

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



**“EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD ESPERMÁTICA DEL SEMEN
REFRIGERADO Y TASA DE PREÑEZ EN OVEJAS CRIOLLAS”**

TESIS

PRESENTADA POR:

Bach. FELIPE CHOQUE LIMACHI

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

PUNO – PERÚ

2017

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

TESIS

“EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD ESPERMÁTICA DEL SEMEN
REFRIGERADO Y TASA DE PREÑEZ EN OVEJAS CRIOLLAS”

PRESENTADA POR:

Bach. FELIPE CHOQUE LIMACHI

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA



APROBADA POR:


PRESIDENTE

:


MVZ. JOEL GUIDO FLORES CHECALLA

PRIMER MIEMBRO

:


MVZ. CIRIACO TEODORO ZUÑIGA ZUÑIGA

SEGUNDO MIEMBRO

:


Mg. Sc. JAPHET DEMETRIO ZAPANA PINEDA

DIRECTOR / ASESOR

:


Dr. MANUEL GUIDO PEREZ DURAND

Área : Reproducción animal

Tema : Viabilidad espermática en ovinos

Fecha de Sustentación: 18 de Diciembre del 2017

DEDICATORIA

El conocimiento adquirido es dedicado con amor y cariño a mis queridos padres: LUCIO y ROSA, por darme la oportunidad de existir y culminar esta profesión, por su sacrificio en algún momento incomprensido, por su confianza, amor y amistad incondicional. Por el apoyo persistente de ellos ha sido posible la culminación de mi profesión.

A mi esposa Olga Deysi, mis hijos Carlo Vladimir y Juan Jhassir, por ser el motor y motivo principal para concretar esta profesión.

A mis queridos hermanos: Yasmany, Marleny y Rosmery por el apoyo incondicional y cariño que me brindaron durante mi formación profesional.

A mis amigos: Javier (QEPD Y DDG), Mario, Joel, Johan, José Luis y Henry quienes fueron modelo a seguir y porque confiaron en mi capacidad y responsabilidad de asumir este reto para concretar mis objetivos planeados.

F.CH. L.

AGRADECIMIENTO

A Dios, quien guía e ilumina mi camino, día a día en el sendero de mi vida.

Es mi obligación, expresar un sincero agradecimiento a la prestigiosa Universidad Nacional del Altiplano, por haberme formado, en especial a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y el cuerpo docente por sus conocimientos impartidos durante mi formación profesional y al personal administrativo.

A mi Director Dr. Guido Pérez Durand, quien durante la realización de mi trabajo de investigación, me ha guiado en el complejo proceso del presente trabajo. Sin embargo, su paciencia y su motivación han sido fundamentales durante la elaboración, ejecución y culminación del presente trabajo.

Al Dr. Ciriaco Zuñiga Zuñiga, por motivarme a la culminación del presente trabajo de investigación, por su apoyo constante e incondicional, por sus conocimientos, su experiencia, sus orientaciones, su persistencia y su paciencia han sido fundamentales para la concretización del presente trabajo de investigación.

A los miembros del jurado, Dr. Joel Flores Checalla, Dr. Ciriaco Zuñiga Zuñiga, Mg. Sc. Japhet Zapana Pineda, por las correcciones y sugerencias realizadas en el presente trabajo de investigación.

A los trabajadores de la biblioteca Especializada: Samuel, Marcelino y Martin, por el apoyo para concretar el presente trabajo.

F. CH. L.

INDICE GENERAL

INDICE DE TABLAS.....	07
INDICE DE ACRONICOS.....	08
RESUMEN.....	09
ABSTRACT.....	10
I. INTRODUCCIÓN.....	11
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	13
2.1. Generalidades.....	13
2.1.1. Reproducción animal.....	13
2.1.2. Ciclo reproductivo.....	13
2.1.3. Fisiología de la reproducción en borregas.....	15
2.1.4. Fases del ciclo estral.....	17
2.1.5. Inseminación artificial (I.A.).....	19
2.1.6. Evaluación reproductiva del macho.....	20
2.1.7. Manipulación y examen del semen.....	20
2.1.8. Evaluación del semen.....	21
2.1.8.1. Evaluación Macroscópica.....	21
2.1.9. Procesamiento del semen.....	23
2.1.10. Conservación del semen fresco, enfriado y refrigerado.....	29
2.1.11. Refrigeración del semen del carnero.....	30
2.1.13. Sincronización de celo.....	35
2.1.14. Dispositivos intravaginales.....	39
2.1.15. Las esponjas vaginales syntex.....	42
2.1.16. Diagnóstico de gestación.....	42
2.1.16.1. Diagnóstico de gestación por ecografía.....	42
2.1.17. Fertilidad en ovejas sincronizadas.....	44
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	49
3.1. Ubicación.....	49
3.2. Material experimental.....	49
3.2.1. Ovejas.....	49

IATF: Inseminación Artificial a Tiempo Fijo.....	49
3.2.2. Reproductores	49
3.2.3. Instalaciones.....	50
3.2.4. Insumos	50
3.2.4.1. Progespón	50
3.2.4.2. Novormon.....	50
3.2.4.3. Dilutor de semen	50
3.3. Metodología	51
3.3.2. Colección de semen	51
3.3.3. Evaluación del Semen	51
3.3.3.1. Evaluación macroscópica	51
3.3.3.2. Evaluación microscópica	52
3.4. Dilución del semen	55
3.4.1. Preparación del dilutor.....	56
3.4.2. Refrigeración del semen.....	56
3.4.3. Conservación del semen fresco y refrigerado	56
3.5. Inseminación artificial a tiempo fijo (iatf)	56
3.5.1. Protocolo de sincronización	57
3.5.2. inseminación artificial a tiempo fijo con semen fresco	59
3.5.3. Inseminación artificial a tiempo fijo con semen refrigerado	59
3.5.7. Diagnóstico de gestación a través de la ecografía transrectal.....	60
3.5.4. Determinación del porcentaje de fertilidad.....	61
3.6. Análisis estadístico	61
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	63
4.1. Motilidad individual en el semen fresco diluido	63
4.2. Motilidad individual en semen refrigerado.....	63
4.3. Vitalidad en semen refrigerado.	65
4.4. Acrosoma en semen refrigerado.....	66
4.5. Fertilidad obtenida en borregas	67
V. CONCLUSIONES	70
VI. RECOMENDACIONES.....	71
VII. REFERENCIAS	72
ANEXOS.....	80

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Promedios de la motilidad individual del semen refrigerado.....	91
TABLA 2. Valores extremos en la motilidad individual del semen refrigerado.....	91
TABLA 3. Análisis de varianza de la motilidad para semen refrigerado con promedio de 59.63 % sin diferencia estadística ($P \leq 0.05$)	91
TABLA 4. Promedios de la vitalidad en semen refrigerado.....	92
TABLA 5. Valores extremos de la vitalidad del semen refrigerado	92
TABLA 6. Análisis de varianza para vitalidad del semen refrigerado con promedio 58.74 % siendo altamente significativo ($P \geq 0.01$).....	92
TABLA 7. Promedios de acrosoma del semen refrigerado	93
TABLA 8. Valores extremos del acrosoma del semen refrigerado	93
TABLA 9. Análisis de varianza para acrosoma del semen refrigerado siendo 60.00% sin diferencia estadística a un ($P \geq 0.05$).	93
TABLA 10. Resumen de parámetros seminales de los carneros en semen fresco	94
TABLA 11. Diagnóstico de preñes en ovejas inseminadas con semen fresco. 95	
TABLA 12. Diagnostico de preñes en ovejas inseminadas con semen refrigerado.....	96

INDICE DE ACRONICOS

- ANVA:** Análisis de varianza.
- CASA:** Análisis espermático asistido por computadora.
- eCG:** Gonadotropina corionica equina.
- FGA:** Acetato de flurogestona.
- FSH:** Hormona foliculoestimulante.
- GnRH :** Gonadotropina.
- HL:** Hormona luteinizante.
- IA:** Inseminación artificial.
- IASC:** Inseminación artificial sistémica cervical.
- IATF:** Inseminación artificial a tiempo fijo.
- MAP:** Acetato de medroxiprogesterona.
- PMSG:** Gonadotropina de suero de yegua preñada.
- SC:** Sincronización de celo.
- SO:** Superovulacion.
- TE:** Transferencia de embriones.
- UI:** Unidades internacionales.

RESUMEN

El estudio fue diseñado para evaluar la viabilidad espermática (motilidad, vitalidad y acrosoma) de los espermatozoides de semen refrigerado a las 0, 6, 12, 24 horas, para ello se utilizó 02 reproductores machos PDP de la raza Corriedale con fertilidad comprobada, de 04 dientes, sanos y entrenados para la colección de semen. Y la tasa de preñez a través de la inseminación artificial a tiempo fijo con semen fresco. Se evaluó a 100 ovejas criollas adultas distribuidas al azar en 2 tratamientos de 50 ovejas cada uno. Fueron sincronizadas con esponjas de poliuretano impregnadas con acetato de Medroxiprogesterona 60 mg aplicado en el canal vaginal durante 14 días. Al momento de retirar se aplicó eCG, (300 UI), la inseminación artificial se realizó a los 2 días post retiro de las esponjas por vía cervical con semen fresco diluido en una proporción de 1: 2 con el dilutor comercial AndroMet® a > 6 horas de refrigeración del semen de carnero. La evaluación fue: Motilidad individual 74.06 %. (0 h), 64.25 % (6h), 53.81% (12h) y 46.43% (24h) no existiendo diferencia estadística al análisis de varianza ($P \geq 0.05$). Vitalidad 69.21% (0h), 65.09 % (6h), 54.255% (12h) y 56.42% (24h) encontrando diferencia altamente significativa en ANVA ($P \geq 0.01$) y 72.89% (0h), 64.74% (6h), 54.97% (12h), 47.42% (24h) para Acrosoma no existiendo diferencia estadística al análisis de varianza ($P \geq 0.05$). A la inseminación con semen fresco 76.6% y refrigerado 59.55 existiendo diferencia estadística altamente significativa (≥ 0.01) utilizando la prueba de Ji cuadrado. La IATF en ovinos se puede realizar con semen diluido o refrigerado por presentar 60% en promedio la tasa de preñez.

Palabras claves: Estro, inseminación, semen, sincronización.

ABSTRACT

The study was designed to evaluate sperm viability (motility, vitality and acrosome) of sperm from refrigerated semen at 0, 6, 12, 24 hours and its pregnancy rate through artificial insemination at fixed time with fresh semen. We evaluated 100 adult Creole sheep distributed randomly in 2 treatments of 50 sheep each. They were synchronized with polyurethane sponges impregnated with 60 mg Medroxyprogesterone acetate applied to the vaginal canal for 14 days. At the time of removal, eCG (300 IU) was applied. Artificial insemination was performed 2 days after removal of the sponges by cervical route with fresh semen diluted in a ratio of 1: 2 with the commercial dilutor Andro Met ® a> 6 hours of cooling of the ram semen. The evaluation was: Individual Motility 74.06% (0 h), 64.25% (6h), 53.81% (12h) and 46.43% (24h), there being no statistical difference to the analysis of variance ($P \geq 0.05$). Vitality 69.21% (0h), 65.09% (6h), 54.255% (12h) and 56.42% (24h) finding a highly significant difference in ANVA ($P \geq 0.01$) and 72.89% (0h), 64.74% (6h), 54.97% (12h), 47.42% (24h) for Acrosoma, there being no statistical difference to the analysis of variance ($P \geq 0.05$). To the insemination with fresh semen 76.6% and refrigerated 59.55 there being a highly significant statistical difference (≥ 0.01) using the Chi square test. The IATF in sheep can be carried out with diluted or refrigerated semen, since the pregnancy rate is 60% on average.

Keywords: estrus, insemination, semen, synchronization.

I. INTRODUCCIÓN

La población de ganado ovino en la Sierra de Peru es de 8 972,200 cabezas, que representa el 94.2% del total. Considerando las razas, son los Criollos los que tienen mayor participación 80,5%, seguidos por los Corriedale 11, 3%. La sierra cuenta con una mayor proporción de ovinos de la raza criollos 80,6% (INEI, 2012).

La crianza de ovinos es una de las actividades y la principal fuente de ingreso económico en las zonas rurales, por eso es necesario incrementar la productividad y mejorar las condiciones de crianza (Aliaga, 2006).

En los últimos años, la inseminación artificial ha adquirido constante difusión, debido a que esta técnica se ha ido perfeccionando constantemente (Cárdenas, 1997).

La obtención y fraccionamiento del semen para su utilización en fresco de un carnero genéticamente superior, permite acelerar el mejoramiento de las características productivas de las majadas al aumentar el número de crías logradas con respecto a las que se obtendrían en servicio natural (Gibbons y col. 1997).

La utilización de semen refrigerado a 5°C evita el daño producido por congelación. En este estado el semen se conserva durante 24 h. y puede ser aplicado por vía vaginal. Con esta técnica, se pueden obtener una fertilidad del mismo orden que con el semen fresco (Maxwell y Strojanov, 1996).

Los parámetros o indicadores más utilizados para evaluar la calidad de una muestra de semen son: motilidad, concentración espermática, porcentaje de espermatozoides vivos, integridad de la membrana espermática y porcentaje de

anormalidades. Otros indicadores son la integridad del acrosoma y el grado de fragmentación del ADN (Cabrera y Pantoja, 2008).

Las tecnologías disponibles, para evitar el traslado de reproductores entre establecimientos, se basan en la preservación del semen por largos períodos (semen congelado) o períodos breves (semen refrigerado y enfriado). (Paulenz *et al.*, 2002)

En la actualidad se considera que la preservación de semen ovino enfriado a 15°C resultaría adecuada para períodos breves de conservación de 6 a 12 horas, en comparación con la preservación refrigerada a 5°C que se adaptaría mejor para lapsos de tiempo más prolongados. Por estas razones y buscando alternativas para realizar un mejoramiento genético utilizando técnicas de inseminación artificial con semen fresco y refrigerado, el trabajo de investigación tiene como propósito validar las técnicas reproductivas y el tiempo óptimo del semen para la inseminación artificial en ovejas criollas. El objetivo es:

1.1. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION

1.1.1. Objetivo General:

Determinar la calidad del semen refrigerado (motilidad, vitalidad y acrosoma del espermatozoide a las 0, 6, 12 y 24 horas.

1.1.2. Objetivos Específicos:

Evaluar la tasa de preñez a obtener en la inseminación artificial a tiempo fijo con semen fresco (0 horas).

Evaluar la tasa de preñez a obtener en la inseminación artificial con semen refrigerado (>6 horas) de ovejas criollas.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Generalidades

2.1.1. Reproducción animal

La biología de la reproducción animal es cada vez más importante como disciplina científico - práctica en la producción ovina, apoya el incremento pecuario para el suministro de proteínas de origen animal a la humanidad, ayuda también a estabilizar la economía del criador creando circunstancias favorables para su producción y el mejoramiento genético (Bearden y Fuquay, 1982).

La aplicación de las tecnologías en el control de la reproducción, sincronización del celo (SC), inseminación artificial (IA) e incluso técnicas adecuadas de superovulación (SO) y la transferencia de embriones (TE) ayudarían a resolver algunos problemas productivos, acelerarían la selección y potenciarían el desarrollo biotecnológico (Angulo y Mejía, 2003).

2.1.2. Ciclo reproductivo

El ciclo reproductivo anual de las ovejas es regulado por la amplitud del fotoperiodo (Arroyo, 2006). La mayor parte de las razas ovinas son poliéstricas estacionales como Hampshire, Southwn, Rommey, Rambouillet, éstas se desarrollan en climas fríos donde la disponibilidad de alimentos y condiciones hicieron que las crías no sobrevivan a menos que nacieran en el momento más óptimo, lo que propició la aparición de la estación reproductiva otoñal y parte en la primavera. Las especies no estacionales tuvieron su origen en el

Mediterráneo, donde las condiciones del clima no son tan severas y los recién nacidos pueden sobrevivir casi todo el año, pertenecen a este grupo: Merino, Karakul, Persas de cabeza negra y hasta cierto grado el Dorset-horn (McDonald, 1981).

Un método simple para una temprana inducción del estro consiste en la exposición de las ovejas a los carneros en el periodo de transición entre la estación de actividad reproductiva y la estación de anestro. Muchas ovejas ovularán dentro de los primeros seis días posteriores a dicha exposición y exhibirán un calor fértil aproximadamente 17 días después. Esta ovulación temprana está asociada con un surgimiento de hormona luteinizante (HL) en las ovejas expuestas. Otra alternativa es la sincronización del ciclo estral por medio de progestágenos implantados vaginal o subcutáneamente por 10 a 14 días, y seguidos de una inyección de 750 (U.I.) unidades internacionales de PMSG. Las ovejas no solamente serán inducidas a mostrar estro, sino también aquellas que no conciban en el primer estro, continuarán ciclando y podrán ser servidas posteriormente. La fertilidad de las ovejas con estro inducido es más alta durante la parte final del anestro que durante el comienzo o a mediados de la etapa reproductiva (Angulo y Mejía, 2003).

2.1.3. Fisiología de la reproducción en borregas

Ciclo estral

El ciclo estral se inicia a partir del primer día del estro y los ciclos sexuales varían según la raza y el estado de nutrición; algunas razas solo tienen uno, dos o tres ciclos por año, la duración del ciclo estral en ovinos en promedio es de 17 días, variando desde 13 días hasta 21 días (Mc Donald, 2006).

La tasa de ovulación varía con la época del año, la edad y el estado nutricional, observándose un incremento a mediados de la estación reproductiva y entre los 4 y 6 años de edad.

Cuadro 1. Duración del ciclo estral en ovinos (días)

AUTOR	AÑO	RAZA	CICLO ESTRAL (Días)	
			Promedio	Extremos
Nalbandov	1969	-	16	-
Santos A.	1971	Corriedale	16-18	16-21
González M	1980	Corriedale	17.65	15-20
Astete D.	1988	Corriedale	18	-
Alencastre R.	1997	Corriedale	17.7	15-20

FUENTE :(Machaca, 1998)

La sucesión de eventos que conducen a períodos regulares de receptividad sexual forman parte del ciclo estral. En la oveja el ciclo estral tiene una duración de 14-19 días, con un promedio de 17, se toma como referencia el día de receptividad sexual por ser el evento más notorio. En un ciclo estral producto de sincronización se pueden considerar básicamente dos fases: La fase folicular y la fase lútea (Mc Donald, 2006).

Fase folicular

Durante esta fase, se lleva a cabo el crecimiento folicular, el cuál es controlado en parte por gonadotropinas hipofisarias; la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH). La FSH estimula el crecimiento temprano de los folículos y la LH completa las últimas fases de crecimiento (Angulo y Mejía, 2003), además estas permiten que los folículos secreten hormonas sexuales femeninas como estrógenos que liberan al torrente sanguíneo permitiendo la manifestación del celo. Dentro de la fase folicular se incluyen a las fases del proestro y estro (Hafez ,2000).

Fase lútea.

Después de la ovulación, el espacio dejado por el ovocito es ocupado por células de la granulosa y de la teca que se diferencian en células lúteas grandes y chicas respectivamente. Ambos tipos celulares forman parte del tejido lúteo y son responsables de la producción de progesterona. El cuerpo lúteo es considerado una continuación del desarrollo folicular y es clasificado como una glándula endocrina temporal. Hacia el día 3 o 4 posteriores al celo se pueden tener concentraciones basales de 0.2 ng/ml de progesterona, alrededor del día 6 o 7 se alcanzan 2-4 ng/ml. (Angulo y Mejía, 2003).

La fase lútea comprende el metaestro y diestro. El estro dura de 24 a 36 horas, produciéndose la ovulación cerca del final del estro (Hafez, 2000). En borregas corriedale tiene una duración promedio de 27

horas, además establece que la duración del estro es mayor en borregas adultas (Gonzales, 1980).

2.1.4. Fases del ciclo estral

En condiciones naturales el ciclo estral en los animales domésticos puede dividirse en 4 etapas: Proestro, estro, metaestro y diestro (Mc Donald, 1981).

Proestro

Proceso que da inicio al ciclo estral en el cual, el hipotálamo a través de las neuronas endocrinas, producen como consecuencia del estímulo del SNC (fotoperiodo) la hormona GnRH, que es transportada a través del sistema portal, al bulbo anterior de la hipófisis, una vez allí estimula la secreción de la hormona FSH, la que a su vez produce el desarrollo de los folículos ováricos (Jainuden y Hafez, 2004).

Durante esta etapa ya son perceptibles en los genitales externos, alteraciones como: edematización e hiperemia de los labios vulvares, las hembras sienten inquietud y muestran comportamiento alterado, pero rechazan todavía el comportamiento del macho; por otro lado, el tamaño del útero aumenta, el endometrio está congestionado, edematoso y sus glándulas presentan abundante actividad secretora (Hafez, 2000).

Tiene una duración de 3 días, comienza con el cese funcional del cuerpo lúteo y termina con la iniciación del estro. Se caracteriza por el inicio de la atracción del macho a la hembra, pero no permite que la

monte. Este periodo es de preparación para el apareamiento. Los niveles de estrógenos se elevan en ese momento y es la principal causa de los cambios (Craplet, 1961).

Estro

Los folículos maduros o de Graaf son responsables de la producción de estrógenos que determinan los cambios anatómicos y de comportamiento asociados con el estro. Los signos externos de manifestación del celo en la oveja no son muy marcados. Estos incluyen el enrojecimiento de la vulva y la secreción vaginal de mucus (Hafez, 2000).

Estro es el momento durante el cual, la hembra acepta la cópula con el macho. Tiene una duración de 18 horas a 72 horas su duración varía de una especie a otra. Este período es de naturaleza cíclica y recibe el nombre también de “celo” o “calor”, ya que el animal se encuentra muy excitado. El nivel de estrógenos es muy alto y en la mayoría de especies la ovulación ocurre en este período. Este período es más largo en las ovejas adultas (26.2 horas) que en las jóvenes (19.8 horas) (Craplet, 1961).

Metaestro

Después de la ovulación comienza el metaestro que dura dos días en la oveja, durante este tiempo se organiza e inicia la función del cuerpo amarillo. En la fase post- ovulatoria caracterizada por el desarrollo del cuerpo lúteo, y el comienzo de la secreción de la progesterona. Los

ovarios y el útero se disponen como si la gestación hubiese empezado (MC Donald (1981).

Diestro

Existe uno o varios cuerpos lúteos totalmente desarrollados a partir de los folículos que han ovulado. Si se ha producido fecundación el cuerpo lúteo continúa a lo largo de los 145 días de gestación; de lo contrario el cuerpo lúteo permanece útil solo 11 a 12 días y luego regresa (lisis) (Hafez, 2000).

2.1.5. Inseminación artificial (I.A.)

Se entiende por inseminación artificial a la técnica de reproducción que consiste en introducir el material fecundante masculino por medios artificiales, en las vías genitales femeninas. Los medios mecánicos sustituyen a los órganos, sin necesidad de poner en presencia y en contacto a los progenitores.

La técnica de la fecundación artificial consta, por lo tanto, de las siguientes operaciones principales:

- a) Recolección y obtención del semen.
- b) Valoración cuantitativa, cualitativa y sanitaria de dicho semen.
- c) Dilución del mismo en los valores adecuados.
- d) Conservación in vitro, y transporte del semen a distancia.
- e) Introducción del líquido seminal en el aparato genital femenino o siembra

(Gibbons y Cueto 2007).

2.1.6. Evaluación reproductiva del macho

La evaluación reproductiva del semental es útil en el diagnóstico de problemas de infertilidad en el rebaño. Al encontrar a los sementales como reproductores satisfactorios, pueden considerarse otros factores que influyen sobre la fertilidad, como el buen estado físico, buena calidad seminal, buena libido y habilidad de servicio

El examen andrológico requiere el conocimiento de las características reproductivas normales y de las causas de alteraciones más frecuentes. La evaluación de la aptitud reproductiva del semental debe incluir los siguientes aspectos: Examen clínico general, evaluación del semen y evaluación de la libido (Angulo y Mejía, 2003).

2.1.7. Manipulación y examen del semen

Luego de su recolección, es importante que el semen se mantenga protegido de los cambios bruscos de temperatura, contacto con el agua y metales, radiación solar directa e impurezas.

La observación del color del semen, así como la apreciación de su motilidad masal, son importantes para decidir si se procederá a la utilización del eyaculado.

El volumen y concentración espermática deben ser estimados antes de su utilización, para realizar una correcta dilución según el volumen y el número de espermatozoides totales a inseminar por dosis. El volumen promedio del eyaculado del carnero es de 1 ml (0.7-3 ml), y su concentración varía entre 2000-6000 millones de espermatozoides/ml.

La dilución del semen para la IA se lleva a cabo por razones técnicas y biológicas:

Razones técnicas: incrementar el volumen de eyaculado para inseminar un mayor número de hembras

Razones biológicas: proveer a los espermatozoides, nutrientes y protección de las temperaturas de enfriamiento y congelamiento (Cueto y Gibbons, 1997).

2.1.8. Evaluación del semen

La evaluación espermática nos permite estimar la fertilidad potencial de cualquier semental y consiste en la evaluación, en el laboratorio, de parámetros espermáticos que son indicadores de la calidad del semen del reproductor de interés (Sorensen, 1991).

Estos parámetros pueden ser de carácter macroscópico (color, aspecto, volumen, pH) ya que pueden ser evaluados a simple vista de la muestra seminal; y microscópicos (motilidad masal, motilidad individual, concentración espermática, anormalidades, integridad de membrana, vitalidad) que deben ser evaluados utilizando un microscopio (Aisen, 2002).

2.1.8.1. Evaluación Macroscópica.

Color

La cantidad de espermatozoides presentes en el eyaculado hace que la muestra tome una coloración blanquecina – amarillenta cuando la muestra es de buena calidad. Cuando es de baja calidad, es similar a la leche acuosa (Hafez, 2000). En este sentido puede admitirse una

relación directa entre la intensidad del color y la riqueza espermática (Pérez y Pérez, 1985).

Un color rojizo indica la presencia de sangre, así como los colores grises o marrones indican contaminación o infección, debiéndose en estos casos, desechar el eyaculado y proceder a la revisión del carnero (Gibbons et al., 2004).

Aspecto

El aspecto del semen depende de la relación de dos constituyentes: la concentración de espermatozoides y la calidad del plasma seminal. Las muestras de alta consistencia contienen más espermatozoides que las muestras más acuosas. El semen debe tener un aspecto cremoso - lechoso y uniforme (Evans y Maxwell, 1990).

Volumen

Cuando la recolección se realiza con vagina artificial, normalmente se obtienen eyaculados de aproximadamente 1 ml. Este volumen, varía según la edad, tamaño, condición corporal del animal, frecuencia de colección y destreza del operador (Gibbons et al., 2004).

Los volúmenes de eyaculados pueden admitirse como normales cuando sus rangos van de 0.5 a 2.0 ml con una media de 0.8 ml. Se sabe, además, que las cópulas reiteradas a intervalos demasiado cortos disminuyen el volumen recolectado y, por el contrario, la excitación acentuada aumenta (Pérez y Pérez, 1985).

pH

El valor del pH es el resultante de la neutralización entre las reacciones glandulares de acción tampón y la concentración iónica del material de las ampollas de Henle y del epidídimo. En ovinos, el pH tiende a la acidosis, fenómeno importante ya que en él radica su capacidad fecundante. La reacción alcalina es características de una escasa fertilidad y muchas veces va acompañada de necropermia y de una disminución en la concentración espermática y motilidad (Evans y Maxwell, 1990).

En el carnero y en el macho cabrío, los valores de pH oscilan entre 6.2 – 7.3, llegando incluso a citarse como normal un pH de 7.5 (Pérez y Pérez, 1985).

2.1.9. Procesamiento del semen

El procesamiento del semen enfriándolo a 5°C es similar ya sea que se use congelado o sin congelar. El semen se colecta a la temperatura corporal. Después de la obtención debe mantenerse tibio (30°C) antes de la dilución, para evitar choque por frío. Esto se realiza colectando semen y diluyente en un baño de agua que se mantiene a 30°C. Se extrae una porción de semen para evaluación, y el resto puede mezclarse con tres a cuatro partes del diluyente a 30°C. Se recomienda mantener el semen durante 30 minutos a esa temperatura, a fin de aumentar la acción antibiótica del diluyente. La mezcla se enfría gradualmente hasta 5°C a todas las especies excepto en el caso del semen no congelado del verraco, el cual suele

mantenerse a 15°C. El enfriamiento debe ser lento, tomando por lo menos 1 hora para llevar la mezcla de 30°C a 5°C. Este proceso suele realizarse protegiendo el recipiente con una camisa de agua para evitar el choque térmico (Hafez, 2000).

2.1.9.1. Evaluación Microscópica.

Motilidad Masal

La motilidad masal valora la formación y progresión de ondas producidas por el desplazamiento de los espermatozoides. La onda de movimiento solo puede ser observada en especies de alta concentración espermática, como es el caso de pequeños rumiantes (Evans y Maxwell, 1990). Se determina mediante microscopía óptica a 100 aumentos (100x) utilizando una pequeña gota de semen puro colocada sobre un portaobjeto temperado a 37 °C (Pérez y Pérez, 1985).

Motilidad Individual

Es una de las pruebas que se utiliza con mayor frecuencia para evaluar la calidad de semen diluido. En algunas especies, parece estar correlacionada con la capacidad fertilizante del espermatozoide. Si existe menos del 40% de espermatozoides con movimiento lineal progresivo, es menos probable que haya fertilidad. Debido a la influencia que tienen las variaciones de temperatura sobre la motilidad espermática, las muestras deben ser evaluadas tan pronto sea posible (Aisen, 2002).

La técnica consiste en la observación microscópica a 400 aumentos (400x) de una muestra de semen diluido en una lámina portaobjetos temperada. Se consideran espermatozoides móviles aquellos que aparecen activos y con movimiento progresivo. La motilidad individual es el porcentaje de espermatozoides móviles con respecto al total de espermatozoides visualizados (Sorensen, 1991; Arthur, 1991).

En el Perú, Quispe (1998), evaluando 3 tiempos de equilibrio (2, 10 y 18 horas) en semen refrigerado de carneros, reportó motilidades de 78.3%, 73.5% y 71.6%, respectivamente, utilizando el dilutor Tris–yema de huevo. Con el dilutor leche–yema de huevo reportó motilidades de 78.3%, 75.0% y 73.3% a los mismos tiempos de equilibrio. Por su parte, Ramírez et al. (2001), trabajando con semen refrigerado, encontró que los porcentajes de motilidad individual fueron de $85.2 \pm 4.33\%$ con dilutor Tris–Fructosa–Yema de huevo, $84.2 \pm 1.44\%$ con dilutor Citrato–Glucosa–Yema de huevo y $85.8 \pm 5.2\%$ con dilutor leche descremada. Observaron, también, que la motilidad disminuye al aumentar el tiempo de refrigeración a 5°C, obteniéndose valores de motilidad a las 48 horas post refrigeración de $75.0 \pm 9.01\%$ con Tris–Fructosa–Yema de huevo, $77.5 \pm 2.50\%$ con Citrato–Glucosa–Yema de huevo y de $67.5 \pm 15.21\%$ con leche descremada (Ramírez et al. 2001).

Concentración espermática

La concentración espermática está definida como el número de espermatozoides por unidad de volumen, expresada normalmente en millones por ml. de eyaculado (esp/ml). Los diferentes métodos utilizados para su cálculo varían en función de la rapidez y exactitud (Evans y Maxwell, 1987).

Son varios los métodos que permiten determinar la concentración espermática. Entre ellos, figuran el recuento en el hemocitómetro y el método del fotocolorímetro. Ambos métodos son precisos y si bien el fotocolorímetro permite un recuento más rápido, su costo es más elevado que el hemocitómetro (Gibbons, 2004).

Debido a que se quiere aprovechar al máximo una muestra de semen de buena calidad, se procura dosificarlo (tener la cantidad óptima de espermatozoides en un volumen determinado) y así manejar varias muestras para inseminación. Por tanto, es necesario conocer el número de espermatozoides por mililitro de eyaculado ya que nos permitirá saber cuántas dosis se pueden preparar; en pocas palabras, cuántas veces puedo diluirlo (factor de dilución) (Evans y Maxwell, 1990).

Guillén (2001), evaluó las características seminales de carneros de la raza Blackbelly del INIA, obteniendo concentraciones de 3.14×10^9 espermatozoides/ml. Así mismo, (Huamán, 2003), reportó concentraciones de 3.63, 3.316, 2.78 y 2.67×10 esp/ml.

Morfología espermática

La morfología espermática se refiere al estudio de la forma del espermatozoide y permite determinar las posibilidades que tiene una célula espermática para fertilizar. El objetivo de esta evaluación es eliminar el semen no ideal para la reproducción. La presencia de altos porcentajes de formas anormales parece estar asociada con inmadurez sexual, procesos degenerativos y patologías (Madrid y Bohada, 1993).

La morfología espermática es una de las características más estudiadas en el análisis seminal (Madrid y Bohada, 1993). Su estudio ha utilizado tradicionalmente técnicas de tinción entre las que destacan la eosina-nigrosina (Merino, 2003).

La introducción de los sistemas de Análisis Espermáticos Asistidos por Computadora (CASA, por sus siglas en inglés), ha permitido realizar evaluaciones morfométricas objetivas y cuantitativas del semen de diversas especies (Casey et al. 1997).

Un eyaculado de carnero se considera normal cuando el porcentaje de formas anormales es inferior al 15%. Existen variaciones en la morfología espermática debido al estrés ambiental, factor individual, temperatura, estación del año, etc. (Gibbons, 2004). Merino (2003), trabajando con 3 carneros de 2 a 3 años de edad, reportó 12,8% de anomalías. Así mismo, Brito et al. (2003), trabajando con el semen de carneros de las razas Rambouillet y Suffolk; y, utilizando

frotis de semen teñido con los colorantes eosina y nigrosina, reportaron 15% de anormalidades.

Vitalidad

La membrana celular de los espermatozoides representa una barrera al paso de tinciones al medio intracelular. Los espermatozoides vivos no dejan pasar ningún tipo de colorante a su medio intracelular, mientras que los muertos, los absorben. Este fenómeno biofísico permitió el desarrollo de técnicas orientadas a la diferenciación de espermatozoides vivos de muertos (Fernández et al. 1998).

Actualmente, existe toda una serie de técnicas destinadas a identificar espermatozoides vivos y muertos. Se han descritos numerosas tinciones basadas en la permeabilidad selectiva de la membrana plasmática como por ejemplo la eosina-nigrosina (Colas, 1975) y azul de Tripán de tal manera, que si el espermatozoide está vivo, la membrana celular actúa como barrera impermeable impidiendo el paso del colorante a través de ella, permaneciendo la célula sin teñirse (Suttiyotin y Thwaites, 1992).

Características del acrosoma del espermatozoide

El acrosoma es una estructura membranosa que ocupa la región anterior de la cabeza del espermatozoide, englobando al núcleo y que se origina a partir del complejo de Golgi durante la fase de espermátide. Este orgánulo contiene los enzimas que permiten al espermatozoide atravesar las envolturas que recubren al ovocito. Dichos enzimas se liberan al exterior mediante un proceso de

exocitosis denominado Reacción Acrosómica. Un nuevo parámetro, introducido en 1968 por Saacke y Marshall, empleado para la evaluación morfológica del eyaculado consiste en la descripción de la secuencia de alteraciones que presenta el acrosoma del espermatozoide del toro con el transcurso del tiempo. A partir de aquí, la integridad del acrosoma se ha utilizado como prueba de evaluación de la calidad seminal en la mayoría de las especies de animales mamíferos. El acrosoma juega un papel fundamental en la fecundación. En el acrosoma se puede distinguir tres regiones claramente diferenciadas: la zona acrosomal con su borde apical, la zona post acrosomal y el segmento ecuatorial entre ambas, los mismos que tienden a romperse en el proceso de refrigeración, congelación y descongelamiento. Muestras seminales con alta proporción de alteraciones acrosomales suelen tener una fertilidad baja (Peña y Linde-Forsberg, 2000).

Una de las propiedades bioquímicas más importantes de los espermatozoides es la capacidad de que las moléculas puedan ser transportadas a través de su membrana. Esto no solo es esencial para la motilidad espermática, sino también para la inducción de la reacción acrosómica y posiblemente otros eventos relacionado a la fertilización (Jeyendran et al., 1984).

2.1.10. Conservación del semen fresco, enfriado y refrigerado

Semen fresco: el semen que va a emplearse inmediatamente después de su recolección, podrá mantenerse a 28°C-30°C en baño termostático durante su utilización, ya sea puro o diluido.

Semen enfriado: podrá conservarse por el transcurso de 6-12 horas a 15°C.

Semen refrigerado: podrá conservarse por el transcurso de 24 horas a 5°C.

Semen enfriado y refrigerado: Luego de realizar la dilución del semen, el mismo se lleva a temperatura de 15°C o 5°C, respectivamente, siguiendo una curva de enfriamiento a razón de 2°C cada 3 minutos aproximadamente. De esta forma el semen puede conservarse por un período de 6-12 horas (semen enfriado) o 24 horas (semen refrigerado) (Gibbons y col., 2007).

2.1.11. Refrigeración del semen del carnero

El objeto de refrigerar el semen es el de reducir el metabolismo energético de los espermatozoides, prolongando así su viabilidad y capacidad fecundante en el tiempo. El semen de mamífero, en especial el de carnero y chivo, es sensible al enfriamiento rápido (*shock* frío), traducándose en un aumento del número de espermatozoides muertos, alteración de la distribución de lípidos de membrana y aumento del calcio intracelular. En caso de los espermatozoides de ovino, existe una distribución desigual de proteínas del citoesqueleto asociadas a la membrana, por lo que son más sensibles a los cambios de temperatura por refrigeración (Aisen, 2004).

Evans y Maxwell (1990), indicaron Para la conservación *in vitro* del semen, hay que dar importancia especial a la forma que se efectúa el

enfriamiento, el cual debe ser muy lento que el enfriamiento a 15°C y 5°C se debe realizar en un lapso de 1 a 1.5 horas y de 2 a 3 horas, respectivamente.

El método mayormente utilizado para conservar semen en forma líquida por períodos de tiempo mayores a 24 horas es mediante la reducción progresiva de la temperatura. La motilidad se detiene totalmente a los 5°C, pero se puede restituir si se eleva nuevamente la temperatura a los niveles normales, siempre y cuando no se hayan producido daños de tipo estructural causados por shock térmico (Vivianco, 1998).

Las células deben ser protegidas contra las bajas temperaturas mediante la adición de compuestos orgánicos como la leche descremada o la yema de huevo que aumentan la resistencia de la membrana a los cambios de permeabilidad e impiden que los espermatozoides acumulen calcio al alterarse el sistema de intercambio iónico de la membrana (Bearden, 1980).

Evaluaciones en el laboratorio han demostrado que el semen diluido y refrigerado a 5°C muestra una gran variabilidad en sobrevivencia y fertilidad en las siguientes 72 horas de conservación. Existen algunos diluyentes en los cuales los espermatozoides de carnero pueden conservarse a 4°C durante 8 a 15 días con una buena viabilidad y con fertilidad aceptable a los 8 días (Salomón y Maxwell, 2000).

Cáceres, (2013) observó la motilidad individual en una evaluación espermática del semen de ovinos tratado por la técnica de gradiente

de densidad un aumento significativo en los valores promedio de motilidad individual de 3 carneros después de 24 horas de refrigeración a 5°C.

Motilidad Individual (%) después de 24 horas de refrigeración (T24)		
	Control	Experimental
Carnero I	82.14 ± 2.40 ^a	87.43 ± 3.17 ^b
Carnero II	82.74 ± 2.29 ^c	86.30 ± 3.16 ^d
Carnero III	82.43 ± 2.09 ^e	87.08 ± 3.08 ^f

Fuente: Caceres (2013).

Paulenzet *et al.* (2002), no observaron diferencia estadística en motilidad progresiva al monitorear semen diluido a 5°C durante 0, 6, 24 y 30 horas.

Morrieret *et al.* (2002), obtuvieron resultados similares al probar la adición o no adición de glicerol en semen conservado a 5°C durante 0, 8, 16 y 24 horas. Ellos observaron que la adición del glicerol no afectaba la motilidad en los diferentes tiempos, manteniéndose esta ligeramente por debajo de la motilidad inicial (84 ± 3.3%). Sin embargo, la conservación del semen a 5°C también puede acarrear consecuencias perjudiciales como el disminución del 40% de la actividad metabólica del Na⁺/K⁺ intracelular, lo cual provoca una marcada disfunción en el paso de algunos iones a través de la membrana celular, ocasionando una disminución en la sobrevivencia del espermatozoide.

También, Bailey *et al.* (2002) demostraron que el proceso de refrigeración provoca un cambio estructural en la membrana

plasmática del espermatozoide parecido a lo que sucede durante la capacitación. Así mismo, Cormier et al. (1997), reporta que la capacitación puede ocurrir a los 5°C. Por otro lado, Salomón y Maxwell (2000) mencionan, que independientemente del diluyente, tasa de dilución, temperatura o condiciones de almacenaje; el deterioro del espermatozoide se debe al incremento en el tiempo de almacenaje y la reducción de su capacidad para controlar la entrada de iones calcio. Esto último está asociado con la capacitación, hiperactivación y reacción acrosómica. El descenso en fertilidad se considera entre un 10 y 30% por cada día transcurrido (Maxwell y Salomón, 1993).

Efecto de la raza sobre la integridad de membrana celular intacta en semen refrigerado en semen diluido a 5°C

Raza	N	Membrana espermática intacta (%)	Valores extremos (%)
Criollo	15	59.33 ^a	39.00-89.00
Corriedale	15	56.87 ^a	41.00-78.00
Texel	15	48.00 ^b	34.00-67.00

Fuente: Vargas, P., (2015)

Cáceres, (2013) observo la integridad de membrana en una evaluación espermática del semen de ovinos tratado por la técnica de gradiente de densidad un aumento significativo en los valores promedio de integridad de membrana de 3 carneros después de 24 horas de refrigeración a 5°C.

Integridad de Membrana (%) en el tiempo cero (T0)		
Control (C)		Experimental (E)
Carnero I	73.41 ± 4.80 ^a	79.24 ± 3.71 ^b
Carnero II	74.08 ± 4.69 ^c	77.75 ± 4.91 ^d
Carnero III	72.60 ± 3.93 ^e	78.68 ± 4.34 ^f

Fuente: Cáceres (2013).

Para temas de fertilidad, Borque y Sánchez (1992) sostienen que para la inseminación con semen refrigerado por vía cervical se emplean dosis conteniendo 50 a 200 x10⁶ esp/ml. Se sabe, además, que los porcentajes de fertilidad con semen refrigerado a 24, 48 y 72 horas son de 45-50, 25-30 y 15-20%, respectivamente. Esto en contraste con el porcentaje de fertilidad (75 a 80%) obtenido con semen fresco (Salomon y Maxwel, 2000).

Aisen (2004), indica que el porcentaje de endosmosis en semen fresco de ovino varía de 60% a 90% y en semen refrigerado es mayor al 60%. Además, sostiene que la endosmosis se correlaciona estrechamente con la fertilidad *in vitro*, siendo su valor para el ovino de 0.86.

En el Perú, evaluaron un total de 16 muestras de semen puro de carneros en un medio hiposmótico (0.735g. de citrato de sodio dihidratado y 1.351g de fructosa en 100 ml de agua destilada) obteniendo respuestas de 61.2 + 6.9%, 97.7 + 1.0% y 100% de espermatozoides con membrana intacta que reaccionaron positivo al HOST, para 30min, 60min y 120 min de tiempo de incubación, respectivamente. Sin embargo, la correlación con la motilidad espermática fue muy baja (Santiani et al. 2003).

2.1.13. Sincronización de celo

La explotación intensiva de ovinos necesita de la aplicación de técnicas de intensificación del manejo reproductivo. Resulta necesario tener agrupados los partos, a fin de obtener lotes homogéneos de corderos.

En Europa se utilizan los progestágenos, esponjas vaginales de FGA (Acetato de Flurogestona) o de Acetato de medroxiprogesterona (MAP) o dispositivos intravaginales para cabras y ovejas (CIDR), liberadores de progesterona. En ambos casos, el tratamiento se mantiene durante 12-14 días aplicando una inyección de gonadotropina coriónica (eCG) al final del tratamiento. La dosis de eCG varía entre 400 y 600 UI. Los resultados dependen del estado fisiológico de los animales (condición corporal, intervalo al parto anterior, lactación, edad). Para obtener buenos resultados debe realizarse la cubrición controlada, 48 horas después de retirar el tratamiento (Folch y Alabart, 2000).

Sin la sincronización de celo la IA se torna ineficiente. Hoy día los sistemas más comunes de sincronización de celos son los que utilizan progesterona sintética, aplicada en esponjas vaginales o como implantes de progesterona bajo la piel. Las esponjas o dispositivos intravaginales son fáciles de aplicar y también son tan efectivos como los implantes subcutáneos. Estos se mantienen por un lapso de 9 a 12 días y posteriormente se retiran, provocando el inicio de un ciclo estral (Sepúlveda et al., 1999).

Protocolos de Sincronización de celo

Para lograr una eficiencia productiva en la sincronización de estros colocando a un grupo de hembras dentro de la misma fase de su ciclo estral, de manera que los calores se presenten en la mayoría de los animales al mismo tiempo y por un periodo de corta duración se utiliza varios procedimientos:

progestágenos y sustancias que ejercen una acción biológica parecida llamados progestágenos inhibiendo al hipotálamo para impedir la liberación de factores de liberación de gonadotropinas (GnRH), para lograr este efecto, la aplicación del progestágeno debe realizarse por un periodo relativamente largo (11 días). Con este método el hipotálamo está en posibilidades de ahorrar sus factores de liberación, lo que explica su capacidad para inducir el celo en la oveja primeriza y en aquellas que se encuentran fuera de la estación reproductiva. La esponja vaginal se usa actualmente debido a su efectividad y fácil manejo. La permanencia de la esponja impregnada con el progestágeno durante el tiempo de tratamiento asegura una absorción regular a través de las paredes de la vagina. Este método es el más común y se ha utilizado en gran escala. Además, el sistema ofrece las siguientes ventajas:

1. Inducción del estro y la ovulación en cualquier época del año.
2. Inducción del estro en ovejas fuera de la estación reproductiva.
3. Inducción del estro en primerizas (mayores de 7 meses y con 60% de peso adulto).

4. Hace posible el uso racional de la inseminación artificial.
5. Aumenta el número de crías al parto cuando se utiliza PMSG (efecto de superovulación) (Angulo y Mejía, 2003).

Los progestágenos (esponjas vaginales, implantes, dispositivos, etc.) utilizados en muchas especies en forma previa, inhiben la liberación de hormonas luteinizante (LH) y foliculoestimulante (FSH) de la hipófisis, frenando el desarrollo folicular y la ovulación hasta el momento deseado. Cuando los progestágenos son retirados, la concentración de Progesterona en sangre cae rápidamente con lo cual el animal puede entrar en celo. La administración de NOVORMON® en ese momento estimula el desarrollo folicular y potencia la acción sincronizante de los progestágenos (Syntex, 2014).

Prostaglandinas sintéticas Simulan la acción de la prostaglandina F2 alfa, agente luteolítico liberado por el útero, acortando la vida del cuerpo lúteo. Por este motivo, sólo pueden utilizarse durante la estación reproductiva. Dado que los celos se presentan más dispersos que en el tratamiento con esponjas, la IA se realiza con previa detección de celos. Las prostaglandinas inducen la regresión luteal entre los días 5 y 14 del ciclo estral en ovejas, con manifestación de celo entre las 48 y 84 horas de aplicada la inyección. Las ovejas que se encuentren entre el día 15 y 17 del ciclo, experimentarán luteólisis en forma natural y entrarán en celo dentro del mismo intervalo. En tanto que las que se encuentren entre los días 0 y 4 son refractarias a la prostaglandina y se alzarán recién 13-17 días más tarde (Cueto y Gibbons, 1997).

GnRh La Gonadotropina coriónica equina (eCG ó PMSG), es una hormona placentaria, secretada por las copas endometriales del endometrio uterino de yegua y es de característica glucoproteínica constituida por las sub unidades ∞ y β . La sub unidad ∞ es similar a las existentes en la FSH y LH, mientras, que la sub unidad β es la responsable de la diferente actividad biológica de cada una de las hormonas, por estas razones es utilizada en los tratamientos de sincronización (Hafez, 2002).

La PMSG o eCG, se administra por inyección intramuscular al momento de retirar las esponjas, en la estación reproductiva; o 48 horas antes del retiro, en el anestro estacional. La PMSG provoca un pico importante de estrógenos, induciendo la aparición de un pico preovulatorio de LH y la ovulación, al mismo tiempo que mejora la sincronía de los celos. Las dosis utilizadas de PMSG varían entre 200 y 400 UI, dependiendo fundamentalmente del peso corporal, de la raza y de la época del año, aconsejándose probar en principio la dosis menor. Dosis elevadas de PMSG ocasionan ovulaciones y gestaciones múltiples, generando altas pérdidas de animales por toxemia de la preñez y mortalidad perinatal (Cueto y Gibbons, 1997).

Algunos protocolos que utilizan progesterona y gonadotropina coriónica equina (eCG) inducen celos fértiles en ovejas, independientemente de la época del año y de las condiciones ambientales (Machaca, 1998).

2.1.14. Dispositivos intravaginales

Los dispositivos intravaginales impregnados con progesterona o progestágenos son frecuentemente utilizados para la sincronización de los celos en ovejas y cabras. Sin embargo, la fertilidad de estos tratamientos es más baja que la de una ovulación espontánea, lo que parece tener un origen multicausal. La presencia de los dispositivos en la vagina (esponjas o dispositivos de silicona) provoca cambios en el ambiente vaginal caracterizados por un incremento en el número y una alteración en la composición de la biota bacteriana además de cambios histológicos y citológicos de la pared vaginal. El crecimiento bacteriano es fundamentalmente basado en un aumento en las bacterias coliformes Gram-negativas (*E. coli* y *Klebsiella spp.*). Estas vaginitis son responsables por sí mismas de una significativa reducción en las tasas de concepción. La acumulación de productos bacterianos e inflamatorios en el entorno vaginal afecta la viabilidad espermática. Recientemente, observamos que los espermatozoides en contacto con moco vaginal de ovejas en celo sincronizado con esponjas presentan alteraciones en su funcionalidad y viabilidad. El resultado del uso de dispositivos intravaginales está condicionado no solo por la respuesta ovárica, sino también por los cambios que provoca en el ambiente vaginal normal (Syntex, 2014)

Otras variantes de dispositivos intravaginales son los realizados en silicona, impregnados con progesterona, que varían en sus formas, tamaños, y número de veces que pueden ser reutilizados (CIDR, Cronipres CO, DICO). Tratamientos con esponjas. Los tratamientos

tradicionales para sincronizar celos en caprinos consisten en la inserción de un dispositivo con progestágenos durante 12 a 14 días, lo que puede estar o no asociado a una dosis de prostaglandina y eCG. A partir de la incorporación de nuevos conocimientos en el área de la fisiología reproductiva se ha acortado la duración de estos tratamientos. En el caso de animales en anestro, los tratamientos aplicados durante 5-6 días son al menos tan efectivos como los tradicionales. En este caso, para obtener un alto porcentaje de animales que respondan, el tratamiento deberá asociarse a la administración de eCG, al retiro del dispositivo o al uso del efecto macho.

En animales ciclando, los tratamientos cortos requieren de una dosis de prostaglandina F2 alfa para asegurar la luteólisis, y eCG al momento de retirar el dispositivo para sincronizar la ovulación y/o aumentar la tasa ovulatoria, mediante este protocolo es posible inseminar todas las hembras en un mismo momento sin necesidad de detectar el estro, tecnología conocida como inseminación artificial a tiempo fijo o IATF. La IATF por vía cervical se realiza a las 48 y 52 h. después de retirar el dispositivo en ovejas y cabras respectivamente, y por vía intrauterina a las 54 h en ambas especies (Cueto y Gibbons, 1997).

La duración del tratamiento debe igualar o exceder la vida media del cuerpo luteo, es decir entre 10 a 14 días, manifestándose estro durante las primeras 48 horas posterior al retiro del dispositivo (Simonetti, 2008).

- Protocolos de Sincronización

Robinson, 1965) citado por (Burgos *et al.*, 2002), fue el primero en comunicar el éxito de estas esponjas de poliuretano impregnadas con (FGA) a la dosis de 30 – 45 mg por 14 a 16 días, de este modo convirtiéndose los progestágenos sintéticos más usados, el acetato de fluorogestona (FGA) o cronolona y el acetato de medroxiprogesterona (MAP) impregnados en esponjas, ambos de aplicación intravaginal siendo similar su efectividad (Burgos *et al.*, 2002).

Simulan la acción de un cuerpo lúteo mediante la liberación lenta de progesterona se colocan en la vagina de la hembra por 12-14 días, período de tiempo que iguala o excede el tiempo de vida media del cuerpo lúteo. Este método permite alcanzar una elevada concentración de celos y llevar a cabo la IA a un tiempo fijo luego de finalizado el tratamiento hormonal (IA sistemática). Asimismo concentra los estros fuera de la estación reproductiva, permitiendo la producción de corderos en contra-estación. Debido a que hay un porcentaje variable de ovejas que no responden al tratamiento o que no presentan la ovulación sincronizada con el resto, como así también a la alteración del transporte espermático producida por efecto de los progestágenos, se aconseja la utilización de progestágenos en forma combinada con una dosis de Gonadotrofina de Suero de Yegua Preñada (PMSG). (Cueto y Gibbons, 1997).

2.1.15. Las esponjas vaginales syntex

Son esponjas de poliuretano con azul de metileno c.s.p. impregnadas con 60 mg de acetato de Medroxiprogesterona. Este es un progestágeno sintético que se absorbe por vía vaginal. Aplicado en el canal vaginal durante 12 a 14 días actúa eficazmente como sincronizador de celos en ovejas y cabras (Sintex, 2004)

2.1.16. Diagnóstico de gestación

Es importante en los rebaños, Saber qué ovejas no están gestantes y cuales si es muy útil para el criador, ya que le permite corregir problemas, por ejemplo detectar una baja fertilidad y con ello tomar la decisión de re-empadrar, también permite prepararse para las etapas que vienen después del empadre desde el punto de vista nutricional, sanitario, de instalaciones o de disposición de personal para atender los partos, el diagnóstico de gestación se puede realizar por varios métodos como: Determinación de niveles serológicos de progesterona, biopsia vaginal, ultrasonografía (Nuncio y Escobedo, 2000).

2.1.16.1. Diagnóstico de gestación por ecografía

Conocer si las ovejas están gestando, es una información de mucho valor para el manejo de los predios y los recursos forrajeros. Para ello, se cuenta con un método rápido y eficiente. La ecografía es una técnica que permite realizar estudios de los tejidos y órganos internos, aplicable tanto a animales como a personas.

La ultrasonografía es una técnica de exploración de los órganos internos del cuerpo que consiste en registrar el eco de ondas de sonido enviadas hacia el lugar que se examina. De manera específica, se señala que dicha técnica se fundamenta en la emisión de ondas de sonido de alta frecuencia debido a la estimulación eléctrica de cristales que se encuentran en el transductor que a partir del contacto con los tejidos de diferentes densidades penetran, se absorben y rebotan (Ramírez, et al., 2009).

La ecografía o ultrasonografía es una técnica en la que se emplean ondas de sonido de alta frecuencia para producir imágenes, las cuales podemos visualizar a través de la pantalla del ecógrafo. La técnica de ecografía en producción ovina se incrementa cada día por el veterinario clínico y el especialista de biotecnología de la reproducción, constituyendo un medio de diagnóstico de certeza en la dinámica de las ondas foliculares, desarrollo del cuerpo lúteo, la determinación del estado de gestación precoz, sexado de las crías y la evaluación de los procesos patológicos del sistema reproductor (Simoes, *et al.*, 2006).

La aplicación de la ecografía o ultrasonografía es un método fácil, seguro y certero para detectar la preñez de manera detectar gestaciones múltiples sobre los 20-22 días (cuando el embrión mide aprox. 1 cm). La ecografía transrectal en

pequeños rumiantes solo es posible mediante un vástago o adaptador rígido por el transductor (Bellenda, 2006).

A partir de los 26 días de gestación, momentos en el cual el diagnóstico tiene una certeza muy alta (95 – 100%). La presencia de cotiledones placentarios a partir de los 40 días de gestación agiliza el trabajo, entre los 42 y 52 días de gestación es posible la detección de mellizos, la presencia de los latidos cardiacos, presencia de líquido amniótico a los 28 días, movimientos propios del feto a más de 38 días (Manazza, 2007).

2.1.17. Fertilidad en ovejas sincronizadas

Es el número de borregas preñadas después del servicio de inseminación artificial o monta natural, resulta del número de borregas inseminadas dividido por el número total de borregas inseminadas multiplicados por 100.

En el cuadro 2 se presentan la eficiencia de 3 tratamientos de sincronización de celo traducidos en porcentaje de preñez en ovejas merino, el tiempo requerido para la inseminación cervical con semen fresco, los porcentajes de preñez (ovejas inseminadas) y su eficiencia general (ovejas preñadas/ovejas tratadas) (Gibbons y Cueto, 2007).

Cuadro 2. Resumen de tratamientos para la sincronización de celo en
ovejas

TRATAMIENTO	PRESENTACIÓN DE ESTROS	% DE ESTRO	TIEMPO DE I.A.	% PREÑEZ	% EFICIENCIA GENERAL
Prost F2 ∞ (n400)	16 a 21 días post tratamiento	71	6 días	81	58
Esponja + 200UI eCG (n 100)	36 A 72 hr días post tratamiento	83	1.5 días	68	56
Esponja + eCG (n 100)	Sin detección IA tiempo fijo	-	2.5 días (54-56 h días post tratamiento)	72	67

FUENTE: (Gibbons y Cueto 2007).

Entre las 24 y 72 horas post-retiro de las esponjas y aplicación de PMSG, se presenta un 85-95% de las ovejas en celo, alcanzándose la mayor concentración de estros entre las 36 y 48 horas. La mayoría de las ovejas presenta la ovulación alrededor de las 60 horas post-retiro de las esponjas (Cueto y Gibbons, 1997).

En sincronización con esponjas intravaginales (EIV) impregnadas con 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP) por 14 días y al retiro vía intramuscular una dosis de 400UI de eCG. La I.A. mediante laparoscopia se dio las 60-65 horas con semen congelado/descongelado. La evaluación se hizo a través de 3 años de establecimiento, cuyo porcentaje de parición más alto obtenido fue de 68.42% (Seillant y Soto, 2004).

Se comparó la eficiencia de estos dos tratamientos al aplicarlos en borregas Romney Marsh de 6 a 8 meses de edad y con peso de 34 kg. I inicio del ensayo (tabla 3). Un grupo de animales se trató con

progesterona por 14 días para lo cual se utilizó un dispositivo intravaginal (Eazy-Breed). El otro grupo se sincronizó con prostaglandinas (PG2) en dosis de 5 mg de dinoprost en dos inyecciones con intervalo de 14 días. Se realizó monta natural con carneros que portaban chalecos marcadores y se midieron los niveles de progesterona en las borregas para analizar su actividad reproductiva (Sepúlveda, 1995).

Cuadro 3. Porcentaje de preñez en 2 protocolos de sincronización vs 1 y 2.

TRATAMIENTOS	CELOS	CELOS	PREÑEZ	PREÑEZ
	PRESENTADOS	DIA 2 Y 3	1° CELO	2° CELO
Progesterona	88 %	86 %	50 %	63 %
Prostaglandina	75%	67 %	50 %	63 %

FUENTE: (Sepúlveda, 1995)

En el Centro de Investigación y Producción Chuquibambilla, de la Universidad Nacional del Altiplano Puno se inseminaron 75 ovejas criollas con experiencia de parto y se distribuyeron de la siguiente manera: 25 ovejas para inseminar con semen congelado por vía cervical, 25 ovejas para inseminar vía vaginal y 25 ovejas control para inseminar con semen fresco (método tradicional). La inseminación artificial se realizó en época reproductiva junio 2010 obteniendo los siguientes porcentajes de fertilidad: 11/25 (68%) vaginal, 10/25(64%) y control 20/25(88%) ovejas gestantes (Pérez, et al; 2011).

Se evaluó la fertilidad sincronizando celo en 100 ovejas criollas adultas distribuidas al azar en 2 tratamientos; T1 esponjas

intravaginales con 60 mg de MAP y T2 DICO con 0.3 g de progesterona natural obteniendo 79.13% para MAP y 76.59% para DICO (Quico, 2015).

Se analizó el posible efecto del lugar de deposición del semen refrigerado sobre los resultados de fertilidad de ovejas inseminadas artificialmente por vía vaginal. Para ello se utilizaron ovejas de raza Merino Precoz. Tras el tratamiento de sincronización e inducción de celo mediante acetato de flurogestona (FGA) y eCG las ovejas fueron inseminadas con semen refrigerado procedente de tres reproductores. Obteniendo los siguientes resultados: La fertilidad total fue de 66.7% siendo más baja en las ovejas clasificadas en el grupo penetración profunda del catéter sin reflujo (57,1%), 64,4% en el grupo de penetración ligera del catéter con escaso reflujo a mitad o final de la inseminación y 87% en el grupo de penetración ligera del catéter con intenso reflujo desde el principio de la inseminación (Bravo y Roy., 2004).

Se evaluó la fertilidad de la inseminación artificial sistemática cervical (IASC) del semen ovino refrigerado a 5°C durante 12 o 24 horas en 200 ovejas adultas de la raza Merino, fueron sincronizadas con esponjas intravaginales impregnadas con 60 mg de acetato de medroxiprogesterona, las cuales permanecieron colocadas durante 14 días. Al finalizar el trabajo dio como resultado mayor porcentaje de preñez en la IASC con el semen refrigerado durante 12 h (32%) respecto al semen preservado durante 24 h (11%) A su vez, la eficiencia fue mayor con la dosis de inseminación de 300 millones de

espermatozoides (29%) en comparación con la dosis de 150 millones (14%). La preservación seminal durante 12 h alcanzó el 25% y 38% de preñez con la dosis de inseminación de 150 y 300 millones de espermatozoides. El semen preservado por 24 h presentó el 3% y 19% de preñez con las dosis inseminantes de 150 y 300 millones de espermatozoides, respectivamente. El grupo control (semen fresco) evidenció una preñez del 59% valor de referencia de las condiciones generales de trabajo de la majada de experimentación (Naim, y col., 2006).

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Ubicación

El presente trabajo de investigación se realizó en la comunidad de Condorcuyo y I Chimpa Jallapisi del distrito de Azángaro, provincia Azángaro, región Puno.

Altitud: 3859 msnm, coordenadas geográficas: 14°54'35"S 70°11'50"O y extensión: 533.47 km² (Climate-data.org 2012).

3.2. Material experimental

Para la ejecución del trabajo se utilizaron los siguientes materiales

3.2.1. Ovejas

Cien ovejas criollas madres con buen estado de salud a partir del segundo parto, de los diferentes productores de ovinos, del distrito de Azángaro, distribuidos en 2 grupos: 1(50), 2(50)

IATF SEMEN FRESCO	IATF SEMEN REFRIGERADO
50 ovejas	50 ovejas

IATF: Inseminación Artificial a Tiempo Fijo.

3.2.2. Reproductores

Se utilizó 02 reproductores machos PDP de la raza Corriedale con fertilidad comprobada, de propiedad de la Municipalidad Provincial de Azángaro, de 04 dientes, sanos y entrenados para la colección de semen.

3.2.3. Instalaciones

Cada productor proporcionó instalaciones adecuadas para las borregas a experimentar (cobertizo, comedero y bebedero).

3.2.4. Insumos

3.2.4.1. Progespón

Se utilizó 100 unidades de esponjas intravaginales compuesto por esponjas de poliuretano impregnadas con acetato de Medroxiprogesterona 60 mg (MAP).

3.2.4.2. Novormon

Se utilizó 300 UI de eCG, (Gonadotropina Coriónica Equina) por borrega.

3.2.4.3. Dilutor de semen

Se utilizó dilutor comercial llamado Andromed® compuesto por:

Agua bidestilada

Fructosa.

Glicerol

Fosfolípidos

Ácido cítrico

Antibióticos (lincomicina 15.0 mg, tylosina 5.0 mg, gentamicina 25mg).

3.3. Metodología

3.3.1. Preparación de Reproductores

Se inició con una fase pre-experimental, un mes antes del inicio de la inseminación artificial se preparó a los reproductores esquilando la parte baja de la barriga con el fin de facilitar la extracción del semen sin contaminarlos, además, se aplicó vitaminas (ADE) y antiparasitarios (albendazoles y prazicuantel), luego se le acostumbró a la vagina artificial a una temperatura de 40°C.

3.3.2. Colección de semen

La colección de semen se realizó durante 5 días consecutivos a las 05 a.m. en el establo de la Municipalidad de Azángaro, utilizando un brete para la colección del semen, para ello se puso delante del carnero una borrega en celo para proceder a la colección utilizando una vagina artificial a 40°C.

3.3.3. Evaluación del Semen

La evaluación del semen se realizó para cada eyaculado, evaluando los siguientes parámetros:

3.3.3.1. Evaluación macroscópica

Se realizó inmediatamente después de la extracción del semen tomando todas las precauciones del caso, las características evaluadas fueron las siguientes:

a) Volumen

El volumen se determinó por lectura directa de un tubo graduado en ml, inmediatamente después de la colección.

b) El color

Se observó directamente del semen obtenido en la copa colectora.

3.3.3.2. Evaluación microscópica

Las características evaluadas fueron las siguientes.

a) Motilidad masal

Se evaluó inmediatamente después de la colección, para ello se colocó una gota de semen en una lámina portaobjetos, el movimiento masal de los espermatozoides fue observada y calificada en una escala de 1 al 5 con la ayuda de un microscopio óptico a un aumento de 100X.

b) Vitalidad

Para completar la evaluación se realizó un frotis: coloración vital, morfología y acrosomía, pudiéndose evaluar éstos dos últimos en el mismo frotis, con la tinción adecuada determinando el porcentaje de células espermáticas vivas y muertas, se realizó la tinción con los colorantes eosina y nigrosina de la siguiente manera:

- Se colocó una gota de semen puro en una lámina porta objetos temperatura a 37°C.

- Seguidamente se colocó al costado del semen puro, los colorantes eosina-nigrosina a una temperatura de 37°C.
- Una vez homogenizado se realizó el frotis colocando otra lámina porta objetos en ángulo de 45° y se obtuvo una película fina.
- Luego la lámina con el frotis se dejó reposar sobre la platina temperada a 37°C por 30s.
- Para realizar la lectura se llevó al microscopio a un aumento de 40X, donde se realizó el conteo de células espermáticas.
- Se consideraron vivos a los espermatozoides que no se colorearon

El fundamento de esta técnica es el siguiente: el colorante penetra la membrana de los espermatozoides muertos, dejando sin teñir los que se encontraban vivos al momento de realizar la tinción. Para sacar el porcentaje de espermatozoides vivos se procede a observar el frotis a 40X, contando todos los espermatozoides de cada campo evaluado, discriminando los que están teñidos, como muertos y los sin teñir como vivos. Se cuentan no menos de 100 células y se saca el porcentaje. Se considera como valor mínimo aceptable, el 70 % de espermatozoides vivos.

c) Acrosoma

Esta evaluación se realizó por medio de endósmosis, cuya solución y medio de lavado estaba compuesto por citrato de sodio, fructuosa y agua bidestilada, para determinar la integridad de la membrana plasmática, los espermatozoides fueron

expuestos a medio hipo-osmótico para ello las muestras fueron en un aumento de 400X con el procedimiento siguiente:

- En un tubo Falcon de 10 ml de capacidad se colocó 1ml de solución hipo osmótico, la misma que fue temperada en un recipiente de agua 37°C.
- El semen fue calentado a 37°C y de ello se tomó una alicuota de 0,05 ml de semen que fue colocado en el tubo Falcon que contenía una solución hipo-osmótico, se homogenizó suavemente y se dejó incubar por 1 h. Pasado el tiempo necesario, se procedió a montar una muestra sobre una lámina porta objetos y cubierta con una lámina cubre objetos, se contabilizaron como reacción positiva a todos aquellos espermatozoides que tenían la cola hinchada y enrollada, también fueron contabilizados aquellos espermatozoides que presentaron reacción positiva, para de esa manera determinar el porcentaje de espermatozoides con membrana intacta con la siguiente formula: (Jeyendran, *et al.*1984).

$$N = \frac{X}{Y} \times 100$$

Donde:

N = % de espermatozoides con reacción positiva

X = Número de espermatozoides con reacción positiva

Y = Número de espermatozoides contados

d) Motilidad Individual Progresiva

La evaluación de la motilidad individual en el semen refrigerado fue evaluada al momento de la dilución inicial y posteriormente a las 6, 12 y 24 horas. Las muestras fueron observadas a un aumento de 400X con el procedimiento siguiente:

- Una vez calentada a 37°C, se colocó una gota de semen sobre una lámina porta objetos y luego fue cubierta con una lámina cubre objetos a la misma temperatura.
- A continuación, se realizó la lectura de la motilidad individual, para ello se contabilizaron los espermatozoides con movimiento y los estáticos para luego obtener el porcentaje de motilidad con la siguiente formula:

$$MI = \frac{N}{Y} \times 100$$

Donde:

MI = % de motilidad de espermatozoides

N = Número de espermatozoides móviles

Y = Número total de espermatozoides contados

3.4. Dilución del semen

La dilución del semen fue en una proporción de 1:1 ml (semen: dilutor) empleando dilutor comercial (AndroMed®), asegurándose una cantidad más de 100 a 150 millones de espermatozoides totales por dosis de inseminación. La dilución se llevó a cabo a 36°C teniendo presente que el diluyente se agregará con pipeta limpia, seca y entibiada, dejándolo escurrir por las paredes del tubo de recolección.

3.4.1. Preparación del dilutor

Se calentó 2 ml de diluyente (agua destilada) a 36°C. Se añadió 8 ml de dilutor (Andromed®) calentado previamente a 36°C y se mezcló suavemente evitando de esa manera el choque térmico.

3.4.2. Refrigeración del semen

Una vez terminada la dilución, el semen fue llevado a refrigeración con el objetivo de lograr que el semen baje de temperatura de 37°C en un tiempo promedio de 1,5 h a 5°C (Evans y Maxwell, 1978).

3.4.3. Conservación del semen fresco y refrigerado

Semen fresco: el semen que va a emplearse inmediatamente después de su recolección, se mantuvo a 36°C - 37°C en baño maría ya sea puro o diluido.

Semen refrigerado: se conservó a 5°C por 24 h. y se realizó en una caja térmica con bolsas de gel refrigerante para conducirlo hasta el laboratorio para su posterior evaluación a los 0, 6, 12 y 24 h. a 5°C.

3.5. Inseminación artificial a tiempo fijo. (IATF)

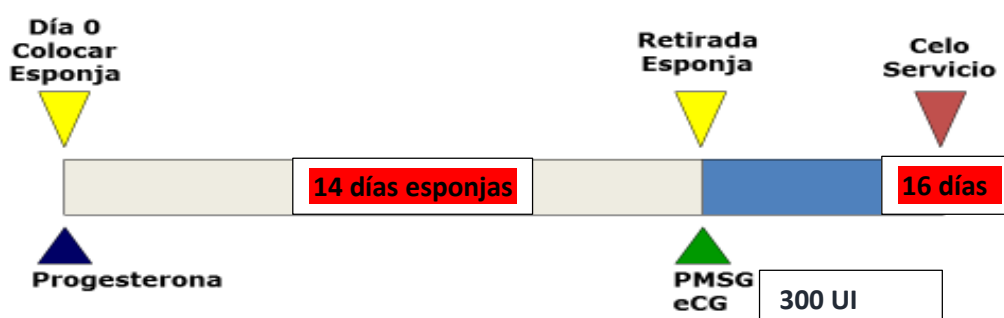
Se seleccionó cien borregas criollas madres de diferentes productores de la comunidad de Condorcuyo y I Chimpa Jallapisi tomando en cuenta que sean madres de segundo parto, buen estado de salud con ancas amplias con el fin de evitar partos distócicos.

3.5.1. Protocolo de sincronización

Se colocó esponjas intravaginales a todas las borregas el día 0, dejándose ahí por 14 días al término de este tiempo fueron retiradas aplicándose 300 U.I de eCG y se inseminó a los 16 días.

El protocolo utilizado fue el siguiente:

Grafico 1. Protocolo de sincronización MAP 14 días + eCG en UI



Los pasos seguidos para la colocación de los dispositivos fueron:

- Sujeción de las borregas tomadas al azar para el experimento, colocando el cuello de la borrega entre las piernas del operador lo que permitió la inmovilización de la borrega permitiendo la limpieza de la región perianal con toallas húmedas con la finalidad de retirar restos de heces, costras etc. para evitar posibles infecciones.
- Para la inserción de las esponjas vaginales se utilizó un aplicador humedecido externamente con vaselina líquida con la finalidad de no ocasionar lesión alguna en el ingreso hacia el lumen vaginal.

- Se aplicó un antibiótico en polvo (oxitetraciclina) directamente a la bolsa de las esponjas para luego comprimirlas dentro del aplicador e introducir el aplicador previamente humedecido con vaselina neutra aperturando los labios vulvares para no contaminar el tracto reproductivo depositando en la entrada de la cérvix, luego retirar el aplicador dejando libre el hilo.
- Luego se aplicó un compuesto de vitaminas y minerales con alto contenido de selenio (Nutrimin).
- Pasado los 14 días, los dispositivos intravaginales fueron retirados para ello las borregas fueron sujetadas convenientemente por el operador.
- Se ubicó el extremo libre del hilo del dispositivo intravaginal desde los labios vulvares, para luego ser removidos de manera lenta con los dedos con guantes de látex traccionándolo hacia atrás y hacia abajo.
- Algunas borregas presentaron adherencia de los dispositivos a la pared vaginal entonces se procedió a la debridación con la ayuda de un vaginoscopio y una pinza simple estéril.
- Las borregas que no presentaron el hilo a nivel de los labios vulvares, se observó la presencia de la esponja dentro de la vagina con la ayuda de un vaginoscopio, una vez visualizado el extremo del hilo fue extraído con la ayuda de una pinza simple

- La administración de eCG fue realizada por vía intramuscular profunda con una jeringa de 5 ml teniendo en cuenta todos los cuidados de asepsia y antisepsia, según la siguiente metodología:
- En una caja térmica (Cooler) a una temperatura interna de 5°C se transportó el diluyente frasco de 25 ml, y los frascos con el principio activo (prostaglandina, 5,000 U.I.).
- Antes de realizar la aplicación se mezcló, extrayendo el diluyente con una jeringa estéril de 20 ml e introduciendo dentro del frasco que contenía la eCG liofilizado, se homogenizo y se dejó dentro de la caja térmica.
- Se cargó 300 U.I (1.5 ml) y se aplicó la inyección intramuscular profunda.

3.5.2. Inseminación artificial a tiempo fijo con semen fresco

Para realizar la inseminación artificial a los dieciséis días post retiro de las esponjas se reunió a las borregas sincronizadas en un ambiente cerrado libre de rayos solares, donde se trasladó a los reproductores en un vehículo motorizado.

3.5.3. Inseminación artificial a tiempo fijo con semen refrigerado

Para la inseminación con semen refrigerado se colectó semen por la mañana a las 5 a.m., luego se refrigeró, según la técnica descrita y se mantuvo a 5°C hasta después de 6 horas trasladando el semen refrigerado en una caja térmica a 5°C al lugar de borregas sincronizadas y en un ambiente cerrado se procedió a la inseminación.

La inseminación cervical con semen fresco diluido y semen refrigerado se realizó mediante una pistola de inseminación multidosis, que permite mediante un émbolo dentado, inseminar varias borregas, así como graduar el volumen de la dosis, para ello las hembras se presentan inclinadas cabeza-abajo, sujetado por un ayudante, se limpió la vulva con una toalla de papel descartable y se aplicó vaselina para facilitar la introducción del vaginoscopio. Este se introdujo lentamente hasta el fondo de la vagina de la hembra, donde se localizó la cérvix. En el caso de presencia de moco abundante que dificulta su localización, se evacuó el flujo cervical con la ayuda del vaginoscopio inclinando a la oveja hacia abajo.

3.5.4. Diagnóstico de gestación a través de la ecografía transrectal

El diagnóstico de gestación se realizó con un ecógrafo transrectal a los 60 días post inseminación artificial por vía cervical. Se utilizó el transductor lineal de un ecógrafo portátil / para ecografía polivalente / blanco y negro / consola integrada 3W-2000, imagen del ultrasonido de B/W.

El transductor del ecógrafo fue acondicionado con un guante obstétrico, al cual se le aplicó gel ecográfico, al mismo tiempo fue lubricado con vaselina líquida.

Las borregas fueron sujetadas e inmovilizadas por los productores, realizando la limpieza y evacuación de las heces del recto.

Una vez introducido el transductor del ecógrafo se localizó los cuernos uterinos, guiándose por la vejiga, con el objeto de observar la

presencia o ausencia de la vesícula embrionaria o cuerpo embrionario (patrón ecográfico anecogénico).

3.5.5. Determinación del porcentaje de fertilidad

La fertilidad fue determinada utilizando la siguiente formula:

Fertilidad. - Es el número de borregas que quedan preñadas posterior al servicio.

$$\% \text{ Fertilidad} = \frac{N^{\circ} \text{ Borregas preñadas}}{N^{\circ} \text{ Borregas empadtradas}} \times 100$$

Dónde: F (%) tasa de fertilidad en porcentaje

Fuente: (Alencastre, 1997)

3.6. Análisis estadístico

En el presente trabajo de investigación se empleó el análisis de varianza (ANVA) para determinar diferencias estadísticas entre medias obtenidas en las muestras de semen refrigerado a las 0, 6, 12, y 24 horas y para la determinación de la tasa de fertilidad se utilizó el análisis estadístico de ji cuadrado cuyas formula son:

Tabla 1. ANVA para promedios (Motilidad, vitalidad y acrosoma).

F. de V.	G.L.	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F
Tiempos	t - 1	$\sum_{i=1}^t \frac{y_i^2}{r} - \frac{y^2}{tr}$	SC_{trat} / gl_{trat}	CM_{trat} / CM_{ee}
Error	t (r - 1)	SCtotal - Sctrat	SC_{ee} / gl_{ee}	
Total	t r - 1	$\sum_{i=1}^t \sum_{j=1}^r y_{ij}^2 - \frac{y^2}{tr}$		

Fórmula de prueba de JI CUADRADO.

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^k \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

Donde:

O_i = Frecuencia observada

E_i = Frecuencia esperada

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Motilidad individual en el semen fresco diluido

La motilidad individual en semen fresco diluido de los carneros en promedio fue de 87.25% con valores extremos de 82 a 91% (tabla 10)

Cuadro 1. Porcentaje de motilidad, vitalidad y acrosoma

TIEMPOS	MOTILIDAD	VITALIDAD	ACROSOMA
0 horas	74.06	69.21	72.89
6 horas	64.25	65.09	64.74
12 horas	53.81	54.25	54.97
24 horas	46.43	46.42	47.42
Promedio	59.63	58.74	60
ANVA	P ≥ 0.05 n.s.	P ≥ 0.01 a.s.	P ≥ 0.05 n.s

4.2. Motilidad individual en semen refrigerado

Los resultados (Cuadro 1) del 74.06% (0h) comparado con la literatura y reportado por Quispe (1998) quien obtiene 78.35 % utilizando el dilutor tris-yema de huevo y 78.3% con leche-yema de huevo y ambos resultados son ligeramente inferior al presente.

Por su parte, Ramírez et al. (2001), trabajando con semen refrigerado, encontró 85.2 % de motilidad individual con dilutor Tris–Fructosa–Yema de huevo, 84.2 % con dilutor Citrato–Glucosa–Yema de huevo y 85.8 con dilutor leche descremada. Delgado (2015) evaluando la calidad del espermatozoide de ovinos tratados en dos tiempos por gradientes de

densidad obtuvo 85.54% (0 h) de motilidad individual del semen diluido con Triladyl® que contiene yema de huevo.

Ésta diferencia sea probablemente por efecto del dilutor porque el utilizado en el presente experimento (AndroMed ®) no contiene sustancias de origen animal ya que el plasma seminal sólo otorga al espermatozoide una protección limitada contra los cambios bruscos de temperatura, el uso de diluyentes que contienen agentes protectores de la membrana celular durante el enfriamiento a 5°C (generalmente yema de huevo) y/o el congelamiento (generalmente glicerol) es de vital importancia (Cortez, 1997). Las células deben ser protegidas contra las bajas temperaturas mediante la adición de compuestos orgánicos como la leche descremada o la yema de huevo (Vishwanathy y Shannon, 2000) que aumentan la resistencia de la membrana a los cambios de permeabilidad e impiden que los espermatozoides acumulen calcio al alterarse el sistema de intercambio iónico de la membrana (Bearden, 1980).

El promedio de motilidad obtenidos en la presente investigación a las 24 h fue de 46.43 % que son inferiores por los reportados por Delgado (2015) y Quispe (1998) 82.44 % a las 24 h.

La motilidad individual obtenida en el presente trabajo en diferentes tiempos 74.06 % (0 h), 64.25 % (6), 53.82 % (12 h) y 46.43% (24 h) tuvo una disminución gradual de la motilidad a medida que aumenta el tiempo de refrigeración a 5°C concordamos con Ramírez et al. (2001) 75.0 % (2h), 77.5 % (10 h), 67.5% (18 h) y Quispe (1998). Durante la evaluación del semen de los carneros se puede considerar como regular por cuanto

presenta una motilidad de 59.63% en promedio general de espermatozoides vivos, lo cual es equivalente a una calificación de motilidad regular cuando el rango es de 60 a 80 % de motilidad individual, de acuerdo a varios autores consideran que tienen un movimiento de onda lento con una motilidad progresiva aparente, con desplazamiento moderado, que traducido en otras palabras tendrían los espermatozoides permanente grado de energía para fecundar.

Para los resultados del presente trabajo de investigación se realizaron un análisis de varianza no encontrándose diferencia estadística a $P (\geq 0.05)$.

Así mismo, Paulenz et al. (2002), no observaron diferencia estadística en motilidad progresiva al monitorear semen diluido a 5°C durante 0, 6, 24 y 30 horas. Morrier et al. (2002), obtuvieron resultados similares al probar la adición o no adición de glicerol en semen conservado a 5°C durante 0, 8, 16 y 24 horas. Ellos observaron que la adición del glicerol no afectaba la motilidad en los diferentes tiempos, manteniéndose esta ligeramente por debajo de la motilidad inicial ($84 \pm 3.3\%$).

4.3. Vitalidad en semen refrigerado.

Los promedios de la vitalidad en el semen refrigerado encontrados fueron: 69.21% (0 h), 65.09% (6), 54.24% (12) y 46.42% (24) altamente significativo ($P \leq 0.01$) (Tabla 1).

En lo referente a la vitalidad se nota que hay una diferencia altamente significativa en el tiempo de evaluación ($P \leq 0.01$) lo que nos dice que la vitalidad no es lo mismo en los diferentes momentos que se evaluó, lo cual también ha podido ser influenciado por el evaluador y su sistema o

modalidad de considerar un espermatozoide vital, porque es sabido que espermatozoide en movimiento no significa un eficiente poder fecundante, porque se conoce que en ella intervienen muchos factores como vigor espermático (mínimo de 3 en una escala de 1 a 5). Morfología espermática (máximo 20 – 30 %) de defectos totales, dependiendo esto último de la concentración de espermatozoides con motilidad progresiva.

4.4. Acrosoma en semen refrigerado

Los promedios de la integridad de membrana encontrados fueron: 60% sin diferencia estadística a un ($P \geq 0.05$) (Cuadro 7)

Vargas (2015) reportó resultados similares en ovinos criollos (59.33 %) y superiores a los encontrado en carneros Corriedale (56.87 %) con valores extremos de 41 – 78 %, y para ovinos Texel 48 % muy por debajo de lo reportado.

Con relación a la integridad del acrosoma, se observó que no hay diferencia estadística en la morfología espermática ($P \geq 0.05$) lo que nos podría indicar que la integridad de la membrana plasmática del espermatozoide no ha sufrido en demasía en su integridad morfológica y funcional, lo cual como se dijo anteriormente, puede ser una ventaja para efectos de conservación por que los espermatozoides estarían íntegros a las 24 horas después de la colección, consecuentemente con capacidad fecundante.

Se puede concluir que las evaluaciones en el laboratorio han demostrado que el semen diluido y refrigerado a 5°C muestra una gran variabilidad en sobrevivencia y fertilidad en las siguientes 72 horas de conservación. Existen

algunos diluyentes en los cuales los espermatozoides de carnero pueden conservarse a 4°C durante 8 a 15 días con una buena viabilidad y con fertilidad aceptable a los 8 días (Salomón y Maxwell, 2000). Efecto de la raza sobre la integridad de membrana celular intacta en semen refrigerado en semen diluido a 5°C.

4.5. Fertilidad obtenida en borregas

Los resultados de fertilidad fueron: 76% para ovejas inseminadas con semen fresco y 59.5 % para ovejas inseminadas con semen refrigerado.

Se encontró al análisis estadístico utilizando el Ji cuadrado a una P (≥ 0.01) que existe una diferencia altamente significativa.

Cuadro 2. Porcentaje de preñez en ovejas inseminadas con semen fresco vs semen refrigerado.

DESCRIPCION	Semen Fresco	Semen refrigerado
Número de borregas sincronizadas	50	50
Número de borregas inseminadas	47	47
Numero de borregas preñadas	36	28
% de Fertilidad	76.6	59.5

De los resultados del cuadro 2 se puede destacar que de las 100 borregas criollas sincronizadas en ambos tratamientos como semen fresco (T1 = 50 borregas) y semen refrigerado (T2 = 50 borregas), el número de borregas inseminadas fue de 47 debido a que 2 borregas perdieron su esponja y una

murió por cuestiones de manejo en el T1 y en el T2 se inseminaron 47 borregas de igual forma 3 esponjas se perdieron.

El 76,6% de fertilidad obtenido con semen fresco es inferior a lo reportado por Pérez, *et al.*(2011) 88% de fertilidad en ovejas control inseminando con semen fresco (método tradicional) y similares a lo encontrado por Quico (2015) 76.59 % de fertilidad en borregas criollas sincronizadas con DICO(0.3 g de Progesterona natural) e inferior en borregas sincronizadas con MAP (60 mg de acetato de medroxiprogesterona) 79.13 % y superior a lo encontrado por Naim y col. (2006) 59% en grupo control con semen fresco.

Por lo tanto, la alta fertilidad en la inseminación artificial con semen fresco se debe a la estacionalidad reproductiva que está controlada por factores ambientales, destacándose el fotoperiodo como el más constante. Aquellos genotipos que se desarrollan en la región ecuatorial, sujetos a menores variaciones en el fotoperiodo responden más a factores ambientales como temperatura y disponibilidad de alimento, por lo que pueden tener menor restricción estacional que aquellos que se desarrollan en zonas templadas o lejanas al ecuador, las cuales responden principalmente a las variaciones de luz y oscuridad. (Angulo y Mejía, 2003).

Este hecho es muy meritorio resaltar por cuanto se puede comprobar que el sistema reproductor y el sistema endocrinológico de las borregas criollas es eficiente, junto a una adecuada alimentación y manejo, así mismo, se puede afirmar que el ovino criollo es una buena alternativa para iniciar un programa de mejoramiento genético del ovino.

En la tabla se muestra un promedio de 59.5 % de fertilidad en borregas inseminadas con semen refrigerado a un tiempo mayor a 6 horas que es inferior a lo reportado por Bravo y Royse (2004) se puede concluir que quienes sincronizaron e indujeron el celo mediante acetato de fluorogestrona (FGA) y eCGe inseminadas con semen refrigerado. Obteniendo 66.7% de fertilidad total, Naim y col (2006) obtuvo resultados inferiores con semen refrigerado a las 32 % (12 h) y 11% (24 h) con dosis de 150 millones y con dosis de 300 millones 25% (24 h) y 38 % (12 h).

V. CONCLUSIONES

- En la evaluación motilidad individual del semen refrigerado se obtuvo como promedio general 59.63% a las 0 h (74.06 %), 6 h (64.25%), 12 h (53.81%) y 24 h (46.43%) no habiendo diferencia estadística a ($P \geq 0.05$).

Con respecto a la vitalidad se encontró 58.74 % de promedio general y para las 0 h (69.21%), 6 h (65.09 %), 12 h (54.25 %) y 24 h (46.42%) siendo altamente significativo a $P (\geq 0.01)$.

Para acrosoma se obtuvo 60.00 % de promedio general y para las 0 h (72.89 %), 6 h (64.74 %), 12 h (54.97%) y 24 h (47.42%) no encontrando diferencia estadística a $P (\geq 0.05)$.

- La fertilidad obtenida en las borregas fue de 76.6 % con semen fresco.
- La fertilidad con semen refrigerado es de 59.5% encontrando diferencia altamente significativa a $P (\geq 0.01)$.

VI. RECOMENDACIONES

- Para hacer extensivo los resultados se deben realizar trabajos de validación con mayor número de animales y con mejores condiciones de manejo pos inseminación.
- Se recomienda confirmar los resultados de este estudio utilizando un mayor número de carneros y en un periodo mayor de tiempo.
- Es necesario hacer estudios de tasas de preñez con semen refrigerado dentro las 6, 12, ,24 y 48 horas.
- Los datos obtenidos en el presente trabajo de investigación pueden ser utilizados como referencia para realizar programas de inseminación artificial con semen fresco (IATF) a nivel de sistemas de producción intensiva y extensiva con diferentes concentraciones (UI) de Prostaglandinas (eCG)) para incrementar el porcentaje de fertilidad y natalidad.

VII. REFERENCIAS

- Aisen, E. (2004). Recolección y evaluación de semen. Reproducción Ovina y Caprina. 1era ed. Buenos Aires: Inter-Médica.
- Aliaga, J. (2006). Producción de Ovinos. Universidad Nacional Agraria La Molina 1ra ed. Editores Juan Gutemberg. Lima. Perú.
- Angulo, B., O. Mejía (2003) Curso teórico-práctico "Inseminación artificial en ovinos" "Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos.
- Arroyo, J. y J. Gallegos, A. Godoy, J. Méndez, (2006). Sistemas neuronales de retroalimentación durante el ciclo reproductivo anual de la oveja.
- Bailey, J., y M. Buhr, (1994). Cryopreservation alters the Ca²⁺ flux of bovine spermatozoa. Can. J. Anim. Sci. 74: 45 - 51.
- Bearden, J., y J. Fuquay, (1982) Reproducción animal aplicada. 1era ed. México. El Manual Moderno; p.135 - 250.
- Bellenda, O. (2006). El ultrasonido o ecografía aplicada a la reproducción animal. Asesoría Privada.
- Bravo, J. A. y T. J. Roy, (2004). "Resultados de Fertilidad de ovejas inseminadas artificialmente según el lugar de deposición del semen refrigerado" Servicio de Producción Agraria Unidad de Reproducción y Obstetricia. Facultad de Veterinaria. UEX-España.
- Brito, L., A. Barth, G., O. Bilodeau, S. Eseels, P. Panich, y J. Kastelic, (2003) Comparisson of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rateo. Theriogenology. 1539 - 1551.
- Borque, S. (1992). Variaciones estacionales de los niveles de fructuosa, ácido cítrico y proteínas totales en eyaculados de morruecos de la raza manchega. Invest. Agr. Prod. Sanit. Anim. 7 (3) 235-240.

- Burgos, R., L., F Hancke, Botana, y T. Jiménez. (2002). "Estrógenos, andrógenos y progestágenos". Farmacología y terapéutica veterinaria. 7ª Ed. México, Ed. Mc Graw Hill Interamericana, P. 411-434.
- Cabrera, P., y C. Pantoja, (2008). Influencia de los dilutores tris y ovinefreezing sobre la integridad de la membrana citoplasmática durante la congelación de semen de ovinos en pajillas de 0.5 ml. Rev. Investig. Vet. 152 - 159.
- Cáceres D. Belma Esrlalia (2013) Evaluación espermática del semen de ovino tratado por la técnica de gradiente de densidad.
- Cardenas, H. (1997). Control Artificial del ciclo estral en ovinos. Memoria: I Symposium internacional: Avances en reproducción de rumiantes APPA.17 – 18.
- Casey, P., C. Gravance, R. Davis, D. Chabt, y I. Liu, (1997). Morphometric differences in sperm head dimensions of fertile and subfertile stallions. Theriogenology. 575 - 582.
- Climate-data.org 2012.
- Colas, G. (1997). Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep-frozen ram semen. JournalReproductionFertility. 277 - 285.
- Cordova, A., G. Ruiz, J. Saltijeral, J. Pérez, y T. Degefa, (1999). Inducción y sincronización de celos en ovejas criollas anestrícas estacionales con esponjas vaginales impregnadas en FGA y PMSG inyectable. Arch 48:437 – 440.
- Cormier, N., M, Sirard, J. Bailey (1997) Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by criopreservación. J. Androl: 461 - 467.
- Cortéz, G. (1997). Efecto de la conservación sobre la fisiología espermática de semen caprino (tesis Doctoral). Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense. Madrid, España.

- Craplet, C. (1961). El Cordero: Reproducción, alimentación y enfermedades. 2da edición. Editorial Veterinaria. Salamanca – España.
- Cueto, M., y A. Gibbons, (1997). Efecto de la dosis de PMSG en la Inseminación Artificial Intrauterina sistemática o con detección de estros. Instituto de Tecnología Agropecuaria Bariloche itea. rio negro – argentina. 18 (2): 440 – 442.
- Evans, G., y W. Maxwell, (1990). Salamon´s Artificial Insemination of Sheep and Goats. United Kingdom. Butterworth.
- Fernández, A., N. Villegas, y M. Bellagamba, (1998). Comparación de la fertilidad obtenida con semen conservado a 5° C utilizando diferentes diluyentes y métodos de inseminación. Producción Ovina. 51 - 62.
- Folch, J., J. Alabart, (2000). II Congreso latinoamericano de especialistas en pequeños rumiantes y camélidos sudamericanos y XI Congreso Nacional de Producción Ovina, Aragonés – España.
- Gibbons, A., M, Cueto., M. Wolff, J. Arrigo y J, V. García (1993). Obtención, Procesamiento y conservación del Semen Ovino. Manual de divulgación. Comunicación Técnica de Producción Animal del INTA Bariloche N° 443
- Gibbons, A., M. Cueto, (1997) Reproducción & Genética Instituto Nacional de Tecnología Estación Experimental Agropecuaria Bariloche ITEA Rio Negro-Argentina
- Gibbons, M., A., Cueto, M. J. Wolff, Arrigo, y J. García (2004). Obtención, procesamiento y conservación del semen ovino. Comunicación técnica PA 200. INTA. EEA Bariloche, Chile.
- Gibbons, A., M. Cueto, (2007). Manual de inseminación artificial en la especie ovina. Instituto nacional de tecnología agropecuaria. INTA. Bariloche.
- Gonzales, M. (1980). Largo del estro y del ciclo estral en borregas Corriedale del altiplano. Tesis F.M.V.Z. UNA – PUNO.

- Guillén, H. (2001) Evaluación de las características seminales en carneros Blackbelly (tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú.
- Hafez, E. (1996). Reproducción e Inseminación Artificial en animales. 7ma edición. Editorial Interamericana McGraw – Hill. México.
- Hammerstedt, R., J. Graham, and J. Nolan, (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *Journal of Andrology*. 11: 73-88.
- INEI (Resultados Definitivos IV Censo Nacional Agropecuario 2012).
- Jeyendran, R., H. M. Van Der Ven., Perez-Pelaez., B. Crabo, y 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. Reproduction fertility* 70, 219-228.
- Jimeno, V., Castro. (2007) Reproducción e Inseminación Artificial en Animales, EUITA. Facultad de Veterinaria, UCM. COPYRIGHT. Interciencia Asociaton. Publication Date: 09- Jun-08.
- Machaca, E. (1998). Efecto de la concentración espermática de semen fresco y congelado sobre el porcentaje de gestación en ovinos Corriedale del C.E.CH. Tesis FMVZ. UNA – PUNO.
- McDonald, L. (1981). Reproducción en Endocrinología Veterinaria. 2da edición. Editorial Interamericana. México.
- Madrid, M. y E. Bohada, (1993). Características de un buen reproductor bovino. Centro de Investigaciones Agropecuarias del Estado Zulia Maracaibo, Venezuela. FONAIAP Divulga. N° 44.
- Manazza, E. (2007). Diagnóstico de Preñes en ovinos. Grupo sanidad animal E.E.A. INTA. Balcarce. Argentina.

- Maxwell, M., T. Strojanov, (1996). Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. *Reprod. Fertil. Dev.*, 8, 1013-20.
- Maxwell, W. M., y S. Salamon, (1993). Liquid storage of ram semen: review. *Reprod. Fertil. Dev.* 1993; 5: 613 - 638.
- Merino, G. (2003) Estudios preliminares en capacitación in-vitro de espermatozoides ovinos frescos y congelados (tesis de Licenciatura). Escuela de Medicina Veterinaria. Universidad Austral de Chile. Chile.
- Morrier, A., F. Castonguay, y J. Bailey, (2002) Glycerol addition and conservation of fresh and cryopreserved ram spermatozoa. *Can. J. Anim. Sci.* 347
- Naim, P., M. Cueto y A. S. Gibbon (2006) Inseminación Artificial a Tiempo Fijo con semen de Ovino Refrigerado. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Estación Experimental Bariloche. ITEA Rio Negro-Argentina.
- Nuncio, O. y A. Escobedo. (2000) diagnóstico de los sistemas de producción Ovina. Tabasco. III Diversificación productiva de las unidades de producción ovina. En memoria de la XIII. Reunión Científica-Tecnológica Forestal y agropecuaria. Villahermosa. Tabasco. México. P 307.
- Paulenz H., R. Söderquist, Pérez-PE., K. Andersen (2002). Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. *Theriogenology.*; 57: 823 - 836. - 356.
- Pérez, M., T. Quispe, F. Quispe, E. Aguirre, M. Quispe, U. Pérez, (2011) Inseminación Artificial con semen congelado en ovejas por vía vaginal y cervical en el altiplano peruano *Revista de Ciencias Veterinarias ESPERMOVA* Vol. 1(1). Lima.
- Peña, A., and C. Linde-Forsberg. (2000). Effects of spermatozoa concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa. *Theriogenology* 54: 703-718.

- Pérez-Llano, B., J. González M., Clemente, P. García-Casado, (1999). El test de endosmosis (HOST) en semen de ganado porcino. *Albeitar*. 30: 16 -17.
- Pérez y F. Pérez, (1985) *Reproducción Animal: Inseminación Artificial y Trasplante de Embriones*. Barcelona, España. Edit. Científico Médica; 1985.
- Perez, U., M. Perez, E. Mellisho (2011) Viabilidad Espermática en semen de carnero congelado por dos métodos *Revista de Ciencias Veterinarias ESPERMOVA* Vol. 1(1). Lima.
- Quico, G. (2015). *Métodos de sincronización del estro para la inseminación artificial a tiempo fijo con semen fresco en ovejas criollas en Paucarcolla Puno*
- Ramírez, C., A. Gallegos, y R. Gutiérrez, (2001). Efecto de tres dilutores y diferentes tiempos de refrigeración en la motilidad individual y el pH del semen refrigerado en ovinos Blackbelly (tesis de Licenciatura). INIA. Lima, Perú.
- Ramírez, V., R. Robson, C. Aguilar., D. Benítez. (2009). *Ecografía: Herramienta para el ordenamiento productivo de la majada*. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. N° 450. ISSN N° 0327-3059. http://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta_ecografa_en_ovinos.pdf
- Salomon, S., y W. Maxwell (2000). Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 62: 77-111.
- Santiani, A. (2003). *Criopreservación de semen de ovino: efecto de la adición de antioxidantes al diluyente*. Tesis para obtener el grado de Magister en ciencias mención en biología de la reproducción. Facultad de Medicina, universidad de la frontera. Temuco-Chile.

- Sepúlveda, N., y R. Mansilla. (1995). Relación entre niveles de testosterona y circunferencia escrotal en carnerillos RomneyMash. XX Reunión Anual de la sociedad chilena de producción animal. Coquimbo. Chile.
- Sintex. (2004). Esponjas Vaginales Sintex® w.w.w. viarural.com.ar/viarural.com.ar
- Simoës, J., J. Potes., J. Azevedo., J. Almeida., P. Fontes., G. Baril., y R. Mascarenhas. (2005) Morphometry of ovarían structures by transrectal ultrasonography in serrana Goats. Anim. Reprod. Sci 85: 263.
- Simonetti, L. (2008). Simplificación de los métodos de superovulación en ovejas de la raza Corriedale. Universidad Politécnica de Valencia. Departamnto de ciencia animal – 2008-12-15 / 3104 02. España.
- Tamuli, M., P. Watson (1992). Effects of temperature of incubation on the development of resistance to cold stress in boar spermatozoa incubated for up 24 hrs. Proc. 12th ICAR Congress. TheHaugue. p. 1484 - 1486.
- Urviola, S. (1990). “Efecto de la edad y sexo sobre el primer celo monta post-destete y medidas biométricas en ovinos criollos”. Tesis Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAP. Perú.
- Vargas, P. (2015). “Efecto del factor dilutor y raza en la integridad de la membrana espermática y acrosomal en semen crioconservado de carneros Tesis Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAP. Perú.
- Vazquez, J., E. Martinez, P. Martinez, Garcia-Artiga, J. Roca, (1997) Hipoosmotic Swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analyzing the sperm membrane. Theriogenology. 47: 913 - 922.
- Vivianco, M. (1988). Inseminación artificial en ovinos. Memorias del Seminario Internacional Aplicaciones de Técnicas Biotecnológicas en la Reproducción de Ovinos y Caprinos. Chapingo, México.

Vishwanathy, R. y P. Shannon, (2000) Storage of bovine semen in liquid and frozen state. Anim. Reprod. Sci.; 62: 23 - 53.

Watson, P. (1975). Artificial insemination and the preservation of semen Marshall's. Physiology of reproduction in the male. Edimburgo. Pg 747-869.[https:// es.climate-data.org](https://es.climate-data.org) 2017

ANEXOS:

FOTOS



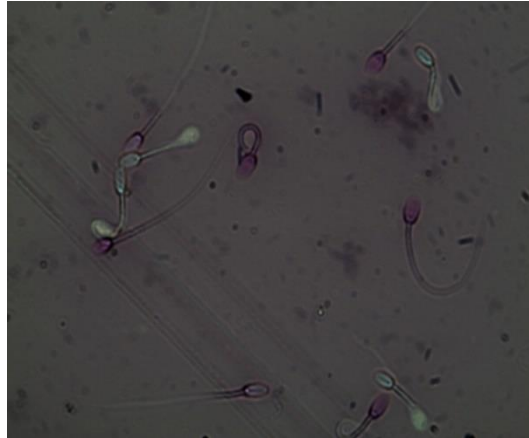
















ANEXOS DE MATERIALES Y EQUIPOS UTILIZADOS.**MATERIALES Y EQUIPOS UTILIZADOS EN EL TRABAJO DE INVESTIGACION**

- Ecógrafo portátil / para ecografía polivalente / blanco y negro / consola integrada 3W-2000, imagen del ultrasonido de B/W.
- Microscopio compuesto.
- Aplicadores de dispositivos intravaginales
- Pistola micro dosis para inseminación artificial.
- Microscopio portátil monofocal
- Termómetro digital.
- Vaginoscopio
- Vagina artificial para ovinos.
- Funda para la vagina artificial.
- Jeringas descartables de 5ml.
- Laminas cubre y porta objetos.
- Vaselina neutra.
- Papel toalla.
- Marcadores.
- Tubos Falcon graduados
- Termo casero para agua.
- Equipo de baño maría.
- Balanza de 5kg. Tipo reloj.
- caja de Tecnofhor

Materiales de toma de datos

- Libreta de campo
- Registros y fichas de selección, inseminación y parición.

- Fichas de evaluación.
- Lápiz, lapicero, Plumones, resaltadores, etc.

Otros materiales

- Material de escritorio
- Computadora

TABLAS

TABLA 1. Promedios de la motilidad individual del semen refrigerado.

MOTILIDAD TOTAL (%)					
Horas	0 horas	6 horas	12 h	24h	
Promedios	74.47	65.84	61.23	51.22	
Promedios	75.85	64.74	51.84	49.61	
Promedios	82.87	67.54	53.41	40.90	
Promedios	61.75	57.89	51.63	45.79	
Promedios	75.37	65.24	50.92	44.65	
Totales	370.31	321.25	269.03	232.17	
Prom. Total	74.062	64.25	53.806	46.434	59.63

TABLA 2. Valores extremos en la motilidad individual del semen refrigerado

	0 horas	6 horas	12 horas	24 horas
N	5	5	5	5
Promedio (%)	74,06	64,25	53,82	46,43
Valores extremos	61.75 - 82,87	57,89 – 67.54	50,92- 61,23	40,90 – 51,22

TABLA 3. Análisis de varianza de la motilidad para semen refrigerado con promedio de 59.63 % sin diferencia estadística ($P \leq 0.05$)

	F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.C	Sig.
Tiempos		3	2187.7258	729.241	26.773	N.S.
Error experimental		16	428.3727	26.773		
Total		19	2616.0985			

TABLA 4. Promedios de la vitalidad en semen refrigerado

VITALIDAD (%)					
Horas	0 horas	6 horas	12 h	24h	
Promedios	63.84	63.84	61.2	48.81	
Promedios	76.12	68.73	59.67	46.04	
Promedios	68.62	66.03	52.15	48.72	
Promedios	62.32	62.96	52.19	43.64	
Promedios	75.141	63.92	46.03	44.88	
Totales	346.041	325.48	271.24	232.09	
Prom. Total	69.2082	65.096	54.248	46.418	58.74

TABLA 5. Valores extremos de la vitalidad del semen refrigerado

	0 horas	6 horas	12 horas	24 horas
N	5	5	5	5
Promedio (%)	69.21	65.10	54.25	46.42
Valores extremos	62.32 – 76.12	62.96 – 68.73	46.034 – 61.20	43.64 – 48.82

TABLA 6. Análisis de varianza para vitalidad del semen refrigerado con promedio 58.74 % siendo altamente significativo ($P \geq 0.01$).

	F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.C	Sig.
Tiempos		3	28.703	9.567	Grande	Altamente significativo
Error experimental		16	0	0		
Total		19	81907.840			

TABLA 7. Promedios de acrosoma del semen refrigerado

INTEGRIDAD DE MENBRANA (%)					
Horas	0 horas	6 horas	12 h	24h	
Promedios	72.16	68.36	64.37	50.85	
Promedios	76.22	61.79	59.82	48.33	
Promedios	72.48	69.84	53.55	49.34	
Promedios	66.46	61.59	47.85	46.29	
Promedios	77.15	62.13	49.24	42.29	
Totales	364.47	323.71	274.83	237.106	
Prom. Total	72.894	64.742	54.966	47.4212	60.00

TABLA 8. Valores extremos del acrosoma del semen refrigerado

	0 horas	6 horas	12 horas	24 horas
N	5	5	5	5
Promedio (%)	72.89	64.74	54.97	47.42
Valores extremos	66.46 – 77.153	61.79 – 69.84	47.85 – 64.37	42.29 – 50.85

TABLA 9. Análisis de varianza para acrosoma del semen refrigerado siendo 60.00% sin diferencia estadística a un ($P \geq 0.05$).

	F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.C	Sig.
Tiempos		3	74366	24.778	183.283	N.S.
Error experimental		16	2163.976	135.248		
Total		19	2238.342			

TABLA 10. Resumen de parámetros seminales de los carneros en semen fresco

REPETICION	VOLUMEN	COLOR	MOTILIDAD MASAL	VITALIDAD	MOTILIDAD INDIVIDUAL EN SEMEN DILUIDO %
1	0.5	BLANCO CREMOSO	4.5	91.02	82.0
2	1.0	BLANCO CREMOSO	4.0	91.07	90.0
3	0.8	BLANCO CREMOSO	5.0	85.95	87.0
4	0.9	BLANCO CREMOSO	5.0	93.85	86.0
5	1.2	BLANCO CREMOSO	5.5	91.04	91.0
PROMEDIOS	0.88		4.8	90.59	87.2

TABLA 11. Diagnóstico de preñes en ovejas inseminadas con semen fresco

N°	MICROCUCENCA	COMUNIDAD CAMPESINA	ARETE Y/O CODIGO DE BORREGA	CODIGO DE CARNERO	FECHA DE INSEMINACION	DX PREÑEZ	OBSERVACIONES
1	Azangaro II	I Chimpa Jallapisi	2718	2801	01/12/2016	Positivo	
2	Azangaro II	I Chimpa Jallapisi	2711	2801	01/12/2016	Positivo	
3	Azangaro II	I Chimpa Jallapisi	2716	2801	01/12/2016	Positivo	
4	Azangaro II	I Chimpa Jallapisi	2715	2801	01/12/2016	Negativo	
5	Azangaro II	I Chimpa Jallapisi	2714	2801	01/12/2016	Positivo	
6	Azangaro II	I Chimpa Jallapisi	2713	2801	01/12/2016	Positivo	
7	Azangaro II	I Chimpa Jallapisi	2712	2801	01/12/2016	Positivo	
8	Azangaro II	I Chimpa Jallapisi	2731	2801	01/12/2016	Negativo	
9	Azangaro II	I Chimpa Jallapisi	2732	2801	01/12/2016	Positivo	
10	Azangaro II	I Chimpa Jallapisi	2733	2801	01/12/2016	Negativo	
11	Azangaro II	I Chimpa Jallapisi	2734	2801	01/12/2016	Positivo	
12	Azangaro II	I Chimpa Jallapisi	2735	2801	01/12/2016	Positivo	
13	Azangaro II	I Chimpa Jallapisi	2736	2801	01/12/2016	Positivo	
14	Azangaro II	I Chimpa Jallapisi	2737	2801	01/12/2016	Positivo	
15	Azangaro II	I Chimpa Jallapisi	2738	2801	01/12/2016	Positivo	
16	Azangaro II	I Chimpa Jallapisi	2739	2801	01/12/2016	Negativo	
17	Azangaro II	I Chimpa Jallapisi	2791	2801	01/12/2016	Negativo	
18	Azangaro II	I Chimpa Jallapisi	2792	2801	01/12/2016	Np	
19	Azangaro II	I Chimpa Jallapisi	2793	2801	01/12/2016		Perdida Esponja
20	Azangaro II	I Chimpa Jallapisi	2794	2801	01/12/2016	Positivo	
21	Azangaro II	I Chimpa Jallapisi	2795	2801	01/12/2016	Negativo	
22	Azangaro II	I Chimpa Jallapisi	2796	2801	01/12/2016	Positivo	
23	Azangaro II	I Chimpa Jallapisi	2797	2801	01/12/2016	Positivo	
24	Azangaro II	I Chimpa Jallapisi	2798	2801	01/12/2016	Positivo	
25	Azangaro II	I Chimpa Jallapisi	2799	2801	01/12/2016	Positivo	
26	Azangaro II	I Chimpa Jallapisi	2730	2801	01/12/2016	Positivo	
27	Azangaro II	I Chimpa Jallapisi	2729	2801	01/12/2016	Positivo	
28	Azangaro II	I Chimpa Jallapisi	2728	2801	01/12/2016	Positivo	
29	Azangaro II	I Chimpa Jallapisi	2772	2801	01/12/2016	Positivo	
30	Azangaro II	I Chimpa Jallapisi	2725	2801	01/12/2016	Negativo	
31	Azangaro II	I Chimpa Jallapisi	2726	2801	01/12/2016	Positivo	
32	Azangaro II	I Chimpa Jallapisi	2724	2801	01/12/2016	Positivo	
33	Azangaro II	I Chimpa Jallapisi	2723	2801	01/12/2016	Positivo	
34	Azangaro II	I Chimpa Jallapisi	2727	2801	01/12/2016	Negativo	
35	Azangaro II	I Chimpa Jallapisi	2721	2801	01/12/2016	Positivo	

36	Azangaro II	I Chimpa Jallapisi	2759	2801	01/12/2016	Positivo	
37	Azangaro II	I Chimpa Jallapisi	2758	2801	01/12/2016	Negativo	
38	Azangaro II	I Chimpa Jallapisi	2757	2801	01/12/2016	Positivo	
39	Azangaro II	I Chimpa Jallapisi	2755	2801	01/12/2016	Positivo	
40	Azangaro II	I Chimpa Jallapisi	2756	2801	01/12/2016	Positivo	
41	Azangaro II	I Chimpa Jallapisi	2754	2801	01/12/2016	Positivo	
42	Azangaro II	I Chimpa Jallapisi	2753	2801	01/12/2016	Negativo	
43	Azangaro II	I Chimpa Jallapisi	2752	2801	01/12/2016		Esponja perd.
44	Azangaro II	I Chimpa Jallapisi	2751	2801	01/12/2016	Positivo	
45	Azangaro II	I Chimpa Jallapisi	2750	2801	01/12/2016	Negativo	
46	Azangaro II	I Chimpa Jallapisi	2749	2801	01/12/2016	Positivo	
47	Azangaro II	I Chimpa Jallapisi	2748	2801	01/12/2016	Positivo	
48	Azangaro II	I Chimpa Jallapisi	2747	2801	01/12/2016	Positivo	
49	Azangaro II	I Chimpa Jallapisi	2746	2801	01/12/2016	Positivo	
50	Azangaro II	I Chimpa Jallapisi	2745	2801	01/12/2016	Positivo	

TABLA 12. Diagnóstico de preñes en ovejas inseminadas con semen refrigerado

N°	MICROCUENCA	COMUNIDAD CAMPESINA	ARETE Y/O CODIGO DE BORREGA	CODIGO DE CARNERO	FECHA DE INSEMINACION	DX PREÑEZ	OBSERVACIONES
1	AZANGARO II	CONDORCUYO	1945	2091	02/12/15	Positivo	
2	AZANGARO II	CONDORCUYO	1946	2091	02/12/15	Negativo	
3	AZANGARO II	CONDORCUYO	1942	2091	02/12/15	Positivo	
4	AZANGARO II	CONDORCUYO	1940	2091	02/12/15	Negativo	
5	AZANGARO II	CONDORCUYO	1941	2091	02/12/15	Positivo	
6	AZANGARO II	CONDORCUYO	1943	2091	02/12/15	Positivo	
7	AZANGARO II	CONDORCUYO	1944	2091	02/12/15	Negativo	
8	AZANGARO II	CONDORCUYO	1937	2091	02/12/15	Negativo	
9	AZANGARO II	CONDORCUYO	1938	2091	02/12/15	Positivo	
10	AZANGARO II	CONDORCUYO	1939	2091	02/12/15	NP	
11	AZANGARO II	CONDORCUYO	1931	2091	02/12/15	Positivo	
12	AZANGARO II	CONDORCUYO	1932	2091	02/12/15	Negativo	
13	AZANGARO II	CONDORCUYO	1935	2091	02/12/15	Positivo	Muerte
14	AZANGARO II	CONDORCUYO	1934	2091	02/12/15	Negativo	
15	AZANGARO II	CONDORCUYO	1936	2091	02/12/15	Positivo	
16	AZANGARO II	CONDORCUYO	1933	2091	02/12/15	Negativo	
17	AZANGARO II	CONDORCUYO	1949	2091	02/12/15	Positivo	
18	AZANGARO II	CONDORCUYO	1921	2091	02/12/15	Positivo	
19	AZANGARO II	CONDORCUYO	1950	2091	02/12/15	Negativo	
20	AZANGARO II	CONDORCUYO	1922	2091	02/12/15	Negativo	
21	AZANGARO II	CONDORCUYO	1923	2091	02/12/15	Positivo	
22	AZANGARO II	CONDORCUYO	1924	2091	02/12/15	Negativo	
23	AZANGARO II	CONDORCUYO	1912	2091	02/12/15	Positivo	
24	AZANGARO II	CONDORCUYO	1913	2091	02/12/15	Positivo	

25	AZANGARO II	CONDORCUYO	1911	2091	02/12/15	Negativo	
26	AZANGARO II	CONDORCUYO	1930	2091	02/12/15	Negativo	
27	AZANGARO II	CONDORCUYO	1925	2091	02/12/15	Positivo	
28	AZANGARO II	CONDORCUYO	1927	2091	02/12/15	Positivo	
29	AZANGARO II	CONDORCUYO	1924	2091	02/12/15	Positivo	
30	AZANGARO II	CONDORCUYO	1926	2091	02/12/15	Positivo	
31	AZANGARO II	CONDORCUYO	1928	2091	02/12/15	Negativo	
32	AZANGARO II	CONDORCUYO	1915	2091	02/12/15		Muerte
33	AZANGARO II	CONDORCUYO	1914	2091	02/12/15	Positivo	
34	AZANGARO II	CONDORCUYO	1917	2091	02/12/15	Negativo	
35	AZANGARO II	CONDORCUYO	1916	2091	02/12/15	Positivo	
36	AZANGARO II	CONDORCUYO	1902	2091	02/12/15	Positivo	
37	AZANGARO II	CONDORCUYO	1920	2091	02/12/15	Positivo	
38	AZANGARO II	CONDORCUYO	1919	2091	02/12/15	Positivo	
39	AZANGARO II	CONDORCUYO	1918	2091	02/12/15	Positivo	
40	AZANGARO II	CONDORCUYO	1901	2091	02/12/15	Negativo	
41	AZANGARO II	CONDORCUYO	1947	2091	02/12/15	Positivo	
42	AZANGARO II	CONDORCUYO	1948	2091	02/12/15	Positivo	
43	AZANGARO II	CONDORCUYO	tatuaje	2091	02/12/15	Negativo	
44	AZANGARO II	CONDORCUYO	1995	2091	02/12/15	Positivo	
45	AZANGARO II	CONDORCUYO	Tatuaje	2091	02/12/15	Positivo	
46	AZANGARO II	CONDORCUYO	1994	2091	02/12/15	Negativo	
47	AZANGARO II	CONDORCUYO	Tatuaje	2091	02/12/15	Negativo	
48	AZANGARO II	CONDORCUYO	Tatuaje	2091	02/12/15	Positivo	
49	AZANGARO II	CONDORCUYO	Tatuaje	2091	02/12/15	Positivo	
50	AZANGARO II	CONDORCUYO	tatuaje	2091	02/12/15	Negativo	