

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



TESIS

“Efecto protector de yema de huevo en la viabilidad de semen congelado de carnero”

PRESENTADA POR:

LIZ STEPHANY APAZA RAMOS

PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE:

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

PUNO, PERÚ

2017

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

TESIS

“Efecto protector de yema de huevo en la viabilidad de semen congelado de carnero”

PRESENTADO POR EL BACHILLER:

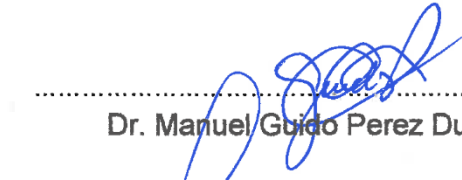
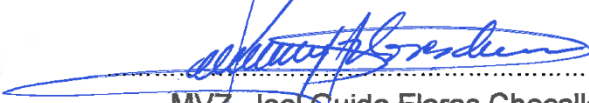
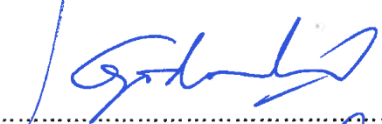
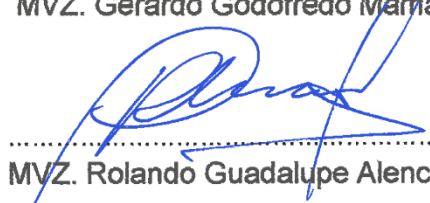
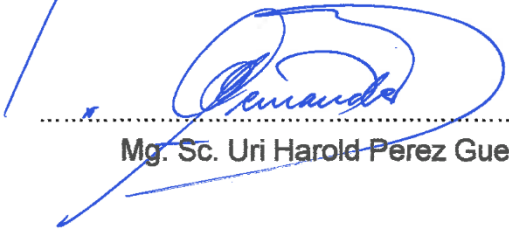
LIZ STEPHANY APAZA RAMOS

PARA REALIZAR EL INFORME DE INVESTIGACIÓN Y OPTAR EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA



APROBADA POR EL JURADO REVISOR CONFORMADO POR:

- PRESIDENTE : 
.....
Dr. Manuel Guido Perez Durand
- PRIMER MIEMBRO : 
.....
MVZ. Joel Guido Flores Checalla
- SEGUNDO MIEMBRO : 
.....
MVZ. Gerardo Godofredo Mamani Choque
- DIRECTOR DE TESIS : 
.....
MVZ. Rolando Guadalupe Alencastre Delgado
- ASESOR DE TESIS : 
.....
Mg. Sc. Uri Harold Perez Guerra

ÁREA: Reproducción animal

TEMA: Conservación de gametos

DEDICATORIA

A Dios porque ha estado conmigo a cada paso que doy, cuidándome y dándome fortaleza para continuar.

A mis padres, Mauro Apaza Arpasi y Lisoy Ramos Huamanquispe quienes a lo largo de mi vida han velado por mi bienestar y educación siendo mi apoyo en todo momento. Depositando su entera confianza en cada reto que se me presentaba sin dudar ni un solo momento en mi inteligencia y capacidad, es por ellos que soy lo que soy ahora.

A mi familia por apoyarme incondicionalmente durante el transcurso de mi vida universitaria.

A Jhonatan por todo el apoyo brindado, por aguantarme y por siempre buscar la manera de tenerme de buen ánimo; y a mis futuros bebés Anthuan y Liam. Los amo mucho.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional del Altiplano, especialmente a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y a su plana docente, por darme la oportunidad de estudiar y ser una profesional.

Mis sinceros sentimientos de gratitud al “CIP. CHUQUIBAMBILLA” y al Dr. Juan P. Zevallos Aragón (Q.E.P.D. y Q.D.D.G.) por su apoyo, paciencia incondicional y facilidades brindadas durante la ejecución de mi tesis.

A mi director de tesis, MVZ. Rolando Guadalupe Alencastre Delgado por su esfuerzo y dedicación quien, con sus conocimientos, su experiencia, su paciencia y su motivación ha logrado en mí que pueda terminar mis estudios con éxito; por su rectitud en su profesión como docente, por sus consejos, que ayudan a formarte como persona e investigador.

A los distinguidos miembros del jurado por su valioso tiempo y sus sabios consejos.

Son muchas las personas que han formado parte de mi vida profesional a las que me encantaría agradecerles su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía en todo momento. Algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y en mi corazón, sin importar en donde estén quiero darles las gracias por formar parte de mí, por todo lo que me han brindado y por todas sus bendiciones.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xiv
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. COLECCIÓN DE SEMEN	4
2.2. CARACTERÍSTICAS DEL SEMEN DE CARNERO	4
2.3. MANEJO Y EVALUACIÓN DEL SEMEN	7
2.3.1. COLOR	7
2.3.2. VOLUMEN	8
2.3.3. MOTILIDAD MASAL	9
2.3.4. CONCENTRACIÓN	11
2.3.5. MOTILIDAD INDIVIDUAL	12
2.3.6. TEST HIPOSMÓTICO	13
2.3.7. TINCIONES VITALES.....	16
2.4. CRIOPRESERVACIÓN	18
2.4.1. CRIOPROTECTORES.....	20
2.4.2. DILUCIÓN.....	21
2.4.3. FASES DE LA CONGELACIÓN DE SEMEN.....	29
2.5. CURVAS Y TEMPERATURAS DE CONGELACIÓN	34
2.6. DAÑOS CRIOGÉNICOS DE LA CONSERVACIÓN ESPERMÁTICA .	36

2.7. INSEMINACIÓN ARTIFICIAL.....	40
2.8. DIAGNÓSTICO DE GESTACIÓN.....	44
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	47
3.1. LUGAR.....	47
3.2. MATERIAL SEMINAL.....	47
3.2.1. ANIMALES PARA COLECTA DE SEMEN.....	47
3.2.2. MANEJO Y ALIMENTACIÓN.....	48
3.3. METODOLOGÍA.....	48
3.3.1. AVES PARA OBTENCIÓN DE YEMAS DE HUEVO.....	48
3.3.2. COMPOSICIÓN DEL DILUTOR DE SEMEN UTILIZADO.....	49
3.3.3. TRATAMIENTOS – YEMA DE HUEVO.....	50
3.3.4. COLECCIÓN DEL SEMEN.....	51
3.3.5. EVALUACIÓN DEL SEMEN.....	51
3.3.5.1. EVALUACIÓN MACROSCÓPICA.....	52
3.3.5.2. EVALUACIÓN MICROSCÓPICA.....	52
3.3.6. DILUCIÓN.....	57
3.3.7. PERIODOS DE LA CONGELACIÓN DEL SEMEN.....	57
3.3.7.1. ENFRIAMIENTO.....	57
3.3.7.2. EQUILIBRACIÓN.....	59
3.3.7.3. EMPAJILLADO.....	59
3.3.7.4. CONGELACIÓN.....	60
3.3.8. DESCONGELACIÓN.....	61

3.3.8.1. MOTILIDAD INDIVIDUAL PROGRESIVA	61
3.3.8.2. MOTILIDAD TOTAL.....	62
3.3.8.3. VITALIDAD Y ANORMALIDADES.....	63
3.3.8.4. INTEGRIDAD DE ACROSOMA.....	64
3.3.8.5. TEST HIPO-OSMÓTICO	65
3.3.9. INSEMINACIÓN ARTIFICIAL	65
3.3.10. DIAGNÓSTICO DE GESTACIÓN.....	66
3.3.11. DETERMINACIÓN DE LA TASA DE FERTILIDAD	67
3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	67
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	69
4.1. EFECTO DEL DILUTOR CON DIFERENTES YEMAS DE HUEVO SOBRE LA VIABILIDAD ESPERMÁTICA	69
4.2. FERTILIDAD	89
V. CONCLUSIONES	91
VI. RECOMENDACIONES.....	92
VII. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Tasas de Congelación y eventos físico durante la congelación (Adaptado de Gao & Crister, 2000).....	34
Figura 2: Principales daños producidos durante la congelación/descongelación	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Características microscópicas a la colección del semen de carnero.	69
Tabla 2: Comparación del porcentaje de TH, vitalidad y anormalidades de semen de carnero durante el proceso de equilibración utilizando cuatro yemas de huevo	73
Tabla 3: Comparación del porcentaje de MIP, MT, TH, vitalidad, anormalidades e integridad de acrosoma de semen de carnero a la descongelación utilizando cuatro yemas de huevo	77
Tabla 4: Características seminales de los carneros a la colección.....	5
Tabla 5: Volumen a la colección por carnero.....	5
Tabla 6: Motilidad masal a la colección por carnero.....	6
Tabla 7: Concentración a la colección por carnero.....	6
Tabla 8: Promedio general de volumen, motilidad masal y concentración a la colección.	7
Tabla 9: Datos generales de Motilidad masal, TH, vitalidad y anormalidades por carneros a la colección.....	8
Tabla 10: ANVA del Test Hipo-osmótico para semen a la colección.....	9
Tabla 11: Contrastación de medias de la prueba de Duncan del Test Hipo-osmótico para dilutor (tratamientos)	9
Tabla 12: ANVA de vitalidad para semen a la colección.	10
Tabla 13: Contrastación de medias de la prueba de Duncan de vitalidad para dilutor (tratamientos)	10

Tabla 14: Datos generales de TH, vitalidad y anormalidades por carneros a 5°C.	11
Tabla 15: ANVA del Test Hipo-osmótico para semen a 5°C.	12
Tabla 16: Contrastación de medias de la prueba de Duncan del Test Hipo-osmótico a 5°C para dilutor (tratamientos)	12
Tabla 17: ANVA de vitalidad para semen a 5°C.	13
Tabla 18: Contrastación de medias de la prueba de Duncan de vitalidad a 5°C para dilutor (tratamientos)	13
Tabla 19: Datos generales de MIP, MT, TH, vitalidad, anormalidades e integridad de membrana por carneros a la descongelación.	14
Tabla 20: ANVA de motilidad individual progresiva para semen a la descongelación.	15
Tabla 21: Contrastación de medias de la prueba de Duncan de motilidad individual progresiva a la descongelación para dilutor (tratamientos)	15
Tabla 22: ANVA de motilidad total para semen a la descongelación.	16
Tabla 23: Contrastación de medias de la prueba de Duncan de motilidad total a la descongelación para dilutor (tratamientos).....	16
Tabla 24: ANVA del Test Hipo-osmótico para semen a la descongelación.....	17
Tabla 25: Contrastación de medias de la prueba de Duncan Test Hipo-osmótico a la descongelación para dilutor (tratamientos).....	17
Tabla 26: ANVA de vitalidad para semen a la descongelación.	18

Tabla 27: Contrastación de medias de la prueba de Duncan de vitalidad a la descongelación para dilutor (tratamientos)	18
Tabla 28: ANVA de integridad de acrosoma para semen a la descongelación.	19
Tabla 29: Contrastación de medias de la prueba de Duncan de integridad de acrosoma a la descongelación para dilutor (tratamientos)	19

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

CIP: Centro de Investigación y Producción

IA: Inseminación Artificial

LDL: Low Density Lipoprotein (lipoproteína de baja densidad)

MIP: Motilidad Individual Progresiva

MT: Motilidad Total

NL: Nitrógeno Líquido

ROS: Reactive Oxygen Species (especies reactivas de oxígeno)

TH: Test Hipo-osmótico

YH: Yema de Huevo

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto protector de la YH sobre la viabilidad espermática de semen congelado de carnero, se realizó en el CIP Chuquibambilla de la FMVZ de la UNA – PUNO. Se utilizó dilutor a base de Tris, YH (15%) y glicerol (5%), la congelación se realizó en vapores de NL durante 10 minutos. Los resultados fueron de dos tipos. En primer lugar, en semen refrigerado el TH fue 78.38%, 79.00%, 78.10% y 69.88% para el dilutor YH de gallina criolla (T1), YH de gallina de granja (T2), YH de codorniz (T3) y YH de paloma (T4), respectivamente ($P>0.05$); la vitalidad fue 81.79%, 81.97%, 80.57% y 72.56% para T1, T2, T3 y T4, respectivamente ($P<0.05$). En semen descongelado, la MIP fue de 51.36%, 50.72%, 50.05% y 45.98% para T1, T2, T3 y T4, respectivamente ($P>0.05$); el TH fue 55.86%, 60.50%, 59.44% y 49.30% y vitalidad 57.19%, 56.04%, 56.08% y 46.66% para T1, T2, T3 y T4, respectivamente ($P<0.05$) y en integridad de acrosoma se obtuvo 61.59%, 65.27%, 64.64% y 62.53% para T1, T2, T3 y T4, respectivamente ($P>0.05$). En segundo lugar, se realizó la IA por vía cervical con semen congelado (dilutor Tris - YH de gallina criolla) y el diagnóstico de gestación se realizó por ecografía transrectal (35 días post-inseminación) obteniendo 45.45% de fertilidad. Por lo que se concluye que la YH es un factor influyente sobre las características de TH, vitalidad y MIP en semen descongelado de carneros; el semen congelado con Tris-YH de gallina criolla muestra mejores resultados, así mismo la YH de gallina de granja y codorniz, pero no siendo así para yema de huevo de paloma.

Palabras clave: Semen, carnero, congelación, yema de huevo, inseminación artificial, ecografía.

ABSTRACT

The objective of the present investigation was to evaluate the protective effect of YH on the sperm viability of frozen semen of ram, was carried out in the CIP Chuquibambilla of the FMVZ of the UNA - PUNO. Diluent based on Tris, YH (15%) and glycerol (5%) was used, freezing was performed in NL vapors for 10 minutes. The results were of two types. Firstly, in refrigerated semen the TH was 78.38%, 79.00%, 78.10% and 69.88% for the YH broiler from criollo hen (T1), YH from farmed hen (T2), YH from quail (T3) and YH from Pigeon (T4), respectively ($P > 0.05$); The vitality was 81.79%, 81.97%, 80.57% and 72.56% for T1, T2, T3 and T4, respectively ($P < 0.05$). In unfrozen semen, the IPM was 51.36%, 50.72%, 50.05% and 45.98% for T1, T2, T3 and T4, respectively ($P > 0.05$); The TH was 55.86%, 60.50%, 59.44% and 49.30% and vitality 57.19%, 56.04%, 56.08% and 46.66% for T1, T2, T3 and T4, respectively ($P < 0.05$) and in acrosome integrity was obtained 61.59 %, 65.27%, 64.64% and 62.53% for T1, T2, T3 and T4, respectively ($P > 0.05$). Second, the AI was performed by cervical route with frozen semen (diluent Tris-YH of criollo hen) and the diagnosis of gestation was performed by transrectal ultrasound (35 days post-insemination) obtaining 45.45% of fertility. Therefore, it is concluded that YH is an influential factor on the characteristics of TH, vitality and MIP in thawed semen of sheep; The semen frozen with Tris-YH of creole hen shows better results, as well as the YH of hen farm and quail, but not being so for yolk of pigeon.

Key words: Semen, ram, freezing, egg yolk, artificial insemination, ultrasound.

I. INTRODUCCIÓN

La población nacional de ovinos es de 9 523 200, siendo Puno la región con mayor población de ovinos con un 21.9% (INEI, 2013); encontrándose mayormente en mano de pequeños productores por lo que el uso de tecnología reproductiva es reducido. Sin embargo, hoy en día se implementa la IA, herramienta importante en la producción ganadera, permitiendo mejorar la calidad genética con características fenotípicas y genotípicas deseadas. Es así, que esta tecnología es ampliamente utilizada en centros de producción ganadera a nivel mundial (Delgado, 2013). No obstante, sus resultados hasta ahora tienden a ser insatisfactorios en ovinos, debido a la baja tasa de fertilidad, este hecho podría deberse a los daños ocasionados en los espermatozoides durante el proceso de criopreservación, principalmente en la membrana plasmática y acrosomal del espermatozoide, reduciendo así el número de células viables acortando su tiempo de vida en el tracto reproductivo de la hembra; por lo tanto tendría una menor oportunidad de poder fecundar el ovocito (Sandoval, 2005).

Estos daños producidos en los espermatozoides durante el proceso de criopreservación podrían ser prevenidos parcialmente, usando dilutores adecuados con agentes crioprotectores apropiados, que puedan mejorar la capacidad de preservación y fecundación del semen congelado de carnero siendo uno de los principales temas de investigación, más aun en nuestra zona, en la que no está bien definido en la especie ovina, por lo cual se vienen desarrollando ensayos con diferentes dilutores. La adición de yema de huevo al dilutor tiene un efecto benéfico sobre el porcentaje de motilidad, particularmente después de un rápido enfriamiento del semen. Las lipoproteínas de baja

intensidad actúan como crioprotectores (Watson, 1981), ya que protegen contra el choque de frío y mantienen la viabilidad (factor de conservación) (Fiser y Fairfull, 1986). Existe una investigación sobre el efecto protector de diferentes yemas de huevo (gallina, ganso, perdiz, pato, pavo y codorniz) en carneros Karayaka, demostrando que la yema de huevo de perdiz tiene mejor efecto crioprotector en términos de motilidad y viabilidad en comparación con las otro cinco yemas de huevo (Kulaksız et al. 2010).

El semen de ovino presenta una aceptable supervivencia espermática al proceso de congelación, lográndose una fertilidad de 25 y 45% en ovejas inseminadas (García et al., 1992). Estas tasas de fertilidad podrían ser mejoradas si se pone especial énfasis en la composición de los dilutores y su efecto sobre la integridad de la membrana citoplasmática del espermatozoide. En condiciones fisiológicas normales, la fecundación no ocurre si la membrana plasmática del espermatozoide está bioquímicamente inactiva, aun cuando permanezca estructuralmente intacta (Tamuli y Watson, 1992).

En la Región Puno, es poco difundida la inseminación en ovinos, esto a falta de políticas de mejoramiento genético en bienes semovientes ovinos; agregado a esto el factor limitante del material de inseminación (semen): precio y calidad (método de inseminación, operador y dilutor), (Expediente Técnico Proyecto Regional Ovinos. UE PRADERA I, 2014). El uso de semen congelado en ovino está produciendo un gran impacto en el mejoramiento genético mundial, al permitir acelerar considerablemente el flujo de material genético superior hacia sectores poblacionales de inferiores características productivas, facilita el

transporte de semen a nivel internacional y permite mantener bancos de semen aun cuando los animales estén muertos (Cueto et al., 2004).

Estos hechos justifican entonces el desarrollo de un trabajo de investigación comparando un dilutor con diferentes fuentes de yema de huevo para la criopreservación de semen ovino, ya que así se preserva el germoplasma de machos valiosos, y se extiende su utilización mediante la IA a otras regiones del país diferentes a su lugar de origen, se logra mejoramiento de las características productivas de tipo u otros para cumplir la demanda del mercado y de esta manera se mejoran los ingresos de los productores.

Con los antecedentes descritos anteriormente la finalidad de esta investigación fue:

Determinar los porcentajes de motilidad, vitalidad y TH durante la colección, fase de equilibrio y a la descongelación del semen de carneros.

Comparar el efecto protector de yemas de huevo de 03 especies de aves sobre la fertilidad espermática de semen congelado en carneros.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. COLECCIÓN DE SEMEN

La colección de semen de carneros se realiza por dos métodos: electroeyaculación y vagina artificial. En la colección por el método de vagina artificial los reproductores deben ser entrenados para eyacular, comenzando unas 2 a 3 semanas antes del inicio de un programa de IA (Evans y Maxwell, 1990). La vagina artificial es una imitación de la vagina de la oveja, con el cual se pretende simular la temperatura y presión, a su vez se recomienda lubricar la vagina artificial para obtener los mejores resultados en cuanto a volumen y concentración de espermatozoides. El procedimiento ideal debe ser inocuo, sin contaminación, estar protegido contra el shock térmico y de la luz solar (Clarence, 1993).

Inmediatamente después del salto, el tubo de colección se protege de los cambios bruscos de temperatura y se coloca en un baño maría a 36°C. La frecuencia para obtener semen depende de su libido, condición corporal y temperamento. Un régimen de 2 – 3 saltos por día por un periodo de 4 – 5 días, seguido de un descanso de 2 – 3 días, mantiene la calidad de semen (Evans y Maxwell, 1990; Hafez y Hafez, 2000; Cueto et al., 2004).

2.2. CARACTERÍSTICAS DEL SEMEN DE CARNERO

El semen está conformado por una fracción líquida o plasma seminal y una fracción celular que la conforman los espermatozoides (Garner y Háfiez, 2000). A partir de diversos reportes (Cuadro 1), se obtiene que en promedio el carnero tiende a eyacular una cantidad de semen que oscila entre 0.75

a 2 mL., conteniendo una alta concentración de espermatozoides, los cuales son altamente variables.

Cuadro 1: Características del semen de ovino

Autor y año	Volumen (mL)	Concentración (millones/mL)	Motiles (%)	Vivos con acrosoma (%)	Integridad de membrana (%)
Garner y Hafez, 2000	0.8 – 1.2	2000 – 3000	60 – 80		
Paulenz y col., 2002	0.75 – 2.0	>3500	>70		
Gil y col., 2003	0.75 – 2.0	>2500	>70		
Santianiy col., 2004			80 – 95	83 – 95	70 – 90

FUENTE: Ruiz, 2005

✓ **Plasma seminal**

El plasma seminal es un fluido complejo, formado principalmente por compuestos inorgánicos y orgánicos, entre los que se encuentran aminoácidos, ácidos grasos, iones inorgánicos, ácido cítrico, carbohidratos, sales orgánicas, prostaglandinas y proteínas de bajo y alto peso molecular, en el cual se encuentran inmersos los espermatozoides tras la eyaculación; y también está constituido por una mezcla de secreciones procedentes de los testículos, del epidídimo y de las glándulas sexuales accesorias, que constituyen más del 90% del eyaculado (próstata, vesículas seminales y glándulas bulbouretrales).

Durante su tránsito por el epidídimo, se producirá la remodelación proteica y fosfolipídica de la membrana plasmática espermática con la integración de nuevas proteínas secretadas por el epidídimo, principalmente en la región de la cabeza y el cuerpo (Gatti y col., 2004).

Tras la eyaculación actuarán las distintas secreciones procedentes de la vesícula seminal, próstata y glándulas bulbouretrales. Entre los compuestos secretados por estas glándulas sexuales se encuentran metabolitos energéticos, como fructosa, inositol, ácido cítrico y ácido ascórbico (Garner y Hafez, 1993); aminoácidos tales como ácido glutámico, carnitina, taurina e hipotaurina; también enzimas protectoras contra sustancias oxígeno reactivas (sustancias ROS), y otras que intervendrán en la digestión de los espermatozoides muertos y dañados, así como en la penetración del ovocito (Strzezek, 2002). Sin embargo, y a pesar de la gran cantidad de componentes que posee el plasma seminal, son las proteínas las que contribuyen, de forma más relevante, a la regulación de la mayor parte de las funciones espermáticas.

De hecho, las funciones de las sustancias contenidas en el plasma son complejas y parcialmente conocidas, siendo algunas de ellas, la de medio de suspensión, regulación del transporte de los espermatozoides y eliminación de éstos en el órgano reproductor de la hembra (Matousek, 1985; Troedsson y col., 2005), prevención de la capacitación prematura y estabilización de la membrana plasmática (Villemure y col., 2003), además de mantener el pH y la osmolaridad adecuada en cada especie.

2.3. MANEJO Y EVALUACIÓN DEL SEMEN

El semen colectado en todo momento debe ser protegido de los cambios bruscos de temperatura, contacto con el agua y metales, radiación solar directa e impurezas. Por lo tanto, el material que entre en contacto con el eyaculado deberá ser de vidrio o plástico, estará esterilizado y seco, y a la misma temperatura del semen (Evans y Maxwell, 1990; Cueto et al., 2004).

Los eyaculados de los carneros varían en cuanto a cantidad y calidad. El número de espermatozoides por eyaculado depende del volumen y concentración. Las características de calidad incluyen motilidad, vitalidad en integridad de membrana, las cuales serán revisadas por separado en los siguientes párrafos:

2.3.1. COLOR

El color del semen es el primer factor que se valora y se debe hacer en el mismo tubo de recogida inmediatamente después de la colección (Evans y Maxwell, 1990). El color normal del semen de ovino es color lechoso o blanquecino, pudiendo variar de tonalidad de acuerdo a la concentración espermática, cuando la misma baja considerablemente, el semen aparece como un líquido ligeramente lechoso (Del Campo, 1980). Si el eyaculado presenta sangre tendría una apariencia rosada. Coloración gris o café indica contaminación o una posible infección del tracto reproductivo. Si hay presencia de orina, tiende a tener un olor fuerte y el eyaculado parece de color

amarillo y diluido. Si hay una de estas situaciones el eyaculado debe ser descartado (Cueto et al., 2004).

A medida que los saltos sean frecuentes en una misma jornada, el líquido espermático se hace cada vez más claro y acuoso, esto debido a la baja concentración espermática (Derivaux, 1982).

2.3.2. VOLUMEN

En general la cantidad de esperma varía según la especie y dentro de ella; según el estado fisiológico del macho, el individuo, edad, tamaño, número de saltos o recogidas, método de colección, alimentación. Aunque el eyaculado de volumen normal sea un índice favorable, el volumen total del esperma recogido no es más que un factor secundario de apreciación, de preferencia deberá medirse en el propio vaso colector graduado, la producción volumétrica normal del carnero fluctúa alrededor de 0.5 a 2 mL (Derivaux, 1982). Si las colecciones son frecuentes (más de 3 por día) o por un largo periodo, el volumen del eyaculado disminuye (Cueto et al., 2004).

Investigaciones realizadas por Perez et al. (2011a) reportaron 1.18 mL colectados de carneros Merino y Criollo mejorado obtenidos con vagina artificial, similares trabajos como el de Guerrero et al. (2009) obtuvieron 1.1 mL en ovinos Blackbelly, Cabrera y Pantoja (2008) reportaron 1.7 mL en carneros Assaf, Canela y Blackbelly.

Campana (1982) obtuvo 0.95 mL mediante la técnica de electroeyaculación en carneros Corriedale.

2.3.3. MOTILIDAD MASAL

La prueba de motilidad proporciona los datos más importantes acerca de su calidad. Sin embargo, ella está sujeta a dos tipos de factores: La subjetividad de la prueba y el manejo de las células vivas que son extremadamente sensibles a influencias extremas que puedan destruirlas o perjudicar y alterar su motilidad (Zemjanis, 1990).

Un eyaculado normal tiene un movimiento de ondas al examen macroscópico. La intensidad de movimiento de la onda varía entre eyaculados y carneros. El movimiento de la onda se califica de acuerdo al vigor de movimiento (Cuadro 02). El semen con calificaciones de 0 a 2 no son usados para inseminación (Mylne et al., 1997). Para proceder al congelamiento de un eyaculado, se recomienda que su motilidad masal sea de 3 o mayor. Por otro lado, es importante considerar que si los reproductores estuvieron fuera de servicio por un tiempo prolongado, la calidad espermática de los primeros eyaculados puede ser baja, por tanto sería conveniente desecharlo (Cueto et al., 2004).

La muestra se prepara colocando una gota de semen en una lámina porta objeto limpio a una temperatura de 37°C, el semen puro del carnero exhibe movimientos en ondas cuando se examina en el microscopio a un aumento de 50x a 100x. Al evaluar se hace un estimado subjetivo de la motilidad basándose en el vigor de las ondas y su actividad se cuantifica en grados en una escala que va de 0 a 5 (Evans y Maxwell, 1990).

Cuadro 2: Sistema de valoración subjetiva de la onda de movimiento del semen de ovino.

Grado	Clave	Descripción
5	Muy bueno	Densa, movimiento en ondas muy rápidas y con jaspes gruesos oscuros. El 90% o más de los espermatozoides son activos.
4	Bueno	Movimiento en onda vigoroso con jaspe delgado y los remolinos no muy rápidos como para grado 5, alrededor de 70-85% de espermatozoides son activos.
3	Regular	Movimientos de ondas lento, se puede apreciar presencia de movimientos individuales de 45-65% de células espermáticas activas.
2	Pobre	Son movimientos en ondas, se puede apreciar movimientos individuales de 20-40% de los espermatozoides vivos y su motilidad es pobre.
1	Muy pobre	Muy pocos espermatozoides (alrededor del 10%) muestran algún signo de vida, se aprecia movimiento estacionario.
0	Muertos	Ningún espermatozoide presenta movimiento.

FUENTE: Evans y Maxwell (1990).

Trabajos realizados por Perez et al. (2011a) obtuvieron una motilidad masal de 4.5 como promedio general de 5 carneros adultos (2 Merino y 3 criollos mejorados), similares datos reportan Guerrero et al. (2009) con 4.4 de motilidad masal en ovinos Blackbelly, así también Cabrera y Pantoja (2008) reportan 4.3 de motilidad masal como promedio general de 5 carneros (1 Blackbelly, 2 Canela y 2 Assaf).

2.3.4. CONCENTRACIÓN

La concentración es el número de espermatozoides por unidad de volumen (normalmente expresado en mL); puede ser evaluado por el examen de espectofotómetro, hemocitómetro, densímetro, colorímetro o con un contador electrónico de partículas. La determinación confiable del número de espermatozoides por mL de semen es necesaria para la exactitud de dilución. Un eyaculado en promedio contiene 3.5 a 6 billones ($3.5 - 6 \times 10^9$) espermatozoides por mL. Aparte de la evaluación visual, las otras técnicas requieren de tiempo o equipamiento que puede no estar disponible o el uso de los cuales es impráctico bajo condiciones de campo. La consistencia del semen está relacionada con la proporción de espermatozoides en el plasma seminal. Las muestras de semen de consistencia cremosa contienen alta proporción de espermatozoides que otras muestras más diluidas, las consistencias pueden ser calificadas como se muestra en el Cuadro 03 (Evans y Maxwell, 1990; Mylne et al., 1997).

Cuadro 3: Concentración del semen de carnero valorado por su consistencia.

Valor	Consistencia	Nº de espermatozoide ($\times 10^9$) por mL	
		Media	Valores extremos
5	Creмоса espesa	5.0	4.5 - 6.0
4	Creмоса	4.0	3.5 - 4.5
3	Creмоса tenue	3.0	2.5 - 3.5
2	Lechosa	2.0	1.0 - 2.5
1	Nebulosa	0.7	0.3 - 1.0
0	Clara (acuosa)	Insignificante	

FUENTE: Evans y Maxwell (1990).

Trabajos realizados por Perez et al. (2011a) reportan 3.89×10^9 espermatozoides/mL en de carneros Merino y Criollo mejorado, Cabrera y Pantoja (2008) reportaron 2.73×10^9 de concentración en carneros Blackbelly, Canela y Assaf, Guerrero et al. (2009) obtuvieron 3.5×10^9 /mL en carneros Blackbelly y finalmente Hernández et al. (2012) reportó 1.77×10^9 de concentración espermática obtenidos de carneros Suffolk de 2 años de edad mediante vagina artificial.

2.3.5. MOTILIDAD INDIVIDUAL

La capacidad de desplazamiento que poseen los espermatozoides de los mamíferos, hace posible que lleguen a recorrer un camino tan grande como lo es desde el lugar de su deposición en el tracto genital de la hembra, ya sea por monta natural o IA. La adquisición de la capacidad de movilidad progresiva, coincide con la adquisición de la capacidad fecundante (Illera, 1994). La motilidad espermática a pesar de ser indispensable para la fecundación, no pronostica de una forma precisa la capacidad fecundante del espermatozoide. Este hecho ha

sido atribuido a la naturaleza subjetiva de la valoración visual de dicho parámetro (López, 1992).

Debido a la alta concentración espermática es necesario diluir el semen colectado con solución salina isotónica fresca y tibia para observar los movimientos individuales de los espermatozoides, siendo una buena muestra de semen aquella que tenga más del 80% de espermatozoides motiles (motilidad individual). La motilidad puede calificarse como muy buena cuando la motilidad individual es mayor al 80%, buena cuando la motilidad individual se encuentra en un rango de 60 a 80%, regular cuando el rango es de 40 a 60%, pobre cuando está entre 20 a 40% y muy pobre cuando la motilidad individual es menor al 20%, así mismo se debe considerar al momento de observar la motilidad individual movimientos anormales, circulares o retogresivos (Clarence, 1993).

2.3.6. TEST HIPOSMÓTICO

El TH es una prueba de rutina utilizada para evaluar la integridad de la membrana plasmática y es de gran importancia en tecnologías de reproducción asistida (WHO, 2010). El TH es aplicado rutinariamente en distintas especies a las condiciones que inicialmente fue estandarizado y aplicado en humanos (Jeyendran et al. 1984).

La membrana celular de los espermatozoides de carnero tiene una particular composición que hace dificultosa la criopreservación (Aisen et al., 2002). Los espermatozoides de mamíferos bajo condiciones

hiposmóticas se “hinchán” debido al flujo de agua extracelular que origina la expansión de las membranas, por lo tanto, sometiendo a los espermatozoides a estos medios se puede evaluar la integridad funcional de la membrana plasmática, ya que aquellos espermatozoides que aparecen con el flagelo hinchado y plegado helicoidalmente sobre la porción intermedia son los que mantienen su membrana plasmática funcional y permite el paso de agua al interior, para establecer el equilibrio osmótico entre los espacios intra y extracelular. La respuesta a esta prueba esta correlacionada con la capacidad del espermatozoide de penetrar al ovocito, por lo tanto, es indicativo del potencial fertilizante (Jeyendran et al., 1992).

El test de endosmosis se ha aplicado para el control de la calidad seminal en varias especies animales, entre ellas la ovina, porcina y bovina. Las presiones osmóticas de los medios empleados para realizar esta prueba en ovinos oscilan entre 75 y 150 mOsm/Kg, la solución contiene 9 gramos de fructosa, 4.9 gramos de citrato sódico y c.s.p 1000 uL; habiéndose observado que por debajo de dichas presiones los lazos formado en los flagelos se pierden al reventar las membranas plasmáticas (López, 1992; Tribulo, 2009).

Trabajos de investigación como el de Perez (2010) quien realizó congelación de semen de carnero a una temperatura determinada de congelación (-120°C) y reporto para TH porcentajes de 68.68% a la colección, 60.28% en la fase de equilibrio y a la descongelación 52.2% controlado y 39.95% sin control de temperatura de congelación.

Cabrera y Pantoja (2008) reportan 81.2% a la colección, 77.9% refrigerado y 39.9% a la descongelación utilizando como dilutor Tris-glucosa. Cabrera et al. (2010) congeló semen de carneros bajo la forma de pellets utilizando dilutor Tris-yema de huevo de codorniz y reportaron 83.27% de TH a la colección y a la descongelación obtuvo 43.56% para raza Assaf y 40.19% para Blackbelly. Vargas (2015) realizó una investigación sobre el efecto de tres dilutores y tres razas sobre la integridad de membrana y acrosoma en semen refrigerado a 5°C y congelado-descongelado de carneros y obtuvo 67.33% de espermatozoides con membrana intacta a los 5°C y 34.47% a la descongelación. Cabrera et al. (2011) reportan los siguientes porcentajes de TH, 78.03% para semen refrigerado y 49.8% para semen descongelado en una investigación sobre el efecto del dilutor Tris y Citrato con yema de huevo de codorniz sobre la viabilidad espermática en semen ovino congelado en pajillas. Huamaní (2011) probó el efecto de la temperatura de empajillado y raza en la motilidad individual e integridad de membrana en semen congelado de carnero y obtuvo 37.61% empajillado a 5°C y 39.75% empajillado a 20°C utilizando como dilutor Tris-yema de huevo de gallina en carneros Criollo, Corriedale y Merino. Santiani et al. (2007) utilizó un antioxidante análogo al superóxido dismutasa (Tempol) durante la criopreservación de semen y reporta 33.65% y 40.53% de espermatozoides con membrana celular intacta con antioxidante y sin antioxidante respectivamente y Sandoval et al. (2007) reporta 62.7%

de espermatozoides con respuesta positiva al TH utilizando Tris-yema de huevo.

Por otro lado, Kulaksiz et al. (2010) realizó una investigación comparando el efecto protector de seis diferentes yemas de huevo durante la criopreservación de semen de carnero Karayaka y obtuvo 57.0%, 49.2%, 45.0%, 42.4%, 44.0% y 30.8% de integridad de membrana a la descongelación utilizando yema de huevo de Perdiz, Pato, Ganso, Pavo, Gallina y Codorniz respectivamente.

2.3.7. TINCIONES VITALES

El contenido de espermatozoides vivos de una muestra de semen puede determinarse fácilmente mediante el empleo de técnicas de tinción en las cuales los espermatozoides muertos aparecen teñidos al presentar mayor permeabilidad al paso del colorante. Esta técnica de evaluación se basa en el fenómeno de que las cabezas de los espermatozoides muertos tienen la propiedad de dejar pasar colorantes, gracias a la permeabilidad de la membrana cefálica, mientras los espermatozoides vivos y activos no dejan pasar los colorantes por lo que permanecen sin colorearse (Derivaux, 1982). Los colorantes más usados para este caso son: Nigrosina 5% y Eosina 1% estos colorantes al ser usados se deben mantener a la misma temperatura respecto del semen, así mismo también existen una gran cantidad de tinciones como el karras, rojo de bengala, azul de victoria, well, willians giemsa, tinta china y otros, la técnica consta en contar 100 espermatozoides en varios campos, se cuentan los

vivos y muertos y se anotan los espermatozoides alterados especificando el tipo de alteración, un buen semen posee de 70% a 80% de espermatozoides vivos normales.

El examen morfológico de espermatozoides es una prueba detallada de calidad de semen. Todos los eyaculados contienen algún espermatozoide anormal, las muestras con una alta proporción de espermatozoides anormales pueden dar bajos resultados en fertilidad, estos pueden ser detectados en frotices preparados y coloreados en una lámina porta objetos para ser observada en microscopio óptico a 400x. Los espermatozoides coloreados de rojo se contabilizan como muertos y los que están totalmente transparentes como vivos. Una muestra de semen de un reproductor no debe mostrar un porcentaje mayor de 15% a 20% de espermatozoides coloreados o muertos (Evans y Maxwell, 1987).

Investigaciones como el trabajo de Perez (2010) quien realizó congelación de semen de carnero a una temperatura determinada (-120°C) con dilutor Tris, fructosa, ácido cítrico, glicerol y huevo de gallina criolla y obtuvo los siguientes porcentajes de vitalidad: 90.32% y 81.55% a la colección y en la fase de equilibrio respectivamente y a la descongelación 54.65% con control y 45.0% sin control. Cabrera y Pantoja (2008) reportan para vitalidad porcentajes de 82.5% en semen fresco y 40.0% a la descongelación utilizando dilutor Tris-glucosa. Cabrera et al. (2010) obtuvieron 83.4% y 79.5% de espermatozoides vivos en carneros Assaf y Blackbelly

respectivamente, del mismo modo Guerrero et al. (2009) realizo trabajos con ovinos Blackbelly utilizando dilutores hipertónicos y obtuvo 90.2% a la colección y a la descongelación 34.4% con Tris-Trealosa y 24.3% con Tris-Lactosa, ambos con 10% de yema de huevo.

- **Anormalidades espermáticas:** Los resultados de un examen de morfología espermática se informan como porcentaje de formas normales. Siempre es el caso que un determinado porcentaje de espermatozoides en un eyaculado sea morfológicamente anormal, pero cuando esa fracción es excesiva, la fertilidad puede disminuir. También es útil sub clasificar la población anormal en los tipos de anomalías observados. Dos tipos de clasificación se usan normalmente: anomalías primarias y anomalías secundarias. Los defectos primarios son más severos y se piensa que se originan mientras los espermatozoides todavía están dentro del epitelio seminífero de los testículos. Los defectos secundarios son menos serios y se originan durante el pasaje por el epidídimo o maltrato después de la eyaculación (Garde et al., 1992).

2.4. CRIOPRESERVACIÓN

La congelación de los espermatozoides viene a ser una detención del proceso de la actividad del espermatozoide. El espermatozoide es almacenado a -79°C (hielo seco - HS) o a -196°C (NL), retiene su potencial de fertilización indefinidamente. La congelación es un proceso de stress para los espermatozoides, debido a los cambios de temperatura que sufre

el espermatozoide durante el proceso de enfriamiento, asimismo, se tiene como factor de stress también a la descongelación (Watson, 1995). La disminución de la temperatura produce un daño letal en algunos espermatozoides conocido como shock térmico, provocando alteraciones morfológicas en la membrana plasmática, acrosomal y mitocondrial, (revisado por Aboagla y Terada, 2004), incluso puede llegar a provocar una reacción acrosómica prematura, acortando la vida del espermatozoide y reduciendo su fertilidad (Watson, 1995). La congelación también causa daño celular debido al estrés osmótico y tóxico por las concentraciones molares de los agentes crioprotectores, y daño mecánico debido a la formación y disolución de cristales de hielo (revisado por Aboagla y Terada, 2004).

El semen se congela y conserva a muy bajas temperaturas, esto en NL (-196° C), las reacciones metabólicas de los espermatozoides quedan detenidas. Esto hace que el semen se pueda conservar durante mucho tiempo con lo que se pueden conservar genes para futuro uso y se asegure la disponibilidad de un semental en particular. También de esta forma se facilita el transporte de semen, tanto nacional como internacionalmente, y el semen se puede recoger y conservar en épocas distintas a la estación reproductiva. En consecuencia, la utilización de los sementales se amplía considerablemente al congelar y conservar el semen (Evans y Maxwell 1990).

2.4.1. CRIOPROTECTORES

Su principio básico es evitar daños por la formación de cristales de “hielo intracelular” y a su vez reducir el “efecto solución”. El primero se produce al congelar el agua libre intracelular y el segundo se debe a la exposición de las células no congeladas a altas concentraciones de solutos durante la criopreservación (Aisen, 2004).

A. Agentes Crioprotectores (CPA) no Permeables.

Se han utilizado proteínas que se encuentran en la yema de huevo y leche como también los azúcares no permeables (lactosa, sacarosa, trehalosa, rafinosa), que originan un medio hipertónico y la consecuente deshidratación celular. Los disacáridos son más efectivos que los monosacáridos para disminuir la temperatura de cristalización durante la congelación (Aisen, 2004; Yeste, 2016). La trealosa tiene un efecto protector estabilizante de la membrana celular al interactuar con los fosfolípidos, lo cual se refleja en la integridad acrosomal (Guerrero *et al.*, 2009).

B. Agentes Crioprotectores (CPA) Permeables

Se trata de moléculas que atraviesan velozmente la membrana plasmática, acomplejan agua intracelular y disminuyen el tamaño y número de cristales de hielo. Se llevan a cabo ensayos con propanodiol, etilenglicol, sorbitol, manitol, inositol, adonitol, DMSO, prolina, glicina, glicerol y otros. El Glicerol, su protección se debe a las propiedades coligativas (descenso crioscópico y

presión osmótica principalmente) y a la unión con las moléculas de agua. La molécula de Glicerol atraviesa rápidamente la membrana plasmática del espermatozoide, impidiendo el crecimiento de los cristales de hielo, debido a una acción tóxica del Glicerol, se ha reducido su concentración para la congelación de semen de ovino a 4-8%; su proporción depende de la tasa de enfriamiento y congelación y de la composición y osmolaridad del diluyente. El uso de aminoácidos (prolina y glicina) en los diluyentes tiene un efecto osmótico de baja toxicidad. Su utilización se basa en el efecto protector intracelular no tóxico, que reduce el efecto desnaturador de la condición hiperosmolar inducida por la deshidratación celular durante la congelación lenta (Aisen, 2004).

2.4.2. DILUCIÓN

Los espermatozoides viven fuera del organismo solamente durante un tiempo limitado. Precisamente por esto, el semen colectado que se va a utilizar para inseminar deberá proceder a su dilución lo más pronto posible. Las soluciones buffer que conforman la mayor parte del diluyente seminal poseen un doble rol: uno es neutralizando el ácido láctico producido por la actividad metabólica de los espermatozoides (evitando los cambios de pH). El otro es proveyendo una correcta concentración del buffer conformando un medio isotónico para el semen. Las sales utilizadas deben ser no tóxicas. Las siguientes son cuatro soluciones que cumplen con estos requerimientos: solución

buffer fosfatado, buffer citrato, buffer tris y la leche entera o descremada (Tribulo, 2009). Los diluyentes son sustancias que se agregan al eyaculado para conservar su metabolismo, viabilidad y fertilidad. Con la dilución se persigue:

- Añadir al semen sustancias nutritivas, protectoras y amortiguadoras.
- Aumentar el volumen para poder inseminar a un gran número de hembras.
- Reducir el metabolismo de los espermatozoides al mínimo, al descender la temperatura del semen diluido.
- Restringir el crecimiento de microorganismos mediante la adición de antibióticos, sulfas, antimicóticos y otras sustancias (Días y Valencia, 2008).

Los diluyentes para el semen tenemos: yema-fosfato, yema-citrato, yema-tris y leche descremada. Sin embargo, los diluyentes sintéticos más comúnmente utilizados para diluir semen de carnero, contienen como amortiguador el tris o el citrato, glucosa o fructosa como fuente de energía y yema de huevo como agentes protectores para las membranas celulares durante el enfriamiento a 5°C, y el congelamiento (generalmente glicerol) (Evans y Maxwell, 1990; Cueto et al., 2004). Siendo la composición del dilutor el siguiente:

Cuadro 4: Composición de dilutor para congelamiento de semen

Tris (hidroximetil) aminometano (g)	3.634
Ácido cítrico (g)	1.990
Glucosa (g)	0.500
Glicerol (mL)	5.00
Yema de huevo (mL)	15.00
Penicilina (UI)	100 000
Estreptomicina (mg)	100
Agua destilada enrasar a 100 mL	

FUENTE: Evans y Maxwell, 1990.

Existen preparados comerciales utilizados mundialmente son: Bioxcell, diluyente para semen bovino libre de sustancias de origen animal especialmente adaptado para producir pajillas con bajas concentraciones de espermatozoides; Biociphos Plus, diluyente que contiene sustancias de origen animal, es muy fácil de preparar y su claridad facilita el análisis de semen; Triladyl, a este diluyente comercial se le debe adicionar yema de huevo ya agua bidestilada; finalmente el Andro Med; diluyente que es libre de contenidos de origen animal, es un diluyente para semen fresco equino que contiene sustitutos de yema de huevo y antibiótico (Tribulo, 2009).

Investigaciones realizadas por Cabrera y Pantoja (2008) quienes probaron 2 dilutores, reportando 86% de motilidad individual para el dilutor tris y 88.5% de motilidad individual con ovine freezing. A la descongelación obtuvieron para motilidad individual con tris de 60.8% y para ovine freezing 62.9%, para la endósmosis fue para tris 39.9% y para ovine freezing 43.2%.

➤ **Funcionalidad de los componentes del dilutor**

A. Tris y Ácido Cítrico

Tris (Hidroximetil aminometano) fue uno de los principales componentes en diluyentes para la congelación de semen de toros ya que se cree que tiene una buena capacidad de buffer, diurético y actividad osmótica y baja toxicidad en altas concentraciones (Nahas, 1961), los nuevos diluyentes se basan en buffers de iones mixtos que fijan metales pesados y controlan el pH, estos componentes sirven para mantener la bomba de Na^+ - K^+ , con el objeto de evitar el agotamiento del K^+ intracelular y la pérdida de motilidad también actúan neutralizando el ácido láctico producido por la actividad metabólica de los espermatozoides (evitando los cambios de pH) y proveyendo una correcta concentración del buffer conformando un medio isotónico para el semen. Las siguientes son cuatro soluciones que cumplen con estos requerimientos: solución buffer fosfatado, buffer citrato, buffer tris y la leche entera o descremada (Tribulo, 2009). El **Ácido Cítrico** y **Citrato de Sodio**; ejercen acción directa sobre la fijación de Calcio en la membrana de los espermatozoides, que, junto con los iones de Sodio y Potasio, mantienen el equilibrio osmótico favoreciendo la motilidad de los espermatozoides (Borque y Saguez, 1992).

B. Azúcares

Por los años de 1964 que descubrieron la acción protectora de la xilosa, fructosa, glucosa, galactosa, maltosa, sacarosa y rafinosa en la congelación profunda rápida de espermatozoides en toro. Confieren al medio la necesaria presión osmótica y actúan como crioprotectores. Tanto los azúcares como la glicerina alteran las propiedades mecánicas del medio aumentando la viscosidad, de manera que evitan la cristalización eutéctica y refuerza la tendencia del medio a formar cristales, propiedad que se aprovecha de manera creciente en medios vitrificantes. La elevada proporción de glucosa propia de la mayoría de los diluyentes origina una notable disminución del pH intracelular hasta por debajo de 6.0. Esta acidosis intracelular permite que las células seminales sobrevivan a temperatura de ambiente durante algunos días (Busch y Waberski, 2007).

C. Yema de Huevo

La concentración de yema de huevo utilizada habitualmente oscila entre 15 a 30%, hasta ahora se han utilizado los siguientes componentes con una hipotética acción protectora de la congelación:

- Fosfatidilcolina (lecitina)
- Fosfolípidos
- Extractos lipídicos

- Fracciones lipoproteicas
- Lipoproteínas específicas (Busch y Waberski, 2007).

Los principales reportes de las funciones de este componente indican como protectores de shock térmico, preservación de la motilidad espermática, menor producción de enzimas acrosomales (hialuronidasa) y mantenimiento de la integridad de la membrana mitocondrial, actúa como amortiguador osmótico, permitiendo una mayor tolerancia de los espermatozoides a las soluciones hipo e hiperosmóticas, esta protección se debe a su adhesión a la membrana plasmática especialmente por las LDL que se asocian con la membrana del espermatozoide y proveen protección para estabilizar la membrana estas lipoproteínas que tras su extracción con agua, solución salina o citrato proporcionan una fracción lipoproteica catiónica que se fija con preferencia a la membrana de los espermatozoides y desarrolla su acción protectora. Sin embargo, hay evidencia contradictoria concerniente a la estabilidad de la membrana del espermatozoide asociadas a las LDL (Moustacas *et al.*, 2011). La hipótesis sugiere que los fosfolípidos presentes en las LDL protegen a los espermatozoides formando una película protectora sobre la superficie del espermatozoide (Quinn *et al.*, 1980) o para reemplazar los fosfolípidos de la membrana del espermatozoide que se perdieron o dañaron durante el proceso de criopreservación (Graham y Foote, 1987). Un reciente estudio mostro que la fosfatidilcolina de la yema de huevo o soya, sus fosfolípidos no son incorporados dentro de la membrana del

espermatozoide (Ricker *et al.*, 2006). Existen diferencias entre especies en lo referente a acción de la yema de huevo como indica en carneros quienes secretan la “**lecitinasa**” presente en la secreción de las glándulas bulbouretrales que origina la hidrólisis de la lecitina de la yema de huevo en isolecitina (ejerce acción tóxica sobre los espermatozoides) y ácidos grasos. De aquí debería sacarse la conclusión de no utilizar diluyentes con yema de huevo en la conservación de semen de carnero o bien separar el plasma seminal antes de la dilución (Busch y Waberski, 2007).

D. Glicerol

El descubrimiento casual por Ernest John Christopher Polge como eficaz crioprotector condujo a un nuevo sistema de conservación del semen que se practica hasta el presente a pesar de todas las innovaciones alcanzadas en las últimas décadas, la mejor tasa de supervivencia tras la descongelación está escasamente por encima del 50% (su funcionamiento se detallara más adelante) (Busch y Waberski, 2007).

➤ **Dilución**

Al proceder a la dilución del semen de carnero se debe determinar el número de espermatozoides y volumen requerido para la inseminación. Estos factores pueden variar según requerimientos específicos (Evans y Maxwell, 1990). Una vez conocida la calidad y cantidad seminal se

determina el número de la dosis de inseminación de acuerdo a la siguiente fórmula para determinar el N° de dosis:

$$N^{\circ} \text{ de dosis} = \frac{\text{Vol. Eyac. (cc)} \times [\text{]espermática} \times \text{Moti. (\%)} }{N^{\circ} \text{ de espermatozoides por dosis de IA}}$$

FUENTE: (Mellisho, 2007)

La norma general es que se necesitan menos espermatozoides para la inseminación intrauterina que para la cervical. Independientemente del lugar de la inseminación, el número de espermatozoides móviles afecta a la fertilidad. El límite de seguridad en cuanto al número de espermatozoides móviles por volumen de inseminado se muestra en el siguiente cuadro (Evans y Maxwell, 1990):

Cuadro 5: Número mínimo de espermatozoides móviles en las diferentes formas de inseminación de ovinos (número expresado en millones).

		TIPO DE SEMEN		
		Fresco	Líquido - conservado	Congelado
Inseminación vaginal		300	no efectivo	no efectivo
Inseminación cervical		100	150	180
Inseminación intrauterina	Laparoscopia (n° total en ambos cuernos)	20	20	20

FUENTE: Evans y Maxwell, 1990

2.4.3. FASES DE LA CONGELACIÓN DE SEMEN

a. Enfriamiento del semen

En la fase inicial de la refrigeración, previa a la congelación, la temperatura de la suspensión espermática se reduce desde valores fisiológicos hasta valores ligeramente por encima de los 0 °C. Este cambio térmico va a poner de manifiesto la extrema sensibilidad de los espermatozoides, sobre todo, a los descensos bruscos de temperatura, más conocidos como “shock por frío” (Parks, 1997) o a los debidos a la temperatura final alcanzada, denominados como “daño por enfriamiento extremo” (“chilling injury”) (Watson, 1990, 1995). Así, el espermatozoide manifiesta pérdida de la integridad de membrana y de las funciones celulares al ser enfriado rápidamente en el rango de 20 a 0 °C, aunque por lo general, el daño resulta más severo entre 12 y 2 °C (Watson, 1995). Estas alteraciones pueden minimizarse si se utilizan velocidades de enfriamiento muy lentas (< 10 °C/min) hasta cerca de los 4 °C (Parks, 1997). No obstante, este enfriamiento lento también generara lesiones, aunque mucho menos severas y extensas (Watson, 1990).

En la fase de enfriamiento la temperatura del semen diluido en diluyente A es disminuida gradualmente desde la temperatura en la que fue colectada hasta 5° C, los efectos más importantes del shock frío son:

- Disminución de la motilidad

- Liberación de enzimas
- Transporte de iones en la membrana
- Pérdida de lípidos de la membrana (Busch y Waberski, 2007).

Esta fase tiene una duración entre 0,5 a 3 horas (Aisen et al., 2000) o en un periodo no menor a 3 horas. En esta fase se produce una disminución de la motilidad espermática a causa de un aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (Santiani, 2003). El principal componente del dilutor que protege a los espermatozoides en esta etapa es la yema de huevo quien protege la membrana plasmática y acrosoma contra la baja de temperatura, se cree que los fosfolípidos, colesterol y LDL son factores que protegen el shock frío, el mecanismo exacto aún se desconoce (Kulaksiz et al., 2010). Al terminar la fase de enfriamiento debe haber un periodo de transición. En este periodo se adicionan sustancias crioprotectoras (fracción B) al semen diluido el agregado se fracciona en 3 partes iguales (1º, 2º y 3º glicerolización) a intervalos de 10 minutos, homogenizando diluyente y semen luego de cada agregado (Cueto et al., 2004).

b. Fase de equilibrio del semen

Es un periodo de equilibrio entre el glicerol y los espermatozoides. Este periodo permite una estabilización de los espermatozoides en la solución. Para lo cual el semen debe ser mantenido a una temperatura de 5º C por un periodo de 0,5 a 1,5 horas (Watson, 1995; Aisen et al., 2000). El propósito del equilibramiento es permitir la translocación del agua y reducir los efectos dañinos de nucleación del hielo intracelular

durante el proceso de congelamiento y descongelamiento (Vishwanath y Shannon, 2000). Los crioprotectores permiten mantener una mayor proporción de agua líquida a bajas temperaturas y en consecuencia una menor concentración de electrolitos dentro de los espermatozoides posibilitando la supervivencia celular durante el proceso de criopreservación (Stornelli et al., 2005).

El glicerol es un crioprotector penetrante más utilizado en la congelación de semen actúa intra y extracelularmente en la protección de estructuras celulares. Aumenta el volumen de los espacios congelados y diluye las altas concentraciones de sales. Al incorporar glicerol en el medio isotónico, este se vuelve inmediatamente hipertónico y la célula que se encuentra en él, reaccionará liberando agua a fin de equilibrar la diferencia de gradiente osmótico. Posteriormente, dado que el glicerol penetra en la célula, esta incorporará agua, de acuerdo a la concentración de glicerina en su citoplasma. Este paso biofísico es dependiente del tiempo la temperatura y se denomina equilibración (Palma, 2008). El semen diluido y equilibrado con el diluyente con glicerol está listo para ser envasado en dosis individuales. Esto debe hacerse también a temperatura de 5°C, en caso de trabajos a pequeña escala con llenado y sellado manual (empajillado), esto se puede hacer en un refrigerador de mostrador o en un congelador abierto, regulado a modo de que la altura en que se trabaja se encuentre a 5°C. Antes de llenar las dosis individuales es conveniente volver a examinar el

semen diluido bajo microscopio para asegurarse que no ha ocurrido un accidente (Cueto et al., 2004).

c. Congelación del semen

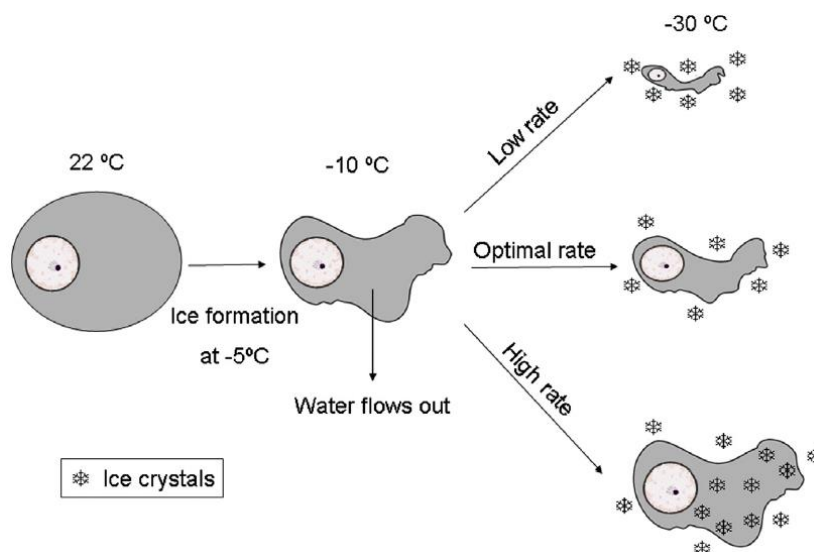
Gao & Crister (2000) indican que las células y el medio extracelular no llegan a congelarse pero si permanecen súper enfriadas a -5°C , la letalidad tanto en la congelación como en la descongelación se da a la temperatura de -15°C a -60°C ; se ha demostrado que alrededor de las temperaturas de -5°C y -15°C el hielo se forma alrededor de la célula, pero no en el contenido intracelular (permanece sin congelar solo súper enfriado) entonces el flujo de agua es hacia el exterior de la célula y posteriormente son las tasas de enfriamiento las que determinan el éxito o el fracaso de la congelación. La congelación es un proceso parecido a la deshidratación de la célula. La cristalización del agua comienza con la formación de núcleos que es un agregado de moléculas que han perdido energía debido a la baja temperatura y que adquieren una forma particular a la cual se adhieren nuevas formaciones de cristalización (Tribulo, 2009). Durante esta fase los espermatozoides son expuestos a un estrés de tipo osmótico y térmico (Watson, 2000). Cuando la temperatura alcanza los -10°C se forma núcleos de hielo de agua pura en el medio extracelular. Lo que provoca un incremento progresivo en la concentración de solutos. La fracción líquida se vuelve hipertónica y en respuesta a la diferencia de gradientes de concentración, el agua contenida intracelularmente sale de la célula, lo que permite mantener el equilibrio osmótico dentro de

la suspensión. Es en este periodo de cristalización que ocurren los principales daños en el espermatozoide ovino cuando la temperatura se encuentra entre -10°C a -25°C (Watson, 1995; Salamon y Maxwell, 1995).

Durante la congelación lenta la célula posee tiempo suficiente para equilibrar el medio a través de la liberación de agua hasta disminuir su contenido en un 10%. Como consecuencia de la deshidratación se encoge. Si la velocidad de congelación es alta la célula no es capaz de liberar agua rápidamente, entonces se produce una equilibración de energía a través de la cristalización intracelular. Cuanto más rápida es la velocidad de congelación tanto más pequeños son los cristales intracelulares formados y menor la supervivencia por los daños que estos producen en el interior de la célula (Palma, 2008). La formación del hielo intracelular y el consecuente daño celular se puede evitar usando una velocidad de congelamiento adecuada, la que debe ser lo suficientemente lenta para permitir que ocurra la deshidratación celular y al mismo tiempo, debe ser lo suficientemente rápida para prevenir la deshidratación excesiva (Holt, 2000, Yeste, M. 2016). La Figura 1 nos muestra la tasa de congelación.

Figura 1: Tasas de Congelación y eventos físico durante la congelación

(Adaptado de Gao & Crister, 2000).



FUENTE: Yeste, M. 2016

2.5. CURVAS Y TEMPERATURAS DE CONGELACIÓN

La congelación de semen en pajillas se realiza por suspensión en vapor de NL, y la velocidad de enfriamiento es regulada por la distancia de la pajilla desde el nivel del refrigerante (NL), las pajillas se colocan horizontalmente en una gradilla fría (5° C), que se expone a los vapores del NL (-80 a -100° C), 4 cm (cuando son pajillas de 0.25 mL) y 6 cm (pajillas de 0.5 mL) por encima de su superficie del NL por 10 minutos, para luego colocar al NL por 3 minutos (Mylne et al., 1997). Alternativamente, las pajillas se pueden colocar en la cámara de congelación, de una unidad biocongeladora, con temperatura de -80° C. Transcurridos 7 a 8 minutos las pajillas, con el semen congelado, se introducen en NL (Evans y Maxwell, 1990). Por lo tanto, la suspensión de la pajilla en vapor de NL entre -75°C y - 125°C no tuvo efecto, pero el vapor a -55 ° C redujo la supervivencia de

espermatozoides. Sin embargo, la motilidad post-descongelación de espermatozoides era mejor cuando la pajilla se congelaba a 16-35 ° C/ minuto que en tasas inferiores o superiores (Salamon y Maxwell, 1995).

Las células espermáticas son congeladas a tasas bastante rápidas, en el rango de 15 a 60°C/minuto a este se le llama como “tasa de congelación media”, la cual ha sido empíricamente calculado como la velocidad de congelación que permite mayor probabilidad de obtener una mejor tasa de sobrevivencia celular (Stornelli et al., 2005). Sin embargo, cuando la tasa de congelación excede los -60°C/minuto, el porcentaje de motilidad espermática que sobrevive al descongelado se ve reducida (Tribulo, 2009). Sin embargo, el control de una curva de congelación y una temperatura de congelación muestra porcentajes mayores comparado a los de una congelación tradicional (con vapores de NL) así demuestra el siguiente cuadro:

Cuadro 6: Comparación de tasas de congelación Controlada y Sin Control

	TASA Y TEMPERATURA DE CONGELACION	
	CONTROLADO	SIN CONTROL
Motilidad (%)	58.58 ± 7.79 _a	44.94 ± 5.98 _b
Test Hipo-osmótico (%)	52.2 ± 11.14 _a	39.95 ± 9.47 _b
Vitalidad (%)	54.65 ± 4.43 _a	45.00 ± 11.10 _b

Los valores en la misma fila con la letra diferente muestran diferencia ($p \leq 0.05$).

FUENTE: Perez y col., 2011

La descongelación del semen es un proceso crítico para el espermatozoide. Aparte del daño ocasionado por la congelación, puede ocurrir daño a los espermatozoides si la descongelación no es el adecuado. Tener presente,

si el semen es congelado rápidamente, así también debe ser descongelado para obtener la máxima recuperación de espermatozoides (Mellisho, 2007).

El semen de carnero congelado por pellets o pajilla debe ser descongelado en un baño de agua de 37°C en un tiempo de 15 a 20 segundos para pajillas y 45 a 60 segundos para pellets (Mellisho, 2007).

2.6. DAÑOS CRIOGÉNICOS DE LA CONSERVACIÓN ESPERMÁTICA

A. Efectos sobre la Membrana Plasmática

El semen de mamífero (en especial de ovino y chivo) es sensible al enfriamiento rápido (choque de frío), manifestándose por el número de espermatozoides muertos, formas anormales, alteración de la distribución de lípidos de membrana y aumento del calcio intracelular, con posible fusión de membranas, al tener el ovino una distribución desigual de las proteínas del citoesqueleto asociadas a la membrana por lo que sería más sensible al enfriamiento (Aisen, 2004). También se alteran todas las funciones de la membrana, confiriéndole un alto grado de fragilidad (Watson, 1995; Ruiz, 2005; Meara *et al.*, 2008). Durante el enfriamiento la solución se hace hiperosmótica que es detrimental, porque está demostrado que daña la membrana del espermatozoide (Holt, 2000; Watson, 1995).

Específicamente existe una restricción de los movimientos laterales de los fosfolípidos (membrana plasmática) ocurre cuando la temperatura es menor a 5°C sucede en la transición de la fase líquida a gel. Las proteínas integrales son agrupadas irreversiblemente por la separación de los

lípidos por lo tanto los lípidos de la membrana son reestructurados y algunas moléculas de Colesterol son liberados; como resultado de esta ruptura de interacciones entre los lípidos y las proteínas tales como los canales iónicos que cambian y/o pierden su función, desestabilizando y ocasionando una pérdida selectiva de la permeabilidad de este modo incrementa el influjo de iones como el Ca^{2+} y Bicarbonato del espacio extracelular dándose un fenómeno parecido a la criocapacitación también se observa la fusión entre la membrana plasmática y la capa externa de la membrana acrosomal. Así mismo, los elementos del citoesqueleto son sensibles a la temperatura. Se ha postulado que la despolimerización de los filamentos de actina del citoesqueleto es un prerrequisito para la aproximación de la membrana plasmática a la membrana acrosomal externa en el camino hacia la exocitosis acrosomal (Yeste, 2016).

Durante la congelación la membrana del espermatozoide sufre una amplia variedad de daños durante el proceso de congelación. La causa principal de estos cambios es debida a alteraciones térmicas, mecánicas y químicas, asociados a la acción previa de los criopreservantes; cambios volumétricos, en parte dependientes del balance Na^+/K^+ ligado al aporte de ATP intracelular, indicando que podría estar implícito un fracaso metabólico, y en parte dependiente de variaciones osmóticas puntuales (Fernández *et al.*, 2000).

B. Efectos sobre el Núcleo del Espermatozoide

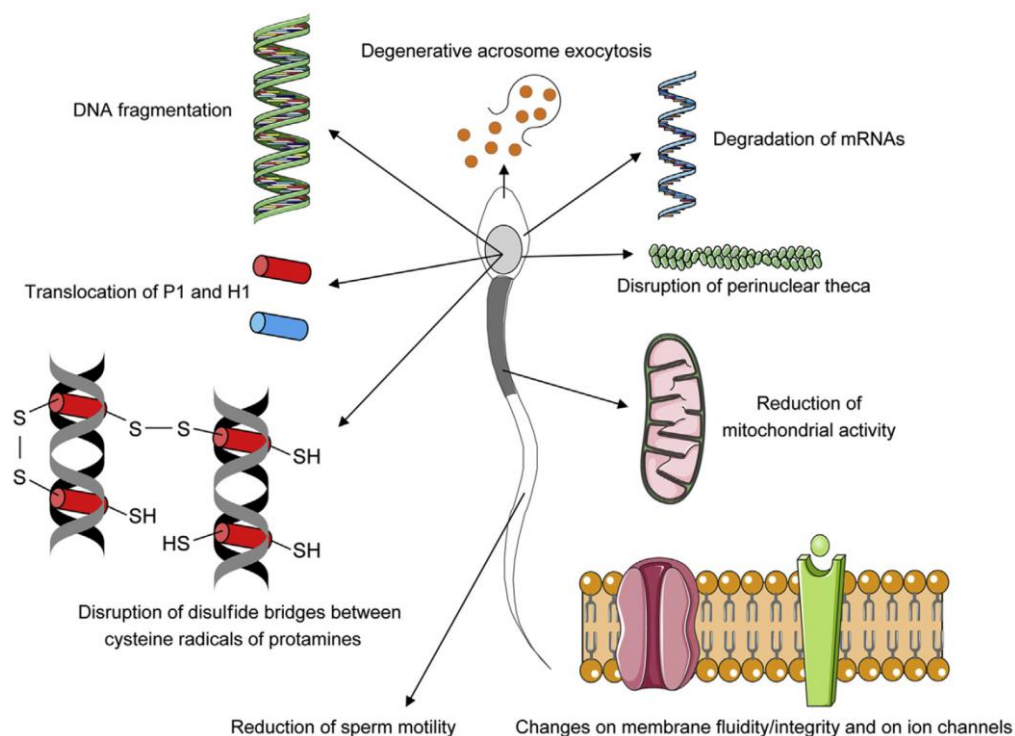
Los estudios se enfocan sobre la integridad de la cromatina (ADN, nucleoproteínas e interacción estructural de ambas) que está compuesta

principalmente de Protaminas (P1 y P2) y entre 2 al 15% de Histonas (H1). El efecto se da sobre la ubicación y distribución de P1 y H1 en todo el núcleo durante los procesos de congelación/descongelación aunque también los cambios están presentes al final de la fase de enfriamiento. Existe un problema en la interacción de los puentes de disulfuro entre los radicales de cisteína de las Protaminas (constituyen la estructura de la cromatina espermática) también se observa durante los procesos de congelación/descongelación.

Al parecer no existe un incremento significativo en la fragmentación de ADN inmediatamente a la post descongelación es daño es más aparente cuando los espermatozoides son incubados durante 2 horas a 37°C, este daño difiere según especies siendo más sensibles aquellas que poseen Protaminas P1 y P2 (ratones, humanos y potros) (Yeste, 2016).

C. Efectos sobre la Teca Perinuclear, función mitocondrial y producción de ROS

Es la región alrededor del núcleo del espermatozoide y contiene proteínas del citoesqueleto cruciales para el mantenimiento de la arquitectura de la cabeza del espermatozoide. Esta región es importante durante la fertilización y contiene proteínas como PLC y PAWP su integridad es importante para la función espermática (Yeste, 2016). La Figura 2 nos muestra los daños que se producen durante la congelación/descongelación.

Figura 2: Principales daños producidos durante la congelación/descongelación

FUENTE: Yeste, M. 2016

En efecto en búfalos y toros las especies ROS son conocidas que afectan la motilidad espermática, peroxidación lipídica, potencial de la membrana mitocondrial e integridad del ADN en semen fresco pero esta relación es menos clara en caso de semen congelado/descongelado; en la fase de enfriamiento se produce una disminución de la motilidad espermática a causa de un aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno el 50% de espermatozoides de carnero muestran la pieza intermedia rígida con la consiguiente pérdida de motilidad progresiva a 16° C de temperatura, debido a la falta de batido de la cola que cesa en temperaturas por debajo de 14° C (Santiani 2003; Yeste, 2016).

2.7. INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

La IA es considerada la técnica reproductiva de mayor relevancia en el mejoramiento genético de los animales. A pesar de ser una técnica que tiene un destacado desarrollo en la ganadería bovina, su aplicación en la ganadería ovina aún existe algunas dificultades científicas, económicas y socioculturales que están frenando su difusión. La ventaja fundamental de la IA es la posibilidad de incrementar notoriamente la cantidad de hembras que pueden ser cubiertas con un solo reproductor y además permite el mejoramiento de la calidad de los productos (lana, carne) (Sepúlveda, 2012).

En el ovino, el uso de esta técnica es de aplicación reciente, debido a que tanto la dificultad que presenta el cuello uterino de la oveja para ser traspuesto por la vaina de inseminación (vía vaginal), así como la reducción de la viabilidad espermática producida por el proceso de congelamiento y descongelamiento, impedían obtener tasas de preñez semejantes a otras especies. Los porcentajes de preñez obtenidos por medio de la inseminación cervical con semen congelado varían entre el 20 y el 25% (Gibbons y Cueto).

En ovinos al utilizar IA con semen fresco es posible que un reproductor pueda cubrir más de 2.000 hembras por mes de trabajo y si se utiliza semen congelado esta cifra puede duplicarse; la IA se puede efectuar mediante tres métodos: inseminación vaginal, intracervical e intrauterina. La vía vaginal e intracervical se realiza cuando se utiliza semen fresco y la

inseminación intrauterina cuando se utiliza semen congelado (Sepúlveda, 2012).

Con la implementación de la IA por laparoscopia, la barrera natural que representa el cérvix de los pequeños rumiantes ha sido superada al depositar el semen dentro del lumen uterino (Maxwell y Salamon, 1993). Además, con la inseminación intrauterina se ha renovado el interés por la congelación de semen, ya que permite reducir la cantidad de espermatozoides por dosis para obtener niveles óptimos de fertilidad. En la inseminación cervical, es necesaria una concentración mínima de 60 millones de espermatozoides móviles en un volumen de 0.05 a 0.20 ml, mientras que para la inseminación intrauterina por laparoscopia se utilizan 20 millones de espermatozoides móviles en un volumen de 0.05 a 0.1 ml (Evans y Maxwell, 1990).

Un factor a considerar es la nutrición de los carneros que servirán de donantes de semen, sobre todo si la extracción se realiza fuera de la estación reproductiva, ya que en esa época la producción de semen se encuentra muy deprimida (Sepúlveda y Mansilla, 1995).

Investigaciones realizadas por Perez et al. (2011b) quien realizó IA con semen congelado en ovejas criollas por vía vaginal y cervical utilizando leche descremada en polvo con 10% de yema de huevo como dilutor, y obtuvieron 44% y 40% de gestación a la primera inseminación por el método cervical y vaginal respectivamente, 68% y 64% de gestación con una segunda inseminación por el método cervical y vaginal respectivamente. Quispe (2013) reporta 54.5% de fertilidad con semen

refrigerado y 31.2% de fertilidad con semen congelado-descongelado en ovinos Corriedale utilizando Ovine Freezing Buffer como dilutor. Yturri (2014) reporta resultados obtenidos por efecto del tiempo de refrigeración de semen a las 0, 8, 16 y 24 horas, 37.03%, 30.74%, 48.35% y 37.22% de fertilidad respectivamente; mientras que por efecto de los dilutores reporta un 22.46%, 49.39% y 41.67% de fertilidad utilizando Tris-yema de huevo, leche UHT y agua de coco respectivamente, mediante una inseminación por vía transvaginal.

Por otro lado Gonzales et al. (2010) realizó una investigación sobre la influencia de la profundidad de deposición del semen sobre la fertilidad de la inseminación transcervical en cabras, los clasifico en cuatro grupos, Grupo 0 (<0.5 cm), Grupo 1 (>0.5 <1.5 cm), Grupo 2 (>1.5 <2.5 cm), Grupo 3 (intrauterina), y reporta la fertilidad para IA con semen refrigerado 49.26%, 59.26%, 67.88% y 61.85% para los grupos 0, 1, 2 y 3 respectivamente y con semen congelado 26.63%, 52.32%, 73.16% y 73.33%.

Descongelamiento y examen del semen post descongelamiento

La descongelación del semen es un proceso crítico para el espermatozoide. Aparte del daño ocasionado por la congelación, puede ocurrir daño a los espermatozoides si la descongelación no es el adecuado. Tener presente, si el semen es congelado rápidamente, así también debe ser descongelado para obtener la máxima recuperación de espermatozoides (Mellisho, 2007). El semen de carnero congelado por pellets o pajilla debe ser descongelado en un baño de agua de 37°C en un tiempo de 15 a 20 segundos para pajillas

y 45 a 60 segundos para pellets (Mellisho, 2007). Una vez descongelado, es conveniente proceder a su rápida utilización. Si el congelamiento del semen se realizó en pajuelas, éstas se agitarán durante 15 segundos bajo el agua. La pajuela es retirada del baño y secada con una toalla de papel descartable. Se le cortan ambos extremos para proceder a su vaciado, ya sea en un tubo de hemólisis o directamente en la vaina de inseminación (Gibbons y Cueto).

La evaluación de la calidad seminal al descongelamiento es de suma importancia. Normalmente se evalúan 2 ó 3 dosis por partida. Es necesario hacer varias observaciones de la misma pajuela. Inmediatamente después del descongelamiento, se coloca una gota de semen en portaobjetos templado sobre platina térmica, realizándose una observación al microscopio de la motilidad masal.

A continuación, se coloca una gota de semen entre porta y cubreobjeto templados. En esta observación se estima el porcentaje de espermatozoides vivos, así como la motilidad individual progresiva (valor subjetivo de la velocidad de desplazamiento hacia adelante de los espermatozoides vivos; 0, mínimo; 5, máximo).

Para aceptar una partida, el semen debe poseer:

- a) Motilidad masal al descongelamiento,
- b) Un porcentaje de espermatozoides vivos igual o superior al 30% y
- c) Motilidad individual progresiva igual o superior a 2.5 (Gibbons y Cueto).

2.8. DIAGNÓSTICO DE GESTACIÓN

Existen diversas técnicas para el diagnóstico de gestación que han demostrado ser las más prácticas y eficaces, éstas son la detección del retorno al estro, el método del ultrasonido y el método de la biopsia vaginal. Cabe hacer notar que existen otras, pero su uso no es frecuente, como son: palpación por vía rectal de la arteria uterina media, la detección de estrógenos en orina, la determinación de progesterona y sulfato de estrona en plasma y la técnica visual.

La detección del retorno al estro se realiza desde el día 18 post servicio hasta el día 23; éste se debe realizar dos veces al día, detectando visualmente los signos del estro, y de ser posible con la presencia de un macho. Este método es muy utilizado por ser económico (Galina y Valencia, 2008).

El método del ultrasonido requiere del uso de un ecógrafo, que está compuesto básicamente de un procesador y de un transductor que emite los ultrasonidos (Sales, 2002). Con este equipo se puede detectar la presencia de embriones y/o gestaciones múltiples con buena efectividad alrededor de los 30 días de gestación (cuando el embrión mide aproximadamente 1 cm) a partir de aquí la efectividad es muy alta.

La técnica tiene dos variantes se puede explorar a través de la pared abdominal pegado a la ubre y dirigido hacia arriba y atrás (vértebras coxales) o introduciendo el transductor por el recto, para hacer el diagnóstico por encima del tracto reproductor (útero) (Flores y Tron).

Sotomayor (2001) realizó una investigación sobre la efectividad de cinco métodos de diagnóstico de gestación en ovinos Corriedale del CIP-Chuquibambilla, los cuales fueron niveles de progesterona (34 días), laparoscopia (34 días), ecografía (34 días), ultrasonido (60 días) y palpación abdominal (60 días) recomendando el uso de la ecografía que brinda un 92.31% de seguridad de preñez y un costo de S/. 2.039.

Diagnóstico de gestación por ultrasonografía

El ultrasonido, se basa en la característica de este tipo de ondas, que son capaces de generar ecos, al chocar o interactuar con estructuras (Sales, 2002).

El diagnóstico de preñez en ovinos, puede llevarse a cabo a través de las vías transabdominal o transrectal. La exactitud del diagnóstico solo depende de la experiencia del operador, pero con el equipo adecuado la vía abdominal, con el animal de pie, resulta más rápida, dado que no es necesario sujetar cada una de las hembras al ser ecografiadas (Sales, 2005).

En el caso de la vía transabdominal, el diagnóstico de preñez se puede realizar a partir de los 30 días de edad gestacional, apoyando el transductor en la pared inguinal. Se hace necesario el uso de un elemento que elimine el aire entre la piel y el transductor, pudiéndose utilizar un gel especialmente diseñado para tal efecto o bien agua. La imagen que se deberá visualizar, es el útero y las estructuras que nos señalen una

condición de animal “seco” o “preñado”, ya sea único, mellicero o en algunos casos, triple.

Al inicio de la gestación (18-22 días) se deberá ubicar el saco o vesícula gestacional, que es el que contiene al embrión. Posteriormente y a medida que la cantidad de líquido aumenta al igual que el tamaño del embrión, de deberá tratar de ubicar éste (25-30 días). A esta fecha, es posible visualizar el corazón latiendo, señal inequívoca de vitalidad y viabilidad (Sales, 2002).

Es necesario realizar la ecografía a partir de los 26 días de gestación, momento en el cual el diagnóstico tiene una certeza muy alta (95 a 100%); con anterioridad a este período el resultado puede ser incierto. La presencia de cotiledones placentarios a partir de los 40 días de gestación agiliza el trabajo, debido a una confirmación rápida de la preñez. A partir del día 60 resulta más práctica la vía abdominal, por el tamaño fetal, Entre los 42 y 56 días de gestación es posible la detección de mellizos, tarea que requiere más tiempo de observación y experiencia (Manazza, 2007).

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. LUGAR

La investigación se desarrolló en el Centro de Investigación y Producción Chuquibambilla de la Universidad Nacional del Altiplano (3216 Has), ubicado en el Distrito de Umachiri, provincia de Melgar, departamento de Puno. Geográficamente ubicado a 14° 43' 35" latitud sur, 70° 43' 50" longitud oeste, a una altitud de 3970 m.s.n.m. La precipitación pluvial promedio 750 mm con una temperatura máxima de 21.5°C y mínima de -18.5°C entre los meses de Agosto a Diciembre (Senamhi, 2014).

La evaluación de las muestras de semen descongelado se realizó en el laboratorio de Reproducción Animal de la facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional del Altiplano – Puno localizada en el departamento de Puno a una altitud de 3820 m.s.n.m, geográficamente a latitud sur 15° 49' 34.5" y una longitud oeste 70° 00' 43.5", el periodo de estudio para la colección, congelación de semen e IA fue durante época reproductiva.

3.2. MATERIAL SEMINAL

3.2.1. ANIMALES PARA COLECTA DE SEMEN

Se colectó semen de 4 carneros maduros (boca llena), 2 carneros de las razas Dohne Merino pertenecientes al Proyecto PRADERA; 1 carnero Texel híbrido y 1 carnero de la raza Merino pertenecientes al

Centro de Investigación y Producción Chuquibambilla. El promedio de peso corporal de los animales fue de 65 kg.

3.2.2. MANEJO Y ALIMENTACIÓN.

Los carneros Merino Dohne fueron mantenidos en un sistema intensivo, proporcionándoseles una dieta a base de concentrado en una cantidad de 250 gr/día/animal, heno de alfalfa con suplementación de sales minerales y agua *ad libitum*. Permanecieron bajo cobertizo ya que se trataba de reproductores del Proyecto PRADERA.

Los carneros Texel híbrido y Merino se mantuvieron cerca de la sala de inseminación de ovinos junto a los demás reproductores del CIP Chuquibambilla, donde su alimentación fue al pastoreo en praderas naturales compuestas por *Festuca dolichophylla*, *Trifolium amabile*, *Calamagrostis spp.*, *Mühlenbergia fastigiata*, *Medicago sativa* entre las más importantes. Además se les suplementó con ensilado de avena, heno de alfalfa y agua *ad libitum*. Los carneros pernoctaban a la intemperie en un corral con los demás reproductores del Centro de Investigación.

3.3. METODOLOGÍA

3.3.1. AVES PARA OBTENCIÓN DE YEMAS DE HUEVO

Para el presente trabajo se utilizaron 4 tipos de yemas de huevo de 3 especies de aves: gallina criolla (*Gallus domesticus*), gallina de granja

(*Gallus domesticus*), codorniz (*Coturnix coturnix*) y paloma (*Columba livia*). Las yemas utilizadas fueron obtenidas de huevos frescos, colectados en su mayoría el mismo día de la preparación del dilutor.

3.3.2. COMPOSICIÓN DEL DILUTOR DE SEMEN UTILIZADO

Para la preparación del dilutor Tris – yema de huevo – glicerol se utilizó los siguientes componentes:

Cuadro 7: Composición de dilutor para congelamiento de semen

Tris (hidroximetil) aminometano (g)	3.634
Ácido cítrico (g)	1.990
Glucosa (g)	0.500
Glicerol (mL)	5.00
Yema de huevo (mL)	15.00
Penicilina (UI)	100 000
Estreptomocina (mg)	100
Agua destilada enrasar a 100 mL	

FUENTE: Evans y Maxwell, 1990.

Se pesó las cantidades indicadas de tris, glucosa, ácido cítrico y se colocó en una probeta de 100 mL, se completó con 80 ml de agua bidestilada y fue agitada para obtener una mezcla homogenizada; la cual se llevó a esterilizar en un envase que contenía agua hirviendo (86°C aproximadamente) por espacio de 5 minutos, al finalizar dicho proceso y con la solución enfriada se colocó los antibióticos en las cantidades ya mencionadas.

3.3.3. TRATAMIENTOS – YEMA DE HUEVO

La preparación del dilutor para cada tratamiento fue de la siguiente manera:

Tratamiento 1 (T1): Tris + yema de huevo de GALLINA CRIOLLA

Tratamiento 2 (T2): Tris + yema de huevo de GALLINA DE GRANJA

Tratamiento 3 (T3): Tris + yema de huevo de CODORNIZ

Tratamiento 4 (T4): Tris + yema de huevo de PALOMA

La yema de huevo que se agregó a la solución fue día antes de la colección. Se lavó cuidadosamente la cáscara de huevo, se limpió con un paño mojado en alcohol, y se dejó secar. Luego se separó la clara, situando la yema de huevo sobre un papel absorbente, cuidando de que no se rompa su membrana. El resto de clara se separó haciendo rodar la yema suavemente sobre el papel. Se atravesó la membrana de la yema con una jeringa, se extrajo la yema, propiamente dicha, desde el interior y se vertió la cantidad necesaria en un tubo Falcon® estéril de 10 mL (Cueto et al., 2004). Una vez preparado el dilutor tris se tomó la cantidad necesaria y se calculó el volumen de yema de huevo que corresponde al 15% en la preparación del dilutor, luego se homogenizó suavemente evitando la formación de burbujas de aire (Evans y Maxwell, 1990) posteriormente se procedió a filtrar con papel filtro para eliminar particular de grasa (Anexo – Foto 2). Una vez que

se separó en dos fracciones el dilutor (fracción A), la fracción B contenía (2.5 mL) de glicerol que representa del volumen total 5% de glicerol.

3.3.4. COLECCIÓN DEL SEMEN

Dos semanas antes de empezar el estudio se realizó el entrenamiento, haciendo colecciones de 2 carneros por día utilizando hembras en celo sujetadas en un brete de monta. Para el experimento se colectó dos carneros por día, 2 veces por semana por el lapso de 5 meses (Agosto – Diciembre).

Procedimiento

Antes de colectar a los machos se realizó la limpieza de toda la zona adyacente al prepucio como también se cortó la lana del prepucio para evitar la contaminación de la muestra, para una colección buena, se realizó de una a dos montas falsas antes de colectar.

La colección de semen se realizó por el método de vagina artificial, atemperada a unos 42° C aproximadamente, colectado en un tubo graduado como lo recomienda Evans y Maxwell (1990) y Cueto et al., (2004) (Anexo – Foto 1).

3.3.5. EVALUACIÓN DEL SEMEN

Se realizó una evaluación macroscópica y microscópica para cada eyaculado, evaluando los siguientes parámetros:

3.3.5.1. EVALUACIÓN MACROSCÓPICA

A. Color

Para evaluar el color se realizó mediante el método de observación directa en el vaso colector, según autores mencionados anteriormente.

B. Volumen

El volumen se midió mediante la siguiente metodología, se usó un tubo colector graduado el cual fue protegido para evitar que se enfriara como recomienda Mylne et al., (1997) y Cueto et al., (2004).

3.3.5.2. EVALUACIÓN MICROSCÓPICA

Una vez colectado el semen fue puesto en baño maría a 37°C y el dilutor estuvo a la misma temperatura, también en baño maría.

Procedimiento

En un inicio se diluyó en una proporción 1:1 (semen: fracción A) al que denominaremos como “Pre dilución”; en tanto que ya se iniciaba el proceso de enfriamiento hasta llegar al laboratorio del Centro de Investigación.

Una vez que se llegó al laboratorio se procedió a evaluar motilidad, vitalidad y TH.

A. Motilidad masal

La motilidad masal de los espermatozoides se evaluó, inmediatamente después de la colección, para proceder al congelamiento de un eyaculado, Cueto et al. (2004) recomiendan que su motilidad masal sea de 3 o mayor.

Procedimiento

La técnica consistió en colocar una gota de muestra sobre un portaobjetos previamente calentado, enseguida se colocó al microscopio donde se observó con un aumento de 40x para determinar dicha característica.

B. Vitalidad

Para determinar el número de células espermáticas vivas y muertas, se realizó un frotis con colorante Eosina-Nigrosina cuya composición fue la siguiente:

1 g de Eosina

5 g de Nigrosina

100 mL de agua bidestilada.

Procedimiento

- Se colocó sobre un portaobjetos tibio (37°C) una gota de Eosina y una gota de Nigrosina.

- Seguidamente se colocó una gota de semen cercanamente a los colorantes.
- Se mezcló cuidadosamente la gota de semen con los colorantes por 10 segundos con apoyo de una aguja hipodérmica (primero con Eosina y luego con Nigrosina).
- Una vez homogenizado se realizó el frotis colocando otra lámina porta objetos en ángulo de 45°, se obtuvo una película fina y se dejó secar a temperatura ambiente.
- Se examinó con microscopio a una magnificación de 400x, evaluando 200 células espermáticas por lámina. Los espermatozoides coloreados se consideran muertos y los sin teñir vivos como lo indica Tribulo (2009).

C. Test hipo-osmótico

Para la evaluación del TH se utilizó una solución hipo-osmótica cuya composición fue la siguiente:

Cuadro 08: Composición de solución hipo-osmótica

Insumos	Cantidad
Citrato de sodio (di hidratado)	0.735 g
Fructuosa	1.351 g
Agua bidestilada	100 mL

FUENTE: Santiani (2003).

Procedimiento

- Se tomó la solución hipo-osmótica en un tubo de ensayo y se adicionó la muestra de semen pre diluido (teniendo una dilución de 1 de semen y 10 de solución hipo-osmótica) y se incubó por 45 minutos a 37° C.
- Luego se colocó una pequeña gota de la mezcla sobre un portaobjetos y se colocó el cubreobjetos.
- La lectura se realizó en un microscopio, contándose 100 espermatozoides a una magnificación de 400X.
- Los espermatozoides con cola enrollada e hinchada se consideraron con reacción positiva según recomiendan Jeyendran et al. (1992).

$$TH = \frac{e}{T} \times 100$$

Donde:

TH = Porcentaje de test hipo-osmótico

e = Número total de espermatozoides con cola enrollada

T = Número total de espermatozoides contados

D. Concentración

La concentración de espermatozoides se determinó por el método del hemocitómetro con la cámara de Neubauer®:

Procedimiento

- Se colocó una pequeña gota de muestra de semen sobre un portaobjetos y con la pipeta de glóbulos rojos se absorbió la muestra hasta la marca de 0.5 y completado con agua destilada (como agente espermicida) hasta la marca de 101 (1:200).
- El contenido de la pipeta se homogenizó completamente eliminando las tres o cuatro primeras gotas.
- Se colocó un cubreobjetos sobre la cámara de Neubauer®.
- Seguidamente se colocó una gota que por capilaridad se distribuyó entre el espacio existente entre cámara de Neubauer y el cubreobjetos.
- Se dejó en reposo durante 5 min.
- En el microscopio a un objetivo de 400x de aumento se realizó el conteo de espermatozoides situados en 5 de los 25 cuadrados tomándose aquellas de las esquinas y el centro, para evitar contar doble los espermatozoides se contaron a manera de “L” invertida.

El número de espermatozoides en los 5 cuadrantes son iguales al número de espermatozoides en $1/50 \text{ mm}^3$ del volumen del fluido total. La tasa de dilución fue de 1:200. Por consiguiente, el número de espermatozoides de los 5 cuadrantes fueron multiplicados por 50 luego por 200 eso nos da el N° de espermatozoides contenidos en 1 mm^3 , lo cual para transformarlo en mL se multiplicará por 1000.

3.3.6. DILUCIÓN

La dilución se realizó en dos fracciones, primero adicionándole Fracción A a los 37°C y a los 5°C se adiciono la Fracción B.

Procedimiento

La primera fracción se agregó una vez colectada la muestra a los 37°C en una proporción de 1:1 (Pre dilución).

La segunda fracción (contenía dilutor con 5% de glicerol) se agregó cuando la muestra Pre diluida llegó a 5°C.

3.3.7. PERIODOS DE LA CONGELACIÓN DEL SEMEN

Los periodos en la congelación de semen del carnero están dados por periodos de enfriamiento, equilibración y empajillado.

3.3.7.1. ENFRIAMIENTO

El enfriamiento es la fase de inicio que va desde que se realizó la pre dilución (tubo Falcon® conteniendo semen y dilutor) colocado en un recipiente (con capacidad de 350 mL aproximado) que contenía agua a 37°C cubriendo la muestra en su totalidad dentro de una caja de tecnopor que se llevó hasta el laboratorio, al cual se llegaba aproximadamente en 15 min con la muestra a una temperatura de 25°C.

Procedimiento

- Se colocó en el refrigerador que estaba con una temperatura interna de 4°C.
- El semen pre diluido llegó a la temperatura de 5°C en un lapso de 4 – 4.5 horas teniendo una tasa de enfriamiento de 0.15°C/minuto aproximadamente.
- Al terminar el proceso de enfriamiento (5°C) se colocó la Fracción B (Tris-yema de huevo-Glicerol, que contenía el glicerol en un 5%) en tres partes iguales con intervalos de 10 minutos cada uno como sugiere Gao (1993).
- Al terminar el proceso de glicerolización se realizó la evaluación microscópica de motilidad, vitalidad y test hiposmótico de las muestras de semen.

Rotulado de pajillas

Mientras se espera el enfriamiento se procedió a identificar las pajillas, con lapiceros de tinta indeleble de diferentes colores, se asignó un color diferente a cada carnero; el color rojo fue para Merino Dohne (Daniel), color azul para Merino Dohne (Higor), color anaranjado para Merino Precoz Alemán y color morado para Texel (Nico).

La información inscrita en las pajillas se detalla la raza, código del carnero, el tratamiento con las diferentes yemas de huevo utilizadas (yema de huevo de gallina criolla, gallina de granja, codorniz y paloma) y número de repeticiones.

Una vez rotuladas las pajillas se colocaron en el refrigerador en un tubo de ensayo para atemperarlas a 5° C con la finalidad de que la pajilla y el semen estén en la misma temperatura para su respectivo uso.

3.3.7.2. EQUILIBRACIÓN

Al terminar el proceso de enfriamiento se realizó la fase de equilibrio entre el glicerol y los espermatozoides a la temperatura de 5° C en la refrigeradora por un periodo de tiempo de 30 min.

3.3.7.3. EMPAJILLADO

El empajillado o llenado de las pajillas se realizó dentro del refrigerador, durante este proceso se sigue manteniendo la temperatura de 5°C.

Procedimiento

- Se realizó de forma manual con una jeringa de tuberculina (adecuada con un aditivo de goma que aseguraba la absorción del semen dentro de la pajilla), ya que esta nos permitió controlar la cantidad que fue cargada en la pajilla, las pajillas de uso fueron las de 0.25 mL obteniéndose entre 20 – 25 pajillas/colecta/carnero.
- El sellado de las pajillas se realizó con Alcohol Polivinílico.
- Para el sellado se puso en contacto el extremo libre o anterior de la pajilla con el Alcohol Polivinílico, haciendo 3 a 4 golpes, se

introdujo en agua a 5° C con la finalidad de solidificar el alcohol polivinílico, se limpió la parte del sellado con papel higiénico y se volvió a sumergir en el recipiente con agua a 5° C con lo que finalizó el proceso de sellado (Evans y Maxwell, 1987; 1990).

3.3.7.4. CONGELACIÓN

La congelación de semen se realizó en una caja de tecnopor de aproximadamente 38 cm de alto por 22 cm de ancho por 26 cm de largo y se almacenó en un tanque criogénico a -196° C.

Procedimiento

- Se extrajo las pajillas de 0.25 mL del recipiente con agua secando con ayuda de papel toalla suavemente.
- Se colocaron sobre la rejilla de congelación uniformemente en forma horizontal.
- Se preparó una caja de tecnopor, agregando NL hasta una altura de 5 cm en la caja.
- Se colocó la rejilla con las pajillas sobre el NL en suspensión a 5 cm del nivel de NL, donde recibieron el vapor estático del NL por un tiempo de 10 min.
- Una vez cumplido el tiempo de 10 min las pajillas fueron sumergidas rápidamente en el NL lo cual permitió que el vapor del nitrógeno envolviera por completo las pajillas obteniéndose una congelación uniforme (Evans y Maxwell, 1990).

Para controlar la curva de congelación a la altura de la parrilla por la parte externa de la caja se hizo una abertura para colocar el transductor del termómetro termocupla (cuyo rango de temperatura van desde -200°C hasta 1000°C con una sensibilidad de 0.1°C).

3.3.8. DESCONGELACIÓN

El semen congelado almacenado en el tanque criogénico a -196°C fue retirado individualmente para su descongelación y posterior evaluación.

Procedimiento

La pajilla fue sumergida en baño maría (descongelado de semen) a 37°C por un tiempo de 30 segundos. Posteriormente se secó con papel toalla y se vertió en un tubo de ensayo, estando lista para el proceso de evaluación microscópica.

3.3.8.1. MOTILIDAD INDIVIDUAL PROGRESIVA

La evaluación de la motilidad espermática individual se realizó en base a las recomendaciones de Joshi et al. (2001).

Procedimiento

El semen descongelado fue diluido 1:1 con solución madre (Fracción A del dilutor) a 37°C y fueron observadas a un aumento de 400X con el procedimiento siguiente:

- Se colocó una gota de semen en una lámina portaobjetos temperada a 37° C aproximadamente y luego fue cubierta con una lámina cubreobjetos a la misma temperatura para ello se utilizó una platina temperada.
- La lectura se realizó como indica López et al. (2012), primero se contaron los espermatozoides con motilidad progresiva, luego los espermatozoides con motilidad no progresiva y por último los inmóviles, siguiendo el sentido de las agujas del reloj. Realizándose en tres campos como mínimo.
- Una vez concluido el conteo se determinó el porcentaje de motilidad individual a través de la fórmula siguiente:

$$MIP = \frac{p}{T} \times 100$$

Donde:

MIP = Porcentaje de motilidad individual de espermatozoides

p = Número de espermatozoides con motilidad progresiva

T = Número total de espermatozoides contados

3.3.8.2. MOTILIDAD TOTAL

Para su evaluación se tomó la misma muestra que se preparó para motilidad individual.

Procedimiento

- Se colocó una pequeña gota de la mezcla anterior en una lámina portaobjetos temperada a 37° C y luego fue cubierta con una lámina cubreobjetos a la misma temperatura para lo cual se utilizó una platina temperada.
- La lectura se realizó a una magnificación de 400X, en tres campos como mínimo, primero se contaron los espermatozoides motiles (motilidad progresiva y no progresiva) y después los inmóviles.
- Una vez concluido el conteo se determinó el porcentaje de MT a través de la formula siguiente:

$$MT = \frac{m}{T} \times 100$$

Donde:

MT = Porcentaje de motilidad individual de espermatozoides

m = Número de espermatozoides motiles

T = Número total de espermatozoides contados

3.3.8.3. VITALIDAD Y ANORMALIDADES

Se realizó de la misma manera que a la colección, realizando un frotis con colorante Eosina-Nigrosina, examinando con microscopio a 400x y evaluando 200 células espermáticas por lámina.

3.3.8.4. INTEGRIDAD DE ACROSOMA

Para su evaluación se tomó la misma muestra que se utilizó para evaluar vitalidad y anormalidades.

Procedimiento

Se tomó una gota de semen, que fue mezclada con una gota de eosina y dos gotas de nigrosina sobre un portaobjetos en una platina temperada a 37° C, se realizó la mezcla de todos ellos y el frotis fue secado al aire.

Se colocó una gota de esta dilución en un portaobjeto con su respectivo cubreobjeto y se observó al microscopio en objetivo de inmersión 100x.

Se diferenciaron los espermatozoides con borde acrosomal normal de aquellos con alguna alteración; se contó un total de 100 espermatozoides y el resultado se expresó en porcentaje con la siguiente formula:

$$IA = \frac{i}{T} \times 100$$

Donde:

IA = Porcentaje de espermatozoides con acrosoma integro

i = Número de espermatozoides con acrosoma integro

T = Número total de espermatozoides contados

3.3.8.5. TEST HIPO-OSMÓTICO

Se realizó de la misma manera que a la colección, se mezcló muestra de semen con solución hipo-osmótica (1:10) y se incubó por 45 minutos a 37° C, luego se colocó una pequeña gota de la mezcla sobre un portaobjetos y se colocó un cubreobjetos para evaluar en un microscopio a 400x, contándose 100 espermatozoides. Los espermatozoides con cola enrollada e hinchada se consideraron con reacción positiva.

3.3.9. INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

La IA se realizó en época reproductiva (Junio) utilizando la siguiente metodología:

Determinación de celo

El celo fue detectado, haciendo uso de carneros vasectomizados o retajos, los mismos que fueron provistos de un marcador en el pecho, el elemento utilizado como marcador fue una mezcla de ocre, de manera tal que el carnero al momento de realizar el salto pintaba la grupa de la borrega en celo. Los carneros fueron colocados dos veces al día a las 5:00 am y a las 17:00 pm horas, las borregas que tuvieron la región de la grupa bien pintada son las que fueron consideradas como borregas en celo (Quispe, 2011).

Inseminación artificial

La inseminación se realizó 12 h posteriores a la detección de celo. Una vez identificadas las borregas en celo se procedió a inseminarlas por vía cervical con ayuda de colaboradores quienes sujetaron a las borregas por los miembros posteriores elevándolas y exponiendo la región de la vulva de las borregas, se limpió la región de la vulva y se introdujo el vaginoscopio para observar la entrada de la cérvix, lugar donde se depositó el semen (Cueto, 2004) (Anexo – Foto 4). La dosis para inseminar fue de 0.25 ml por borrega, las pajillas se descongelaron a 37°C por 30 segundos.

3.3.10. DIAGNÓSTICO DE GESTACIÓN

Para realizar el diagnóstico de gestación se utilizó la ultrasonografía con el ecógrafo, modo - B en tiempo real (Sonovet 600 V; medison Co, LTD, Korea. Con doble frecuencia 5.0 MHz y 7.5 MHz indicada para el examen transrectal en animales) con el transductor lineal con una frecuencia de onda de 7.5 MHz vía rectal a los 35 días posteriores a la IA a todas las borregas (Anexo – Foto 5).

Procedimiento

- Se armó el transductor y se cubrió con un guante de plástico obstétrico y se lubricó este con gel, evitando las burbujas de aire.
- Se sujetaron a las borregas de pie y se procedió a evacuar las heces del animal introduciendo los dedos índice y medio suavemente hasta vaciar el contenido de las heces del recto.

- Se lubrico el transductor armado con gel, esto para que se adhiera a la mucosa del recto, luego se introdujo el transductor suavemente evitando lesionar el recto.
- Se ubicó la vejiga como órgano de referencia en la pantalla de monitor, luego se pasó al útero y cuernos uterinos para su observación y se procedió a diagnosticar: en caso positivo de gestación se pudo observar la presencia de vesícula embrionaria; y en caso negativo solo se observó los cuernos uterinos.

3.3.11. DETERMINACIÓN DE LA TASA DE FERTILIDAD

Para la determinación de la tasa de fertilidad se utilizó la formula descrita a continuación:

$$\text{Tasa de fertilidad} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de borregas gestantes a los 35 días}}{\text{N}^\circ \text{ de borregas inseminadas}} \times 100$$

Fuente: Alencastre, 1997

3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Posterior al registro de datos y previo al análisis estadístico, se realizó la prueba de supuestos de normalidad (Shapiro Wilks) y homogeneidad de varianzas (Prueba F), los resultados de los mismos indicaron que los datos se ajustan a la distribución normal y presentan varianzas homogéneas, por lo cual se continuo el análisis mediante el análisis de varianza (prueba paramétrica). La prueba de Duncan fue usada para determinar la diferencia entre medias. Todos los análisis fueron resueltos por el programa SAS.

Los datos de las variables: vitalidad, motilidad, TH por efecto de cuatro tratamientos (Tris-yema de huevo de gallina criolla, Tris-yema de huevo de gallina de granja, Tris-yema de huevo de codorniz, Tris-yema de huevo de paloma) fue analizado mediante el Diseño Bloque Completamente al Azar cuyo modelo aditivo lineal es el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + S_j + \xi_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = Variable respuesta observada en la unidad experimental que recibe el i-ésimo tratamiento

μ = Media poblacional

T_i = Efecto de i-ésimo tratamiento de diluyente

S_j = Efecto de la j-ésima raza

ξ_{ij} = Término que representa el error.

- ✓ Para la evaluación del porcentaje de gestación se utilizó la prueba no paramétrica de Chi-cuadrado.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. EFECTO DEL DILUTOR CON DIFERENTES YEMAS DE HUEVO SOBRE LA VIABILIDAD ESPERMÁTICA

El promedio de las características seminales de los carneros utilizados se muestra en el Anexo – Tabla 4 a Tabla 8.

a) Evaluación a la colección

La Tabla 1 muestra el porcentaje general de las características microscópicas (TH, vitalidad y anomalías) para el dilutor con cuatro diferentes yemas de huevo. Los resultados corresponden a la colección de cuatro carneros cuyos datos se encuentran en Anexo – Tabla 9 a Tabla 13.

Tabla 1: Características microscópicas a la colección del semen de carnero.

	T1*	T2*	T3*	T4*
MOTILIDAD MASAL	4.9	4.5	4.8	4.9
TEST HIPO-OSMÓTICO	83.27 ^{ab}	86.56 ^a	83.01 ^{ab}	79.76 ^b
VITALIDAD	82.64	86.03	85.94	86.35
ANORMALIDADES	2.07	1.26	1.32	0.48

^{a, b} Superíndices diferentes entre tratamientos indican diferencia significativa ($p < 0.05$)

* Tratamientos: T1 (Tris + Yema de Huevo de gallina Criolla), T2 (Tris + Yema de Huevo de gallina de Granja), T3 (Tris + Yema de Huevo de Codorniz), T4 (Tris + Yema de Huevo de Paloma)

MOTILIDAD MASAL

La motilidad masal de los espermatozoides colectados fueron clasificados de acuerdo al vigor del movimiento (Evans y Maxwell, 1990), según lo recomendado por Cueto *et al.* (2004), en el presente estudio el resultado fue 4.77 en promedio. Al comparar con lo reportado por Mamani (2010) con 4.7, Perez *et al.* (2011a) con 4.5 de motilidad masal muestran ser parecidos pudiendo deberse a que trabajaron en condiciones similares a nuestro trabajo; de la misma forma comparado con lo reportado por Cabrera y Pantoja (2008) con 4.3, Guerrero *et al.* (2009) con 4.4, Mansano *et al.* (2014) con 4.0 de motilidad masal se observa una superioridad con nuestros resultados debido a que los reproductores estuvieron suplementados con concentrados.

TEST HIPO-OSMÓTICO

Los porcentajes de TH a la colección fueron de 83.27% para T1, 86.56% para T2, 83.01% para T3 y 79.76% para T4 porcentajes que muestran diferencia estadística ($p < 0.05$).

Los porcentajes obtenidos para T1 y T2 son superiores a lo reportado por Perez (2010), quien obtuvo un 68.68% de espermatozoides con integridad de membrana celular intacta, pueda deberse al tipo de dilutor (tris 2.42 mg, fructosa 1.00 mg, ácido cítrico 1.36 mg, glicerol 6.4 mL, yema de huevo 20 mL, penicilina 100000 UI y estreptomycinina 100 mg) utilizando diferentes concentraciones ya que se trabajaron en condiciones similares, Cabrera y Pantoja (2008) reporta 81.2% de integridad de membrana esta diferencia

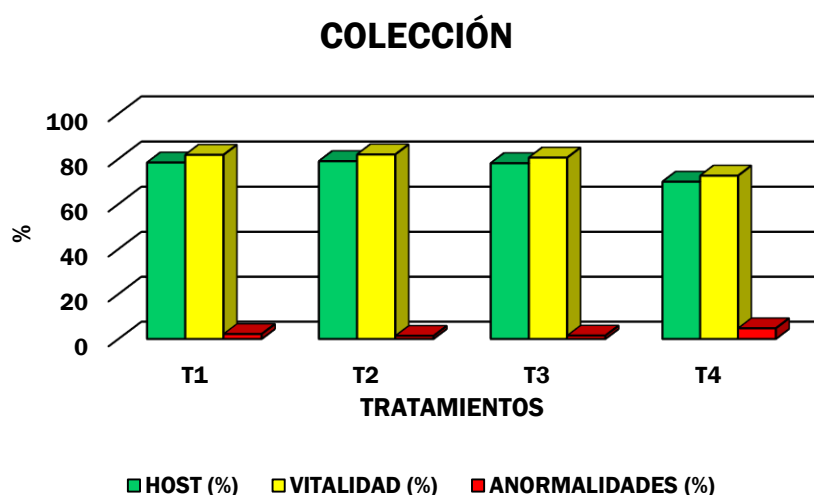
puede deberse al tiempo y temperatura de incubación ya que lo realizaron a 34°C/60 min en baño maría. El resultado obtenido para T3 es similar a lo reportado por Cabrera *et al.* (2010), quienes obtuvieron 83.27% de espermatozoides con integridad de membrana celular intacta, debido posiblemente al dilutor que utilizaron (Tris-yema de huevo de codorniz). No se encontró trabajos similares con yema de huevo de paloma por lo que no se pudo discutir.

VITALIDAD

En cuanto a los porcentajes de vitalidad se observa un 82.64% para T1, 86.03% para T2, 85.94% para T3 y 86.35% para T4 porcentajes que no muestran diferencia significativa. Cabrera y Pantoja (2008) obtuvieron 82.5% de espermatozoides vivos, dato ligeramente inferior a nuestros resultados pudiendo deberse a un mejor manejo de las muestras. El resultado obtenido para T3 es ligeramente inferior a lo reportado por Cabrera *et al.* (2010), quienes obtuvieron 83.4% de espermatozoides vivos en raza Assaf, pudiendo deberse a que el porcentaje de espermatozoides vivos guarda relación con el movimiento progresivo de los espermatozoides (Hafez y Hafez, 2000) y el mencionado autor empezó con 4.5 y en el presente trabajo se empezó con 4.7. Sin embargo, los resultados del presente trabajo son inferiores a lo reportado por Mamani (2010) que obtuvo 91.5% y Perez (2010) quien obtuvo 90.32 % a la prueba de vitalidad esto probablemente sea a un mejor manejo de las muestras ya que ambos trabajos se realizaron en condiciones similares al nuestro y utilizaron dilutor con yema de huevo de gallina criolla.

En el gráfico 1, se muestran los resultados de TH, vitalidad y anormalidad espermática de semen diluido con los cuatro tratamientos: T1 (Tris + Yema de Huevo de gallina Criolla), T2 (Tris + Yema de Huevo de gallina de Granja), T3 (Tris + Yema de Huevo de Codorniz), T4 (Tris + Yema de Huevo de Paloma), observándose mayor porcentaje de integridad de membrana y vitalidad para T2 (86.56% y 86.03% respectivamente).

Gráfico 1: Porcentaje de TH, vitalidad y anormalidad espermática de semen diluido con los cuatro tratamientos a la colección.



b) Evaluación a los 5° C

La Tabla 2 muestra los resultados del efecto del dilutor con diferentes yemas de huevo sobre las características microscópicas: TH, vitalidad y anormalidades durante el proceso de equilibración. Los resultados corresponden a la colección de cuatro carneros cuyos datos se encuentran en Anexo – Tabla 14 a Tabla 18.

Tabla 2: Comparación del porcentaje de TH, vitalidad y anormalidades de semen de carnero durante el proceso de equilibración utilizando cuatro yemas de huevo

	T1*	T2*	T3*	T4*
TEST HIPO-OSMÓTICO	78.38	79.00	78.10	69.88
VITALIDAD	81.79 ^a	81.97 ^a	80.57 ^a	72.56 ^b
ANORMALIDADES	2.18	1.36	1.47	4.74

^{a, b} Superíndices diferentes entre tratamientos indican diferencia significativa ($p < 0.05$)

* Tratamientos: T1 (Tris + Yema de Huevo de gallina Criolla), T2 (Tris + Yema de Huevo de gallina de Granja), T3 (Tris + Yema de Huevo de Codorniz), T4 (Tris + Yema de Huevo de Paloma)

Los porcentajes obtenidos de TH en los diferentes tratamientos no muestran diferencia estadística ($p > 0.05$) y en cuanto a vitalidad si se muestra diferencia estadística ($p < 0.05$)

TEST HIPO-OSMÓTICO

Los porcentajes obtenidos durante el proceso de equilibración para TH fueron 78.38%, 79.00%, 78.10% y 69.88% para T1, T2, T3 y T4 respectivamente, observando una disminución aproximada del 6% para T1 y T3, y un 9% para T2 comparado con lo evaluado durante el proceso de colección, esta disminución es debido a que con el transcurrir del tiempo existe un aumento en la producción de ROS como lo indica Santiani, (2003), este estrés oxidativo aumenta la concentración de ROS que podría afectar el metabolismo, motilidad, viabilidad e integridad del DNA del espermatozoide (Da Silva *et al.*, 2009). Otro efecto del enfriamiento es el shock de frio que principalmente causa daños a nivel de membrana, y como

parte de la membrana está contenida por proteínas integrales cuyas funciones son de transporte como los canales de calcio, se produce un aumento en la permeabilidad la misma que ve afectada procesos como la reacción acrosomica durante la fertilización (Stornelli *et al.*, 2005; Tribulo, 2009).

El resultado obtenido para T1 (78.38%) es superior a lo reportado por Vargas (2015), quien obtuvo 67.33% esta ligera superioridad pueda deberse tal vez a un mejor manejo de las muestras ya que se trabajaron en condiciones similares y con el mismo dilutor (Tris – yema de huevo de gallina criolla), asimismo es superior comparado con lo reportado por Perez (2010) quien utilizó como dilutor tris (2.42 mg), fructosa (1.00 mg), ácido cítrico (1.36 mg), glicerol (6.4 mL), yema de huevo de gallina criolla (20 mL), penicilina (100000 UI) y estreptomycin (100 mg), con un descenso hasta 5°C en un lapso de 2 horas teniendo una tasa de enfriamiento de 0.27°C/minuto aproximadamente y con un tiempo de equilibracion de 1 hora, obteniendo 60.28% de espermatozoides con integridad de membrana celular intacta, esta ligera diferencia pueda deberse a la concentración del diluyente ya que también se trabajó en condiciones similares. Del mismo modo, se muestra una ligera superioridad a lo reportado por Cabrera y Pantoja (2008) quienes obtuvieron 77.9% utilizando como dilutor Tris – glucosa – yema de huevo, esta ligera diferencia pueda deberse a la temperatura y tiempo de incubación. Asimismo, se observa un trabajo con resultados parecidos para T3 como lo reportado por Cabrera et al. (2011) que consiguió 78.03% utilizando como dilutor Tris – yema de huevo de codorniz y congelado en pajillas de 0.25mL.

Vitalidad

En cuanto a los porcentajes de vitalidad fueron 81.79%, 81.97%, 80.57% y 72.56% para T1, T2, T3 y T4 respectivamente, se observa una disminución aproximada del 1% para T1, 5% para T2 y 6% para T3, comparado con lo evaluado durante el proceso de colección, esta disminución es debido a un aumento en la producción de ROS como lo indica Santiani, (2003). La gran susceptibilidad de los espermatozoides a los radicales libres de oxígeno se debe a que sus membranas plasmáticas tienen un alto contenido de ácidos grasos insaturados (Jones et al 1979), lo cual las hace susceptibles a sufrir peroxidación lipídica (Alvarez y Storey 1989). Dicha peroxidación ha sido relacionada además con una disminución en la motilidad espermática y muerte celular (Aitken 1994).

El porcentaje de vitalidad para T1 es similar al resultado obtenido por Perez (2010) que reporta 81.55% de vitalidad durante el proceso de equilibración, posiblemente debido a que se trabajaron con animales de las mismas razas y con condiciones parecidas. No se ha podido hacer más comparaciones con otros trabajos, puesto que la mayor parte de autores no hacen referencia del porcentaje de vitalidad espermática a la refrigeración.

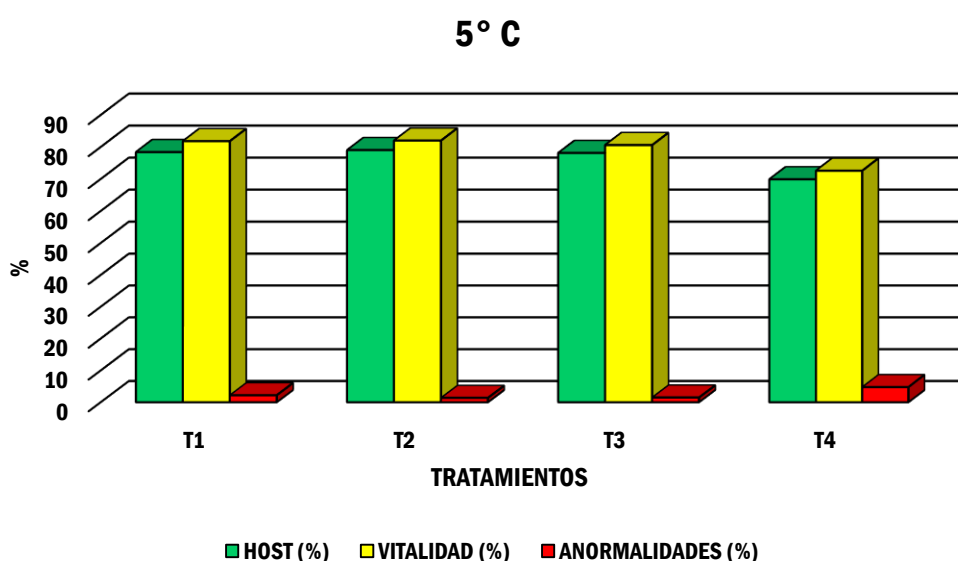
La superioridad de espermatozoides con membrana celular intacta y vitalidad observada en T1, T2 y T3 en comparación con T4 a la refrigeración podría ser consecuencia de que se tubo inconveniente al momento de la extracción de la yema de huevo de paloma debido a que la yema presentó una membrana muy delgada y que al momento de la extracción se pudo

mezclar con un pequeño porcentaje de clara de huevo que estaría actuando como un agente espermicida.

Para T4 se observó una disminución aproximada del 12% en integridad de membrana y 16% en vitalidad comparado con lo evaluado durante el proceso de colección, esta disminución es debido a lo mencionado anteriormente y al mismo tiempo a un aumento en la producción de ROS.

En el gráfico 2, se muestran los resultados de TH, vitalidad y anormalidad espermática de semen refrigerado en los cuatro tratamientos: T1 (Tris + Yema de Huevo de gallina Criolla), T2 (Tris + Yema de Huevo de gallina de Granja), T3 (Tris + Yema de Huevo de Codorniz), T4 (Tris + Yema de Huevo de Paloma), observándose mayor porcentaje de integridad de membrana y vitalidad para T2 (79.00% y 81.97% respectivamente).

Gráfico 2: Porcentaje de TH, vitalidad y anormalidad espermática de semen diluido con los cuatro tratamientos a la refrigeración.



c) Evaluación a la descongelación

La Tabla 3 muestra los resultados del efecto del dilutor con diferentes yemas de huevo sobre las características microscópicas: MIP, MT, TH, vitalidad, anormalidades e integridad de membrana a la descongelación. Los resultados corresponden a la colección de cuatro carneros cuyos datos se encuentran en Anexo – Tabla 19 a Tabla 29.

Tabla 3: Comparación del porcentaje de MIP, MT, TH, vitalidad, anormalidades e integridad de acrosoma de semen de carnero a la descongelación utilizando cuatro yemas de huevo

	T1*	T2*	T3*	T4*
Motilidad individual progresiva	51.36	50.72	50.03	45.98
Motilidad total	51.86 ^{ab}	57.87 ^a	54.30 ^a	44.21 ^b
Test hipo-osmótico	55.86 ^a	60.50 ^a	59.44 ^a	49.30 ^b
Vitalidad	57.19 ^a	56.04 ^a	56.08 ^a	46.66 ^b
Anormalidades	3.44	2.27	1.76	2.18
Integridad acrosoma	61.59	65.27	64.64	62.53

^{a, b} Superíndices diferentes entre tratamientos indican diferencia significativa ($p < 0.05$)

* Tratamientos: T1 (Tris + Yema de Huevo de gallina Criolla), T2 (Tris + Yema de Huevo de gallina de Granja), T3 (Tris + Yema de Huevo de Codorniz), T4 (Tris + Yema de Huevo de Paloma)

Los porcentajes obtenidos de motilidad individual progresiva e integridad de membrana en los diferentes tratamientos no muestran diferencia estadística ($p > 0.05$) y en cuanto a MT, TH y vitalidad si se muestra diferencia estadística ($p < 0.05$)

MOTILIDAD INDIVIDUAL PROGRESIVA

Los porcentajes de MIP a la descongelación fueron de 51.36% para T1, 56.04% para T2, 56.08% para T3 y 46.66% para T4; porcentajes superiores que lo reportado por Santiani et al. (2007) quienes lograron un 42.36% (sin antioxidante) y 47.92% (con antioxidante) de motilidad progresiva, esta ligera diferencia probablemente se deba a que el mencionado autor realizó la congelación exponiendo las pajillas a 15 cm sobre el NL durante 15 minutos; por lo que a mayor tiempo de exposición de las pajillas (15 min) a los vapores de NL causa una mayor deshidratación de los espermatozoides por lo tanto un mayor shock osmótico (Perez, 2010) y también es necesario considerar la distancia que existe entre las pajillas y la superficie del NL, la distancia recomendada es entre 4 a 6 cm (Salamon y Maxwell, 2000). Guerrero *et al.* (2009) reporta 40.3% de motilidad progresiva; podemos indicar que el mencionado autor realizó la congelación con dilutores hipertónicos (tris-trealosa) lo que podría producir un shock osmótico (Chen et al., 1993; Aisen et al., 2000), también usó 10% de yema de huevo lo que probablemente no proporcione una buena acción protectora, además que se observa una curva de congelación de -50 a -60 °C/minuto produciendo una congelación rápida que no le daría tiempo al espermatozoide para poder deshidratarse ocasionando la formación de cristales pequeños de hielo dentro del espermatozoide, asimismo congeló en pajillas de 0.5mL que a diferencia de las de 0.25 mL el descongelamiento es más rápido y por consiguiente hay menor daño en los espermatozoides (Mamani, 2010).

Comparado con un estudio similar, Huamani (2010) reporta 38.60% utilizando como dilutor tris – yema de huevo de gallina, esta diferencia pueda deberse tal vez a un mejor manejo de las muestras ya que se trabajaron en condiciones similares y con el mismo dilutor. Los resultados obtenidos para T3 (50.03%) son inferiores a lo reportado por Cabrera et al. (2011) 62.0% y Cabrera et al. (2010) 63.77% quienes utilizaron Tris – yema de huevo de codorniz para congelar semen en pajillas (0.25 mL) y pellets (0.20 mL) respectivamente, esta ligera ventaja obtenida por los autores mencionados puede ser a que los espermatozoides sufrieron menos daño de la membrana porque el descenso de temperatura desde 34°C a 5°C fue en dos horas a comparación de nuestro trabajo que fue de 4 – 4.5 horas aproximadamente lo cual estaría exponiéndose más tiempo a las ROS que se generan en esta fase.

Sin embargo también reportan resultados superiores a los obtenidos en el presente trabajo como Sandoval (2007) 69.29%, Ruiz et al. (2007) 66.9%, utilizando un dilutor a base tris – yema de huevo (no especifican especie) y trehalosa; esta superioridad estaría influenciada por la acción de la trehalosa que interactúa con la membrana celular del espermatozoide, reemplazando al agua alrededor de los fosfolípidos, previniendo el daño de esta durante la deshidratación celular a la congelación (Aisen, et al. 2002). Cabrera y Pantoja (2008) obtuvieron 60.77% utilizando como dilutor Tris – glucosa – yema de huevo (no especifican especie); esta diferencia podría deberse a que el mencionado autor evaluó la motilidad diluyendo en una proporción de 1:1 (v/v) de semen en citrato de sodio al 2.9% con 2% de suero bovino y lo centrifugó a 500 rpm/5 min lo cual le estaría dando un mejor medio para su

evaluación porque nosotros tuvimos inconvenientes al momento de la evaluación a pesar de que se diluyó con suero fisiológico y también se probó con solución madre (dilutor sin yema de huevo) a pesar de eso la motilidad se disminuía gradualmente.

MOTILIDAD TOTAL

Los porcentajes de MT a la descongelación fueron de 51.86% para T1, 57.87% para T2, 54.30% para T3 y 44.21% para T4; comparado con un estudio similar, Mamani (2010) reporta 48.96% utilizando como dilutor tris – yema de huevo de gallina criolla, esta superioridad mostrada en el presente estudio pueda deberse tal vez a un mejor manejo de las muestras ya que se trabajaron en condiciones similares y con el mismo dilutor. Asimismo nuestros resultados son superiores a lo reportado por Kulaksiz, et al. (2010) quien determino el efecto de seis diferentes yemas de huevo sobre la calidad del semen después de la crioconservación de semen de carnero, obteniendo 35% de motilidad con yema de huevo de gallina y 26% de motilidad con yema de huevo de codorniz, esta ligera diferencia probablemente se deba a que el mencionado autor realizo la congelación suspendiendo las pajillas a 4 cm por encima del NL durante 15 minutos; por lo que a mayor tiempo de exposición de las pajillas (15 minutos) a los vapores de NL causa una mayor deshidratación de los espermatozoides por lo tanto un mayor shock osmótico (Perez, 2010).

Sin embargo también reportan resultados superiores comparado con lo obtenido como Pérez (2010), que evaluó el efecto de tres diferentes temperaturas de congelación quien obtuvo 48.26% para -80°C, 53.69% para

-100°C, 58.58% para -120°C y 44.94% en el grupo control; esta ligera superioridad (para -120°C) se puede deber por el control estricto en la curva de congelación ofreciendo menor daño estructural a nivel de membranas y organelas de los espermatozoides durante los procesos de congelación y descongelación. Valencia et al. (1994) reporta una motilidad progresiva de 59.0% (descongelado a 37°C/15 segundos) y 59.9% (descongelado a 55°C/8 segundos) utilizando un dilutor con 0.03 ml de pasta Orvus que brinda una mejora de la viabilidad en muestras espermáticas de ovinos a la descongelación, encontrando principalmente una mejoría en la motilidad y un mayor número de acrosomas intactos (Hellemann, et al. 1997) y también a la temperatura de descongelación ya que a medida que aumenta la temperatura de descongelación, aumenta el porcentaje de movilidad espermática (López, 1992).

Esta superioridad mostrada por los autores ya mencionados se debe también a que en el presente trabajo se tuvo inconvenientes al momento de la evaluación de la motilidad tanto total como individual progresiva observando una mortandad alta que fue incrementándose según el tiempo de evaluación, a pesar de que se diluyó con suero fisiológico y también con el mismo dilutor base (sin yema de huevo) a la misma temperatura de descongelado.

TEST HIPO-OSMÓTICO

Los porcentajes del TH a la descongelación fueron de 55.86% para T1, 60.50% para T2, 59.44% para T3 y 49.30% para T4. Esta ligera superioridad mostrada podría ser que T1, T2 y T3 brindaron mejor protección a los

espermatozoides, mostrando menor daño estructural a nivel de membranas y organelas durante los procesos de congelación y descongelación. Trimeche et al. (1997) encontraron que después del proceso de congelación-descongelación de espermatozoides de Jackass, la yema de huevo de codorniz mejoró el porcentaje de espermatozoides móviles, en comparación con la yema de huevo de gallina, debido a que la yema de huevo de codorniz contiene significativamente más fosfatidilcolina, menos fosfatidiletanolamina, y una proporción más pequeña de poliinsaturados que los ácidos grasos saturados de la yema de huevo de gallina. Sin embargo, en el presente trabajo, no hubo diferencia entre la yema de huevo de codorniz y la yema de huevo de gallina (criolla y de granja) en porcentajes de TH, vitalidad e integridad de acrosoma a la descongelación, corroborando con lo mencionado por Moreno et al. (2008) que informaron que la yema de huevo de codorniz en el diluyente no tiene ninguna ventaja sobre la yema de huevo de gallina en la criopreservación de espermatozoides epididimarios de cabras montesas españolas.

Comparado con estudios similares, Vargas (2015) 34.47%, Huamani (2010) 37.61% empajillado a 5°C y 39.75% empajillado a 20°C, Mamani (2010) 45.28% y Pérez (2010) 52.2% controlando temperatura de congelación y 39.95% sin control; esta diferencia puede ser tal vez a un mejor manejo de las muestras porque los autores mencionados también utilizaron tris – yema de huevo de gallina criolla, mismo método de congelación, raza de carneros y mismo ambiente.

Kulaksiz et al. (2010) obtuvieron 44.0% y 30.8% de integridad de membrana con yema de huevo de gallina y yema de huevo de codorniz respectivamente, esta ligera diferencia probablemente se deba al tiempo de congelación (4 cm por encima del NL durante 15 minutos); por lo que a mayor tiempo de exposición de las pajillas a los vapores de NL causa una mayor deshidratación de los espermatozoides por lo tanto un mayor shock osmótico (Perez, 2010).

Santiani et al. (2007) quienes lograron 33.65% (sin antioxidante) y 40.53% (con antioxidante) de espermatozoides con membrana celular intacta, esta ligera diferencia probablemente se deba al proceso de congelación (15 cm sobre el NL durante 15 minutos). Igualmente, se muestra una superioridad a lo reportado por Cabrera y Pantoja (2008) 39.9% utilizando dilutor Tris – glucosa – yema de huevo (no especifica la especie), puede deberse a que para la evaluación incubó a 34°C/60 min en baño maría y a un mejor manejo de las muestras comparado con el presente estudio.

Los resultados muestran ser inferior a lo reportado por Sandoval (2007) quien reporta 62.7% de espermatozoides con respuesta positiva a la prueba de hiposmosis quien también utilizó dilutor Tris – yema de huevo (no especifican especie) y Trealosa, esta diferencia probablemente sea por la acción de la Trealosa que interactúa con la membrana celular del espermatozoide, reemplazando al agua alrededor de los fosfolípidos, previniendo el daño de esta durante la deshidratación celular a la congelación (Aisen, et al. 2002).

VITALIDAD

Los porcentajes de vitalidad a la descongelación fueron de 57.19% para T1, 56.04% para T2, 56.08% para T3 y 46.66% para T4. En el presente trabajo se muestra una superioridad de T1, T2 y T3 frente a T4, probablemente sea efecto de la composición química de la yema ayudando a mantener mejor la viabilidad (factor de conservación), esta protección se debe a su adhesión a la membrana plasmática especialmente por las LDL que se asocian con la membrana del espermatozoide y proveen protección para estabilizar la membrana. Estas diferencias químicas pueden explicar las diferencias en la motilidad y la integridad de los espermatozoides congelados-descongelados cuando se congela con dilutores que contienen diferentes yemas de huevo (Bathgate et al., 2006); el fosfolípido, colesterol y contenido de lipoproteínas de baja densidad de yema de huevo de gallina específicamente han sido identificados como los componentes protectores (Pace y Graham, 1974). Así también, las membranas del espermatozoide ovino poseen menor cantidad de moléculas de colesterol que otras especies, de allí que es más propenso a sufrir capacitación espermática prematura (Davis, 1981). Estas diferencias en la composición de la membrana y los componentes de diferentes yemas de huevo pueden culminar en interacciones específicas de especie (Moreno et al., 2008).

Comparado con estudios similares, la ligera inferioridad mostrada por Kulaksiz, et al. (2010) 50.0% y 33.0% de viabilidad espermática con yema de huevo de gallina y yema de huevo de codorniz respectivamente, esta ligera diferencia probablemente se deba al tiempo de congelación y además

que lo realizaron en época no reproductiva motivo por el cual el porcentaje es menor. Del mismo modo, Pérez (2010) 54.65% de vitalidad controlando la temperatura de congelación y 45.00% de vitalidad sin control, utilizando también Tris – yema de huevo de gallina criolla, se puede deber a que se congelo con un dilutor que tenían otras concentraciones y tal vez a un mejor manejo de las muestras ya que se trabajaron en condiciones similares. Guerrero *et al.* (2009) consigue 34.4% de espermatozoides vivos, podemos indicar que el mencionado autor realizó la congelación con dilutores hipertónicos (Tris - Trealosa) que posiblemente hayan deshidratado en mayor magnitud los espermatozoides por lo que produjeron un mayor shock osmótico durante la congelación y descongelación de la pajilla; esta distinta composición estaría influyendo a más de que utilizó un 10% de yema de huevo, usó pajillas de 0.5 mL que a diferencia de las de 0.25 mL permiten una congelación más homogénea por el menor volumen (Nöthling y Shutteleworth, 2005) de la misma manera los ingredientes que se encuentran en el diluyente no son suficientes para proporcionar un adecuado aporte nutricional y de protección al espermatozoide durante la congelación (Mathur et al. 1993).

Kulaksiz, et al. (2010) demostró que la yema de huevo de perdiz tiene el mejor efecto crioprotector en semen de ovino en términos de motilidad, viabilidad, anormalidad acrosómica e integridad de membrana (54%, 59%, 31.6% y 57.0 respectivamente) entre seis yemas de huevo evaluados en los dilutores. En el presente trabajo, la yema de huevo de perdiz no se ha estudiado, pero se dice que los constituyentes de la yema de huevo de perdiz y yema de huevo de paloma son similares (Bair y Marion, 1978). Sin

embargo, en la presente investigación, la yema de huevo de paloma dio un bajo resultado en comparación con las demás yemas de huevo referente a motilidad, integridad de membrana y vitalidad a la descongelación pudiendo deberse al inconveniente expuesto anteriormente.

Gonzalez, et al. (2004) indica que el efecto de algunos aditivos sobre las membranas de las células espermáticas parece estar ligado a la constitución del diluyente, particularmente a la presencia de lecitina aportada por la yema de huevo.

INTEGRIDAD DE ACROSOMA

Los porcentajes de integridad acrosomica a la descongelación fueron de 61.59% para T1, 65.27% para T2, 64.64% para T3 y 62.53% para T4. Se puede observar que las cuatro yemas estarían brindando similar protección a la membrana espermática y acrosomal de los espermatozoides contra el choque térmico y las alteraciones promovidas por el proceso de crioconservación.

El porcentaje para T1 es mayor comparado con lo reportado por Vargas (2015) 24.33% de integridad acrosomica utilizando como dilutor Tris – yema de huevo de gallina criolla, esta diferencia se debe a que el mencionado autor solo tomó en cuenta los espermatozoides vivos con acrosoma intacto y en el presente trabajo se consideró vivos y muertos.

Los porcentaje para T2 y T3 son ligeramente superiores a lo reportado por Kulaksiz, et al. (2010) quien obtuvo 47.4% y 43.2% de anomalía acrosomica con yema de huevo de gallina y yema de huevo de codorniz

respectivamente; esta ligera superioridad puede deberse al efecto de mayor tiempo de exposición de las pajillas al vapor de NL (Bucak *et al.*, 2007; Bucak *et al.*, 2009) porque a mayor tiempo de exposición al vapor de NL causa una mayor deshidratación de los espermatozoides por lo tanto un mayor shock osmótico (Perez, 2010).

Sin embargo hay trabajos que reportan datos superiores al presente trabajo como lo reportado por Sandoval *et al.* (2007) 63.12% de espermatozoides con acrosoma intacto, quienes agregaron agentes antioxidantes (trehalosa) para poder controlar el aumento de ROS, la ventaja de la trehalosa con respecto a otros criopreservantes se sustenta en la base del efecto protector estabilizante de la membrana celular al interactuar con los fosfolípidos, lo cual se refleja en la integridad acrosomal; además tiene un efecto deshidratante por ser un medio hipertónico, resultando en una menor formación de cristales dentro del espermatozoide permitiendo preservar áreas específicas de la membrana, del citoesqueleto y del sistema motriz (Chen *et al.*, 1993; Aisen *et al.*, 2000).

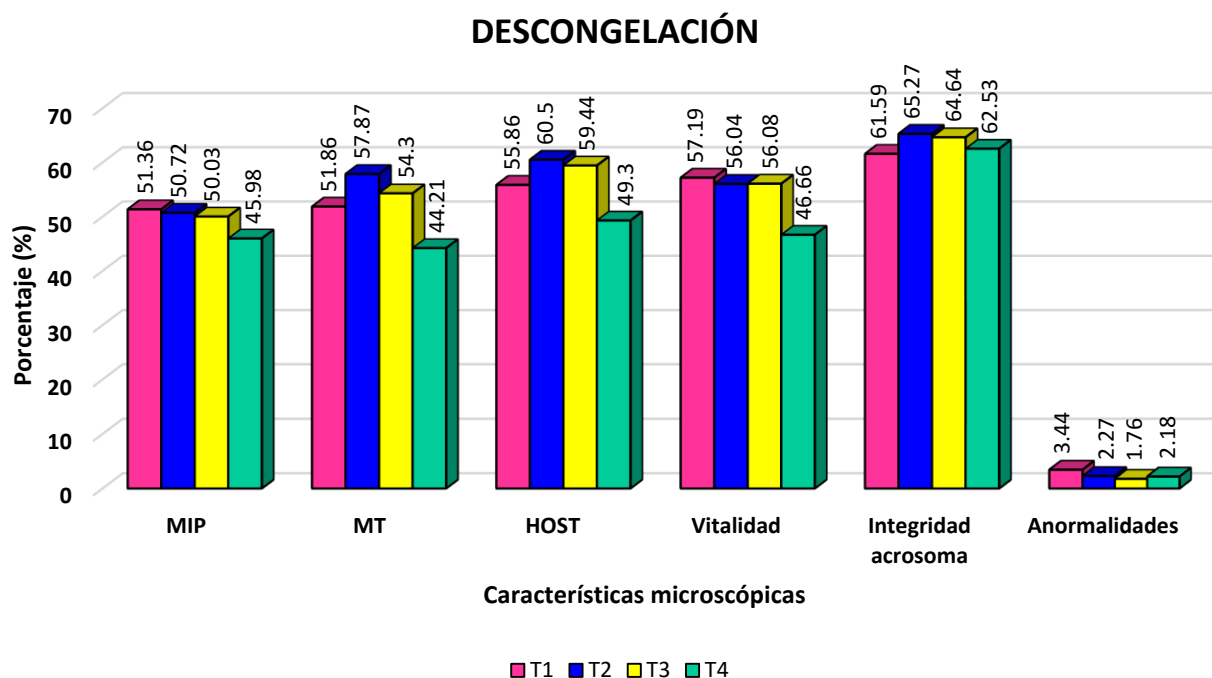
Valencia *et al.* (1994) reporta un daño acrosomal de 10.4% (descongelado a 37°C/15 segundos) y 10.0% (descongelado a 55°C/8 segundos) esta ligera superioridad se puede deber al tiempo de descongelación como también a los aditamentos de su dilutor. Diferentes autores mencionan que a medida que se aumenta la temperatura de descongelación, aumenta el porcentaje de movilidad espermática y disminuye el número de espermatozoides con daño acrosomal (López, 1992).

Finalmente, comparado con lo reportado por Ruiz *et al.* (2007) que obtuvo 22.69%, podemos indicar que el mencionado autor utilizó un tipo de antioxidante Tempol en una concentración de 2.5nM, esta diferencia puede deberse a la alta concentración de este tipo de antioxidante lo cual disminuiría la motilidad, viabilidad y el acrosoma del espermatozoide a la descongelación. Así mismo en el mismo estudio existe una marcada superioridad que fue de 68.86% de espermatozoides con el acrosoma intacto, utilizando otro tipo de antioxidante Tempo en una menor concentración 0.5mM que actuaría inhibiendo el daño oxidativo.

Su *et al.* (2007) realizaron un estudio comparando la acción protectora de la yema de huevo de cinco especies de aves (gallina doméstica, pato doméstico, codorniz japonesa y paloma doméstica) añadida al criopreservante en el semen de toro demostrando que la yema de huevo de paloma proporciona los mejores efectos crioprotectores sobre la crioconservación.

En el gráfico 3, se muestra la comparación de los cuatro tratamientos: T1 (Tris + Yema de Huevo de gallina Criolla), T2 (Tris + Yema de Huevo de gallina de Granja), T3 (Tris + Yema de Huevo de Codorniz), T4 (Tris + Yema de Huevo de Paloma) en cuanto a MIP, MT, TH, Vitalidad, Integridad de acrosoma y anomalías, observándose mayor porcentaje de MIP para T1 (51.36 %), mayor MT para T2 (57.87 %), ligera ventaja de TH para T2 (60.5 %), de igual manera ligera ventaja de vitalidad para T1 (57.19 %), finalmente ligera ventaja de integridad de acrosoma para T2 (65.27 %).

Gráfico 3: Porcentaje general de TH, vitalidad y anormalidad espermática de semen diluido con los cuatro tratamientos a la descongelación.



4.2. FERTILIDAD

Con los resultados obtenidos anteriormente se pudo observar que hubo diferencia estadística significativa entre las diferentes yemas de huevo, pero también se pudo observar que no hubo diferencia entre los dilutores con yema de huevo de gallina criolla, gallina de granja y codorniz por lo que se procedió a inseminar las borregas Corriedale con semen congelado utilizando el dilutor Tris – Yema de huevo de gallina criolla (T1) porque tuvo una ligera ventaja en cuanto a MIP (51.36%) y vitalidad (57.19%) que según Boretto et al. (2002) la variabilidad de la eficiencia reproductiva puede ser explicado por esos valores.

El resultado obtenido en el presente estudio fue de 45.54% de fertilidad; resultados inferiores fueron encontrados por Perez et al. 2011b quienes obtuvieron 44% de gestación en ovejas criollas con la primera inseminación por método cervical utilizando, esta diferencia puede deberse al tipo de dilutor que usaron ya que estuvo compuesto a base de leche en polvo descremada, 10% de yema de huevo, 224 mM de fructosa y glicerol (14% v/v), quizá el porcentaje de glicerol estaría afectando a los espermatozoides. Quispe (2013) obtuvo 31.2% de fertilidad en borregas Corriedale (entre primerizas y adultas) realizando inseminación vía cervical utilizando dilutor comercial (Ovine Freezing Buffer).

González et al. (2010) realizaron una investigación sobre la influencia de la profundidad de deposición del semen sobre la fertilidad de la inseminación transcervical en cabras donde obtuvieron 26.63% de fertilidad inseminando a una profundidad < 0.5 cm del cuello uterino y 52.32 % de fertilidad inseminando a una profundidad > 0.5 < 1.5 cm del cuello uterino por lo que indica que existe una relación positiva entre la fertilidad y la profundidad de inseminación para semen congelado, esta diferencia puede deberse a que las inseminaciones realizadas en las cabras lo realizaron sincronizando celo con esponjas Chronogest®.

V. CONCLUSIONES

- Durante la colección, los cuatro tratamientos mostraron ser similares en cuanto a vitalidad e integridad de membrana.
- Durante los 5°C, los cuatro tratamientos se comportaron de forma similar para TH; pero si hubo diferencia estadística en cuanto al porcentaje de vitalidad siendo menor el T4 (tris-yema de huevo de paloma).
- A la descongelación no se encontró diferencia estadística para los diferentes tratamientos en cuanto a MIP, MT e integridad de acrosoma pero si se encontró diferencia estadística para vitalidad y TH mostrando una menor respuesta el Tratamiento 4 (tris-yema de huevo de paloma).
- La mejor respuesta de vitalidad y TH se observó utilizando Tris – yema de huevo de gallina criolla (T1) obteniendo 57.19% y 55.86% respectivamente comparado con Tris – yema de huevo de paloma (T4) que obtuvo 46.66% y 49.30% respectivamente.
- Se obtuvo un 45.54% de fertilidad en ovinos Corriedale utilizando el dilutor Tris – Yema de huevo de gallina criolla.

VI. RECOMENDACIONES

Se recomienda utilizar dilutor Tris con yema de huevo de gallina criolla o gallina de granja o codorniz para congelar semen de carnero, ya que mostraron tener similar efecto.

Se recomienda realizar trabajos similares, pero mejorando la técnica para la obtención de yema de huevo de paloma, ya que por antecedentes mencionados la yema de huevo de paloma ofrece mejor protección para la criopreservación de semen congelado.

VII. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- Aboagla, E. y T. Terada. 2004. Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. *Theriogenology*. 62(6): 1160-1172.
- Aisen, E., H. Alvarez, A. Venturino and J. Garde. 2000. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology* 53: 1053-1061.
- Aisen, E., V. Medina and A. Venturino. 2002. Cryopreservation and post – thawed fertility of ram frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology* 57: 1801 – 1808.
- Aisen, E. 2004. *Reproducción Ovina y Caprina*. Editorial Inter-Médica. Argentina.
- Aisen, E., M. Quintana, V. Medina, H. Morello and A. Venturino. 2005. Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. *Cryobiology*. 50: 239 – 249.
- Aitken, R. 1994. A free radical theory of male infertility. *Reprod Fert. Dev.* 6:19-24.
- Alencastre, R. 1997. *Producción de ovinos*. Talleres gráficos de A & R Panamericana E.I.R.L.
- Alvarez, J. y B. Storey. 1989. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by lipid peroxidation. *Gamete Res.* 23:77-90.
- Amirat, L., D. Tainturier, L. Jeanneau, C. Thorin, O. Gerad, J. Courtens, and M. Anton. 2004. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk

- LDL: a comparison with optidyl, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology* 61,895-907.
- Bathgate, R., W. Maxwell, and G. Evans. 2006. Studies on the effect of supplementing boar semen cryopreservation media with different avian egg yolk types on in vitro post-thaw sperm quality. *Reprod. Domest. Anim.*
- Boretto, J., A. Gibbons, M. Bunge, M. Cueto y F. Bidinost. 2002. Calidad seminal post descongelamiento en relación con la eficiencia reproductiva de la inseminación artificial laparoscópica en ovinos. *Revista de Medicina Veterinaria*, Vol 83(4):185-188.
- Borque, M. y A. Saguez. 1992. Variaciones estacionales de los niveles de fructosa, ácido cítrico y proteínas totales en eyaculados de moruecos de raza Manchega. *Investi Agr Prod Sanid Anim.* 7(3): 235-240.
- Bucak, M., A. Atessahin, O. Varish, A. Yuce, N. Tekin, A. Akcay. 2007. The influence of treholose, taurine, cysteamine and hyarulonan on ram semen microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. *Theriogenology.* 67: 1060-1067.
- Bucak, M., P. Tuncer, S. Sariözkan, P. Ulutaş. 2009. Comparison of the effects of glutamine and an amino acid solution on post-thawed ram sperm parameters, lipid peroxidation and anti-oxidant activities. *Small Ruminant Research.* 81: 13-17.
- Busch, W. y D. Waberski. 2007. *Manual de inseminación artificial de los animales domésticos y de explotación zootécnica.* Editorial Acribia. España.
- Cabrera, P., A. Ayulo y C. Pantoja. 2011. Efecto del dilutor tris y citrato con yema de huevo de codorniz sobre la viabilidad espermática en semen de ovino congelado en pajillas. *Rev Inv Vet Perú;* 22(2): 105-113.

- Cabrera, P., J. Orellana y C. Pantoja. 2010. Efecto de dos dilutores sobre la motilidad e integridad de la membrana espermática en semen congelado de ovinos. *Rev Inv Vet Perú*; 21(2): 154-160.
- Cabrera, P. y C. Pantoja. 2008. Influencia de los dilutores tris y ovine freezing sobre la integridad de la membrana citoplasmática durante la congelación de semen de ovinos en pajilla de 0.5 mL. *Rev Inv Vet Perú*. 19 (2): 152-159.
- Campana, V. 1982. Evaluación de semen de carneros corriedale de majada general del centro experimental de Chuquibambilla. Tesis para optar el título de Médico Veterinario y Zootecnista. Perú. Universidad Técnica de Altiplano. p. 19-25.
- Chen, Y., R. Foote, C. Tobback, L. Zhang, S. Hough. 1993. Survival of bull spermatozoa seeded and frozen at different rates in egg yolk-tris and whole milk extenders. *Journal Dairy Science*. 76:1028-1034.
- Clarence, M. 1993. El manual de Merck de veterinaria. 4ta Edición. Ediciones Océano S.A. Colombia.
- Colas G. 1975. Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep-frozen ram semen. *J Reprod Fertil* 42:277-285.
- Cueto, M., A. Gibbons, J. Garcia, M. Wolff y J. Arrigo. 2004. Obtención, procesamiento y conservación del semen ovino. Argentina Bariloche. Reproducción y genética. Instituto nacional de tecnología agropecuaria (INTA).
- Da Silva, M., S. Dimas, H. Costa, C. Cecilia, D. Bartoli, L. Rodello. 2009. Motility and viability of ram sperm cryopreserved in a Tris – egg yolk extender supplemented with anti – oxidants. *Small Ruminant Research*. 85: 85-90.

- Davis B. 1981. Timing of fertilization in mammals: Sperm cholesterol/phospholipid ratio as a determinant of the capacitation interval. *Cell Biol* 78: 7560-7564.
- De Abreu, R., W. Berndtson, R. Smith and B. Pickett. 1979. Effect of postthaw warming on viability of bovine spermatozoa thawed at different rates in French straws. *J Dairy Sci* 62:1449-1454.
- Del Campo A. 1980. Anatomía y fisiología de la Reproducción e inseminación Artificial en Ovinos. Editorial Agropecuaria Hemisferio Sur S.R.L. Uruguay.
- Delgado, B. 2013. Evaluación espermática de semen de ovino tratado por la técnica de gradiente de densidad. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Ricardo Palma. Lima-Perú.
- Derivaux J. 1982. Fisiología de la Reproducción de los Animales Domésticos. 2da Ed. Editorial Madrid-España.
- Días, P. y J. Valencia. 2008. Inseminación artificial. Citado por Galina, C.; Valencia, J. 2008. Reproducción de los animales domésticos. 3ed. México. Limusa. p. 219-234.
- Evans, G. y W. Maxwell. 1990. Inseminación artificial de ovejas y cabras. España. Acribia. p. 128-132.
- Evans, G.; y W., Maxwell. 1987. Salomon's artificial insemination in sheep and goats. Butterworths Pty Ltd. Sydney. 189 pp.
- Fernández, J., B. Barrios, J. Martí, T. Muiño, P. Cebrián. 2000. Perdida de proteínas de membrana de espermatozoides ovinos debida a la congelación. Zaragoza, España. Reproducción. p. 123-125.

- Fiser, P., and R. Fairfull. 1986. The effect of rapid cooling (cold shock) of ram semen, photoperiod, and egg yolk in diluents on the survival of spermatozoa before and after freezing. *Criobiology* 23: 518-524.
- Flores, O. y J. Tron, Fortalecimiento del sistema producto ovinos. Reproducción.
- Galina, C. y J. Valencia. 2008. Reproducción de animales domésticos. 3° Edición. Editorial Limusa, S.A. México.
- Gao, G., E. Ashworth, P. Watson, F. Kleinhans, P. Mazur, J. Crister. 1993. Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: separate effects of glycerol, sodium chloride and sucrose on spermolysis. *Biology Reproduction*. 49: 112-123.
- Gao, D., J. Crister. 2000. Mechanisms of cryoinjury in living cells. *ILAR J.* 41:187-96.
- García, R., V. Domínguez, A. Gonzales, A. Veiga y M. Cocero. 1992. Efecto de la concentración de sacarosa sobre la supervivencia post-descongelación de embriones ovinos en distintos estadios del desarrollo preimplantacional. *ITEA* 24: 229-281.
- Garde, J., C. Artiga, A. Gutierrez y I. Vasquez. 1992. Triple tinción para valorar acrosomas normales y viabilidad espermática en semen ovino. *Med. Vet.* 9:107-114.
- Garner, D. and E. Hafez. 2000. Spermatozoa and Seminal Plasma. *Reproduction in farm animals*. 7th edition. Lippincott Williams & Wilkins Company, Philadelphia, pp 96-109.
- Garner, D. and E. Hafez. 1993. Spermatozoa and seminal plasma. En: *Reproduction in Farm Animals*, 6th edition. Hafez ESE (ed). Lea and Febiger. (Philadelphia. USA).165-187.

- Gatti, J., S. Castella, F. Dacheux, H. Ecroyd, S. Métayer, V. Thimon and J. Dacheux. 2004. Post-testicular sperm environment and fertility. *Animal of Reproduction Science.*, 82: 321-39.
- Gibbons, A. y Cueto, M. Manual de inseminación artificial en la especie ovina. INTA. Bariloche.
- Gonzalez, R., M. Rosales, F. Perea, J. Velarde, E. Soto, R. Palomares, H. Hernandez, and A. Palasz. 2004. Conception rates using Brahman bull semen frozen in milk based extender containing egg yolk or soybean lipids: a field study in a tropical environment. *Reprod. Fertil. Develop.* 16(1-2):170-171.
- González, M., I. Pernía, C. Cepedano, L. De La Fuente, E. Anel, M. Álvarez, P. De Paz y L. Anel. 2010. Influencia de la profundidad de deposición del semen sobre la fertilidad de la inseminación transcervical en cabras. XXXV Congreso de la SEOC – Valladolid.
- Graham, J. and R. Foote. 1987. Effect of several lipids, fatty acyl chain length and degree of unsaturation on the motility of bull. *Cryobiol.* 24: 42-52.
- Guerrero, H., W. Huanca, F. Raymundo, S. Huerta, D. Ramos. 2009. Uso de dilutores hipertónicos en la criopreservación de semen ovino. *Rev Inv Vet Perú.* 20(1): 41-46.
- Hafez, E. y B. Hafez, 2000. Reproducción e inseminación Artificial en Animales. 7ed. Mexico. McGraw Hill. 378p.
- Hellemann, C. y C. Jara. 1997. Efecto de un surfactante sobre la integridad de espermatozoides ovinos crioconservados. *Arch. Med. Vet.* 29(1): 153-160.
- Hernández, P., R. Fernández, S. Rodríguez, R. Juárez, M. Soto y R. García. 2012. Efecto de la criopreservación de semen de ovino en relación a su

- viabilidad y estado acrosomal. Rev. Salud Anim. Vol. 34 No. 2, p. 78.83. México.
- Holt, W. 2000. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology* 53, 47-58.
- Huamaní, H. 2011. Efecto de la temperatura de empajillado y raza en la motilidad individual e integridad de membrana en semen congelado de carnero. Tesis para optar el título de Médico Veterinario y Zootecnista. Puno – Perú. Universidad Nacional de Altiplano.
- Illera, M. 1994. Reproducción de los animales domésticos. España. Editorial Aedos. p. 121-122.
- INEI, 2013. Resultados Definitivos. IV Censo Nacional Agropecuario 2012. Lima-Perú.
- Jeyendran, R., H. Van der Venn, L. Zaneveled. 1992. The hipoosmotic swelling test: an update. *Ach. Androl.* 29: 105-116.
- Jeyendran, R.S., H. Van der Ven, M. Perez-Pelaez, B. Crabo, L. Zaneveld. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Fertil.* 70, 219–228.
- Jones, R., T. Mann and R. Sherins. 1979. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa and protective action of seminal plasma. *Fertile Steril* 31:531-537.
- Joshi, A., S. Bag, S. Naqvi, R. Sharma, P. Rawat, J. Mittal. 2001. Effect of short-term and long-term preservation motion characteristics of Garole ram spermatozoa: a prolific microsheep breed of India. *Asian Aust. J. Anim. Sci.* 14: 1527-1533.

- Kulaksiz, R., C. Cebi, E. Akcay, A. Daskin. 2010. The protective effect of egg yolk from different avian species during the cryopreservation of Karayaka rams semen. *Small Ruminant Research*. 88: 12 – 15.
- López, J. 1992. Congelación de semen en la especie ovina: Características biológicas de las dosis descongeladas. Para optar el grado de Doctor en Veterinaria. España. Universidad Complutense de Madrid Facultad de Veterinaria. p. 7 – 11.
- López, J., A. Urbano y M. Cárdenas. 2012. Manual de laboratorio para el análisis del semen.
- Mamani, D. 2010. Efecto del uso de dos crioprotectores (etilinglicol y glicerol) y el envasado en pajillas de 0.25 mL, 0.5 mL y pellet sobre las características de motilidad e integridad de membrana del espermatozoide en semen de carneros. Tesis para optar el título de Médico Veterinario y Zootecnista. Puno – Perú. Universidad Nacional de Altiplano.
- Manazza, J. 2007. Diagnóstico de Preñez en Ovinos. Disponible en www.producción-animal.com.ar
- Mansano, M., C. Scott, D. Souza, T. Torre, H. Vallejo y F. Ferreira. 2014. Viabilidad de espermatozoides ovinos mantenidos a 5° y 15° C en diferentes sistemas de refrigeración. *R. bras. Ci. Vet.*, v. 21, n. 2, p. 122-126. Brasil.
- Matousek, J. 1985. Biological and immunological roles of proteins in the sperm of domestic animals. *Anim Reprod Sci.*, 8: 1–40.
- Mathur, A., R. Srivastava and P. Rawat. 1993. Effect of larger volumes frozen on round and flat glass surfaces on cryosurvival of ram spermatozoa. *Indian J. Anim. Sci.* 63:427-429.

- Maxwell, W. y S. Salamon. 1993. Liquid Storage of Ram: a review. *Reprod. Fertil. Dev.* 5:613-638.
- Meara, C., J. Hanrahan, N. Prathalingam, J. Owen, A. Donovan, S. Fair, F. Ward, M. Wade, A. Evans, P. Lonergan. 2008. Relationship between in vitro sperm functional an in vivo fertility of rams fologing cervical artificial insemination of ewes with frozen-tawed semen. *Theriogenology*. 69: 513-522.
- Mellisho, E. 2007. *Manual de inseminación artificial en Ganado ovino*. 1ed. Peru.
- Moreno, J., M. Coloma, A. Diaz, A. Brunet, A. Pastor, A. Soria, J. Carrizosa, B. Urritia, A. Sebastian. 2008. A comparision of the protective action of chicken and quail egg yolk in the cryopreservation of Spanish ibex epididymal spermatozoa. *Cryobiology* 57, 25–29.
- Moustacas, V., F. Zaffalon, M. Lagares, A. Loaiza-Eccheverri, F. Varago, M. Neves, L. Heneine, R. Arruda, M. Henry. 2011. Natural, but not lyophilized, low density lypoproteins were an acceptable alternative to egg yolk for cryopreservation of ram seme. *Theiogenology*. 75: 300-307.
- Mylne, M., J. Hunton and B. Buckrell. 1997. *Ovine Theriogenology*. Citado por Youngquist, R. 1997. *Current therapy in large animal theriogenology*. United states of America. Saunder company. p. 569-650
- Nahas, G. 1961. Introductory remarks. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 92:337.
- Pace, M. y E. Graham. 1974. The components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. *J. Anim. Sci.* 39, 1144–1149.
- Palma, G. 2008. *Biotecnología de la reproducción*. 2ed. Argentina. Producción gráfica integral.

- Parks, J. 1997. Hypothermian and mammalian gametes. En: "Reproductive tissue banking: scientific principles." Eds: Karow, A.M. y Critser, J.K. Academic Press, San Diego, EEUU. Pp: 229-261.
- Pérez, U. 2010. Efecto de tres temperaturas de congelación de pajillas de semen de carnero en la viabilidad espermática. Tesis de Maestría. Facultad de Zootecnia de la Universidad Agraria la Molina. Lima-Perú.
- Perez, U., M. Perez y E. Mellisho. 2011a. Viabilidad espermática en semen de carnero congelado por dos métodos. *Spermova*. 1(1):127-128.
- Perez, M., T. Quispe, J. Malaga, Y. Quispe y U. Perez. 2011b. Inseminación artificial con semen congelado en ovejas por vía vaginal y cervical en el altiplano Peruano. *Spermova*. 1(1):121-122.
- Poulos, A., A. Darrin y I. White. 1973. The phospholipidbound fatty acids and aldehydes of mammalian spermatozoa. *Comp. Biochem. Physiol.* 46, 41–549.
- Quinn, P., P. Chow and I. White. 1980. Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at plasma membrane site. *J Reprod Fertil.* 60:403-407.
- Quispe, F. 2011. Manual de inseminación artificial en ovinos. FMVZ.UNAP. Perú.
- Quispe, F. 2013. Fertilidad con semen refrigerado y congelado mediante inseminación cervical en ovinos Corriedale. *Spermova* 3(1): 57-58.
- Ricker, J., J. Linfor, W. Delfino, P. Kysar, E. Scholtz, F. Tablin, J. Crowe, B. Ball, S. Meyers. 2006. Equine sperm membrane phase behavior: The effects of lipid-based cryoprotectants. *Biology Reproduction.* 74:359-365.

- Ruiz, L. 2005. Efecto de dos antioxidantes (Tempo y Tempol) en la criopreservación de semen de ovino empleando un dilutor en base a tris. Tesis de pregrado. Facultad de medicina Veterinaria. UNMSM. Lima. Perú.
- Ruiz, L., A. Santiani, R. Sandoval, W. Huanca, A. Delgado, L. Coronado, y C. Alzamora. 2007. Efecto de dos antioxidantes (Tempo y Tempol) en la criopreservación de semen de ovino empleando un dilutor en base a tris. *Rev Inv Vet Perú*; 18(2): 99-106.
- Salamon, S. y W. Maxwell. 1995. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science*. 37, 185-249.
- Salamon, S. y W. Maxwell. 2000. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci* 2000; 62:77-111.
- Sales, F. 2002. Diagnóstico de gestación por ultrasonografía en producción ovina. Informativo INIA KAMPENAIKE. Chile.
- Sales, F. 2005. Ultrasonografía en ovinos: optimizando el uso de las praderas. *Boletín INIA N° 132*.
- Sandoval, R. 2005. Criopreservación de semen ovino empleando diferentes dilutores y combinaciones de agentes crioprotectores permeantes y no permeantes. Tesis de pregrado. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad Mayor De San Marcos. Lima-Perú.
- Sandoval, R., A. Santiani, L. Ruiz, V. Leyva, L. Coronado y A. Delgado. 2007. Criopreservación de semen de ovino empleando tres dilutores y cuatro combinaciones de agentes crioprotectores permeantes y no permeantes. *Rev Inv Vet Perú* 18 (2): 107-114.

- Santiani, A., F. Ruiz, R. Sandoval, S. Evangelista, M. Urviola, N. Catacora, L. Coronado y A. Delgado. 2007. Incremento de la tasa de no retorno de celo en ovejas utilizando una antioxidante análogo de superóxido dismutasa (Tempo) durante la criopreservación de semen. APPA – ALPA – Cusco, Perú.
- Santiani, A. 2003. Criopreservación de semen ovino: efecto de la adición de antioxidantes al diluyente. Tesis para obtener el grado de Magister en Ciencias mención en Biología de la Reproducción. Temuco-Chile. Universidad de la Frontera. p. 27-30.
- Senamhi. 2014. Estación meteorológica del Centro de Investigación y Producción Chuquibambilla. UNA- Puno.
- Sepúlveda, N. y R. Mansilla. 1995. Relación entre niveles de testosterona y circunferencia escrotal en carnerillos Romney Marsh. XX Reunión Anual de la sociedad Chilena de Producción Animal. Coquimbo, Chile.
- Sepúlveda, N. 2012. Inseminación artificial en ovinos. XVI Congreso Venezolano de Producción e Industria Animal. VI Congreso Internacional de Ganadería de Doble Propósito.
- Sotomayor, J. 2001. Efectividad de cinco métodos de diagnóstico de gestación en ovinos Corriedale del CIP-Chuquibambilla. Tesis para optar el título de Médico Veterinario y Zootecnista. Puno – Perú. Universidad Nacional de Altiplano.
- Stornelli, M., C. Tittarelli, C. Savignone y A. Stornelli. 2005. Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. *Analactea Veterinaria*. 25: 28-35.

- Strzezek, J. 2002. Secretary activity of boar seminal vesicle glands. *Biology of Reproduction*, 2:243-66.
- Su, L., X. Li, J. Quan, S. Yang, Y. Li, X. He y X. Tang. 2008. A comparison of the protective action of added egg yolks from five avian species to the cryopreservation of bull sperm. *Animal Reproduction Science* 104: 212-219.
- Tamuli, M. and P. Watson. 1992. Effects of temperature of incubation on the development of resistance to cold stress in boar spermatozoa incubated for up 24 hours. *Proc 12th ICAR Congress*. The Hague: ICAR. p 1484-1486.
- Tribulo, H. 2009. Curso de congelado de semen bovino. Argentina. Instituto de Reproducción Animal Córdoba IRAC. Guía práctica. P 31-33.
- Trimeche, A., M. Anton, P. Renard, G. Gandemer and D. Tainturier. 1997. Quail egg yolk: a novel cryoprotectant for the freeze preservation of Pitou jackass sperm. *Cryobiology*: 34(4):385-393.
- Troedsson, M.H.T., A. Desvousges, A. Alghamdi, B. Dahms, C. Dow, J. Hayna, R. Valesco, P. Collahan, M. Macpherson, M. Pozor and M. Buhi. 2005. Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. *Anim Reprod Sci.*, 89: 171–186.
- Valencia, J., G. González, M. González y A. Trejo. 1994. Motilidad y daño acrosomal del semen caprino congelado en pajillas de 0.25 ml y 0.5ml y descongelado a dos diferentes ritmos de temperatura. *Vet. Méx*, 25(2).
- Vargas, P. 2015. Efecto del factor dilutor y raza en la integridad de la membrana espermática y acrosomal en semen crioconservado de carneros. Tesis para optar el título de Médico Veterinario y Zootecnista. Puno – Perú. Universidad Nacional de Altiplano.

- Villemure, M., C. Lazure and P. Manjunath. 2003. Isolation and characterization of gelatin-binding proteins from goat seminal plasma. *Reprod Biol Endocrinol.*, 1: 39–48.
- Vishwanath, R. y P. Shannon. 2000. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Animal Reproduction Science.* 62:23-53.
- Watson, P. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Repro. Sci.* 61, 481-492.
- Watson, P. 1990. Artificial insemination and the preservation of semen. En: "Marshall's physiology of reproduction. 4th edition. Vol. 2: Reproduction in the male". Ed: Lamming, G.E. Churchill Livingstone, New York, EEUU. pp: 747-869.
- Watson, P. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev.* 7: 781-791.
- Watson, P. 1981. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 °C by egg yolk lipoprotein. *J Reprod Sci* 37: 156-157.
- World Health Organization, 2010. WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen FIFTH EDITION. Cambridge University Press, Cambridge.
- Yeste, M. 2016. Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. *theriogenology.* 85: 47-64.
- Yturri, L. 2014. Efecto de tres dilutores y tiempos de refrigeración sobre la fertilidad de borregas inseminadas por vía transvaginal. Tesis para optar el título de Médico Veterinario y Zootecnista. Puno – Perú. Universidad Nacional de Altiplano.

Zemjanis R. 1990. Reproducción Animal Diagnostico y Técnicas Terapéuticas.

1ra Ed. Editorial Limusa. México.

ANEXO

PANEL FOTOGRÁFICO



Foto 1: Colección de semen con vagina artificial



Foto 2: Filtración del dilutor Tris – yema de huevo para la dilución de semen



Foto 3: Extracción de la pajilla del tanque criogénico



Foto 4: Inseminación Artificial vía cervical



Foto 5: Diagnostico de gestación 35 días post inseminación artificial

CARACTERÍSTICAS GENERALES A LA COLECCIÓN DE SEMEN

Tabla 4: Características seminales de los carneros a la colección.

Carneros	Características del semen	Volumen (ml) ($P \leq 0.05$)	Motilidad masal (Puntaje) ($P \geq 0.05$)	Concentración (millones) ($P \geq 0.05$)
	Frecuencia.	Prom. \pm D.S.	Prom. \pm D.S.	Prom. \pm D.S.
C – 1 (Dohne Merino)	4	1.05 \pm 0.40 ^b	4.6 \pm 0.25	1767 \pm 985
C – 2 (Dohne Merino)	9	1.37 \pm 0.24 ^a	4.6 \pm 0.30	4109 \pm 1352
C – 3 (Merino)	9	1.39 \pm 0.18 ^a	4.9 \pm 0.17	3733 \pm 1002
C – 4 (Texel)	6	1.48 \pm 0.04 ^a	4.8 \pm 0.41	4833 \pm 1178

Tabla 5: Volumen a la colección por carnero.

VOLUMEN (mL)			
MD074 (C1)	DANIEL (C2)	M(BV) (C3)	T(BV) (C4)
1.30	1.30	1.50	1.50
1.40	1.30	1.40	1.40
0.50	1.40	1.20	1.50
1.00	1.00	1.50	1.50
	1.00	1.50	1.50
	1.70	1.50	1.50
	1.60	1.00	
	1.50	1.50	
	1.50	1.40	

Tabla 6: Motilidad masal a la colección por carnero.

MOTILIDAD MASAL			
MD074 (C1)	DANIEL (C2)	M(BV) (C3)	T(BV) (C4)
4.50	4.50	5.00	5.00
5.00	4.70	5.00	5.00
4.50	5.00	4.50	5.00
4.50	4.00	4.80	4.00
	4.50	5.00	5.00
	4.50	5.00	5.00
	5.00	5.00	
	4.50	5.00	
	5.00	5.00	

Tabla 7: Concentración a la colección por carnero.

CONCENTRACIÓN (x10⁶)			
MD074 (C1)	DANIEL (C2)	M(BV) (C3)	T(BV) (C4)
1120	6260	3800	5960
2900	3340	4220	3120
1280	4780	3040	4740
	3520	3280	6360
	3100	2220	4540
	2620	4020	4280
	4760	5760	
	5860	4180	
	2740	3080	

Tabla 8: Promedio general de volumen, motilidad masal y concentración a la colección.

	VOLUMEN	MOTILIDAD MASAL	CONCENTRACIÓN (10⁹)
1	1.3	4.5	6.26
2	1.3	4.7	3.34
3	1.4	5	4.78
4	1.6	5	4.76
5	1.5	4.5	5.86
6	1.5	5	2.74
7	1.0	4	3.52
8	1.0	4.5	3.10
9	1.7	4.5	2.62
10	1.0	4.5	1.28
11	1.3	4.5	1.12
12	1.4	5	2.90
13	0.5	4.5	3.28
14	1.2	4.5	3.04
15	1.5	4.8	2.20
16	1.5	5	2.22
17	1.5	5	3.80
18	1.4	5	4.22
19	1.5	5	4.02
20	1.0	5	5.76
21	1.5	5	4.18
22	1.4	5	3.08
23	1.5	4	6.36
24	1.5	5	5.96
25	1.4	5	3.12
26	1.5	5	4.74
27	1.5	5	4.54
28	1.5	5	4.28
PROMEDIO	1.35	4.77	3.82

Tabla 9: Datos generales de Motilidad masal, TH, vitalidad y anormalidades por carneros a la colección.

CARNEROS	TRATAMIENTO	TH	VITALIDAD	ANORMALIDADES
C1	T1	84.62	77.98	0.91
	T1		89.47	0.44
	T2	85.59	91.78	1.37
	T2	90.26	84.97	1.10
	T2	86.41	86.56	0.78
	T3	86.91	89.42	0.53
	T3		84.34	0.50
	T3	82.38	89.81	0.48
C2	T1	88.05	74.62	1.00
	T1		81.74	2.23
	T2	80.56	80.79	1.46
C3	T1	76.15	87.95	9.20
	T1	84.21	85.83	0.83
	T2	87.91	87.84	1.33
	T2	88.61	83.97	0.76
	T3		86.78	2.42
	T3		89.10	2.31
	T3	85.12	80.62	1.15
	T4	78.88	86.63	1.46
	T4	81.01	82.87	0.00
C4	T1	86.96	80.71	0.51
	T1	79.62	82.78	1.42
	T2		86.29	1.99
	T3	89.62	81.48	1.82
	T4	82.65	89.69	0.00
	T4	76.50	86.21	0.44

Tabla 10: ANVA del Test Hipo-osmótico para semen a la colección.

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	TH Media
0.405508	5.091389	4.281909	84.10100

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	8	137.5692	17.19615	0.94	0.5238
Error	11	201.68218	18.3347436		
Total correcto	19	339.25138			

Tabla 11: Contrastación de medias de la prueba de Duncan del Test Hipo-osmótico para dilutor (tratamientos)

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	11
Error de cuadrado medio	18.33474
Media armónica de tamaño de celdas	4.8

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.			
Duncan Agrupamiento	Media	n	Tratamiento
a	86.557	6	Tris-yema de huevo de gallina de granja
ab	86.008	4	Tris-yema de huevo de codorniz
ab	83.268	6	Tris-yema de huevo de gallina criolla
b	79.760	4	Tris-yema de huevo de paloma

Tabla 12: ANVA de vitalidad para semen a la colección.

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	Vitalidad Media
0.434424	4.410783	3.749556	85.00885

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	8	183.5822314	22.9477789	1.63	0.1882
Error	17	239.0058339	14.0591667		
Total correcto	25	422.5880654			

Tabla 13: Contrastación de medias de la prueba de Duncan de vitalidad para dilutor (tratamientos)

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	17
Error de cuadrado medio	14.05917
Media armónica de tamaño de celdas	6.054054

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.			
Duncan Agrupamiento	Media	n	Tratamiento
a	86.350	4	Tris-yema de huevo de paloma
a	86.029	7	Tris-yema de huevo de gallina de granja
a	85.936	7	Tris-yema de huevo de codorniz
a	82.635	8	Tris-yema de huevo de gallina criolla

Tabla 14: Datos generales de TH, vitalidad y anormalidades por carneros a 5°C.

5°C				
CARNEROS	TRATAMIENTO	TH	VITALIDAD	ANORMALIDADES
C1	T1	74.44	78.33	0.99
	T1	78.50	88.16	0.00
	T2	80.43		
	T2	82.93	78.07	1.40
	T2	79.14	79.23	1.08
	T3		84.51	4.70
	T3		78.43	0.00
	T3	83.33	81.07	0.48
C2	T1	80.43	83.54	2.96
	T1	72.81	74.65	0.00
	T2	71.53	76.33	2.31
	T4		60.20	7.98
C3	T1	82.05	78.13	9.22
	T1	77.83	86.70	0.91
	T2	72.59	85.02	0.69
	T2	86.11	85.03	2.09
	T2	76.71	87.05	0.80
	T3	83.01	83.43	1.00
	T3	72.54	77.72	1.52
	T3	73.68	79.82	0.87
	T4	69.88	84.92	1.49
C4	T1	82.59	83.04	1.16
	T2	82.59	83.04	1.16
	T3	77.96	79.04	1.72

Tabla 15: ANVA del Test Hipo-osmótico para semen a 5°C.

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	TH 5°C Media
0.357479	6.224320	4.864099	78.14667

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	8	157.96059	19.7450738	0.83	0.5901
Error	12	283.913476	23.6594564		
Total correcto	20	441.874067			

Tabla 16: Contrastación de medias de la prueba de Duncan del Test Hipo-osmótico a 5°C para dilutor (tratamientos)

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	12
Error de cuadrado medio	23.65946
Media armónica de tamaño de celdas	2.725061

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.			
Duncan Agrupamiento	Media	N	Tratamiento
a	79.004	8	Tris-yema de huevo de gallina de granja
a	78.379	7	Tris-yema de huevo de gallina criolla
a	78.104	5	Tris-yema de huevo de codorniz
a	69.880	1	Tris-yema de huevo de paloma

Tabla 17: ANVA de vitalidad para semen a 5°C.

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	Vitalidad Media
0.567709	5.937822	4.790170	80.67217

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	8	421.870738	52.7338423	2.3	0.0829
Error	14	321.240253	22.9457323		
Total correcto	22	743.110991			

Tabla 18: Contrastación de medias de la prueba de Duncan de vitalidad a 5°C para dilutor (tratamientos)

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	14
Error de cuadrado medio	22.94573
Media armónica de tamaño de celdas	4.307692

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.			
Duncan Agrupamiento	Media	N	Tratamiento
a	81.967	7	Tris-yema de huevo de gallina de granja
a	81.793	7	Tris-yema de huevo de gallina criolla
a	80.574	7	Tris-yema de huevo de codorniz
b	72.560	2	Tris-yema de huevo de paloma

Tabla 19: Datos generales de MIP, MT, TH, vitalidad, anormalidades e integridad de membrana por carneros a la descongelación.

DESCONGELACIÓN							
CARNERO	TRATAMIENTO	MIP	MT	TH	VITALIDAD	ANORMALIDADES	INTEGRIDAD DE ACROSOMA
C1	T1	54.70	50.88	59.64	63.73	1.55	63.81
	T1	57.14	55.00	53.85	60.00	1.49	65.16
	T1	51.52	54.30	58.08	55.45	0.99	71.89
	T2	43.08	49.62	54.82	45.31	2.00	53.91
	T2	55.29	55.17	59.93	60.08	3.48	58.30
	T2	33.73	41.75	55.26	50.43	2.16	51.33
	T3	52.94	50.47	62.69	54.76	0.94	70.31
	T3	50.41	55.96	57.41	53.43	3.43	57.14
	T3	48.57	53.31	62.69	56.75	1.38	61.47
C2	T1		34.58	50.00	47.76	2.90	50.91
	T2	50.60	64.62	61.45	55.00	4.00	51.46
	T4		30.72	50.75	22.22	5.03	38.42
C3	T1	61.50	61.98	64.34	62.77	16.28	53.73
	T1	45.00	50.82	59.72	64.57	2.26	77.62
	T2	60.00	68.52	66.82	54.13	1.80	73.02
	T2	60.00	66.67	66.80	62.41	0.95	77.54
	T2	53.02	63.21	65.69	61.97	1.84	78.95
	T3	49.65	60.15	64.80	60.19	3.14	67.13
	T3	48.57	51.61	54.76	58.82	0.39	73.31
	T3			61.90	59.09	1.36	70.64
	T4	50.00	61.47	59.86	64.75	1.42	74.77
	T4		35.11	38.71	53.49	0.92	75.00
C4	T1	56.35	59.77	52.38	57.63	1.50	56.28
	T1	33.33	47.53	48.91	45.60	0.52	53.29
	T2	50.00	53.37	53.20	58.96	1.92	77.64
	T4	41.96	54.65	56.20	49.83	2.42	74.15
	T4			59.52	49.52	1.67	52.47
	T4		39.10	40.97	43.01	1.10	50.20

Tabla 20: ANVA de motilidad individual progresiva para semen a la descongelación.

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	MIP Media
0.416667	14.43258	7.264576	50.33455

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	8	490.045746	61.255718	1.16	0.3893
Error	13	686.0628	52.774062		
Total correcto	21	1176.10855			

Tabla 21: Contrastación de medias de la prueba de Duncan de motilidad individual progresiva a la descongelación para dilutor (tratamientos)

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	13
Error de cuadrado medio	52.77406
Media armónica de tamaño de celdas	4.132841

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.			
Duncan Agrupamiento	Media	N	Tratamiento
a	51.363	7	Tris-yema de huevo de gallina criolla
a	50.715	8	Tris-yema de huevo de gallina de granja
a	50.028	5	Tris-yema de huevo de codorniz
a	45.980	2	Tris-yema de huevo de paloma

Tabla 22: ANVA de motilidad total para semen a la descongelación.

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	MT Media
0.565710	15.07357	7.944583	52.70538

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	8	1397.66944	174.70868	2.77	0.037
Error	17	1072.97881	63.1164		
Total correcto	25	2470.64825			

Tabla 23: Contrastación de medias de la prueba de Duncan de motilidad total a la descongelación para dilutor (tratamientos)

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	17
Error de cuadrado medio	63.1164
Media armónica de tamaño de celdas	6.153846

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.			
Duncan Agrupamiento	Media	N	Tratamiento
a	57.866	8	Tris-yema de huevo de gallina de granja
a	54.300	5	Tris-yema de huevo de codorniz
ab	51.858	8	Tris-yema de huevo de gallina criolla
b	44.210	5	Tris-yema de huevo de paloma

Tabla 24: ANVA del Test Hipo-osmótico para semen a la descongelación.

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	TH Media
0.587067	9.360272	5.326864	56.90929

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	8	766.485708	95.810713	3.38	0.014
Error	19	539.134078	28.375478		
Total correcto	27	1305.61979			

Tabla 25: Contrastación de medias de la prueba de Duncan Test Hipo-osmótico a la descongelación para dilutor (tratamientos)

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	19
Error de cuadrado medio	28.37548
Media armónica de tamaño de celdas	6.746988

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.			
Duncan Agrupamiento	Media	N	Tratamiento
a	60.496	8	Tris-yema de huevo de gallina de granja
a	59.440	7	Tris-yema de huevo de codorniz
a	55.865	8	Tris-yema de huevo de gallina criolla
b	49.298	5	Tris-yema de huevo de paloma

Tabla 26: ANVA de vitalidad para semen a la descongelación.

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	Vitalidad Media
0.591600	12.26840	6.711079	54.70214

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	8	1239.59736	154.94967	3.44	0.0129
Error	19	855.733115	45.038585		
Total correcto	27	2095.33047			

Tabla 27: Contrastación de medias de la prueba de Duncan de vitalidad a la descongelación para dilutor (tratamientos)

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	19
Error de cuadrado medio	45.03858
Media armónica de tamaño de celdas	6.746988

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.			
Duncan Agrupamiento	Media	N	Tratamiento
a	57.189	8	Tris-yema de huevo de gallina criolla
a	56.080	7	Tris-yema de huevo de codorniz
a	56.036	8	Tris-yema de huevo de gallina de granja
b	46.660	5	Tris-yema de huevo de paloma

Tabla 28: ANVA de integridad de acrosoma para semen a la descongelación.

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	Integridad de acrosoma Media
0.516646	14.56074	9.256210	63.56964

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	8	1739.99341	217.499176	2.54	0.0456
Error	19	1627.87109	85.677426		
Total correcto	27	3367.8645			

Tabla 29: Contrastación de medias de la prueba de Duncan de integridad de acrosoma a la descongelación para dilutor (tratamientos)

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	19
Error de cuadrado medio	85.67743
Media armónica de tamaño de celdas	6.746988

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.			
Duncan Agrupamiento	Media	N	Tratamiento
a	65.269	8	Tris-yema de huevo de gallina de granja
a	64.639	7	Tris-yema de huevo de codorniz
a	62.528	5	Tris-yema de huevo de paloma
a	61.586	8	Tris-yema de huevo de gallina criolla