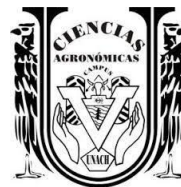




**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIAPAS
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
CAMPUS V**



**Protocolos de criopreservación espermática para la conservación
ex situ de bovinos (*Bos taurus*) localmente adaptados en
Huajuapán de León, Oaxaca**

TESIS

Que para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA
TROPICAL**

Presenta

NÉSTOR ALONSO LÓPEZ OCHOA F131025

Director de tesis

DR. HORACIO LEÓN VELASCO

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México

Agosto, 2023



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIAPAS
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS, *CAMPUS V.*
DIRECCIÓN



Villaflores, Chiapas
24 de agosto de 2023
Oficio N° FCACV/D/0899/23

C. NÉSTOR ALONSO LÓPEZ OCHOA
MAESTRANTE EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA TROPICAL
DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS *CAMPUS V*
P R E S E N T E.

En atención a que usted ha presentado los votos aprobatorios del Honorable Jurado designado para su evaluación de posgrado, de la tesis titulada: "**Protocolos de criopreservación espermática para la conservación ex situ de bovinos (*Bos taurus*) localmente adaptados en Huajuapán de León, Oaxaca**", por este conducto le comunico que se le autoriza la impresión del documento, de acuerdo a los lineamientos vigentes de la Universidad.

Sin otro particular, le envío un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR LA CONCIENCIA DE LA NECESIDAD DE SERVIR"

FACULTAD DE
CIENCIAS AGRONOMICAS

M. C. CARLOS ALBERTO VELAZQUEZ SANABRIA
DIRECTOR



C. c. p. Archivo

CAVS*marh.

DEDICATORIA

A MIS PADRES

Quienes me dieron la vida, me inculcaron valores, han luchado a mi lado a largo de todo este proceso, me han aconsejado y apoyado en las decisiones que he tomado a lo largo de mi vida tanto en mi desarrollo personal como profesional.

A MIS ABUELOS

Quienes nunca han dejado de cuidarme, aconsejarme y preocuparse por mí. Que con su ejemplo de vida me han enseñado que con trabajo y esfuerzo se llega al éxito.

A MIS HERMANOS

Con mucho cariño por todo el apoyo y espero que sirva de motivación para su desarrollo profesional.



Código: FO-113-05-05

Revisión: 0

CARTA DE AUTORIZACIÓN PARA LA PUBLICACIÓN ELECTRÓNICA DE LA TESIS DE TÍTULO Y/O GRADO.

El (la) suscrito (a) Néstor Alonso López Ochoa, Autor (a) de la tesis bajo el título de “Protocolos de criopreservación espermática para la conservación *ex situ* de bovinos (*Bos taurus*) localmente adaptados en Huajuapán de León, Oaxaca” presentada y aprobada en el año 2023 como requisito para obtener el título o grado de Maestro en Ciencias en Producción Agropecuaria Tropical, autorizo licencia a la Dirección del Sistema de Bibliotecas Universidad Autónoma de Chiapas (SIBI-UNACH), para que realice la difusión de la creación intelectual mencionada, con fines académicos para su consulta, reproducción parcial y/o total, citando la fuente, que contribuya a la divulgación del conocimiento humanístico, científico, tecnológico y de innovación que se produce en la Universidad, mediante la visibilidad de su contenido de la siguiente manera:

- Consulta del trabajo de título o de grado a través de la Biblioteca Digital de Tesis (BIDITE) del Sistema de Bibliotecas de la Universidad Autónoma de Chiapas (SIBI-UNACH) que incluye tesis de pregrado de todos los programas educativos de la Universidad, así como de los posgrados no registrados ni reconocidos en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad del CONACYT.
- En el caso de tratarse de tesis de maestría y/o doctorado de programas educativos que sí se encuentren registrados y reconocidos en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), podrán consultarse en el Repositorio Institucional de la Universidad Autónoma de Chiapas (RIUNACH).

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas; a los 30 días del mes de agosto del año 2023.

Néstor Alonso López Ochoa

Nombre y firma del Tesista o
Tesisistas

AGRADECIMIENTOS

A Dios por estar conmigo siempre, por darme la sabiduría para poder desarrollarme profesionalmente, por bendecirme siempre y poner en mi camino a personas que me han apoyado en todo momento, muchas gracias.

A mis padres, Edelmira Ochoa Mendoza y Porfirio López Alonso por enseñarme que hay que sacrificar muchas cosas para obtener el éxito, por apoyarme en todas las decisiones de mi vida, por esforzarse y luchar conmigo todo este tiempo para poder llegar hasta aquí.

A mi director de tesis, Dr. Horacio León Velasco, codirector Leonardo Gordillo Paez, asesores, Dr. Raúl Andrés Perezgrovas Garza y Dr. Víctor Hugo Severino Lendecky por confiar en mí para la realización de esta investigación y guiarme en todo el proceso, del mismo modo por transmitirme sus conocimientos.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por valioso apoyo como becario, sin duda alguna fue de mucha importancia para la realización de este estudio.

Contenido

	Páginas
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Objetivo general.....	3
1.2 Objetivos específicos	4
1.3 Hipótesis	4
2. REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1 Origen y domesticación de los animales de producción	5
2.2 Llegada y distribución de los bovinos a la Nueva España.....	6
2.3 Distribución de los bovinos en México	7
2.4 Características de los bovinos localmente adaptados en México	8
2.4.1 Bovino criollo Mixteco	11
2.5 Importancia de la caracterización y conservación de los recursos genéticos. 12	
2.6 Estrategias para la conservación de los recursos genéticos animales	14
2.7 Criopreservación de semen como herramienta de conservación de germoplasma de bovinos localmente adaptados.....	15
2.7.1 Métodos de colecta de semen	16
2.7.2 Evaluación seminal.....	16
2.7.3 Retiro del plasma seminal previo al procesamiento para la criopreservación de semen	17
2.7.4 Dilución del semen	18
2.7.5 Refrigeración y equilibrio de semen diluido pre-congelación	21
2.8 Evaluación espermática pos descongelación mediante sistemas de análisis espermático asistido por computadora (CASA)	21
2.9 Parámetros espermáticos pos descongelado establecidos para bovinos	24
3.1 Localización del área de estudio.....	25
3.2 Objeto de estudio	25
3.3 Metodología.....	26
3.3.1 Preparación de los diluyentes	26
3.3.2 Colecta de semen.....	27
3.3.3 Análisis macroscópico y microscópico del semen precongelación.....	29
3.3.4 Retiro del plasma seminal para la criopreservación de semen.....	32
3.3.5 Comparación de dos diluyentes para la criopreservación de semen bovino	33

3.3.6 Equilibrio de semen y diluyentes para la criopreservación de semen bovino	33
3.3.7 Evaluación de diferentes protocolos de criopreservación espermática.....	34
3.3.8 Evaluación del semen congelado-descongelado	36
3.4 Análisis estadístico	37
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
4.1 Evaluación en fresco de semen de bovinos localmente adaptados.....	39
4.2 Efecto del retiro del plasma seminal sobre la calidad pos descongelado de espermatozoides de bovinos localmente adaptados	41
4.3 Efecto de diluyentes de origen animal y vegetal sobre la viabilidad espermática pos descongelado	43
4.4 Evaluación de la criopreservación de semen bovino con diferentes tiempos de equilibrio.....	45
4.5 Efecto de diferentes protocolos de criopreservación sobre la viabilidad espermática de bovinos localmente adaptados	47
5. CONCLUSIONES	53
6. LITERATURA CITADA	54

1. INTRODUCCIÓN

Los bovinos localmente adaptados o comúnmente llamados “criollos” son animales originarios en el Continente Americano, descendientes de los animales que llegaron en el siglo XV por los conquistadores españoles. Estos individuos son de talla mediana, con características morfométricas similares a sus ancestros, entre ellas: la presencia de cuernos largos dirigidos hacia arriba y enfrente, orejas pequeñas y horizontales, prepucio corto y mucosas sin pigmentar (Quiroz, 2007). Además, tienen más de 500 años de memoria evolutiva, lo que les ha permitido desarrollarse en diferentes entornos, y ha sido factor para adquirir ciertas características de rusticidad para mantenerse y reproducirse con insumos locales de las diferentes regiones.

Sin embargo, estos bovinos criollos están siendo sustituidos por razas comerciales, ya que se infiere que son poco productivos, lo que ha provocado que estos animales se establezcan principalmente en asentamientos indígenas o en zonas alejadas de las grandes producciones, donde explotar a estos individuos es la opción idónea para realizar la ganadería. A pesar de ello, el material genético poco a poco se va erosionando con la incorporación de las nuevas razas transfronterizas, principalmente cebuinas o europeas especializadas, generando el incremento en peligro de extinción de la proporción de ganado localmente adaptado con un aumento del 15 al 17% del 2005 a 2014 (FAO, 2010).

El desplazamiento de las razas bovinas localmente adaptadas o criollas se puede atribuir al incremento poblacional y a la expansión de la mancha urbana hacia territorios donde antes se establecían la agricultura y la ganadería, lo que exige un sistema de producción más intensificado donde se necesita una producción más eficiente en menos tiempo y espacio geográfico. Es por esta razón que se incorporaron sistemas de producción con razas “mejoradas” para satisfacer las demandas de la actualidad; no obstante, la característica de este sistema es la uniformidad de las razas y líneas utilizadas la cuales buscan mayor producción a dejando de lado de la diversidad; esto se debe a que, cuando se seleccionan individuos para una producción especializada, se descartan otras características

como la capacidad de adaptarse a las diversas condiciones climáticas, la resistencia a enfermedades o sobrevivir y producir únicamente con los recursos locales.

Aunque los bovinos localmente adaptados presentan algunos aspectos de producción menos competitivos en relación con las razas comerciales, la perspectiva puede ser diferente si se confrontan las condiciones en las que estos se desarrollan, debido a que los primeros tienen la capacidad de sobrevivir y producir en un sistema tradicional con un manejo sanitario a veces deficiente y en condiciones hostiles, donde los pastos suelen ser de baja calidad y los terrenos irregulares. Las razas especializadas no podrían sobrevivir en esas condiciones, ya que una producción especializada demanda un manejo nutricional y sanitario estricto, además de condiciones medio ambientales óptimas para su desarrollo.

Organizaciones como la FAO, han realizado esfuerzos para conservar el recurso zogenético local y han planteado estrategias de conservación, las cuales pueden ser a través del uso continuo de los individuos en sistemas de producción, en los cuales han evolucionado y se reproducen actualmente (*in situ*), o mediante condiciones artificiales como la criopreservación de gametos, embriones o células somáticas que tienen la capacidad de reconstruir una población animal en un futuro determinado (*ex situ*).

Dentro de los métodos de conservación *ex situ* se encuentra la criopreservación de semen, la cual consiste en la colecta, evaluación, dilución, congelación y almacenamiento de espermatozoides en pequeñas dosis, lo que permite entre otras cosas una mayor capacidad de servicio por eyaculado, almacenamiento prolongado que puede durar años en las condiciones adecuadas y se presenta como una herramienta más económica comparada con el transporte y manutención de animales para un servicio natural. Además, con esta técnica se eliminan las cuarentenas por introducción de nuevos sementales, lo que aumenta la bioseguridad de los hatos, todo esto, favoreciendo a la preservación de las diversas razas de bovinos a nivel mundial.

Aunque la criopreservación de semen bovino es una excelente herramienta para la conservación, el eyaculado no siempre es de buena calidad, debido a que en

algunas ocasiones la concentración espermática no es la ideal para incorporar diluyentes para la criopreservación; esto, aunado a la poca disponibilidad y el difícil acceso a sementales localmente adaptados, dificulta en algunos casos la conservación del germoplasma. Por lo anterior, es imprescindible desarrollar protocolos desarrollando una técnica específica para este tipo de individuos, que permita criopreservar el germoplasma por medio de los espermatozoides, todo esto, con la finalidad de salvaguardar el recurso zoogenético local además de asegurar fuentes de alimentos de origen animal manteniendo la riqueza tanto cultural como ecológica.

En consideración a los enunciados anteriores, se plantean las siguientes preguntas de investigación:

- ¿Cuál es la calidad del semen fresco de los bovinos localmente adaptados?
- ¿Cuál es el efecto del retiro del plasma seminal sobre la criopreservación de semen?
- ¿Cuál es la diferencia en la viabilidad espermática pos descongelado entre un diluyente de origen vegetal y uno de origen animal?
- ¿Qué diferencias existen con el uso de distintos tiempos de equilibrio sobre la viabilidad de espermatozoides congelados-descongelados?
- ¿Cuál será el efecto sobre la viabilidad espermática utilizando diferentes protocolos con diferentes técnicas (con y sin plasma seminal), diluyentes y tiempos de equilibrio?

1.1 Objetivo general

Evaluar diferentes protocolos de criopreservación espermática para la conservación ex situ de bovinos (*Bos taurus*) localmente adaptados en Huajuapán de León, Oaxaca.

1.2 Objetivos específicos

- a) Evaluar la calidad de semen fresco de bovinos localmente adaptados
- b) Contrastar el efecto del retiro de plasma seminal sobre la viabilidad espermática pos descongelado
- c) Comparar el efecto de diluyentes de origen animal y vegetal sobre la viabilidad espermática pos descongelado
- d) Evaluar la criopreservación de semen bovinos con diferentes tiempos de equilibrio
- e) Evaluar el efecto de diferentes protocolos de criopreservación sobre la viabilidad espermática.

1.3 Hipótesis

- a) La calidad seminal en fresco de bovinos criollos mixtecos es similar a la reportada en diversos trabajos con la misma raza criolla
- b) La criopreservación sin plasma seminal tendrá mejor eficiencia sobre la viabilidad espermática
- c) La viabilidad espermática pos descongelado es diferente entre los criopreservados con diluyente a base de lipoproteínas de origen animal y vegetal
- d) Existe diferencia en la criopreservación espermática entre los diferentes tiempos de equilibrio
- e) Existe un efecto sobre la viabilidad espermática con los diferentes protocolos de criopreservación.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Origen y domesticación de los animales de producción

Los recursos zoogenéticos y la diversidad de estos son esenciales para la producción de proteína de origen animal, debido a que estos son la base para el mejoramiento genético y la adaptación de los individuos a los entornos cambiantes de la actualidad, se ha descrito que la diversidad en las razas de ganado bovino locales son superiores a las razas comerciales, es por esto importante conocer el origen y distribución de estos bovinos para su adecuada utilización y conservación Hanotte *et al.* (2006).

La FAO (2010) establece que existieron diferentes eventos de domesticación de especies pecuarias en distintas áreas geográficas, siendo inevitable el cruzamiento entre individuos domesticados y salvajes de la misma especie, las cuales dieron como origen a las diversas especies de ganado que se conocen en la actualidad; a estas áreas geográficas donde ocurrieron dichos sucesos se les conoce como centros de domesticación. Se cree que en el mundo existieron aproximadamente 12 centros de domesticación de especies ganaderas.

Se ha relacionado a la domesticación animal con la evolución de los cazadores al tratar de manejar o domar a animales salvajes (Diamond, 2002). Sin embargo, fue hasta finales del periodo de pleistoceno cuando se data del inicio de la domesticación, se menciona que, debido a los cambios climáticos, donde se empezaron a marcar climas más cálidos y estacionales en determinadas zonas, lo que provocó que las poblaciones humanas se expandieran en búsqueda de condiciones óptimas para su desarrollo. Debido a esto, las poblaciones desarrollaron nuevas estrategias para la alimentación como la producción agrícola, se modificó la distribución y cantidad de animales que se cazaban. Es por esto que se cree que la principal causa de la domesticación de los animales fue la necesidad de las poblaciones humanas por asegurar alimento disponible para su consumo (FAO, 2010).

2.2 Llegada y distribución de los bovinos a la Nueva España

Los bovinos localmente adaptados o como se conoce comúnmente bovino criollo, son individuos *Bos taurus* que nacieron en el Continente Americano y que sus padres fueron introducidos desde Europa, principalmente de España posterior a la conquista, estos animales desarrollaron una excelente memoria evolutiva lo que tuvo como consecuencia una gran adaptación a las diversas condiciones ecológicas de América, debido a que estos animales se han desarrollado en diferentes ambientes determinados y se han adaptado a diversos efectos de selección natural, es importante conservarlos, para esto es necesario que intervengan diversos actores tanto del sistema productivo como científico (De Alba, 1981; Sponenberg, 2008).

Primo (1992) comenta que los bovinos criollos de América son descendientes directos de los animales que desembarcó Cristóbal Colón en su segunda expedición en 1493, los cuales provenían de la isla La Gomera en el archipiélago de Canarias; los bovinos llegaron en primer lugar a la isla denominada por el mismo Colón como La Española, que en la actualidad es conocida como República Dominicana y Haití.

Los bovinos ingresaron al continente americano por Santa Marta, Colombia, y a partir de ahí, se dio lugar a la distribución por las nuevas tierras. Una subcorriente ingresó a Venezuela con dirección al sur, donde Lima constituyó un centro importante de distribución de donde los bovinos migraron por Bolivia, Paraguay y Chile hasta establecerse en Argentina y Uruguay. Otro grupo de animales llegó desde Brasil y se dispersó por el Río de la Plata (*op. cit.*).

Las razas que se utilizaron como base para la formación de las razas criollas que se conocen actualmente fueron: La raza palmera de canarias, la canaria o criolla de canarias, retinta andaluza, asturiana y gallega. Estos animales llegaron principalmente de Sevilla y en menor proporción de los puertos de Cádiz y Andalucía (Rodero *et al.*, 1992).

2.3 Distribución de los bovinos en México

En el segundo viaje de Cristóbal Colón hacia la nueva España fueron enviados animales para crianza en la nueva tierra dentro de los cuales se encontraban parejas de bovinos. Estos animales desembarcaban en la Española y su distribución por todo el nuevo continente fue un proceso lento y complicado debido a que estos animales eran difíciles de manejar y por las dimensiones de las naves de esos tiempos, además que el proceso de adaptación a las nuevas tierras fue complicado, por esta razón las autoridades de la Española detuvieron la salida de bovinos de la isla y solicitaban a la Corona nuevas embarcaciones de bovinos jóvenes. Otra de las razones por las que los bovinos tuvieron un proceso lento de distribución fue que en los envíos posteriores se embarcaban animales de otras especies como cerdos, cabras y ovejas para la producción de carne, debido a que estos animales por su menor tamaño eran más fáciles de embarcar y trasladar (Sastre, 2003).

Los bovinos criollos mexicanos son muy parecidos con los de otros países del Norte, Centro y Sudamérica, esto debido a que comparten la misma procedencia. Los estudios sobre estos individuos han tomado una gran relevancia, como resultado se han descrito diversas razas de animales criollos en diferentes regiones y se ha encontrado que durante el tiempo en el que permanecieron estos animales en La Española, se tuvo una reproducción sin un control, lo que ocasionó que al trasladar a los animales a tierra firme, estos presentaban características muy particulares, las cuales se fueron modificando debido al proceso de adaptación a las distintas regiones geográficas donde empezaron a desarrollarse, pero compartiendo similitudes fenotípicas y genotípicas con el ganado criollo mexicano que se conoce actualmente (Rubio y Pérez, 2015).

Quiroz (2007) describe que los bovinos criollos entraron a tierras mexicanas por Veracruz, teniendo estos ejemplares una buena adaptación y reproducción en las zonas tropicales y una rápida distribución en el altiplano, Nueva Galicia y su llegada a la Nueva Vizcaya. Es por esto que a lo que refiere la diferenciación genética, el bovino criollo mexicano puede clasificarse de acuerdo a su localización y distribución geográfica además de características de la región, siendo estos

animales clasificados en bovinos criollos del norte, centro y sur del México, estos animales pueden separarse en poblaciones diferentes para su estudio.

Por su parte, Parra-Cortés y Magaña-Magaña (2020) mencionan a un personaje importante en la historia de la ganadería mexicana, el capitán español Gregorio Villalobos quien fue quien introdujo por primera vez ejemplares bovinos procedentes de Cuba, estos animales fueron desembarcados en el puerto de Veracruz en 1521. Se menciona también que fue a partir del año 1527 cuando se iniciaron los embarques de ganado desde España y las Antillas hacia la Nueva España, por solicitud de Nuño Beltrán de Guzmán gobernador de Santiesteban del Puerto, hoy Tampico, Tamaulipas.

Otra vía de entrada de los bovinos a tierras mexicanas fue por las costas de Campeche, donde arribó en 1543 una embarcación con bovinos y otros animales descendientes de los que fueron introducidos a la Nueva España, otros procedentes de Andalucía, Extremadura y Galicia. Ya en la Nueva España, estos animales encontraron condiciones geográficas y climáticas adecuadas además de agostaderos óptimos para su reproducción, éstas condiciones favorecieron que estos animales se propagaran con facilidad por todo el territorio lo que hizo que algunos animales vivieran de manera silvestre hasta su domesticación por parte de pueblos indígenas que se encontraban desde la Sierra Madre de Chiapas hasta los valles desérticos de Chihuahua (*op. cit.*)

2.4 Características de los bovinos localmente adaptados en México

Se han identificado núcleos de bovinos criollos mexicanos, estos animales generalmente se encuentran en zonas aisladas, rústicas, con difícil acceso, asociadas a zonas donde habitan pueblos indígenas (De Alba, 2011; Martínez y Montaña, 2015).

Las razas localmente adaptadas de México son animales de talla corporal baja, angulosos y de cuernos largos, mayormente hacia arriba y adelante, de base gruesa, más largos en las hembras que en los machos; poseen orejas cortas, pequeñas y horizontales, con pezuñas oscuras y duras, prepucio recogido, con una

altura a la cruz en los machos de 1.42 a 1.47 m y en las hembras de 1.32 a 1.35 m, con un peso que no excede los 300 kg para las hembras y de 400 a 600 kg en los machos. Inclusive los machos y hembras se consideran como animales de alta fertilidad, y las vacas se distinguen por su facilidad de parto y gran comportamiento maternal (De Alba, 2011).

De acuerdo con Perezgrovas et al. (2017) los bovinos criollos tienen colores variados, característica que los relaciona con sus antepasados españoles. Sus colores van desde el negro, rojo, bermejo y gateado hasta blanco, pinto y manchado, en diversas combinaciones (Figura 1).

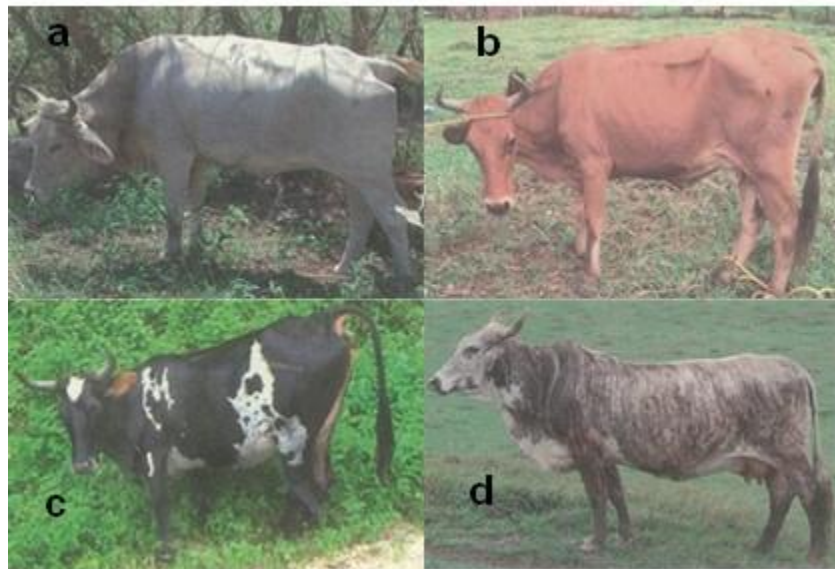


Figura 1. Distintos colores de capa de bovinos criollos: a) Blanco b) Colorado c) Overo negro d) Jaspeado/atigrado (Perezgrovas *et al.*, 2017).

El Criollo es un bovino dócil, pero que posee una gran resistencia a las enfermedades; muestra rusticidad, camina grandes distancias de terrenos quebrados, pedregosos, adversos, bajo climas extremos, con la ventaja de resistir la escasez de forrajes para su alimentación, ya que sus requerimientos nutricionales son menores en comparación con la mayoría de las razas comerciales (Vázquez, 2014).

En México se han realizado acciones para conocer y conservar las razas bovinas locales; se han estudiado las características de estos bovinos en varios estados de la República, en particular en los estados del norte. Actualmente se han realizado actividades para crear conciencia y dar a conocer la importancia social, económica y productiva de estos animales mediante publicaciones y foros académicos para estimular su conservación y fomento (Perezgrovas y de la Torre, 2015).

Se han realizado estudios morfométricos y fanerópticos del bovino Criollo Chinampo de la península de Baja California, el cual se describe como un bovino pequeño y muy resistente a condiciones de aridez extrema; se encontró que la coloración de estos animales fue la combinación de blanco con rojo, siguiendo el color rojo uniforme, luego el negro, blanco con negro, blanco con hosco, barcino o rojo rayado de negro y otras combinaciones de colores (Espinoza *et al.*, 2009).

En la Sierra de Tarahumara de Chihuahua se encuentra un bovino criollo que presenta características fanerópticas que se relacionan con las diversas razas bovinas de los principales ancestros españoles como el negro recto ibérico, rojo convexo turdetano y castaño cóncavo; los bovinos criollos de Chihuahua presentan diversas tonalidades de la capa que van desde el pinto, barcino rojo y negro, hosco, castaño en sus diversas tonalidades que van desde castaño claro hasta castaño oscuro. Otra característica de estos animales es que son de talla pequeña, presentan cuernos, los cuales se observan abiertos hacia arriba y hacia adelante, su cuerpo es angosto y extremidades largas (Rubio y Pérez, 2015).

Actualmente el bovino criollo de chihuahua, conocido como criollo de Rodeo se selecciona de acuerdo a sus características fenotípicas, siendo la cornamenta y el color de la capa características importantes para suplir las exigencias del mercado internacional, ya que un individuo de 12 a 18 meses de edad se comercializa entre 500 y 700 dólares (Hernández, 2012).

Se han realizado estudios enfocados a la producción de nuevos ejemplares criollos, para esto se ha caracterizado la respuesta ovárica de hembras de bovino criollo del estado de Nayarit (Coreño) estimuladas para multiovular, en estos estudios se realizaron estimulaciones hormonales con cantidades reducidas de hormona

folículo estimulante, donde encontraron que se pueden emplear dosis bajas para reducir costos en la producción de embriones mediante la técnica de ovulación múltiple y así contribuir en los esfuerzos de conservar estas razas (Villaseñor *et al.*, 2017).

2.4.1 Bovino criollo Mixteco

En México se encuentra una raza bovina criolla que se ha desarrollado en la región comprendida entre los estados de Oaxaca, Puebla y Guerrero a la cual se denomina región de la mixteca y de la que recibe el nombre. Estos animales son de bajo peso corporal, encontrándose ejemplares que van desde los 125 a más de 200 kg de peso, el perímetro torácico oscila entre 120 a 140 cm y la alzada a la cruz es de 103 cm en promedio (Méndez *et al.*, 2002).

Desde el punto de vista productivo estos animales representan una alternativa para la región ya que presentan gran rusticidad, además de la capacidad de moverse en las condiciones geográficas que en general son de montaña, aunque suelen perder peso durante las temporadas de estiaje, estos logran sobrevivir y recuperar su condición corporal a medida que el forraje nativo mejora, estos animales son resistentes a enfermedades y suelen ser muy fértiles, además de presentar partos dobles eutócicos. Estos animales se comercializan principalmente para rodeos y finalizando su etapa productiva en yuntas; aunque la carne de estos individuos presenta buenas características fisicoquímicas, además de representar una fuente de proteína de origen animal para el mercado que busca alimentos más sanos, ya que al ser escaso el tratamiento médico en estos animales y basarse en la alimentación con forraje nativo pudiera considerarse una carne limpia de contaminantes químicos (Fuentes - Mascorro, 2016).

Desde el punto de vista cultural, los bovinos criollos representan una parte de la cosmovisión de los pueblos ya que, en los asentamientos con este tipo de ganado, se seleccionan animales para el santo patrono del pueblo y se designa a un grupo de pobladores quienes se encargan del manejo de estos hasta su utilización en la fiesta del pueblo (*op. cit.*).

Serrano et al. (2004) mencionan que el bovino criollo mixteco se ha convertido en un ejemplar de interés para el deporte del rodeo americano debido a la resistencia física, agilidad, tamaño y forma de los cuernos. La existencia de un nicho de mercado para estos animales justifica que se sigan estudiando sus características productivas y morfológicas.

2.5 Importancia de la caracterización y conservación de los recursos genéticos

Según datos de la FAO, más de un tercio de la población mundial depende de los animales domésticos para su sustento, además de que los animales de granja aportan del 30 al 40 % del valor económico del sector agropecuario. Esto aunado al crecimiento poblacional y a la demanda de alimentos de origen animal, es necesario aumentar la producción de huevo, leche, carne y sus derivados para contribuir a la seguridad alimentaria mundial (Cardellino, 2003).

La diversidad que presentan los recursos zoogenéticos es primordial para todos los sistemas de producción, ya que proporcionan la materia prima para la mejora genética y la adaptación a las circunstancias cambiantes del medio ambiente (Hanotte *et al.*, 2006).

Los bovinos criollos representan una pieza fundamental en la historia y cultura de los pueblos que se dedican a su crianza, formando parte de las tradiciones y formas de vida de los diversos pueblos indígenas; para estos pueblos la pérdida de estos animales no solo significa la pérdida de individuos sino también de identidad cultural y un patrimonio de la humanidad (FAO, 2010).

Existen regiones que presentan condiciones ambientales y de sanidad complejas, esto ha generado que existan animales genéticamente adaptados y únicos. Esto debido a que entre más tiempo se encuentre una población animal a un cambio medioambiental, tiene mayor probabilidad de desarrollar caracteres específicos de adaptación. Las razas criollas han evolucionado en conjunto con las condiciones ambientales y al manejo etnozootécnico de cada población (*op. cit.*).

Actualmente existen diversos factores que se influyen en la disminución de la diversidad genética como son:

- a) La creación de líneas altamente productivas poco rusticas debido a la disminución de la variabilidad genética
- b) Erosión del material genético debido al cruzamiento indiscriminado con razas exóticas introducidas que trae como consecuencia una rápida desaparición de las razas locales
- c) Desaparición del hábitat de las razas criollas, debido a que los sistemas de producción se han ido modificando
- d) El cambio por razas con características productivas mayores debido a las exigencias del mercado actual aunado a las preferencias de los productores (Cardellino, 2003).

El bovino localmente adaptado o criollo está siendo sustituido por otras razas de ganado, principalmente *Bos indicus* y su cruzamiento con razas europeas mejoradas (Azuara *et al.*, 1982).

En México, aún existen poblaciones de bovinos criollos sin evaluar, esto debido a que existen animales geográficamente separados con diferentes tipos de acuerdo a la localización. La característica principal de estos animales es la adaptación a las regiones en las que se desarrollan, sin embargo, a pesar de que poseen características deseables en cuanto a comportamiento y adaptación estos se consideran en amenaza de una erosión genética o reemplazo por razas mejoradas genéticamente, esto debido a que se tiene la idea de que al introducir líneas o razas mejoradas de alta producción en los países con desarrollo mejorarán los parámetros productivos a diferencia de las razas nativas (Segura y Montes, 2001).

Es necesario implementar acciones para conservar las razas criollas, los esfuerzos no deben estar enfocados únicamente en preservar las razas sino de hacer difusión para promover su evaluación productiva y su utilización. Tomando como base la memoria evolutiva de estos animales lo cual les permite adaptarse al entorno, además de ser razas con potencial para implementarse en programas de mejoramiento genético debido a su rusticidad son excelentes para cruzarse con

otras razas para lograr aumentar la productividad en las condiciones de cada región en la que se desarrollan estos animales (*op. cit.*).

En la producción pecuaria se ha enfocado en razas altamente productivas, sin embargo estas suelen ser poco adaptables a las diversas condiciones medioambientales lo cual puede generar problemas en la sostenibilidad de las unidades de producción pecuaria, debido a que el entorno cambiante en relación al medio ambiente puede exigir a mediano plazo animales resistentes, por lo que si se pierden las razas con una memoria evolutiva que les permita afrontar las condiciones adversas se podría llegar tener un grave problema en los sistemas de producción pecuaria y por ende el aseguramiento de proteína de origen animal (Tisdell, 2003).

Mendelsohn (2003) menciona que es importante conservar los recursos zoogenéticos, sin embargo en la actualidad estos animales no son requeridos debido a diversos factores, dentro de los principales se encuentra la falta de información sobre estos individuos, el enfoque en el mercado actual que exige mayor producción en menor tiempo.

2.6 Estrategias para la conservación de los recursos genéticos animales

Las razones para conservar los recursos zoogenéticos locales varían de acuerdo a la especie animal, distribución geográfica y al entorno socioeconómico donde se desarrollan. Se pueden listar algunos de los argumentos para conservar las razas localmente adaptadas tales como:

- 1) La contribución que estos individuos realizan en la conservación de los ecosistemas en los que se desarrollan
- 2) El impacto social y económico para las comunidades que se dedica a la explotación de esos.
- 3) La identidad cultural que representan estos recursos zoogenéticos, no solo para las comunidades que se dedican a la crianza de estos individuos; sino a la riqueza cultural e histórica de todo un país.

Es por esto que la conservación de las razas locales de bovinos se debe plantear de acuerdo a la capacidad para lograr los objetivos y sobre todo en resaltar la cualidades y beneficios en los diversos contextos (FAO, 2010).

Cardellino (2003) menciona que en la mayoría de los programas, la conservación es considerada como la acumulación de semen y/o embriones, pero esto no permite realizar un programa eficaz en cualquier nivel para el mantenimiento y la mejor utilización de la diversidad genética animal, por esto sugiere que, para iniciar un programa de conservación eficaz a nivel mundial, se debe iniciar con censos para conocer la situación actual de las poblaciones de animales localmente adaptados; posteriormente caracterizar a los individuos para identificar cualidades particulares y su fin zootécnico, para comprender cómo se pueden realizar contribuciones futuras en las explotaciones pecuarias.

Por su parte Steane (1992) señala que la valoración de razas con importancia en sector agrícola actual y a futuro, es indispensable para la implementación de un programa de conservación. La población de especies animales nativas o criollas se han ido disminuyendo, esto se puede atribuir a la introducción de razas exóticas y mejoradas, aunado a la destrucción del hábitat donde se desarrollan los animales criollos y la pérdida de interés económico por estos individuos.

Este autor comenta que, existen en la actualidad herramientas para conservar la variación genética, esto con ayuda de biotecnologías en la reproducción animal, donde se pueden extraer y crioconservar en bancos de germoplasmas para su posterior utilización gametos y embriones de distintas razas de animales localmente adaptados.

2.7 Criopreservación de semen cómo herramienta de conservación de germoplasma de bovinos localmente adaptados

Existen dentro de las biotecnologías de la reproducción herramientas que permiten conservar el material genético de animales, tal es el caso de la crioconservación de espermatozoides, esta técnica resulta muy útil ya que permite conservar el germoplasma de macho en pequeñas dosis almacenadas en nitrógeno líquido

donde pueden permanecer durante muchos años y su posterior utilización aun cuando el semental no se encuentre con vida, además esta técnica es fundamental para poder implementar programas de inseminación artificial o producción de embriones *in vitro*. Estas técnicas permiten la diseminación de del material genético de reproductores con alto valor genético o que se encuentren en peligro de extinción (Saavedra, 2018).

Otra de las ventajas de la criopreservación de semen es que disminuye el costo de transporte de sementales, así como el riesgo de contraer enfermedades de transmisión sexual, además facilita la diversidad dentro de las unidades de producción ya que permite la utilización de germoplasma de diferentes ejemplares (Castelo *et al.*, 2008).

2.7.1 Métodos de colecta de semen

Mejía (2017) realizó una evaluación antes y después del congelado de semen de bovinos criollos colectados mediante vagina artificial y electroeyaculador, donde no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la evaluación seminal pos descongelación de las variables motilidad individual progresiva, la vitalidad espermática y las anomalías, aunque se encontraron mayores valores en cuanto a la integridad de la membrana plasmática que los colectados por vagina artificial. Sin embargo, existieron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al volumen del eyaculado y concentración espermática, donde se obtuvo un mayor volumen seminal y menor concentración en aquellas muestras que se colectaron con electroeyaculador a diferencia de las que se colectaron mediante vagina artificial.

2.7.2 Evaluación seminal

Los bovinos criollos presentan baja concentración espermática en relación a otras razas bovinas, esto puede deberse a que presentan un mayor volumen de eyaculado, sin embargo, la motilidad suele ser alta lo que permite realizar procesos de criopreservación (Aguirre *et al.*, 2011).

Existe un estudio realizado por Íñiguez *et al.* (2017), en donde se evaluó el efecto de la época del año sobre las características seminales de toros de fenotipo Criollo Ecuatoriano. En ese trabajo las muestras se evaluaron macroscópicamente para volumen (mL) y microscópicamente para motilidad individual progresiva (%) con un microscopio óptico con un objetivo de 20X. La concentración se determinó con la ayuda de un espectrofotómetro (Spermac, Minitube®) donde se colocó una muestra de 10µL y el resultado se expresó en millones/mL.

La vitalidad espermática y las anomalías totales fueron determinadas realizando un frotis colocando 5 µL de semen y 5 µL de eosina-nigrosina (en concentración de 2 y 10%, respectivamente) en un portaobjetos durante 10 segundos. Inmediatamente después se realizó un extendido de la mezcla y se dejó secar en una placa térmica. El frotis se observó en un microscopio óptico con un objetivo de 40X donde se evaluaron en total 200 células. Se determinó la vitalidad considerando como vivos a los espermatozoides que no se tiñeron (color blanco) y muertos a los teñidos (rosa) y se determinó el porcentaje de vitalidad. También se determinó el porcentaje de anomalías, haciendo un recuento de 200 células espermáticas y cuantificando el número de espermatozoides normales y el número de espermatozoides con anomalías primarias y de cola (*op. cit.*).

2.7.3 Retiro del plasma seminal previo al procesamiento para la criopreservación de semen

Almela (2014) realizó aportaciones a la crioconservación de gametos de sementales en la raza bovina Murciano Levantina con la recongelación de espermatozoides; para esto se descongelaron las dosis en baño maría a 37°C durante 10 segundos aproximadamente y el semen se colocó en un tubo de ensayo al cual se le adicionaron 5 mL de solución isotónica a 37°C, posteriormente se las muestras se centrifugaron durante 5 min a 100 fuerzas G, lo que favoreció la formación de un pellet el cual se eliminó para realizar una segunda centrifugación de la muestra a 800 fuerzas G durante 10 minutos, una vez terminado el segundo ciclo de centrifugación se conservó el pellet al cual se le adiciono medio para criopreservación ajustando la concentración espermática y se procedió a

criopreservar el semen de manera convencional obteniendo una viabilidad optima al momento de descongelar por segunda ocasión.

Hernández-Corredor *et al.* (2014) mencionan que en el plasma seminal en caprinos contiene la enzima fosfolipasa que cataliza la hidrolisis de los fosfolípidos en la yema de huevo, lo cual resulta dañino para los espermatozoides en el proceso de criopreservación, por lo que una opción es retirar el plasma seminal mediante centrifugación a 800 fuerzas G durante tres minutos, posteriormente se retira el sobrenadante y el pellet se diluye con medio de congelación y se continua con el proceso de equilibrio y congelación.

Por su parte, Leyva (2020) menciona que en la plasma seminal de los rumiantes se encuentra la enzima fosfolipasa A2 que hidroliza la membrana de los espermatozoides, lo que disminuye la viabilidad de los espermatozoides criopreservados con diluyentes a base de yema de huevo, por esta razón recomienda que después de la evaluación macroscópica y microscópica el semen debe ser centrifugado.

Saavedra (2018) también estudió el efecto de la retirada del plasma seminal y su posterior incorporación sobre la calidad espermática en los protocolos de criopreservación de semen de toros Cebú; donde encontró que el plasma seminal es perjudicial para la criopreservación espermática, cuando las muestras se diluyen con niveles superiores al 20% de plasma seminal durante largo periodos antes de la criopreservación.

2.7.4 Dilución del semen

Roof *et al.* (2012) estudiaron el efecto de dos extensores de semen disponibles comercialmente sobre la motilidad de los espermatozoides de cabra criopreservados, en un intento por simplificar el protocolo de criopreservación. Los eyaculados de cabra individuales se dividieron y procesaron en paralelo para congelarlos en un extensor a base de soja disponible comercialmente (Bioxcell®) o un extensor a base de yema de huevo (Irvine TYB). La calidad del esperma se evaluó mediante la motilidad espermática total y progresiva, medida mediante

análisis de esperma asistido por computadora (CASA). Los autores concluyen diciendo que un extensor a base de soya disponible comercialmente era superior a un extensor a base de yema de huevo, para preservar la motilidad de los espermatozoides de cabra criopreservados, utilizando un método de dos pasos.

Por su lado, Clemente-Sánchez *et al.* (2015) realizaron un estudio con diferentes diluyentes de semen en venado, donde se evaluó el índice de calidad (IC%) del semen descongelado a partir de la estimación del porcentaje de motilidad bruta, motilidad progresiva, espermatozoides vivos, espermatozoides normales y concentración de espermatozoides con diferentes diluyentes. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los extensores antes de la congelación, dando como resultado Bioxcell® con mayor IC (60.77%), mientras que para Triladyl® y Biladil® las tasas fueron 48.39% y 33.01%, respectivamente.

En un estudio llevado a cabo por Parada y Ariza en 2019 encontró un menor resultado en las muestras que se criopreservaron con diluyente comercial Andromed® encontrando un 57% de recuperación de espermatozoides viables.

Varela *et al.* (2019) evaluaron la capacidad antioxidante enzimática del semen bovino criopreservado con diferentes fuentes de lipoproteínas de baja densidad y trehalosa. Diez eyaculados seleccionados a partir de cinco toros fueron criopreservados con diferentes tratamientos. Se evaluó la capacidad enzimática antioxidante de la catalasa, la superóxido dismutasa y la glutación peroxidasa del semen bovino luego de la descongelación por espectrofotometría y su relación con los parámetros cinéticos espermáticos. En ese estudio, concluyó estableciendo que los diluyentes con yema de huevo, yema de huevo centrifugada y lipoproteínas de baja densidad mejoran la actividad antioxidante de la catalasa y glutación peroxidasa, generando una correlación positiva con la calidad seminal.

En un estudio llevado a cabo por Ludueña (2019), se evaluaron dos antioxidantes en la calidad seminal pos congelación de dos biotipos de ganado bovino criollo, donde se encontró que el medio Triladyl® + vitamina E es el tratamiento que obtuvo mejores resultados pos congelación con un 52.67%. El motivo de la diferencia pudo deberse a que la formación de cristales de hielo intracelulares y producción de

especies oxígeno reactivas es menor cuando se incorpora vitamina E, lo que da como resultado menor cantidad de solutos en la fracción no congelada, lo cual evita alterar la presión osmótica y permite proteger la funcionalidad y vitalidad espermática después de la criopreservación.

Montoya-Páez *et al.* (2020) analizaron en un estudio tres concentraciones de yema de huevo centrifugada en la criopreservación de semen bovino, donde se realizó la crioconservación y evaluación, en este estudio, la concentración de yema de huevo centrifugada no tuvo ningún efecto sobre la motilidad, vitalidad espermática, morfología anormal e integridad de la membrana plasmática. Sin embargo, hubo diferencias significativas al emplear un 10% de yema huevo centrifugada en la suplementación de los diluyentes con respecto a parámetros cinéticos como la velocidad curvilínea, velocidad lineal y velocidad media ($100.3 \pm 5.74 \mu\text{m/s}$, $45.47 \pm 9.46 \mu\text{m/s}$ y $68.77 \pm 7.33 \mu\text{m/s}$ respectivamente).

Calle (2020), al comparar cuatro medios de crioconservación (Tryladil®, Andromed®, Optixcell® y Two Step®), en esta investigación no se encontraron diferencias entre los tratamientos, la viabilidad espermática pos descongelación fue evaluada mediante la vitalidad, motilidad individual progresiva y la morfología las cuales no sufrieron cambios drásticos durante el proceso de criopreservación.

Filipiak *et al.* (2020) realizaron un estudio evaluando la calidad y capacidad fertilizante *in vitro* de semen de toros Criollo Uruguayo criopreservado en dos diluyentes comerciales, en el cual utilizaron semen de ocho toros, diluido en Triladyl® y Andromed® (con/sin yema de huevo); se evaluó por el sistema CASA para análisis espermático: concentración, motilidad, cinética, morfología y test hiposmótico. A las 2 h se repitió motilidad y cinética. Los autores encontraron que ambos diluyentes no tuvieron diferencias significativas en cuanto a la calidad del semen y su capacidad fertilizante *in vitro*, resultandos adecuados para ambos diluyentes.

2.7.5 Refrigeración y equilibrio de semen diluido pre-congelación

Para esta actividad, se realiza una curva de enfriamiento desde los 37 °C hasta los 5 °C a una tasa de 0.25 °C/min, la temperatura debe permanecer alrededor de 5 °C, para que el agua intracelular y extracelular permanezca en un estado de congelación, intervalo en que los espermatozoides son sensibles al choque térmico (González y Pallares, 2014).

Ramos *et al.* (2017) evaluaron diferentes tiempos de equilibrio en la criopreservación de semen ovino, el cual fue aumentando en la cámara de refrigeración con el descenso de la temperatura hasta llegar a 5 °C, lo que favoreció que los espermatozoides se equilibraran con los componentes del diluyente, encontrando mejores parámetros pos congelación en las muestras que se mantuvieron por cuatro horas en equilibrio.

Se han evaluado distintos tiempos de equilibrio sobre la calidad espermática pos congelación de semen bovino encontraron los mejores resultados para las variables motilidad espermática total y motilidad espermática progresiva a las cuatro de tiempo de equilibrio, mientras que el mejor resultado para la variable espermatozoides vivos/muertos pre y pos congelación se evidenció a las dos horas de tiempo de equilibrio (Anchatuña, 2017).

2.8 Evaluación espermática pos descongelación mediante sistemas de análisis espermático asistido por computadora (CASA)

El CASA es un sistema automatizado objetivo para el análisis computarizado de semen que cuantifica los principales parámetros de la calidad y funcionalidad de los espermatozoides, este sistema evalúa e identifica de manera individual cada célula espermática (Valverde y Madrigal-Valverde, 2018).

Este sistema permite evaluar a los espermatozoides según sus características cinemáticas en su trayectoria, determinando su motilidad, velocidad, linealidad y desplazamiento lateral, además de parámetros de concentración, morfología, morfometría, integridad de membrana plasmática, integridad acrosómica y fragmentación de ADN. Las principales características del sistema CASA es la

precisión, rapidez y objetividad con la que se evalúan las muestras (Thundathil *et al.*, 2016).

Algunos de los parámetros que se pueden obtener mediante este análisis son los siguientes:

- Porcentajes de motilidad total o de motilidad progresiva: en función de su velocidad curvilínea (VCL) o de su velocidad media (VAP), los espermatozoides son clasificados en estáticos, móviles progresivos o móviles no progresivos.
- VCL (Velocidad curvilínea), distancia recorrida por el espermatozoide en su trayectoria real en función del tiempo de captura considerado, como medida de la vigorosidad del espermatozoide en $\mu\text{m/s}$ (Figura 3).
- VSL (Velocidad lineal) distancia recorrida en línea recta por el espermatozoide entre el primer y el último punto de su trayectoria real, indicando el desplazamiento neto de la célula en el tiempo considerado [$\mu\text{m/s}$] (Figura 2).
- VAP (Velocidad media) trayectoria media del espermatozoide medida en $\mu\text{m/s}$ en el tiempo considerado, que se calcula como una interpolación entre los puntos correspondientes a la trayectoria de la VCL, en un intento de mejor aproximación al desplazamiento real de la célula (Figura 3).
- BCF (frecuencia de batida de la cola), expresada como número de veces que la trayectoria curvilínea cruza la trayectoria media, en función del tiempo de captura considerado medido en Hz.
- ALH (desplazamiento lateral de la cabeza) como la altura máxima (o media) de la amplitud del movimiento oscilatorio de la trayectoria curvilínea medida en μm (Figura 2).
- MAD (media del desplazamiento angular de la cabeza) o media del ángulo (en valor absoluto) de giro de la cabeza del espermatozoide a lo largo de su trayectoria curvilínea (VCL) medida en grados (Figura 3) (Monserrat, 2016).

También se determinan una serie de índices, como parámetros derivados de los anteriores:

- Índice de linealidad ($LIN=VSL/VCL \times 100$), como medida de linealidad de la trayectoria curvilínea (VCL).
- Índice de rectitud ($STR=VSL/VAP \times 100$), como medida de linealidad de la trayectoria media (VAP).
- Índice de oscilación ($WOB=VAP/VCL \times 100$), como medida de oscilación de la trayectoria curvilínea (VCL) respecto a la trayectoria media (VAP) (Muiño, 2008).

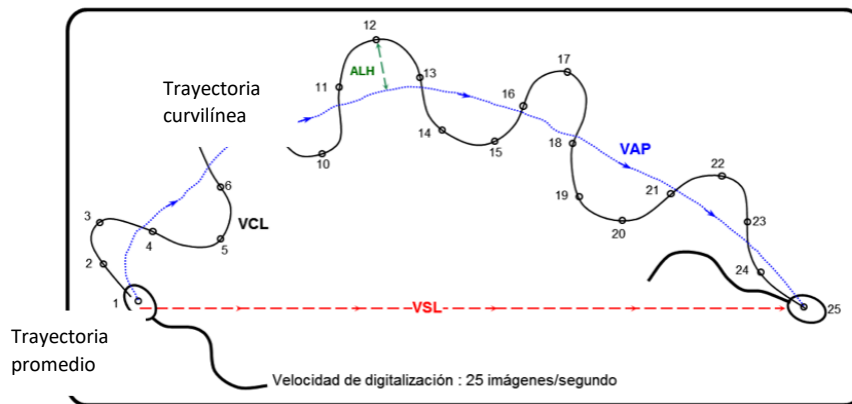


Figura 2. Variables cinéticas VSL y ALH determinadas por el sistema CASA.

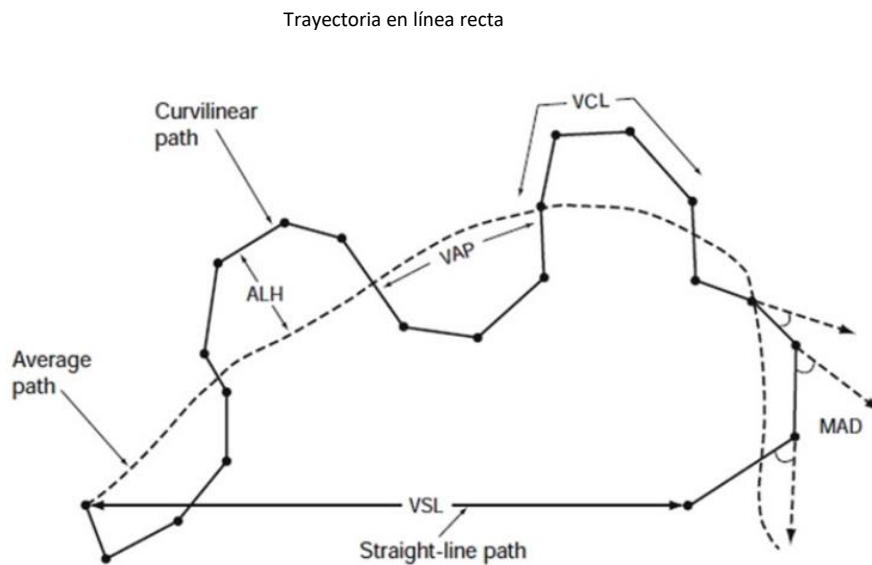


Figura 3. Variables cinéticas VCL, VAP y MAD determinadas por el sistema CASA.

2.9 Parámetros espermáticos pos descongelado establecidos para bovinos

La Organización de los Estados Americanos (OEA) establece parámetros de calidad mínima para la comercialización de semen en el Mercosur. Dentro de estos parámetros se establece que una dosis comercial debe tener al menos el 30% de espermatozoides con movimiento progresivo y a una concentración mínima de 10 millones de (OEA, 2022).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Localización del área de estudio

El estudio se realizó en diez unidades de producción (UP) bovina, ubicadas en el municipio de Huajuapán de León (Lat. 17°48'14" Norte y Long. 97°46'33" Oeste) en el estado de Oaxaca, México, a altitud de 1641 msnm, con clima semicálido húmedo con lluvias en verano, temperatura promedio anual de 20 °C y precipitación anual de 736 mm (INEGI, 2022).



Figura 4. Municipio de Huajuapán de León, Oaxaca.

3.2 Objeto de estudio

Se tomó una muestra (n) de 20 sementales localmente adaptados, siguiendo la metodología propuesta por Sponenberg (2008) para la evaluación de la pureza de la raza criolla. Se seleccionaron individuos con condición corporal de 5 a 7 en una escala de 1 al 9, tomando como el valor mínimo considerado de 1 para un animal extremadamente flaco y donde el 9 representa a un animal excesivamente gordo, según lo establecido por Dieter et al. (1999); el estado reproductivo fue activo y sin

alteraciones de los órganos reproductivos. Estos individuos se encontraban en condiciones de montaña, alimentados con vegetación nativa y con manejo en dos periodos al año, esto únicamente para evaluar el inventario y en algunos casos, aplicar vacunas.

3.3 Metodología

3.3.1 Preparación de los diluyentes

Se comparó el efecto de dos diluyentes, uno a base de liposomas de origen animal (Optidyl®), el cual se preparó de acuerdo a la especificaciones del fabricante, tomando dos partes del medio por tres partes de agua estéril, y se mezcló hasta formar una solución homogénea; para el diluyente a base de liposomas de origen vegetal (BioXcell®) (Figura 5), se tomó una parte de diluyente y cuatro partes de agua estéril para obtener una mezcla homogénea; ambos diluyentes preparados se mantuvieron a una temperatura de 37 °C hasta su utilización.



Figura 5. Diluyentes utilizados para la criopreservación de semen.

3.3.2 Colecta de semen

Para la obtención del semen de los bovinos criollos se utilizó la técnica empleada por Villamizar (2014), la cual se inició con la sujeción de los sementales con ayuda de una trampa metálica portátil (Figura 6); posteriormente con una tijera se realizó el corte del exceso de pelo del prepucio, cuidando no generar algún tipo de lesión o irritación en el área.

Una vez terminado el proceso, se lavó con agua y jabón quirúrgico la parte externa del prepucio, y en seguida se secó con papel absorbente, finalizando con un lavado interno del prepucio con infusiones de solución salina al 0.9% con 200 mg de gentamicina y 80 mg de tilosina, con el fin de evitar la contaminación del semen con algún tipo de agente externo o por propias secreciones del toro (esto debido a que en algunas ocasiones los sementales eyaculan en la parte interna del prepucio); finalmente se secó el área perfectamente con toallas secantes.

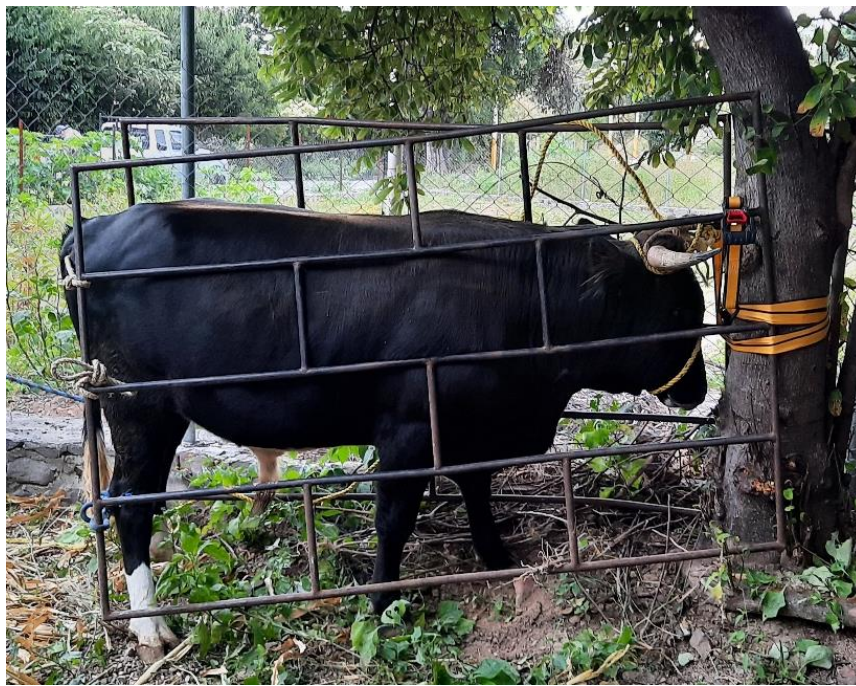


Figura 6. Sujeción con trampa metálica portátil.

Se procedió a estimular al semental mediante un masaje vía transrectal de las vesículas seminales y la región de la próstata, además de examinarlos; consecutivamente se iniciaron los estímulos, introduciendo la bala del electroeyaculador (ElectroJac® 6) lubricada vía rectal con los electrodos en dirección ventral (Figura 7) y se inició con estímulos con pulsos eléctricos de bajo voltaje de manera manual, los cuales incrementaron paulatinamente de acuerdo a la respuesta del animal, manteniendo de 1 a 2 s de descanso entre cada ciclo, hasta la eyaculación.

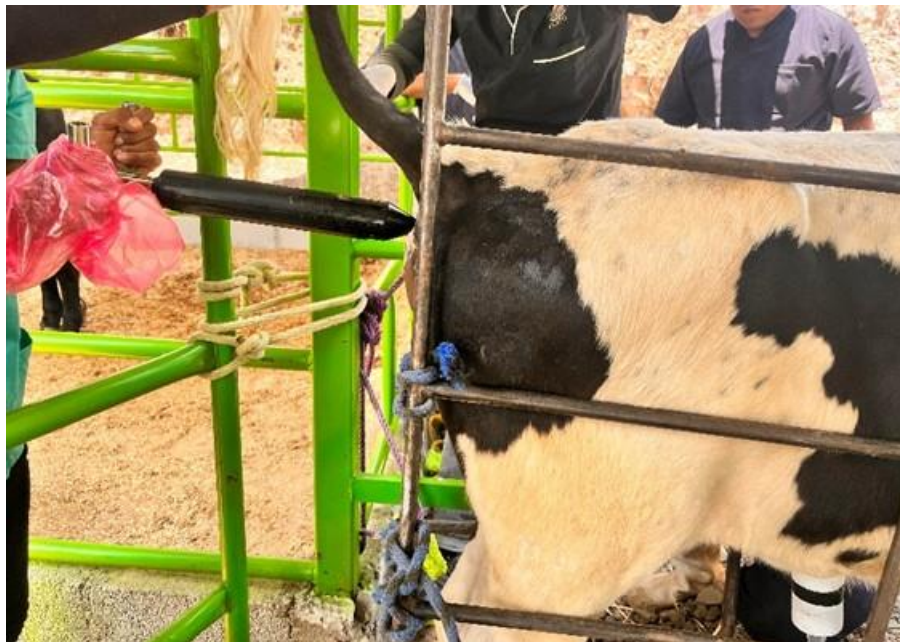


Figura 7. Colocación de la bala del electroeyaculador en el recto de bovinos.

Se colectó la fracción rica en espermatozoides con ayuda de un cono desechable unido a un tubo cónico de 15 mL, ambos sujetos a un mango de plástico (Figura 8), evitando coleccionar líquido preseminal y el contacto directo con los rayos solares. Cuando los sementales no exponían el pene, se realizaban masajes en el prepucio en dirección caudal – craneal con el fin de obtener el eyaculado.



Figura 8. Colecta de semen de bovino criollo.

3.3.3 Análisis macroscópico y microscópico del semen precongelación

Una vez que se colectó el eyaculado, se realizó una evaluación macroscópica, analizando el volumen mediante un tubo cónico graduado de 15 mL; el color y el aspecto se evaluaron de forma visual tomando como parámetros los colores: blanco, crema, amarillo o verde limón; el aspecto se evaluó como: cremoso, lechoso, opalescente o acuoso (Figura 9). El pH se evaluó con la ayuda de tiras reactivas con una escala de 0 a 14.

Posteriormente se realizó el análisis microscópico del semen, analizando con ayuda de un microscopio óptico compuesto la motilidad masal (MM) en un objetivo de 4X; se realizó una adaptación de los parámetros en la cual se consideró por cada grado el 25% de MM (Cuadro 1); se colocó un cubre objetos a la muestra y se analizó en el objetivo 40X la motilidad individual (MI) de manera subjetiva en relación al porcentaje de espermatozoides con movimiento rectilíneo.

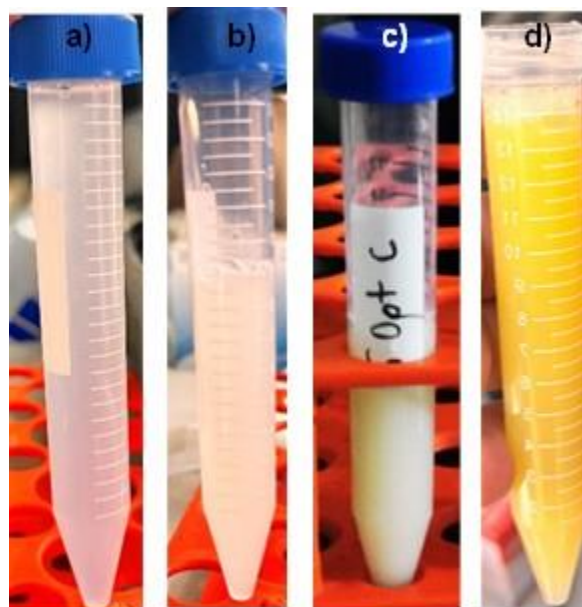


Figura 9. Colores y aspectos encontrados con bovinos criollos. a) Blanco acuoso, b) Blanco lechoso, c) Crema lechoso y d) Amarillo cremoso.

Se analizó la morfología y vitalidad de los espermatozoides colocando 10 μ L de muestra de semen en un porta objetos y 10 μ L de tinción de eosina-nigrosina sobre la muestra seminal; con otro porta objetos limpio se realizó un frotis y se examinó en un microscopio óptico compuesto con el objetivo 40X contando un total de 200 espermatozoides por muestra, a los que se observó el número de espermatozoides normales y anormales (presencia de gota citoplasmática, alteraciones en cola, fractura de pieza media y alteraciones en la cabeza), así como vivos (sin teñir) y muertos (teñidos de rojo) (Figura10).

Cuadro 1. Criterios para la evaluación de la motilidad masal (Vera, 2001).

Valor %	Clasificación	Descripción
91 - 100	Muy bueno	Ondas oscuras con movimientos rápidos
71 - 90	Bueno	Ondas aparentes, remolinos con movimiento moderado
51 - 70	Aceptable	Ondas ligeras con movimientos apenas perceptibles
10- 50	Pobre	No hay ondas. Movimiento espermático vibrátil
0 - 9	Muy pobre	Sin movimiento espermático

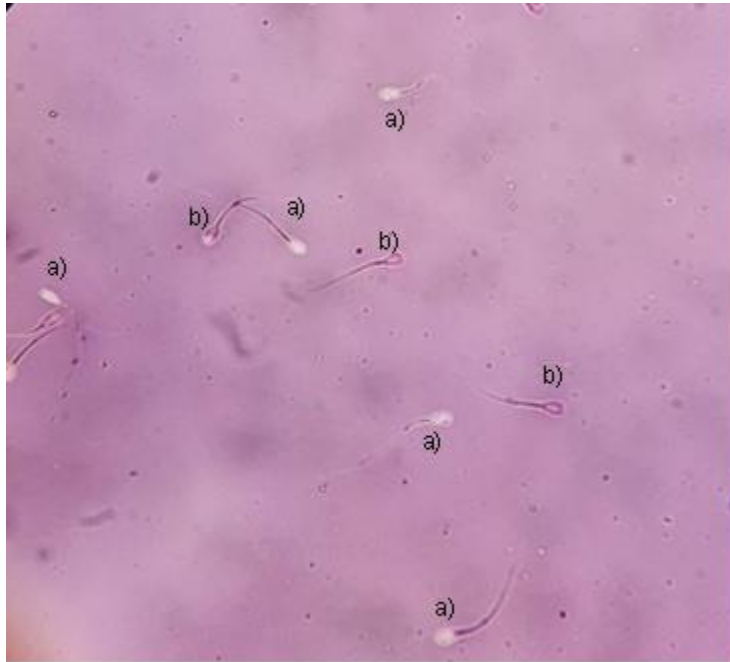


Figura 10. Espermatozoides de bovino criollo mixteco teñidos con eosina-nigrosina: a) Vivos y b) Muertos.

Se determinó la concentración espermática con ayuda de la cámara Makler® mezclando la muestra y evitando la formación de burbujas; con ayuda de una micropipeta se tomó una alícuota de 10 μL y se colocó en el centro de la zona del disco, posteriormente se colocó la cubierta de cristal sobre el disco teniendo cuidado de tomarla por el anillo metálico ejerciendo una pequeña presión haciendo que la muestra se expandiera en un espesor de 10 μm .

Cuando la muestra se encontraba demasiado densa, se inmovilizaron los espermatozoides colocando una muestra en un tubo cónico en agua a 50-60 °C durante 5 min, posteriormente se contaron las cabezas de los espermatozoides dentro de los cuadrantes de la misma celda en una franja de 10 cuadrantes (Figura 11), lo que representó el número de espermatozoides en millones por mL de eyaculado.

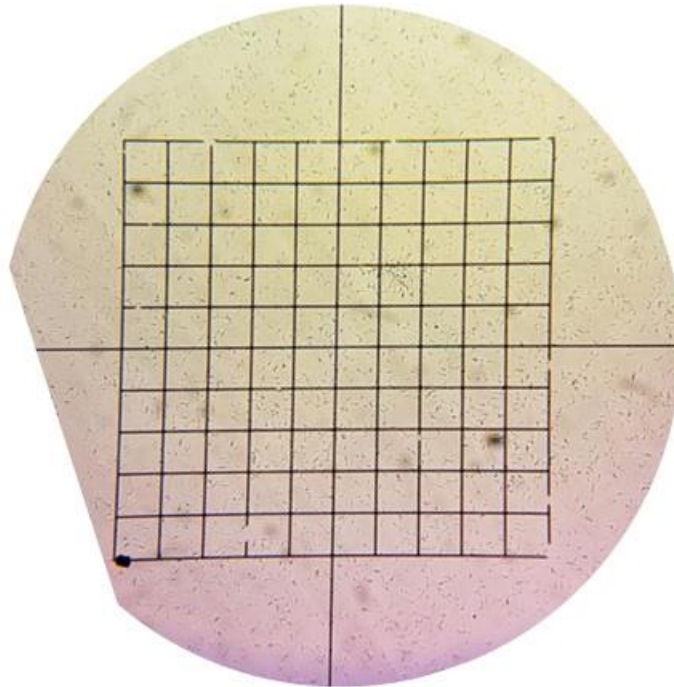


Figura 11. Cuadrantes de la cámara Makler® para el conteo espermático.

3.3.4 Retiro del plasma seminal para la criopreservación de semen

Para evaluar el efecto del retiro de plasma seminal sobre la viabilidad de espermatozoides congelados-descongelados, se tomaron dos alícuotas del eyaculado: una se colocó en baño María a 37 °C y la otra se centrifugó a 500 fuerzas G durante 10 min; luego se retiró el sobrenadante y se colocó a 37 °C durante 5 min para homogenizar la temperatura entre la muestra y el diluyente.

Después de ello se agregó el diluyente (Optidyl®) a relación del 25% del volumen de la muestra previa centrifugación y se analizó la motilidad individual, morfología y concentración espermática, para ajustar la concentración a 20×10^6 células espermáticas por cada pajilla francesa de 0.25 mL; el ajuste de la concentración espermática por pajilla fue determinado por la siguiente ecuación.

No. de pajillas =

$$\frac{\text{Vol. del eyaculado} \times \text{Concentración} \times \text{Motilidad individual} \times \text{Morfología normal}}{\text{Concentración deseada por pajilla}}$$

Posteriormente se llevó a equilibrio y criopreservación de acuerdo al procedimiento realizado en toros criollos (Mejía, 2017).

3.3.5 Comparación de dos diluyentes para la criopreservación de semen bovino

Para evaluar el efecto de dos diluyentes sobre la viabilidad espermática pos descongelación, se tomaron los dos alícuotas del eyaculado y se diluyeron con los medios Optidyl® y Bioxcell®, respectivamente, los cuales se encontraban a 37 °C, agregando un 25% de diluyente con respecto al volumen de la muestra, esto con el fin de evitar un shock osmótico entre la muestra y el diluyente; se homogenizó con movimientos suaves, y posteriormente se estimó la cantidad de diluyente necesario para el ajuste de concentración utilizando la siguiente formula:

Cantidad de diluyente =

(Número de pajillas x Volumen de la pajilla en mL) – Volumen del eyaculado

Realizado el ajuste de concentración, la muestra final se llevó a un descenso lento de la temperatura hasta 4-6 °C durante 5 h y las pajillas se colocaron en una rampa a 5 cm del nivel de nitrógeno para congelar el semen dentro de los vapores.

3.3.6 Equilibrio de semen y diluyentes para la criopreservación de semen bovino

Se evaluó el efecto de diferentes tiempos de equilibrio de semen sobre la viabilidad de espermatozoides congelados-descongelados; para esto, se mantuvo la temperatura del semen diluido con medio Optidyl® entre 4-6°C por 3, 4, 5, 6 y 7 h, y de acuerdo a cada h, se empajillaron las dosis, sellándolas con alcohol polivinílico y se identificaron (Figura 12) para la congelación en vapores de nitrógeno (Morillo *et al.*, 2012).



Figura 12. Muestras empajilladas e identificadas en proceso de equilibrio a 5°C.

3.3.7 Evaluación de diferentes protocolos de criopreservación espermática

Se inició distribuyendo el eyaculado en cuatro alícuotas homogéneas en tubos cónicos conteniendo el mismo volumen para realizar los distintos tratamientos, los cuales se conformaron como se muestra en el Cuadro 2.

Se colectó el eyaculado y se colocaron dos alícuotas en baño María a 37 °C, las cuales se utilizaron en el siguiente proceso y las dos restantes se centrifugaron a 500 fuerzas G durante 10 min; posteriormente se retiró el sobrenadante y se colocaron a 37 °C durante 5 min para homogenizar la temperatura entre la muestra y el diluyente. Más adelante se agregó diluyente (Optidyl® y Bioxcell® respectivamente) a relación del 25% del volumen de todas las alícuotas y se analizó la motilidad individual, morfología y concentración espermática, esto con el fin de ajustar la concentración por pajillas a 20×10^6 células espermáticas por cada pajilla francesa de 0.25 mL.

Cuadro 2. Conformación de los distintos protocolos de criopreservación de semen de bovinos Criollo mixteco.

Tratamientos	Tipo de muestra	Diluyente	Tiempo de equilibrio (h)
1	Sin plasma seminal	Optidyl®	3
2	Sin plasma seminal	Optidyl®	4
3	Sin plasma seminal	Optidyl®	5
4	Sin plasma seminal	Optidyl®	6
5	Sin plasma seminal	Optidyl®	7
6	Sin plasma seminal	Bioxcell®	3
7	Sin plasma seminal	Bioxcell®	4
8	Sin plasma seminal	Bioxcell®	5
9	Sin plasma seminal	Bioxcell®	6
10	Sin plasma seminal	Bioxcell®	7
11	Convencional	Optidyl®	3
12	Convencional	Optidyl®	4
13	Convencional	Optidyl®	5
14	Convencional	Optidyl®	6
15	Convencional	Optidyl®	7
16	Convencional	Bioxcell®	3
17	Convencional	Bioxcell®	4
18	Convencional	Bioxcell®	5
19	Convencional	Bioxcell®	6
20	Convencional	Bioxcell®	7

Realizado el ajuste de concentración, la muestra final se llevó a un descenso lento de la temperatura hasta 5°C durante 3, 4, 5, 6 y 7 h; en este momento se empajillaron las dosis, se sellaron con alcohol polivinílico y se identificaron para la congelación en vapores de nitrógeno. Pasado el tiempo de equilibrio correspondiente, las muestras se congelaron a vapores de nitrógeno (-125°C aproximadamente) durante 20 min (Figura 13), y posteriormente se sumergieron en

nitrógeno líquido (-196 °C) para su conservación; las pajillas se colocaron en gobelets de plástico los cuales fueron distribuidos en bastones metálicos para el almacenamiento en un termo criogénico (Mejía, 2017).

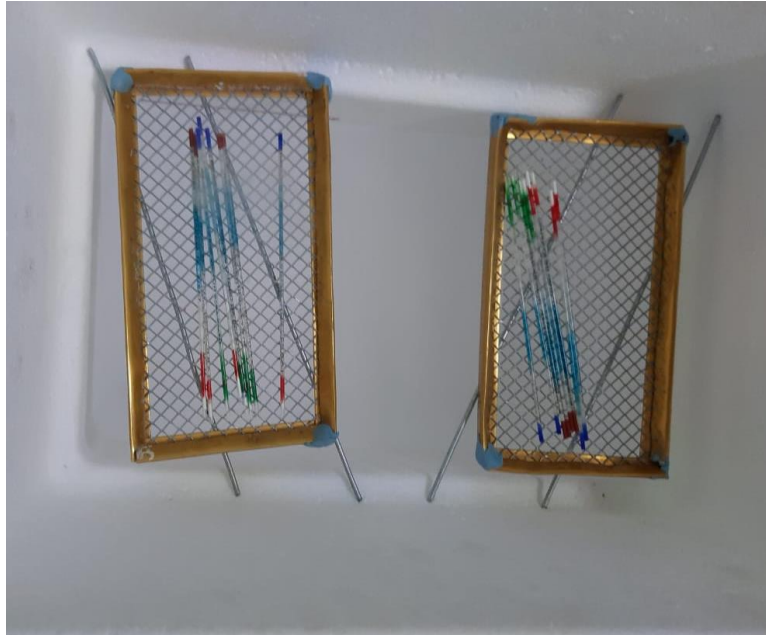


Figura 13. Pajilla de semen en vapores de nitrógeno.

3.3.8 Evaluación del semen congelado-descongelado

Se evaluó la viabilidad espermática después de la criopreservación con diferentes protocolos mediante el porcentaje de vitalidad, integridad funcional de la membrana, y motilidad de espermatozoides con movimiento rectilíneo.

La vitalidad se evaluó mediante el conteo de células espermáticas teñidas (muertos) y sin teñir (vivos) contando un total de 200 espermatozoides evaluados. Para esto se realizó una tinción con eosina-nigrosina, para lo que se tomó una muestra de 10 μ L de semen y se colocó en un portaobjetos, y posteriormente se agregaron 10 μ L a la muestra de semen y se realizó el frotis.

La integridad funcional de la membrana se analizó mediante una prueba hipo osmótica (HOST), donde cada muestra de semen descongelado se incubó con una

relación de 10 μL de semen con 90 μL de una solución de fructosa y ácido cítrico de osmolaridad 150 mOsm/L por 45 min a 37 °C. Se consideraron espermatozoides con membrana funcional los que reaccionaron al medio hipo osmótico con dilatación de la parte distal de la cola espermática o enrollamiento de la misma, mientras que aquellos espermatozoides sin cambios en la cola se consideraron funcionalmente dañados. La dilatación espermática se evaluó utilizando un microscopio óptico de campo claro (40X). Se hizo el recuento de 200 espermatozoides y los resultados fueron expresados en porcentaje de espermatozoides dilatados.

Mientras tanto, la motilidad se evaluó con ayuda de un Analizador de la Clase de Esperma (SCA MICROPTIC®) versión 5.4.0.0. 2013; se descongelaron las pajillas a 37 °C durante 30 s y se colocaron 10 μL de muestra en una porta objetos al cual se colocó un cubre objetos para realizar el análisis a través de la captura de videos (cinco videos por análisis) de espermatozoides en movimiento registrando las trayectorias. Los videos se revisaron de forma manual para descartar errores del sistema como partículas extrañas consideradas como espermatozoides o registro de espermatozoides con movimientos erróneos, posteriormente se emitió un informe del análisis de datos como motilidad, progresividad y cinemática espermática.

3.4 Análisis estadístico

Para la evaluación de la calidad de semen fresco se utilizaron estadísticos descriptivos y correlación lineal de Pearson para el comportamiento de las variables evaluadas, debido a que los toros no fueron sometidos a tratamientos adicionales.

Para el análisis de los diluyentes y técnicas de procesamiento de semen se utilizó la prueba U de Mann-Whitney, mientras que los tiempos de equilibrio se analizaron mediante una prueba no paramétrica Kruskal-Wallis.

Para el análisis de los diferentes protocolos de criopreservación de semen se utilizó un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial 2 x 2 x 5. Las variables evaluadas pos descongelación fueron analizadas mediante prueba no

paramétrica Kruskal-Wallis y para aquellos resultados con diferencia significativa se utilizó la prueba Post Hoc de Tukey.

Para todos los análisis estadísticos se tomó un valor de $\alpha < 0.05$ utilizando el paquete estadístico SPSS versión 23.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Evaluación en fresco de semen de bovinos localmente adaptados

Los ejemplares de bovino criollo mixteco evaluados en esta investigación se encontraban en un peso vivo promedio de 248 ± 26.58 kg y una condición corporal de 6.08 ± 0.37 en escala de 1 a 9; la calidad seminal de estos sementales se encontraba dentro de los parámetros normales para la especie bovina.

Los resultados de este estudio indican que las características microscópicas como Motilidad Masal (MM), Motilidad Progresiva (MP) y Morfología normal (MN) se encontraron arriba del 80%, mientras que el volumen de eyaculado fue aceptable para los parámetros dentro de la especie bovina (7.03 ± 3.27 mL) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Resultados de la evaluación física y espermática de semen fresco de bovinos localmente adaptados

Variable	Indicador	Media \pm DE*
Peso Vivo	kg	248.2 ± 26.6
Condición corporal	1 a 9	6.1 ± 0.4
Circunferencia escrotal	cm	27.9 ± 0.6
Volumen de eyaculado	mL	7.0 ± 3.3
pH	0 a 14	6.9 ± 0.3
Motilidad masal	%	84.8 ± 7.7
Motilidad progresiva	%	84.8 ± 5.3
Morfología normal	%	88.5 ± 4.0
Concentración espermática	Millones x mL	377.3 ± 154.8

*DE= Desviación Estándar

Los bovinos analizados en este estudio tuvieron pesos vivos y circunferencia escrotal inferiores a los reportados en el bovino criollo Chinampo de México por Espinoza et al. (2009), quienes encontraron que el peso corporal fue de 345 ± 15 kg, y en toros criollos argentinos, donde obtuvieron 685.2 ± 28.4 kg de peso vivo y 37.5 ± 2.0 cm para CE (Holgado y Ortega, 2015).

En este estudio el Criollo Mixteco tuvo eyaculados superiores en cuanto a volumen y MI a los reportados en otras razas criollas, mientras que la MI y ME fueron similares a las encontradas por Crespo y Quintero (2014), quienes reportaron que el volumen de eyaculado de ganado criollo Limonero fue de 4.43 ± 0.25 mL, Motilidad Masal (MM) (3.20 ± 0.08 en escala de 1 a 4); Motilidad individual (MI) 70.50 ± 0.81 ; anomalías espermáticas 14.07 ± 0.77 . Por otro lado, la concentración espermática (CE) fue menor en el Criollo Mixteco (377.3 ± 154.8 millones/mL) que lo encontrado en el Criollo Limonero (839.5 ± 35.32 millones/mL); esto puede deberse a que estos animales se encontraban en condición de montaña, a libre pastoreo con forraje nativo y con servicio reproductivo activo además de que las muestras se obtuvieron mediante electroeyaculación, lo cual pudo propiciar un eyaculado con mayor volumen pero con menor concentración en los toros Criollos mixtecos.

En el Cuadro 4 se muestran los coeficientes de correlación entre las variables de peso vivo, condición corporal, pH y morfología normal, los cuales no se asociaron ($p \geq 0.01$); sin embargo, existieron correlaciones altamente significativas ($p \leq 0.01$) entre el volumen del eyaculado y la circunferencia escrotal ($r = 0.63$); y entre motilidad masal y motilidad progresiva ($r = 0.88$). El color tuvo una correlación significativa ($p \leq 0.05$) con la motilidad progresiva ($r = 0.46$) y la concentración espermática ($r = 0.48$), mientras que con el aspecto tuvo una correlación negativa ($r = -0.75$).

También se observó una correlación negativa altamente significativa ($p \leq 0.01$) entre el aspecto y las variables de motilidad progresiva ($r = -0.61$) y concentración espermática ($r = -0.61$) y correlación negativa significativa ($p \leq 0.05$) con la motilidad masal ($r = -0.56$) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Correlación de las variables físicas y seminales de toros localmente adaptados.

Variables	CC	CE (cm)	VE (mL)	Color	Aspecto	pH	MM (%)	MP (%)	MN (%)	CES (millones/mL)
Peso vivo (kg)	.21	.20	.070	.25	-.16	.34	-.13	-.00	.28	.00
CC		.34	.38	-.16	.28	.42	-.32	-.26	-.24	-.12
CE (cm)			.63**	-.03	.24	-.10	-.26	-.22	-.10	-.15
VE (mL)				-.26	.29	.08	-.16	-.23	.05	.10
Color					-.75**	-.09	.44	.46*	-.03	.48*
Aspecto						.32	-.56*	-.61**	-.11	-.61**
pH							-.32	-.32	-.11	-.25
MM (%)								.88**	.19	.32
MP (%)									.42	.37
MN (%)										.00

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

CC= Condición corporal; CE= Circunferencia escrotal; VE= Volumen del eyaculado; MM= Motilidad masal; MP= Motilidad Progresiva; MN= Morfología normal.

Los resultados encontrados con criollo mixteco difieren a lo reportado por Torrado et al. (2016), quienes encontraron una elevada correlación entre la movilidad y la morfología del espermatozoide, y una relación del volumen eyaculado con el resto de las variables, mientras que en volúmenes de muestra más elevados se asociaron a peor calidad seminal.

4.2 Efecto del retiro del plasma seminal sobre la calidad pos descongelado de espermatozoides de bovinos localmente adaptados

Se comparó la criopreservación de espermatozoides de bovinos criollos mixtecos mediante una técnica convencional y una separando el plasma seminal, donde se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) en las siguientes variables: vitalidad espermática (48.76 ± 15.34 y $46.15 \pm 15.26\%$), motilidad total (69.66 ± 15.39 y $71.75 \pm 16.37\%$), motilidad progresiva (47.65 ± 6.85 y $48.16 \pm 7.17\%$), así como en los

parámetros cinéticos: velocidad lineal (VSL) (45.90 ± 6.96 y $47.98 \pm 8.19\%$), velocidad curvilínea (VCL) (130.94 ± 20.68 y $138.19 \pm 23.67\%$), velocidad media (VAP) (78.23 ± 12.71 y $82.11 \pm 14.89\%$), índice de oscilación (WOB) (60.15 ± 2.00 y $59.49 \pm 1.98\%$), desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) (3.73 ± 0.49 y $3.97 \pm 0.54\%$) y frecuencia de batida de la cola (BCF) (13.73 ± 0.88 y $13.97 \pm 0.91\%$) (Cuadro 5).

Cuadro 5. Variables evaluadas pos descongelación de semen de bovinos criollos mixtecos mediante dos técnicas diferentes.

Variables	Indicador	Técnica	
		Convencional	Centrifugado
		Media \pm DE*	Media \pm DE*
VE	%	48.76 ± 15.34^a	46.15 ± 15.26^b
IMP	%	37.96 ± 12.94^a	38.37 ± 14.17^a
MT	%	69.66 ± 15.39^b	71.75 ± 16.37^a
MP	%	47.65 ± 6.85^b	48.16 ± 7.17^a
VSL	$\mu\text{m/s}$	45.90 ± 6.96^b	47.98 ± 8.19^a
VCL	$\mu\text{m/s}$	130.94 ± 20.68^b	138.19 ± 23.67^a
VAP	$\mu\text{m/s}$	78.23 ± 12.71^b	82.11 ± 14.89^a
LIN	%	37.50 ± 2.73^a	36.99 ± 3.23^a
WOB	%	60.15 ± 2.00^a	59.49 ± 1.98^b
STR	%	62.52 ± 3.55^a	62.37 ± 4.35^a
ALH	μm	3.73 ± 0.49^b	3.97 ± 0.54^a
ALH Max	μm	6.53 ± 1.08^b	6.89 ± 1.20^a
BCF	Hz	13.73 ± 0.88^b	13.97 ± 0.91^a
MAD	Grados	193.39 ± 11.40^a	193.21 ± 8.84^a

*DE= Desviación Estándar; Los superíndices con letras diferentes entre filas representan diferencia significativa ($P < 0.05$).

VE= Vitalidad espermática; IMP= Integridad de la membrana plasmática; MT= Motilidad total= MP= Motilidad progresiva; VSL= Velocidad lineal; VCL= Velocidad curvilínea; VAP= Velocidad media; LIN= Índice de linealidad; WOB= Índice de oscilación; STR= Índice de rectitud; ALH= Desplazamiento lateral de la cabeza; BCF= Frecuencia de batida de la cola; MAD= Media del desplazamiento angular de la cabeza.

Se identificaron mejores resultados en las muestras sin el plasma seminal, lo que concuerda con lo reportado por Jacinto-Condori (2020), quien evaluó el retiro parcial de plasma seminal de toros de las razas Holstein y Pardo Suizo, donde encontró mejores resultados (68.67%) de motilidad individual pos descongelado con los eyaculados a los que se les retiró el 60% del plasma seminal. Esto se puede deber a que al retirar plasma seminal se diluye en mayores cantidades de diluyentes, y a lo reportado por Leyva (2020), quien menciona que el plasma seminal de los rumiantes contiene la enzima fosfolipasa A2 que puede hidrolizar la membrana de los espermatozoides, disminuyendo así la viabilidad a la criopreservación en muestras de semen con diluyentes que contienen yema de huevo.

En otro estudio, Vargas et al. (2008) encontraron menores resultados en cuanto a la motilidad espermática con semen procesado con tres diferentes técnicas de separación de espermatozoides viables. Esto puede asociarse a que en este estudio no se utilizaron medios para la separación de espermatozoides que pudieran dañar la integridad espermática.

4.3 Efecto de diluyentes de origen animal y vegetal sobre la viabilidad espermática pos descongelado

En el Cuadro 6 se muestran las variables de semen criopreservado con dos diluyentes, donde se encontraron mejores resultados con espermatozoides criopreservados con Optidyl® a diferencia de los criopreservados con Bioxcell®.

Estos resultados concuerdan con lo publicado por Carballo et al. (2009), quienes encontraron mayor porcentaje de motilidad con semen criopreservado con diluyente a base de lipoproteínas de origen animal (30.8%) en contraste con el semen congelado con diluyente a base de lecitina de soya (23.8%). Por su parte, Filipiak et al. (2020) no encontraron diferencias significativas entre diluyentes a base de lipoproteínas de origen animal y vegetal.

Cuadro 6. Variables evaluadas post descongelación de semen de bovinos criollos mixtecos mediante dos diluyentes diferentes.

Variable	Indicador	Diluyente	
		Optidyl®	Bioxcell®
		Media ± DE*	Media ± DE*
VE	%	51.56 ± 12.54 ^a	43.41 ± 16.76 ^b
IMP	%	41.46 ± 13.35 ^a	34.89 ± 12.98 ^b
ME	%	79.23 ± 12.89 ^a	62.19 ± 13.97 ^b
MP	%	50.78 ± 5.91 ^a	45.03 ± 6.85 ^b
VSL	µm/s	49.22 ± 6.89 ^a	44.67 ± 7.73 ^b
VCL	µm/s	144.47 ± 22.43 ^a	124.66 ± 17.77 ^b
VAP	µm/s	85.62 ± 13.22 ^a	74.72 ± 12.50 ^b
LIN	%	36.30 ± 2.97 ^b	38.18 ± 2.73 ^a
WOB	%	59.55 ± 1.81 ^b	60.09 ± 2.11 ^a
STR	%	61.07 ± 3.88 ^b	63.81 ± 3.57 ^a
ALH	µm	4.09 ± 0.51 ^a	3.61 ± 0.44 ^b
ALH Max	µm	7.29 ± 1.08 ^a	6.13 ± 0.91 ^b
BCF	Hz	14.28 ± 0.78 ^a	13.42 ± 0.75 ^b
MAD	Grados	195.23 ± 9.26 ^a	191.37 ± 10.73 ^b

*DE= Desviación Estándar; Los superíndices con letras diferentes entre filas representan diferencia significativa (P<0.05).

VE= Vitalidad espermática; IMP= Integridad de la membrana plasmática; MT= Motilidad total; MP= Motilidad progresiva; VSL= Velocidad lineal; VCL= Velocidad curvilínea; VAP= Velocidad media; LIN= Índice de linealidad; WOB= Índice de oscilación; STR= Índice de rectitud; ALH= Desplazamiento lateral de la cabeza; BCF= Frecuencia de batida de la cola; MAD= Media del desplazamiento angular de la cabeza.

4.4 Evaluación de la criopreservación de semen bovino con diferentes tiempos de equilibrio

Con relación a la evaluación de la criopreservación del semen con diferentes tiempos de equilibrio no se encontraron diferencias significativas para las variables espermáticas evaluadas (Cuadro 7); esto difiere con lo encontrado por Anchatuña (2017), quien encontró un mayor porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva a las 2 y 4 h (60.75 ± 8.14 y 61.11 ± 7.51) en relación a espermatozoides con mayor tiempo de equilibrio (8, 12, 16, 20, 24h); por otro lado, Galarza *et al.* (2017) no encontraron diferencias significativas entre tiempos de equilibrio de 2, 4 y 7 ($p \geq 0.05$). Esto puede deberse a que los espermatozoides se mantienen en constante metabolismo de nutrientes.

Cuadro 7. Variables evaluadas pos descongelación de semen de bovinos criollos mixtecos mediante diferentes tiempos de equilibrio.

Variable	Indicador	Tiempo de equilibrio				
		3 h	4 h	5 h	6 h	7h
		Media ± DE*	Media ± DE*	Media ± DE*	Media ± DE*	Media ± DE*
VE	%	44.6 ± 16.2	47.5 ± 14.7	49.2 ± 15.5	48.6 ± 15.0	47.4 ± 15.3
IMP	%	38.2 ± 14.3	36.1 ± 11.3	39.4 ± 12.3	38.4 ± 14.0	38.8 ± 15.7
ME	%	68.9 ± 16.7	72.9 ± 15.7	70.7 ± 15.4	71.0 ± 16.5	70.0 ± 15.2
MP	%	46.9 ± 7.0	49.8 ± 7.5	47.5 ± 6.6	47.3 ± 6.6	47.9 ± 7.2
VSL	µm/s	46.2 ± 7.8	48.4 ± 8.5	46.4 ± 6.7	46.6 ± 7.0	47.1 ± 8.1
VCL	µm/s	132.6 ± 23.8	136.1 ± 22.6	134.8 ± 19.9	135.8 ± 23.0	133.5 ± 23.4
VAP	µm/s	78.8 ± 14.8	81.7 ± 14.5	79.9 ± 12.2	80.5 ± 13.8	80.0 ± 14.5
LIN	%	37.4 ± 3.3	37.8 ± 2.8	36.7 ± 2.9	36.7 ± 2.9	37.7 ± 3.1
WOB	%	59.7 ± 1.9	60.15 ± 2.0	59.5 ± 2.2	59.6 ± 1.8	60.2 ± 1.9
STR	%	62.9 ± 4.5	62.9 ± 3.5	61.9 ± 3.6	61.8 ± 3.8	62.8 ± 4.2
ALH	µm	3.8 ± 0.60	3.9 ± 0.5	3.8 ± 0.5	3.8 ± 0.6	3.8 ± 0.5
ALHMax	µm	6.6 ± 1.3	6.8 ± 1.1	6.7 ± 1.0	6.8 ± 1.2	6.7 ± 1.2
BCF	Hz	13.8 ± 0.9	13.9 ± 0.8	14.0 ± 0.8	13.8 ± 1.0	13.7 ± 0.9
MAD	Grados	194.8 ± 9.3	194.8 ± 9.3	193.2 ± 9.4	191.8 ± 10.0	191.8 ± 12.5

**DE= Desviación Estándar VE= Vitalidad espermática; IMP= Integridad de la membrana plasmática; MT= Motilidad total= MP= Motilidad progresiva; VSL= Velocidad lineal; VCL= Velocidad curvilínea; VAP= Velocidad media; LIN= Índice de linealidad; WOB= Índice de oscilación; STR= Índice de rectitud; ALH= Desplazamiento lateral de la cabeza; BCF= Frecuencia de batida de la cola; MAD= Media del desplazamiento angular de la cabeza.

4.5 Efecto de diferentes protocolos de criopreservación sobre la viabilidad espermática de bovinos localmente adaptados

Se contrastaron diferentes protocolos para la criopreservación de semen bovino de toros criollos mixtecos en los cuales no se encontró diferencia significativa en las variables de vitalidad e integridad de la membrana plasmática, mientras que, en la motilidad total y progresiva, los mejores resultados fueron para aquellos en los que se utilizó el diluyente Optidyl®, independientemente del tiempo de equilibrio o el retiro de plasma seminal (Cuadro 8). Los resultados de esta investigación difieren con lo reportado por Montoya-Páez *et al.* (2020), quienes encontraron una vitalidad espermática mayor ($67.60 \pm 7.86\%$) y parámetros menores en la integridad de la membrana ($32.63 \pm 7.05\%$), motilidad total de $58.40 \pm 24.84 \%$ y motilidad progresiva de $40.09 \pm 21.0 \%$ a diferencia del presente estudio.

Cuadro 8. Variables evaluadas pos descongelación de semen de bovinos criollos mixtecos con diferentes protocolos de criopreservación.

Tratamientos	Variables			
	Vitalidad	Integridad de la Membrana Plasmática	Motilidad Total	Motilidad Progresiva
	Media ± DE*	Media ± DE*	Media ± DE*	Media ± DE*
Cent_Op_3h	45.3 ± 11.3	40.4 ± 14.7	75.9 ± 14.0 ^{abcde}	49.2 ± 4.6 ^{abcd}
Cent_Op_4h	49.8 ± 13.4	38.7 ± 10.7	83.6 ± 10.9 ^a	53.0 ± 5.9 ^a
Cent_Op_5h	51.0 ± 14.6	42.9 ± 12.4	81.5 ± 10.3 ^a	51.5 ± 5.1 ^{ab}
Cent_Op_6h	50.6 ± 12.6	43.3 ± 14.9	81.8 ± 13.2 ^a	51.1 ± 5.5 ^{abc}
Cent_Op_7h	50.3 ± 11.2	45.1 ± 19.5	80.2 ± 13.8 ^{ab}	51.4 ± 5.1 ^{ab}
Cent_Bio_3h	39.9 ± 17.8	36.1 ± 15.1	61.9 ± 17.1 ^{efg}	45.2 ± 8.9 ^{bcd}
Cent_Bio_4h	46.5 ± 19.2	32.5 ± 9.4	63.4 ± 16.8 ^{defg}	46.2 ± 7.6 ^{abcd}
Cent_Bio_5h	43.1 ± 16.3	34.4 ± 10.9	62.1 ± 13.7 ^{efg}	44.1 ± 6.6 ^{cd}
Cent_Bio_6h	44.8 ± 16.0	37.2 ± 13.5	66.1 ± 14.5 ^{bcdefg}	45.4 ± 5.3 ^{bcd}
Cent_Bio_7h	40.4 ± 16.2	33.4 ± 14.8	61.0 ± 13.2 ^{efg}	44.3 ± 9.0 ^{bcd}
Cent_Op_3h	54.0 ± 14.7	43.6 ± 13.0	77.8 ± 15.5 ^{abcd}	49.3 ± 6.0 ^{abcd}
SCent_Op_4h	49.9 ± 11.9	39.0 ± 11.4	80.5 ± 10.6 ^{ab}	53.3 ± 7.8 ^a
SCent_Op_5h	55.7 ± 10.1	40.2 ± 11.4	79.1 ± 9.7 ^{abc}	49.5 ± 4.8 ^{abcd}
SCent_Op_6h	55.2 ± 12.3	39.9 ± 12.6	77.5 ± 15.2 ^{abcd}	49.7 ± 6.2 ^{abcd}
SCent_Op_7h	53.5 ± 11.7	41.8 ± 12.2	74.3 ± 14.1 ^{abcdef}	49.8 ± 7.0 ^{abcd}
SCent_Bio_3h	39.4 ± 16.7	32.7 ± 12.7	59.8 ± 12.6 ^{fg}	44.1 ± 6.4 ^{cd}
SCent_Bio_4h	44.0 ± 13.7	34.2 ± 12.7	64.3 ± 12.6 ^{cdefg}	46.9 ± 5.7 ^{abcd}
SCent_Bio_5h	47.2 ± 18.1	40.4 ± 13.5	60.1 ± 14.4 ^{fg}	45.0 ± 6.9 ^{2bcd}
SCent_Bio_6h	43.8 ± 16.8	33.1 ± 13.9	58.8 ± 13.0 ^g	43.0 ± 6.4 ^d
SCent_Bio_7h	45.3 ± 18.4	35.1 ± 13.2	64.5 ± 12.4 ^{cdefg}	46.1 ± 5.1 ^{abcd}

*DE= Desviación Estándar; Los superíndices con letras diferentes entre columnas representan diferencia significativa (P<0.05).

Con relación a la cinética espermática de estos protocolos, se encontró una mayor velocidad lineal (VSL) en los tratamientos en donde se utilizó Optidyl® con 4 h de equilibrio (50.84 ± 5.62 y 51.13 ± 10.45 $\mu\text{m/s}$ respectivamente); la velocidad curvilínea (VCL) fue mayor en los protocolos en los que se retiró el plasma seminal, utilizando Optidyl® con 4, 5, 6 y 7 h de equilibrio (149.29 ± 20.76 , 150.24 ± 22.54 , 149.42 ± 22.53 y 147.64 ± 25.15 $\mu\text{m/s}$); la velocidad promedio de desplazamiento (VAP) fue mayor en los protocolos sin plasma seminal donde se utilizó Optidyl® con 4 y 5 h de equilibrio (88.55 ± 12.00 y 88.55 ± 12.68 $\mu\text{m/s}$ respectivamente).

Los espermatozoides criopreservados sin plasma seminal, con diluyente Optidyl® con 4, 5 y 6 h de equilibrio mostraron mayor amplitud del desplazamiento lateral de cabeza, ALH Max y Frecuencia de batido (BCF); se encontró diferencia estadísticamente significativa en la media del desplazamiento angular (MAD), donde el mejor resultado se encontró con el protocolo sin retiro de plasma seminal, con diluyente Optidyl® con 4 h de equilibrio ($200.80 \pm 8.16^\circ$) ($p \leq 0.05$) (Cuadro 9).

Estos resultados difieren de los encontrados por Arbaiza y Cabrera (2021), quienes obtuvieron menores parámetros cinéticos a los reportados en este estudio obteniendo una VSL de 30.134 ± 1.75 $\mu\text{m/s}$, VCL 75.227 ± 7.38 $\mu\text{m/s}$, VAP 38.639 ± 3.20 $\mu\text{m/s}$, ALH 0.940 ± 0.11 $\mu\text{m/s}$, BCF 7.314 ± 0.38 Hz. E igualmente con Pérez et al. (2021), quienes encontraron una VSL de 19.7 ± 1.5 $\mu\text{m/s}$, VCL 45.3 ± 2.3 $\mu\text{m/s}$, VAP 27.4 ± 1.8 $\mu\text{m/s}$, ALH 2.0 ± 0.0 $\mu\text{m/s}$, BCF 4.6 ± 0.2 Hz en muestras criopreservadas con diluyente a base de yema de huevo durante 2 h de equilibrio.

Cuadro 9. Trayectorias obtenidas mediante el analizador espermático asistido por computadora (CASA).

Tratamientos	Variables						
	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	ALH (μm)	ALH_Max (μm)	BCF (Hz)	MAD (grados)
	Media \pm DE*	Media \pm DE*	Media \pm DE*	Media \pm DE*	Media \pm DE*	Media \pm DE*	Media \pm DE*
Cent_Op_3h	47.1 \pm 5.6 ^{abc}	139.3 \pm 21.3 ^{abcde}	82.2 \pm 12.2 ^{abcde}	4.0 \pm 0.5 ^{abc}	7.1 \pm 1.1 ^{abcd}	14.3 \pm 0.7 ^{abcd}	193.9 \pm 7.2 ^{ab}
Cent_Op_4h	50.8 \pm 5.6 ^a	149.3 \pm 20.8 ^a	88.6 \pm 12.0 ^a	4.2 \pm 0.5 ^a	7.6 \pm 1.0 ^a	14.4 \pm 0.7 ^a	197.0 \pm 5.5 ^{ab}
Cent_Op_5h	50.7 \pm 6.1 ^{ab}	150.2 \pm 22.5 ^a	88.6 \pm 12.7 ^a	4.2 \pm 0.5 ^a	7.5 \pm 1.0 ^a	14.6 \pm 0.7 ^a	196.2 \pm 7.8 ^{ab}
Cent_Op_6h	50.0 \pm 6.1 ^{ab}	149.4 \pm 22.5 ^a	87.9 \pm 12.6 ^{ab}	4.2 \pm 0.5 ^a	7.6 \pm 1.1 ^a	14.4 \pm 0.8 ^a	194.8 \pm 10.6 ^{ab}
Cent_Op_7h	50.4 \pm 7.1 ^{ab}	147.6 \pm 25.2 ^a	87.4 \pm 15.1 ^{ab}	4.2 \pm 0.6 ^{ab}	7.4 \pm 1.2 ^{ab}	14.4 \pm 0.7 ^{ab}	196.0 \pm 6.6 ^{ab}
Cent_Bio_3h	46.0 \pm 11.7 ^{abc}	128.7 \pm 29.2 ^{abcde}	76.9 \pm 19.9 ^{abcde}	3.7 \pm 0.7 ^{bcde}	6.2 \pm 1.4 ^{cde}	13.6 \pm 0.9 ^{bcde}	195.3 \pm 8.8 ^{ab}
Cent_Bio_4h	46.9 \pm 9.3 ^{abc}	127.8 \pm 21.1 ^{abcde}	77.0 \pm 14.6 ^{abcde}	3.8 \pm 0.4 ^{abcde}	6.3 \pm 1.0 ^{bcde}	13.4 \pm 0.8 ^{de}	189.0 \pm 10.1 ^b
Cent_Bio_5h	44.6 \pm 7.9 ^{abc}	127.8 \pm 16.1 ^{abcde}	75.8 \pm 12.1 ^{abcde}	3.7 \pm 0.4 ^{abcde}	6.3 \pm 0.8 ^{bcde}	13.6 \pm 0.7 ^{bcde}	191.5 \pm 7.3 ^{ab}
Cent_Bio_6h	46.4 \pm 7.6 ^{abc}	132.4 \pm 20.6 ^{abcde}	78.9 \pm 14.2 ^{abcde}	3.8 \pm 0.5 ^{abcde}	6.6 \pm 1.0 ^{abcde}	13.5 \pm 1.0 ^{de}	190.3 \pm 9.0 ^{ab}
Cent_Bio_7h	46.9 \pm 11.1 ^{abc}	129.3 \pm 20.5 ^{abcde}	78.0 \pm 15.8 ^{abcde}	3.8 \pm 0.5 ^{abcde}	6.4 \pm 1.0 ^{bcde}	13.5 \pm 0.8 ^{bcde}	188.2 \pm 10.6 ^b
SCent_Op_3h	49.1 \pm 6.4 ^{abc}	144.2 \pm 23.1 ^{ab}	85.4 \pm 13.6 ^{abc}	4.0 \pm 0.6 ^{abc}	7.2 \pm 1.2 ^{abc}	14.2 \pm 0.7 ^{abcd}	197.1 \pm 8.4 ^{ab}
SCent_Op_4h	51.1 \pm 10.5 ^a	143.6 \pm 23.1 ^{abc}	86.6 \pm 15.5 ^{ab}	4.1 \pm 0.5 ^{ab}	7.3 \pm 1.0 ^{abc}	14.2 \pm 0.7 ^{abcd}	200.8 \pm 8.2 ^a
SCent_Op_5h	47.5 \pm 5.6 ^{abc}	141.3 \pm 16.3 ^{abcd}	83.4 \pm 10.0 ^{abcde}	4.0 \pm 0.4 ^{abcd}	7.1 \pm 0.7 ^{abcd}	14.3 \pm 0.6 ^{abc}	193.5 \pm 9.7 ^{ab}
SCent_Op_6h	48.4 \pm 7.0 ^{abc}	143.6 \pm 24.2 ^{abc}	85.0 \pm 14.1 ^{abcd}	4.0 \pm 0.5 ^{ab}	7.3 \pm 1.2 ^{abc}	14.2 \pm 1.0 ^{abcd}	191.4 \pm 10.7 ^{ab}
SCent_Op_7h	47.2 \pm 7.3 ^{abc}	136.2 \pm 24.7 ^{abcde}	81.2 \pm 14.2 ^{abcde}	3.9 \pm 0.5 ^{abcde}	6.9 \pm 1.2 ^{abcde}	13.8 \pm 0.9 ^{abcde}	191.7 \pm 13.5 ^{ab}
SCent_Bio_3h	42.5 \pm 4.7 ^{bc}	118.0 \pm 9.0 ^e	70.7 \pm 7.0 ^{de}	3.4 \pm 0.2 ^e	5.8 \pm 0.5 ^e	13.3 \pm 0.6 ^e	193.0 \pm 12.2 ^{ab}
SCent_Bio_4h	44.8 \pm 6.8 ^{abc}	123.6 \pm 15.3 ^{bcde}	74.7 \pm 11.4 ^{abcde}	3.5 \pm 0.3 ^{cde}	6.0 \pm 0.7 ^{de}	13.5 \pm 0.7 ^{cde}	192.2 \pm 8.6 ^{ab}
SCent_Bio_5h	43.0 \pm 4.4 ^{abc}	120.0 \pm 6.5 ^{de}	71.8 \pm 5.6 ^{cde}	3.4 \pm 0.3 ^e	5.9 \pm 0.6 ^e	13.4 \pm 0.6 ^{de}	191.8 \pm 12.1 ^{ab}
SCent_Bio_6h	41.7 \pm 4.2 ^c	117.7 \pm 8.7 ^e	70.1 \pm 6.4 ^e	3.4 \pm 0.3 ^e	5.8 \pm 0.7 ^e	13.2 \pm 0.6 ^e	190.9 \pm 9.7 ^{ab}
SCent_Bio_7h	43.8 \pm 4.8 ^{abc}	121.0 \pm 14.6 ^{cde}	73.4 \pm 9.4 ^{bcde}	3.5 \pm 0.4 ^{de}	6.1 \pm 0.8 ^{de}	13.2 \pm 0.7 ^e	191.5 \pm 16.7 ^{ab}

*DE= Desviación Estándar; Los superíndices con letras diferentes entre columnas representan diferencia significativa (P<0.05).

VSL= Velocidad lineal; VCL= Velocidad curvilínea; VAP= Velocidad media; ALH= Desplazamiento lateral de la cabeza; BCF= Frecuencia de batida de la cola; MAD = Media del desplazamiento angular de la cabeza.

El porcentaje de linealidad (LIN) tuvo diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre los tratamientos (Cuadro 10), encontrándose un mayor resultado en el protocolo sin retirar plasma seminal, con diluyente Bioxcell® con 7 h de equilibrio ($38.83 \pm 2.55\%$), mientras que en el índice de oscilación (WOB) no se encontraron diferencias estadísticas ($p \geq 0.05$).

El índice de rectitud (STR) fue mayor en los protocolos donde se retiró el plasma seminal, y se utilizó diluyente Bioxcell®, con 3 y 4 h de equilibrio (64.60 ± 5.96 y $64.64 \pm 3.32\%$ respectivamente). Estos datos concuerdan con lo reportado por Ronquillo (2021), quien encontró $49.43 \pm 1.61\%$ de LIN, $61.38 \pm 1.32\%$ WOB, $79.69 \pm 2.33\%$ de STR en espermatozoides congelados de toro criollo chihuahuense. Esto puede atribuirse a que en ambos estudios se trabajó con toros criollos mexicanos.

Cuadro 10. Índices cinéticos obtenidos mediante el analizador espermático asistido por computadora (CASA).

Tratamiento	Variables		
	Porcentaje de linealidad (LIN) %	Índice de oscilación (WOB) %	Índice de rectitud (STR) %
	Media ± DE*	Media ± DE*	Media ± DE*
Cent_Op_3h	36.21 ± 2.62 ^{ab}	59.39 ± 1.41	61.28 ± 3.96 ^{abc}
Cent_Op_4h	36.26 ± 3.20 ^{ab}	59.52 ± 1.77	60.98 ± 3.88 ^{abc}
Cent_Op_5h	35.87 ± 3.05 ^{ab}	59.15 ± 1.94	60.67 ± 3.71 ^{abc}
Cent_Op_6h	35.67 ± 3.63 ^{ab}	59.24 ± 2.05	60.24 ± 4.44 ^{bc}
Cent_Op_7h	36.48 ± 3.25 ^{ab}	59.42 ± 1.41	61.62 ± 4.80 ^{abc}
Cent_Bio_3h	38.45 ± 4.43 ^{ab}	59.75 ± 2.60	64.60 ± 5.96 ^a
Cent_Bio_4h	38.59 ± 2.27 ^{ab}	59.93 ± 1.45	64.64 ± 3.32 ^a
Cent_Bio_5h	37.07 ± 2.88 ^{ab}	59.23 ± 2.46	62.90 ± 3.73 ^{abc}
Cent_Bio_6h	37.15 ± 2.28 ^{ab}	59.42 ± 1.56	62.88 ± 3.52 ^{abc}
Cent_Bio_7h	38.13 ± 3.16 ^{ab}	59.89 ± 2.32	63.88 ± 3.62 ^{abc}
SCent_Op_3h	36.19 ± 2.64 ^{ab}	59.32 ± 1.31	61.20 ± 4.24 ^{abc}
SCent_Op_4h	37.72 ± 3.18 ^{ab}	60.49 ± 2.30	62.31 ± 3.32 ^{abc}
SCent_Op_5h	35.56 ± 2.16 ^c	59.25 ± 1.82	60.13 ± 2.86 ^c
SCent_Op_6h	35.73 ± 2.58 ^{ab}	59.46 ± 1.91	60.20 ± 3.23 ^c
SCent_Op_7h	37.32 ± 2.96 ^{ab}	60.26 ± 1.86	62.12 ± 4.07 ^{abc}
SCent_Bio_3h	38.76 ± 2.06 ^{ab}	60.36 ± 2.09	64.46 ± 2.28 ^{ab}
SCent_Bio_4h	38.43 ± 1.96 ^{ab}	60.67 ± 2.19	63.62 ± 2.53 ^{abc}
SCent_Bio_5h	38.30 ± 2.67 ^{ab}	60.25 ± 2.36	63.76 ± 2.89 ^{abc}
SCent_Bio_6h	38.17 ± 2.10 ^{ab}	60.12 ± 1.83	63.74 ± 2.52 ^{abc}
SCent_Bio_7h	38.83 ± 2.55 ^a	61.27 ± 1.53	63.64 ± 4.23 ^{abc}

*DE= Desviación Estándar; Los superíndices con letras diferentes entre columnas representan diferencia significativa (P<0.05).

5. CONCLUSIONES

La calidad seminal en fresco de bovinos criollos mixtecos fue similar a la reportada en diversos trabajos con la misma raza criolla.

Se encontraron diferencias en cuanto a la viabilidad de los espermatozoides pos descongelados entre los tratamientos con y sin plasma seminal, obteniéndose mejores resultados en aquellos eyaculados a los que se les retiró el plasma seminal.

La viabilidad espermática pos descongelado fue diferente entre los criopreservados con diluyente a base de lipoproteínas de origen animal y vegetal, encontrándose mejores parámetros en la utilización del diluyente de origen animal (Optidyl®).

No existió diferencia estadísticamente significativa entre los diferentes tiempos de equilibrio. Sin embargo, los resultados están dentro de los parámetros aceptados para la comercialización de semen criopreservado para la especie bovina.

Se encontró un efecto sobre la viabilidad espermática con diferentes protocolos de criopreservación, donde la motilidad total y progresiva, así como la mayoría de las variables cinemáticas fue mejor en el protocolo al que se les retiró el plasma seminal, se diluyó con Optidyl® y se equilibró a 4 h por lo que se considera a este protocolo como el mejor para criopreservar el germoplasma de bovinos criollos mixtecos.

Se recomienda replicar este estudio con las diversas razas de bovinos criollos mexicanos, así como evaluar la capacidad fecundante tanto in vivo como in vitro de los espermatozoides criopreservados.

6. LITERATURA CITADA

- Aguirre L, A. Bermeo, D. Maza y L. Merino. 2011. Estudio fenotípico y zoométrico de bovino criollo de la sierra media y alta de la región sur del Ecuador (RSE). *Actas Iberoamericanas de Conservación animal* 1: 392 – 396.
- Almela, V.L. 2014. Aportaciones a la Crioconservación de Gametos Masculinos en la Raza Bovina Murciano Levantina: Recongelación de Espermatozoides. Tesis doctoral. Universidad de Murcia. España; p. 45-75.
- Anchatuña, Q.C.A. 2017. Efecto de distintos tiempos de equilibrio sobre la calidad espermática pre y post congelación de semen bovino de toros reproductores Holstein friesian. Tesis Licenciatura. Universidad Central del Ecuador. Quito, Ecuador, p. 32-78.
- Arbaiza B. M. D., P. C. Cabrera. 2021. Efecto de la criopreservación espermática en la fragmentación del ADN, viabilidad, y parámetros cinéticos en toros Brown Swiss. *Revista Colombiana de Ciencia Animal* 13(1): 1-12
- Azuara, P.B., E.A., Velázquez, B.F., Ayala y R.J., Garza. 1982. Polimorfismo bioquímico de las proteínas sanguíneas en bovinos criollos y su aplicación en la selección. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Citogenética e Inmunogenética. México D.F.; p. 60-77.
- Calle, C.C. 2020. Evaluación de semen bovino utilizando medios comerciales de criopreservación, provincia de Morona Santiago, Ecuador. Tesis especialidad. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina; p. 51-76.
- Carballo, D.M. R. Canseco, R. García y F. Montiel. 2009. Comparación de dos diluyentes comerciales para criopreservar semen de bovino bajo condiciones de campo en el trópico húmedo. Instituto de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Veracruz, México. pp. 355-360.

- Cardellino, R.A. 2003. Animal genetic resources conservation and development: the role of FAO. *Archivos de Zootecnia* 52: 185-192.
- Castelo, T.S., T.R., Frota, A.R., Silva. 2008. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. *Acta Vet Bras* 2: 67-75.
- Clemente-Sánchez, F., V., Cessa-Reyes, C., Cortez-Romero, L.A., Tarango-Arambulaa y P., Arenas-Baez. 2015. Commercial extenders and freezing curves for the preservation of sperm cells of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Journal of Applied Animal Research*. 43(4):468–473.
- Crespo, E, A. Quintero-Moreno. 2014. Calidad seminal de toros criollo limonero *Revista Científica*. 24(6): 518-525.
- De Alba, J. 1981. Recursos genéticos animales en América Latina. Ganado Criollo y especies de altura. FAO. Roma Italia, p. 10-35.
- De Alba, J. 2011. El Libro de los Bovinos Criollos de América. Biblioteca Básica de Agricultura. Ediciones Papiro Omega, S.A. de C.V. México, p. 444.
- Diamond, J. 2002. Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. *Nature*, 418: 700–707.
- Dieter H., Díaz, T., y Flórez H. 1999. Guía para la evaluación de la condición corporal de vacas en sistemas doble propósito. CORPOICA. Programa Nacional de Nutrición Animal. Bogotá.
- Espinoza, V.J.L., F.J.A., Guevara y E.A., Palacios. 2009. Caracterización morfométrica y faneróptica del bovino criollo Chinampo de México. *Archivos de Zootecnia* 58(222):277-279.
- FAO. 2010. La situación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación y la agricultura, editado por Barbara Rischkowsky y Dafydd Pilling. Roma. Consultado el 02 de enero de 2020, en: <http://www.fao.org/docrep/011/a1250s/a1250s00.htm> (traducción de la versión original en inglés, 2007).

- Filipiak, Y., E., Armstrong, R., Aragunde, D., Fila, J.G., Laureiro, V., Álvarez, M., Pereira, J.C., Boggio, C., Larocca, F., Vila y S., Llambi. 2020. Calidad y capacidad fertilizante in vitro de semen de toros Criollo Uruguayo criopreservado en dos diluyentes comerciales. Archivos Latinoamericanos de Producción Animal 28(3-4):133-143.
- Fuentes-Mascorro, G. 2016. Oaxaca, tierra de contrastes. Quehacer Científico en Chiapas 11 (1): 50-58.
- Galarza, D. A., V.G. Serpa, C.S. Torres. 2015. Comparación de dos medios para congelar semen de toro y la influencia de tres tiempos de equilibración en la calidad post-descongelación. Maskana 6:189-190.
- González, L.A.K. y S.J.D., Pallares. 2014. Eficiencia comparativa entre dos diluyentes para la criopreservación de semen en toros Brahmán en el departamento de Antioquia. Tesis Licenciatura. Universidad de la Salle. Bogotá, Colombia, p. 36-46.
- Hanotte, O., Toll J., Iniguez L. y Rege, J.E.O. 2006. Farm animal genetic resources: Why and what do we need to conserve. Proceeding of the IPGRI-ILRI-FAO-CIRAD workshop: Option for in situ and ex situ conservation of AnGR, 8-11 November, 2005. Montpellier, Francia.
- Hernández, S.R.M. 2012. Tipificación del ganado Criollo mexicano de los estados de Chihuahua, Baja California, Guerrero, Oaxaca, Puebla y Nayarit. SAGARPA, ASOCRIOLLO, CONARGEN.
- Hernández-Corredor, L., J., Dorado, M., Hidalgo, J., Rubio-Parada y A., Quintero-Moreno. 2014. Efecto del método de extracción seminal sobre la vitalidad y motilidad espermática postdescongelación en machos cabríos de raza mestiza. Revista Científica Biológico Agropecuaria Tuxpan 2(4): 875-884.
- Holgado, F.D., M.F. Ortega. 2015. Caracterización de toros adultos de la raza criollo argentino: peso corporal, alzada y circunferencia escrotal. Actas Iberoamericanas de Conservación Animal. 6: 172 – 177.

- Íñiguez, C.U., D.A., Galarza, D.E., Argudo y R.H., Alberio. 2017. Efecto de la época del año sobre las características seminales de toros de fenotipo Criollo ecuatoriano. *Revista Científica MASKANA*. 8: 93–95.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). (2022). Ubicación geográfica, condiciones climáticas y orográficas. INEGI: México; 2022. Disponible en: <https://www.inegi.org.mx/app/mapa/espacioydatos/default.aspx?ag=200390001>
- Leyva, L.A.A. 2020. Métodos de obtención, evaluación y congelación seminal en Muflón Europeo (*Ovis orientalis musimon*) y Cabra Montés (*Capra pyrenaica*). Tesina maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México, p. 57-88.
- Ludueña, O.E.A. 2019. Evaluación de dos antioxidantes en la calidad seminal post congelación de dos biotipos de ganado bovino criollo de la provincia de Loja. Tesis Licenciatura. Universidad Nacional de Loja. Loja, Ecuador, p. 27-40.
- Martínez, V.G. 2005. El ganado bovino Criollo en Nayarit: ubicación y población estimada. Folleto Técnico N° 1. INIFAP. Campo Experimental 'El Verdineño'. Santiago Ixcuintla, Nayarit.
- Martínez, V.G. y Montaña, B.M. 2015. El bovino criollo del Occidente de México. En Perezgrovas, G.R.A. y de la Torre, S.J.F. (editores) *Los bovinos Criollos de México. Historia, caracterización y perspectivas*. México. Editores Universidad Autónoma de Chiapas; 147-174. Recuperado de: https://www.textosdeinvestigacion.unach.mx/ebooksbd/20151023_121503/mobile/index.html#p=8
- Mejía, G.J.E. 2017. Evaluación pre y post congelación del semen obtenido con vagina artificial y electroeyaculador en el ganado criollo. Tesis Maestría. Universidad de Cuenca. Cuenca, Ecuador, p. 46-72.
- Mendelsohn, R. 2003. The challenge of conserving indigenous domesticated animals. *Ecological Economics* 45(3): 501-510

- Méndez, M., M.J.P., Serrano, R.B., Ávila, M.G., Rosas y N.P. y Méndez. 2002. Caracterización morfométrica del bovino Criollo Mixteco. Archivos de Zootecnia 51: 217-221.
- Monserat, V. J. 2016. CASA, análisis de semen automatizado: aplicabilidad y tendencias de futuro. Reproducción humana y laboratorio clínico. Ed Cont Lab Clín; 32 Valencia: 82 - 111
- Montoya-Páez, J.D., M., Giraldo-León, J.E. y Duque-Cortes. 2020. Evaluación de tres concentraciones de yema de huevo centrifugada en la criopreservación de semen bovino. Rev Inv Vet Perú 31(2): 1-9.
- Morillo, M., S. Salazar, S. y E. Castillo. 2012. Evaluación del potencial reproductivo del macho bovino. Elio A. Pérez S. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Maracay, Aragua. Venezuela. 20 p.
- Muiño, O. R. 2008. Evaluación de la motilidad y viabilidad del semen bovino mediante el uso de sistemas CASA y citometría de flujo, identificación de subpoblaciones espermáticas. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. La Coruña, España. P 16 - 20.
- Organización de los Estados Americanos (OEA). 2022. Mercado Común del Sur (MERCOSUR) Resoluciones del Grupo Mercado Común MERCOSUR/GMC/RES N° 46/96: Marco regulatorio para el tratamiento de la genética animal de bovinos, caprinos, ovinos, équidos y porcinos en el Mercosur
<http://www.sice.oas.org/Trade/MRCSRS/Resolutions/RES4696.asp>
[consulta: 19/07/2022]
- Parra-Cortés, R.I. y M.A. Magaña-Magaña. 2020. Vacas, toros y bueyes criollos en peligro. Ecofronteras 68(24):26-29.
- Parada, D.O y R.K., Ariza. 2019. Efecto de dos diluyentes (agua de coco vs. andromed®) en la crioconservación del semen bovino. Tesis de licenciatura. Universidad Cooperativa de Colombia. Colombia, p. 24-31.

- Pérez, J., G. Restrepo, A. Usuga. 2021. Calidad de semen bovino diluido y congelado con caseinato de sodio. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 32(6): 1-11.
- Perezgrovas, R., J., Delgado, M., Camacho, G., Fuentes, J., Cruz, E., Pérez, M., Carmona, A., Rosendo, V., Severino, P., Pérez, F., Montiel, J., Gallegos, C., Becerril, A., Hernández, P., Cervantes, F., Gómez, M., Barrientos, B., Domínguez, G., Martínez, J., Palacios, M., Montaña, E., Rubio, E., Pérez, M., Itza, J., Carrera, R., Núñez, F., Magaña, R., Ramírez, J., García, D., Phillip, D., Debbie y J., Beranger. 2017. Catálogo ilustrado de los bovinos criollos de México Razas locales y sistemas empíricos de manejo. Editor Perezgrovas-Garza, R.A. Universidad Autónoma de Chiapas. México, p. 40.
- Perezgrovas, G.R. y S.F. de la Torre. 2015. Los bovinos criollos de México. Historia, caracterización y perspectivas. Colección de Textos Universitarios. Unidad de Divulgación Científica. Universidad Autónoma de Chiapas, p. 428.
- Primo, A.T. 1992. El ganado bovino ibérico en las Américas 500 años después. *Archivos de Zootecnia* 41(154): 421-432.
- Quiroz, V.J. 2007. Caracterización genética de los bovinos criollos mexicanos y su relación con otras poblaciones bovinas. Tesis Doctoral. Córdoba España, p. 65-89.
- Ramos, Z.L., A., Rojas y Z., Martínez. 2017. Efecto de dilutores y tiempos de equilibrio en la criopreservación de semen ovino (*Ovis aries*). *Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales* 4(2):63–71.
- Rodero, A., J.V., Delgado y E., Rodero. 1992. Primitive andalusian livestock and their implications in the discovery of America. *Archivos de Zootecnia*. 41:383-400.
- Ronquillo, R. L. M. 2021. Calidad seminal y expresión de ARNm PLCZ1 en células espermáticas de toros criollos chihuahuense vs. europeo. Tesis maestría. Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua, México. p. 29 - 44

- Roof, D.J., S., Bowley, L.L., Price, D.J., Matsas. 2012. Comparison of two commercial extenders for cryopreservation of goat semen without sperm washing. *Theriogenology*. 15;77(2):412-20.
- Rubio, T.R. y E.E., Pérez. 2015. El bovino criollo de la sierra Tarahumara. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal* 6:485-494.
- Saavedra, C.G.D. 2018. Conservación seminal en toros Cebú. Efecto de la retirada del plasma seminal y su posterior incorporación sobre la calidad espermática en los protocolos de criopreservación. Tesis doctoral, Universidad de Zaragoza. España, p. 51-73.
- Sastre, H.J. 2003. Descripción, situación actual y estrategias de conservación de la raza bovina Colombiana Criolla Casanare. Facultad de Veterinaria. Departamento de producción animal. Tesis doctoral, Universidad de Córdoba. España, p. 53-68.
- Segura, C.J.C. y P.R.C., Montes. 2001. Razones y estrategias para la conservación de los recursos genéticos animales. *Rev Biomed* 12:196-206.
- Serrano, J., R. Montes, B. Aguilar, N. Flores. F. Utrera, D. Cano. 2004. Valores hematológicos de Bovinos Criollos de la región Mixteca (México). *Veterinaria, Montevideo*. 39 (155-156): 43-46.
- Sponenberg, P.H. 2008. Conservación sostenible de los recursos zoogenéticos en los EE.UU. IX Simposio Iberoamericano sobre Conservación y Utilización de Recursos Zoogenéticos. 10, 11 y 12 de diciembre. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.
- Steane DE. 1992. Note on the FAO Expert Consultation on Management of Global Animal Genetic Resources. Rome: FAO; p. 39.
- Tisdell, C. 2003. Socioeconomic causes of loss of animal genetic diversity: analysis and assessment. *Ecological Economics* 45(3):365-376.
- Thundathil J.C., L. Alysha, L. Dance, J.P. Kastelic. 2016. Fertility management of bulls to improve beef cattle productivity. *Theriogenology* 86(1): 397 - 405.

- Torrado, I., M.L. Aranda, V. Gómez-Arrones, J.A. Bravo, J.A. Constantino. 2016. Utilización de la electroeyaculación para la evaluación de la aptitud reproductiva potencial del toro en sistemas extensivos en la comunidad autónoma de Extremadura. *Archivos de Zootecnia*. 65 (251): 327-332.
- Valverde, A., M. Madrigal-Valverde. 2018. Sistemas de análisis computadorizado de semen en la reproducción animal. *Agronomía Mesoamericana* 29(2). 469-484
- Varela, G.E., B.A., Rojano y B.G., Restrepo. 2019. Efecto de las lipoproteínas de baja densidad y la trehalosa sobre la actividad enzimática antioxidante del semen bovino criopreservado. *Rev Inv Vet Perú* 30(1):256-264.
- Vargas, I.M., R. Canseco y F. Montiel. 2008. Técnicas para separar espermatozoides viables en eyaculados bovinos. Instituto de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Veracruz, México. pp. 336-340
- Vázquez, M.D. 2014. Evaluación fenotípica y del sistema de manejo de bovinos autóctonos en dos regiones económicas de Chiapas. Tesis de Maestría. Instituto de Estudios Indígenas, Universidad Autónoma de Chiapas. San Cristóbal de Las Casas, Chiapas, p. 48-65.
- Vera, M. O. (2001). Evaluación seminal comparativa pre y postcongelación en machos bovinos. En: *Reproducción Bovina*. C. González-Stagnaro. Maracaibo-Venezuela: Fundación Girarz 15: 251-262.
- Villamizar, G.G. 2014. Manual de procedimientos para la colecta y criopreservación de semen bovino para la empresa santa clara genética estado Paraná – Brasil. Tesis licenciatura. Universidad Cooperativa de Colombia. Bucaramanga, Colombia. Pp. 53-86.
- Villaseñor, G.F., S.J.F., De la Torre, V.G., Martínez, G.H., Álvarez, R.S., Pérez, F.J.A., Palacios, S.F., Polanco y B.M., Montaña. 2017. Caracterización de la respuesta ovárica a la superovulación en bovino Criollo Coreño utilizando dosis reducidas de FSH. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 8(3):225-232.

Wikipedia. 2011. Archivo:Mexico Oaxaca Huajuapan de Leon location map.svg.
Consultado el 28 de octubre de 2021, en:
https://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:Mexico_Oaxaca_Hujuapan_de_Leon_location_map.svg.