

**UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURÍMAC**  
**FACULTAD DE MEDINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



TESIS

Evaluación de dos dilutores sobre características espermáticas antes y después de la congelación  
del semen de carneros Hampshire Down

Presentado por:

Emerson Huayca Ignacio

Para optar el Título de Médico Veterinario y Zootecnista

Abancay, Perú

2019



UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURÍMAC  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



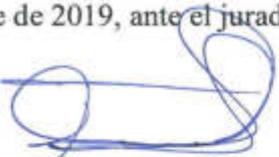
TESIS

“EVALUACIÓN DE DOS DILUTORES SOBRE CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS  
ANTES Y DESPUÉS DE LA CONGELACIÓN DEL SEMEN DE CARNEROS  
HAMPSHIRE DOWN”

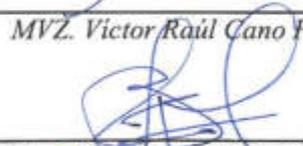
Presentado por **Emerson Huayca Ignacio**, para optar el Título de:  
Médico Veterinario y Zootecnista

Sustentado y aprobado el 20 de diciembre de 2019, ante el jurado evaluador:

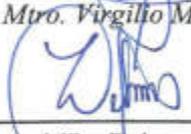
**Presidente:**

  
\_\_\_\_\_  
*MVZ. Victor Raúl Cano Fuentes*

**Primer Miembro:**

  
\_\_\_\_\_  
*Mtro. Virgilio Machaca Machaca*

**Segundo Miembro:**

  
\_\_\_\_\_  
*MSc. Delmer Zea Gonzales*

**Asesor:**

  
\_\_\_\_\_  
*Dr. Ulises Sandro Quispe Gutiérrez*

## **Agradecimientos**

*A la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac, por la gran oportunidad para formarme profesionalmente como Médico Veterinario y Zootecnista.*

*A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por mi formación en el sendero del conocimiento para aportar con conocimiento a la sociedad.*

*Al Dr. Ulises Sandro Quispe Gutiérrez, por el asesoramiento para la realización del presente estudio, porque sin el apoyo, la exigencia, los consejos, las críticas, no hubiera sido posible realizar el presente estudio.*

*A los miembros del Jurado Evaluador: MVZ. Víctor R. Cano Fuentes, MSc. Delmer Zea Gonzales y Mtro. Virgilio Machaca Machaca, por los aportes incondicionales como jurados para poder llevar adelante el presente estudio.*



## **Dedicatoria**

*Dedico esta tesis en primer lugar a Dios, seguido a mis padres; Gregorio y Virginia, por ser el motivo más importante para lograr uno de mis objetivos anhelados en la vida que es ser un profesional de éxito para la sociedad.*

*A mis hermanos y hermanas por motivarme cada día a seguir adelante y alcanzar una de las metas y objetivos que es obtener el título profesional de Médico Veterinario y Zootecnista.*

*A mis abuelos que en paz descansen, siempre me inculcaron la responsabilidad, el respeto, el sacrificio de ser un buen ciudadano, aportando a la sociedad con el conocimiento y las experiencias de un profesional.*



“Evaluación de dos dilutores sobre características espermáticas antes y después de la congelación del semen de carneros Hampshire Down”

Línea de investigación: Ciencias Veterinarias

Esta publicación está bajo una Licencia Creative Commons



## ÍNDICE

	Pág.
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>2</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>3</b>
<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>4</b>
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	<b>4</b>
1.1 Descripción del problema .....	4
1.2 Enunciado del problema .....	5
1.2.1 Problema general .....	5
1.2.2 Problemas específicos .....	5
1.2.3 Justificación de la investigación .....	5
<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>7</b>
<b>OBJETIVOS E HIPÓTESIS</b> .....	<b>7</b>
2.1 Objetivos de la investigación .....	7
2.1.1 Objetivo general .....	7
2.1.2 Objetivos específicos .....	7
2.2 Hipótesis de la investigación .....	7
2.2.1 Hipótesis general .....	7
2.2.2 Hipótesis específicos .....	8
2.3 Operacionalización de variables .....	8
<b>CAPÍTULO III</b> .....	<b>9</b>
<b>MARCO TEÓRICO REFERENCIAL</b> .....	<b>9</b>
3.1 Antecedentes .....	9
3.2 Marco referencial .....	20
	I



3.2.1	Importancia del ganado ovino .....	20
3.2.2	Carnero Hampshire Down .....	20
3.2.3	Fisiología reproductiva del carnero .....	21
3.2.4	Colección del semen de carnero .....	22
3.2.5	Características espermáticas y evaluación del semen.....	22
3.2.6	Congelación del semen.....	29
3.2.7	Dilutores del semen .....	31
3.2.8	Componentes del dilutor de semen.....	34
3.3	Marco conceptual .....	39
3.3.1	Semen .....	39
3.3.2	Espermatozoide .....	40
3.3.3	Espermatogénesis .....	40
3.3.4	Dilutor.....	41
3.3.5	Criopreservación.....	41
<b>CAPÍTULO IV.....</b>		<b>42</b>
<b>METODOLOGÍA.....</b>		<b>42</b>
4.1	Tipo y nivel de la investigación.....	42
4.2	Diseño de la investigación.....	42
4.3	Población y muestra .....	42
4.3.1	Población .....	42
4.3.2	Muestra .....	42
4.4	Técnica e instrumentos .....	43
4.4.1	Localización .....	43
4.4.2	Animales y diseño experimental.....	43
4.4.3	Preparación de dilutores .....	43
4.4.4	Colección del semen.....	44
4.4.5	Dilución del semen .....	45
4.4.6	Evaluación del semen .....	45
4.4.7	Equilibramiento de temperatura para el semen y dilutores .....	48
4.4.8	Empajillado del semen .....	49
4.4.9	Congelación del semen.....	49



4.4.10 Almacenamiento de pajuelas .....	49
4.4.11 Descongelamiento del semen .....	49
4.5 Análisis estadístico .....	49
<b>CAPÍTULO V .....</b>	<b>51</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>51</b>
5.1 Análisis de resultados .....	51
5.1.1 Motilidad total espermática .....	51
5.1.2 Motilidad espermática progresiva .....	53
5.1.3 Vitalidad .....	55
5.1.4 Integridad funcional de la membrana plasmática .....	58
<b>CAPÍTULO VI.....</b>	<b>61</b>
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>	<b>61</b>
6.1 Conclusiones.....	61
6.2 Recomendaciones .....	61
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>62</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>72</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Variables de la investigación.....	8
Tabla 2. Composición del dilutor Tris.....	32
Tabla 3. Composición de la yema de huevo de gallina .....	36
Tabla 4. Composición de la yema de huevo de codorniz.....	37
Tabla 5. Composición del dilutor Triladyl® (T2) para 10 mL.....	44
Tabla 6. Composición del dilutor Tris-YHG+C (T1). Para 10 mL .....	44
Tabla 7. Preparación de la solución HOST .....	48
Tabla 8. Porcentaje de motilidad total (media $\pm$ desviación estándar) de espermatozoides de carneros, diluidos con Triladyl® y Tris-YHG+C antes y después de la congelación.....	51
Tabla 9. Porcentaje de motilidad progresiva (media $\pm$ desviación estándar) de espermatozoides de carneros, diluidos con Triladyl® y Tris-YHG+C antes y después de la congelación.....	53
Tabla 10. Porcentaje de la vitalidad (media $\pm$ desviación estándar) de espermatozoides de carneros, diluidos con Triladyl® y Tris-YHG+C antes y después de la congelación.....	55
Tabla 11. Porcentaje de la integridad funcional de la membrana plasmática (media $\pm$ desviación estándar) de espermatozoides de carneros, diluidos con Triladyl® y Tris-YHG+C antes y después de la congelación .....	58
Tabla 12. Base de datos de la evaluación espermática antes y después de la congelación del semen de carneros.....	73
Tabla 13. Análisis de Varianza mediante el Modelo Lineal Generalizado (GLM) para dilutores Triladyl y Tris-YHG+C en la Motilidad Total antes y después de la congelación .....	76
Tabla 14. Análisis de Varianza mediante el Modelo Lineal Generalizado (GLM) para dilutores Triladyl y Tris-YHG+C en la Motilidad Progresiva antes y después de la congelación.....	76
Tabla 15. Análisis de Varianza mediante el Modelo Lineal Generalizado (GLM) para dilutores Triladyl y Tris-YHG+C en la Vitalidad antes y después de la congelación .....	77
Tabla 16. Análisis de Varianza mediante el Modelo Lineal Generalizado (GLM) para dilutores Triladyl y Tris-YHG+C sobre HOST antes y después de la congelación.....	77
Tabla 17. Análisis de Varianza mediante el Modelo Lineal Generalizado (GLM) y prueba de Tukey de Motilidad Total antes y después de la congelación .....	77
Tabla 18. Análisis de Varianza mediante el Modelo Lineal Generalizado (GLM) y prueba de Tukey de Motilidad Progresiva antes y después de la congelación .....	78



Tabla 19. Análisis de Varianza mediante el Modelo Lineal Generalizado (GLM) y prueba de Tukey de Vitalidad antes y después de la congelación .....	78
Tabla 20. Análisis de Varianza mediante el Modelo Lineal Generalizado (GLM) y prueba de Tukey de HOST antes y después de la congelación.....	79



## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Carneros utilizados para colección de semen.....	80
Figura 2. Separación de yema de huevo de la clara del huevo de codorniz y de gallina .....	80
Figura 3. Preparación de dilutores del semen.....	81
Figura 4. Colección de semen de carnero.....	81
Figura 5. Semen colectado con vagina artificial.....	82
Figura 6. Terma con semen colectado para transportar al laboratorio .....	82
Figura 7. Preparación de los tratamientos para su evaluación.....	83
Figura 8. Empajillado de la dilución de semen por tratamientos .....	83
Figura 9. Caja de poliestireno para congelación de semen con nitrógeno líquido .....	84
Figura 10. Congelación convencional del semen .....	84
Figura 11. Almacenamiento de pajillas con semen de carnero .....	85
Figura 12. Frotis de espermatozoides con Eosina/Nigrosina .....	85
Figura 13. Evaluación de vitalidad con Eosina/Nigrosina de espermatozoides, objetivo 40X .....	86
Figura 14. Evaluación de integridad funcional de la membrana plasmática (positivo: membrana funcional).....	86

## INTRODUCCIÓN

La crianza ovina a nivel nacional es de esencial importancia en las poblaciones rurales económicamente, en la zona alto andina del territorio peruano a los 3000 y 4200 msnm se encuentra con mayor énfasis la crianza ovina. El ovino ha logrado mantenerse e integrarse con otras crianzas como; bovinos y camélidos sudamericanos a altitudes por arriba de los 4000 msnm (1). La crianza de ovina se sitúa en pequeños productores mayormente, como consecuencia limita la utilización de tecnologías reproductivas, esta reduce el mejoramiento genético con consecuencias de baja productividad. Sin embargo, actualmente se ponen en práctica con más frecuencia las tecnologías bioreproductivas, que facilitan lograr cambios de significancia en la producción de la descendencia (2).

La inseminación artificial despertó interés de los productores, con el propósito de mejorar la calidad genética y los sistemas de explotación del rebaño. Uno de los aspectos positivos de esta tecnología es que permite disponer de ovinos reproductores genéticamente valorados, permitiendo la congelación de semen para la utilización eficiente y racional, así mismo, es posible incrementar la utilización de los reproductores, aminorar el costo-beneficio de producción y lograr machos genéticamente valorados (3). En muchos países, la inseminación artificial ovina se aplica utilizando semen fresco diluido o refrigerado (4). La utilización del semen congelado posibilita una mayor precisión de selección, debido a la falta de utilización de animales con genética superior permitiendo adquirir mayor impacto sobre los programas de mejoramiento animal y dependiendo de la etapa tecnológica del hato, esta ventaja supera las restricciones técnicas impuestas para su utilización (5). Los espermatozoides no están capacitados para sobrevivir a la congelación, por lo que reaccionan de manera diferente al proceso de enfriamiento y recalentamiento, según especies animales y la variación individual, las lesiones por congelación son más graves en el espermatozoide ovino que en el espermatozoide bovino, reduciendo su capacidad fecundante (6,7). La elección de dilutores es esencial, su composición es importante tener en cuenta, el tipo de sustancia tampón, la naturaleza de los crioprotectores, los aditivos como azúcares, los quelatos de calcio, los antioxidantes y las proteínas de leche o de la yema de huevo, han revelado una profunda influencia en la viabilidad de los espermatozoides (4,6). Por tanto, los dilutores que se usan durante la congelación del semen deben contribuir con las condiciones adecuadas para la viabilidad de los espermatozoides en la inseminación artificial ovina.



## RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar las características espermáticas antes y después de la congelación del semen de carneros Hampshire Down, diluidos con Triladyl® y Tris-yema de huevo de gallina mezclado con yema de huevo de codorniz (Tris-YHG+C). Se utilizaron tres carneros Hampshire Down, entre 1.5 a 2 años de edad, el semen se colectó con vagina artificial dos veces por semana ( $n = 30$  eyaculados). Se evaluaron las características espermáticas en semen fresco diluido antes y después de la congelación: Motilidad Total (MT), Motilidad Progresiva (MP), Vitalidad e Integridad Funcional de la Membrana Plasmática (Endosmosis). Se realizó el análisis de varianza de las variables de respuesta. Las características espermáticas antes de la congelación fueron similares ( $P > 0.05$ ) entre dilutores Triladyl® vs. Tris-YHG+C (MT:  $85.7 \pm 4.2$  vs.  $84.6 \pm 4.4\%$ ; MP:  $73.6 \pm 4.1$  vs.  $73.7 \pm 4.1\%$ ; Vitalidad:  $86.8 \pm 4.2$  vs.  $85.6 \pm 4.7\%$ ; Endosmosis:  $75.5 \pm 4.5$  vs.  $75.1 \pm 4.1\%$ ). Después de la congelación también fueron similares ( $P > 0.05$ ) entre dilutores (MT:  $44.7 \pm 5.7$  vs.  $43.8 \pm 4.6\%$ ; MP:  $29.4 \pm 3.2$  vs.  $27.6 \pm 3.1\%$ ; Vitalidad:  $45.6 \pm 5.8$  vs.  $44.7 \pm 4.7\%$ ; Endosmosis:  $30.0 \pm 3.3$  vs.  $28.2 \pm 3.2\%$ ). Entre semen fresco diluido y posdescongelado hubo diferencia ( $P \leq 0.05$ ), MT:  $85.1$  vs.  $44.2\%$ , MP:  $73.7$  vs.  $28.5\%$ , Vitalidad:  $86.2$  vs.  $45.1\%$  y Endosmosis:  $75.3$  vs.  $29.1\%$ . En conclusión, las características espermáticas del semen de carnero, no fueron afectados por los dilutores Triladyl® o Tris-YHG+C; mientras por el factor congelamiento, si fueron afectados.

**Palabras Clave:** Espermatozoide, criopreservación, motilidad, vitalidad, endosmosis.

## ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate the sperm characteristics before and after the freezing of the Hampshire Down sheep semen, diluted with Triladyl® and Tris-Chicken egg yolk mixed with quail egg yolk (Tris-YHG+C). Three Hampshire Down rams were used, between 1.5 and 2 years old, semen was collected with artificial vagina twice a week ( $n = 30$  ejaculates). The sperm characteristics were evaluated in fresh semen diluted before and after freezing: Total Motility (MT), Progressive Motility (MP), Vitality and Functional Integrity of the Plasma Membrane (Endosmosis). The analysis of variance of the response variables was performed. The sperm characteristics before freezing were similar ( $P > 0.05$ ) between Triladyl® vs. dilutors Tris-YHG+C (MT:  $85.7 \pm 4.2$  vs.  $84.6 \pm 4.4\%$ ; MP:  $73.6 \pm 4.1$  vs.  $73.7 \pm 4.1\%$ ; Vitality:  $86.8 \pm 4.2$  vs.  $85.6 \pm 4.7\%$ ; Endosmosis:  $75.5 \pm 4.5$  vs.  $75.1 \pm 4.1\%$ ). After freezing, they were also similar ( $P > 0.05$ ) among dilutors (MT:  $44.7 \pm 5.7$  vs.  $43.8 \pm 4.6\%$ ; MP:  $29.4 \pm 3.2$  vs.  $27.6 \pm 3.1\%$ ; Vitality:  $45.6 \pm 5.8$  vs.  $44.7 \pm 4.7\%$ ; Endosmosis:  $30.0 \pm 3.3$  vs.  $28.2 \pm 3.2\%$ ). Between diluted and post-frozen fresh semen there was a difference ( $P \leq 0.05$ ), MT:  $85.1$  vs.  $44.2\%$ , MP:  $73.7$  vs.  $28.5\%$ , Vitality:  $86.2$  vs.  $45.1\%$  and Endosmosis:  $75.3$  vs.  $29.1\%$  In conclusion, the sperm characteristics of ram semen were not affected by Triladyl® or Tris-YHG+C dilutors; while by the freezing factor, if they were affected.

**Keywords:** Spermatozoon, cryopreservation, motility, vitality, endosmosis.

## CAPÍTULO I

### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

#### 1.1 Descripción del problema

La inseminación artificial ovina es limitado comparado a otras especies, debido a que la congelación de semen de carneros es dificultosa. La utilización de semen congelado en la inseminación ovina resulta hasta el momento poco satisfactorios. La fertilidad del semen congelado es más baja que la fertilidad del semen fresco, principalmente debido a la escasa viabilidad de los espermatozoides al descongelarse y a una alteración subletal del porcentaje de espermatozoides vivos (8). Estas consecuencias pueden deberse al daño causado de la membrana espermática en el proceso de criopreservación, donde se altera la función metabólica, disminuyendo la cantidad de espermatozoides con viabilidad, resultando en una prematura capacitación espermática (9).

Se han iniciado esfuerzos considerables para criopreservar semen de carnero, dado que la inseminación artificial depende en gran medida de la utilización del semen congelado. Sin embargo, la calidad del semen posterior al descongelamiento ha sido inconsistente y baja, en comparación con los estándares internacionales de otras especies como los bovinos. Elevar la baja tasa de fertilidad es importante, para producir semen congelado de carnero que sea aceptable, se requiere un protocolo de congelación minucioso, debido a que el carnero tiene semen con una particularidad que es muy susceptible al choque de frío (10).

La calidad espermática en la congelación del semen puede verse afectada por la composición del dilutor y la adición de crioprotectores. Varios autores describen que la calidad del semen se asocia a la proporcionalidad de crioprotectores como: glicerol (11), dodecil sulfato sódico (12), yema de huevo y los diferentes tipos de azúcares añadidos al dilutor (13). Es convencional el uso de yema de huevo de gallina en los dilutores; sin embargo, aún existe controversia de su uso. Existen varios dilutores del semen con gran variabilidad en su composición (14), por ello, conlleva a sustituir con crioprotectores

alternativos (15). La motilidad y otras características espermáticas disminuyen durante el proceso de congelación; además, los dilutores comerciales tienen diferente composición, cuyos comportamientos en la dilución del semen podrían diferir, aún no existe un dilutor específico para semen de carnero que tengan resultados similares a los del bovino; por tanto, hay necesidad de continuar con los estudios.

## 1.2 Enunciado del problema

### 1.2.1 Problema general

¿Cuál es el efecto de los dilutores Triladyl® y Tris-yema de huevo de gallina mezclado con yema de huevo de codorniz en la congelación de semen de carneros Hampshire Down, evaluados antes y después de la congelación?

### 1.2.2 Problemas específicos

- ¿Qué dilutor Triladyl® o Tris-yema de huevo de gallina mezclado con yema de huevo de codorniz, mantiene mejor la motilidad total y motilidad progresiva de los espermatozoides de carneros Hampshire Down, evaluados antes y después de la congelación?
- ¿Cuál de los dilutores Triladyl® o Tris-yema de huevo de gallina mezclado con yema de huevo de codorniz, mantiene mejor la vitalidad de los espermatozoides de carneros Hampshire Down, evaluados antes y después de la congelación?
- ¿Cuál de los dilutores Triladyl® o Tris-yema de huevo de gallina mezclado con yema de huevo de codorniz, conserva mejor la integridad funcional de la membrana plasmática de los espermatozoides de carneros Hampshire Down, evaluados antes y después de la congelación?

### 1.2.3 Justificación de la investigación

La inseminación artificial es una técnica expandida en todo el mundo como una técnica muy útil desde el punto de vista económico y zootécnico, aumentando los rendimientos productivos mediante la mejora y homogeneidad de las poblaciones animales. La escasez de la rápida mejora en la distribución de razas, el incremento de la producción, la gran utilización de los reproductores selectos han difundido considerablemente el procedimiento de la inseminación artificial (16). La congelación del semen de carneros utilizando dilutores adecuados, permite

preservar la viabilidad y potencial fecundante de los espermatozoides por mucho tiempo; facilita, además el control sanitario, optimizar la utilidad de reproductores genéticamente de alto valor, incremento de programas de mejora selección. La preservación del semen por un periodo prolongado es económicamente trascendental y en gran medida requerido para conservar germoplasma, mantener una variedad genética y optimizar la eficiencia reproductiva. La dilución del semen fresco con dilutores permite incrementar el volumen de la muestra de eyaculado, conserva la viabilidad de los espermatozoides y también proteger durante el proceso de la congelación (17).

El éxito de la criopreservación del semen de carnero depende de la dilución, enfriamiento, congelación y protocolo de descongelación. Varios dilutores como Tris-base, Andromed®, BioXcell®, Triladyl®, Ovipro®, la leche descremada, fueron utilizados ampliamente para la congelación de semen de carnero, siendo el dilutor basado en Tris con mejores resultados. El dilutor más común para la congelación de semen de carnero es a base de Tris con yema de huevo y glicerol como componentes principales; la proporción de yema de huevo y glicerol depende de la composición del dilutor, del protocolo de enfriamiento y congelación (10). La yema de huevo tiene como principal componente activo la porción de lipoproteínas de baja densidad, que actúa como protector a nivel de la integridad de membrana espermática (18). Por las consideraciones anteriores se planteó realizar el estudio con el objetivo de evaluar las características espermáticas antes y después de la congelación del semen de carneros Hampshire Down, diluidos con Triladyl® y Tris-yema de huevo de gallina mezclado con yema de huevo de codorniz, cuyos resultados permitirían utilizar dilutores para criopreservar semen de carneros, que servirían para la inseminación artificial en programas de mejora genética de ovinos, de tal forma, elevaría la genética animal y por consiguiente, la mejora económica del productor.

## CAPÍTULO II OBJETIVOS E HIPÓTESIS

### 2.1 Objetivos de la investigación

#### 2.1.1 Objetivo general

Evaluar las características espermáticas antes y después de la congelación del semen de carneros Hampshire Down, diluidos con Triladyl® y Tris-yema de huevo de gallina mezclado con yema de huevo de codorniz.

#### 2.1.2 Objetivos específicos

- Determinar la motilidad total y motilidad progresiva de los espermatozoides de carneros Hampshire Down, diluidos con Triladyl® y Tris-yema de huevo de gallina mezclado con yema de huevo de codorniz, evaluados antes y después de la congelación del semen.
- Observar la vitalidad de los espermatozoides de carneros Hampshire Down, diluidos con Triladyl® y Tris-yema de huevo de gallina mezclado con yema de huevo de codorniz, evaluados antes y después de la congelación del semen.
- Examinar la integridad funcional de la membrana plasmática de los espermatozoides de carneros Hampshire Down, diluidos con Triladyl® y Tris-yema de huevo de gallina mezclado con yema de huevo de codorniz, evaluados antes y después de la congelación del semen.

### 2.2 Hipótesis de la investigación

#### 2.2.1 Hipótesis general

El dilutor Triladyl® o Tris-yema de huevo de gallina mezclado con yema de huevo de codorniz conservan similarmente las características espermáticas de carneros Hampshire Down antes y después de la congelación del semen.

### 2.2.2 Hipótesis específicos

- El dilutor Triladyl® o Tris-yema de huevo de gallina mezclado con yema de huevo de codorniz mantienen similarmente la motilidad total y la motilidad progresiva de espermatozoides de carneros Hampshire Down antes y después de la congelación del semen.
- El dilutor Triladyl® o Tris-yema de huevo de gallina mezclado con yema de huevo de codorniz mantienen similarmente la vitalidad de espermatozoides de carneros Hampshire Down antes y después de la congelación del semen.
- El dilutor Triladyl® o Tris-yema de huevo de gallina mezclado con yema de huevo de codorniz conservan la integridad funcional de la membrana plasmática de espermatozoides de carneros Hampshire Down antes y después de la congelación del semen.

### 2.3 Operacionalización de variables

**Tabla 1.** *Variables de la investigación*

<b>Variables</b>	<b>Indicador</b>	<b>Índice</b>
<b>Independiente</b>		
Dilutores Tris, Triladyl®	Cantidad de dilutor agregado al	Relación del dilutor agregado al semen.
<b>Dependiente</b>		
Motilidad total	Número de espermatozoides con cualquier tipo de movimiento.	Motilidad individual del espermatozoide sobre el total de espermatozoides contados.
Motilidad progresiva	Número de espermatozoides con tipo de movimiento progresivo rectilíneo.	Motilidad progresiva del espermatozoide sobre el total de espermatozoides contados.
Vitalidad	Número de espermatozoides sin coloración (+).	Espermatozoides vivos sobre el total de espermatozoides contados.
Integridad de la membrana plasmática	Número de espermatozoides positivos a la prueba de endosmosis.	Espermatozoides positivos a la prueba de endosmosis sobre el total de espermatozoides contados.

## CAPÍTULO III

### MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

#### 3.1 Antecedentes

- a) En un estudio evaluaron la integridad de la membrana espermática y el acrosoma en semen de carneros durante dos procesos refrigeración 5 °C y descongelación. utilizaron carneros de raza; Criollo, Corriedale y Texel, los dilutores; Tris, Agua de coco y Leche UHT (Ultrapasteurizada). Utilizaron la prueba endosmótica y la tinción triple el primero para la evaluación de la integridad de membrana espermática y el segundo para evaluar la integridad del acrosoma. Los resultados obtenidos mostraron para la prueba endosmótica en refrigeración y descongelación; efecto dilutor Tris, agua de coco y leche UHT; 67.33%, 49.93%, 46.93% y 34.47%, 24.73%, 20.93%; efecto raza Criollo, Corriedale y Texel; 59.33%, 56.87%, 48.00% y 29.13%, 21.73%, 29.27%. así mismo la tinción triple en semen refrigerado y descongelado; efecto dilutor; 50.60%, 44.27%, 48.93% y 24.33%, 24.00%, 28.20%; efecto raza; 39.73%, 55.47%, 48.60% y 20.93%, 29.53%, 26.07%. En las asociaciones dilutor-raza se observaron diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ ) Agua de coco-corriedale 56.80% al evaluar la integridad del acrosoma en semen refrigerado y para la interacción Tris-Texel 45.00% de espermatozoides con membrana espermática intacta después de la descongelación. En conclusión , Tris ofrece mejor protección a nivel de la membrana espermática y el acrosoma durante la refrigeración que persiste hasta la descongelación, con respecto a la raza, el esperma de Corriedale se comportó mejor y sería más tolerante al proceso de refrigeración y congelación que la raza Criollo y Texel (19).
- b) Por otro lado, en un estudio se analizaron el efecto de dos dilutores Tris-glucosa y Ovine Freezing Buffer en la motilidad individual progresiva (MIP) e integridad de membrana plasmática de los espermatozoides (prueba de Host), durante el proceso de congelación. Para ello se usaron tres razas de carneros; 02 Assaf, 02 Canela y 01 Black

Belly; la muestra seminal fue de buena calidad cuyos valores se encuentran dentro de los parámetros. Los resultados obtenidos muestran en semen refrigerado para tris (T1) y Ovine Freezing, la MIP  $81 \pm 2.75\%$  y  $83 \pm 2.74\%$ ; prueba de Host  $78 \pm 4.76\%$  y  $79 \pm 3.96\%$ . Por otro lado, en semen descongelado, la MIP es  $61 \pm 3.57\%$  y  $63 \pm 2.41\%$ ; prueba de Host  $40 \pm 3.57\%$  y  $43 \pm 2.85\%$ , existiendo diferencia significativa alta entre dilutores, carneros y momentos de procesamiento ( $P < 0.01$ ), también se registró regresiones lineales significativas ( $P < 0.05$ ) para Host en semen fresco y descongelado para ambos dilutores. En conclusión se demuestra que la utilización del dilutor Ovine freezing, durante el proceso de congelación conserva mejor los espermatozoides de carneros; además un buen indicador de la calidad seminal es mediante la prueba Host (20).

- c) También, en un estudio se evaluó dos dilutores en la congelación de semen de carneros sobre la motilidad individual progresiva (MIP) y la integridad de membrana (prueba de Host). Para el estudio se utilizaron seis carneros de tres razas; Blackbelly, Canela y Assaf en edades reproductivas y dos dilutores Tris-glucosa-yema de huevo de codorniz (Tris) y Citrato-glucosa-yema de huevo (Citrato). Los resultados obtenidos muestran en semen refrigerado para Tris y Citrato, la MIP  $82.3\%$  y  $79.2\%$ , prueba de Host  $78.0\% \pm 4.4$  y  $73.2 \pm 5.8\%$ ; en semen descongelado, la MIP  $62.0\%$  y  $56.8\%$ , prueba de Host  $49.8 \pm 3.9\%$  y  $41.3 \pm 3.8\%$ , estadísticamente entre dilutores, razas y momentos de procesamiento hubo diferencia significativa ( $P < 0.01$ ), también entre la MIP del semen refrigerado y Host descongelado para los dos dilutores se registró regresiones lineales significativas ( $P < 0.01$ ). En conclusión el dilutor Tris tiene mejores rendimientos que el dilutor Citrato durante la congelación seminal, por otro lado, la prueba Host mostró diferencias entre dilutores, razas y momentos de procesamiento del semen (3).
- d) Asimismo, en una investigación se utilizaron dos carneros de raza Corriedale, se les extrajo 12 eyaculados, con motilidad total  $86.60 \pm 3.37\%$  el objetivo fue evaluar la adición de lecitina de soja en concentraciones de 1%, 2% y 3%, utilizando Tris sin yema de huevo como dilutor base para la refrigeración y congelación de semen. La metodología consintió fraccionar el eyaculado en cuatro tratamientos; grupo control

T1: Tris + yema de huevo, T2: Tris + 1% de lecitina de soja, T3: Tris + 2% de lecitina de soja y T4: Tris + 3% de lecitina de soja, las muestras fueron refrigeradas a 5°C por dos horas para su posterior congelación. Los resultados obtenidos para semen descongelado muestran para T1, T2, T3 y T4; motilidad  $44.64 \pm 3.51\%$ ,  $19.96 \pm 1.95\%$ ,  $24.09 \pm 2.20\%$  y  $45.69 \pm 2.19\%$ ; vitalidad  $46.49 \pm 2.31\%$ ,  $20.38 \pm 2.32\%$ ,  $24.26 \pm 4.21\%$  y  $45.09 \pm 2.84\%$  y la funcionalidad de la membrana  $42.75 \pm 3.08\%$ ,  $19.84 \pm 2.59\%$ ,  $23.57 \pm 2.89\%$  y  $44.05 \pm 2.69\%$ . Comparando las medias de T1 y T4 estadísticamente la diferencia no es significativa ( $P > 0.05$ ) para la motilidad, en cambio, al comparar dichos tratamientos con T2 y T3 estadísticamente hay diferencia significativa alta ( $P < 0.01$ ), de la misma manera ocurre en la vitalidad y funcionalidad de la membrana espermática. La adición de lecitina de soja tiene correlación alta y significativa ( $P < 0.01$ ) con la motilidad y funcionalidad de la membrana después de la congelación. En conclusión el dilutor Tris sin yema de huevo a mayor concentración de lecitina de soja conserva mejor las características espermáticas (21).

- e) También, en un estudio se examinaron el efecto de la suplementación de Tris-yema de huevo con un extensor jalea real liofilizada (RJ) en los parámetros de semen de carneros congelados y descongelados. Las eyaculaciones fueron recolectadas por vagina artificial de 4 carneros maduros, dos veces por semana durante 4 semanas. Se agruparon y dividieron en cuatro partes iguales y luego se diluyeron en extensores con diversas concentraciones de RJ (0, 1, 3 y 5%, vol / vol) a una concentración final de  $200 \times 10^6$  espermatozoides /mL y se incubó a 37 °C durante 30 minutos y posteriormente se evaluaron. Después del equilibramiento del semen a 2 °C y 4 °C, algunas muestras de semen se almacenaron en pajillas de 0.25 mL, las pajuelas de semen se congelaron en vapor de nitrógeno líquido por 15 minutos y se almacenaron a -196 °C en nitrógeno líquido. Las pajillas congeladas se descongelaron en agua tibia (37 °C) durante 30 segundos y se evaluaron. Después de la dilución, la anormalidad total de espermatozoides más baja y más alta se registró en 3 y 5% de grupos suplementados con RJ, respectivamente ( $P < 0.05$ ). La motilidad espermática total refrigerados y la integridad de membrana fueron significativamente ( $P < 0.05$ ) mayores en un 3% que en los grupos suplementados con RJ al 0% y 5%. La motilidad total del espermatozoides post

descongelado, la motilidad progresiva, la integridad de membrana y la viabilidad fueron significativamente mayores en el grupo suplementado con RJ al 3% ( $P < 0.05$ ). En conclusión, la suplementación de Tris-yema de huevo con extensor RJ liofilizado al 3% tuvo un efecto protector sobre los espermatozoides de carneros refrigerados y criopreservados (22).

- f) De la misma forma, en un trabajo de investigación se evaluaron el efecto de la adición de metil-  $\beta$ -ciclodextrina cargada de colesterol (CLC) en un dilutor a base de Tris para evaluar las características del semen descongelado, se utilizaron cuatro carneros de raza Asblack en edades reproductivas. la cantidad de muestras fueron de 30 eyaculados por el método de vagina artificial. Después de una predilución 1:1, se fraccionaron en tres grupos para adicionar las CLC de la siguiente manera: 0 mg: T1, 1 mg: T2 y 2 mg: T3. Los resultados obtenidos muestran que después de la descongelación evidencian mejoras con el uso de CLC para T1, T2 y T3, obteniéndose motilidad 65.34%, 68.68%, 75.27%, vitalidad 56.58%, 60.70%, 66.23%, anormalidades 9.60%, 10.13%, 11.23% y la integridad de membrana 50.54%, 56.4% y 63.71%; por tanto, entre los tratamientos y variables se muestra diferencia estadística ( $P < 0.05$ ), a excepción en la morfología espermática. En conclusión las ciclodextrinas cargadas de colesterol al incorporar a la membrana de los espermatozoides aumenta la calidad de forma eficiente los parámetros espermático durante el proceso de la criopreservación (23).
- g) Por otro lado, en una investigación se evaluaron el efecto de la criopreservación sobre la vitalidad y el estado acrosomal de los espermatozoides de carneros. Se utilizaron 45 eyaculados colectados por el método de vagina artificial, se estudiaron los siguientes parámetros espermáticos en semen fresco; volumen, motilidad progresiva, porcentaje de viabilidad, morfología normal, concentración espermática. las muestras de semen se congelaron en un dilutor comercial Triladyl® seguidamente se empacaron en pajuelas de 0.5 mL a una concentración de  $150 \times 10^6$ /mL, congelándose en nitrógeno líquido por lapso 8 días, se descongelaron a 37 °C durante 60 segundos. Los resultados en la evaluación del semen descongelado; motilidad progresiva  $37.4 \pm 5.3\%$ , viabilidad  $67.5 \pm 4.7\%$ , morfología normal  $79.5 \pm 5.7\%$ , espermatozoides vivos

sin reacción acrosomal  $26.9 \pm 7.3\%$ , vivos con reacción acrosomal  $29.2 \pm 6.4\%$ , muertos sin reacción acrosomal  $27.7 \pm 7\%$  y muertos con reacción acrosomal  $15.9 \pm 6.2\%$ , demostrándose diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) en consecuencia de los efectos de la criopreservación (24).

- h) De la misma forma, se estudiaron el efecto de la edad del carnero en las características macro y microscópicas, así mismo evaluar tres dilutores en dos tiempos de equilibrio al descongelamiento, sobre la motilidad espermática del semen ovino. Se emplearon tres reproductores de la raza Corriedale de edades 1.7, 2.7 y 4.5 años, de los cuales se recolectaron seis muestras por carnero empleando una vagina artificial. Los dilutores utilizados fueron: Tris-glucosa yema de huevo (T-G YH), Triladyl® y Citrato-yema de huevo (C-YH), tomándose dos tiempos de equilibrio de 4 y 8 horas. Los dilutores tuvieron una influencia significativa ( $P < 0.05$ ) en la motilidad progresiva durante los procesos de dilución del semen fresco con 79.89% para T-G-YH, 71.89% C-YH y 74.33% para Triladyl®, igualmente la motilidad espermática estuvo influenciada significativamente por los tiempos de equilibrio ( $P < 0.05$ ) con 68.22% para 4 horas y 63.33% para 8 horas. Las diferencias entre edades en carneros no influyeron ( $P > 0.05$ ) en la motilidad espermática del semen post descongelado, en cambio los dilutores presentaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) con motilidades de 51.17% para T-G YH, 44,17% para Triladyl® y 40.83% para C-YH. En conclusión, el dilutor T-G YH es una de las mejores opciones para obtener una mayor motilidad espermática y prevenir daños durante la congelación de los espermatozoides (25).
- i) Asimismo, en una investigación evaluaron leche descremada como dilutor sobre la viabilidad de los espermatozoides; para ello se evaluaron la motilidad individual, integridad del acrosoma y la integridad de la membrana espermática después de la congelación, se utilizaron un total de 100 eyaculados obtenidas por el método de vagina artificial de 5 borregos de raza Pelibuey de 3.5 años de edad, las muestras fueron diluidas y congeladas con Triladyl® y leche descremada con 7% de glicerol. Se estudiaron los siguientes parámetros espermáticos; motilidad individual (MI), integridad del acrosoma y la integridad de membrana. Para evaluar los resultados de las muestras viables se aplicó la prueba Chi cuadrado, considerando muestras con

viabilidad aquellas que obtuvieron motilidad individual mayor o igual a 40%, la viabilidad con Triladyl® muestra mayor porcentaje 94 % con respecto a la leche descremada 28% ( $P < 0.05$ ). Los resultados obtenidos muestran para los dilutores Triladyl® y leche descremada en semen fresco y post descongelado: la MI 87.7% y 65.6% vs 68.0% y 18.3% ( $P < 0.05$ ), no hay diferencia estadística significativa ( $P > 0.05$ ) entre las muestras frescas y descongeladas, de la misma forma entre dilutores en la proporción de acrosomas intactos, en cambio la integridad de membrana fue afectada por el proceso de congelación, encontrándose daño mayor con leche descremada 67.5% y 9.8%, que utilizando Triladyl® 68.0% y 24.9% existiendo una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ). Por lo tanto se concluye que la leche descremada con la adición de 7 % de glicerol no es un buen dilutor en la congelación de semen de carneros a diferencia del Triladyl® que mantiene mejor los parámetros espermáticos (26).

- j) Asimismo, en un estudio evaluaron porcentajes; motilidad progresiva (MP), espermatozoides vivos (EV), en semen fresco (SF), refrigerado (SR) y congelado (SC). Se utilizaron dos carneros de raza Kathadín, la cantidad de muestras fueron de 16 eyaculados. El dilutor utilizado fue Triladyl® con yema de huevo al 20%, envasado en pajuelas de 0.5 mL; las muestras de semen fueron refrigerados por 24 horas luego congelados con nitrógeno líquido a temperatura de  $-96^{\circ}\text{C}$ . Los resultados obtenidos muestran que los valores promedio de MP y EV fueron diferentes estadísticamente por tratamiento ( $P < 0.05$ ), encontraron para SF  $87 \pm 0.2\%$ ;  $85 \pm 0.16\%$  valores altos a diferencia de SR  $67 \pm 0.2\%$ ;  $77 \pm 0.18\%$  y SC  $41 \pm 0.2\%$ ;  $60 \pm 0.18\%$ . En conclusión se demuestra que Triladyl® como diluyente puede utilizarse para congelar semen de carneros pese a que es inevitable la reducción de vitalidad y motilidad, además los espermatozoides durante la refrigeración sufren daños considerables en motilidad, vitalidad (27).
- k) Igualmente, en una investigación durante la congelación evaluaron *in vitro* e *in vivo* la adición del efecto de Orvus ES Paste® (OEP) en el dilutor para estudiar la calidad seminal de los carneros y su fertilidad. Se colectaron muestras utilizando tres carneros de raza Katahdin, se realizaron tres sesiones por semana (8 semanas) tres eyaculados

por carnero  $n = 72$ , cada eyaculado fue fraccionada en dos partes o tratamientos iguales, TO: Triladyl® 20% yema de huevo más 0.5% de OEP y testigo TT: Triladyl® 20% yema de huevo sin OEP, se almacenaron en pajuelas de 0.25 mL. Los resultados encontrados muestran que la motilidad en el TO  $36.05 \pm 0.86\%$  tiene diferencia estadística ( $P < 0.05$ ) con el TT  $19.97 \pm 0.86\%$ ; de la misma forma en la vitalidad con membrana intacta en el TO  $37.31 \pm 1.27\%$  es superior ( $P < 0.05$ ) al TT  $21.98 \pm 1.27\%$ . En conclusión la adición de un surfactante como Orvus ES Paste® a un diluyente de congelación comercial Triladyl® aumenta la supervivencia de los espermatozoides (28).

- l) También, en un estudio evaluaron el efecto de dos dilutores comerciales para ver la viabilidad; motilidad, integridad del acrosoma y morfología de los espermatozoides de carneros después del proceso de congelación, se estudiaron 64 eyaculados de dos carneros colectados con vagina artificial; se utilizaron dos dilutores Triladyl® ( $n=32$ ) y One-Step® ( $n=32$ ). El enfriamiento de  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  se realizó en 2 horas, las pajuelas de 0.25 mL fueron expuestas a vapores de nitrógeno líquido durante 7 minutos para luego sumergirlas, la descongelación se hizo 72 horas después en agua a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos. Se tomó como referencia que la congelación fue exitosa cuando la motilidad a la descongelación es igual o mayor al 40%. Los resultados obtenidos para ambos dilutores permiten tener promedios favorables de cantidades aptas para conservar semen en congelación con una leve diferencia, pero no significativa ( $P > 0.05$ ) para Triladyl 71.9% vs One-Step 65.7%, la motilidad fue similar entre los dilutores para semen fresco y congelado 88.7%, 60.1% vs 89.0%, 59.5%, Triladyl y One-Step, ( $P > 0.05$ ), el porcentaje de acrosomas intactos fue también similar para ambos dilutores: Triladyl 48.9% y One-Step 46.1% ( $P > 0.05$ ), la morfología espermática también fue similar entre dilutores 87.71% Triladyl vs 86.21% One-Step. Se concluyó que la viabilidad del semen de carnero procesado y congelado con los dos dilutores estudiados es satisfactoria y sin diferencia significativa entre ambos (29).
  
- m) En una investigación se evaluó el porcentaje de vitalidad, motilidad progresiva y velocidades de cinemática en semen fresco, para ello se utilizaron carneros de tres

razas Criollo, Romney Marsh y Hampshire. Las muestras se colectaron mediante vagina artificial de 6 carneros, dos muestras por día, se utilizó el CASA para la evaluación de la calidad de los espermatozoides, también se utilizó ANOVA y el paquete estadístico SPSS 24, el primero para analizar la información obtenida y el segundo para comparar variables entre razas. Los resultados obtenidos muestran que no hay diferencia significativa en semen fresco para los parámetros de calidad ( $P > 0.05$ ) como vitalidad, motilidad progresiva y anormalidades de los espermatozoides indistintamente de las razas evaluadas, pero otros investigadores reportaron diferencia estadística en semen fresco para estas razas, es posible que las condiciones del clima influyan en la calidad del semen, En cambio, para las variables de velocidad Media, Curvilínea y Lineal, se destacaron una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) con buenos porcentajes para carneros Criollo y Hampshire, varios investigadores recomiendan que a mayor velocidad, motilidad progresiva y rectitud hay mayor probabilidad de obtener fertilización. Se concluye que la raza Criolla y Hampshire tienen mayor capacidad o posibilidad de lograr la fertilización que la raza Romney Marsh (30).

- n) En un estudio que consistió en establecer cuál de los diluyentes Salamon o Colas, es el mejor para conservar semen de carnero, mediante la obtención, evaluación, y criopreservación de semen, posteriormente evaluarse después de la congelación. para ello utilizaron carneros puros que presentaran un buen estado general y un fenotipo acorde a la raza. Se utilizaron yemas de huevo frescas y yemas de huevo pasteurizadas en forma de polvo para preparar los diluyentes. La evaluación de la calidad de los diluyentes se llevó a cabo evaluando la motilidad de los espermatozoides en tres momentos diferentes; antes de refrigerar diluido a 30 °C, después de refrigerar diluido a 5 °C y 48 horas después de la descongelación. En conclusión, no se encontró diferencia significativa estadísticamente para poder enunciar que un diluyente sea mejor que otro en la congelación de semen de carnero (31).
- o) Por un lado, en una investigación evaluaron en 2 tiempos la calidad espermática de carnero utilizando la técnica de gradiente de densidad con respecto a muestras no evaluadas. Para ello utilizaron 102 eyaculados, cada eyaculado se fraccionó en dos grupos control y experimental. El primer grupo diluyeron con Triladyl® y el segundo

fue evaluado por la técnica de gradiente de densidad. Los resultados obtenidos muestran incremento significativo del grupo experimental comparado al grupo control ( $P < 0.05$ ); para la motilidad progresiva 92.07% vs. 85.74%, vitalidad 78.42% vs. 75.19% y la integridad de membrana intacta 78.55% vs. 73.37%, las muestras de del grupo experimental comparado al grupo control muestran incremento significativo ( $P < 0.05$ ); 86.94% vs. 82.44%, 71.24% vs. 68.82%, 70.87% vs. 67.98%. Por tanto, se concluye que la técnica de gradiente tiene un efecto positivo para obtener espermatozoides viables en alto número, con mayor motilidad y la membrana plasmática intacta, por otro lado, se reduce la cantidad de anomalías espermáticas en semen fresco así como en refrigerado (2).

- p) El objetivo de un estudio fue evaluar el efecto de dos dilutores sobre la motilidad y el porcentaje de vitalidad después de la congelación. Se utilizaron dos dilutores Tris glucosa yema de huevo (T1) y Ovine Freezing Buffer UA 467/005237 (T2), cuatro carneros de raza Blackbelly y Assaf. Los resultados encontrados muestran que el promedio de la motilidad individual antes del congelamiento con el dilutor Tris es 84.13% y Ovine Freezing 87.7%, por otro lado, después de descongelar y evaluar se encontró valores para la motilidad individual progresiva con dilutor Tris 57.60% y Ovine Freezing 62.23%, para vitalidad 53.01% y 53.63%. Concluyen, que los valores obtenidos, serían indicativo de que el Ovine Freezing tiene mejores efectos para la motilidad progresiva y la vitalidad en semen congelado comparado al dilutor Tris a pesar de la semejanza de los resultados (32).
- q) En un estudio el objetivo principalmente fue evaluar el efecto de dos dilutores sobre la motilidad individual progresiva (MIP) e integridad de la membrana (Host) en muestras de semen congelado en forma de pellets. Para tal estudio se utilizaron dilutores Tris Fructosa yema de huevo y Citrato Glucosa yema de huevo, 4 carneros de raza Blackbelly y Assaf. Los resultados muestran que en la raza Assaf, la MIP de semen descongelado para Tris y Citrato fueron de 63.77% y 61.11%, demostrándose una diferencia significativa entre dilutores ( $P < 0.05$ ), mientras que para la raza Blackbelly, la MIP fue 62.33% y 61.33% sin diferencia estadística, asimismo, los valores para Host después de descongelar en la raza Assaf, fueron 43.56% y 40.38%,

y en Blackbelly 40.19% y 38.16%, sin diferencias significativas. En conclusión el dilutor Tris mostró mejores valores en el mantenimiento de la motilidad individual, sin embargo ambos dilutores tuvieron efecto similar sobre la integridad funcional de la membrana espermática (33).

- r) En un estudio se evaluaron el efecto crioprotector de dos dilutores hipertónicos Trealosa y Lactosa, sobre las características espermáticas después de la congelación, muestras  $n = 4$ . Tris, fructosa, glicina, yema de huevo y glicerol fueron componentes básicos de los dilutores utilizados, la colecta de semen fue mediante el método de vagina artificial, las características del semen fueron; volumen; 1.1 mL, concentración espermática  $3.5 \times 10^9/\text{mL}$ , motilidad individual: 87.0%, motilidad masal (escala 0 a 5): 4.4, vitalidad 90.2% y anormales 1.8%. Las pajuelas fueron descongeladas después de 3 meses para evaluar. los resultados obtenidos para los dilutores Trealosa y Lactosa fueron; motilidad individual  $40.3 \pm 5.9$  y  $30.0 \pm 5.0\%$  y espermatozoides vivos de  $34.4 \pm 6.6$  y  $24.4 \pm 5.0$ . En conclusión, se puede decir que el mejor resultado se logró con el diluyente hipertónico Trealosa, ya que tiene mejores propiedades de motilidad individual y esperma vivo después de la descongelación (34).
- s) El objetivo de un experimento fue evaluar el efecto de diferentes tipos de yema de huevo, el pollo doméstico, el ganso, el pavo, el pato, la codorniz japonesa y la perdiz sobre la calidad del esperma después de la criopreservación del semen de carnero. Las muestras de semen se evaluaron como eyaculación dividida en el ensayo y las muestras se extendieron con un extensor de Tris-ácido cítrico-glucosa que contenía las diferentes yemas de huevo aviar 15% y glicerol 5%. Las pajuelas de semen se equilibraron a 4 °C durante 2 h, se congelaron en vapor de nitrógeno líquido durante 15 minutos a -120 °C y se almacenaron en nitrógeno líquido a -196 °C. Después de descongelar a 37 °C durante 30 segundos, se procedieron a evaluar la motilidad de los espermatozoides, la viabilidad, el acrosoma anormal y la integridad de la membrana (Host). Los resultados mostraron que la yema de huevo de perdiz posee mejor efecto crioprotector la mayor motilidad del espermatozoide 54.0%, comparado con las otras yemas de huevo aviar ( $P < 0.05$ ) evaluadas. El espermatozoide congelado en la yema de huevo también mostró un mayor porcentaje de viabilidad 59%, que el

espermatozoide almacenado en yema de huevo de codorniz y la yema de huevo de pavo ( $P < 0.05$ ). El porcentaje de anomalías del acrosoma después de la descongelación fue menor en la yema de huevo de perdiz que en las otras especies ( $P < 0.05$ ). No hubo diferencias significativas en la integridad de la membrana espermática entre las yemas de huevo, excepto en la codorniz ( $P < 0.05$ ). Los resultados sugieren que la yema de huevo de perdiz podría usarse como una alternativa para la yema de huevo de gallina, en un extensor de semen en la criopreservación (35).

- t) Se realizó un estudio para establecer una técnica de congelación manual sostenible y efectiva para la criopreservación del semen de carnero Bangladesh. Se probaron tres diluyentes y técnicas de congelación, tanto como combinaciones de tratamiento (diluyente/técnica de congelación) y efectos fijos (diluyente o técnica de congelación) sobre la motilidad espermática (SM), la viabilidad (SV), la integridad de la membrana plasmática (SPMI) y la integridad del acrosoma (SAI). Se seleccionaron 10 carneros, según la evaluación del semen. Se usaron ocho eyaculados para cada combinación de tratamiento. Las muestras de semen se diluyeron usando un protocolo de dos pasos para diluyentes caseros a base de Tris-yema de huevo (20%): D1 (7% de glicerol) y D2 (5% de glicerol) y un paso para diluyente comercial: D3 (Triladyl®) a 35 °C. Se añadió la fracción A (sin glicerol) a 35 °C y después de enfriar la muestra a 5 °C, se añadió la fracción B (con glicerol). Las muestras diluidas se aspiraron en pajuelas de 0.25 mL, se sellaron y se equilibraron a 5 °C durante 2 horas. Las pajillas se congelaron en vapor de nitrógeno líquido (LN), en una caja de espuma de poliestireno. Se evaluaron dos pajuelas de semen de cada lote antes y después de la congelación. El grupo D3 exhibió una significancia más alta ( $P < 0.05$ ) después del deshielo SM  $63.1 \pm 2.5\%$ , SV  $79.0 \pm 2.1\%$  y SPMI  $72.9 \pm 1.7\%$ , mientras que SAI  $72.9 \pm 1.7\%$  fue significativamente más alto ( $P < 0.05$ ) en el grupo D2. El diluyente D2 y D3 tuvieron valores espermáticos post-descongelación significativamente más altos ( $P < 0.05$ ) en comparación con D1. Los SM, SV y SPMI posteriores al descongelamiento estuvieron por encima del 50%, 65% y 55% con los diluyentes D2 y D3, pero no fueron significativos. El SAI  $76.1 \pm 1.1\%$  fue significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) con D3. Concluyen, que el uso de un diluyente casero simple basado en Tris que contiene 20%

de yema de huevo y 5% de glicerol, una dilución en dos pasos es un método efectivo para congelar semen de carnero (10).

## **3.2 Marco referencial**

### **3.2.1 Importancia del ganado ovino**

La ganadería ovina es de vital importancia económica en las zonas altoandinas, son grupo de animales de los cuales se puede obtener productos como; carne, lana, leche, pieles y estiércol; asimismo, derivados para producir jabón como el cebo (36). Por tanto, la crianza del ganado ovino representa fuente de trabajo y sustento de la economía de un sector importante de la población, donde la actividad agrícola es limitada debido a condiciones geográficas y medio ambientales, pero son favorables para la crianza de la ganadería ovina (37).

Según, el IV censo del CENAGRO del 2012, la población es de 9 523 198 millones de ovinos. Los vinos con mayor población es la raza Criollos que representa 81.0% de la totalidad, seguidamente esta Corriedale con 11.4%, Hampshire Down 2.6%, Black Belly 0.9% y otros representan un 4.1% del total. Las regiones con mayor porcentaje de ovinos a nivel nacional se encuentran; Puno, Cusco, Junín, Ancash, Huánuco, Huancavelica y Ayacucho, son principalmente las regiones con mayor crianza de ovinos, estos representan a nivel nacional un 71.0% de la crianza y otros con 29.0%. Aproximadamente el 94.2% de crianza de ovinos es una de las principales actividades de la sierra a nivel rural (1). El ganado ovino en su mayoría está bajo un sistema de crianza extensiva que implica la alimentación con pastos naturales y hay poca tecnología de manejo (38).

### **3.2.2 Carnero Hampshire Down**

El ovino de raza Hampshire es denominado comúnmente ovino cara negra, tiene como origen Inglaterra, su principal característica es la producción de carne (39). La raza Hampshire Down destaca dentro de este grupo, esta raza fue influenciada por la raza Southdown y la raza Inglesa, principalmente se caracteriza porque tiene un rápido desarrollo y conversión alimenticia eficiente (40). Las características de esta raza es la producción cárnica, morfológicamente tiene es de cuerpo amplio, profundo y compacto, debido a que las costillas son arqueadas, mantiene el dorso y

el lomo de forma recta, zonas cubiertos de carne, también tiene la grupa horizontal y amplia, cola gruesa, extremidades cortas y aplomos de forma correcta, el peso de esta raza es de 100 Kg a 135 Kg para los carneros y para las ovejas es de 70 Kg a 90 Kg, la producción de lana es de 3 Kg a 3.5 Kg calidad media (41).

### **3.2.3 Fisiología reproductiva del carnero**

La funcionalidad de los testículos indistintamente de la especie es la capacidad que tiene para la producción de espermatozoides de calidad y cantidad adecuada para que pueda realizarse la fertilización en la hembra. Para ello, es importante la producción de hormonas por parte del macho que son necesarias para la madurez sexual del aparato reproductor (42). En el proceso fisiológico de la maduración sexual actúan hormonas importantes como la GnRH (hormona liberadora de las gonadotropinas), el hipotálamo es el encargado de su síntesis actúa incrementando los niveles de FSH (hormonas folículo estimulante) y LH (hormona luteinizante) a nivel de la hipófisis dentro de la fisiología del macho, los cuales además, tienen directamente efecto en la espermatogénesis y la producción de testosterona (43). La LH tiene la función de estimular la producción de testosterona a nivel de las células de Leydig localizado en el estroma del testículo (44). En toros de raza Holstein, las dosis repetidas de GnRH, aumentan la producción seminal y a su vez las concentraciones de LH y Testosterona (45). Asimismo, en carneros causa un incremento de la concentración de testosterona sérica en consecuencia aumenta la actividad sexual (46). Las concentraciones altas de testosterona inhiben la elaboración de GnRH por un mecanismo llamado feedback negativo (47).

Los carneros llegan sexualmente a su madurez en la pubertad, esta etapa es la edad donde empieza a ser funcional el aparato reproductor, este proceso se da a los 5 y 7 meses, el carnero se encuentra con el 50 y 60% del peso corporal. La producción espermática en los carneros tarda aproximadamente 7 semanas. El tamaño de los testículos del carnero es un indicativo de la capacidad para la producción espermática. Asimismo, al examinar el epidídimo del carnero puede favorecer a determinar las reservas espermáticas (48). En el carnero, su habilidad para la producción de semen y la actividad de monta es permanente durante el año, apreciándose variaciones en la capacidad reproductiva (49). La calidad seminal de

carneros es predominante en estaciones de otoño y en invierno pero disminuye en la primavera y en verano, igualmente la cantidad del semen eyaculado y la concentración de espermatozoides disminuyen en estas épocas del año (50). La actividad sexual de los carneros cambia según la estación del año, estos cambios son influenciados por el fotoperiodo (variación de los periodos de luz), la edad del animal y jerarquía social del rebaño (51).

### **3.2.4 Colección del semen de carnero**

La utilización de vagina artificial para la colección del semen de carneros es un método de mejor elección debido a la rapidez y limpieza, además de la el estrés causado en el carnero es mínimo, el semen obtenido por este método es de buena calidad, la simulación de la vagina natural de la oveja por medio de la vagina artificial proporciona una temperatura, presión y lubricación adecuada el pene y la posterior eyaculación del semen (52). Por ello, el cuerpo de la vagina artificial se llena con agua a temperatura de 40 °C a 42 °C y una presión de 40 a 60 mm de mercurio (53). Asimismo, se coloca un tubo al extremo de la vagina para la colecta del semen, la calidad del semen colectado por vagina artificial es influenciado por la frecuencia de colección de semen y el estado del animal principalmente (52).

La estimulación de la libido y la monta en el carnero es mediante la utilización de una hembra. El operador se sitúa al lado derecho de la oveja sujetando la vagina artificial utilizando la mano diestra, la válvula de la vagina artificial debe dirigirse hacia abajo aproximadamente 45° de esta manera se evita el contacto con el carnero al momento de la monta con la mano izquierda, seguidamente el pene se dirige hacia el interior de la vagina, una vez que el pene hace contacto con la parte interna de la vagina artificial atemperada, el carnero realiza el golpe de riñón característico, indicativo de la eyaculación (52). Todo el proceso de colección de semen dura aproximadamente de 10 a 15 minutos (54).

### **3.2.5 Características espermáticas y evaluación del semen**

Para observar las características es importante que el semen colectado esté protegido de cambios bruscos de temperatura, el contacto con el agua, la luz solar directa y la contaminación en todo momento. Por lo tanto, el material de recolección que entra en contacto con el eyaculado debe ser de vidrio o plástico

esterilizado, estar seco y tener la misma temperatura que el eyaculado de semen (55). Las características espermáticas pueden ser de carácter macroscópicas; color, aspecto, volumen, pH y microscópicas; motilidad (masal e individual), concentración, morfología (anormalidades), vitalidad (porcentaje de espermatozoides vivos) e integridad de la membrana espermática (HOST), deben ser evaluados utilizando un microscopio (56).

### **Evaluación macroscópica**

#### **a) Color**

La cantidad espermática en el eyaculado hace que parezca lechoso o blanco cremoso es una indicación de buena calidad y cuando es de baja calidad tiene una similitud con la leche que parece agua (54). Sin embargo, colores anormales como el color rojo indica presencia de restos de sangre, y colores como el gris y marrón son indicativos de contaminación del eyaculado en estos casos se desecha la muestra (55).

#### **b) Aspecto**

El semen tiene una apariencia opaca relativamente uniforme, las muestras translúcidas tienen espermatozoides en baja concentración. La densidad seminal de los carneros se debe a la alta concentración espermática. La apariencia del semen se evalúa en función a la proporción de espermatozoides y plasma seminal, alta densidad concentran mayor número de espermatozoides que las de menos densidad (52,56).

#### **c) Volumen**

Según Gibbons *et al.* (57) indican que, determinar con precisión el volumen del eyaculado es importante para ver el número de espermatozoides totales contenido en la muestra. Además, indican que, cuando la colección es mediante vagina artificial pueden obtenerse normalmente eyaculados de 1 mL en promedio, pero pueden variar según algunos aspectos como la edad, el tamaño y la condición corporal, también la frecuencia de colecta y además la destreza del que opera. Así mismo, Evans y Maxwell (52) manifiestan, en carneros jóvenes el volumen del eyaculado es menor que en adultos, también, recomiendan colectar cada 2 días. Por otro lado, el volumen del eyaculado son normales

cuando varían en carneros adultos de 0.5 a 2 mL y 0.5 a 0.7 mL en carneros jóvenes (56).

#### **d) pH del semen**

En carneros tiende a la acidosis el pH, lo cual es importante porque su capacidad fertilizante reside en él, la reacción alcalina indica mala fertilidad y suele ir asociada a la necrospemia, que se define como la disminución de concentración y motilidad de los espermatozoides (52). El pH del seminal puede variar según el eyaculado reciente y eyaculado almacenado, por lo que existe una importante influencia en los rangos normales, en el carnero estos valores varían entre 6.2 a 7.3, incluso llega a 7.5 como pH normal (56).

### **Evaluación microscópica**

#### **a) Motilidad espermática**

La motilidad es uno de los muchos requisitos que debe cumplir un espermatozoide para poder fertilizar un óvulo. Sin embargo, es el parámetro de mayor uso para evaluar la calidad de un eyaculado refrigerada o congelada; La motilidad también es una expresión de la integridad estructural y la competencia funcional de los espermatozoides para que el movimiento de los espermatozoides por el tracto genital de la hembra pueda tener lugar con normalidad y, en particular, para establecer un reservorio de espermatozoides en el oviducto, los espermatozoides deben tener un movimiento activo (58). La motilidad puede ser: Motilidad masal, motilidad total y motilidad progresiva. En un estudio, Conde *et al.* (30) evaluaron la calidad espermática de ovinos Hampshire utilizando el sistema computarizado de análisis seminal (CASA), mencionan que la raza Hampshire muestra parámetros mayores que Romney Marsh, pero es menor que el ovino criollo además, mencionan la posible influencia de la estación de lluvias sobre la calidad seminal.

#### **b) Motilidad masal**

Se evalúa la formación y cantidad de ondas generadas por el movimiento de los espermatozoides, las ondas solo se pueden observar en especies con alta concentración de espermatozoides, tales como los pequeños rumiantes. La observación se realiza con un microscopio óptico de 10X sobre una micro gota de esperma puro, que se colocó sobre un portaobjetos calentado a 37 °C. Las

muestras de semen con muy buena motilidad se pueden utilizar para la inseminación artificial (52). Por otro lado, es importante considerar, el intervalo de servicio y la calidad espermática de los primeros eyaculados (55). Estudios realizados por; Perez et al. (59) reportaron 4.5 de motilidad masal; Guerrero et al. (34) indican en carneros raza Blackbelly 4.4 de motilidad masal; Cabrera y Pantoja (60) reportan en su estudio 4.3 de motilidad masal.

**c) Motilidad total**

Para la motilidad total, se valora el porcentaje de espermatozoides mótils y progresivos (mótils que se desplazan). Los mótils progresivos deben superar el 32%. La motilidad de cada espermatozoide observado en el campo microscópico se clasifica en a, b, c, y d; Motilidad progresiva rápida (a), Motilidad progresiva lenta (b), Motilidad no progresiva (c) e Inmóviles (d). La motilidad total es la sumatoria de los porcentajes de la categoría a, b y c (61). Para evaluar la motilidad individual, primero se estima el porcentaje de espermatozoides que tienen algún tipo de movimiento denominado como motilidad total, segundo, el porcentaje de espermatozoides motiles que tienen movimiento progresivo (62).

**d) Motilidad progresiva**

Uno de los parámetros usados en la valoración de semen en la motilidad progresiva, pero no es determinante de la capacidad fecundante del espermatozoide. También, se puede denominar porcentaje de espermatozoides con respecto a los espermatozoides mótils totales, se determina observando el porcentaje de espermatozoides que se mueven en forma rectilínea en el campo microscópico. Los espermatozoides que se mueven en mismo sitio podrían indicar que sufrieron un choque térmico o el medio no es isotónico (56). La alta concentración de espermatozoides dificulta la evaluación, por lo que es importante la dilución del semen colectado con una solución salina isotónica para facilitar la observación de los movimientos individuales, una muestra de calidad es la que contiene una motilidad individual progresiva mayor del 80% (63). Para el recuento de la motilidad individual progresiva se utiliza una gota de semen sobre un portaobjetos a 37 °C y seguido se coloca un cubreobjetos para en el microscopio con objetivo de 40x o 100x. El paso a través del campo visual

hacia adelante y sin movimientos de rotación de los espermatozoides, es lo que se denomina motilidad progresiva. Uno de los criterios que se pueden tomar, es seguir cuatro espermatozoides, a los cuales, dependiendo de la velocidad y capacidad para cruzar el campo visual, se le asigna un score o porcentaje. El movimiento individual de los espermatozoides debe ser lineal, progresivo y se calcula en porcentaje. Una buena muestra debe tener 70% de espermatozoides con este tipo de movimiento. El movimiento circular o local es anormal (64,65).

Se puede evaluar la motilidad individual; muy buena con más del 80%, buena con 60 a 80%, regular con 40 a 60%, mala con 20 a 40% y muy mala con menos de 20%, además se tiene que tomar en cuenta movimientos anormales, movimientos circulares o retrógrados (63). También, Ávalos *et al.* (66) señalan que en ovinos y caprinos donde las concentraciones de espermatozoides son muy elevadas, se debe realizar una dilución con el medio adecuado y la temperatura indicada de 36 a 37 °C para poder evaluar. Asimismo, mencionan que los espermatozoides normalmente deben moverse de forma rápida y recta a través del campo microscópico; se puede evaluar el porcentaje de la motilidad progresiva: Muy buena de 80 a 100%, Buena de 60 a 79%, Regular de 40 a 59%, Pobre menor del 40%.

**e) Concentración espermática**

Se expresa cómo el número de espermatozoides por mL de semen, este valor tiene una gran importancia y es necesario conocerlo para juzgar la calidad de una muestra de semen, se han empleado diversos métodos para investigarlo, en especial la numeración directa en la cámara de Neubauer (67). Los métodos para evaluar la concentración son el recuento en la cámara de Neubauer y el fotocolorímetro, ambos métodos tienen precisión (55). La concentración espermática es el número de espermatozoides por unidad de volumen, generalmente se expresa como espermatozoides/mL, la concentración de espermatozoides en carneros es  $3\ 000$  a  $7\ 000 \times 10^6$  espermatozoides/mL variando por factores externos (56).

**f) Vitalidad**

La vitalidad de los espermatozoides se asocia a la integridad de la membrana plasmática y de la actividad biosintética de los espermatozoides (32). Cuando

las células espermáticas mueren, se vuelven permeables a la eosina. por lo tanto, esta tinción se puede usar para determinar la proporción de células vivas (68). Una de las técnicas de tinción selectiva consiste en diluir una gota de espermatozoos en un colorante vital (Eosina) junto con Nigrosina. Una vez aplicado el colorante se deja secar el frotis al aire de modo que la eosina tiñe en seguida los zoospermios muertos en el momento de la mezcla, mientras que la nigrosina da como resultado la solución de contraste (16).

Los colorantes más usados para la evaluación de la vitalidad es la nigrosina 5% y la eosina 1%, dichos colorantes deben mantenerse a la temperatura que tiene el semen al ser utilizados, la técnica para evaluar la vitalidad consiste en contabilizar 100 espermatozoides en distintos campos microscópicos se contabilizan tanto espermatozoides vivos y muertos (69). Se evalúa con un objetivo de 40X de un microscopio óptico, considerando aquellos espermatozoides sin teñir viables y muertos los que se tiñeron (24). Para determinar el porcentaje de espermatozoides vivos es mediante la integridad de la membrana plasmática de la cabeza, puede realizarse utilizando colorantes supravitales, al evaluar los espermatozoides muertos se tiñen y los vivos no se tiñen. La técnica consiste en; a) Colocar en un extremo del portaobjetos templado a 37 °C una gota de colorante y una de semen separadas y mezclarlas. b) Extender la mezcla con otro portaobjeto, que actúa como extensor, procurando que la capa quede lo más delgada posible. c) Se deja secar y se observa a 40X o 100X (con aceite de inmersión). d) Se deben evaluar observando 100 a 200 espermatozoides en diferentes campos microscópicos, el resultado se expresa en porcentaje de vivos (56).

La evaluación de la integridad de la membrana plasmática del espermatozoide es una condición elemental para su viabilidad, por tanto, una predicción de su potencial de fertilización. Anteriormente, la vitalidad del espermatozoide se examinaba mediante tinciones supravitales, que consistían exclusivamente en Eosina o combinadas con Nigrosina. Sin embargo, estas tinciones vitales no son las adecuadas para evaluar semen criopreservado, debido a la presencia del crioprotector glicerol, que interfiere con la tinción. Son algunos de los



colorantes utilizados para detectar la integridad de la membrana celular, Diacetato de Carboxifluoresceína (CFDA), SYBR-14®, Yoduro de Propidio (IP) y Hoechst 33258 (70).

**g) Integridad funcional de la membrana plasmática (HOST)**

Una de las pruebas para evaluar la integridad funcional de la membrana plasmática es la prueba hipoosmótica (HOST), se basa en el desequilibrio osmótico entre el medio extracelular y el intracelular, fisiológicamente este proceso se compensa mediante la difusión de agua al compartimento intracelular, dando como resultado un aumento de volumen con cambios morfológicos seguidos en los flagelos del espermatozoide como; dilatación y enrollamiento (71). Asimismo, para el test hipoosmótico se mezclan 0.1 mL de semen fresco o criopreservado con 1 mL de cada una de las soluciones hipoosmóticas (100 y 150 mOsmol/L); la mezcla es incubada a 37 °C durante una hora, se coloca una gota en un portaobjeto con laminilla y se observa con el microscopio de contraste de fase a 40X contando 200 espermatozoides por placa. Se determina el porcentaje de espermatozoides que muestran hinchazón típica de la cola en respuesta al proceso hipoosmótico (72).

La dilatación de espermatozoides frente a una solución hipoosmótica se observa por el enrollamiento de la cola, sólo en aquellos espermatozoides que mantienen íntegra su membrana plasmática, este proceso es consecuencia de influjo de agua que genera una dilatación de las membranas. El valor porcentual de endosmosis tiene una relación estrecha con la fertilidad in vitro, para medir la integridad funcional de la membrana, la muestra se diluye en una solución hipotónica (10 gotas de solución más 1 gota de semen diluido), dejando actuar unos 20 minutos. Luego de la fijación con glutaraldehído (2 gotas), se observa entre porta y cubreobjetos, procediendo al recuento de espermatozoides con colas enrolladas (56). Hernandez y Carrillo (73) relacionan la motilidad progresiva y la normalidad de los espermatozoides con una membrana celular íntacta. Por lo tanto, la respuesta de los espermatozoides a la prueba HOST puede estar asociada como indicador de la fertilidad ovina, lo que permite incorporar esta técnica para evaluar la calidad del semen.



### **3.2.6 Congelación del semen**

La congelación de semen es un proceso donde a baja temperatura el semen se congela y conserva a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ , el propósito es detener en los espermatozoides las reacciones metabólicas, permitiendo conservar material seminal por mucho tiempo. Por lo tanto, se puede disponer de material genético para el futuro y se asegura semen de un reproductor en particular en cualquier época del año. También se facilita el transporte de semen, así mismo se amplía la utilización de los machos donantes, aun después de muertos (56).

En las especies en las cuales se puede realizar la congelación, aun con el perfeccionamiento exhaustivo de las técnicas actuales, existe un porcentaje de espermatozoides muertos en la operación. Para evitarlo en lo posible se realiza una bajada gradual de la temperatura buscando una curva idónea, de modo que se evite los riesgos señalados anteriormente (16). La utilización de semen congelado tiene como única desventaja la tasa de preñez baja, principalmente a consecuencia de la congelación y descongelación, porque durante estos procesos se dañan el acrosoma de las células espermáticas y la motilidad (52). La congelación de semen de carnero se puede realizar por dos métodos; el método convencional utilizando nitrógeno líquido a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  en pajuelas de plástico y el método rápido en hielo seco a  $-79\text{ }^{\circ}\text{C}$  seguido de nitrógeno líquido en este método se conserva semen en forma de pellets (52).

#### **a) Equilibramiento de temperatura para congelar el semen**

La disminución gradual de la temperatura reduce el metabolismo celular de esta manera se prolonga la vitalidad de los espermatozoides, en los mamíferos especialmente ungulados es altamente sensible los espermatozoides al enfriamiento rápido, dicho proceso es denominado choque frío, la viabilidad en semen congelado depende de tres factores; la velocidad de enfriamiento, el rango absoluto de temperatura descendida y la temperatura final alcanzada (74). En el enfriamiento de espermatozoides se realiza dos etapas, en la primera el semen con dilutor es enfriado hasta  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  y en la segunda etapa se realiza la estabilización del semen diluido con la adición de crioprotectores, se han investigado que el semen diluido y refrigerado a  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  tiene mayor viabilidad y fertilidad dentro de las 72 horas (4).

Por lo tanto, la finalidad de realizar el proceso de enfriamiento del semen, es reducir el metabolismo energético, para prolongar su viabilidad y capacidad de fecundar. La sensibilidad al enfriamiento rápido “shock frío”, ocurre especialmente en semen de carnero y chivo, traduciéndose como un aumento del número de espermatozoides muertos, aumento del calcio intracelular y distribución de lípidos de membrana alterados. La distribución de proteínas del citoesqueleto asociada a la membrana en los espermatozoides de carneros es desigual, como consecuencia la sensibilidad a cambios de temperatura es más alta (56). Evans y Maxwell (52) indican que es recomendable el enfriamiento a 5 °C y 15 °C en 1 a 1.5 horas y de 2 a 3 horas, además recomiendan que se evite bajar de forma rápida la temperatura desde 18 °C a 5 °C, para prevenir el choque por frío.

#### **b) Protocolo de congelación**

El enfriamiento es un proceso previo de adaptación de los espermatozoides a un metabolismo reducido. El semen diluido es enfriado a 5 °C, a una velocidad aproximada de -0.2 a 0.4 °C/minuto, la disminución de la temperatura normalmente ocurre en las primeras dos horas. Es recomendable que el semen diluido llegue a 5 °C y mantenerlo durante 1.5 a 2 horas, proceso conocido con el nombre de equilibrado, durante este proceso de equilibrado los espermatozoides antes de congelarse se mantienen con el glicerol, el glicerol al penetrar las células espermáticas, establece un equilibrio entre la concentración intracelular y extracelular (7).

El proceso de congelación de espermatozoides comienza cuando la temperatura baja a 5 °C, esto se logra al exponer las pajuelas a vapor de nitrógeno líquido (4). En los espermatozoides ovinos se presenta el “rango crítico de temperatura” entre -10 °C a -25 °C (7). La congelación espermatozoides se realiza de forma manual o automatizada, en la forma manual las pajuelas son colocadas horizontalmente utilizando una gradilla de 3 a 4 cm de distancia sobre la superficie de nitrógeno líquido dentro de una caja de poliestireno. Las pajillas son expuestas durante 10 a 20 minutos a vapores de nitrógeno líquido -80 a -100 °C y después son sumergidas en el nitrógeno líquido a -196 °C (52).

### 3.2.7 Dilutores del semen

El plasma seminal, solamente, no proporciona protección a los espermatozoides contra los cambios de temperatura. Por lo tanto, para la conservación del semen a bajas temperaturas es necesario un dilutor con propiedades especiales. Por lo general, con un pH, capacidad de amortiguación y osmolaridad adecuado, contienen una fuente de energía, un agente protector de la membrana celular como la yema de huevo durante el enfriamiento a 5 °C y un crioprotector, generalmente glicerol, ideal para proteger el espermatozoide del daño criogénico (4). El propósito del diluyente es incrementar el volumen y mantener una concentración espermática suficiente para servir a tantas hembras como sea posible. La dilución depende de la cantidad de inseminación artificial y de la concentración de espermatozoides con motilidad, porque la fertilidad está asociada a la cantidad de espermatozoides motiles (52).

En los carneros al igual que otras especies el diluyente utilizado para preservar el semen debe tener, por lo general, un pH y capacidad amortiguadora óptima, adecuada osmolalidad, que debe proteger a los espermatozoides del daño por baja temperatura (4). El diluyente contiene Tris (hidroximetilaminometano) o citrato como tampón y glucosa como fuente de energía, además de protectores de la membrana celular durante el enfriamiento a 5 °C (yema de huevo), en la congelación (glicerina) y como agentes antimicrobianos penicilina o estreptomina (55). El diluyente utilizado para preservar los espermatozoides debe cumplir una de las siguientes condiciones mínimas (75).

- Debe ser con el plasma seminal, isotónico cuando se usa en refrigeración (320 mOsm / kg) e hiperosmótico cuando se utiliza en congelación (400 mOsm / kg).
- Tener un valor de pH cercano a 7 y capacidad amortiguadora para mantener el valor de pH en neutral, además compensar la producción de ácido láctico durante el proceso de congelación.
- Tener moléculas que brinden protección a los espermatozoides del frío. Según su capacidad de penetración a la membrana plasmática se clasifican como: sustancias crioprotectoras permeables e impermeables.



- Contener como fuente de energía en su constitución, la glucosa y fructosa que son las más usadas.
- No debe tener bacterias ni contaminantes, por lo que debe contener antibióticos.

**a) Dilutor Tris (N-Tris [hidroximetil] aminometano)**

El diluyente Tris es uno de los dilutores mayor utilizados en la congelación y refrigeración de semen, debido a que esta sustancia al mezclarse con yema de huevo y glicerol pueden almacenarse semen a distintas temperaturas, actualmente la mayoría de los diluyentes empleados para la criopreservación contienen Tris y ácido cítrico como principales sustancias tampón (76). El dilutor Tris, por su efecto tampón, osmótica y baja toxicidad, se utiliza para la criopreservación de semen incluso en concentraciones elevadas, entre otras cosas como, neutralizar los desechos producidos por el metabolismo de los espermatozoides, especialmente el ácido láctico (7).

**Tabla 2.** *Composición del dilutor Tris (56)*

Insumo	Cantidad
Tris (g)	3.876
Ácido cítrico monohidratado (g)	2.123
Glucosa (g)	0.533
Glicerol (mL)	5.3
Penicilina (UI)	100.000
Estreptomina (g)	100
Agua destilada c.s.p. (mL)	84
Yema de huevo (mL)	16
Tasa de dilución 1+3	

El efecto de agregar antibióticos es reducir la carga bacteriana en el medio que rodea a los espermatozoides. Esto se debe principalmente a que las muestras de semen recolectadas se contaminan con el medio, por ello, se recomienda la utilización de unas dosis de 500 a 1 000 UI de penicilina/mL de dilutor y 500 a 1 000 µg de estreptomina/mL de dilutor. La penicilina actúa principalmente

sobre las bacterias Gram (+), impidiendo la transpeptidación (en el bacteria un proceso necesario para la formación de la pared celular) en la pared celular bacteriana, interrumpiendo la regeneración del mismo, de tal manera que se destruye las bacterias (54).

**b) Triladyl® (Minitube, Tiefencach, Germany)**

Según el Manual Minitube, Triladyl® es una concentración estéril que puede utilizarse para preparar un dilutor con yema de huevo en un solo paso para congelar el semen bovino. También el Triladyl® se puede utilizar para congelar el semen de otros rumiantes como ovinos, caprinos y ciervos. Su contenido de antibióticos cumple con el estándar UE: EC norma 88/407 (77). Estudios, *in vitro*, afirman que el Triladyl® a base de Tris es un dilutor igual o superior a los dilutores lactosa-yema y sacarosa-lactosa-yema, asimismo, al agregar 2% de albumina sérica bovina al Triladyl®, tiene un efecto de protección de la integridad del acrosoma (4).

**Composición de Triladyl®**

El Triladyl® contiene; Tris, ácido cítrico, azúcar, tampones, glicerina, antibióticos, agua de extrema pureza, por cada 100 mL de dilutor preparado contiene unidades activas de: Tilosina 5.7 mg, Gentamicina 28.6 mg, Espectinomicina 34.3 mg y Lincomicina 17.2 mg (77).

**Preparación del Triladyl® (77).**

- La preparación del dilutor se necesita concentrado de Triladyl®, agua estéril, yema de huevo, probeta graduada estéril o matraz de Erlenmeyer, papel filtro estéril y embudos estériles. El dilutor listo se compone de una parte de concentrado de Triladyl®, tres partes de agua pura estéril y de una parte de yema de huevo, lo que equivale al 20% de su volumen final. La solución madre se prepara vertiendo primero un frasco completo de concentrado de Triladyl® 250 g en un matraz graduado, agregando en varios pasos 750 mL de agua estéril. Dicha solución madre es estable y puede conservarse alrededor de una semana a 5 °C de temperatura.
- Para completar el diluyente, se deben agregar 250 mL de yema de huevo a la solución madre. El volumen y el peso de 250 g de yema de huevo son



iguales. Las cáscaras de huevo se pueden esterilizar con llama o pasando un algodón empapado en alcohol. Luego cortar con cuidado el huevo, para separar la yema y la clara. Para que la yema de huevo se desprenda completamente de la clara y las membranas, puedes colocarlas una a una sobre una toalla de papel y enrollarlas sobre el papel para retener el residuo de la clara de huevo. Finalmente, se coloca la yema de huevo en el borde del papel toalla, se envuelve en el papel y se abre la membrana de manera que permita que la yema de huevo fluya libremente para que la membrana se adhiera al papel.

- Luego agregar lentamente la solución madre a la yema de huevo en ese orden y mezclar con un agitador magnético o con una varilla de vidrio estéril. El estricto cumplimiento de esta secuencia es muy importante para desarrollar plenamente las cualidades de conservación de Triladyl® (77).

### **3.2.8 Componentes del dilutor de semen**

El diluyente de semen utilizado para la criopreservación consta de diferentes sustancias con las siguientes funciones; a) Aportar nutrientes como fuente de energía, b) Protege los espermatozoides del daño por enfriamiento, c) mantener un pH equilibrado y adecuado, d) mantener presión osmótica y balance electrolítico adecuados, e) impedir el crecimiento bacteriano, f) Aumentar el volumen de semen para que pueda usarse para inseminación múltiple y g) proteger los espermatozoides durante la congelación (54,56,78). La composición básica del diluyente que se usa para congelar el semen es básicamente la misma que la del diluyente que se usa para almacenar el semen en forma líquida. Estos diluyentes que se usan para conservar el semen de la mayoría de las especies domésticas se componen de las siguientes sustancias (76).

- Agua bidestilada, como disolvente de los demás componentes.
- Sustancias iónicas y no iónicas para que mantenga la osmolaridad y el pH.
- Materiales orgánicos como yema de huevo o leche, tienen la capacidad de reducir o evitar los efectos del frío.
- Crioprotectores como el glicerol, el más usado.

- Azúcares simples como fuente energía, también los disacáridos y Trisacáridos como crioprotector adicional.
- Antibióticos para evitar el crecimiento de bacterias.
- Otros aditivos opcionales, como enzimas, detergentes, aminoácidos que pueden optimizar la viabilidad y fertilidad de los espermatozoides.

**a) Sustancias buffer**

Las sustancias amortiguadoras funcionan impartiendo estabilidad a la membrana porque mantienen la tonicidad total del diluyente, lo cual es de importancia cuando el semen es almacenado durante mucho tiempo. (7). Tris se utiliza como componente principal del diluyente para congelar semen bovino. Tiene principalmente buena actividad tampón, diurética, osmótica y baja toxicidad a altas concentraciones. La utilización de Tris en los dilutores para el congelamiento del semen de carnero es reportada en trabajos desde los años setenta. A pesar de que el Tris es el compuesto más utilizado como buffer existen otras sustancias con el mismo objetivo como el ácido cítrico. Sin embargo, el ácido cítrico en semen de borrego puede ser una limitante ya que las opiniones difieren del tipo de azúcar que será usada en combinación con este (7).

**b) Sustancias orgánicas**

Las sustancias orgánicas como la yema de huevo por sus lipoproteínas, fosfolípidos y lecitinas previenen el choque por frío. La yema de huevo es un componente comúnmente utilizado para congelar porque mantiene la motilidad e integridad del acrosoma del espermatozoide y la membrana mitocondrial, también es un tampón osmótico. Además, se ha observado que la yema de huevo tiene un efecto protector durante la congelación. Cuando se adhiere y cubre la membrana, esta capacidad protectora se debe a la alta densidad de la parte lipoproteica (79).

La yema de huevo adicionado al diluyente tiene efecto beneficioso sobre el porcentaje de motilidad, especialmente después de que el semen se enfría rápidamente a 10 y 5 °C, porque las lipoproteínas de baja concentración puede actuar como crioprotector, ayudando así a prevenir el choque de frío (Factor

resistencia) y mantener la viabilidad de espermatozoides (factor conservación) (80). Así mismo en un estudio concluyen que el dilutor Tris yema de huevo de codorniz conserva eficientemente los espermatozoides de carneros durante la congelación a diferencia del diluyente Citrato yema de huevo de codorniz (3). Algunas yemas de huevo se pueden usar como componentes.

### Huevo de gallina

La composición es de 57% de clara, 32% de yema y 12 % de cascara (81). La fracción de la yema de huevo es la parte amarilla, el color de la yema se ve afectado según la dieta. El componente de la yema es utilizado como fuente de alimento para el desarrollo del embrión (82).

**Tabla 3.** *Composición de la yema de huevo de gallina (83)*

<b>Característica (g/100 g)</b>	<b>Albumen</b>	<b>Yema</b>	<b>Cascara</b>
Agua	87.0	46.50	1.60
Proteína	9.5	16.00	3.30
Colesterol	-	1.31	-
Lípidos	-	33.00	-
Saturados	-	11.20	-
Insaturados	-	18.20	-
Ácido graso mirístico	-	0.36	-
Ácido graso palmítico	-	27.40	-
Ácido graso palmitoleico	-	4.00	-
Ácido graso esteárico	-	9.05	-
Ácido graso oleico	-	43.01	-
Ácido graso linoleico	-	15.62	-
Glúcidos	0.4	0.15	-
Cenizas	0.5	1.10	95.10
Calorías	40.0	380.00	-

### Huevo de codorniz

La estructura de los huevos de codorniz es la siguiente: yema de huevo 42,3%, clara de huevo 46,1%, membranas 1,4% y cáscara de huevo 10,2%. La yema de huevo contiene vitaminas, lípidos y minerales, por lo tanto, nutricionalmente es

la parte más importante, un huevo contiene 50% de agua aproximadamente. El huevo de codorniz concentra mayor contenido de proteínas, extracto etéreo y calcio comparado al huevo de gallina, así mismo la concentración de ácidos grasos Omega 3 del tipo EPA es mucho mayor que en los huevos de gallina (81).

**Tabla 4.** *Composición de la yema de huevo de codorniz (84)*

<b>Característica (g/100 g)</b>	<b>Clara</b>	<b>Yema</b>	<b>Huevo entero</b>
Humedad	86	51	69.46
Proteína	11.63	15.63	13.63
Colesterol	-	1.13	-
Lípidos	-	33.61	12.59
Ácido graso mirístico	-	0.75	-
Ácido graso palmítico	-	28.04	-
Ácido graso palmitoleico	-	5.91	-
Ácido graso esteárico	-	8.71	-
Ácido graso oleico	-	44.68	-
Ácido graso linoleico	-	11.91	-

### c) Crioprotectores

Los crioprotectores tienen como principio fundamental es evitar el daño causado a nivel intracelular por la formación de cristales de hielo, reduciendo así el efecto solución. La formación de cristales es producido al congelar el agua libre dentro de las células y el efecto solución es debido a la exposición de las células no congeladas a altas concentraciones de solutos durante la congelación (56). La estructura molecular es un parámetro importante para determinar la eficiencia de los crioprotectores, una vez que, poseen afinidad por el agua. La deshidratación celular promovida por el agente crioprotector impide que los cristales de hielo al interior de la célula espermática se formen debido al cambio de la osmolaridad del medio intracelular. Estos enlaces alteran la orientación de las moléculas de agua de los cristales de hielo, creando un ambiente menos



perjudicial para las células espermáticas. Los crioprotectores pueden ser clasificados como permeables que protegen las células de daños de la congelación lenta; y no permeables que requieren un tasa de congelación más rápida, para conferir protección celular espermática (85). Entre los principales crioprotectores se tiene:

- **Agentes crioprotectores no permeables**

Se encuentran en la yema y la leche, así como azúcares impermeables; lactosa, sacarosa, trehalosa, rafinosa, que pueden producir medios hipertónicos y provocar deshidratación celular. En el proceso de congelación, los disacáridos reducen la temperatura de cristalización de manera más efectiva que los monosacáridos (56). La yema de huevo es componente común de los dilutores, utilizado reiteradamente en los medios de conservación de semen de varias especies, principalmente de bovinos. Estas sustancias tienen una acción preservadora sobre el metabolismo, la motilidad y la fertilidad de los espermatozoides conservados a bajas temperaturas. Comparando tres concentraciones de yema de huevo 10%, 15% y 20%, no se encontraron diferencia entre los parámetros de motilidad espermática (4). De manera similar, la trehalosa tiene efecto protector estable sobre la membrana celular al interactuar con los fosfolípidos, lo que se refleja en la integridad del acrosoma (34). En condiciones hipertónicas la presencia de trehalosa en los diluyoservadores de semen ovino confiere una mayor preservación de la integridad y fertilidad espermática, donde los valores de motilidad individual, acrosomas normales, endosmosis y fertilidad son mayores (56).

- **Agentes crioprotectores permeables**

Estas moléculas atraviesan rápidamente la membrana plasmática, acomplejan el agua en el interior de la célula y reducen el tamaño y la cantidad de cristales de hielo. Se realizan ensayos con propilenglicol, etilenglicol, sorbitol, manitol, inositol, adenosina, dimetilsulfóxido (DMSO), prolina, glicina, glicerol, etc. Los crioprotectores más utilizados son glicerol y el etilenglicol. El primero ha mostrado mejores resultados en la

descongelación de semen ovino en varias investigaciones en el especial relacionado con la motilidad progresiva (4,56). La protección se atribuye a la naturaleza coligativa (principalmente la baja caída de temperatura y la presión osmótica) y la asociación con moléculas de agua, el glicerol en forma de moléculas atraviesa con rapidez la membrana plasmática de los espermatozoides para evitar formación de cristales de hielo, pero debido a efectos tóxicos del glicerol para congelar semen de carneros se redujo su concentración de 4 a 8%. El uso de aminoácidos como prolina y glicina en el diluyente tiene un efecto protector intracelular atóxico (baja toxicidad osmótica) que disminuye durante la congelación lenta el efecto desnaturador de la condición hiperosmolar inducida por la deshidratación celular (56).

El glicerol como metanol, etilenglicol, propilenglicol y dimetilsulfóxido pertenecen al grupo de crioprotectores, que penetran en el citoplasma celular importante para mantener la motilidad post-descongelación y la integridad funcional de la membrana plasmática. Sin embargo, inducen efectos tóxicos y osmóticos sobre los espermatozoides, según especie y, dependiendo de su concentración en la solución de dilución (79). El glicerol es el crioprotector más utilizado, que proporciona deshidratación celular a través del efecto osmótico, creando un medio hipertónico que induce la salida de agua de las células espermáticas, evitando la formación de hielo intracelular y aumentando la supervivencia a la criopreservación (6).

### 3.3 Marco conceptual

#### 3.3.1 Semen

Se define como un conjunto de espermatozoides y sustancias líquidas producidas en el tracto reproductivo masculino de animales y humanos (86). El semen consiste en una suspensión celular que se encuentran en los gametos masculinos y se compone de dos fracciones distintas: a) Los espermatozoides; b) El plasma seminal. Las interacciones entre los espermatozoides y el plasma seminal comienzan precozmente en la espermatogénesis (87). El plasma seminal es un líquido extracelular, que actúa como un vehículo para el transporte de la célula espermática.

Además, funciona como un medio rico en nutrientes. que proporciona la supervivencia de los espermatozoides en el genital femenino, compuesto por secreciones de las glándulas anexas del aparato reproductor masculino. El plasma seminal tiene una función importante en la interacción con el útero, protegiendo a los espermatozoides durante la Transporte espermático y prolongando su supervivencia en el genital femenino (85).

### **3.3.2 Espermatozoide**

Los espermatozoides son células alargadas, altamente especializadas, tienen cabeza plana con un núcleo y una cola que proporciona la motilidad celular, cubierta por una membrana plasmática. La parte anterior de la cabeza está cubierta por el acrosoma portador de enzimas importantes para que se lleve proceso de fertilización. Estructuralmente, cada espermatozoide puede ser dividido de forma morfológica y funcional, en cabeza (contiene el núcleo) y flagelo (permite la motilidad), los cuales están recubiertos por la membrana plasmática. El cuello conecta la cabeza del espermatozoide con el flagelo que se subdivide en una parte intermedia, principal y terminal, responsable de la propulsión de los espermatozoides (85).

### **3.3.3 Espermatogénesis**

Es un proceso sumamente complejo en la cual las células germinales inmaduras pasan una serie de fases como división, diferenciación y meiosis para dar sucesión a espermátidas alargadas y haploides de alta especialización; mediante divisiones mitóticas y meióticas, todo esto es monitoreado por de factores autocrinos, paracrinos y endocrinos. En los testículos a nivel de los túbulos seminíferos en conexión con las células somáticas del epitelio seminífero y además las células de Sertoli se lleva a cabo la espermatogénesis (88,89).

En los conductos seminíferos se forman los espermatozoides a partir de las espermatogonias del epitelio germinal, se encuentra en el borde exterior de los túbulos seminíferos; Se llevan a cabo una serie de divisiones celulares hacia la luz del tubo, donde la apariencia y las propiedades de las células cambian hasta que son liberadas a la luz. Después de un período de fijación a las células nodrizas, los



espermatozoides se independizan y pasan a lo largo de los túbulos seminíferos a los conductos colectores. Se suele decir que, durante la espermatogénesis, las espermatogonias sufren modificaciones para convertirse en espermatozoides, en las que se producen tres fases; la proliferación, meiosis y la espermiogénesis (89,90).

### **3.3.4 Dilutor**

Es una solución acuosa que ayuda a incrementar el volumen de eyaculado hasta alcanzar la dosis requerida. Los dilutores son sustancias que se adicionan al eyaculado, con el propósito de mantener su metabolismo, viabilidad y fertilidad de los espermatozoides. El propósito de la dilución es; a) Agregar al semen sustancias nutritivas, protectoras y amortiguadoras. b) Incrementar el volumen. c) Disminuir el metabolismo al mínimo de los espermatozoides al bajar la temperatura. d) Limitar la proliferación de microorganismos a través de la incorporación de antibióticos, sulfas, antimicóticos y otros (65).

### **3.3.5 Criopreservación**

La criobiología es la ciencia que estudia los efectos de las bajas temperaturas en las células y tejidos con fines de criopreservación. La criopreservación o congelación de espermatozoides es uno de los métodos para preservar espermatozoides por mucho tiempo con fines de utilizar en el futuro, básicamente se realiza sometiendo los espermatozoides a un proceso de enfriamiento gradual hasta llevarlo a una temperatura de  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  utilizando nitrógeno líquido. La criopreservación es también una técnica que permite mantener las células y tejidos a temperaturas muy bajas, normalmente entre  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ , para mantener su metabolismo plenamente activo. Todas las reacciones bioquímicas se detienen para que su viabilidad potencial se mantenga durante largos períodos de tiempo (91).

## **CAPÍTULO IV METODOLOGÍA**

### **4.1 Tipo y nivel de la investigación**

La investigación es de tipo experimental. Debido a que el investigador controló la variable independiente y la conformación de los grupos que necesitó para el estudio (92). La investigación experimental es un proceso que consiste en someter a un objeto o grupo de individuos, a determinadas condiciones, estímulos o tratamiento (variable independiente), para observar los efectos o reacciones que se producen (variable dependiente) (93).

El nivel de investigación explicativo. Pertenece a este nivel porque el propósito es demostrar que los cambios en la variable dependiente fueron causados por la variable independiente, es decir, se pretende explicar el comportamiento de una variable en función de otra(s); por ser estudios de causa-efecto (94).

### **4.2 Diseño de la investigación**

El diseño de la investigación se detalla más adelante.

### **4.3 Población y muestra**

#### **4.3.1 Población**

La población estuvo compuesta por semen colectado de carneros Hampshire Down de 1.5 a 2 años de edad, criados bajo un sistema extensivo alimentados con forraje de pastos naturales, procedente de un productor privado de la comunidad San Gabriel del distrito y provincia de Abancay, Apurímac.

#### **4.3.2 Muestra**

El método utilizado fue aleatorio simple cuyo tamaño muestral fue por conveniencia, que es un procedimiento no probabilístico (95). Se utilizó 30 colecciones de semen, obtenidos con vagina artificial de 3 carneros Hampshire Down, de genética puro por cruce (PPC).

#### 4.4 Técnica e instrumentos

##### 4.4.1 Localización

Las evaluaciones de las muestras de semen se realizaron en el Laboratorio de Histopatología, Embriología y Reproducción Animal de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac, ubicado en Patibamba Baja del distrito y provincia de Abancay del departamento de Apurímac, Perú. Está localizado a 13° 38' 31.40" Latitud Sur y 72° 53' 17.03" Longitud Oeste, a 2 180 m de altitud (96).

##### 4.4.2 Animales y diseño experimental

Se utilizó semen de 3 carneros Hampshire Down de 1.5 a 2 años de edad, se colectaron 10 eyaculados por carnero, 2 veces por semana, alcanzando a 30 eyaculados. Se formaron dos grupos de tratamiento (T) con dilutores de semen, T1: Tris-yema de huevo de gallina mezclado con yema de huevo de codorniz, T2: Triladyl® mas yema de huevo de gallina mezclado con yema de huevo de codorniz; con 10 repeticiones cada grupo. El eyaculado del semen de cada carnero se destinó una parte al grupo T1 y la otra al T2. Las muestras de cada tratamiento de semen se evaluaron antes y después de la congelación.

##### 4.4.3 Preparación de dilutores

La preparación del dilutor Triladyl® fue realizada según el manual de Minitube (77) en un tubo cónico de 14 mL se separó 6 mL de agua bidestilada, seguidamente se agregó 2 mL de Triladyl® y 1 mL de yema de huevo de gallina más 1 mL de yema de huevo de codorniz, de esta solución se separó en otro tubo 3 mL de dilutor para agregarle 1 mL del semen de carnero.

La preparación del dilutor Tris-YHG+C fue realizada según, Aisen (56) con algunas modificaciones, que consistió en pesar los insumos para Tris en una balanza analítica, para preparar el dilutor Tris, primero, se ha vertido agua bidestilada en un tubo cónico de 50 mL, seguido se colocó los insumos y se homogenizó según Tabla 5, seguidamente se agregó yema de huevo de gallina más yema de huevo de codorniz en partes iguales, la yema de huevo se obtuvo separando la clara sobre el papel filtro estéril, luego se colocaron en tubos cónicos de 14 mL que permanecieron a temperatura de 37 °C en baño María hasta su utilización. La

preparación del dilutor se realizó 12 h antes de su uso. La dilución fue 3:1 (3 partes de dilutor y 1 parte de semen) diluidos a temperatura de 37 °C en baño María.

**Tabla 5.** *Composición del dilutor Triladyl® (T2) para 10 mL (77)*

Insumos	Triladyl®
Yema de huevo de gallina (mL)	1.0
Yema de huevo de codorniz (mL)	1.0
Agua bidestilada (mL)	6.0
Triladyl® (mL)	2.0

**Tabla 6.** *Composición del dilutor Tris-YHG+C (T1). Para 10 mL (56)*

Contenido	Tris-yema de huevo
Tris (g)	0.388
Ácido cítrico (g)	0.212
Glucosa (g)	0.190
Glicerol (mL)	0.50
Penicilina (UI)	100.000
Yema de huevo de gallina (mL)	1.0
Yema de huevo de codorniz (mL)	1.0
Agua bidestilada (mL)	8.0

#### 4.4.4 Colección del semen

Los carneros utilizados para la colección del semen fueron procedentes de una crianza extensiva de un productor privado de la comunidad San Gabriel del distrito y provincia de Abancay, Apurímac. El lugar asignado donde se realizó la colección del semen se encontraba en sombra para evitar que los rayos solares afecten las muestras colectadas.

La colección del semen se realizó con el método de vagina artificial, según Bearden y Fuquay (97) con algunas modificaciones, se usó la vagina artificial para ovinos que consta un tubo rígido de 20 cm, la vagina artificial se cubrió internamente con

funda recta, se aseguró los extremos de la funda a la vagina artificial con liguillas de goma, se agregó agua entre 41 a 42 °C en el espacio entre el cilindro y la vagina artificial, en el extremo de la funda se colocó la funda cónica para el tubo colector, por la válvula de la vagina artificial se introdujo aire para dar presión al interior de la vagina artificial. La temperatura interna de la vagina artificial fue 41 °C. Para la colección del semen se sujetó una oveja para que el carnero realice la monta, de esta manera se colectó el semen, este proceso fue previo entrenamiento.

Las colecciones de semen se realizaron en tubos cónicos de plástico 14 mL en horas de la mañana, luego se llevaron al laboratorio para mantenerlos en baño maría a 37 °C, seguidamente se evaluaron las características espermáticas en semen fresco diluido con los dilutores Tris-yema de huevo de gallina mezclado con yema de huevo de codorniz y Triladyl®.

#### **4.4.5 Dilución del semen**

Para el tratamiento 1: El separó 3 mL de Triladyl® y se adicionó 1 mL de semen, luego se evaluaron las características seminales manteniendo la dilución en baño maría para evitar muerte de espermatozoides por shock térmico.

Para el tratamiento 2: Se formaron dos fracciones A y B, la fracción A contenía el dilutor base más semen, mientras la fracción B contenía el dilutor base más glicerol al 5%. Para la fracción A, se utilizó 1.5 mL de dilutor mas la adición de 1 mL de semen seguidamente se hizo la evaluación seminal de las variables en estudio. La fracción B, contenía 1.5 mL de dilutor mas la adición de 0.15 mL de glicerol al 5%.

#### **4.4.6 Evaluación del semen**

##### **Evaluación macroscópica del semen**

##### **a) Color**

Se determinó mediante la observación directa de las muestras del semen, después de cada colecta, se obtuvo el color blanco lechoso en todas las colecciones (54).

## b) Volumen

Para el semen colectado, el volumen se determinó por observación directa, según medida en mL del tubo colector, el mínimo colectado fue de 0.8 mL llegándose a colectar un máximo de 1.5 mL (56).

## Evaluación microscópica del semen

La evaluación de las características microscópicas del semen se realizó en 2 etapas:

- Fresco diluido: una vez obtenida la muestra se hizo la evaluación de la concentración, motilidad, vitalidad e integridad funcional de la membrana plasmática.
- Descongelado: en la muestra descongelada se evaluó la motilidad, vitalidad e integridad funcional de la membrana plasmática.

## a) Concentración espermática

La concentración espermática se evaluó según la técnica hemocitométrica definida por Aisen (56) donde se utilizó solución salina al 0.9% con formol al 4%. Los espermatozoides diluidos se aspiraron con cuenta glóbulos (hemocitómetro), seguidamente se colocó una microgota en la cámara de Neubauer cubierto con cubreobjeto luego, se observó en microscopio a objetivo de 40X, se contabilizaron en 5 cuadrantes diferentes, el valor obtenido fue expresado en millones de espermatozoides/mL de semen, obteniéndose un valor de  $4\,833 \times 10^6$ /mL de espermatozoides.

## b) Motilidad espermática

- **Motilidad masal:** Las muestras de semen fueron evaluadas de acuerdo a la metodología propuesta por Evans y Maxwell (52) que consistió en colocar 5  $\mu$ L de semen colectado de carnero en una lámina portaobjeto atemperado sobre una platina termocontrolada a 37 °C, el cual se observó con microscopio óptico a 10X, para valorar subjetivamente en una escala de 0 a 5 grados, considerando 0 cuando hay ausencia de movimiento y 5 cuando existen ondas con movimiento muy rápido y vigoroso. En las muestras del semen se observó motilidad masal en escala de 4 a 5 grados en las todas las colecciones.

- **Motilidad total:** Fue evaluada según la metodología de Evans y Maxwell (52), se consideró el total de espermatozoides móviles expresada en porcentaje. Para esta evaluación de motilidad, se mezcló 5  $\mu\text{L}$  de semen diluido por cada dilutor con 10  $\mu\text{L}$  de cloruro de sodio a 0.9% atemperado a 37 °C en baño maría, en viales de plástico de 2 mL. De dicha dilución se aspiró 2  $\mu\text{L}$  con una micropipeta y se colocó a la lámina portaobjeto atemperado sobre una platina térmica a 37 °C, luego con un cubreobjetos atemperado a 37 °C, se observó al microscopio a objetivo de 40X. Para la motilidad total, se consideró al total de espermatozoides móviles. Se observó en diferentes campos microscópicos, se contabilizaron 200 células espermáticas.
- **Motilidad progresiva:** Se consideraron los espermatozoides con presencia de movimientos hacia adelante que pueden ser rectilíneos y curvilíneos ya sean rápidos o lentos expresado en porcentajes. Se observó con microscopio a objetivo de 40X. Para su evaluación se consideró solo el conteo de los espermatozoides con movimientos progresivos. Los valores obtenidos se expresaron en porcentaje.

### c) Vitalidad espermática

Fue evaluada según la metodología de Evans y Maxwell (52) la vitalidad espermática fue evaluada utilizando una solución de Eosina/Nigrosina. Se preparó frotis en láminas portaobjetos atemperado a 37 °C sobre una platina termocontrolada, se colocó una alícuota de 5  $\mu\text{L}$  de la solución del colorante y la misma cantidad de alícuota de semen, se homogenizaron suavemente las alícuotas con el uso de tipos de pajillas de 0.25 mL para hacer frotis sobre una lámina portaobjeto atemperado. Se contabilizaron 200 células espermáticas con microscopio a objetivo de 40X en diferentes campos, se consideraron espermatozoides muertos aquellos coloreados con la Eosina y Nigrosina, los que no fueron coloreados como espermatozoides vivos. Todos los valores obtenidos se expresaron en porcentaje.

#### d) Integridad funcional de la membrana plasmática (HOST)

Se evaluó el parámetro hipoosmótico, utilizando una solución hipoosmótica de 100 mOsmol. Para la solución HOST se preparó según las indicaciones de Aisen (56), se separó agua bidestilada 10 mL y se agregó los insumos según Tabla 7. La preparación se hizo un día antes de la colección del semen. Se colocó 0.9 mL de la solución de HOST en un tubo cónico de 14 mL, a temperatura de 37 °C en baño María, al cual se agregó 0.1 mL de semen diluido con los dilutores correspondientes Tris-YHG+C y Triladyl®, se dejó por 45 minutos en baño María, luego se añadió 0.1 mL de formaldehído al 4%.

Para la observación de la integridad funcional de la membrana plasmática, se colocó una microgota sobre una lámina portaobjetos y con cubreobjetos. Se contaron 200 células espermáticas a objetivo de 40X en varios campos de la lámina, escogidos aleatoriamente, siendo considerados espermatozoides con integridad funcional de la membrana plasmática aquellos que presentaron edema, evidenciado por el enrollamiento de la cola del espermatozoide (reacción positiva) y aquellos que no presentaron edema ni enrollamiento de la cola (reacción negativa). Los valores obtenidos se expresaron en porcentajes.

**Tabla 7.** Preparación de la solución HOST

Insumos	Cantidad
Citrato de sodio (g)	0.04
Fructosa (g)	0.09
Agua destilada (mL)	10.00

#### 4.4.7 Equilibramiento de temperatura para el semen y dilutores

Las muestras contenidas en tubos cónicos de plástico según los tratamientos se colocaron durante 2 horas a temperatura ambiente hasta llegar a 15 °C, luego se coloca en refrigeración a 4 °C por 2 horas, hasta su equilibramiento. Para el Tratamiento 1, se mezclaron las dos fracciones A y B para empajillar y para el Tratamiento 2 solo es una fracción conteniendo dilutor mas semen.

#### **4.4.8 Empajillado del semen**

Se utilizaron pajuelas de 0.25 mL, debidamente identificadas. Se aspiró los espermatozoides diluidos por cada dilutor, utilizando una jeringa tuberculina, se colocó en su extremo tipos de micropipeta luego las pajuelas para aspirar, seguidamente fueron sellados con alcohol polivinílico cada pajuela, manteniéndose la temperatura para el empajillado a 5 °C.

#### **4.4.9 Congelación del semen**

Se utilizó una caja de poliestireno con contenido de nitrógeno líquido hasta un nivel de 5 cm. Las pajuelas se colocaron sobre una parrilla de congelamiento a 5 cm del nivel de nitrógeno líquido, por 15 min. luego se sumergió las pajuelas al nitrógeno líquido para su congelación. Las pajillas después de sumergirse en nitrógeno líquido por 12 min se almacenaron en los goblets para su posterior almacenamiento en el tanque criogénico.

#### **4.4.10 Almacenamiento de pajuelas**

Se almacenaron las pajuelas en tanque criogénico a -196 °C, colocados en los goblet y estos a su vez en porta goblet, cada pajilla identificadas por cada tratamiento y carnero, finalmente los porta goblet se colocaron en las canastillas para su almacenamiento en el tanque criogénico.

#### **4.4.11 Descongelamiento del semen**

Se realizó la descongelación de pajillas del semen con la utilización de una terma a 37 °C por 1 minuto. Para descongelar las pajillas se realizó después de 3 días del congelamiento del semen. Se hizo la evaluación espermática con la misma metodología que se realizó antes de la congelación: se evaluaron motilidad total, motilidad progresiva, vitalidad e integridad funcional de la membrana plasmática.

### **4.5 Análisis estadístico**

Para analizar los datos se utilizó el sistema de análisis estadístico (SAS) v 9.4. Las variables de respuesta al principio se comprobaron con la normalidad mediante la prueba Shapiro-Wilk y la homogeneidad de Varianza mediante Levene. Seguidamente se transformaron los datos a arcoseno. Posteriormente se realizó el análisis de varianza mediante el Modelo Lineal General, bajo el diseño completamente al azar. La comparación

de medias se realizó con la prueba de Tukey determinando la significancia ( $P \leq 0.05$ ) entre grupos.

$$Y_{ij} = \mu + t_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

$Y_{ij}$  = Es la variable de respuesta (motilidad total, motilidad progresiva, vitalidad e integridad funcional de la membrana plasmática).

$t_i$  = Es el efecto del tratamiento  $i$  con dos niveles: Triladyl® y Tris-YHG+C.

$\mu$  = Es la constante, media de las observaciones.

$\varepsilon_{ij}$  = Es el efecto del error experimental, que está distribuido como  $\varepsilon$  DNI ( $0, \sigma^2\varepsilon$ ).

## CAPÍTULO V

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 5.1 Análisis de resultados

##### 5.1.1 Motilidad total espermática

**Tabla 8.** Porcentaje de motilidad total (media  $\pm$  desviación estándar) de espermatozoides de carneros, diluidos con Triladyl® y Tris-YHG+C antes y después de la congelación

Semen	Motilidad total espermática		Media de semen*
	Triladyl®	Tris-yema	
Fresco	85.7 $\pm$ 4.3	84.6 $\pm$ 4.4	85.1 $\pm$ 4.3 <sup>a</sup>
Descongelado	44.7 $\pm$ 5.7	43.8 $\pm$ 4.6	44.2 $\pm$ 5.1 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Letras diferentes de superíndices dentro de la misma columna indican diferencias ( $P < 0.05$ )

\*Media de semen antes y después de la congelación

Los resultados de la motilidad total de los espermatozoides antes y después de la congelación se muestran en el Tabla 8. El efecto entre los dilutores Triladyl® y Tris-yema, sobre la motilidad total de los espermatozoides de carneros antes y después de la congelación fueron similares ( $P > 0.05$ ). Sin embargo, se encontró menor ( $P < 0.05$ ) motilidad total de espermatozoides de carneros después de la descongelación de semen independientemente de los dilutores. En ambos dilutores se utilizaron mezcla de yemas de huevo de gallina mezclado con yema de huevo de codorniz en proporciones iguales.

En semen fresco diluido el porcentaje de la motilidad total de espermatozoides en el presente estudio son similares a reportes de Jha *et al.* (10) utilizaron dos dilutores Tris-yema de huevo de gallina (20%) con glicerol al 5% y Triladyl®, quienes encontraron 82.5  $\pm$  0.9% y 81.3  $\pm$  1.6% de motilidad total; Amini *et al.* (22) 80.31  $\pm$

1.40% de motilidad total utilizando Tris-yema de huevo de gallina. La similitud de resultados posiblemente se deba a que se realizaron en condiciones similares al presente estudio.

Por otro lado, resultados mayores al presente estudio en semen fresco diluido, son reportados por Ek *et al.* (29) utilizando dos dilutores comerciales Triladyl® y One-Step, en semen fresco diluido, reportan 88.7% y 89.0%; Aké *et al.* (26) con Triladyl® encontraron 88.7%; Castillo (23) encontró en uno de los tratamientos con dilutor Tris-yema de huevo de gallina  $90.98 \pm 2.35\%$  de motilidad total en semen refrigerado, evaluados con Computer Assisted Sperm Analysis (CASA). Posiblemente estos resultados superiores al presente estudio se deban por la metodología de evaluación utilizada por el sistema CASA, que tendría mayor efectividad de conteo de células espermáticas móviles (23).

Por otra parte, resultados menores en semen fresco diluido comparado al presente estudio fueron encontrados por Vieira *et al.* (98) quienes utilizando Tris-yema de huevo de gallina encontraron  $76.6 \pm 15.9\%$ . Posiblemente esta disminución de la motilidad total esté relacionada a factores ambientales. Conde *et al.* (30) mencionan que la estacionalidad de lluvias influye sobre los parámetros espermáticos en el ovino Hampshire. También, esta variación puede estar relacionada con factores tales como especie, componentes de extensores y otros (98).

Los resultados de la motilidad total de espermatozoides de semen descongelado en el presente estudio son similares a las investigaciones realizadas por Guerrero *et al.* (34) quienes utilizaron dos dilutores, Tris-trealosa y Tris-lactosa encontrando 40.3% y 30.0%; Vieira *et al.* (98), con el dilutor Tris-yema de huevo de gallina encontraron  $41.7 \pm 8.1\%$  de motilidad total.

Sin embargo, en semen descongelado encontraron resultados mayores comparado al presente Ek *et al.* (29) quienes utilizando dos dilutores comerciales Triladyl® y One-Step, después de 72 horas encontraron 60.1% y 59.5%; Aké *et al.* (26) en semen diluido con Triladyl® encontraron 65.6%; Castillo (23), encontró en uno de los tratamientos con dilutor Tris-yema de huevo de gallina  $65.34 \pm 5.94\%$  en semen descongelado, evaluados con sistema CASA. Posiblemente estos resultados



superiores al presente estudio se deban por la metodología de evaluación utilizada por el sistema CASA, tendría mayor efectividad de conteo de células espermáticas móviles (23).

Por otra parte, en semen descongelado fueron reportados resultados menores comparado al presente estudio. Amini *et al.* (22) encontraron  $36.25 \pm 1.54\%$  utilizado Tris-yema de huevo de gallina. La disminución de la motilidad total después de la descongelación, según, Guillaume (99) considera que es normal la disminución de la motilidad, debido a los cambios por los que tiene que atravesar el espermatozoide durante el enfriamiento, la congelación y la descongelación.

La diferencia de la motilidad total del presente estudio entre el semen fresco diluido y congelado fue 40.9%, esta diferencia está dentro del rango convencional. Watson (74) durante el proceso de congelación y descongelación del semen se puede dar una disminución de la motilidad total espermática entre el 40 y 50%. Evans *et al.* (52) afirman que los eyaculados de carneros deben tener un porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva no menor del 40% al descongelarlos para ser considerado óptimo en programas de inseminación artificial.

### 5.1.2 Motilidad espermática progresiva

**Tabla 9.** Porcentaje de motilidad progresiva (media  $\pm$  desviación estándar) de espermatozoides de carneros, diluidos con Triladyl® y Tris-YHG+C antes y después de la congelación

Semen	Motilidad espermática progresiva		Media de semen*
	Triladyl®	Tris-yema	
Fresco	$73.6 \pm 4.1$	$73.7 \pm 4.1$	$73.6 \pm 4.1^a$
Descongelado	$29.4 \pm 3.2$	$27.6 \pm 3.1$	$28.5 \pm 3.3^b$

<sup>a,b</sup> Letras diferentes de superíndices dentro de la misma columna indican diferencias ( $P < 0.05$ )

\*Media de semen antes y después de la congelación

Los resultados de la motilidad progresiva de los espermatozoides antes y después de la congelación se muestran en el Tabla 9. El efecto entre los dilutores Triladyl® y Tris-yema sobre la motilidad progresiva de los espermatozoides de carneros antes y después de la congelación fueron similares ( $P > 0.05$ ). Se encontró menor ( $P <$

0.05) motilidad progresiva de espermatozoides de carneros después de la descongelación de semen independientemente de los dilutores. En ambos dilutores se utilizaron mezcla de yemas de huevo de gallina mezclado con yema de huevo de codorniz en proporciones iguales.

En semen fresco diluido los resultados para la motilidad progresiva antes de la congelación de espermatozoides en el presente estudio, son similares a los estudios encontrados por Ramos *et al.* (25) quienes obtuvieron con Tris-yema de huevo y Triladyl®, 79.89% y 74.33%; Dalmazzo (100) utilizando Tris-citrato-yema de huevo,  $77.5 \pm 7.5\%$ ; Buitrago y Pérez (31) utilizando el dilutor Salamon con yema de huevo líquida encontró 72.5%; Merino (101),  $74.5 \pm 3.9\%$ .

Por otro lado, en semen fresco diluido encontraron valores mayores comparado a los resultados del presente estudio, Castillo (23) reportó con Tris-yema de huevo de gallina  $83.88 \pm 4.82\%$ ; Sánchez (32)  $84.13 \pm 0.47\%$  con Tris-yema de huevo de gallina; Cabrera *et al.* (33) utilizando Tris-Fructosa-yema de huevo encontró  $83.75 \pm 3.2\%$ . Así mismo, obtuvieron resultados superiores con el dilutor Triladyl® antes de la congelación de espermatozoides, Toscano (27)  $87 \pm 0.2\%$ ; Hernández *et al.* (24)  $88.0 \pm 3.4\%$ ; Delgado (2)  $85.74 \pm 1.75\%$  en semen fresco diluido.

Resultados ligeramente inferiores al presente estudio antes de la congelación obtuvieron, Amini *et al.* (22) quienes encontraron  $69.01 \pm 1.93\%$  utilizando Tris-yema de huevo; Buitrago y Pérez (31) utilizando dilutor Salamon con yema en polvo, encontraron 67.5% en semen fresco diluido.

Los resultados para la motilidad progresiva después de la congelación de espermatozoides del presente estudio, son similares a los estudios encontrados por Dalmazzo (100) utilizando Tris-citrato-yema de huevo,  $27.0 \pm 15.5\%$ ; Buitrago y Pérez (31) utilizando el dilutor Salamon con yema en polvo 27.5%.

En semen descongelado de espermatozoides, varios estudios utilizando Tris-yema de huevo de gallina encontraron resultados mayores comparado al presente estudio, Merino (101)  $56.7 \pm 4.1\%$ ; Choquepuma (21) encontró  $44.64 \pm 3.51\%$ ; Pantoja y Cabrera (20)  $61 \pm 3.57\%$ ; Cabrera *et al.* (3) 62%; Buitrago y Pérez (31) utilizando dilutor Salamon con yema de huevo líquida, encontraron 44.2%; Ramos *et al.* (25)



utilizando Tris-yema de huevo y Triladyl® después de la congelación obtuvieron 51.17% y 44.17%; por otra parte, utilizando Tris-yema de huevo de gallina reportan, Castillo (23)  $55.13 \pm 7.59\%$ ; Sánchez (32)  $57.60 \pm 0.82\%$ ; Cabrera *et al.* (33) utilizando Tris-Fructosa-yema de huevo, encontraron  $62.33 \pm 2.31\%$ . Así mismo, obtuvieron resultados superiores con el dilutor Triladyl® después de la congelación de espermatozoides, Toscano (27)  $41 \pm 0.2\%$ ; Hernández *et al.* (24)  $37.4 \pm 5.3\%$ . Estos resultados superiores podrían deberse a la utilización de bajas concentraciones de glicerol en los dilutores, Jha *et al.* (10) mencionan que el mejor rendimiento del dilutor podría deberse a concentraciones más bajas de glicerol (5%).

Por otro lado, resultados ligeramente inferiores que la presente investigación después de la congelación, reportaron Amini *et al.* (22)  $26.13 \pm 1.25\%$  utilizando Tris-yema de huevo; Cervera (28) encontró con el dilutor Triladyl®  $19.97 \pm 0.86\%$ . Ramos *et al.* (25) mencionan que hay una influencia significativa de los tiempos de equilibrio sobre la motilidad. Los resultados inferiores en el presente estudio después de la congelación de espermatozoides comparado a las investigaciones anteriores, posiblemente se deban al uso de yema de huevo en los dilutores, ya que al observar al microscopio dificulta la visualización de los espermatozoides por la presencia de partículas de yema de huevo, asimismo los tiempos de equilibramiento pueden haber sido otro factor determinante debido a que los espermatozoides de carneros son altamente sensibles a los cambios de temperatura “choque térmico”.

### 5.1.3 Vitalidad

**Tabla 10.** Porcentaje de la vitalidad (media  $\pm$  desviación estándar) de espermatozoides de carneros, diluidos con Triladyl® y Tris-YHG+C antes y después de la congelación

Semen	Vitalidad		Media de semen*
	Triladyl®	Tris-yema	
Fresco	$86.8 \pm 4.2$	$85.6 \pm 4.7$	$86.2 \pm 4.5^a$
Descongelado	$45.6 \pm 5.8$	$44.7 \pm 4.6$	$45.1 \pm 5.2^b$

<sup>a,b</sup> Letras diferentes de superíndices dentro de la misma columna indican diferencias ( $P < 0.05$ )

\*Media de semen antes y después de la congelación

Los resultados de la vitalidad espermática antes y después de la congelación, se muestran en el Tabla 10. El efecto entre los dilutores Triladyl® y Tris-yema sobre la vitalidad de los espermatozoides de carneros antes y después de la congelación fueron similares ( $P > 0.05$ ). Se encontró menor ( $P < 0.05$ ) vitalidad de espermatozoides de carneros después de la descongelación de semen independientemente de los dilutores. En ambos dilutores se utilizaron mezcla de yemas de huevo de gallina mezclado con yema de huevo de codorniz en proporciones iguales.

En semen fresco diluido los resultados de la vitalidad del presente estudio utilizando Tris-yema de huevo gallina son similares a estudios de Castillo (23)  $85.79 \pm 4.55\%$ ; Sánchez (32)  $80.27 \pm 0.45\%$ ; Amini *et al.* (22) quienes encontraron  $81.93 \pm 1.29\%$ ; así mismo, con Triladyl® en semen fresco diluido, Toscano (27) reporta  $85 \pm 0.16\%$ .

Por otro lado, resultados mayores antes de la congelación comparado al presente estudio obtuvieron Hernández *et al.* (24) con Triladyl®  $91.4 \pm 3.8\%$ ; Guerrero *et al.* (34)  $90.2 \pm 3.8$  en semen fresco con Tris-threalosa. El método que se utiliza para la colección del semen podría afectar la vitalidad, Matthews (102) indica que el semen colectado por el método de vagina artificial muestra un mayor porcentaje de espermatozoides vivos y una concentración más alta que la recolectada por el método de electroeyaculación.

Así mismo, resultados menores comparado a la presente investigación antes de la congelación, fueron encontrados por Delgado (2) con Triladyl®  $75.19 \pm 4.58\%$ ; Merino (101) con Tris-yema de huevo en semen fresco diluido  $73.7 \pm 3.3\%$ . Garner (70) menciona que las tinciones a base de Eosina o combinadas con Nigrosina no son adecuadas para la evaluación de muestras de semen criopreservado, debido a la presencia del crioprotector glicerol, que interfiere con la tinción. En el presente estudio se usó Eosina – Nigrosina, quizá este factor pudo haber influido.

Los resultados después de la congelación comparado al presente estudio fueron similares a los reportes de Choquepuma (21) con Tris-yema de huevo de gallina

46.49 ± 2.31% después de congelar. La similitud de resultados posiblemente se deba a que se realizaron en condiciones similares al presente estudio.

Por otro lado, resultados superiores al presente estudio después de congelar encontraron Merino (101) reportó 58.2 ± 5.5% con Tris-yema de huevo; Sánchez (32) encontró 53.01 ± 0.53% con Tris-yema de huevo de gallina; Kulaksiz, *et al.* (35) utilizando Tris-yema de huevo de gallina 50.0%; Castillo (23) encontró 56.58 ± 7.34% con Tris-yema de huevo de gallina. También con Triladyl® obtuvieron Hernández *et al.* (24) reportó 67.5 ± 4.7%; Toscano (27) obtuvo 60 ± 0.18%. Kulaksiz *et al.* (35) mencionan que un factor que pudo haber ocasionado una mayor viabilidad es la yema de huevo, es que esta es buena para la congelación debido al factor de resistencia, que ayuda al espermatozoide frente al choque térmico y al factor de almacenamiento, los cuales pueden ayudar a mantener una alta viabilidad.

Por otra parte, reportan resultados inferiores después de la congelación con Tris-yema de huevo Amini *et al.* (22) quienes encontraron 38.90 ± 1.92% después de congelar; Guerrero *et al.* (34) encontraron utilizando Tris-trealosa y Tris-lactosa, 34.4 ± 6.6% y 24.3 ± 5.0% en semen descongelado; Kulaksiz, *et al.* (35) en semen descongelado utilizando Tris-yema de huevo de codorniz obtuvieron 33.0%. Probablemente estos valores menores sean atribuidos al uso de la yema de huevo. Aires *et al.* (14) mencionan que la yema de huevo puede inducir a una aglutinación de espermatozoides, impidiendo el conteo adecuado de los espermatozoides. También, Watson (8) menciona que el empleo de velocidades de congelación superiores a la óptima impide al agua intracelular abandonar la célula antes de enfriarse y congelarse provocando la muerte celular por la formación de cristales de hielo; mientras que cuando se emplean tasas inferiores a la óptima, las lesiones se originan por la deshidratación celular que trae consigo una prolongada exposición de las células a elevadas concentraciones de solutos, con deshidratación y aumento de la concentración del crioprotector, cambios de pH y precipitación de sales. Por tanto, deben utilizarse velocidades de congelación intermedias que aumenten la tasa de supervivencia celular después de la congelación.

### 5.1.4 Integridad funcional de la membrana plasmática

**Tabla 11.** Porcentaje de la integridad funcional de la membrana plasmática (media  $\pm$  desviación estándar) de espermatozoides de carneros, diluidos con Triladyl® y Tris-YHG+C antes y después de la congelación

Semen	Prueba de HOST		Media de semen*
	Triladyl®	Tris-yema	
Fresco	75.5 $\pm$ 4.5	75.1 $\pm$ 4.1	75.3 $\pm$ 4.3 <sup>a</sup>
Descongelado	30.0 $\pm$ 3.3	28.2 $\pm$ 3.2	29.1 $\pm$ 3.3 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Letras diferentes de superíndices dentro de la misma columna indican diferencias ( $P < 0.05$ )

\*Media de semen antes y después de la congelación

HOST: Hipo Osmotic Swelling Test

Los resultados de la prueba de integridad funcional de la membrana plasmática (HOST) de los espermatozoides antes y después de la congelación se muestran en el Tabla 11. El efecto entre los dilutores Triladyl® y Tris-yema sobre HOST de los espermatozoides de carneros antes y después de la congelación fueron similares ( $P > 0.05$ ). Se encontró menor ( $P < 0.05$ ) reacción positiva a la prueba de HOST de espermatozoides de carneros después de la descongelación de semen independientemente de los dilutores. En ambos dilutores se utilizaron mezcla de yemas de huevo de gallina mezclado con yema de huevo de codorniz en proporciones iguales.

En semen fresco diluido los resultados del presente estudio son similares a los encontrados por Dalmazzo (100) quien obtuvo con Triladyl® 75.5  $\pm$  6.1% antes de la congelación; Delgado (2) reportó con Triladyl® 73.36  $\pm$  4.49% en semen fresco diluido. Díaz *et al.* (103) mencionan que los resultados que permiten la obtención de mayores porcentajes de espermatozoides móviles y con membrana íntegra son aquellos dilutores con yema de huevo.

Por otro lado, en varios estudios reportan resultados superiores a los encontrados en la presente investigación antes de la congelación de espermatozoides, Cabrera *et al.* (33) con el dilutor Tris- Fructosa-Yema de huevo encontraron 81.37  $\pm$  3.22%;

Castillo (23) reportó con Tris-yema de huevo de gallina  $86.61 \pm 3.99\%$ . Así mismo, Toscano (27) con Triladyl® encontró  $85 \pm 0.16\%$ . Vieira *et al.* (98) mencionan que la variación puede estar relacionada con factores tales como especies, componentes de extensores, procedimientos de congelación y diferentes concentraciones de antioxidantes utilizados.

Sin embargo, resultados ligeramente inferiores al presente estudio, antes de congelar fueron encontrados por Amini *et al.* (22) quienes reportaron con Tris-yema de huevo de gallina  $60.37 \pm 3.56\%$ ; Aké *et al.* (26) obtuvieron con Triladyl® 68%. Aires *et al.* (14) indican que el uso de yema de huevo aumenta el riesgo de contaminación microbiana por la gran variabilidad en su composición, este factor probablemente podría disminuir el número de espermatozoides vivos con la membrana plasmática intacta.

Los resultados después de la congelación de semen comparado al presente estudio son similares a los reportes de Vargas (19) con Tris-yema de huevo de gallina 34.47%; Kulaksiz *et al.* (35) obtuvieron con Tris-yema de huevo de codorniz 30.8% después de la congelación; Guerrero *et al.* (34) encontraron utilizando Tris-trealosa 34.4%. La similitud de estos resultados posiblemente se deben a que se realizaron dichos estudios en condiciones similares. Moussa *et al.* (18) afirman que el principal componente activo de la yema de huevo es la fracción de lipoproteínas de baja densidad que protege la integridad de la membrana.

Por otro lado, varios estudios reportan resultados superiores después de la congelación de semen, Cabrera *et al.* (33) con el dilutor Tris-Fructosa-Yema de huevo (Tris) encontraron  $40.19 \pm 5.10\%$ ; Castillo (23) reportó con Tris-yema de huevo de gallina  $50.54 \pm 7.17\%$ ; Toscano (27) con el dilutor Triladyl® encontró  $60 \pm 0.18\%$ . También, reportaron resultados superiores después de la congelación de semen, con el dilutor Tris-yema de huevo gallina reportan Kulaksiz *et al.* (35) 44.0%; Sánchez (32),  $53.01 \pm 0.53\%$ ; Choquepuma (21)  $42.75 \pm 3.08\%$ ; Pantoja y Cabrera (20)  $40 \pm 3.57\%$ ; Cabrera *et al.* (3)  $49.8 \pm 3.9\%$ . Kulaksiz *et al.* (35) mencionan que un factor que pudo haber ocasionado una mayor viabilidad es la yema de huevo, que es buena para la congelación debido al factor de resistencia que

ayuda proteger al espermatozoide frente al choque térmico que pueden ayudar mantener una alta viabilidad.

Por otra parte, resultados ligeramente inferiores a la presente investigación después de la congelación, fueron encontrados por Amini *et al.* (22) quienes reportaron con Tris-yema de huevo  $26.93 \pm 1.46\%$ ; Guerrero *et al.* (34) encontraron utilizando Tris-lactosa 24.3%. También, encontraron resultados inferiores con Triladyl®, Cervera *et al.* (28)  $21.98 \pm 1.27\%$ ; Aké *et al.* (26) 24.9%. Los resultados inferiores después de la congelación probablemente se atribuyan al tiempo transcurrido durante el proceso de la congelación de pajillas, Kulaksiz *et al.* (35) mencionan que esta diferencia probablemente se deba al tiempo de congelación, por lo que a mayor tiempo de exposición de las pajuelas a los vapores de nitrógeno líquido causa una mayor deshidratación de los espermatozoides, por tanto, shock osmótico mayor. Thomas *et al.* (104) afirman que durante el proceso de criopreservación esta disminución de la viabilidad de los espermatozoides se produce principalmente por los efectos de la temperatura y la presión osmótica, cambios que se producen en la organización morfológica de las células como la permeabilidad, la composición lipídica de las membranas espermáticas y el líquido intracelular.

## CAPÍTULO VI

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 6.1 Conclusiones

- Los dilutores Triladyl® y Tris-yema de huevo de gallina mezclado con yema de huevo de codorniz tuvieron efectos similares sobre la motilidad total y la motilidad progresiva de los espermatozoides de carneros Hampshire Down, antes y después de la congelación del semen.
- La vitalidad y la integridad funcional de la membrana plasmática de los espermatozoides de carneros Hampshire Down, antes y después de la congelación, utilizando los dilutores Triladyl® y Tris-yema de huevo de gallina mezclado con yema de huevo de codorniz, tuvieron efectos similares.
- La yema de huevo de codorniz combinada con la de gallina, se puede usar como componente de los dilutores Triladyl® y Tris, en procesos de criopreservación del semen de carneros Hampshire Down.

#### 6.2 Recomendaciones

- Evaluar las características espermáticas después de la congelación de semen de carneros, utilizando dilutores Triladyl® y Tris mezclando yemas de huevo de gallina y codorniz a diferentes concentraciones.
- Evaluar factores como edad del carnero, nivel nutricional, condición corporal, época del año y otros, asociando con las diferentes concentraciones de yema de huevo mezclando la de gallina y codorniz, sobre las características espermáticas posdescongelación del semen de carneros.
- Evaluar el uso de otros dilutores en la criopreservación del semen de carneros, para optimizar y llegar a los estándares adecuados para utilizar en programas de inseminación artificial.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Díaz R. Cadena Productiva de Ovinos. 1.<sup>a</sup> ed. Díaz R, Oviedo F, editores. Lima: Ministerio de Agricultura y Riego; 2013. 54 p.
2. Delgado BE. Evaluación espermática de semen de ovino tratado por la técnica de gradiente de densidad. Universidad Ricardo Palma; 2013.
3. Cabrera P, Ayulo A, Pantoja C. Efecto del dilutor tris y citrato con yema de huevo de cordorniz sobre la viabilidad espermática en semen ovino congelado en pajillas. Rev Investig Vet del Perú. 2011;22(2):105-13.
4. Salamon S, Maxwell WM. Storage of ram semen. Anim Reprod Sci. agosto de 2000;62(1-3):77-111.
5. Nadal SL, Pereira J, Dias PB. Parâmetros utilizados na avaliação do sêmen congelado ovino para inseminação laparoscópica. Brazilian J Vet Res Anim Sci. 1 de enero de 2000;37(2):141-5.
6. Holt WV. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. Theriogenology. 1 de enero de 2000;53(1):47-58.
7. Salamon S, Maxwell WMC. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. Anim Reprod Sci. febrero de 1995;37(3-4):185-249.
8. Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Anim Reprod Sci. julio de 2000;60-61:481-92.
9. Maxwell WMC, Watson PF. Recent progress in the preservation of ram semen. Anim Reprod Sci. 1 de abril de 1996;42(1-4):55-65.
10. Jha PK, Shahi Alam MG, Mansur AA, Naher N, Islam T, Uddin Bhuiyan M, et al. Cryopreservation of Bangladeshi ram semen using different diluents and manual freezing techniques. Cryobiology. junio de 2019;89(1):35-41.
11. Baran A, Bacinoglu S, Evecen M, Sahin BE, Alkan S, Demir K. Freezing of Cat Semen in



- Straws with Different Glycerol Levels Containing Tris Extender. *Turk J Vet Anim Sci.* 2004;28(3):545-52.
12. Axner E, Hermansson U, Linde-Forsberg C. The effect of Equex STM paste and sperm morphology on post-thaw survival of cat epididymal spermatozoa. *Anim Reprod Sci.* agosto de 2004;84(1-2):179-91.
  13. Glover TE, Watson PF. The effects of egg yolk, the low density lipoprotein fraction of egg yolk, and three monosaccharides on the survival of cat (*Felis catus*) spermatozoa stored at 5°C. *Anim Reprod Sci.* 1 de mayo de 1987;13(3):229-37.
  14. Aires VA, Hinsch K-D, Mueller-Schloesser F, Bogner K, Mueller-Schloesser S, Hinsch E. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology.* 1 de julio de 2003;60(2):269-79.
  15. Forouzanfar M, Sharafi M, Hosseini SM, Ostadhosseini S, Hajian M, Hosseini L, et al. In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology.* 1 de marzo de 2010;73(4):480-7.
  16. Buxadé C. *Zootecnia: Bases de producción animal: Reproducción y alimentación.* 1.ª ed. Madrid: Mundi-Prensa; 1995. 344 p.
  17. Bellido E, Blanco HS. Efecto de dos dilutores sobre la criopreservación de semen de verraco. Universidad Nacional de Huancavelica; 2013.
  18. Moussa M, Martinet V, Trimeche A, Tainturier D, Anton M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology.* 1 de abril de 2002;57(6):1695-706.
  19. Vargas P. Efecto del factor dilutor y raza en la integridad de la membrana espermática y acrosomal en semen criopreservado de carneros. Universidad Nacional del Altiplano; 2015.
  20. Pantoja C, Cabrera P. Influencia del dilutor Tris y Ovine Freezing sobre la integridad de membrana citoplasmática, durante la congelación de semen de ovinos en pajillas de 0.5 ML. *An Científicos UNALM.* 2009;70(1):67-74.

21. Choquepuma WA. Efecto de la lecitina de soja en la criopreservación de semen de ovino y sus efectos sobre la multilidad espermática e integridad funcional de la membrana. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco; 2010.
22. Amini S, Masoumi R, Rostami B, Shahir MH, Taghilou P, Arslan HO. Effects of supplementation of Tris-egg yolk extender with royal jelly on chilled and frozen-thawed ram semen characteristics. *Cryobiology*. junio de 2019;88:75-80.
23. Castillo LA. Adición de metil- $\beta$ -ciclodextrina cargada de colesterol en la criopreservación de semen de carnero. Universidad Nacional Agraria la Molina; 2017.
24. Hernández PJE, Fernández RF, Rodríguez SJL, Juárez RE, Soto MYG, García RAD. Efecto de la criopreservación de semen de ovino en relación a su viabilidad y estado acrosomal. *Rev Salud Anim*. 2012;34(2):78-83.
25. Ramos L, Rojas A, Martínez Z. Efecto de dilutores y tiempos de equilibrio en la criopreservación de semen ovino (*Ovis aries*). *Rev Investig e Innovación Agropecu y Recur Nat*. 2017;4(2):63-71.
26. Aké JR, Ramírez H, Aké NY, Aké JR, Barrios MB. Viabilidad de semen de ovino congelado con leche descremada como diluyente. *Bioagrocencias*. 2016;9(1):65-71.
27. Toscano IA. Efecto de la congelación-descongelación del semen ovino sobre el estado funcional de la membrana plasmática del espermatozoide utilizando un diluyente para bovinos. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; 2006.
28. Cervera D, Cob L, Rivera J, Domínguez Á, Baeza JJ, Ramón J. Efecto de la adición de un surfactante (Orvus es Paste®) en el diluyente de congelación sobre la calidad y la capacidad fecundante del semen ovino de pelo (*Ovis aries*) congelado. *Rev Científica*. 2013;23(1):48-53.
29. Ek JE, Aké JR, Silva CA. Efecto de dos diluyentes sobre la viabilidad del semen congelado de ovinos de pelo. *Bioagrocencias*. 2009;2(1):4-23.
30. Conde E, Rivera W, Baéz G, Grajales H. Evaluación de la calidad espermática bajo un sistema computarizado de análisis seminal en ovinos criollos, Romney Marsh y Hampshire en condiciones de trópico alto. 1.<sup>a</sup> ed. IV semana internacional y XII semana de ciencia,

- tecnología e innovación. San José de Cúcuta: Universidad Francisco de Paula Santander; 2017. 146-151 p.
31. Buitrago JM, Pérez LM. Comparación de dos diluyentes para la criopreservación de semen ovino. Universidad de la Salle; 2008.
  32. Sánchez NC. Efecto de dos dilutores sobre la motilidad y el porcentaje de espermatozoides vivos en el semen congelado de ovino (*Ovis aries*). Universidad Nacional de la Amazonía Peruana. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana; 2009.
  33. Cabrera P, Orellana J, Pantoja C. Efecto de dos dilutores sobre la motilidad e integridad de la membrana espermática en semen congelado de ovinos. *Rev Investig Vet del Perú*. 2010;21(2):154-60.
  34. Guerrero H, Huanca W, Raymundo F, Huerta S, Ramos D. Uso de dilutores hipertónicos en la criopreservación de semen ovino. *Rev Investig Vet del Perú*. 2009;20(1):41-6.
  35. Kulaksız R, Çebi Ç, Akçay E, Daşkın A. The protective effect of egg yolk from different avian species during the cryopreservation of Karayaka ram semen. *Small Rumin Res*. enero de 2010;88(1):12-5.
  36. Bywater TL, Rowlands WT. Cría, explotación y enfermedades de las ovejas. 2.<sup>a</sup> ed. Acribia S.A., editor. España: Acribia; 1981. 250 p.
  37. FAO. Producción y Sanidad Animal: Ganado y Medio Ambiente [Internet]. Departamento de Agricultura y Protección del Consumidor. 2013 [citado 19 de junio de 2019]. Disponible en: <http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/environment.html>
  38. Diaz RI. Sector ovinos en el Perú con perspectivas al 2015. Vº Congreso de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos, Mendoza, Argentina. 2007.
  39. Fraser A, Stamp JT. Ganado ovino : producción y enfermedades. 1.<sup>a</sup> ed. Mundi-Prensa, editor. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa; 1989. 358 p.
  40. Oklahoma State University. Breeds of Livestock - Hampshire Sheep [Internet]. Breeds of Livestock, Department of Animal Science. 2015 [citado 6 de noviembre de 2018]. Disponible en: <http://afs.okstate.edu/breeds/sheep/hampshire>

41. Aliaga J. Producción de ovinos. 1.<sup>a</sup> ed. Lima: Gutenberg; 2006. 420 p.
42. Sharpe RM. Regulation of spermatogenesis. *Physiol Reprod.* 1994;1:1363-434.
43. Hafez ESE, Jainudeen MR, Rosnina Y. Hormonas, factores de crecimiento. En: Interamericana M-H, editor. Reproducción e inseminación artificial en animales domésticos. 7.<sup>a</sup> ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2000. p. 33-56.
44. Sutovsky P, Manandhar G. Mammalian spermatogenesis and sperm structure: anatomical and compartmental analysis. En: UK: Cambridge University Press, editor. *The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration.* Cambridge: Cambridge University Press; 2006. p. 1-30.
45. Miller CJ, Amann RP. Effects of Pulsatile Injection of GnRH into 6- to 14-Wk-Old Holstein Bulls. *J Anim Sci.* 1 de mayo de 1986;62(5):1332-9.
46. Andaur M, Santiani A, Sepúlveda N. Concentraciones plasmáticas de testosterona máxima en carneros como respuesta a la aplicación de GnRH. *Int J Morphol.* 1 de junio de 2003;21(2):174-5.
47. O'Donnell L, Meachem S, Stanton P, McLachlan R. Endocrine regulation of spermatogenesis. En: Knobil and Neill's physiology of reproduction. 3.<sup>a</sup> ed. Elsevier; 2006. p. 1017-69.
48. American Sheep Industry Association. SID sheep production handbook. 7.<sup>a</sup> ed. Denver-Colorado: American Sheep Industry Association; 2002.
49. Boland MP, Al-Kamali AA, Crosby TF, Haynes NB, Howles CM, Kelleher DL, et al. The influence of breed, season and photoperiod on semen characteristics, testicular size, libido and plasma hormone concentrations in rams. *Anim Reprod Sci.* 1 de octubre de 1985;9(3):241-52.
50. Hafez ESE. Studies on the breeding season and reproduction of the ewe Part I. The breeding season in different environments Part II. The breeding season in one locality. *J Agric Sci.* 27 de julio de 1952;42(03):189-231.
51. Mickelsen WD, Paisley LG, Dahmen JJ. Seasonal variations in scrotal circumference,

- sperm quality, and sexual ability in rams. *J Am Vet Med Assoc.* 15 de agosto de 1982;181(4):376-80.
52. Evans G, Maxwell WM., Salamon S. Inseminación artificial de ovejas y cabras. 1.<sup>a</sup> ed. Acribia S.A., editor. Zaragoza: Acribia; 1990. 204 p.
  53. Buxadé C. Zootecnia: Bases de producción animal: Producción Ovina. 1.<sup>a</sup> ed. Madrid: Mundi-Prensa; 1996. 381 p.
  54. Hafez ES., Hafez B. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7.<sup>a</sup> ed. México: McGraw-hill-Interamericana; 2002. 519 p.
  55. Cueto M, Gibbons A, Bruno-Galarraga M, Fernández J. Manual de Obtención, procesamiento y conservación del semen ovino. 2.<sup>a</sup> ed. INTA, editor. 2016.
  56. Aisen EG. Reproducción ovina y caprina. Buenos Aires: Inter-Médica; 2004. 216 p.
  57. Cueto M, Gibbons A, García J, Wolff M, Arrigo J. Obtención, procesamiento y conservación del semen ovino. Bariloche: INTA Bariloche; 1993.
  58. Muiño R, Fernández M, Peña A. Parámetros cinéticos en eyaculados bovinos de toros de raza frisona y rubia gallega. *ITEA.* 2006;102(1):55-66.
  59. Perez U, Perez M, Mellisho E. Viabilidad espermática en semen de carnero congelado por dos métodos. 2011;1(1):127-8.
  60. Cabrera P, Pantoja C. Influencia de los dilutores tris y ovine freezing sobre la integridad de la membrana citoplasmática durante la congelación de semen de ovinos en pajillas de 0.5 ml. *Rev Investig Vet del Perú.* 2008;19(2):152-9.
  61. OMS. Manual de laboratorio de la OMS para el examen del semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical. 3.<sup>a</sup> ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana S.A; 1992.
  62. Mellisho E. Manual de laboratorio de reproducción animal. *ovinos-caprinos.com.* Lima-Perú: Universidad Agraria La Molina; 2010.
  63. Fraser CM. El Manual Merck de veterinaria: un manual de diagnóstico, tratamiento,



- prevención y control de las enfermedades, para el veterinario. Océano S.A. Merck; 1993. 2092 p.
64. Lucas J de, Arbiza SI. Sistemas de apareamiento e inseminación artificial en ovinos. 1.<sup>a</sup> ed. Estado de México: UNAM, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán; 2004. 118 p.
  65. Galina C, Valencia J. Reproducción de animales domésticos. 3.<sup>a</sup> ed. México: LIMUSA; 2009. 582 p.
  66. Ávalos A, Gonzáles JA, Vargas AK, Herrera JA. Recolección y Manipulación Seminal in vitro. 1.<sup>a</sup> ed. México: D.R. © Universidad Autónoma Metropolitana; 2018. 58 p.
  67. Derivaux J. Reproducción de los animales domésticos. 2.<sup>a</sup> ed. Zaragoza: Editorial Acribia; 1986. 486 p.
  68. Cole HH, Cupps PT. Reproduction in domestic animals. 3.<sup>a</sup> ed. Academi Press, editor. London: Academi Press; 1977.
  69. Apaza LS. Efecto protector de yema de huevo en la viabilidad de semen congelado de carnero. Universidad Nacional del Altiplano. Universidad Nacional del Altiplano; 2017.
  70. Garner DL, Pinkel D, Johnson LA, Pace MM. Assessment of Spermatozoal Function Using Dual Fluorescent Staining and Flow Cytometric Analyses. Biol Reprod. 1 de febrero de 1986;34(1):127-38.
  71. Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJD. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. Reproduction. 1 de enero de 1984;70(1):219-28.
  72. Neild D, Chaves G, Flores M, Mora N, Beconi M, Agüero A. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. Theriogenology. enero de 1999;51(4):721-7.
  73. Hernandez D, Carrillo-González D. Aplicación del test hipoosmotico (host) en la evaluacion de calidad seminal en ovinos criollos de pelo colombiano. Actas Iberoam Conserv Anim. 2015;6:165-71.
  74. Watson P. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and

- the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev.* 1995;7(4):871.
75. Paulenz H, Söderquist L, Pérez-Pé R, Andersen Berg K. Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. *Theriogenology.* enero de 2002;57(2):823-36.
  76. Rossi A. Efecto de la refrigeración y la adición de trehalosa en los parámetros de viabilidad microscópicos de semen bovino. Pontificia Universidad Católica Argentina; 2012.
  77. Minitube. Triladyl®: Diluyente de Semen Bovino. Germany: Perulactea; 2012.
  78. Curbelo Curbelo M, Rodríguez Rodríguez Z. Relevamiento de laboratorios de procesamiento de semen bovino en Uruguay. UR. FV; 2013.
  79. Holt W. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci.* agosto de 2000;62(1-3):3-22.
  80. Fiser PS, Fairfull RW. The effects of rapid cooling (cold shock) of ram semen, photoperiod, and egg yolk in diluents on the survival of spermatozoa before and after freezing. *Cryobiology.* 1986;23(6):518-24.
  81. Mendiola EM. Evaluación comparativa nutricional entre los huevos de codorniz japónica (*Coturnix coturnix*) y gallina criolla (*Gallus gallus*) en la primera etapa de postura. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2002.
  82. Santana S. Resúmenes de las ponencias presentadas en un taller internacional celebrado en ocasión del V congreso de avicultura: El huevo como aliado de la nutrición y la salud. *Rev Cuba Aliment Nutr.* 2008;18(1):15.
  83. Sauveur B. *Reproduction des volailles et production d'oeufs.* 4.<sup>a</sup> ed. Paris: INRA; 1988. 449 p.
  84. González JF, Hernández A. Evaluación sensorial de huevos de codorniz en conserva y composición nutrimental. *REDVET - Rev electrónica Vet.* 2011;12(8):10.
  85. Medeiros CMO, Forell F, Oliveira ATD, Rodrigues JL. Current status of sperm

- cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*. 1 de enero de 2002;57(1):327-44.
86. RAE. Definición de semen [Internet]. Real Academia Española. 2019 [citado 19 de julio de 2019]. Disponible en: <https://dle.rae.es/?id=XW36fRk>
87. Tulsiani D, Yshida-Komiya H, Araki Y. Mammalian fertilization: a carbohydrate-mediated event. *Biol Reprod*. 1997;57:487-94.
88. McLachlan RI, Wreford NG, Robertson DM, de Kretser DM. Hormonal control of spermatogenesis. *Trends Endocrinol Metab*. abril de 1995;6(3):95-101.
89. Junqueira LC, Carneiro J. *Histología básica*. 6.<sup>a</sup> ed. MASSON; 2005. 640 p.
90. López J. Fisiología y anatomía : Espermatogénesis [Internet]. *R.Vet*. 20017 [citado 22 de julio de 2019]. Disponible en: <https://www.reproduccionveterinaria.com/fisiologia-y-anatomia-obstetrica/macho/fisiologia-reproductiva-del-macho/espermatogenesis/>
91. Bajo JM, Coroleu B. *Fundamentos de reproducción*. 1.<sup>a</sup> ed. España: Editorial Médica Panamericana; 2009. 408 p.
92. Hernández R, Fernández C, Baptista P. *Metodología de la Investigación*. 4.<sup>a</sup> ed. Lopez NI, editor. McGraw-Hili Interamericana. México; 2006. 850 p.
93. Arias F. *El Proyecto de Investigación. Introducción a la Metodología Científica*. 6.<sup>a</sup> ed. Caracas: Episteme; 2012. 21-34 p.
94. Supo J. *Cómo empezar una tesis*. 1.<sup>a</sup> ed. BIOESTADISTICO EIRL, editor. Arequipa: BIOESTADISTICO EIRL; 2015. 60 p.
95. Casal J, Mateu E. Tipos de Muestreo. *Rev Epidem Med Prev*. 2003;1:3-7.
96. Google E. Google Earth [Internet] [Internet]. 2019. Disponible en: <https://earth.google.com/web/@-13.64187874,-72.88803149,2295.33450139a,25.22413793d,35y,192.68380799h,0t,0r/data=ClkaVxJR>
97. Bearden HJ (Henry J, Fuquay JW. *Reproducción animal aplicada*. México: El Manual Moderno; 1982. 358 p.
98. Vieira C, Zandonadi F, Rodrigues JD, Pereira VA, Barbosa VM, Clara da Cruz M, et al.



- Effect of different concentrations of l-carnitine in extender for semen cryopreservation in sheep. *Cryobiology*. mayo de 2019;
99. Martin G, Sabido O, Durand P, Levy R. Cryopreservation Induces an Apoptosis-Like Mechanism in Bull Sperm. *Biol Reprod*. 1 de julio de 2004;71(1):28-37.
  100. Dalmazzo PF. Comparación de dos métodos de congelación de semen ovino. Universidad Austral de Chile; 2008.
  101. Merino RA. Estudios preliminares en capacitación in-vitro de espermatozoides ovinos frescos y congelados. Universidad Austral de Chile. Universidad Austral de Chile; 2003.
  102. Matthews N, Bester N, Schwalbach LMJ. A comparison of ram semen collected by artificial vagina and electro-ejaculation. *SA-ANIM SCI*. 2003;4(1):28-30.
  103. Díaz R, Torres M, Painemil S, Martins S, Andrade A de, Bravo S, et al. Efecto del diluyente y tiempo de equilibrio sobre la motilidad e integridad de membrana post-descongelación de espermatozoides de carnero. *Asoc Peru Reprod Anim ASPRA*. 2015;5(1):67-70.
  104. Thomas CA, Garner DL, Dejarnette JM, Marshall CE. Effect of Cryopreservation on Bovine Sperm Organelle Function and Viability As Determined by Flow Cytometry. *Biol Reprod*. 1998;58(3):786-93.



## ANEXOS



**Tabla 12.** Base de datos de la evaluación espermática antes y después de la congelación del semen de carneros

CARNERO	DILUTOR	REPETICIÓN	CONGELACIÓN	MT	MP	VITA.	HOST	TRANSFORMADO A ARCO SENO			
								MT	MP	VITA.	HOST
C1	Tris	R1	PRE	77.0	69.0	78.6	71.0	1.07	0.98	1.09	1.00
C1	Tris	R2	PRE	79.6	71.0	81.2	73.0	1.10	1.00	1.12	1.02
C1	Tris	R3	PRE	85.8	72.0	82.0	73.0	1.18	1.01	1.13	1.02
C1	Tris	R4	PRE	78.4	68.3	79.9	69.7	1.09	0.97	1.11	0.99
C1	Tris	R5	PRE	91.1	78.7	92.9	80.3	1.27	1.09	1.30	1.11
C1	Tris	R6	PRE	84.8	72.4	86.5	73.8	1.17	1.02	1.20	1.03
C1	Tris	R7	PRE	88.1	75.5	89.8	77.0	1.22	1.05	1.25	1.07
C1	Tris	R8	PRE	79.6	66.5	81.2	67.8	1.10	0.95	1.12	0.97
C1	Tris	R9	PRE	85.8	71.4	87.5	72.8	1.18	1.01	1.21	1.02
C1	Tris	R10	PRE	86.5	75.2	88.3	76.7	1.19	1.05	1.22	1.07
C1	Triladyl	R1	PRE	88.4	80.1	90.2	81.7	1.22	1.11	1.25	1.13
C1	Triladyl	R2	PRE	77.9	70.0	79.5	73.0	1.08	0.99	1.10	1.02
C1	Triladyl	R3	PRE	88.1	72.0	82.0	74.0	1.22	1.01	1.13	1.04
C1	Triladyl	R4	PRE	85.8	74.6	87.5	74.6	1.18	1.04	1.21	1.04
C1	Triladyl	R5	PRE	91.7	78.8	93.5	80.4	1.28	1.09	1.31	1.11
C1	Triladyl	R6	PRE	87.7	77.0	89.5	82.6	1.21	1.07	1.24	1.14
C1	Triladyl	R7	PRE	79.2	67.2	80.8	68.5	1.10	0.96	1.12	0.98
C1	Triladyl	R8	PRE	94.5	79.0	94.0	81.0	1.33	1.09	1.32	1.12
C1	Triladyl	R9	PRE	91.7	80.5	93.5	82.1	1.28	1.11	1.31	1.13
C1	Triladyl	R10	PRE	87.7	76.7	89.5	78.2	1.21	1.07	1.24	1.09
C2	Tris	R1	PRE	90.3	72.5	77.0	75.0	1.25	1.02	1.07	1.05
C2	Tris	R2	PRE	84.4	72.6	86.0	74.0	1.16	1.02	1.19	1.04
C2	Tris	R3	PRE	83.8	73.4	85.4	74.8	1.16	1.03	1.18	1.05
C2	Tris	R4	PRE	82.3	74.0	84.0	72.0	1.14	1.04	1.16	1.01
C2	Tris	R5	PRE	88.3	78.8	90.1	80.4	1.22	1.09	1.25	1.11
C2	Tris	R6	PRE	81.5	70.6	83.1	72.0	1.13	1.00	1.15	1.01
C2	Tris	R7	PRE	89.4	77.9	91.2	78.0	1.24	1.08	1.27	1.08
C2	Tris	R8	PRE	84.4	74.5	86.0	76.0	1.16	1.04	1.19	1.06
C2	Tris	R9	PRE	78.6	67.4	80.2	68.8	1.09	0.96	1.11	0.98
C2	Tris	R10	PRE	88.3	78.3	90.1	79.9	1.22	1.09	1.25	1.11
C2	Triladyl	R1	PRE	83.5	70.7	85.2	74.3	1.15	1.00	1.18	1.04
C2	Triladyl	R2	PRE	79.7	68.9	81.3	70.3	1.10	0.98	1.12	0.99
C2	Triladyl	R3	PRE	84.6	71.7	86.3	73.1	1.17	1.01	1.19	1.03
C2	Triladyl	R4	PRE	87.5	77.5	89.3	79.1	1.21	1.08	1.24	1.10
C2	Triladyl	R5	PRE	90.4	71.0	85.0	74.0	1.26	1.00	1.17	1.04
C2	Triladyl	R6	PRE	89.5	77.0	91.3	79.0	1.24	1.07	1.27	1.09
C2	Triladyl	R7	PRE	80.8	68.4	82.4	69.8	1.12	0.97	1.14	0.99
C2	Triladyl	R8	PRE	84.6	70.6	86.3	72.0	1.17	1.00	1.19	1.01



C2	Triladyl	R9	PRE	82.6	71.5	84.3	72.9	1.14	1.01	1.16	1.02
C2	Triladyl	R10	PRE	85.9	74.8	87.6	76.3	1.19	1.05	1.21	1.06
C3	Tris	R1	PRE	76.6	67.8	78.1	72.0	1.07	0.97	1.08	1.01
C3	Tris	R2	PRE	83.5	73.3	85.2	74.7	1.15	1.03	1.18	1.04
C3	Tris	R3	PRE	89.4	78.3	91.2	79.9	1.24	1.09	1.27	1.11
C3	Tris	R4	PRE	88.3	74.4	90.1	75.9	1.22	1.04	1.25	1.06
C3	Tris	R5	PRE	77.5	66.5	79.1	67.8	1.08	0.95	1.10	0.97
C3	Tris	R6	PRE	85.6	76.7	87.3	78.3	1.18	1.07	1.21	1.09
C3	Tris	R7	PRE	87.5	78.1	89.2	79.7	1.21	1.08	1.24	1.10
C3	Tris	R8	PRE	91.6	79.9	93.4	81.5	1.28	1.11	1.31	1.13
C3	Tris	R9	PRE	88.3	74.4	90.1	75.9	1.22	1.04	1.25	1.06
C3	Tris	R10	PRE	82.0	80.7	83.6	82.3	1.13	1.12	1.15	1.14
C3	Triladyl	R1	PRE	83.4	73.1	85.1	74.6	1.15	1.03	1.17	1.04
C3	Triladyl	R2	PRE	83.9	70.9	85.6	72.3	1.16	1.00	1.18	1.02
C3	Triladyl	R3	PRE	92.5	80.8	94.4	84.7	1.29	1.12	1.33	1.17
C3	Triladyl	R4	PRE	79.7	66.5	81.3	67.8	1.10	0.95	1.12	0.97
C3	Triladyl	R5	PRE	82.0	72.0	83.6	73.4	1.13	1.01	1.15	1.03
C3	Triladyl	R6	PRE	86.4	75.7	88.1	77.2	1.19	1.06	1.22	1.07
C3	Triladyl	R7	PRE	88.9	77.5	90.7	80.5	1.23	1.08	1.26	1.11
C3	Triladyl	R8	PRE	82.0	69.0	83.6	70.4	1.13	0.98	1.15	1.00
C3	Triladyl	R9	PRE	86.4	72.7	88.1	74.1	1.19	1.02	1.22	1.04
C3	Triladyl	R10	PRE	83.9	70.9	85.6	72.3	1.16	1.00	1.18	1.02
C1	Tris	R1	POST	41.0	28.3	41.9	28.9	0.70	0.56	0.70	0.57
C1	Tris	R2	POST	45.0	29.0	45.9	29.6	0.74	0.57	0.74	0.57
C1	Tris	R3	POST	46.5	31.1	47.4	31.7	0.75	0.59	0.76	0.60
C1	Tris	R4	POST	39.3	29.0	40.1	29.6	0.68	0.57	0.69	0.57
C1	Tris	R5	POST	40.9	23.5	41.7	24.0	0.69	0.51	0.70	0.51
C1	Tris	R6	POST	43.2	26.1	44.1	26.6	0.72	0.54	0.73	0.54
C1	Tris	R7	POST	46.5	31.1	47.4	31.7	0.75	0.59	0.76	0.60
C1	Tris	R8	POST	35.5	24.7	36.2	25.2	0.64	0.52	0.65	0.53
C1	Tris	R9	POST	50.0	26.8	51.0	27.3	0.79	0.54	0.80	0.55
C1	Tris	R10	POST	40.9	26.0	41.7	26.5	0.69	0.54	0.70	0.54
C1	Triladyl	R1	POST	47.1	32.7	48.1	33.4	0.76	0.61	0.77	0.62
C1	Triladyl	R2	POST	41.1	27.2	41.9	27.7	0.70	0.55	0.70	0.55
C1	Triladyl	R3	POST	43.2	28.9	44.0	29.4	0.72	0.57	0.73	0.57
C1	Triladyl	R4	POST	55.4	30.6	56.5	31.2	0.84	0.59	0.85	0.59
C1	Triladyl	R5	POST	40.8	29.8	41.6	30.4	0.69	0.58	0.70	0.58
C1	Triladyl	R6	POST	37.0	26.7	37.8	27.2	0.65	0.54	0.66	0.55
C1	Triladyl	R7	POST	39.1	26.7	39.9	27.2	0.68	0.54	0.68	0.55
C1	Triladyl	R8	POST	55.4	30.6	56.5	31.2	0.84	0.59	0.85	0.59
C1	Triladyl	R9	POST	40.8	32.8	41.6	33.5	0.69	0.61	0.70	0.62
C1	Triladyl	R10	POST	37.0	26.7	37.8	27.2	0.65	0.54	0.66	0.55
C2	Tris	R1	POST	46.8	28.1	47.7	28.7	0.75	0.56	0.76	0.57
C2	Tris	R2	POST	45.5	23.7	46.5	24.2	0.74	0.51	0.75	0.51



C2	Tris	R3	POST	51.8	25.9	52.9	26.4	0.80	0.53	0.81	0.54
C2	Tris	R4	POST	43.7	33.4	44.6	34.1	0.72	0.62	0.73	0.62
C2	Tris	R5	POST	37.2	29.6	37.9	30.2	0.66	0.57	0.66	0.58
C2	Tris	R6	POST	41.8	26.1	42.6	26.6	0.70	0.54	0.71	0.54
C2	Tris	R7	POST	50.8	21.9	51.8	22.3	0.79	0.49	0.80	0.49
C2	Tris	R8	POST	42.9	30.5	43.8	31.1	0.71	0.58	0.72	0.59
C2	Tris	R9	POST	47.3	29.0	48.3	29.6	0.76	0.57	0.77	0.57
C2	Tris	R10	POST	38.5	28.3	39.3	28.8	0.67	0.56	0.68	0.57
C2	Triladyl	R1	POST	42.2	28.8	43.0	29.4	0.71	0.57	0.72	0.57
C2	Triladyl	R2	POST	49.9	32.2	50.9	32.8	0.78	0.60	0.79	0.61
C2	Triladyl	R3	POST	46.5	29.8	47.4	30.4	0.75	0.58	0.76	0.58
C2	Triladyl	R4	POST	44.9	30.7	45.8	31.3	0.73	0.59	0.74	0.59
C2	Triladyl	R5	POST	41.1	29.7	41.9	30.3	0.70	0.58	0.70	0.58
C2	Triladyl	R6	POST	50.7	36.0	51.8	36.7	0.79	0.64	0.80	0.65
C2	Triladyl	R7	POST	47.5	34.9	48.5	35.6	0.76	0.63	0.77	0.64
C2	Triladyl	R8	POST	44.9	26.7	45.8	27.2	0.73	0.54	0.74	0.55
C2	Triladyl	R9	POST	41.1	31.7	41.9	32.4	0.70	0.60	0.70	0.61
C2	Triladyl	R10	POST	49.9	32.2	50.9	32.8	0.78	0.60	0.79	0.61
C3	Tris	R1	POST	50.9	24.7	52.0	25.2	0.79	0.52	0.80	0.53
C3	Tris	R2	POST	43.0	33.2	43.9	33.8	0.72	0.61	0.72	0.62
C3	Tris	R3	POST	36.7	22.3	37.4	22.8	0.65	0.49	0.66	0.50
C3	Tris	R4	POST	43.9	26.9	44.8	27.4	0.72	0.54	0.73	0.55
C3	Tris	R5	POST	36.0	23.3	36.7	23.8	0.64	0.50	0.65	0.51
C3	Tris	R6	POST	47.7	28.3	48.7	28.8	0.76	0.56	0.77	0.57
C3	Tris	R7	POST	49.1	31.4	50.1	32.1	0.78	0.60	0.79	0.60
C3	Tris	R8	POST	41.2	29.2	42.0	29.8	0.70	0.57	0.71	0.58
C3	Tris	R9	POST	43.9	26.9	44.8	27.4	0.72	0.54	0.73	0.55
C3	Tris	R10	POST	46.0	31.3	46.9	32.0	0.75	0.59	0.75	0.60
C3	Triladyl	R1	POST	46.4	23.3	47.3	23.8	0.75	0.50	0.76	0.51
C3	Triladyl	R2	POST	57.5	32.5	58.6	33.2	0.86	0.61	0.87	0.61
C3	Triladyl	R3	POST	40.8	26.7	41.6	27.2	0.69	0.54	0.70	0.55
C3	Triladyl	R4	POST	50.5	33.8	51.5	34.5	0.79	0.62	0.80	0.63
C3	Triladyl	R5	POST	41.1	26.5	41.9	27.0	0.70	0.54	0.70	0.55
C3	Triladyl	R6	POST	38.8	28.2	39.6	28.8	0.67	0.56	0.68	0.57
C3	Triladyl	R7	POST	38.5	25.6	39.3	26.1	0.67	0.53	0.68	0.54
C3	Triladyl	R8	POST	50.5	30.6	51.5	31.2	0.79	0.59	0.80	0.59
C3	Triladyl	R9	POST	41.1	26.5	41.9	27.0	0.70	0.54	0.70	0.55
C3	Triladyl	R10	POST	38.8	23.3	39.6	23.8	0.67	0.50	0.68	0.51



MT: Motilidad total

MP: Motilidad progresiva

VITA: Vitalidad

R: Repetición

C1, C2, C3: Carnero

PRE: Precongelado

POST: Poscongelado

**Tabla 13.** *Análisis de Varianza mediante el Modelo Lineal Generalizado (GLM) para dilutores Triladyl y Tris-YHG+C en la Motilidad Total antes y después de la congelación*

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr>F
Modelo	1	0.00444083	0.00444083	0.08	0.7769
Error	118	6.49475167	0.05504027		
Total corregido	119	6.49919250			
Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr>F
DILU	1	0.00444083	0.00444083	0.08	0.7769

**Tabla 14.** *Análisis de Varianza mediante el Modelo Lineal Generalizado (GLM) para dilutores Triladyl y Tris-YHG+C en la Motilidad Progresiva antes y después de la congelación*

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr>F
Modelo	1	0.00261333	0.00261333	0.05	0.8322
Error	118	6.83693333	0.05794011		
Total corregido	119	6.83954667			
Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr>F
DILU	1	0.00261333	0.00261333	0.05	0.8322



**Tabla 15.** *Análisis de Varianza mediante el Modelo Lineal Generalizado (GLM) para dilutores Triladyl y Tris-YHG+C en la Vitalidad antes y después de la congelación*

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr>F
Modelo	1	0.00432000	0.00432000	0.08	0.7841
Error	118	6.75708000	0.05726339		
Total corregido	119	6.76140000			
Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr>F
DILU	1	0.00432000	0.00432000	0.08	0.7841

**Tabla 16.** *Análisis de Varianza mediante el Modelo Lineal Generalizado (GLM) para dilutores Triladyl y Tris-YHG+C sobre HOST antes y después de la congelación*

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr>F
Modelo	1	0.00444083	0.00444083	0.07	0.7883
Error	118	7.23519167	0.06132518		
Total corregido	119	7.23963250			
Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr>F
DILU	1	0.00444083	0.00432000	0.07	0.7883

**Tabla 17.** *Análisis de Varianza mediante el Modelo Lineal Generalizado (GLM) y prueba de Tukey de Motilidad Total antes y después de la congelación*

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr>F
Modelo	1	6.11556750	6.11556750	1881.10	<.0001
Error	118	0.38362500	0.00325106		
Total corregido	119	6.49919250			
Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr>F
CONGE	1	6.11556750	6.11556750	1881.10	<.0001
Medias con la misma letra no son significativamente diferentes					
Tukey agrupamiento	Media	N	CONGE		
A	1.17850	60	PRE		
B	0.72700	60	POST		



**Tabla 18.** *Análisis de Varianza mediante el Modelo Lineal Generalizado (GLM) y prueba de Tukey de Motilidad Progresiva antes y después de la congelación*

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr>F
Modelo	1	6.62700000	6.62700000	3679.13	<.0001
Error	118	0.21254667	0.00180124		
Total corregido	119	6.83954667			

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr>F
CONGE	1	6.62700000	6.62700000	3679.13	<.0001

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes

Tukey agrupamiento	Media	N	CONGE
A	1.032667	60	PRE
B	0.562667	60	POST

**Tabla 19.** *Análisis de Varianza mediante el Modelo Lineal Generalizado (GLM) y prueba de Tukey de Vitalidad antes y después de la congelación*

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr>F
Modelo	1	6.33880333	6.33880333	1769.96	<.0001
Error	118	0.42259667	0.00358133		
Total corregido	119	6.76140000			

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr>F
CONGE	1	6.33880333	6.33880333	1769.96	<.0001

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes

Tukey agrupamiento	Media	N	CONGE
A	1.19483	60	PRE
B	0.73517	60	POST



**Tabla 20.** *Análisis de Varianza mediante el Modelo Lineal Generalizado (GLM) y prueba de Tukey de HOST antes y después de la congelación*

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr>F
Modelo	1	7.01316750	7.01316750	3654.22	<.0001
Error	118	0.22646500	0.00191919		
Total corregido	119	7.23963250			

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr>F
CONGE	1	7.01316750	7.01316750	3654.22	<.0001

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes

Tukey agrupamiento	Media	N	CONGE
A	1.052500	60	PRE
B	0.569000	60	POST





**Figura 1.** Carneros utilizados para colección de semen



**Figura 2.** Separación de yema de huevo de la clara del huevo de codorniz y de gallina



**Figura 3.** Preparación de dilutores del semen



**Figura 4.** Colección de semen de carnero



**Figura 5.** Semen colectado con vagina artificial



**Figura 6.** Terma con semen colectado para transportar al laboratorio



**Figura 7.** Preparación de los tratamientos para su evaluación



**Figura 8.** Empajillado de la dilución de semen por tratamientos



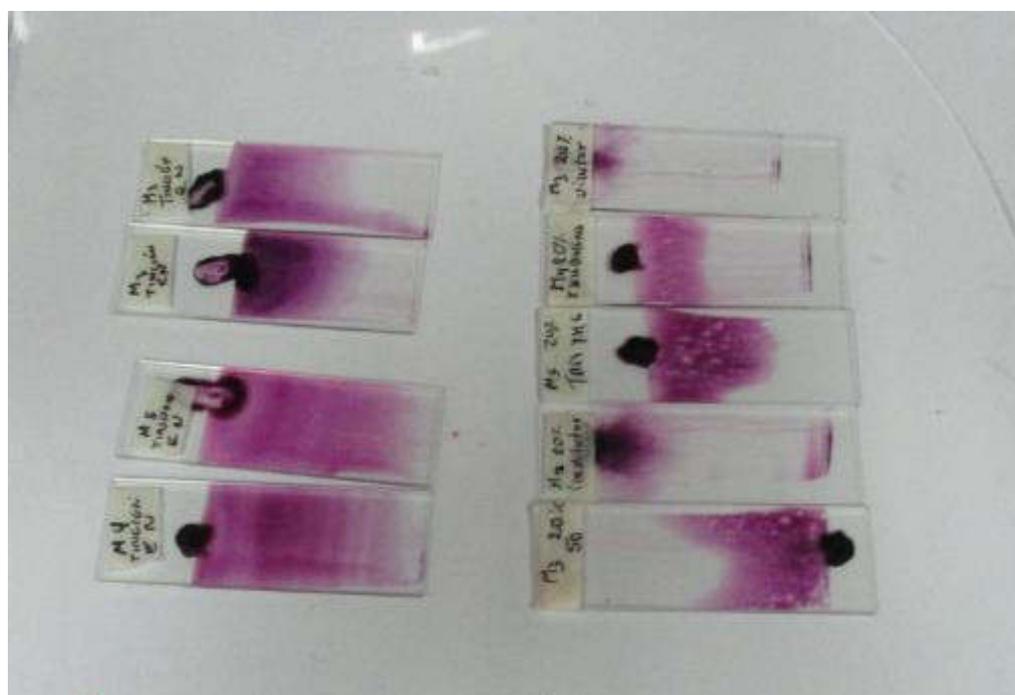
**Figura 9.** Caja de poliestireno para congelación de semen con nitrógeno líquido



**Figura 10.** Congelación convencional del semen



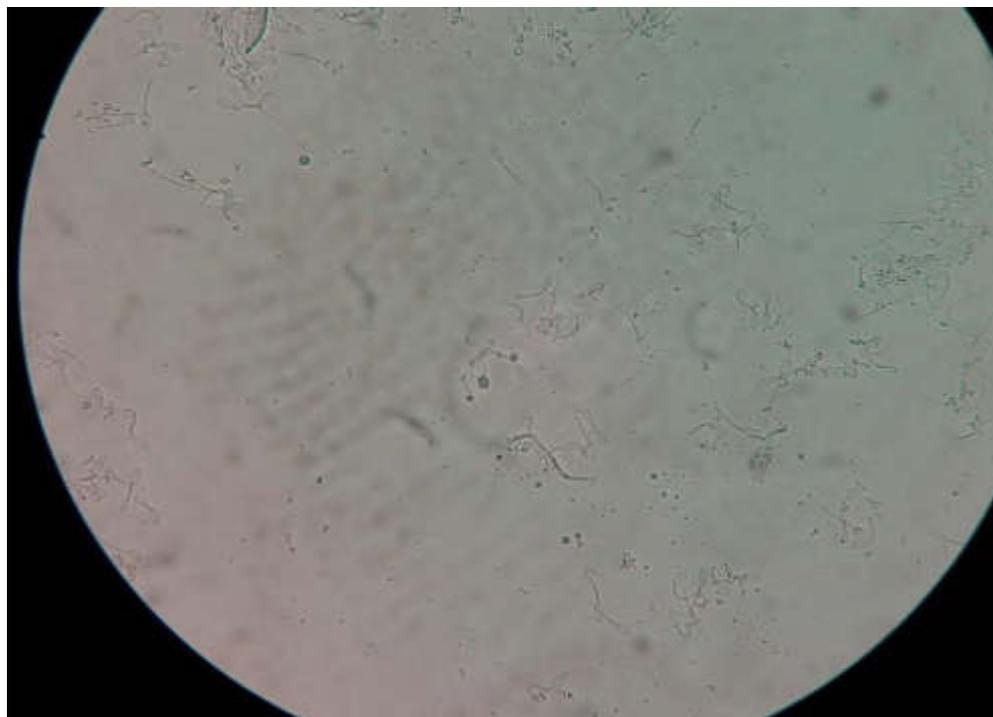
**Figura 11.** Almacenamiento de pajillas con semen de carnero



**Figura 12.** Frotis de espermatozoides con Eosina/Nigrosina



**Figura 13.** Evaluación de vitalidad con Eosina/Nigrosina de espermatozoides, objetivo 40X



**Figura 14.** Evaluación de integridad funcional de la membrana plasmática (positivo: membrana funcional)