.
PALABRAS CLAVES EN INGLES	Bovine semen, Electoejaculation, Reproductive biotechnology, Semen quality, Motility and Vitality.

CARACTERÍSTICAS

PÁGINAS: 101	PLANOS:	ILUSTRACIONES: 22	CD-ROM:

Evaluar el Efecto de la Criopreservación del Semen de Toros Chino Santandereano sobre la Calidad Seminal.

Zoo, Esp. Leonardo Andrés Molina Cabrales

Facultad de Ciencias Agrarias y del Ambiente, Universidad Francisco de Paula Santander Ocaña

Maestría en Producción Animal

MSc. Johann Fernando Hoyos Patiño

M.V.Z., PhD(c)-M.Sc-Esp. Norberto Villa Duque

9 Mayo de 2024

Dedicatoria

A Dios por el don de la vida y permitir que culminara con satisfacción la maestría en producción animal, por darme la sabiduría necesaria para afrontar los obstáculos e inconvenientes presentados, por la salud que diariamente nos regala.

A mi esposa Lauren Yelitza Amaya Angarita, por su compañía incondicional permanente, a mis hijos Samuel Andrés Molina Amaya y Andrés Felipe Molina Amaya, que son el motor de mi vida y fuente de inspiración para alcanzar las metas y objetivos propuestos. Los amo mucho. A la memoria de mis padres, Eduardo Molina y Rebeca Cabrales Roca, por toda la dedicación, motivación, consejos, enseñanzas, valores inculcados, por los esfuerzos y sacrificios realizados, eternamente esteré agradecido.

A los familiares, compañeros y amigos que siempre estuvieron presentes durante este proceso, buscando soluciones para cumplir este objetivo.

Agradecimientos

A la Universidad Francisco de Paula Santander seccional Ocaña, en especial a los profesores del programa de la maestría en producción animal adscrito a la facultad de ciencias agrarias y del ambiente, por toda su dedicación y motivación en los semestres desarrollados.

Al director del trabajo de grado el profesor Msc. Johann Fernando Hoyos Patiño, quien estuvo pendiente durante el desarrollo del trabajo. Al Dr. Msc Norberto Villa Duque, por toda la colaboración y dedicación prestada durante la elaboración y desarrollo del trabajo de grado.

Leonardo Andrés Molina Cabrales.

Índice

Introducción 11

Capítulo 1. Evaluar el Efecto de la Criopreservación del Semen de Toros Chino Santandereano Sobre la Calidad Seminal. 16

1.1 Planteamiento del problema 16

1.2 Formulación del problema 19

1.3 Objetivos 19

1.3.1 Objetivo general 20

1.3.2 Objetivos específicos 20

1.4 Justificación 20

1.5 Delimitaciones 23

1.5.1 Operativa 23

1.5.2 Conceptual 24

1.5.3 Geográfica 25

1.5.4 Temporal 25

Capítulo 2. Marco referencial 26

2.1 Marco histórico 26

2.2 Marco Conceptual 32

2.2.1 Crio preservación 32

2.2.2 Biotecnología reproductiva 32

2.2.3 Semen bovino 33

2.2.4 Calidad seminal 33

2.2.5 Chino Santandereano 33

2.3 Marco teórico 33

2.3.1 Sistema Reproductor del Macho Bovino 34

2.3.2 Valoración de la Actitud Reproductora del Toro (EAR) 36

2.3.3 Colecta y Evaluación del Material Seminal. 38

2.3.4 Evaluación Macroscópica del Semen 40

2.3.5 Evaluación Microscópica del Semen Bovino 41

2.3.4 Criopreservación Seminal 46

2.4 Marco Legal 47

Capítulo 3. Diseño metodológico 49

3.1 Diseño Metodológico 49

3.2 Lugar de Estudio 50

3.3 Obtención y Evaluación del Semen 50

3.4 Métodos de recolección de los datos 52

3.5 Diseño Estadístico 54

3.6 Protocolo del Laboratorio 54

3.6.1 Protocolo para Motilidad 54

3.6.2 Protocolo vitalidad (supervivencia-vivos y muertos). 55

3.6.3 Protocolo Espermatozoides Funcionalmente Competentes (EFC) 55

3.6.4 Motilidad de espermatozoides. 56

3.6.5 Supervivencia. 56

3.6.6 Espermatozoides Funcionalmente Competentes (Efc). 56

Capítulo 4. Resultados y Discusión 58

Capítulo 5. Conclusiones 80

Capítulo 6. Recomendaciones 81

Referencias 82

Apéndices 98

Lista de tablas

Tabla 1 Evaluación macroscópica de semen bovino 40

Tabla 2 Evaluación microscópica del semen bovino 45

Tabla 3 Análisis de los espermatozoides en semen fresco 59

Tabla 4 Análisis de los espermatozoides congelados y descongelados 61

Tabla 5 Análisis de motilidad para el semen fresco y congelado/descongelado 62

Tabla 6 Análisis de vitalidad para el semen fresco y congelado/descongelado. 64

Tabla 7 Resultados de los espermatozoides funcionalmente competentes (EFC) del semen de toros chino santandereano. 67

Lista de figuras

Figura 1 Sistema reproductor del toro 34

Figura 2 Medición de la circunferencia escrotal 37

Figura 3 37

Figura 4 Electroeyaculador 39

Figura 5 Vagina artificial 40

Figura 6 Muestra seminal 41

Figura 7 Morfología de un espermatozoide bovino 42

Figura 8 Antonie van Leeuwenhoek y un ejemplo de sus microscopios con lentes de mano. 43

Figura 9 Valoración espermática 44

Figura 10 Sistema computarizado de análisis seminal (CASA) 45

Figura 11 Ubicación UNIPAZ 50

Figura 12 Toro chino santandereano 51

Figura 13 Colecta de semen de toro chino santandereano, utilizando electroeyaculador 51

Figura 14 Sistema computarizado para análisis seminal (CASA) 52

Figura 15 Registro de datos sobre la motilidad general 53

Figura 16 Registro de datos sobre la vitalidad 53

Figura 17 Registro de datos sobre la motilidad general 54

Figura 18 Prueba t para datos de dos muestras emparejadas 63

Figura 19 Prueba t para medias de dos muestras emparejadas 66

Figura 20 68

Figura 21 Resultado del análisis macro y microscópico de los eyaculados 72

Figura 22 Resultados del análisis microscópico del semen diluido..... 73

Lista de apéndices

Apéndice A Cronograma de actividades..... 98

Apéndice B Presupuesto desarrollo del proyecto 99

Introducción

Tal como lo describen Aguilar Ávila, et al. (2020), el sector ganadero y agroalimentario es un sector estratégico global. Proporciona productos básicos para la canasta familiar (leche y carne) que satisfacen los requerimientos básicos de las personas, por lo que representa una importancia estratégica en la economía mundial incuestionable. Según Saad, et al. (2009), se espera que la demanda de víveres en los países en vía de desarrollo aumente aproximadamente un 2,6% anual, debido principalmente a los cambios demográficos (Bonomie Sánchez & Meleán Romero, 2016).

La producción ganadera bovina es una actividad que se desarrolla en todo el territorio Colombiano constituyendo uno de los principales ingreso de economía en el país, beneficiando a muchas familias involucradas en esta actividad, especialmente para el incremento y desarrollo del sector agropecuario de nuestro país; sin embargo, en algunos casos la producción ganadera bovina no es planificada y en ocasiones se convierte incompatible con el modelo productivo (Palacios Lozano, M. T., et.al., 2019). Sin embargo, existen sistemas de producción bovina con excelentes resultados, siendo sostenibles y sustentables.

Cabe señalar, que los sistemas de producción bovina en Colombia son muy importantes, generando muchos empleos en el sector rural de la nación, convirtiéndose así en un unión importante en la creación de desarrollo social en el sector agropecuario; la difícil situación de los últimos años afectó directamente el crecimiento y el sustento de los sistemas de productivos ganaderos del país; se debe implementar nuevas estrategias de producción para mejorar estos indicadores, teniendo en cuenta que Colombia tienen una ubicación geográfica

estratégica al tener acceso a los dos océanos y cuenta con condiciones agropecuarias privilegiadas que le permiten tener disponibilidad de gramíneas durante todo el año. Estas condiciones y características permitirán que Colombia sea un referente en la producción bovina global (Hernández, et al., 2019).

Según Franganillo, & Serrano (2020), la raza de ganado criollo creada en Colombia es el resultado del extenso proceso de escoger los mejores animales comenzando después de que Cristóbal Colón introdujera ganado de razas locales españolas en 1493. La raza Chino Santandereano proceden de los linajes ibéricos en ciertos rangos distribución (mayor a menor), se destacan las que han sido importadas: Galicia, Pirenaica y Tudanca; además se formaron otros ganados, como el casanareño de los Llanos Orientales, distinguido como limonero-venezolano, y de la Costa Atlántica el costeño con cuernos (Ruiz Castro 2014).

Para Parra Vanegas, 2022, la lista de Colombia incluye diez razas de ganado criollo que se destacan por su adaptabilidad, lo que se refleja en su eficiencia reproductiva. Se sabe que algunas vacas criollas tienen potencial lechero, se evidencia en los parámetros de otras razas introducidas al país.

Ahora bien, el ganado bovino chino Santandereanos se caracteriza por una constitución fuerte y saludable, habiéndose adaptado a las regiones montañosas donde habitan, temperaturas altas, no muestran síntomas de estrés por calor debido a la resistencia que ha tenido esta raza, presenta buenas características reproductivas, fisiológicas y productivas (Varga, 2001).

La conservación del Chino Santandereano necesita establecer programas que preserven esta raza incluyan técnicas de biotecnología reproductiva evitando la extinción de esta especie y que puedan ser utilizados para apoyar más adelante proyectos de seguridad alimentaria y sustentabilidad reproductiva. En Colombia existen muy pocos estudios sobre la raza chino santandereano, lo que inspiro el estudio y consultas relacionadas con la fisiología reproductiva y el comportamiento de diferentes tecnologías de fecundación artificial que permiten la preservación y conservación de gametos (espermatozoides y óvulos) y/o embriones (Vega & Narváez, 2021).

Además, Colombia es un país que está muy interesado en construir un desarrollo sostenible y sustentable; no sólo cumple con la gran responsabilidad de ser el segundo país con mayor biodiversidad del mundo y sus irreemplazables recursos hídricos que privilegian nuestro país, sino también con el impacto del escenario internacional que ha llevado a la agenda pública, incluida una de las preocupaciones creadas por la Comisión Brundtland, sobre la creciente degradación del planeta, sobre la consiguiente pérdida del bienestar humano, equilibrio natural entre otros. Lo cual se ha enfatizado desde 1991 con la adopción del perfil ecológico de la constitución política, que refleja los avances de las décadas anteriores, con la aprobación de la Ley N° 23 de 1973, en el artículo 19 autorizando al presidente de la República a otorgar un año después el Decreto 2811 de 1974 o Ley de Recursos Naturales Renovables y Protección al Ambiente (Palacios-Lozano, M. T., et.al., 2019).

De la misma forma, Colombia ha avanzado en la introducción de técnicas empleadas en la reproducción animal a través de la biotecnología reproductiva, un esfuerzo conjunto con organismos gubernamentales como el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, la

Federación de Ganaderos de Colombia (FEDEGAN) y el Instituto Colombiano de Agricultura (ICA), esto en un trabajo conjunto con los ganaderos colombianos y el fondo ganadero, quienes son los más interesados en mejorar la ganadería y que sea cada vez más sostenible y sustentable (Cadena Gordillo, 2023). La criopreservación busca estabilizar las células espermáticas a temperaturas criogénicas (-196 ºC), donde cesa la acción metabólica y permite su conservación por un tiempo indefinido, pudiendo emplear en los diferentes programas de reproducción de manera asistida (Montoya Páez, et al., 2020).

La técnica de la inseminación artificial (IA) es un instrumento biotecnológico que promueve mejorar la genética, conservar las razas y beneficiar económicamente a las ganaderías bovinas, empleando alto valor genético con toros probados previamente (Salgado Otero, et al, 2015).

Por tal motivo, Colombia se ha destacado en la realización de los análisis de fertilidad de los toros, debido a la importancia que tienen los machos en relación con las hembras bovinas, estimando un macho para 25 hembras, estas pruebas son importantes porque a través de ellas nos permite conocer las fortalezas y debilidades del animal (Acevedo Centeno, 2020).

Históricamente se ha intentado describir las pautas biológicas que deciden si los animales son idóneos para la reproducción, evaluando la calidad seminal aplicando diferentes biotecnologías reproductivas empleadas en los diferentes sistemas de producción bovina, como la IA, optimizando la producción de dosis de esperma a partir de la eyaculación (Valverde, A., 2021). El propósito del análisis de semen es predecir el nivel de fertilidad de una muestra con cierto grado de confianza; sin embargo, como la fecundidad es multifactorial, esta pregunta es

compleja y tiene múltiples respuestas (Valverde & Madrigal, 2018). Por tal motivo se requiere de estudios de fertilidad espermática de semen congelado y descongelado para determinar cómo se emplea en programas de IA y de esta manera mejorar la natalidad de muchas ganaderías incluyendo la raza chino santandereano.

Capítulo 1. Evaluar el Efecto de la Criopreservación del Semen de Toros Chino Santandereano Sobre la Calidad Seminal.

1.1 Planteamiento del problema

En Colombia, el ganado criollo existió durante varios años después del descubrimiento de América, cuando se importaron los primeros animales desde la Península Ibérica y se inició un largo proceso de adaptación al medio y características topográficas del país, desarrollando rusticidad y resistencia; permaneciendo por mucho tiempo en los sistemas de producción animal bovina (Gómez Parra, 2023).

Los biotipos genéticos resultantes de esta adaptación en Colombia son: Romosinuano, Chino Santandereano, Harton del Valle, San Martinero, Caqueteño, Blanco Orejinegro (BON). y Casanareño Costeño con Cuernos Cabe señalar que existen diferencias significativas entre cada raza, ya que provienen de razas diferentes y se han adaptado a zonas geográficas con características diferentes, existiendo similitudes en algunas razas, como el romosinuano y el costeño con cuernos o el caqueteño y el BON, a pesar de que su pelaje es diferente, pero tienen una estructura similar, mientras que otras razas como Caqueteño y Romosinuano tienen diferencias significativas. La ganadería colombiana se desarrolló durante el siglo pasado con la introducción de un sistema de cruce de razas especiales de otros países con el cebú, que, con excepción de la raza criolla colombiana, provocó una disminución significativa de animales de la raza criolla (Gómez Parra, 2023).

Según los criterios de la FAO, las razas chino santandereano y costeño con cuerno están en riesgo de extinción debido a que su tamaño poblacional real (Ne) es demasiado pequeño y con ello evitar la pérdida de variación genética por consanguinidad; otras razas están en un estado vulnerable (Franganillo, & Serrano, 2020). De las razas criollas existentes en Colombia la Chino Santandereano, ha sido paciente en su largo proceso de adaptación por más de 500 años a las condiciones climáticas colombianas. A pesar de presentar muchas ventajas productivas, la raza ha sido reemplazada por otras razas de ganado bovino y está en peligro de extinción (Ocampo Gallego, et al., 2021).

Inclusive, en Colombia se aplican varias biotecnologías reproductivas bovinas entre las cuales se puede mencionar, la inseminación artificial (I.A.), esta técnica se convierte en una alternativa que permite conservar las razas criollas en Colombia, conformando bancos de germoplasma y programas de mejoramiento genético para dar un mayor usos a estas razas criollas, por tal motivo la criopreservación es una opción para el fomento de estas razas el cual se debe evaluar los procesos de criopreservación para determinar que tanto afecta la calidad seminal (Chicaiza Cuzco & Patricio, 2022)

Por lo mismo, la criopreservación es actualmente uno de los métodos más eficaces para almacenar células germinales masculinas de las especies de interés zootécnico, beneficiando los a cada uno de los sistemas productivos y siendo el método más eficaz logrando la seguridad sanitaria y reducir el riesgo de brotes de enfermedades; sin embargo, se deben comprender detenidamente todos los aspectos que están relacionados con esta tecnología reproductiva y las implicaciones y afectaciones que pueden tener los espermatozoides (Barragán Barragán, 2022).

Para Valdez Torres (2018), la criopreservación de esperma implica varios pasos generales, que incluyen: dilución, crioprotección, refrigeración y congelación, la descongelación y almacenamiento, afectando la función y estructura de los espermatozoides; mientras que, para García Elizondo, (2023), argumenta que el proceso de criopreservación puede dañar los espermatozoides, lo que puede causar disminución de la productividad. Hay varias opiniones sobre la forma de uso de la criopreservación de semen y ase de datos pero muy fragmentada, debido a los protocolos tienen muchas variaciones para diferentes especies y para cada especie, tanto en metodología como en materiales (Díaz Duque & López Castaño, 2018).

Para Bonilla Riera, (2000), aunque el esperma bovino se describe como uno de los más estables criogénicamente entre los animales domésticos, se observó una disminución significativa en su capacidad fertilizadora después de la congelación; mientras que Silva Silveira, (2019), argumentaron que a pesar del uso práctico de la criopreservación en la zona reproductiva, la criopreservación puede causar cambios indeseables en la estructura de las grasas en la membrana, la motilidad espermática y el estado del acrosoma debido al compartimento espermatogénico, ocasionando daño irreversible a los niveles estructurales y funcionales de los espermatozoides (Montoya-Páez et al., 2020). La temperatura utilizada para descongelar el material seminal es de suma importancia pudiendo ocasionar daño estructural y alterar la función de los espermatozoides (Zenteno, et al., 2023).

Para Clavijo Echeverri, (2012), el uso de esperma congelado tiene muchas ventajas, como la conservación indefinida del material genético y un cómodo transporte. No obstante, la calidad del esperma fluctúa entre especies y dentro de la misma especie después de cada etapa

del proceso de congelación y descongelación, lo que complica la aplicación de procedimientos estándar para diluir, centrifugar y reconstituir los pellets, en este proceso el entorno para la congelación, envasado, congelación y descongelación del esperma después de cada proceso varía dentro de las especies y sujetos de la misma variedad, lo que dificulta el uso para el proceso de congelación para la dilución, centrifugación resuspensión de la pajilla, envasado, congelación y descongelación del esperma.

Por otro lado, Salazar Caraballo, (2016), argumenta que la criopreservación puede hacer que los espermatozoides reproductivos estén disponibles para programas de biotecnología reproductiva, pero la capacidad fertilizadora de los espermatozoides que fueron congelados y descongelados, viéndose comprometida dado a cambios estructurales y fisiológicos. En este orden de ideas se propone investigar el efecto que tiene la criopreservación en el material seminal de 5 toros chino santandereano en la institución universitario La Paz UNIPAZ - Barrancabermeja, para el cual se van a comparar valores de semen fresco vs el material seminal congelado – descongelado y con ello determinar la fertilidad, después de haber sido preservado.

1.2 Formulación del problema

¿Cuál es el efecto de la criopreservación del semen de toros chino santandereano sobre la calidad seminal?

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la criopreservación del semen de toros chino santandereano sobre la calidad seminal.

1.3.2 Objetivos específicos

Valorar el efecto de la criopreservación sobre la vitalidad del semen de toros chino santandereano.

Estimar el efecto de la criopreservación sobre la motilidad del semen de toros chino santandereano.

Determinar el efecto de la criopreservación sobre los espermatozoides funcionalmente competentes (EFC) del semen de toros chino santandereano.

1.4 Justificación

En las últimas dos décadas, Colombia ha experimentado avances significativos en la conservación de sus recursos zoogenéticos locales, especialmente de las razas bovinas que son fundamentales para la agricultura y la alimentación. Inicialmente, el objetivo principal era rescatar razas de animales en peligro de extinción, especialmente bovinos, cerdos y ovinos, con el fin de establecer núcleos genéticos puros que posibilitaran la implementación de programas para su preservación y protección. En la actualidad, gracias al respaldo del gobierno colombiano, estos animales se encuentran alojados en centros de AGROSAVIA, donde se aplican sistemas de conservación in vivo e in vitro. Desde el principio, la estrategia para preservar y conservar estos

núcleos genéticos ha estado enfocada en mantener la variación genética de las razas (criollas) y en el desarrollo de estrategias que contribuyan a su conservación, caracterización, promoción y utilización en diversos sistemas de producción animal. Esto se hace teniendo en cuenta desafíos como el incremento de los sistemas ganaderos, cambio climático y el impacto en el ambiente y los costos asociados con el mantenimiento del Banco de Germoplasma Animal en Colombia (Jiménez, et al., 2021).

Colombia como país productor a gran escala agropecuario, tiene gran responsabilidad de conservar las razas criollas colombinas evitando que este recurso genético desaparezca de los sistemas de producción bovina, implementando técnicas apropiadas para su conservación y con ello garantizar la sostenibilidad y viabilidad de los sistemas agropecuarios (Martínez Correal, 2004).

Se supone que esta raza aparece en una zona con capacidad para la producción lechera y cárnica, pero la cantidad de animales puros está disminuyendo (Chino santandereano), lo que incentivo la creación de ASOCHINO (Asociación de Criadores de Ganado Chino Santandereano), iniciando investigaciones que identifican las fortalezas y ventajas de esta raza, con la finalidad de aumentar el beneficio en los ganaderos por llevar esta raza a las fincas y así generar un crecimiento en el número de cabezas de ganado evitando su extinción (Parra Vanegas, 2022).

La IA es definida como la biotecnología reproductiva que permite la deposición seminal en el aparato reproductivo de la hembra en el momento correcto, con el fin de lograr el éxito de la fertilización del ovulo con el espermatozoide (García, & Orellana, 2020). Los

programas de inseminación artificial han demostrado que su uso presenta muchas ventajas como prevención de enfermedades venéreas, mejoramiento de genético, uso de animales sobresalientes, mejorar parámetros productivos, evitar genes indeseables, conservación de razas, mejorar la rentabilidad entre otros (Giraldo Giraldo, 2019).

Además, la inseminación artificial es un sistema que permite el avance en la mejora genética del ganado, siempre que se tomen las decisiones adecuadas, según la finalidad. Al aplicar esta tecnología, es posible utilizar de manera más eficiente el semen de los machos que han sido evaluados y aprobados para la cría de ganado, y se puede utilizar el eyaculado de estos toros en un gran número de vacas, las cuales deben ser valoradas y evaluadas por el personal capacitado e idóneo (Carrillo González, 2021).

La preservación del esperma es uno de los avances más importante en la reproducción, contribuyendo al desarrollo de biotecnologías reproductivas básicas como la IA. La preservación del esperma bovino, está avanzando rápidamente con el desarrollo de nuevos solventes y protocolos de crio conservación para mantener la fertilidad adecuada en razas y sistemas de producción de ganado en peligro de extinción (Carrillo González, 2021); la criopreservación contribuye al mantenimiento de la genética y el aumento del almacenamiento seminal de aquellas razas de interés zootécnico (Chicaiza Cuzco & Patricio, 2022); mientras Parra Vanegas, E., (2022), considera que la valoración seminal, la calidad seminal de los bovinos dependerá primordialmente de suficientes espermatozoides normales y funcionalmente competentes (González, & Trujillo, 2018).

Para el desarrollo de determinadas biotecnologías reproductivas, es importante utilizar espermatozoides óptimos; siendo de gran importancia conocer que tan viables son los

espermatozoides desde su morfología has las propiedades que integran el ADN (Restrepo Guzmán,et al., 2023).

Por último, continuar consultando e investigando sobre estos temas relacionados con la biotecnología reproductiva bovina, servirá para buscar alternativas que eviten que las razas criollas desaparezcan, se debe continuar con estos esfuerzos para contribuir desde la academia e investigación mejorar los procesos de criopreservación del semen bovino, optimizando el uso de los reproductores, para este caso la raza chino santandereano; y con ello incentivar, motivar, realizar cruces entre otros, que promuevan el uso de este recurso genético.

1.5 Delimitaciones

1.5.1 Operativa

En este estudio, se pretende recopilar datos objetivos y precisos de la eficacia seminal de los toros chino santandereano, luego de ser criopreservados. Al describir estas características, se espera obtener valiosa información que contribuya a comprender mejor la reproducción de esta raza y sus posibles implicaciones de mejorar los genes y la reproducción asistida. El enfoque descriptivo permitirá recopilar datos observacionales y medibles sobre la calidad seminal, sin intervenir o manipular activamente las variables. Esto brinda la oportunidad de obtener una imagen realista y precisa de cómo se presenta la calidad seminal de los toros chino santandereano.

1.5.2 Conceptual

Para el desarrollo del estudio fue de gran importancia tener claro los conceptos relacionados con la criopreservación de semen bovino, dependiendo de estos se tendrá mayor claridad del tema.

Crio preservación. Técnica que consiste en preservar material biológico (células, tejidos, material seminal u órganos) a temperaturas adecuadas (-196°C) , en medios como el nitrógeno de forma líquida, manteniendo si viabilidad (Suleiman Martos, et al., 2022).

Biotecnología reproductiva. Conjunto de metodologías como la IA o la duplicación de genes, aumentando la eficiencia en la reproducción de los animales, estas herramientas pueden aplicar la transgénesis (Ugalde, 2014).

Semen bovino. Es el eyaculado del toro que presenta aspectos de gran importancia en la viabilidad de un toro, siendo esto incluido en la evaluación del productiva del mismo. La cantidad de semen depende de la fisiología del animal, raza, edad, numero de montas y métodos de recolección (Larocca, & Filipiak, 2017).

Calidad seminal. Es la valoración que certifica que la aptitud reproductiva del macho, evaluando la motilidad, morfología, viabilidad de los espermatozoides, asi como también la concentración, el volumen y el aspecto del líquido seminal (Lozano, 2009).

Chino Santandereano. Es la raza criolla bovina que presenta características especiales por las cuales destaca, pelaje colorado o bayo anaranjado, por tener una contextura con vigor fuerte y excelente adaptabilidad (Vargas, 2001).

1.5.3 Geográfica

La investigación se desarrollará en el instituto universitario La Paz UNIPAZ, ubicada en Km 14 vía Barrancabermeja - Bucaramanga – Santander, Centro de Investigaciones Santa Lucía, con una temperatura promedio de 28° - 35°C, con un promedio de 212 militros de lluvia, H° relativa de 83%, 75 m.s.n.m y un ecosistema tropical.

1.5.4 Temporal

El trabajo se desarrollará en un lapso de tres meses, luego de aprobada la propuesta abarcando la composición del documento final.

Capítulo 2. Marco referencial

2.1 Marco histórico

Se espera que la ganadería bovina en los países poco desarrollados incremente a causa del crecimiento de la población y así llenar la demanda que intensifica la producción pecuaria, que dependiendo de un numero de razas que puedan dar altos resultados, como en el caso de Colombia, donde sólo dos grupos raciales, Cebú y Holstein, son los más altos y los más utilizados en los sistemas de producción bovina y han desplazado a las razas bovinas criollas disminuyendo su número poblacional. Diferentes entidades del gobierno trabajan en equipo para tomar medidas prioritarias en cuanto a las razas criollas para emplear y conservar mejor la amplia gama de razas que tiene el país (Anzola, 2005).

Según lo documenta Ortega Torres & García (2010), se distingue en el país 7 razas criollas colombianas, ROM (Romosinuana), CH (Chino Santandereano), SM (San Martinera), CCC (Costeño con cuernos) HV, (Hartón del Valle), CAS (Casanareño) y BON (Blanco Orejinegro, adaptados a las condiciones del medio ambiente y derivados de los animales originarios de los islotes españoles de la Gomera, que fueron traídos al continente durante el viaje número dos de Cristóbal Colón alrededor de 1493.

La conservación de los criollos (razas) en Colombia, es importante dado que en los sistemas ganaderos bovinos genera recursos genéticos para identificar germoplasma y su viabilidad; además, pueden mantenerse con una nutrición baja en nutrientes, capaces de soportar condiciones climáticas desfavorables con mayor eficacia y presentan una mayor capacidad para

resistir parásitos y enfermedades infecciosas reproductivas; también son una fuente de genes específicos que se utilizan para mejorar la salud animal y seleccionar animales para sistemas ganaderos sostenibles; el mejoramiento de las razas criollas y colombianas es importante porque un animal genéticamente adaptado a su entorno puede producir el máximo al menor costo y es sustentable en el largo plazo (Anzola, 2005).

El uso de las biotecnologías reproductivas en los sistemas de ganado bovino en Colombia ha contribuido a mejorar estos sistemas, los tipos de producción que se manejan en el país (leche o carne), su empleo cada vez se perfecciona día tras día, trayendo consigo múltiples ventajas en el ámbito productivo, económico y sostenible.

Las modernas técnicas de reproducción animal de interés zootécnico, cuya eficacia ha ido aumentando paulatinamente en los últimos tiempos , mejoraran (IA, sincronización hormonal del ciclo estral, transferencia de embriones, fecundación in vitro y asistida, entre otros.), son tecncas importantes para continuar con los nuevos avances de la investigación en temas relacionas con la modificación genética, conservación de embriones, conservación de células germinales entre otras (Gibbons, et al., 2014).

Técnicas básicas como la ecografía, el análisis de esperma y la IA se utilizan en los hatos ganadero desde hace décadas. La inclusión de IATF en todo el sistema de producción ganadera o en grupos específicos de animales trae varias ventajas, como una gestión de la reproducción más tecnificada y controlada. Permite llevar genética superior a la granja a un costo menor; promueve una recuperación más rápida de la función ovárica después del parto; acorta el intervalo entre nacimientos, mediante el uso de esperma probado ayuda a erradicar las enfermedades de

transmisión sexual que pueden ocurrir en los sistemas de producción; todo ello sin duda mejorará la tasa de natalidad. Por otro lado, la transferencia de embriones es muy útil, por ejemplo, para aumentar el rigor de elección en programas de mejoramiento genetico (Sanz Pascua, 2021).

El estudio analiza el proceso de criopreservación del esperma bovino a -196 °C, seguido de su descongelación y aplicación en 32 granjas ganaderas en el centro de Colombia. Se examinaron los efectos de los desaciertos encontrados en la autenticidad de la membrana y la forma del esperma en un entorno in vitro. La recopilación de datos en las fincas se llevó a cabo utilizando un formulario diseñado específicamente para este propósito. La investigación del manejo in vitro se realizó en la Institución de Biotecnología Agrícola en la Universidad de Caldas (Colombia) y se basó en pajitas de 0,5 ml (30 x 10 epzs) en toros Pardo Suizo Holstein y Jersey en el metodo convencional y sus 5 variaciones (los errores más comunes) con arreglo factorial 6 x 3 (diseño completamente al azar). La inseminación artificial no se aplicó correctamente en algunas de las fincas evaluadas, los errores más comunes fueron: daño a la distribución externa de los contenedores y escenarios inadecuadas de almacenamiento, sostener la pajuela en la canasta y manipular la pajilla fuera del cuello del contenedor, descongelar la pajilla debajo del brazo, en agua enfriada y en agua no apta para la técnica. La relación genotipo x técnica del instrumento afectó la integridad del acrosoma (lAs) y la integración estructural de la membrana del esperma (IEM) tuvo afectación del $P< 0,05,$ por el genotipo y método. La tenacidad de la membrana espermática tuvo afectación (P< 0,01). Los valores inferiores de integridad y durabilidad de la membrana pertenecieron al líquido seminal al Pardo Suizo descongelado debajo del brazo (axila) y almacenado en una baja concentración de nitrógeno líquido. Aunque la cantidad de gotitas citoplasmáticas y colas en latigo dio como resultado $P<$

7% y P< 11,3%, siendo más altos de lo que se esperaba, el porcentaje de espermas normales siempre fue por encima del 70%, indicando que de los factores evaluados ninguno tuvo un efecto decisivo en la morfología del espermatozoide (Villa Duque, et al., 2016).

Se realizó un estudio con el propósito de investigar cómo 2 disolvente comerciales, el estado sexual y la edad de los toros, influyen en el movimiento y la cinética del semen fresco de bovinos. La investigación se desarrolló entre marzo y agosto de 2021 de las fincas ganaderas en la "La Balsa" y "La Vega" en San Ramón y San Carlos de Costa Rica. Se obtuvieron un total de 45 eyaculados de 13 toros mediante un electroeyaculador, entre dos y cinco muestras por animal. Los diluyentes comerciales utilizados fueron Optixcell® y Bioxcell®, y la dilución se realizó a 37 °C. Se empleó el Sistema Computarizado de Análisis Seminal (CASA)-Mot ISAS®v1, el dispositivo de video para cálculo espermática que puede reutilizarse (Spermtrack®), con una profundidad (μm) de 20 para analizar las muestras. Encontrando diferencias de significancia (P< 0,05) en el movimiento y la dinámica espermática, medidas de la cinética espermática, dependiendo del tipo de diluyente utilizado.

El uso de Bioxcell® se asoció con un gran movimiento (64,03±2,01%) al compáralo con el Optixcell®. El eyaculado que se diluyo con Bioxcell® se encontró un modelo cinemático más directo y creciente en comparación con los disueltos con Optixcell®; estos últimos mostraron valores más bajos de velocidad e índices en la parte de rectitud con VAP=106 - 67±0,24 μm s -1 y STR=79 - 35±0,10%. La edad, no tuvo variabilidad significativa en el total del movimiento, aunque la movilidad progresiva estuvo alta en animales mayores de 192 semanas con 62,27 ± 1,87%. El estado sexual en el transcurso de la monta se registró un aumento en la velocidad,

oscilación y linealidad de los espermas en comparación con los toros en reposo sexual (Araya et al., 2023).

El estudio tuvo como propósito examinar la eficacia de congelar el semen bovino utilizando CL-8800 (congelador programable) y un diluyente compuesto por ácido cítrico (1,8%), glicerol (7%), yema de huevo (20%), fructosa (1,0%) y Tris (2,42%). Se seleccionaron toros de la raza Sanmartinero, maduros sexualmente y sanos, como donantes de semen. Los espermatozoides obtenidos mediante electroeyaculación, posteriormente se mantuvieron a una temperatura de 36°C y se evaluaron tanto macroscópica como microscópicamente. Aquellas muestras que mostraron más del 80% de movilidad en masa fueron combinadas con el diluente en 2 fracciones de la siguiente manera: la fracción A se mantuvo a 36 °C (1:1), mientras que la fracción B (Glicerizada) que se mantuvo a 20 °C relación 1:1; esta última fue dividida en tres alícuotas con un intervalo de 15 minutos.

Al envasar el semen en pajuelas de 0,5 ml y criopreservado, las pajuelas se trasladaron al termo de almacenamiento a temperaturas bajas (-196 °C) hasta el día del estudio. Para determinar la motilidad individual y su velocidad, las pajuelas se descongelaron en un baño maría de 36 °C durante sesenta segundos, evaluándose en sistemas asistidos computarizados (CASA). Se examinó motilidad masiva y viabilidad del esperma fresco sin diluir, así como durante el tiempo de criopreservación y descongelación. La curva de congelamiento reveló una velocidad total de 4,9 °C en un 1 min desde 20 °C a los -70 °C. Respecto a la motilidad de los espermatozoides individuales, mostrándose diferencia significativa en todas las variables ($P < 0,05$), *comparado* con semen recién eyaculado, menos la motilidad progresiva directa y la motilidad circular. La motilidad de la masa no experimentó cambios significativos durante la

dilución y estabilización con valores de 88,0 ± 1,2% y 80,0 ± 1,5%, solo afectó por el almacenamiento en frío 40,0 % con desviación estándar de 1,5%. Los resultados generales a partir del semen bovino criopreservado en el congelador utilizado (programable) se consideraron aceptables para la especie; sin embargo, el porcentaje de congelación y descongelación aún no ha sido modificada (Medina Robles et al., 2007).

La investigación hecha por MontoyaPáez et al., (2020) en la que estimo 3 concentraciones de yemas centrifugadas (YHC). en un diluente de forma comercial de esperma bovino, el eyaculado de 4 toros a través de la electroeyaculación y vagina artificial, se dividieron en tres partes los espermatozoides añadiendo un 30%, 20% y 10% con YHC, el esperma se congeló en pajitas de 0,5 ml, evaluando los parámetros motilidad total (MT) y progresivas (MP), viabilidad (VE), integridad de la membrana (IM) y morfología anormal (MA) en espermatozoides que fueron descongelados. Se realizo un análisis estadístico ajustando modelos lineales generales (GLM) y comparando medias mediante la prueba de Tukey; en el cual no evidenciaron diferencias significativas entre los tratamientos , VE, MA, IM y MT, por otro lado se encontraron diferencias en las velocidades lineales (VSL), curvilíneas (VCL) y promedio (VAP) cuando se agregó 10% de YHC en comparación con el 30% y 20% de YHC *(P < 0,05)* , concluyendo que el uso de YHC al 10% en la criopreservación de esperma, ayuda en el mejoramiento de la velocidad del esperma y facilita la preparación del diluente utilizado para la criopreservación.

Varela et al., (2020), en su evaluación de los parámetros convencionales y computarizados en la calidad del semen utilizando la citometría en material seminal bovino

criopreservado. Se recolectó material seminal de 10 eyaculados de cinco toros y posteriormente se congeló, en que analizó la movilidad de totalidad (MT), la velocidad media (VAP), la velocidad de linea (VSL), la velocidad curva - lineal (VCL), y la movilidad progresiva (MP) del semen descongelado mediante SCA®; la vitalidad del esperma (VE), la morfología normal (MN) y la funcional de la membrana a través de teñir con eosina-nigrosina y la cata hipoosmótica (HOST). La citometría de flujo evaluó la estabilidad de la membrana a través de sondas y la potencia de membrana mitocondrial (ΔψM), llegando a conclusión que la acción mitocondrial y la permanencia de la membrana, medidas mediante citometría de flujo, están asociadas con el recuento de espermatozoides y la calidad del esperma bovino criopreservado evaluada mediante métodos convencionales y computarizados.

2.2 Marco Conceptual

2.2.1 Crio preservación

Técnica que consiste en preservar material biológico (células, tejidos, material seminal u órganos) a temperaturas adecuadas (-196°C), en medios como el nitrógeno de forma líquida, manteniendo si viabilidad (Suleiman Martos, et al., 2022).

2.2.2 Biotecnología reproductiva

. Conjunto de metodologías como la IA o la duplicación de genes, aumentando la eficiencia en la reproducción de los animales, estas herramientas pueden aplicar la transgénesis (Ugalde, 2014).

2.2.3 Semen bovino

Es el eyaculado del toro que presenta aspectos de gran importancia en la viabilidad de un toro, siendo esto incluido en la evaluación del productiva del mismo. La cantidad de semen depende de la fisiología del animal, raza, edad, numero de montas y métodos de recolección (Larocca, & Filipiak, 2017).

2.2.4 Calidad seminal

Es la valoración que certifica que la aptitud reproductiva del macho, evaluando la motilidad, morfología, viabilidad de los espermatozoides, asi como también la concentración, el volumen y el aspecto del líquido seminal (Lozano, 2009).

2.2.5 Chino Santandereano

Es la raza criolla bovina que presenta características especiales por las cuales destaca, pelaje colorado o bayo anaranjado, por tener una contextura con vigor fuerte y excelente adaptabilidad (Vargas, 2001).

2.3 Marco teórico

La evaluación de fertilidad y desempeño reproductivo del toro es una prueba simple, muy práctica y con un valor económico bajo, permitiendo la identificación de animales fértiles y poco fértiles que afectan un programa de reproducción, en los sistemas de producción bovina se

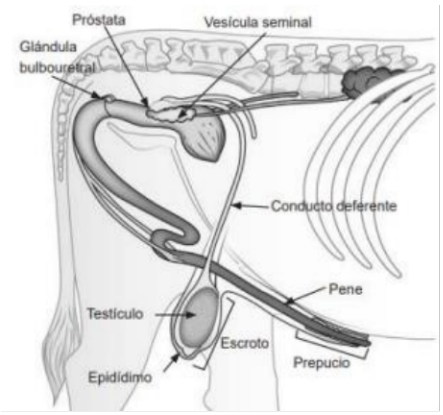
recomienda realizarlo periódicamente, pero su implementación en Colombia es baja. Este examen consta de tres principales pasos: un examen físico total (estructura corporal, órgano reproductor de manera interna y externa), se evalúa la libido y por último la evaluación del esperma con el fin de determinar la capacidad y desempeño reproductivo del toro (Páez Barón & Corredor Camargo, 2014).

2.3.1 Sistema Reproductor del Macho Bovino

Según lo documentan Ruiz Sesma, et al, (2021), el sistema reproductor de los toros está conformado por: escroto, testículos, epidídimo, glándulas bulbouretrales, próstata, vesículas seminales y pene. El sistema reproductivo de los machos bovinos está influenciado por el eje hipotalámico/pituitario, que produce hormonas como la gonadotropina (GnRH), que, actuando en la adenohipófisis, secretando la hormona luteinizante y hormona folículo estimulante, contribuyendo en la espermatogénesis y producción de andrógenos (Chicaiza Cuzco & Patricio, 2022). La edad en la que presentan la pubertad los animales es un factor importante en el comportamiento y desempeño de la reproducción del ganado bovino, debido a que los animales más maduros sexualmente tienen mejor desempeño y a su vez mayor producción; otro factor es el genotipo por ejemplo, el ganado europeo (Bos taurus) es más temprano que el ganado cebú (Bos indicus) en sus diferentes razas (Silva, et al., 2002).

Figura 1

Sistema reproductor del toro



Nota. Conformación del aparato reproductor del bovino. Tomada de (Chicaiza Cuzco & Patricio, 2022).

2.3.1.1 Testículo y Escroto. En los machos bovinos el órgano reproductor primario (testículo) que ayuda en la espermatogénesis y la esteroidogénesis (Liu, et al., 2023). Los testículos se ubican afuera de la parte abdominal específicamente en el escroto; esta estructura en forma de saco procedente de la piel y la aponeurosis del abdominal el cual los protege (Guzman Santaria, 2024).

2.3.1.2 Epidídimo. Las funciones del epidídimo son dos básicamente, la madurez y depósito de espermatozoides (Pérez Durand, et al, 2022).

2.3.1.3 Glándulas Accesorias. Estas glándulas vierten secreciones a la uretra mezclándose con los espermatozoides y las secreciones ampulares del conducto deferente, siendo la próstata y las glándulas bulbouretrales (Guzman Santaria, 2024).

2.3.1.4 Pene y prepucio. Según lo documenta Pérez Durand, et al, (2022), el pene de los bovinos adultos puede medir un metro de longitud, es de aclarar que la cuarta parte del pene corresponde a la flexura sigmoidea o también conocida como "S" peneana, ubicada detrás del escroto, una de las características del pene es su condición fibroelástico convirtiéndolo relativamente rígido aun cuando no esté en erección, una de las funciones del pene es depositar el material seminal en el tracto reproductivo de la hembra; mientras que le prepucio siendo una invaginación de la piel abdominal, protege al pene y está en reposo dentro de la cavidad prepucial (Montovio, 2021).

2.3.2 Valoración de la Actitud Reproductora del Toro (EAR)

La estimación física en general en los toros debe comenzar con el tamaño, forma y posición de las patas y observación del toro al caminar sobre una superficie fija y plana (Honig, et al, 2022).

Los toros seleccionados como donantes de esperma deben someterse a un examen clínico completo, se debe valorar los genitales externos e internos, para identificar posibles problemas de estructura física. Este examen debe incluir la medición de la circunferencia del escroto también llamada "circunferencia testicular" (Gómez López, et al., 2023).

La medición de los testículos es un criterio importante en estudios experimentales, especialmente en estudios toxicológicos, funciones de los testículos y la variedad de trastornos y en la predicción de la espermatogénesis (Akosman, et al., 2013).

Figura 2

Medición de la circunferencia escrotal

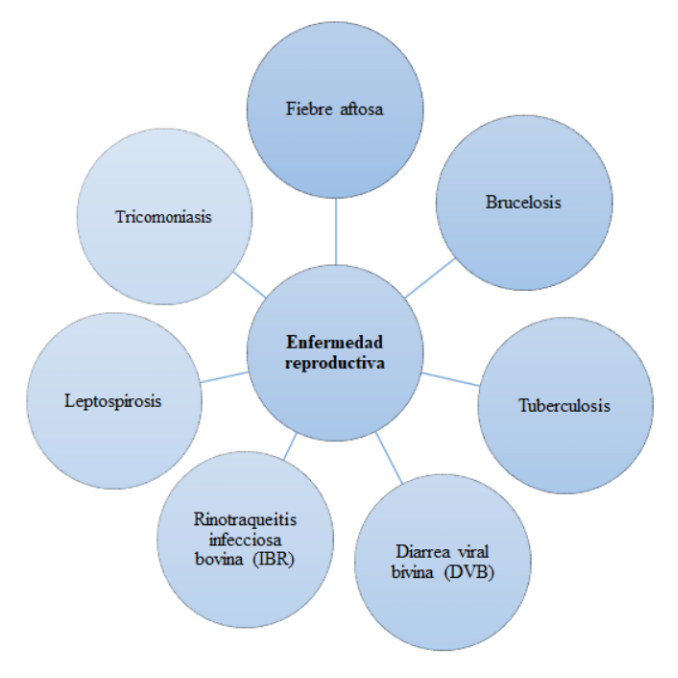


Nota. Ejemplo para la medir la circunferencia escrotal. Tomada de (Gómez López, D. L., et al., 2023).

Es importante realizar los correspondientes análisis para comprobar que los animales no tengan infecciones que puedan afectar el desempeño reproductivo; realizando un diagnóstico laboratorial de enfermedades infecciosas que afectan los sistemas ganaderos bovinos identificando patologías existentes que afectan el desempeño reproductivo de los animales, tal lo pudo comprobar (Ordóñez, et al.,2021).

Figura 3

Enfermedades reproductivas



Nota. Enfermedades reproductivas cuyo control sanitario es exigido por el ICA para los donantes de material seminal. * Exento con certificado vigente de hato libre. Tomada de (Gómez López, et al., 2023).

2.3.3 Colecta y Evaluación del Material Seminal.

El término "métodos de inseminación asistida" puede entenderse en la ganadería moderna como un conjunto de técnicas destinadas a utilizar de forma óptima las células germinales bovinas para producir animales genéticamente valiosos de forma rentable y en el tiempo suficiente. La caracterización precisa de la calidad del esperma es importante n la eficacia de diversos procedimientos de inseminación artificial, como el procesamiento del esperma, la producción de embriones por el método in vitro y la inseminación artificial. La fertilidad del macho es, en última instancia, una proyección colectiva de la

capacidad de una serie de eyaculados para resistir el estrés del procesamiento del esperma y lograr la fertilización del óvulo (Bollwein, & Malama, 2023).

En una investigación realizada por Gutiérrez, (2017), en la recolección del material seminal emplearon el electroeyaculador, el toro es inmovilizado empleando el brete, para evitar que este se lastime, posteriormente se induce a la orina, se corta los vellos del prepucio y se lava internamente con solución y finalmente evacuando el contenido que se encuentra en el recto. Por otro lado, en la investigación realizado Silveira Prado, et al., (2005) donde evaluaron la acción bactericida de amplio espectro y fungicida, 2-bromo 5-furano, que es denominado G-1, que remplaza los antibióticos que se emplean en la conservación del semen bovino, en esta investigación el método utilizado para la recolección del material seminal fue la vagina artificial. Los instrumentos y equipos manipulados en la colecta seminal se desindectan en su totalidad, las muestras serán analizadas macroscópica y microscópicamente.

Figura 4

Electroeyaculador



Nota. Partes que componen el electroeyaculador. Tomada de (Londra, T. A., 2021).

Figura 5

Vagina artificial



Nota: Equipo que componen la vagina artificial. Tomado de (Gómez López, D. L., et al., 2023).

2.3.4 Evaluación Macroscópica del Semen

Las particularidades macroscópicas del material seminal colectado que se analizan el olor, volumen y color (Páez & Corredor, 2014).

Para Dejarnette et al. otros, (2004), citado por Pacheco, et al., (2021), la fertilidad del ganado se evalúa tradicionalmente en el laboratorio basándose en el análisis de esperma. Este enfoque utiliza métodos de laboratorio estándar que miden las características de la producción de esperma, como el volumen, la concentración del esperma y los indicadores de calidad, como el porcentaje de espermatozoides anormales y su motilidad.

Tabla 1

Evaluación macroscópica de semen bovino

Parámetro de evaluación	Criterio de aceptación

Volumen	≥ 2mL
Color	Blanco o marfil
Aspecto	Lechoso o cremoso
Olor	Sui generis (Característico)

Nota. Criterios de aceptación en evaluación macroscópica. Tomado de (Gómez López, et al., 2023).

Figura 6

Muestra seminal



Nota. Colecta seminal de toros chinos santandereanos.

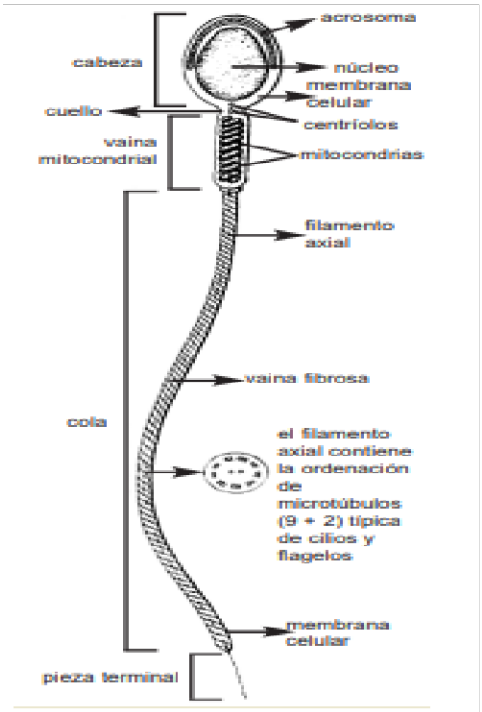
2.3.5 Evaluación Microscópica del Semen Bovino

De las biotecnologías utilizadas en la reproducción bovina, la técnica IA en las indagaciones de estos años se ha demostrado que es un método importante para mejorar la genética en las ganaderías. Realizar una buena valoración del material seminal comprobando su

fertilidad dependerá su utilización futura. Debido al tamaño de los espermatozoides bovinos, estos pueden evaluarse utilizando un equipo como el microscopio óptico en diferentes aumentos (Hidalgo Ordóñez, et al., 2005).

Figura 7

Morfología de un espermatozoide bovino



Nota. Representación de un espermatozoide Tomado de (Hidalgo Ordóñez, et al., 2005).

La secuencia de los acontecimientos que condujeron al uso comercial de la inseminación artificial (IA) se remonta al descubrimiento del esperma en 1678, aunque fueron necesarios casi 100 años para demostrar que los espermatozoides eran los agentes de la fertilización y otros 100 años más para los acontecimientos reproductivos (Lonergan, 2018).

Las características microscópicas que se evalúan en las colectas seminales realizadas a los toros bovinos, están relacionadas con: vitalidad, morfología, motilidad masal, motilidad individual, concentración espermática entre otras (Agüero Camacaro, 2012).

Figura 8

Antonie van Leeuwenhoek y un ejemplo de sus microscopios con lentes de mano.



Nota. Cortesía de Wellcome Library, Londres. Tomado de (Lonergan, 2018).

La evaluación de la motilidad en una muestra seminal, permite determinar el porcentaje de espermatozoides móviles, característica importante para detectar la eficacia del esperma, habitualmente toman como indicador fundamental por el proceso que realiza al momento de penetrar con el óvulo, así como la ligereza e itinerario que realiza el espermatozoide (Bernardi, et al., 2011).

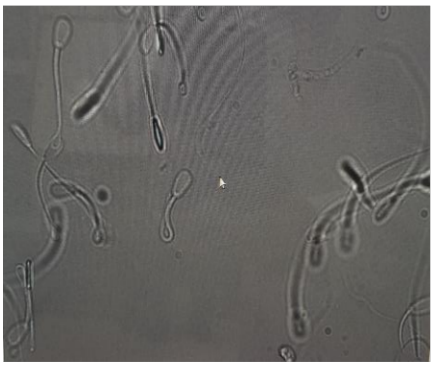
Para Pérez Durand, (2022), la viabilidad es una característica que permite medir la cantidad de espermatozoides vivos. Se utilizan tintes esenciales para medir la viabilidad de los espermatozoides, como el tinte eosina – nigrosina que tiñe los espermas muertos de color rojizo

y aquellos que se encuentran vivos no tienen ningún color y si la membrana celular está dañada como en un el espermatozoide muerto puede atravesarlo y teñirse, al observar por portaobjetos sin teñir son aquellos con una membrana celular intacta que no deja pasar el tinte (Agüero Camacaro, 2012).

La estructura dinámica es la membrana espermática que su función es reconocer y transportar las moléculas. Estas funciones les permiten a los espermatozoides bovinos adaptar su metabolismo a su entorno, ocasionando un sistema molecular para la identificación de los óvulos. Analizar membrana y su integridad es importante para valorar la fertilidad de los toros (Hidalgo Ordóñez, et al., 2005).

Figura 9

Valoración espermática



Nota: Análisis seminal.

La reproducción animal utiliza sistemas computarizados de análisis de esperma (CASA), cuyo objetivo es evaluar la calidad del esperma de manera rápida y confiable. Los centros de investigación análisis cuentan con sistemas confiables y aseguren la seguridad de los datos

reproductivos. El sistema CASA remplaza los estudios habituales que conducen a errores diversos. Además, debido a las restricciones inherentes de la microscopía o de los espermatozoides con desiguales modelos de motilidad, es posible que exista una inestabilidad extraordinaria que afecte la evaluación (Valverde & Madrigal, 2018).

La medición de las imágenes con los sistemas automatizados basado en la toma secuencial de espermas móviles a través de un aparato como el microscopio. Las siluetas se digitan haciendo una identificación de los espermatozoides. Luego se buscan estas células en imágenes continuas y se determinan las líneas finales. Las líneas se procesan de manera matemática, lo que da como resultado resultados numéricos precisos (Hidalgo Ordóñez, et al., 2005).

Figura 10

Sistema computarizado de análisis seminal (CASA)



Nota. Laboratorio de biotecnología reproductiva UNIPAZ.

Tabla 2

Evaluación microscópica del semen bovino

Parámetro de evaluación	Criterio de aceptación
Motilidad masal (escala de 1 a 4)	≥ 3
Motilidad individual	≥ 60%
Concentración	≥ 400 milñlones spz/mL
Morfología (normalidad)	≥ 70%
Viabilidad espermática	≥ 70%
Vigor (escala de 1 a 5)	≥ 3

Nota. Valores de aceptación de la muestra seminal. Tomado de (Gómez López, et al., 2023).

2.3.4 Criopreservación Seminal

En un documento de (Spallanzani, 1784 citado por Chicaiza Cuzco, & Patricio, (2022), se hace referencia al primer intento registrado de criopreservación de semen en 1776, observando los espermatozoides humanos, equinos y de las ranas, helados durante treinta minutos en la nieve, se inactivaban, pero luego se podrían reactivar. Phillips et al., (1940) citado por Chicaiza Cuzco, & Patricio, (2022), comenzaron a emplear la yema de huevo (YH) en la protección de las células de los espermatozoides del toro dado el shock de temperatura durante el proceso de enfriamiento. Más adelante, Salisbury et al., (1941) citado por Chicaiza Cuzco, & Patricio, (2022) mejoraron los diluyentes espermáticos al utilizar YH + citrato de sodio, permitiendo conservar el semen durante 3 días a 5 °C d. Polge et al., 1949 citado por Chicaiza Cuzco, & Patricio, 2022) llevó a cabo la primera congelación de espermatozoides de toro utilizando glicerol dentro del diluente.

Rosete Fernández, et al., (2021), en su hallazgo sobre la capacidad del glicerol como crioprotectora marcando el comienzo de la criopreservación, de los gametos de diversas especies, de células y tejidos. En un informe realizado por Polge & Rowson, (1952) citado por Clavijo Echeverri, (2012) en Cambridge, se registra el nacimiento del primer ternero concebido mediante la utilización del semen bovino congelado-descongelado, la información sobre la fertilidad mediante la utilización de espermatozoides congelados de toro motivó un rápido desarrollando métodos de criopreservación mejorando los resultados, integrándose disciplinas como la biología molecular.

Según Pérez Durand, et al, (2017), el objetivo principal del almacenamiento de los espermatozoides congelados, es la preservación a largo plazo de la viabilidad y función celular durante diferentes períodos. Para lograr este objetivo, los espermatozoides deben almacenarse a temperaturas por debajo de -130°C para detener por completo los procesos metabólicos (Jácome, et al., 2021).

A menudo se utiliza semen congelado para los programas de inseminación artificial (IA) en ganado lechero y de carne por las ventajas en los sistemas productivos (Felippelli. et al., 2023). El semen congelado en los programas de IA, permitiendo la optimización de los reproductores, mejor selección genética del rebaño, como también facilita el trasporte, adquisición de razas, conservación de razas entre otros (Bozzi, et al., 2023).

2.4 Marco Legal

Colombia es un país que está muy interesado en construir un desarrollo sostenible y sustentable; no sólo cumple con la gran responsabilidad de ser el segundo país con mayor biodiversidad del mundo y sus irreemplazables recursos hídricos que privilegian nuestro país, sino también con el impacto del escenario internacional que ha llevado a la agenda pública, incluida una de las preocupaciones creadas por la Comisión Brundtland, sobre la creciente degradación del planeta, sobre la consiguiente pérdida del bienestar humano, equilibrio natural entre otros. Lo cual se ha enfatizado desde 1991 con la adopción del perfil ecológico de la constitución política, que refleja los avances de las décadas anteriores, con la aprobación de la Ley N° 23 de 1973, en el artículo 19 autorizando al presidente de la República a otorgar un año después el Decreto 2811 de 1974 o Ley de Recursos Naturales Renovables y Protección al Ambiente (Palacios Lozano, et al., 2019).

Capítulo 3. Diseño metodológico

3.1 Diseño Metodológico

El enfoque de la investigación fue descriptivo donde su objetivo describir fenómenos o características que ocurren en la realidad, sin buscar establecer relaciones causales o explicar por qué ocurren (Hernández Sampieri, et at, 2014; Barrientos-Monsalve, Sotelo-Barrios & Hoyos-Patiño, 2023). En el caso de esta investigación, se busca describir que tanto afecta la criopreservación la calidad del semen en los toros chino santandereano.

Este tipo de investigación es útil cuando se requiere obtener un panorama general o una imagen clara de un fenómeno específico (Barrientos Monsalve, Velásquez-Carrascal & Hoyos-Patiño, 2021).

En este estudio, se pretende recopilar datos objetivos y precisos sobre la calidad del semen de los toros chino santandereano, luego de ser criopreservados. Al describir estas características, se espera obtener valiosa información que contribuya a comprender mejor la reproducción de esta raza y sus posibles implicaciones mejorando la genética y la reproducción asistida. El enfoque descriptivo permitirá recopilar los datos observados y medibles sobre la calidad seminal, sin intervenir o manipular activamente las variables, brindando la oportunidad de obtener una imagen realista y precisa.

Finalmente, la investigación descriptiva es adecuada para este estudio, ya que permite describir la relación existente de la criopreservación con la calidad seminal de toros de la raza

chino santandereano. Proporcionará una visión detallada y objetiva de estas características reproductivas, siendo útil para tomar decisiones en la reproducción asistida, programas mejoramiento de la genética y la conservación de la razas (Hernández Sampieri, et al, 2014).

3.2 Lugar de Estudio

Figura 11

Ubicación UNIPAZ



Nota: Fotografía tomada de Google maps

La investigación se desarrollará en la institución universitaria La Paz UNIPAZ, ubicada en Km 14 vía Barrancabermeja - Bucaramanga – Santander, Centro de Investigaciones Santa Lucía, con una temperatura promedio de 28° - 35°C, con un promedio de 212 militros de lluvia, H° relativa de 83%, 75 m.s.n.m y un ecosistema tropical.

3.3 Obtención y Evaluación del Semen

Se colectará el semen de 5 toros chino santandereano (muestra), de los 10 toros chino santandereano (población) presentes en la UNIPAZ, las colectas se realizaran mediante electroeyaculador, a cada toro se le tomaran 3 muestras biológicas (eyaculado), con intervalos de 15 días cada toma; según protocolos de laboratorio de biotecnología serán criopreservados en pajitas de 0,5 ml en concentración de 30.000.000 de espermatozoides por pajilla, utilizando como diluyente optixcell en relación 1:2; posteriormente las pajillas serán descongeladas para ser analizadas. Las variables a medir en esta investigación son: espermatozoides funcionalmente competentes (EFC), vitalidad y motilidad general; para esta valoración se utilizará un sistema computarizado para análisis seminal (CASA), tanto para el semen fresco como para el semen congelado/descongelado.

Figura 12 *Toro chino santandereano*



Nota. Toro chino santandereano, propiedad de la UNIPAZ.

Figura 13

Colecta de semen de toro chino santandereano, utilizando electroeyaculador



Nota: Colecta seminal.

3.4 Métodos de recolección de los datos

Inicialmente recolectando información en un registro para toma de datos, se tabulará según resultados obtenido del sistema computarizado para análisis seminal (CASA), para cada una de las variables a medir.

Figura 14

Sistema computarizado para análisis seminal (CASA)



Nota. Análisis seminal utilizando (CASA), laboratorio de biotecnología reproductiva UNIPAZ.

Figura 15

Registro de datos sobre la motilidad general

Motilidad general										
Semen fresco						Semen descongelado				
Muestra	**Toro 1**	**Toro 2**	**Toro 3**	**Toro 4**	**Toro 5**	**Toro 1**	**Toro 2**	**Toro 3**	**Toro 4**	**Toro 5**
Muestra 1										
Muestra 2										
Muestra 3										

Nota. Registro de recolección de datos.

Figura 16

Registro de datos sobre la vitalidad

Vitalidad										
Semen fresco						Semen descongelado				
Muestra	**Toro 1**	**Toro 2**	**Toro 3**	**Toro 4**	**Toro 5**	**Toro 1**	**Toro 2**	**Toro 3**	**Toro 4**	**Toro 5**
Muestra 1										
Muestra 2										
Muestra 3										

Nota. Registro de recolección de datos.

Figura 17

Registro de datos sobre la motilidad general

Espermatozoides funcionalmente competentes.										
	Semen fresco					Semen descongelado				
Muestras	**Toro 1**	**Toro 2**	**Toro 3**	**Toro 4**	**Toro 5**	**Toro 1**	**Toro 2**	**Toro 3**	**Toro 4**	**Toro 5**
Muestra 1										
Muestra 2										
Muestra 3										

Nota. Registro de recolección de datos.

3.5 Diseño Estadístico

Para las medidas de dos muestras emparejadas se utilizó la Prueba T, todos los procesos metodológicos tendrán en cuenta los protocolos de bienestar de la Welfare Quality® (Hoyos Patiño, Velásquez Carrascal & Hernández Villamizar, 2021) y la Resolución del Ministerio de Agricultura 253 del 2020, donde se adoptan el Manual de Condiciones de Bienestar Animal de las especies productivas pecuarias (Aves de corral, bufalina, bovina y animales acuáticos) (Hoyos Patiño, 2022).

3.6 Protocolo del Laboratorio

3.6.1 Protocolo para Motilidad

Depositar 3µl en una cámara leja y leer el sistema computarizado de análisis seminal - CASA.

3.6.2 Protocolo vitalidad (supervivencia-vivos y muertos).

1. Se toman 10µl de la ejemplar de semen en un eppendorf atemperado a 37°C y se le agrega 1µl de Tinción azul (FluoVit® MICROPTIC S.L.) (Hoechst y trihidrocloruro trihidrato) previamente atemperada a 37ºC y se incuba por 5 minutos.

2. Pasados los 5 minutos se le adiciona 1µl de Tinción roja (FluoVit® MICROPTIC S.L.) (Yoduro de Propidio) previamente atemperada a 37ºC y se incuba por 5 minutos más.

3. Se toma una alícuota y se realiza el conteo en microscopio de fluorescencia adjunto al software del método automatizado de análisis seminal-CASA. Conteo de 100 espermatozoides.

3.6.3 Protocolo Espermatozoides Funcionalmente Competentes (EFC)

Primero los espermatozoides son sometidos a estrés osmótico mediante el test hipoosmótico propuesto por (Jeyendran et al; 1984; Pérez Llano et al 2001; Pérez Llano et al 2009)

1. Se preparan tres eppendorf, uno con 900µl de medio hipoosmótico (HOST), otro con 150 µl de la ejemplar de semen y un tercero con 50µl de glutaraldehido al 2%.

2. De estos se incuba la muestra de semen y HOST durante 5minutos.

3. El glutaraldehido se deja atempera a temperatura de Laboratorio.

4. Pasados los 5 minutos se adicionan (sin salir del baño maría) 100µl de la muestra de semen a HOST se incuba por 10 minutos más.

5. De esta muestra, pasada la incubación se toman 10µl en un nuevo eppendorf atemperado a 37°C y se le agrega 1µl de de Tinción azul (FluoVit® MICROPTIC S.L.) (Hoechst y trihidrocloruro trihidrato) previamente atemperada a 37ºC y se incuba por 5 minutos más.

6. Pasados los 5 minutos se le adiciona 1µl de Tinción roja (FluoVit® MICROPTIC S.L.) (Yoduro de Propidio) previamente atemperada a 37ºC y se incuba por 5 minutos más.

7. Luego fija la muestra Glutaraldehido al 2% (1:1)

8. Se toman 5µl y se realiza la lectura en contraste de fase de la integralidad bioquímica de la membrana plasmática (HOST), la membrana acrosomal en su integridad, la morfología definida y luego con fluorescencia la vitalidad. Magnificación 100x (aceite de inmersión). Se cuentan 100 espermatozoides.

3.6.4 Motilidad de espermatozoides.

Se ejecuto a través del método de evalución seminal automatizado–SCA (Sperm Class Analizer) (Valverde, 2021).

3.6.5 Supervivencia.

Sistema de análisis seminal computarizado– SCA (Sperm Class Analizer) y el LIVE/DEAD® Sperm Viability Kit, Molecular Probes, Eugene, OR, USA (Villa Duque, 2016).

3.6.6 Espermatozoides Funcionalmente Competentes (Efc).

Prueba combinada de persistencia, integridad acrosómica, funcionalidad de la membrana y morfología, después de estrés hipoosmótico. Usando microscopio de fluorescencia con contraste de interferencia (Villa Duque, et al., 2016)

Capítulo 4. Resultados y Discusión

Las investigación realizadas en criopreservación seminal sigue siendo muy interesante en los temas de afectación de la calidad del semen congelado/descongelado, buscar alternativas que mitiguen la afectación de la criopreservación sobre la calidad del semen es tema de investigación diaria, como lo describe Layek, et al., (2016) en su investigación quien desde el comienzo de la criopreservación de esperma bovino, se emplearon diluentes comerciales con contenido YH, leche para proteger el esperma de la refigeraciónn y de los efectos nocivos de la congelación.

En los últimos años, la demanda de alternativas a los diluyentes comerciales convencionales ha aumentado debido al reconocimiento del riesgo de enfermedades exóticas transmitidas por el transporte de productos de yema del huevo, esta también puede interferir con la evaluación de los espermatozoides y la presencia de partículas en la extensión puede reducir la fertilidad.

La soja contiene lecitina, una fracción de fosfolípidos que puede reemplazar las lipoproteínas y los fosfolípidos de alto peso molecular en la yema del huevo y prevenir o reparar el daño de la membrana plasmática del esperma que ocurre durante el alargamiento, el enfriamiento y la criopreservación. Los diluyentes que utilizan la lecitina de soja se han evaluado en el procesamiento y congelación de esperma bovino, aunque los diluyentes a base de leche de soja no se han estudiado tan exhaustivamente. Estos diluyentes comerciales que emplean como base de lecitina de soja se utilizan cada vez más, pero todavía están bajo escrutinio y no son universalmente aceptados, por la tanto es necesario investigar el impacto de los métodos convencionales de criopreservación, los métodos de evaluación y la posibilidad de desarrollar la

extracción de soja como una alternativa aceptable a la yema de huevo tradicional y los diluentes en leche como base para la criopreservación de esperma de los toros. Como se evidencia en este estudio se buscan alternativas en los diluyentes de semen bovino para mitigar la afectación de los espermatozoides.

Para esta investigación se utilizaron 5 toros de la raza chino santandereano, los toros fueron colectados 3 veces cada toro, para un total 15 muestras biológicas, las cuales fueron criopreservadas según métodos convencionales de criopreservación utilizando optixcell como diluyente, las colectas seminales se tomaron mediante electroeyaculador, con intervalo de 15 días cada colecta, las muestras en fresco fueron analizadas para las variables de vitalidad, motilidad y espermatozoides funcionalmente competentes (EFC), tal como se evidencia en la tabla 3, los cuales son óptimos según un estudio publicado por Ronda et al., (2019) una motilidad es muy buena cuando el resultado es ≥75%, mientras que para Gómez López, et al., (2023) una vitalidad ≥70% es un porcentaje muy bueno; estos valores son normales en los eyaculados de los bovinos. Aunque los toros números con 11615 en el primer eyaculado obtuvo un 67 % de vitalidad, el toro 11416 para el primer eyaculado obtuvo un 68 % de vitalidad y el toro 10819 en el primer eyaculado obtuvo un 61 % de vitalidad, en las colectas segunda y tercera mejoraron considerablemente, lo cual se sugiere seguir trabajando los toros para este tipo de programas biotecnológicos.

Tabla 3

Análisis de los espermatozoides en semen fresco

Toro	Eyaculado	Motilidad	Vitalidad	EFC
11615	1	99,8	67	50

11616	1	99,9	86	80
11416	1	100	68	68
10819	1	100	61	74
12016	1	95	88	65
11615	2	90	90	65
11616	2	99,4	91	77
11416	2	100	95	80
10819	2	99,79	90	87
12016	2	98,7	83,3	71,6
11615	3	99,82	99	80
11616	3	100	80	74
11416	3	99,9	91	70
10819	3	99,67	78	61
12016	3	98	83	71

Nota. Valores espermáticos para semen fresco, analizados con sistema computarizado para análisis seminal (CASA).

Según Layek, et al., (2016), una de las características que deben tener los espermatozoides es la capacidad fértil luego de ser criopreservados, esta capacidad de fertilización depende de la conservación en la función e integridad de las estructuras espermáticas (Pinto, et al., 2023). Los resultados obtenidos de los espermatozoides congelados y descongelados, fueron analizados utilizando el sistema computarizado para análisis seminal (CASA), tal como se muestran en la tabla 4, donde se aprecia que estos valores están por debajo de lo valores obtenidos en el análisis de los espermatozoides del semen fresco, estos valores están relacionados con los porcentajes de vitalidad, motilidad y espermatozoides funcionalmente competentes (EFC), pero cumplen con los criterios de aceptación tal como lo describe (Gómez López, et al.,2023), donde argumenta que valores ≥30% para vitalidad y motilidad cumplen con los criterios de selección. Aunque en la colecta 1 del toro 12016 el resultado fue de 29,25% para el porcentaje de motilidad y el toro 11615 en la toma 3 de la

colecta se tiene un resultado de 29 % para el porcentaje de vitalidad estos valores son aceptables o discutibles.

Tabla 4

Análisis de los espermatozoides congelados y descongelados

Toro	Eyaculado	Motilidad/posdencongelado	Vitalidad/ posdencongelado	EFC/ posdencongelado
11615	1	58,75	74	24
11616	1	41,61	60	32
11416	1	75,42	75	41
10819	1	30,28	38	31
12016	1	29,51	36	14
11615	2	37,52	52	29
11616	2	81,34	88	61
11416	2	44,53	74	49
10819	2	38,92	45	28
12016	2	49,2	59,3	36,2
11615	3	18,97	29	18
11616	3	70,57	82	56
11416	3	65,73	70	51
10819	3	47,68	48	37
12016	3	49	58	33

Nota: Valores espermáticos para semen congelado/descongelado, analizados con sistema computarizado para análisis seminal (CASA).

Se elaboró un análisis descriptivo comparativo de los datos que se obtuvieron del semen fresco contratados con los resultados obtenidos del semen congelado/descongelado, se aprecian cambios tabla 5, donde se observa que los resultados de los espermatozoide congelado – descongelado bajo su calidad espermática comparados con los resultados del semen fresco.

Tabla 5

Análisis de motilidad para el semen fresco y congelado/descongelado

Toro	Eyaculado	Motilidad/Fresco	Motilidad/Congelado
11615	1	99,8	58,75
11616	1	99,9	41,61
11416	1	100	75,42
10819	1	100	30,28
12016	1	95	29,51
11615	2	90	37,52
11616	2	99,4	81,34
11416	2	100	44,53
10819	2	99,79	38,92
12016	2	98,7	49,2
11615	3	99,82	18,97
11616	3	100	70,57
11416	3	99,9	65,73
10819	3	99,67	47,68
12016	3	98	49

Nota. Resultados de los análisis para la variable de motilidad analizados mediante sistema computarizado para análisis seminal (CASA).

Para determinar el resultado de la criopreservación sobre la motilidad del semen de toros chino santandereano, se efectuó en los datos un análisis estadístico la figura 18, mediante prueba T de muestras parecidas donde se muestra diferencias entre las muestras de semen fresco con los resultados del semen congelado/descongelado.

Las medidas de tendencia para la motilidad fresca son: Media: 98,67% y Mediana: 99,8% y las medidas de tendencia para la motilidad congelada son: Media: 47,68% y Mediana: 60,1%; las medidas de dispersión para la motilidad fresca son: Desviación estándar: 2.73% y para las medidas de dispersión para la motilidad congelada fue: Desviación estándar: 17.98%.

Por tal motivo para esta variable la criopreservación sí tiene un efecto sobre la motilidad y se ratifica con la prueba t, donde t= 11.015 y p-valor = 0,000, estos resultados indican la exitencia de estadística suficiente para concluir que la criopreservación tiene un efecto negativo sobre la motilidad del semen de toros chino santandereano. Los resultados del análisis indican que la criopreservación del semen de toros chino santandereano reduce la motilidad en promedio un 50%. Esto significa que, después de la criopreservación, la motilidad del semen es la mitad de lo que era antes de la criopreservación, es decir la del semen fresco.

Figura 18

Prueba t para datos de dos muestras emparejadas

Item	***Variable 1***	***Variable 2***
Media	98,6713	49,2686667
Varianza	7,4861	323,207227
Observaciones	15	15
Coeficiente de correlación de Pearson	0,297	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	14	
Estadistico t	11,0197	
P(T<=t) una cola	0	
Valor critico de t (una cola)	1,7613	
P(T<=t) dos colas	0	
Valor critico de t (dos colas)	2,1448	

Nota. Prueba t para dos variables.

Los resultados obtenidos del semen fresco comparados con los resultados obtenidos del semen congelado – descongelado figura 18, evidenciando que los espermatozoide congelado – descongelado bajaron su calidad espermática comparados con los resultados del semen fresco. Los resultados de *p-valor* son menores a 0,05, rechazando la hipótesis nula lo que indica que la estadística es suficiente, concluyendo que la criopreservación tiene un efecto negativo sobre la motilidad del semen de toros chino santandereano.

Tabla 6

Análisis de vitalidad para el semen fresco y congelado/descongelado.

Toro	Eyaculado	Vitalidad/Fresco	Vitalidad/Congelado
11615	1	67	74
11616	1	86	60
11416	1	68	75
10819	1	61	38
12016	1	88	36
11615	2	90	52
11616	2	91	88
11416	2	95	74
10819	2	90	45
12016	2	83,3	59,3
11615	3	99	29
11616	3	80	82
11416	3	91	70
10819	3	78	48
12016	3	83	58

Nota. Resultados de los análisis para la variable de vitalidad analizados mediante sistema computarizado para análisis seminal (CASA).

Utilizando los datos de la tabla 6 se procede a valorar el efecto de la criopreservación sobre la vitalidad del semen de toros chino santandereano mediante prueba t para muestras pareadas; para la variable de vitalidad como se aprecia en la figura 19 que existe diferencias significativas en los datos del semen en fresco comparados con los datos del semen congelado/descongelado, se evidencia estas diferencias; para estas variables, las medidas de tendencia central para la vitalidad del semen fresco son: Media: 83.35% y Mediana: 86% y las valores de tendencia central para la vitalidad congelada son: Media: 59.22% y Mediana: 59.3%; las medidas de dispersión para la vitalidad del semen fresco son: Desviación estándar: 10.88 % y para las medidas de dispersión para la vitalidad congelada fue: Desviación estándar: 17.80% .

Por tal motivo para esta variable la criopreservación sí tiene un efecto sobre la vitalidad y se ratifica con la prueba t, donde t= 4.29 y p-valor = 0,000, estos resultados muestran que el análisis estadístico de los datos permite afirmar que criopreservación tiene un efecto negativo sobre la vitalidad del semen de toros chino santandereano. Los resultados del análisis indican que la criopreservación del semen de toros chino santandereano reduce la vitalidad en promedio un 28.95%.

Figura 19

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

Item	*Variable 1*	*Variable 2*
Media	83,3533	59,22
Varianza	118,3727	316,740286
Observaciones	15	15
Coeficiente de correlación de Pearson	-0,1004	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	14	
Estadístico t	4,2932	
P(T<=t) una cola	0,0004	
Valor crítico de t (una cola)	1,7613	
P(T<=t) dos colas	0,0007	
Valor crítico de t (dos colas)	2,1448	

Nota. Resultados de los análisis para la variable de vitalidad.

Analizando los datos para la vitalidad en la figura 19 se muestra que espermatozoides en semen fresco como también los resultados para los espermatozoides del semen congelado/descongelado (semen de toros chino santandereano) a través del programa computarizado para análisis seminal (CASA). El *p-valor* ha sido menor que 0,05, rechazando la

hipótesis. La estadística permite concluir que la criopreservación afecta la vitalidad del semen de toros chino santandereano.

Tabla 7

Resultados de los espermatozoides funcionalmente competentes (EFC) del semen de toros chino santandereano.

Toro	Eyaculado	EFC/Fresco	EFC/Congelado
11615	1	50	24
11616	1	80	32
11416	1	68	41
10819	1	74	31
12016	1	65	14
11615	2	65	29
11616	2	77	61
11416	2	80	49
10819	2	87	28
12016	2	71,6	36,2
11615	3	80	18
11616	3	74	56
11416	3	70	51
10819	3	61	37
12016	3	71	33

Nota. Análisis de los espermatozoides funcionalmente competentes (EFC), mediante programa computarizado para análisis seminal (CASA).

Los datos de la tabla 7 se utilizan para valorar el efecto de la criopreservación sobre los espermatozoides funcionalmente competentes (EFC) del semen de toros chino santandereano mediante prueba t para muestras pareadas; para la variable de espermatozoides funcionalmente

competentes (EFC) se aprecia que existe diferencias significativas entre valores del semen recién recolectado y los datos del semen congelado/descongelado en la figura 20 se evidencia estas diferencias; para estas variables, las medidas de tendencia central para la vitalidad del semen fresco son, media (71.57%) y mediana (71.6%); espermatozoides funcionalmente competentes (EFC) congelada son media (36.01%), mediana (33%) y vitalidad del semen fresco son desviación estándar (9.15%) y para las medidas de dispersión para la vitalidad congelada desviación estándar (13.52%) . Por tal motivo para esta variable la criopreservación sí tiene un efecto sobre los espermatozoides funcionalmente competentes (EFC) y se ratifica con la prueba t, donde t= 9.43 y p-valor = 0,000. En promedio, hay una diferencia de 49.68% (EFC)por eyaculado del el semen fresco y el congelado, siendo el semen fresco el que tiene mayor cantidad de EFC; concluyendo que la criopreservación afecta la calidad de la variable para espermatozoides funcionalmente competentes (EFC).

Figura 20

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

Item	*Variable 1*	*Variable 2*
Media	71,5733	36
Varianza	83,6735	182,857143
Observaciones	15	15
Coeficiente de correlación de Pearson	0,2148	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	14	
Estadístico t	9,4316	
P(T<=t) una cola	0	
Valor crítico de t (una cola)	1,7613	
P(T<=t) dos colas	0	
Valor crítico de t (dos colas)	2,1448	

Nota. Análisis para espermatozoides funcionalmente competentes (EFC).

Según los datos obtenidos para espermatozoides funcionalmente competentes (EFC) de la figura 20, el *p-valor* es mucho menor que 0,05, dado que rechaza la hipótesis. Esto indica que existe evidencia estadística suficiente para deducir que la criopreservación afecta los espermatozoides funcionalmente competentes (EFC) del semen de toros chino santandereano.

Para concluir con los objetivos de esta investigación y establecer la existencia de relación entre las variables (2), se realizó un análisis de correlación simple de variables, donde se demuestra que existes diferencias entre las variables de motilidad, vitalidad y espermatozoides funcionalmente competentes (EFP), según se aprecia en los resultados obtenidos, donde se evidencia la dispersión de datos con relación con la media.

En el esperma criopreservado, el proceso de congelación y descongelación y el procesamiento posterior, dañan los espermatozoides, lo que reduce la capacidad fértil del

esperma congelado, estos procesos se han asociado con el estrés oxidativo (EO), causado por niveles por encima de variedades reactivas de oxígeno (EROS), que dañan la estructura y función del esperma; descongelado se puede proteger contra este daño añadiendo antioxidantes (AO) al medio de incubación; En condiciones in vitro, la ausencia de plasma seminal debe complementarse para obtener espermatozoides funcionalmente competentes; la resistencia a la peroxidación del esperma bovino se ha atribuido a componentes plasmáticos (Deppe, et al., 2021).

En la investigación realizada (Restrepo et al., 2023), utilizaron material seminal de diez toros: 5 bovinos de raza criolla Blanco Orejinegro (BON) y 5 bovinos Bos indicus, de la raza Guzerá; los ejemplares fueron colectados 3 veces cada toro con intervalos por colecta seminal de 2 meses, utilizando electro eyaculador para lo obtención del material seminal; luego del proceso de dilución y criopreservación seminal, se descongelaron 5 pajillas como mínimo para cada eyaculado; para determinar movilidad y cinética espermática utilizando Sperm Class Analizer; para determinar en la membrana plasmática su integridad, en el cual se realizó bajo el protocolo de test hiposmótico; para determinar la vitalidad se empleó microscopía de fluorescencia; la evaluación morfológica se utilizó la tinción eosina negrosina; el citómetro de flujo fue utilizado para valorar la membrana plasmática, la integridad de ADN, protanación espermática y la actividad mitocondrial. El nivel de significancia para esta investigación fue de $P < 0,05$ en toda la evaluación. La raza BON que expuso los mejores resultados en la mayoría de las variables medidas, algunos resultad como la movilidad total (0,42), membrana plasmática en la integridad (0,30), la vitalidad espermática (0,21), para semen congelado-descongelado. La calidad seminla de los machos criollos de raza BON, bajan su calidad seminal cuando son sometidos al proceso

de congelación, sin alterar su capacidad de fertilidad para ser empleados en programas de reproducción asistida.

Tal como lo documentan (Fernández et al., 2022), trabajaron 10 toros de la raza Romosinuano y 10 toros Costeño con Cuernos, los ejemplares tenían edades entre 3 y 6 años; todos en las mismas condiciones de manejo, ambiente y aloimentacion; a cada reproductor le tomaron 3 muestras seminales mediante electro eyaculación, con intervalos entre colectas de 1 mes; las muestras fueron analizadas poscongelacion, los resultados para viabilidad fueron de 32,8 ±9,2 para romosinuano y 17,2 ±7,9 para costeño con cuernos, y la motilidad individual progresiva fue de 40,8 ± 15,17 para el romosinuano y 22,9 ±7,4 para costeño con cuernos; al igual que en las razas chino santandereano la crio preservación afecta la calidad seminal, pero mantiene valores aceptables para ser usados en programas de reproducción asistida.

Tal como se puede apreciar, en esta investigación la media para la variable de motilidad obtenida para los toros chino santandereanos fue de 49,26, los valores obtenidos por (Fernández et al., 2022) para los toros de la raza Romosinuano fue de 40,8 ± 15,17, el costeño con cuernos fue de 22,9 ±7,4 mientras que (Restrepo et al., 2023), obtuvieron resultados de motilidad de (42) cuando compararon la motilidad del semen congelado – descongelado de la raza BON vs Guzerá; valores aceptados para usar en programas de reproducción animal asistida; por tal motivo la criopreservacion afecta la calidad seminal para el parámetro de motilidad, de las razas bovina criollas mencionadas, si afectar sus usos en programas de biotecnología reproductiva. Para el parámetro de vitalidad obtuvimos una media de 59,22%, para toros criollos chino santandereano, mientras que (Fernández et al., 2022), para la variable de viabilidad obtuvieron valores de viabilidad de 32,8 ±9,2 para romosinuano y 17,2 ±7,9, como se aprecia las razas chino

santandereano y romosinuano están dentro dde parámetros aceptables para usar en programas de biotecnología mientras que el uso del material seminl de la raza costeño con cuernos es discutible.

En un investigación realizada por Carpio Chuchuca (2015), con el objeto de estudiar el semen bovino criopreservado utilizando diluyente comercial triladyl junto con leche descremada y YH, fomando los tratamientos (T1) Triladyl + YH y (T2) Triladyl + leche descremada, utilizando material seminal de un toro mestizo Holstein de 2 meses; se emplearon 6 eyaculados recolectados en días distintos, para ser analizados macroscópicamente y microscópicamente; posteriormente fueron empacados en pajillas de 0,5 cc utilizando los diluyentes anteriormente mencionados, se tomaron 10 pajillas para cada tratamiento para analizarlas post descongelación. La investigación tuvo como objetivo determinar la motilidad individual, los espermatozoides vivos y muertos después del descongelamiento de las pajillas utilizando el diseño experimental T students, para comparar los datos.

El análisis de las colectas seminales fue analizado en laboratorio para determinar la calidad de los eyaculados en este tal como se demuestra la figura 21, los valores obtenidos para el análisis macroscópico y microscópico dan resultados de aceptabilidad para ser utilizados en programas de biotecnología.

Figura 21

Resultado del análisis macro y microscópico de los eyaculados

Descripción	Análisis macroscópico	Análisis microscópico
Volumen	*4,67ml*	Motilidad masal 80%
Olor	Suigéneris	
Color	Blanco cremoso	

Nota: Promedio de los análisis macro y microscópico de los eyaculados en fresco. Tomado de (Carpio Chuchuca, 2015).

Luego de colectadas las muestras procedieron según protocolos de laboratorio a elaborar las pajillas con los diluyentes anteriormente mencionados, según resultados estadísticos se evidencia que hubo diferencias significativas entre los dos tratamientos para la variable de motilidad, donde el diluyente Triladyl + YH, dio como resultado en la motilidad individual un 80% mientras que el diluyente Triladyl + leche descremada su motilidad fue de un 72,5%, tal como se aprecia en la figura 22.

Figura 22

Resultados del análisis microscópico del semen diluido

Descripción	Motilidad individual	Vitalidad	Motilidad
Semen diluido con triladyl + yemas	80%	82,50%	17,50%
Semen diluido con triladyl + leche	72,50%	77,50%	22,50%

Nota. Resultados del análisis microscópico de las muestras diluidas antes de criopreservarlas. Tomado de (Carpio Chuchuca, 2015).

Concluyendo que se encontraron diferencias reveladoras en los dos métodos aplicados, mostraron mejores resultados para las constantes motilidad individual y viabilidad el tratamiento uno (T1) diluyente comercial Triladyl con yema de huevo; como también se pudo concluir que la criopreservación afecta los porcentajes de viabilidad y motilidad individual utilizando los 2 diluyentes (Carpio Chuchuca, 2015).

A pesar del uso generalizado de esperma de mamíferos congelado o refrigerado, su calidad sigue siendo aceptable porque son muy susceptibles al deterioro durante el almacenamiento en nitrógeno y la descongelación. Recientemente, se han agregado antioxidantes a los diluyentes del esperma bovino en diversos métodos de almacenamiento para compensar la disminución en la reunión de antioxidantes endógenos del plasma seminal debido a la dilución, y también para prevenir la oxidacion in vitro y minimizar la formación de de los espermas radicales libres (Al-Mutary, 2021). Con este estudio se demuestra que el empleo de antioxidantes en los diluyentes para evitar el deterioro de los espermas.

Aunque existen muchas técnicas para la criopreservación de semen bovino, los efectos adversos de diversos factores estresantes siguen siendo un problema importante, Alyethodi, et al., (2021), en su exploración valoró la función de los parámetros en calidad del esperma, pruebas de función espermática, peroxidación lipídica, variedades reactivas de oxígeno (ROS) y diferentes antioxidantes en la criopreservación de esperma bovino. Además, se investigó la cinética de la peroxidación lipídica, las ROS y los antioxidantes durante la recolección repetida de esperma durante la abstinencia eyaculatoria corta. Diseñaron un estudio

comparativo en el que los toros se agruparon en grupos de espermatozoides con buena y mala congelación (grupos de congelación) en función de su motilidad post-descongelación. Todos los toros incluidos tenían una motilidad inicial similar y estándares mínimos para los parámetros iniciales de esperma, es decir, volumen y concentración de esperma. Uno de los hallazgos de este estudio está relacionado con el marcado por un aumento en las anomalías en la cabeza, una integridad acrosómica deficiente en los grupos con baja congelación y la cabeza del espermatozoide puede ser la parte más vulnerable del espermatozoide al estrés del almacenamiento en nitrógeno líquido.

El uso casi exclusivo de semen criopreservado en la cría de ganado permite largas distancias de envío, mayores tiempos de almacenamiento, cuarentena para evitar la transmisión de gérmenes y una fácil dispersión de toros de alto valor genético. Los espermatozoides de los toros se pueden congelarse fácilmente y la mejora de los protocolos de criopreservación durante décadas ha dado lugar a una alta calidad del semen. Sin embargo, todavía hay cierta pérdida de espermatozoides en cada dosis de semen debido al desprendimiento de los acrosomas después de la descongelación. Incluso hay toros individuales con un número extremadamente alto de acrosomas desprendidos después de la criopreservación, llamados "malos congeladores".

Este estudio examinó 1092 eyaculados de 59 toros Holstein para detectar la diferencia en los acrosomas desprendidos antes y después de la criopreservación (ΔAC). El toro individual influyó en ΔAC ($P < 0,001$) y permitió la selección de individuos con ΔAC repetidamente bajo (buenos congeladores) o alto ΔAC (malos congeladores). Los buenos congeladores fueron superiores a los malos congeladores en una prueba de termorresistencia (78,2% vs. 33,6% de motilidad total, respectivamente, $P = 0,047$) y tuvieron mayores tasas de no retorno (NRR:

46,8% vs. 40,8%, respectivamente, P = 0,016). Dado que el estrés oxidativo es una posible explicación para la reacción acrosómica prematura, se midió la capacidad de reducción radical del líquido seminal y se encontró que este parámetro se redujo en los toros mal congeladores durante la criopreservación (P = 0,043). El análisis de las especies de lípidos en los espermatozoides a través de la espectrometría en masas de tiempo de amplitud de ionización y desorción amplificador concurrida por matriz (MALDI-TOF MS) mostró una reducción de éter lípidos y plasmalógenos, así como un aumento de formil-lisofosfatidilcolinas solo dentro de los congeladores defectuosos durante la criopreservación (P = 0,043). En conclusión, estos hallazgos muestran que la alteración de los lípidos causada por el estrés oxidativo es una razón esencial para que los espermatozoides reaccionen con acrosoma altamente aumentados en toros malos congeladores. Por lo tanto, un mayor uso de antioxidantes en el diluyente podría ser un posible punto de partida para desarrollar diluyentes individualizados para toros malos congeladores de alto valor genético, con el fin de elevar la calidad espermática seguidamente a la criopreservación incluso en esos toros (Jakop, et al., 2023).

El preacondicionamiento de los espermatozoides mediante estrés oxidativo subletal antes de la criopreservación es un enfoque innovador que puede mejorar la criosupervivencia de los espermatozoides. Las proteínas desacopladoras mitocondriales (UCP) son fundamentales para reducir el nivel de ROS durante condiciones de estrés, teniendo como objetivo investigar si el estrés leve subletal inducido por bajas concentraciones de óxido nítrico y peróxido de hidrógeno tiene un efecto preventivo sobre las medidas de calidad seminal del toro post-descongelado mediante modulaciones de expresión de la proteína de desacoplamiento mitocondrial 2 (UCP2). Se recogieron muestras de semen de 6 toros Holstein maduros, luego se mezclaron y dividieron

en 8 alícuotas: grupo fresco, control congelado y grupo congelado tratado con NO: 0,1 (NO-0,1), 1(NO-1), 10 (NO-10), y H2O2: 0,1(H2O2-0,1), 1(H2O2-1) y 10 (H2O2-10). Se observó un porcentaje significativamente mayor de motilidad total, progresiva y viabilidad en NO-1 y H2O2-10 en comparación con los otros grupos congelados (P <0,05). Esperma expuesto a NO y 10. El H2O2 mostró porcentajes significativamente mayores de actividad mitocondrial e integridad de la membrana (P <0,05). Además, el menor porcentaje de apoptosis se observó en los grupos NO-1 y H2O2-10 en comparación con los otros grupos congelados. Además, el nivel de expresión de UCP2 fue mayor en NO-1 y H2O2-10 en comparación con los otros grupos (P <0,05). Se puede concluir que el preacondicionamiento de estrés del esperma de toro antes de la criopreservación puede aumentar la expresión de UCP2 en el esperma, que puede desempeñar un papel protector contra las criolesiones después de la descongelación (Khosrozadeh, F., et al., 2022).

La criopreservación de esperma es un método establecido que se utiliza en aplicaciones de tecnología de reproducción asistida veterinaria. Se investigó los efectos adversos de la criopreservación sobre las propiedades estructurales y ultraestructurales de los espermatozoides de toro inducidos a diferentes temperaturas y etapas utilizando microscopía electrónica de barrido y transmisión (TEM) durante un procedimiento de criopreservación convencional. También investigaron los efectos del almacenamiento en nitrógeno líquido sobre el ADN del esperma y la integridad de la cromatina. Se utilizaron cinco toros frisones sanos y fértiles y las eyaculaciones se obtuvieron por el método vaginal artificial. Las muestras de esperma se combinaron y diluyeron con fructosa tris-yema (TYF) hasta una concentración de espermatozoide final de 80 × 106 espermatozoides/ml. Las muestras de esperma se empaquetadas en pajitas (0,25 ml) y almacenadas en nitrógeno líquido (-196

°C). Las muestras se evaluaron antes de la dilución, inmediatamente después de la dilución (a 37 °C), 2 horas y 4 horas durante el equilibrio y después de la descongelación (37 °C durante 30 segundos en un baño de agua). Junto con la pérdida progresiva de motilidad y viabilidad, los resultados mostraron que la membrana que rodea el espermatozoide era la estructura más sensible al daño criogénico, con una hinchazón, ondulación o pérdida variable que afectaba aproximadamente al 50% del número total de espermatozoides, después del equilibrio demográfico y la congelación, aunque se analizaron otras variables, se coincide en esta mencionada, la perdida de motilidad y vitalidad, como también el daño a la membrana plasmática; tal cual lo concluyeron argumentando que, utilizando el protocolo de criopreservación estándar, el daño más pronunciado inducido por la criopreservación se observa en la membrana plasmática. Por tanto, una mayor mejora de los protocolos de criopreservación debería tener como objetivo reducir el daño a la membrana plasmática (Khalil, W. A., et al., 2018).

Muestras aleatorias de criopreservados, semen extraído de leche, recolectado de 20 Toros Holstein alrededor de los 14 meses de edad (joven) y nuevamente aproximadamente a los 4 años de edad (maduros), fueron evaluados en el momento de la descongelación y durante 3 h de incubación para comparar el semen Calidad de toros jóvenes versus toros maduros. Evaluación por interferencia diferencial. La microscopía de contraste mostró mayores proporciones de gotas citoplasmáticas en el semen de toros jóvenes versus toros maduros. Maduros toros exhibieron mayores proporciones de acrosomas intactos en el semen recién descongelado que los toros jóvenes. Evaluación de espermatozoides estructura de la cromatina por citometría de flujo después de teñir con naranja de acridina mostraron valores más bajos para adultos versus toros

jóvenes, lo que indica resistencia de El ADN en la cromatina nuclear a la desnaturalización ácida aumentó con la edad. Correlaciones entre edades para la mayoría de la morfología, el flujo la y integridad del acrosoma en los espermatozoides, las variables de citometría fueron altas y positivas. La tasa de no retorno para los toros jóvenes fue positivamente relacionado con los espermatozoides morfológicamente normales y la integridad acrosómica y relacionado negativamente con la citometría de flujo rasgos. Los resultados sugieren la calidad seminal de machos bovinos jóvenes están relacionados con posteriores calidades como toros maduros. Con el flujo Por citometría se detectaron diferencias entre muestras de semen que no fueron evidentes con microscopía óptica (Karabinus, D. S., et al, 1990).

Afortunadamente y tal lo describe Contreras, et al., (2023), los avances recientes en genómica, transcriptómica, proteómica, metabolómica y epigenética están permitiendo investigar, indagar y avanzar en la razón de los técnicas celulares y moleculares implicados en el proceso de criopreservación en las diferentes especies de interés zootécnico. Estas investigaciones y avances permitirán en un futuro mejorar la metodología de criopreservación sin afectar la calidad del esperma y con ello mantener el potencial de fertilidad que esos tienen.

Capítulo 5. Conclusiones

Se pudo comprobar con esta investigación que la criopreservación afecta la calidad seminal de los toros chinos santandereanos, en cuanto a su motilidad, pero mantiene valores aceptables luego del proceso congelado/descongelado, pudiendo emplear estas pajillas en programas como inseminación artificial.

En este estudio se comprobó que la criopreservación afecta la viabilidad de los espermatozoides, aunque mantiene valores aceptables para usar en programas de biotecnologías reproductivas.

Los espermatozoides funcionalmente competentes de los toros chinos santandereanos, sufren daños durante el proceso de cripreservacion, pero mantienen valores aceptables en las pruebas realizadas congelado/descongelado.

Capítulo 6. Recomendaciones

En el estudio los resultados indican que la criopreservación del semen de toros chino santandereano puede tener un impacto negativo en la motilidad del semen, recomendando a futuras investigaciones hacer uso de técnicas de criopreservación o antioxidantes que minimicen el daño a los espermatozoides.

Se hacen necesarios más estudios con un mayor número de toros para confirmar estos resultados, es un estudio pequeño debido al escaso número de reproductores en el país, para esta investigación se utilizaron 5 toros (tres pruebas por toro, 15 datos).

Se recomienda continuar con estas investigaciones con el objeto de encontrar diluyentes, técnicas y alternativas que no afecten la calidad seminal en el momento de la congelación espermática; las pajillas elaboradas deben ser probadas en programas de inseminación artificial o fertilización in vitro para evaluar su fertilidad posdescongelación.

Referencias

Acevedo Centeno, C. A. (2020). *Evaluación de la aptitud reproductiva en toros de la ganadería maracaibo de la raza brahman y sus cruces*. https://repository.ucc.edu.co/items/d5db4b0b-1d73-461f-b70d-98efd552177c

Agüero Camacaro, G. A. (2012). *Evaluación de las Características Seminales de Sementales Bovinos mediante el Analizador Seminal Computarizado (CASA)* (Doctoral dissertation). http://saber.ucv.ve/handle/10872/3292.

Aguilar Ávila, J., Martínez González, E. G., Aguilar Gallegos, N., & Altamirano Cárdenas, J. R. (2020). Análisis de procesos de innovación en el sector agroalimentario y rural. https://repositorio.chapingo.edu.mx/handle/20.500.12098/758

Akosman, M. S., Lenger, Ö. F., & Demirel, H. H. (2013). Evaluación Morfológica, Estereológica e Histométrica de los Parámetros Testiculares entre Toros Holstein y Simmental. International Journal of Morphology, 31(3), 1076-1080. https://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-95022013000300048&script=sci_arttext

Al-Mutary, M. G. (2021). Use of antioxidants to augment semen efficiency during liquid storage and cryopreservation in livestock animals: A review. Journal of King Saud University-Science, 33(1), 101226. https://doi.org/10.1016/j.jksus.2020.10.023.

Alyethodi, R. R., Sirohi, A. S., Karthik, S., Tyagi, S., Perumal, P., Singh, U., ... & Kundu, A. (2021). Role of seminal MDA, ROS, and antioxidants in cryopreservation and their kinetics under the influence of ejaculatory abstinence in bovine semen. Cryobiology, 98, 187-193. https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.11.002.

Anzola, H., (2005). Conservación y utilización de las razas bovinas criollas y colombianas para el desarrollo rural sostenible. Archivos de Zootecnia, 54 (206-207), 141-144 https://www.redalyc.org/comocitar.oa?id=49520704

Araya-Zúñiga, I., Sevilla, F., Barquero, V., & Valverde, A. (2023). *Efecto del diluyente, la edad y el estado sexual bovino sobre la cinemática del semen.* Agronomía Mesoamericana , 34 (3), https://doi.org/10.15517/am.2023.52597. https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43774930008

Barragán Barragán, I. F. (2017). Evaluación del efecto crioprotector de diferentes fuentes de antioxidantes en el semen bovino (Bachelor's thesis, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo). http://dspace.espoch.edu.ec/bitstream/123456789/7153/1/17T1470.pdf

Barrientos Monsalve, E. J., Velásquez-Carrasca, B. L., & Hoyos-Patiño, J. F. (2021). Contemporaneidad de las corrientes del pensamiento en los paradigmas de investigación. Aglala, 12(S1), 163–181. Recuperado a partir de https://revistas.curn.edu.co/index.php/aglala/article/view/2128

Barrientos-Monsalve Ender José, Sotelo-Barrios Mauricio Enrique y Hoyos-Patiño Johann Fernando (2023). METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN. Guía práctica para la formulación de proyectos de investigación con ejemplos en áreas de administración y diseño. Primera edición. Ocaña, Norte de Santander: Universidad Francisco de Paula Santander; Bogotá: Ecoe Ediciones, 100 páginas. ISBN 978-958-503-827-1 (impreso) -- 978-958-503-828-8 (digital) https://www.researchgate.net/profile/Ender-Barrientos-Monsalve/publication/377656176_Metodologia_de_la_investigacion_Guia_practica_para_la_formulacion_de_proyectos_de_investigacion_con_ejemplos_en_areas_de_administracion_y_diseno/links/65b11cba9ce29c458ba9c1fd/Metodologia-de-la-investigacion-Guia-

practica-para-la-formulacion-de-proyectos-de-investigacion-con-ejemplos-en-areas-de-administracion-y-diseno.pdf

Bernardi, S., Allende, R., Mazzeo, R., Monti, J. y Marini, P. (2011). Evaluación de los cambios ocasionados en espermatozoides bovinos por variaciones en el manejo de las dosis durante su manipulación en inseminación artificial. InVet , 13 (2), 25-38.https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=179122770004

Bollwein, H., & Malama, E. (2023). Evaluation of bull fertility. Functional and molecular approaches. animal, 17, 100795. https://doi.org/10.1016/j.animal.2023.100795

Bonilla Riera, C. S. (2000). Efecto de la refrigeración del semen de carnero durante 24 horas sobre el transporte espermático. https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/25560/1/BonillaRieraClaudiaSof%C3%ADa.pdf

Bonomie Sánchez, ME, & Meleán Romero, R. (2016). Reflexiones teóricas sobre cadenas agroproductivas en el Sector de ganadería bovina. SAPIENTIAE: Revista de Ciencias Sociais, Humanas e Engenharias, 2 (1),21-44.[fecha de Consulta 12 de Enero de 2024]. ISSN: 2183-5063. Recuperado de: https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=572761143003

Bozzi, A. da R., Particelli, L. H., Viana, C. H. C., Quirino, C. R., Andrade, A. F. C. de ., Freitas, F. V. de ., Passarelli, M. da S., Celeghini, E. C. de C., Bedoya, H. J. N., Chay-Canul, A. J., & Costa, R. L. D. da .. (2023). Addition of orange, pineapple and beet juices as extenders for cryopreservation of ram semen. Ciência Animal Brasileira, 24, e–72745. https://doi.org/10.1590/1809-6891v24e-72745E

Cadena Gordillo, R. Uso de las biotecnologías en ganaderías bovinas tomando como modelo el Centro de Biotecnología Reproductiva SAS CGR (2023). https://repository.unad.edu.co/handle/10596/58423

Carpio Chuchuca, S. V. (2015). *Evaluación de dos diluyentes para la crioconservación de semen bovino: yema de huevo vs leche descremada* (Bachelor's thesis).https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/7955.

Carrillo-González, D. F. (2021). Principios básicos de la reproducción e inseminación artificial en bovinos. *inseminación artificial y liderazgo rural*. Disponible en: https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/81417/978-958-794-695-6.2022.pdf?sequence=1#page=21

Chicaiza Cuzco, S. L., & Patricio, C. G. F. (2022). Comparación de la morfología del semen bovino Gyrholando fresco y criopreservado teñidos con Spermac, Triple tinción y Farelly, para determinar la viabilidad y el porcentaje de motilidad progresiva con el equipo CASA. https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/32549/1/T-ESPESD-003233.pdf

Clavijo Echeverri, N. A. (2012). Manual de procedimiento para importación de material genético de las razas Aberdeen Angus y Brangus a Colombia (Doctoral dissertation, Corporación Universitaria Lasallista). http://repository.unilasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/366/1/MANUAL%20DE%20PROCEDIMIENTO%20PARA%20IMPORTACION%20DE%20MATERIAL%20GENETIC.pdf

Contreras, M. J., Arias, M. E., Fuentes, F., Muñoz, E., Bernecic, N., Fair, S., & Felmer, R. (2023). Cellular and molecular consequences of stallion sperm cryopreservation: Recent

approaches to improve sperm survival. Journal of Equine Veterinary Science, 104499. https://doi.org/10.1016/j.jevs.2023.104499

Deppe, Mariana, Jara, Ana Belén, Reyes-Díaz, Marjorie y Risopatrón, Jennie. (2021). Efecto de complementar el medio de incubación con extracto de Berberis microphylla (Calafate) sobre la funcionalidad del esperma en semen bovino descongelado. *Revista Internacional de Morfología* , *39* (1), 25-31. https://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022021000100025

Díaz Duque, N. A., & López Castaño, P. A. (2018). Protocolos de criopreservación de semen bovino.https://repositorio.utp.edu.co/items/b5033abd-1751-4727-9754-efeadf91db6d

Felippelli, G., Toscano, J. H. B., Texeira, W. F. P., Santos, I. B., Cruz, B. C., Maciel, W. G., Soares, V. E., Bresciani, K. D. S., Lopes, W. D. Z., & Costa, A. J.. (2023). Viability of Toxoplasma gondii in cattle semen cryopreserved with different concentrations of cryoprotectant. Pesquisa Veterinária Brasileira, 43, e07106. https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-7106

Fernández, N., Carlos, J., Herrera, P., Vergara, A., Coronado, M., Rúgeles, P., ... & Cardozo, C. (2022). Proteínas del plasma seminal y calidad espermática de toros Romosinuano y Costeño con Cuernos. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, *33*(2).http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172022000200008.

Franganillo, A. R., & Serrano, E. R. (2020). Capítulo 3 la influencia de las razas andaluzas en el mundo. El caso del descubrimiento de américa. Ilustraciones: Museo del Prado. Museo de Bellas Artes de Sevilla. Museo de Bellas Artes de Córdoba. Museo de Málaga. Museo de Bellas Artes de Granada. Museo Cerralbo de MRadrid y Catedral de Sevilla. ISBN

Volumen I: 978-84-8474-226-5 ISBN Obra completa: 978-84-8474-225-8, 83. https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/52352/1337161240Patrimonio_Ganadero_Tomo_I.pdf?sequence=1#page=84

García Elizondo, M. (2023). Éxito de los tratamientos de fecundación in vitro con semen congelado. https://titula.universidadeuropea.com/handle/20.500.12880/6436

Garcia, B. P., & Orellana, E. (2020). Introducción de la Inseminación Artificial utilizando sincronización de celo en un hato de ganado de carne. Disponible en: https://bdigital.zamorano.edu/items/42b40656-47c6-4209-bb79-71877741bdbe

Gibbons, A., Bevacqua, R. J., Fernández-Martín, R., Pereyra-Bonnet, F., Cueto, M., Bruno-Galarraga, M., & Salamone, D. (2014). Transgénesis: una moderna biotecnología reproductiva en animales de interés zootécnico. RIA. Revista de investigaciones agropecuarias, 40(2), 141-144. http://www.scielo.org.ar/pdf/ria/v40n2/v40n2a06.pdf

Giraldo Giraldo, J. J. (2019). Una mirada al uso de la inseminación artificial en bovinos. *Revista Lasallista de investigación*, *16*(1), 244-252. Disponible en: http://www.scielo.org.co/pdf/rlsi/v16n1/1794-4449-rlsi-16-01-244.pdf

Gómez López, D. L., Cortés Escobar, M. A., Martínez Rocha, J. F. (2023). Guía de manejo del semen bovino durante su colecta y envío para la criopreservación de pajillas seminales. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (agrosavia). https://doi.org/10.21930/agrosavia.analisis.7406436

Gómez Parra, F. (2023). Caracterización *de variables morfométricas, cinéticas, de bienestar animal en ganado Blanco Orejinegro.* https://repositorio.ucaldas.edu.co/handle/ucaldas/18913

González, D. F., & Trujillo P, Y. T., (2018). Técnicas in vitro para la valoración espermática en bovinos. Disponible en: http://repository.ucc.edu.co/bitstream/20.500.12494/6111/1/2018_tecnicas_in_vitro.pdf.pdf

Gutiérrez, M. J. E. M. (2017). Evaluación pre y post congelación del semen obtenido con vagina artificial y electroeyaculador en el ganado criollo (Doctoral dissertation, UNIVERSIDAD DE CUENCA). http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/26940/1/Tesis.pdf

Guzman Santaria, C. (2024). Aplicación de la GnRH post-inseminación con semen sexado sobre la preñez de vacas Holstein de crianza intensiva. https://repositorio.unsch.edu.pe/handle/UNSCH/6315

Hernández Sampieri, R., Fernández Collado, C., & Baptista Lucio, P. (2014). Metodología de la investigación (6a. ed. --.). México D.F.: McGraw-Hill.

Hernández, A., Rojas, B. C., Pérez, L. A., Cárdenas, T., & Corrales, X. (2019). *Planeamiento estratégico para el sector ganadería bovina en Colombia* (Doctoral dissertation, Pontificia Universidad Católica del Perú. https://www.proquest.com/openview/72f7ba876654205e3e26e1cb35dbdf07/1?pq-origsite=gscholar&cbl=18750&diss=y

Hidalgo Ordóñez, C. O., Tamargo Miguel, C., & Díez Monforte, C. (2005). Análisis del semen bovino. https://ria.asturias.es/RIA/handle/123456789/192

Honig, A. C., Inhuber, V., Spiekers, H., Windisch, W., Götz, K. U., Schuster, M., & Ettle, T. (2022). Body composition and composition of gain of growing beef bulls fed rations with varying energy concentrations. Meat science, 184, 108685. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0309174021002618

Hoyos-Patiño, J. F. (2022). Indicadores de bienestar animal en bovinos. Mundo FESC, 12(23), 41-50. Recuperado a partir de https://www.fesc.edu.co/Revistas/OJS/index.php/mundofesc/article/view/984

Hoyos-Patiño, Johann Fernando and Hernández-Villamizar, Daniel Antonio and Velasquez-Carrascal, Blanca Liliana, Condiciones de bienestar en sistemas de producción animal (June 4, 2021). Available at SSRN: https://ssrn.com/abstract=4182002 or http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.4182002

Jácome, A., Ismael, A., Zambrano Montesdeoca, Á. A., Valdivieso Plaza, F. A., & Domingo-Ecuador, S. (2021).Evaluación de la aplicación de metil–β–ciclodextrina más colesterol en la criopreservación de semen bovino.https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/25806/1/T-ESPESD-003114.pdf

Jakop, U., Engel, K. M., Hürland, M., Müller, P., Osmers, J. H., Jung, M., & Schulze, M. (2023). Lipid alterations by oxidative stress increase detached acrosomes after cryopreservation of semen in Holstein bulls. Theriogenology, 197, 37-45. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.11.036.

Jiménez, H. R., Bejarano, D. H., Penagos, J. H. V., Rivera, E. N., Barandica, L. A. R., & Almario, C. G. (2021). Estado actual del Banco de Germoplasma Animal en Colombia: organización y manejo. *Latin American Archives of Animal Production*, *29*(3-4), 151-162. http://ojs.alpa.uy/index.php/ojs_files/article/view/2808/1399

Karabinus, D. S., Evenson, D. P., Jost, L. K., Baer, R. K., & Kaproth, M. T. (1990). Comparison of semen quality in young and mature Holstein bulls measured by light microscopy and flow cytometry. Journal of dairy science, 73(9), 2364-2371. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(90)78919-9

Khalil, W. A., El-Harairy, M. A., Zeidan, A. E., Hassan, M. A., & Mohey-Elsaeed, O. (2018). Evaluation of bull spermatozoa during and after cryopreservation: Structural and ultrastructural insights. International Journal of Veterinary Science and Medicine, 6, S49-S56. https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2017.11.001

Khosrozadeh, F., Karimi, A., Hezavehei, M., Sharafi, M., & Shahverdi, A. (2022). Preconditioning of bull semen with sub-lethal oxidative stress before cryopreservation: possible mechanism of mitochondrial uncoupling protein 2. Cryobiology, 104, 63-69. https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2021.11.001.

Layek, S. S., Mohanty, T. K., Kumaresan, A., & Parks, J. E. (2016). Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders. Animal reproduction science, 172, 1-9. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.04.013

Larocca, C, & Filipiak, Y. (2017). Semen Bovino Sexado Congelado-Descongelado en Producción de Embriones In vitro. *International Journal of Morphology*, *35*(1), 371-375. https://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022017000100059

Liu, S., Ma, X., Wang, Z., Lin, F., Li, M., Li, Y., ... & Deng, T. (2023). MAEL gene contributes to bovine testicular development through the m5C-mediated splicing. Iscience, 26(2). https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.105941

Londra, T. A. (2021). Microbiología del semen bovino: efecto sobre la calidad seminal. https://repositorio.unnoba.edu.ar/xmlui/handle/23601/469

Lonergan, P. (2018). Historical and futuristic developments in bovine semen technology. animal, 12(s1), s4-s18. https://doi.org/10.1017/S175173111800071X.

Lozano, H. (2009). Factores que afectan la calidad seminal en toros. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, *56*(III), 258-272. https://www.redalyc.org/pdf/4076/407639221010.pdf

Martínez Correal, G. (2004). Razas bovinas: criollas y colombianas. https://n9.cl/mb39u

Medina-Robles, VM, Sánchez-Carvajal, E., Velasco-Santamaria, Y. y Cruz-Casallas, PE (2007). Crioconservación de semen bovino usando un congelador programable (CL-8800) y determinación de su calidad postdescongelación por medio de un sistema de análisis espermático asistido por computador (CASA). Orinoquía , 11 (1), 75-86. https://www.redalyc.org/comocitar.oa?id=89611108

Montovio, E. (2021). *Evaluación de toros raza Hereford para función productiva y reproductiva en una cabaña de la Patagonia Norte* (Doctoral dissertation).https://rid.unrn.edu.ar/handle/20.500.12049/8246

Montoya-Páez, Juan David, Giraldo-León, Mariana, & Duque-Cortes, Juan Esteban. (2020). Evaluación de tres concentraciones de yema de huevocentrifugada en la criopreservación de semen bovino. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, *31*(2), e17818. https://dx.doi.org/10.15381/rivep.v31i2.17818

Ocampo Gallego, R. J., Rincón Flórez, J. C., & Bejarano Garavito, D. H. (2021). Genomic characterization of the nucleus for conservation of the Chino Santandereano breed using SNP markers. *Tropical Animal Health and Production*, *53*(5), 492.https://link.springer.com/article/10.1007/s11250-021-02936-4

Ordóñez, G., Avilés, D., Borja, B., & Condolo, L. (2021). Relación entre enfermedades infecciosas y parámetros reproductivos con énfasis en el perfil reproductivo. *Actas*

Iberoamericanas de Conservación Animal. AICA, *16*, 48-55.https://www.researchgate.net/profile/Diana-Aviles

Ortega Torres, J., & García, LF (2010). Polimorfismo de microsatelites en individuos de razas de bovino criollo colombiano. Acta Biológica Colombiana , 15 (1), 223-235.https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=319027884015

Pacheco, H. A., Battagin, M., Rossoni, A., Cecchinato, A., & Peñagaricano, F. (2021). Evaluation of bull fertility in Italian Brown Swiss dairy cattle using cow field data. Journal of Dairy Science, 104(10), 10896-10904. https://doi.org/10.3168/jds.2021-20332

Páez-Barón, EM, & Corredor-Camargo, ES (2014). Evaluación de la aptitud reproductiva del toro. Ciencia y Agricultura , 11 (2), 49-59. https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=560058659007

Palacios-Lozano, M. T., Camacho Rojas, A., Pinto, A., & Rojas, L. (2019). Bases técnicas para la formulación de la política nacional de ganadería bovina sostenible-Colombia (BT-PNGBS). https://www.minagricultura.gov.co/Normatividad/Resoluciones/RESOLUCI%C3%93N%20NO.%20000126%20DE%202022.pdf

Parra Vanegas, E. (2022). Sistema de producción, composición de la leche y sanidad de la ubre en vacas de la raza criolla, Chino Santandereano. https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1022&context=maest_agrocienciaas.

Pérez-Durand, M. G., Luque-Mamani, N., Quispe-Quispe, A. E., Condori-Chuchi, E. A., Rodríguez-Huanca, F. H., Manrique-Quispe, Y. P., & Perez-Guerra, U. H. (2022). Evaluación de la sobrevivencia y fertilidad in vivo de espermatozoides del epidídimo de

toros criollos post mortem. Ariotake–Revista de Investigación Veterinaria y Amazonía, 1(2), e186-e186. https://revistas.unamad.edu.pe/index.php/ariva/article/view/186

Pinto, S. C. C., Souza, F. A., Arruda, R. P., Alves, M. B. R., Batissaco, L., Garcia-Oliveros, L. N., Passarelli, M. S., Carneiro, L. C., & Celeghini, E. C. C.. (2023). Impact of adding different concentrations of IGF-I and insulin to the semen extender on bull sperm quality post-cryopreservation. Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinária E Zootecnia, 75(5), 771–786. https://doi.org/10.1590/1678-4162-12946

Portocarrero, G. S., Quispe-Ccasa, H. A., Saucedo-Uriarte, J. A., Rojas, A. P., Valderrama, N. M., Polanco, J. C., & Trigoso, G. A. (2023). Efecto de dos temperaturas de dilución sobre la calidad de semen en ganado cebuino del Trópico Peruano. *Revista Veterinaria*, *34*(1), 33-39. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S1669-68402023000100012&script=sci_arttext

Restrepo Guzmán, J. C., Balanta Giraldo, A., Rojas López, M., Zapata Carmona, K. V., Restrepo Betancur, G., & Úsuga Suarez, A. (2023). Efecto de la raza sobre la protaminación espermática y su relación con la calidad de espermatozoides bovinos criopreservados.https://repository.ces.edu.co/handle/10946/8035

Ronda, J. B., Ribeiro, G. L., Jacomini, J. O., Quintal, A. P. N., & Vasconcelos, A. B. de .. (2019). *Classificação andrológica por pontos e características andrológicas na avaliação reprodutiva de touros da raça gir candidatos ao teste de progênie.* Ciência Animal Brasileira, 20, e–44670. https://doi.org/10.1590/1809-6891v20e-44670

Rosete Fernández, J. V., Álvarez Gallardo, H., Urbán Duarte, D., Fragoso Islas, A., Asprón Pelayo, M. A., Ríos Utrera, Á., ... & Torre Sánchez, J. F. D. L. (2021). Biotecnologías reproductivas en el ganado bovino: cinco décadas de investigación en México. *Revista*

mexicana de ciencias pecuarias, *12*, 39-78. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-11242021000500004&script=sci_arttext

Ruiz Castro, D. M. (2014). Estimación de la heredabilidad para el peso al nacimiento y el peso al destete en la raza chino santandereano y sus cruces en el departamento de Santander.Disponible en https://repository.unad.edu.co/bitstream/handle/10596/2597/63554613.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Ruiz-Sesma, B., Herrera-Haro, J. G., Rojas-Martínez, R. I., Mendoza-Nazar, P., Ruiz-Sesma, H., & Ruiz-Hernández, H. (2021). Caracterización del sistema doble propósito bovino y evaluación reproductiva de toros en el estado de Chiapas. Ecosistemas y Recursos Agropecuarios, 8(II). https://era.ujat.mx/index.php/rera/article/view/2811

Saad, P. M., Miller, T., & Martínez, C. (2009). Impacto de los cambios demográficos en las demandas sectoriales en América Latina. Revista brasileira de estudos de população, 26, 237-261. https://www.scielo.br/j/rbepop/a/wZ6KNYdpv9BXMnKfY79TrDh/citation/?lang=es

Salazar Caraballo, L. A. (2016). Evaluación del efecto de un suplemento dietario sobre la calidad seminal de cerdos reproductores. https://repositorio.unisucre.edu.co/handle/001/563

Salgado Otero, R., Vergara Avilez, M., & Vergara Garay, O. (2015). Impacto de la Utilización de Inseminación Artificial con Detección de Celo e Inseminación Artificial a Término Fijo en Vacas Mestizas Manejadas Bajo el Sistema Doble Propósito. Revista Científica , XXV (1), 57-62. https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=95934122009

Sánchez, C. A., Jiménez, L. M., & Bueno, M. L. (2006). Transnslocación Robertsoniana (1; 29) En Bovinos Criollos Colombianos. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de*

Zootecnia, *53*(2), 75 85.https://revistas.unal.edu.co/index.php/remevez/article/view/17810/18721

Sanz Pascua, A. (2021). La inseminación artificial a tiempo fijo tiene ventajas reproductivas y genéticas [entrevista]. https://citarea.cita-aragon.es/bitstream/10532/5259/1/2021_057.pdf

Silva Silveira, C. D. (2019). Enfermedades infecciosas que causan abortos en bovinos con enfoque en rodeos lecheros de Uruguay. https://bibliotecadigital.fvet.edu.uy/handle/123456789/2693

Silva, C., Aké, R. y Valle, R. (2002). Edad y crecimiento a la pubertad en toros Suizo Pardo en condiciones tropicales. Revista Cubana de Ciencia Agrícola , 36 (3), 205-210. https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193018103002

Silveira Prado, EA, González García, O., & Espinosa Véliz, L. (2005). Conservación del semen bovino con 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-Furano. REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria, VI (11), 1-9. https://www.redalyc.org/comocitar.oa?id=63617170019

Suleiman-Martos, Nora, García-Lara, Rubén Antonio, Narbona-Sánchez, Isaac, & Domínguez-Vías, Germán. (2022). Proyecto Lázaro (2016): de la criopreservación celular a humana. Mito y realidad para la formación docente en el área de Ciencias de la Salud. *Revista de Medicina y Cine*, *18*(3), 193-204. Epub 07 de noviembre de 2022.https://dx.doi.org/10.14201/rmc.27412

Ugalde, J. R. (2014). Biotecnologías reproductivas para el siglo XXI. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, *48*(1), 33-34. https://www.redalyc.org/pdf/1930/193030122009.pdf

Vargas, C. F. (2001). Raza Chino Santandereano (Chino). https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/17104/41405_27731.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Valdez Torres, J. (2018). Adición de fuentes antioxidantes al diluyente de semen bovino y sus efectos posdescongelamiento (Doctoral dissertation, Universidad Autonoma De Chihuahua). http://repositorio.uach.mx/159/

Valverde Abarca, A., & Madrigal Valverde, M. (2018). Computer-assisted semen analysis systems in animal reproduction. Agronomía Mesoamericana, 29(2), 469–484. https://doi.org/10.15517/ma.v29i2.30613

Valverde, A. (2021). Importancia de la evaluación de la aptitud reproductiva mediante el análisis de semen por sistemas CASA. *Investiga. TEC*, *1*(40). https://revistas.tec.ac.cr/index.php/investiga_tec/article/download/5616/5404

Varela, E., Rojas, M., & Restrepo, G. (2020). Asociación entre parámetros convencionales y computarizados de calidad seminal con la evaluación por citometría de flujo de semen bovino congelado. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, 31(4). http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v31i4.19023.

Vargas, C. F. (2001). Raza Chino Santandereano (Chino) https://repository.agrosavia.co/handle/20.500.12324/17104

Vega, D. A., & Narváez, H. J. (2021). ASPIRACIÓN FOLICULAR EN VACAS CRIOLLAS DE RAZA CHINO SANTANDEREANO. https://www.researchgate.net/profile/Hector-Narvaez-2/publication/353368670_ASPIRACION_FOLICULAR_EN_VACAS_CRIOLLAS_DE_RAZA_CHINO_SANTANDEREANO/links/60f82ebb2bf3553b29027ab5/ASPIRACION-FOLICULAR-EN-VACAS-CRIOLLAS-DE-RAZA-CHINO-SANTANDEREANO.pdf

Villa-Duque, N., Valencia-Giraldo, J. A., Gómez-Londoño, G., & Henao-Uribe, F. J. (2016). Efecto de los errores en la inseminación con semen congelado sobre la morfofisiología

espermática bovina. Orinoquia, 20(1), 46-55. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-37092016000100005&lng=es&tlng=es

Zenteno, E. S., Rojano, B., & Betancur, G. R.. (2023). *Influence of thawing temperature on sperm motility, structure, and metabolism of frozen bovine semen*. Ciência Rural, 53(3), e20210731. https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20210731

Apéndices

Apéndice A Cronograma de actividades

Objetivo General	Objetivos Específicos	Actividades	Mes 1				Mes 2				Mes 3			
			S1	S2	S3	S4	S1	S2	S 3	S4	S1	S2	S3	S4
Evaluar el efecto de la criopreservación del semen de toros chino santandereano sobre la calidad seminal.		Elaboración de propuesta. Presentación de anteproyecto. Revisión de literatura.												
	Valorar el efecto de la criopreservación sobre la vitalidad del semen de toros chino santandereano.	Analizar las muestras espermáticas en el laboratorio de biotecnología reproductiva en la UNIPAZ, utilizando el programa C.A.S.A.												
	Estimar el efecto de la criopreservación sobre la motilidad del semen de toros chino santandereano.													
	Valorar el efecto de la criopreservación sobre los espermatozoides funcionalmente competentes (EFC) del semen de toros chino santandereano.													
		Tabular la información. Análisis y discusión de resultados												

Nota. Actividades para el desarrollo del proyecto.

Apéndice B Presupuesto desarrollo del proyecto

Rubro	Unidad	Cantidad	Precio Unitario	Subtotal
Guantes	caja	1	23.000	23.000
Pajillas	Pajilla	15	30.000	450.000
Material de laboratorio	Unidad	5	100.000	500.000
Transporte	Unidad	5	150.000	750.000
Internet	Mes	3	60.000	180.000
Recurso humano		2	3.000.000	6.000.000
			Total	**7.903.000**

Nota. Presupuesto total.