

UNIVERSIDAD NACIONAL DANIEL ALCIDES CARRIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE ZOOTECNIA



TESIS

Estudio comparativo de dos sistemas de congelamiento de semen y su efecto sobre la fertilidad en ovinos, Centro Experimental Casaracra.

Para optar el título profesional de:

Ingeniero Zootecnista

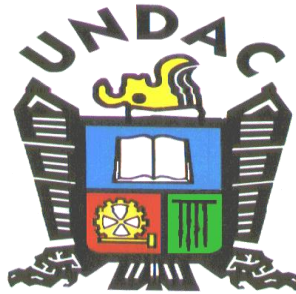
Autores: Bach. ALEX ROBERTH ANGULO DOMINGUEZ

Bach. Erik Frank ANGULO DOMINGUEZ

Asesor: MSc. César PANTOJA ALIAGA

Cerro de Pasco – Perú – 2019

UNIVERSIDAD NACIONAL DANIEL ALCIDES CARRIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL ZOOTECNIA



TESIS

**Estudio comparativo de dos sistemas de congelamiento de semen y su efecto
sobre la fertilidad en ovinos, Centro Experimental Casaraera.**

Sustentado y aprobado ante los miembros del jurado:

MSc. Humberto SANCHEZ VILLANUEVA

PRESIDENTE

Mg. Eraclio HILARIO ADRIANO

MIEMBRO

MSc. Enos MORALES SEBASTIAN
MIEMBRO

DEDICATORIA

*A nuestros padres por su apoyo
incondicional durante nuestra formación
profesional.*

Erik y Alex

RECONOCIMIENTO

A los docentes de la Escuela de Zootecnia de la Universidad Nacional Daniel Alcides Carrión – Pasco, por haberme brindado sus conocimientos y enseñanzas durante mi formación.

A nuestros padres por sus consejos y palabras de aliento durante nuestra formación.

A mis amigos, compañeros de estudios y familiares, por su colaboración, apoyo moral y su amistad.

Al Mg. César Pantoja Aliaga, por su iniciativa y orientaciones como asesor de la Presente investigación.

RESUMEN

La precaria situación económica de los criadores de ovinos altoandinos imposibilita la adquisición de reproductores, pudiendo quedar la inseminación artificial con semen congelado como una alternativa de solución.

No obstante, se tiene que considerar que los resultados de fertilidad del semen crio-preservedo, dependen de las características originales del semen fresco, de los dilutores, de la técnica de crio-preservación y de la eficiencia en el proceso de inseminación artificial y la Inseminación Laparoscópica, (Stornelli et al.,2005).

Considerando que el Perú cuenta con una población mayor de ovinos criollos, considerado una raza de fenotipo muy variado, alta rusticidad y mediana prolificidad (fertilidad), su producción de lana y carne es de bajo nivel. Se han reportado valores promedio de peso de vellón de 1.5 kg, la lana es de mecha corta con finura que van desde 25 a 30 micrones, peso vivo de 27 kg. para ovejas y 35 kg. para carneros siendo actualmente la raza ovina de mayor población en el país, es en este contexto que la población viene introduciendo razas de ovinos como el East Friesian por ser una raza especializada en la producción de leche para sus corderos por tener partos múltiples y poseer lana de color blanco.

Es por ello, que se ha tomado la iniciativa en la mejora del ganado, con ayuda de las biotecnologías reproductivas como la inseminación artificial y la transferencia de embriones. Así mismo, viendo que los ovinos de alto valor genético son pocos, se ha propuesto mantener su calidad genética con ayuda de las tecnologías como la congelación de semen, producción in vitro de embriones y otros.

Es en este contexto, se realizó dos diferentes sistemas de congelación de semen de la raza East Frisian, a fin de determinar el efecto que tiene este en la fertilidad de las borregas Inseminadas vía laparoscópica.

Palabras clave: Semen congelado, inseminación laparoscópica.

SUMMARY

The precarious economic situation of high Andean sheep breeders makes it impossible to acquire breeders, and artificial insemination with frozen semen may remain as an alternative solution.

However, it must be considered that the fertility results of cryopreserved semen depend on the original characteristics of fresh semen, dilutors, cryopreservation technique and efficiency in the process of artificial insemination and Laparoscopic insemination, (Stornelli et al., 2005).

Considering that Peru has a larger population of Creole sheep, considered a race of very varied phenotype, high rusticity and medium prolificity (fertility), its production of wool and meat is low level. Average values of fleece weight of 1.5 kg have been reported, the wool is of short wick with fineness ranging from 25 to 30 microns, live weight of 27 kg. for sheep and 35 kg. for rams, currently the sheep population with the highest population in the country, it is in this context that the population has been introducing sheep breeds such as East Friesian for being a breed specialized in the production of milk for their lambs for having multiple deliveries and owning wool White color.

That is why the initiative has been taken in the improvement of livestock, with the help of reproductive biotechnologies such as artificial insemination and embryo transfer. Also, seeing that sheep of high genetic value are few, it has been proposed to maintain their genetic quality with the help of technologies such as semen freezing, in vitro production of embryos and others.

It is in this context, two different semen freezing systems of the East Frisian breed were made, in order to determine the effect that this has on the fertility of inseminated sheep via laparoscopic route.

Keywords: Frozen semen, laparoscopic insemination.

PRESENTACIÓN.

El presente trabajo de investigación titulado “Estudio comparativo de dos sistemas de congelamiento de semen y su efecto sobre la fertilidad en ovinos, Centro Experimental Casaracra”, nace de la iniciativa de poner a disposición de los ganaderos el material genético de ganado ovino y con alto porcentaje de fertilidad, desarrollando una técnica de congelación de semen acorde a la realidad y medir los porcentajes de fertilidad con la inseminación laparoscópica.

Los primeros estudios, sobre los efectos de temperaturas bajo cero en la viabilidad espermática se llevaron a cabo por Spallanzani en 1776 (Salamon y Maxwell 1995a), desde esa fecha hasta la actualidad se han logrado desarrollar avanzadas técnicas que han permitido almacenar semen por largos períodos. Sin embargo, la conservación del semen no fue considerada hasta que los criadores de ganado vieron los beneficios que entregaba la inseminación artificial (IA).

Las investigaciones en IA en ovejas fueron iniciadas por Ivanov a comienzos del siglo veinte (1907, 1912), cuyos estudios en medios de dilución y reproducción condujeron al desarrollo y la aplicación práctica de la IA.

Es por ello que se venido desarrollando esta tecnología reproductiva de la inseminación artificial (cervical, intrauterina, laparoscópica), así mismo, se han desarrollado nuevas biotecnologías como la conservación de semen las cuales se pueden mantener en congelamiento, refrigeración, etc. sin embargo, hay muchos factores el shock de frío, velocidad de enfriamiento, composición de los diluyentes y estrés osmótico, que ocurren durante el proceso de congelación, son responsables

de la disminución de la fertilidad con el uso de semen congelado (Stornelli et al., 2005).

En la actualidad se ha masificado la utilización de semen congelado para la inseminación artificial en el ganado ovino, dado el incremento de la productividad en esta especie por el uso de machos de alta calidad genética; sin embargo, las tasas de concepción al primer servicio son todavía relativamente bajas. (Rodríguez-Martínez, 2003). Con nuestro trabajo de investigación se realizó dos diferentes sistemas de congelación de semen de la raza East Frislean, a fin de determinar el efecto que tiene este en la fertilidad de las borregas Inseminadas vía laparoscópica con semen congelado.

ÍNDICE

CARÁTULA	1
HOJA EN BLANCO	2
ACTA DE SUSTENTACIÓN	3
DEDICATORIA	4
RECONOCIMIENTO	5
RESUMEN	6
SUMMARY	8
PRESENTACIÓN.	10
ÍNDICE	12
CAPÍTULO I	16
INTRODUCCIÓN	16
CAPÍTULO II	17
MARCO TEÓRICO	17
2.1 Antecedentes de estudio	17
2.2 Bases teóricas	21
2.2.1 Obtención, manipulación y examen de semen	25
2.2.2 Uso de dilutores para el semen de carnero	34
2.2.3 Congelación del semen en carneros	37
2.2.4 Calidad del semen congelado y fertilidad en ovinos	41
2.2.5 Métodos de inseminación	41
2.2.6 Valoración seminal: sistema casa ®.	42
2.2.7 Valoración de la motilidad espermática mediante el sistema informatizado CASA	42
CAPÍTULO III	46
METODOLOGÍAS Y TÉCNICAS DE INVESTIGACIÓN	46
3.1 Tipo de investigación.	46
3.2 Método de investigación.	46
3.3 Población y muestra	46
3.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos	46
3.4.1 Lugar de ejecución	46
3.4.2 Materiales y equipos utilizados	47
3.4.3 Colección de semen	48

3.4.4 Evaluación de semen.....	49
3.4.5 Conservación de semen.....	49
3.4.6 Inseminación artificial.....	50
3.4.6 Determinación de fertilidad de las borregas inseminadas.....	51
3.5 Técnicas de procesamiento y análisis de datos.....	51
Identificación de variables.....	51
Diseño de la Investigación	51
Análisis estadístico	53
CAPÍTULO IV	55
PRESENTACIÓN DE RESULTADOS	55
4.1 Presentación, análisis e interpretación de resultados.....	55
4.1.1 Porcentaje de motilidad en semen post descongelamiento, según tratamiento del carnero raza East Friesian.....	55
4.1.2 Porcentaje de espermatozoides vivos y muertos post descongelamiento según tratamiento del carnero raza East Friesian.....	57
4.3 Porcentaje de fertilidad en las borregas Corriedale después de inseminación artificial intrauterina (35 días), según técnicas de congelamiento.....	62
CONCLUSIONES.....	67
RECOMENDACIONES.....	68
BIBLIOGRAFÍAS	69
ANEXOS:.....	74
FOTO 1. Obtención y colección de semen	75
FOTO 2. Evaluación del semen	75
FOTO 3. Preparado para el congelamiento del semen.....	75

ÍNDICE DE CUADRO

Cuadro 1. Resultados del porcentaje de motilidad progresiva del proceso de congelamiento lento.	55
Cuadro 2. Resultados del porcentaje de motilidad progresiva del proceso de congelamiento rápido.	56
Cuadro 3. Resultados del porcentaje de espermatozoides vivos del proceso de congelamiento lento.	57
Cuadro 4. Resultados del porcentaje de espermatozoides vivos del proceso de congelamiento rápido.	58
Cuadro 5. Resultados del porcentaje de espermatozoides muertos del proceso de congelamiento lento.	59
Cuadro 6. Resultados del porcentaje de espermatozoides muertos del proceso de congelamiento rápido.	60
Cuadro 7. Porcentaje de gestación según proceso de congelamiento.	62
Cuadro 8. Resultados de correlación entre todas las variables.	65

ÍNDICE DE GRÁFICO

Gráfico 1. Histograma de frecuencias del porcentaje de motilidad progresiva del proceso de congelamiento lento	55
Gráfico 2. Histograma de frecuencias del porcentaje de motilidad progresiva del proceso de congelamiento rápido.....	56
Gráfico 3. Histograma de frecuencias del porcentaje de espermatozoides vivos del proceso de congelamiento lento	58
Gráfico 4. Histograma de frecuencias del porcentaje de espermatozoides vivos del proceso de congelamiento rápido.....	59
Gráfico 5. Histograma de frecuencias del porcentaje de espermatozoides muertos del proceso de congelamiento lento.	60
Gráfico 6. Histograma de frecuencias del porcentaje de espermatozoides muertos del proceso de congelamiento rápido.....	61
Gráfico 7. Porcentaje de fertilidad de las borregas al diagnóstico de preñez, inseminadas con semen procesada con congelamiento lento.....	63
Gráfico 8. Porcentaje de fertilidad de las borregas al diagnóstico de preñez, inseminadas con semen procesada con congelamiento rápido	63

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Considerando que el Perú cuenta con una población mayor de ovinos criollos, considerado una raza de fenotipo muy variado, alta rusticidad y mediana prolificidad (fertilidad), su producción de lana y carne es de bajo nivel. Se han reportado valores promedio de peso de vellón de 1.5 kg, la lana es de mecha corta con finura que van desde 25 a 30 micrones, peso vivo de 27 kg. para ovejas y 35 kg. para carneros siendo actualmente la raza ovina de mayor población en el país, es en este contexto que la población viene introduciendo razas de ovinos como el East Friesian por ser una raza especializada en la producción de leche para sus corderos por tener partos múltiples y poseer lana de color blanco.

Es por ello, que se ha tomado la iniciativa en la mejora del ganado, con ayuda de las biotecnologías reproductivas como la inseminación artificial laparoscópica. Así mismo, viendo que los ovinos de alto valor genético son pocos, se ha propuesto mantener su calidad genética con ayuda de las tecnologías como la congelación de semen.

El presente trabajo de investigación titulado “Estudio comparativo de dos sistemas de congelamiento de semen y su efecto sobre la fertilidad en ovinos, Centro Experimental Casaracra”, se realizó dos diferentes sistemas de congelación de semen de la raza East Frisian, a fin de determinar el efecto que tiene este en la fertilidad de las borregas Inseminadas vía laparoscópica con semen congelado.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de estudio

Pérez, M.G. y et al (2011) reporta resultados de inseminación artificial a una primera dosis: Por el método cervical donde obtuvieron 11/25, vaginal 10/25 y control 20/25 ovejas gestantes. Las ovejas que retornaron en celo se re-inseminaron por segunda vez obteniéndose 6/14, 6/15 y 3/5 gestantes para los métodos cervical, vaginal y control respectivamente (Tabla 1).

Tabla 1. Métodos de IA sobre los porcentajes de gestación y parición

	MÉTODO DE IA			
	Cervical	Vaginal	Control	
N	25	25	25	
Tasa de gestación (%)	17 (68)	16 (64)	22 (88)	(p≥0,05)

Los resultados de gestación final reportados por Soderquist et al. (1999) posterior a la inseminación artificial por vía cervical (68 %), medidos en porcentaje de fertilidad del 38,1, 30,0 y 58,3 % de tres carneros diferentes, donde la descongelación de las pajillas del semen realizó a 50 °C por 9 s y 70 °C por 5 s y recomiendan que la descongelación a temperatura más baja facilitaría el uso práctico del semen congelado en condiciones de campo.

Paulenz et al. (2004), reportaron resultados superiores con el 72,9% de gestaciones, lograron por un manejo racional del semen para la IA en pajillas de 0,25 ml y descongelados a 35 °C, técnica que también se utilizó en el presente estudio.

Nordstoga, y et al., 2009) los resultados de gestación del 64% producto de la IA vía vaginal supera al 58,3%, donde los autores indican que existen diferencias en gestación y parición debido a factores como la fertilidad de cada macho, la alimentación, manejo, etc. Cabe indicar que esta superioridad en el porcentaje de gestación en el presente estudio es producto de la re-inseminación de las ovejas que retornaron al celo.

Guillermo, R. C. (1993) midió la fertilidad por medio de la tasa de no retorno de ovejas inseminadas por vía intrauterina sobre celo natural con diferentes calidades de semen en función de su motilidad progresiva rectilínea a la descongelación. De cada animal se congelaron pequeñas porciones del eyaculado en 5 pajuelas a la dosis de 40×10^6 espermatozoides, dos veces por semana. Se caracterizaron los valores de motilidad progresiva rectilínea y la morfología seminal al momento de la descongelación y a las 4 post – descongelación. El semen se descongeló colocando a las pajuelas en agua a 37°C durante 10 segundos. Los animales se seleccionaron a partir de los datos de motilidad progresiva rectilínea a las 4 horas del test de termorresistencia formándose 3 grupos:

A = 20% M.P.R.

B = 7 – 10% M.P.R.

C = 1% M.P.R.

Con este semen congelado se inseminaron por laparoscopia sobre celo natural 48 ovejas por grupo. El porcentaje de preñez alcanzado por grupo fue de:

A = 65,95%

B = 59,60%

C = 60,41%

Se comprobó, de acuerdo con la hipótesis propuesta, que con el semen que a las 4 horas de incubación presentaba una motilidad progresiva rectilínea de 0,9% tanto como de 20% se consiguió preñar igual número de ovejas. En este caso en particular el test de termoresistencia no fue un buen predictor de la fertilidad, pero se debe aclarar, que es solo un trabajo, por lo tanto, antes de desechar esta prueba deberán realizarse más investigaciones.

Ruiz, G., Sandoval, M. y Santiani A. (2015) estudiaron el efecto de dos fuentes energéticas (fructosa y glucosa) y dos crioprotectores (glicerol y etilenglicol) sobre la calidad seminal luego del proceso de criopreservación en un arreglo factorial de 2 x 2. Se evaluó la motilidad progresiva, la viabilidad y la integridad acrosomal. La motilidad fue superior con el uso de glicerol (65.5%) en comparación con el uso de etilenglicol (49.0%) ($p < 0.05$); asimismo, la motilidad fue superior con el uso de fructosa (59.3%) que con glucosa (55.1%) ($p < 0.05$). La integridad acrosomal fue superior con el uso de glicerol (58.2%) en comparación con el etilenglicol (42.0%); asimismo, la integridad acrosomal fue superior con el uso de fructosa (53.8%) que con glucosa (46.4%) ($p < 0.05$). La interacción fuente energética x crioprotector no fue significativa. Los resultados demuestran que la utilización de glicerol como agente crioprotector y de fructosa como fuente energética previenen en forma más

efectiva la pérdida de calidad seminal durante el proceso de criopreservación, en comparación con el etilenglicol y la glucosa, respectivamente.

Hernández, P.J. y et al (2012) analizaron los efectos de la criopreservación sobre la viabilidad y el estado acrosomal de espermatozoides ovinos. Se obtuvieron 45 eyaculados por el método de vagina artificial para el análisis, evaluando en semen fresco las siguientes características: volumen (Vol), motilidad progresiva (MP), porcentaje de viabilidad (Viab), morfología normal (NM), concentración espermática (Concentr); así como su viabilidad y el estado acrosomal, Los dos últimos parámetros evaluaron usando tinción con isotiocianato de fluoresceína conjugada con *Arachis hypogaea* lectina y yoduro de propidio (FITC-PNA/IP), en los que había diferentes patrones de tinción: espermatozoides vivos sin reacción acrosomal (VsRA), vivos con reacción acrosomal (VcRA), muertos sin reacción acrosomal (MsRA) y muertos con reacción acrosomal (McRA), obteniéndose un promedio de: $1,2 \pm 0,3$ mL $88,0 \pm 3,4\%$, $91,4 \pm 3,8\%$, $94,2 \pm 2,9\%$, $1768,1 \pm 5,5 \times 10^6/\text{mL}$ $76,7 \pm 5,5\%$, $7,6 \pm 2,7\%$, $11,2 \pm 4,1\%$ y $4,5 \pm 2,6\%$, respectivamente. El semen se congeló en un diluyente comercial (Triladyl ®) y empacaron en pajuelas de 0,5 mL a una concentración de $150 \times 10^6/\text{ml}$ en nitrógeno líquido durante 8 días, descongeladas a 37°C durante 60 segundos. En la post-evaluación del semen descongelado, se determinaron los valores siguientes: $\text{MP} = 37,4 \pm 5,3\%$, $\text{Viab} = 67,5 \pm 4,7$, $\text{NM} = 79,5 \pm 5,7$, $\text{VsRA} = 26,9 \pm 7,3\%$, $\text{VcRA} = 29,2 \pm 6,4\%$, $\text{MsRA} = 27,7 \pm 7\%$ y $\text{McRA} = 15,9 \pm 6,2\%$, obteniéndose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) causadas por los efectos de la criopreservación. Concluyendo que, a pesar de que la viabilidad y el estado acrosomal de los

espermatozoides se ven afectados por la criopreservación. Los espermatozoides vivos sin reacción del acrosomal se pueden utilizar en las técnicas de reproducción asistida.

Mocé, (2003) evaluó el semen de buena calidad debe presentar un mínimo del 60% de espermatozoides móviles y de 50% de progresión rectilínea. Cuando la movilidad masal está por debajo del 50%, hablamos de astenospermia y se observa la inmovilidad total tras la eyaculación se denomina necrospermia.

2.2 Bases teóricas

Selección de las ovejas a inseminar

Los programas de inseminación artificial (IA) y mejoramiento genético están normalmente destinados a las ovejas de alto valor genético de la cabaña o del establecimiento.

Antes de incorporar los animales a un programa de inseminación, es necesario tener en cuenta los siguientes aspectos de nutrición, sanidad y reproductivos:

Evans, G. y Maxwell, W. (1987) Las hembras deben alcanzar 2.5-3 puntos de condición corporal un mes antes de la inseminación. La condición corporal es un valor subjetivo o índice de la gordura de los animales. Consiste en medir la deposición grasa de los músculos lumbares, situados por debajo de las apófisis transversas de las vértebras lumbares (máximo, 5; mínimo, 0), las ovejas deben estar libres de enfermedades y parásitos.

Características de la raza East Friesian:

Es la raza ovina lechera por excelencia, llama también "Frisona", u "Ovino Frisón".

Esta raza es originaria de las provincias de Friesland en Holanda, y East Friesian en Alemania, donde se le conoce con el nombre de Ostfriesisches Milchscaf.

Es reconocida como la mejor productora de leche del mundo, pero en zonas sin altas temperaturas.

LECHE:

Su período de lactancia va desde los 220 a los 250 días.

Las producciones se ubican en 600 kilogramos por oveja al año y se han llegado a reportar hasta 1.400 kilogramos.

La leche tiene un contenido de grasa de 6-7% en los meses de lactancia.

LANA:

La producción de lana es de 5,5 a 6 kilogramos en los machos, y de 4,5 a 5 kilogramos en las hembras.

El vellón carece de estilo y es sin mecha

CARACTERÍSTICAS:

Estos ovinos son de porte grande; los machos alcanzan pesos de 120 a 130 kilogramos, mientras que las hembras logran de 100 a 110 kilogramos.

En lo referente a la cobertura, a excepción de la cabeza, patas, cola y ubre, tiene lana en todo el cuerpo.

La cola es delgada, y al no tener lana, recuerda a la de una rata.

Es una de las razas que no tienen cuernos.

Las mucosas y las pezuñas están des pigmentadas.

Es muy común el color blanco, aunque existen en negro y algunos tienen pequeñas manchas de color café.

Sus huesos son planos, características que indican una alta inclinación a la producción láctea.

Tienen ubres bien implantadas y de gran capacidad.

Además, la Frisona reporta altas tasas de fertilidad y es muy prolífica, alcanzando hasta 230 % de corderos destetados.

Una gran ventaja de estos ovinos es que no son estacionales, por lo que se pueden reproducir todo el año.

Es una raza muy precoz, pudiendo parir a edades tan tempranas como los 14 a 16 meses.

Tienen un marcado instinto materno.

Fisiología Reproductiva del Ovino Macho

La función testicular de los machos de cualquier especie puede definirse como la capacidad para producir gametos en cantidad y calidad adecuada para llevar a cabo la fertilización. Para esto, es necesario que el individuo produzca las hormonas necesarias que permitirán la maduración sexual del individuo (Sharpe, 1994).

La hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) es una hormona sintetizada en el hipotálamo y que actúa dentro de la fisiología del macho elevando las hormonas folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH) a nivel hipofisiario, las cuales a su vez, tienen un efecto directo sobre la espermatogénesis y la secreción

de testosterona (Hafez et al., 2000) Es la LH la hormona encargada de estimular la producción de testosterona por las células de Leydig en el estroma testicular (Sutovsky y Manandhar, 2006). En bovinos de raza Holstein, dosis repetidas de GnRH causan un incremento en la producción seminal y las concentraciones de LH y Testosterona (Miller y Amman, 1986). Asimismo, en ovinos produce un incremento en la concentración de testosterona sérica y un incremento de la actividad sexual (Andaur et al., 2004). Los niveles elevados de testosterona inhiben la secreción de GnRH mediante un mecanismo denominado retroalimentación negativa (O' Donnell et al., 2006).

Los carneros alcanzan la madurez sexual en la pubertad, que se define como la edad en la cual los órganos reproductores del carnero se vuelven funcionales. Esto ocurre entre los 5 y 7 meses de edad y cuando el animal tiene entre el 50 - 60% de su peso maduro. La producción de esperma en carneros toma alrededor de 49 días (7 semanas). El tamaño testicular es un indicador de la habilidad del carnero de producir espermatozoides. Además, el palpar el epidídimo ayuda a determinar las reservas de esperma (Sheep Production Handbook, 2002).

En el caso del carnero, su capacidad para producir semen y realizar la monta se mantiene durante todo el año, apreciando fluctuaciones en la capacidad reproductiva (Boland et al., 1985). La calidad del semen es superior en otoño y el invierno y bajo en primavera y el verano, el volumen del eyaculado y la concentración espermática también disminuyen (Hafez, 1952). La actividad sexual en los carneros cambia con la estacionalidad, influenciada por el cambio en los

periodos de luz, la edad y jerarquía social (Mickelsen et al., 1982, Schanbacher y Lunstra, 1976).

2.2.1 Obtención, manipulación y examen de semen

Inskoop, (1974); Bearden, (1980); Buxade, (1996) el uso de la vagina artificial, ha constituido hasta hoy uno de los mejores métodos para la obtención de semen en ovinos. Esta unidad es una imitación de la vagina natural de la oveja, que proporciona el estímulo térmico (temperatura), mecánico (presión) y lubricación adecuados. Para ello el cuerpo de la vagina es llenado con agua a 41 – 42 °C y una presión recomendada de 40 – 60 mm de mercurio.

Hafez, (1996) La calidad de semen que se obtenga de ella, depende de la frecuencia y sobre todo el estado del animal al momento de la colección.

Evaluación de las características de una muestra seminal

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

Estos parámetros pueden ser de carácter macroscópico (color, aspecto, volumen, pH) ya que pueden ser evaluados a simple vista de la muestra seminal; y microscópicos (motilidad masal, motilidad individual, concentración espermática, anormalidades, integridad de membrana, vitalidad) que deben ser evaluados utilizando un microscopio (Aisen, 2004).

Los valores normales de los parámetros espermáticos considerados en una evaluación seminal se resumen en el Apéndice 2. Se toma por sentado que cualquier muestra seminal a utilizarse en un estudio experimental debe cumplir con los valores mencionados.

Color

La cantidad de espermatozoides presentes en el eyaculado hace que la muestra tome una coloración blanquecina – amarillenta cuando la muestra es de buena calidad. Cuando es de baja calidad, es similar a la leche acuosa (Hafez, 1996). En este sentido puede admitirse una relación directa entre la intensidad del color y la riqueza espermática (Pérez y Pérez, 1985).

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

Aspecto

El aspecto del semen depende de la relación de dos constituyentes: la concentración de espermatozoides y la calidad del plasma seminal. Las muestras de alta consistencia contienen más espermatozoides que las muestras más acuosas (Apéndice 3). El semen debe tener un aspecto cremoso - lechoso y uniforme (Evans y Maxwell, 1990).

Volumen

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

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

pH

El valor del pH es el resultante de la neutralización entre las reacciones glandulares de acción tampón y la concentración iónica del material de las ampollas de Henle y del epidídimo. En ovinos, el pH tiende a la acidosis, fenómeno importante ya que en él radica su capacidad fecundante. La reacción alcalina es características de una escasa fertilidad y muchas veces va acompañada de necropermia y de una disminución en la concentración espermática y motilidad (Evans y Maxwell, 1990). En el carnero y en el macho cabrío, los valores de pH oscilan entre 6.2 – 7.3, llegando incluso a citarse como normal un pH de 7.5 (Pérez y Pérez, 1985). En el Perú, Ascue (1985), trabajando con muestras de ovinos de la sierra central, reportó un rango de pH de entre 6.3 y 6.8.

Motilidad Masal

La motilidad masal valora la formación y progresión de ondas producidas por el desplazamiento de los espermatozoides. La onda de movimiento solo puede ser observada en especies de alta concentración espermática, como es el caso de pequeños rumiantes (Evans y Maxwell, 1990). Se determina mediante microscopía óptica a 100 aumentos (100x) utilizando una pequeña gota de semen puro colocada sobre un portaobjeto temperado a 37 °C. Su clasificación utiliza la escala descrita en el Apéndice 4 (Pérez y Pérez, 1985; Padrón et al., 1998).

Motilidad Individual

Es una de las pruebas que se utiliza con mayor frecuencia para evaluar la calidad de semen diluido. En algunas especies, parece estar correlacionada con la capacidad fertilizante del espermatozoide. Si existe menos del 40% de espermatozoides con movimiento lineal progresivo, es menos probable que haya fertilidad. Debido a la influencia que tienen las variaciones de temperatura sobre la motilidad espermática, las muestras deben ser evaluadas tan pronto sea posible (WHO, 1992).

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

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

Concentración espermática

La concentración espermática está definida como el número de espermatozoides por unidad de volumen, expresada normalmente en millones por ml de eyaculado (esp/ml). Los diferentes métodos utilizados para su cálculo varían en función de la rapidez y exactitud (Evans y Maxwell, 1990).

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

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

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

Morfología espermática

La morfología espermática se refiere al estudio de la forma del espermatozoide y permite determinar las posibilidades que tiene una célula espermática para fertilizar. El objetivo de esta evaluación es eliminar aquellos espermatozoides no ideales para la reproducción (Madrid y Bohada, 1993). La presencia de altos porcentajes de formas anormales parece estar asociada con inmadurez sexual, procesos degenerativos y patologías (Ascue, 1985).

Las anomalías encontradas en los espermatozoides se clasifican en dos: anomalías primarias y secundarias. Las primeras ocurren durante el proceso de espermatogénesis y pueden ocurrir a nivel del acrosoma (pérdida del borde apical, con abultamiento, arrugado, incompleto, desdoblado), cabeza (piriforme, flagelado, lanceolado, irregular, angosta, cabeza doble, macrocéfalo,

microcéfalo), cuello (fractura, retroacción, con presencia de gota citoplasmática) y cola (corta, doble, retorcida, con presencia de gota citoplasmática). Las anomalías secundarias ocurren durante el transporte de los espermatozoides desde el túbulo seminífero y/o epidídimo hasta su salida por la uretra durante la eyaculación. En este tipo de anomalías tenemos cabezas sueltas, acrosoma desprendido, etc. (Evans y Maxwell, 1990).

La morfología espermática es una de las características más estudiadas en el análisis seminal (Madrid y Bohada, 1993). Su estudio ha utilizado tradicionalmente técnicas de tinción entre las que destacan la eosina-nigrosina (Merino, 2003). La introducción de los sistemas de Análisis Espermáticos Asistidos por Computadora (CASA, por sus siglas en inglés), ha permitido realizar evaluaciones morfométricas objetivas y cuantitativas del semen de diversas especies (Casey et al. 1997).

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

Vitalidad

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

Actualmente, existe toda una serie de técnicas destinadas a identificar espermatozoides vivos y muertos. Se han descritos numerosas tinciones basadas en la permeabilidad selectiva de la membrana plasmática como por ejemplo la eosina-nigrosina (Colas, 1975) y azul de Tripán (Suttiyotin y Thwaites, 1992) de tal manera que si el espermatozoide está vivo, la membrana celular actúa como barrera impermeable impidiendo el paso del colorante a través de ella, permaneciendo la célula sin teñirse. Ozturkler et al. (2000), trabajando con 6 caneros de la raza Kivircik y utilizando una tinción a base de eosina y nigrosina, reportaron 77.45% de espermatozoides vivos en semen fresco.

Integridad de la membrana espermática

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

La prueba de permeabilidad vía endosmosis o "Hypotonic-swelling test" (HOST), consiste en colocar a los espermatozoides a un medio de presión hiposmótica más baja que la fisiológica, lo que causa la entrada de agua hacia el interior de la célula en un intento de equilibrar la presión osmótica interna con la del medio externo (Pérez-Llano et al. 1999). Para que esta respuesta se produzca, la membrana plasmática del espermatozoide debe de estar íntegra y con los mecanismos de intercambio de fluidos funcionando correctamente. La entrada de agua provoca en estas células un hinchamiento y enrollamiento del flagelo. Las células con la membrana física funcionalmente dañada no experimentarían cambios en la forma del flagelo (Apéndice 5). Se considera endosmosis positiva cuando se aprecia como el flagelo del espermatozoide, en un medio hiposmótico (125mOsm/Kg), toma forma helicoidal y asciende dentro de la misma membrana celular. Esto se debe a un desequilibrio osmótico entre el medio extracelular y el intracelular, situación que el espermatozoide trata de vencer difundiendo agua al compartimiento intracelular y, como consecuencia, la célula aumenta su volumen (Vazquez et al. 1997).

En condiciones fisiológicas normales, la fecundación no ocurre si la membrana plasmática del espermatozoide es bioquímicamente inactiva, aun cuando permanezca estructuralmente intacta, por tanto, la prueba hiposmótica es un indicador preciso porque permite distinguir el adecuado funcionamiento de la membrana plasmática (Tamuli y Watson, 1992).

Aisen (2004), indica que el porcentaje de endosmosis en semen fresco de ovino varía de 60% a 90% y en semen refrigerado es mayor al 60%. Además, sostiene que

la endosmosis se correlaciona estrechamente con la fertilidad in vitro, siendo su valor para el ovino de 0.86.

2.2.2 Uso de dilutores para el semen de carnero

Hafez. (1996); Bearden, (1980) el semen obtenido debe ser mezclado con sustancias líquidas llamadas dilutores, con la finalidad de aumentar volumen del eyaculado e incrementar el número de dosis y sacar un máximo provecho a la capacidad reproductora del macho.

a. Dilutores para uso en semen fresco

Carmenate y Gamcik, (1986) evaluaron el semen de Carneros Pelibuey diluido en medios a base de leche en polvo: a) glucosa + lactosa + leche en polvo; b) glucosa + citrato de sodio + leche en polvo y c) leche en polvo y citrato de sodio, conservado a temperatura ambiente por 2 y 12 h a 5 °C, encontrando un porcentaje de fertilidad del semen de 65.7, 65.0, 63.6, y 62.6% respectivamente para el semen conservado por 2 h y un porcentaje de fertilidad de 57.8%, 61.7%, 53.8% y 51.4% para el semen conservado por 12 h para los dilutores antes mencionados.

Cortés et al. (1995), Colectaron semen de carneros de raza Merino, utilizando como dilutor leche descremada, encontrando una motilidad espermática de 68.7 %, sin embargo Daza (1997) menciona que cuando el semen se conserva a 5 °C por 3 horas y luego se cotejan los resultados de fertilidad obtenidas con leche descremada y tris – fructosa – yema de huevo se encuentran mejores valores para la leche pero cuando el tiempo de conservación aumenta a 6 horas los resultados se invierten.

Donovan y et al. (2003), usando un total de 297 Ovejas e inseminadores experimentados compararon tasas de preñez con semen fresco y semen congelado, obteniendo 82 y 70% (T1 y T2) con semen fresco respecto a 34 y 37% (T3 y T4) de semen congelado.

b. Dilutores para semen refrigerado

Alarcón (1984) realizó una dilución de semen con un dilutor a base de tris - fructosa – ácido cítrico – yema de huevo encontrando una motilidad de 75.5 %. Así mismo Ramírez (2002) evaluando los dilutores Tris – Fructosa – yema, Citrato – glucosa – yema y leche descremada en semen diluido a 5 °C, encontró que la motilidad individual se encuentra por encima del 70% hasta las 24 horas y que las 48 horas la motilidad desciende significativamente reportando motilidades de 62.5; 58.3 y 18.3 % para los dilutores antes mencionados.

Saxena y Tripathi (1986) evaluaron diferentes medios para la dilución del semen de carnero, encontraron que el dilutor citrato yema de huevo mostraba un porcentaje de motilidad de 48.33 % y un porcentaje de espermatozoides vivos de 53.08 % a las 72 h de conservado a una temperatura de 20 – 28 °C.

Pace y Graham, (1974); Quinn et al, (1980); Watson, (1981); Fiser y Fairfull, (1986) la adición de la yema de huevo al dilutor tiene un efecto benéfico sobre el porcentaje de motilidad particularmente luego de un rápido enfriamiento del semen a 10 y 5 °C, ya que las lipoproteínas de baja densidad, actúan como crioprotectores contribuyendo con dos factores: uno de los cuales protege contra el shock de frío

(factor de resistencia) y un segundo que mantiene la viabilidad (factor de conservación).

Watson. (1981) realizó un estudio sobre la importancia y el rol que cumplen las lipoproteínas de la yema de huevo en conservación de la membrana citoplasmática del espermatozoide de carnero, obteniendo motilidades de 31.7; 46.7 y 43.3 % de motilidad en las concentraciones de 0.1; 0.5 y 2.5 mg. de lipoproteínas por ml de dilutor respectivamente al evaluar semen conservado a 5 °C por un período de 72 horas.

Paulenz et al (2002) en Noruega, compararon el dilutor en base a TRIS conteniendo 20 % de yema de huevo, el cual aparentemente mantuvo una mejor motilidad progresiva y un menor daño a la membrana citoplasmática durante la conservación del semen a 20 °C, que cuando los espermatozoides fueron conservados en un dilutor en base a leche conteniendo 5 % de yema de huevo.

Pérez y Cebrian. (2001) en estudios sobre las propiedades de las proteínas del plasma seminal para proteger al espermatozoide del shock de frío y concluyeron que, estas son capaces de revertir las alteraciones en la membrana plasmática, pudiendo ser utilizadas para prevenir daño en la misma y mantener la viabilidad del espermatozoide de carnero al adicionarlas al dilutor en una concentración de 2.1 mg; antes del tratamiento de frío, existiendo además una interacción positiva con los ácidos grasos (linoleico y oleico) y con la vitamina E mejorando la viabilidad de los espermatozoides.

Hafez, (1996) los dilutores tienen en su composición: Tris (Hidroximetil Aminometano) o Citrato como buffers y glucosa como fuente de energía. Además,

deben contener agentes protectores para las membranas celulares durante el enfriamiento a 5 °C (generalmente yema de huevo), y el congelamiento (generalmente glicerol) para evitar lesiones de la membrana durante la congelación.

2.2.3 Congelación del semen en carneros

Evans y Maxwell (1990) cuando el semen se congela y conserva a muy baja temperatura, esto es en nitrógeno líquido a -196 °C, las reacciones metabólicas de los espermatozoides quedan detenidas.

Mellisho y col. (2004) esta ventaja hace que el semen se pueda conservar durante mucho tiempo con lo que se pueden conservar genes para futuro uso y se asegure la disponibilidad de un semental en particular. También de esta forma se facilita el transporte de semen, tanto nacional como internacionalmente, y el semen se puede recoger y conservar en épocas distintas a la estación reproductiva. En consecuencia, la utilización de los sementales se amplía considerablemente al congelar y conservar el semen.

Evans y Maxwell, (1990) la única desventaja que tiene su utilización son las bajas tasas de preñez que se logran debido fundamentalmente a que la congelación y descongelación además de lesionar los acrosomas de las células espermáticas, puede afectar la motilidad de los espermatozoides.

Evans y Maxwell, (1990); y Cueto y et al. (2003) el semen de Carnero puede ser congelado por un método lento o convencional en vapor de nitrógeno líquido a -196 °C y por el método rápido en hielo seco (dióxido de carbono sólido) a -79°C y nitrógeno líquido. El primer método implica congelar semen en pajillas de plástico,

mientras que el segundo método dispone el semen en forma de pellets, obtenidos vertiendo el semen más dilutor dentro de agujeros gravados en la superficie de hielo seco. La supervivencia de los espermatozoides de carnero es mejor después del congelamiento rápido. El semen congelado por cualquiera de los métodos debe ser transferido a tanques con nitrógeno líquido para su conservación.

Reich y Williams (1995), sostienen que el éxito de los métodos de conservación y preservación de los espermatozoides a bajas temperaturas está relacionado con el grado de daño de la membrana celular, indicando que las proteínas anticongelantes producidas por los peces polares pueden reducir el daño de la membrana celular bajo stress térmico e incrementar la sobrevivencia de embriones a 4 °C. Para lo cual, realizaron su estudio utilizando concentraciones de 10, 100, 200 y 500 ug/ml de proteínas anticongelantes, las que fueron evaluadas a los 2, 4, 5, 7 y 10 días de conservación a 5 °C, concluyendo que el daño de la membrana se incrementaba en las muestras control durante los 10 días de conservación a 5 °C, indicando además, que el daño a la membrana disminuía a altas concentraciones de proteínas anticongelantes, pero que este efecto era más evidente en un periodo largo de conservación.

Malikov (1960), citado por Bonadonna (1974), recomienda que para la conservación in vitro hay que dar una importancia especial a la forma en que se efectúa el enfriamiento, el cual debe ser muy lento; coincidiendo con Evans (1990) quien indica que el enfriamiento a 15 °C ó a 5 °C, se debe realizar en 1,0 – 1,5 h y de 2 – 3 h respectivamente. Se debe poner especial atención para evitar un descenso rápido desde 18 a 5 °C ya que en este margen de temperatura los espermatozoides

son especialmente sensibles al shock por frío, las temperaturas por debajo de los 0 °C son fatales para los espermatozoides. La viabilidad de los espermatozoides es más corta a 15 °C, pero lo suficientemente prolongada para permitir su transporte. Fiser y Fairfull (1986) sostienen que un rápido enfriamiento del semen diluido desde 30 a 15 °C, tiene poco o ningún efecto sobre la sobrevivencia de los espermatozoides antes y después del enfriamiento, sin embargo esto va acompañado de una disminución del porcentaje de motilidad del espermatozoide y del porcentaje de acrosomas intactos, indicando que la adición de la yema de huevo en la fase inicial del dilutor tiene un efecto benéfico en la motilidad espermática luego de un enfriamiento rápido del semen a 10 y 5°C; coincidiendo con Neubert y Menger (1981) quienes indican que el efecto de añadir un dilutor conteniendo una sustancia crioprotectora a 5 °C resulta ser más favorable en su impacto con el semen de carnero, que el observado cuando el dilutor es añadido a 30 °C.

Buxade, (1996); Daza, (1997); Maxwell y Salamon, (2000) para la refrigeración del semen diluido depositado en pajillas, se coloca en un recipiente de agua a 30 °C el cual se introduce a un frigorífico a 15 °C ó 5 °C. La motilidad de los espermatozoides se puede mantener durante varios días a 5°C. Sin embargo, la fertilidad de semen, utilizando para inseminación cervical declina de 10 a 35% por día de almacenamiento.

Paulenz et al, (2002) se recomienda que el semen diluido a 5 °C, no sea conservado por más de 12 horas para su utilización en la inseminación artificial.

López. (1999) estudio los cambios que se producen en la motilidad espermática y la integridad de membrana del semen conservado a 5 °C por un periodo de 7 días,

obteniendo como resultado que no hay diferencia entre los dilutores citrato de sodio, tris o leche, cuando el semen diluido de ovino es conservado a 5 °C por un periodo corto de tiempo (2 días), sin embargo cuando el semen fue conservado por un mayor tiempo, los espermatozoides presentes en el dilutor citrato de sodio tuvieron una mayor viabilidad.

Gil y et al. (2003) concluyeron que cuando se usan dilutores a base de leche para congelar el semen de carnero es recomendable usar concentraciones bajas de yema de huevo (5 – 10 %) y la adición del glicerol a 5 °C. Además, los resultados de su investigación indicaron que el dilutor comercial Bioxcell al que se le adicionó 6.4% de glicerol, puede ser utilizado como una alternativa al dilutor convencional de leche conteniendo 5% de yema de huevo.

Evans y Maxwell, (1990) el protocolo de congelación descrito por mencionan que, obtenido los reactivos químicos, este debe ser preparado para ser agregado al semen en dos fracciones de igual volumen, una sin glicerol (fracción A) a 32 °C y la otra con glicerol (fracción B) a 4 – 5 °C. El semen colectado inmediatamente pasa a baño maría (30 a 32 °C) y mientras se realiza la evaluación de la calidad seminal se procede a realizar el pre – dilución de 1:1 con la fracción A del dilutor (sin glicerol), de tal manera que los espermatozoides tienen más medio buffer y energético.

Evans y Maxwell, (1990) para determinar la calidad, se calcula el número de dosis de semen a obtener y la cantidad de dilutor a agregar, para luego añadir la fracción A restante, siempre cuidando que el dilutor y el semen estén a la misma temperatura en baño maría (32 °C). Inmediatamente se inicia el descenso gradual de la

temperatura de semen diluido a 0.7 °C/min. (2 °C por cada 3 minutos), hasta llegar a 5 °C, que demora un tiempo de 35 a 40 minutos.

Evans y Maxwell, (1990) la fase de descenso de temperatura le sigue la fase de equilibrio o estabilización a 4 – 5 °C. Al iniciar esta fase se le agrega la fracción B (con glicerol) en tres partes a intervalos de 10 minutos, y se continua la estabilización por un espacio de 45 a 60 minutos más, después del cual se procede a realizar la congelación, para lo cual deben ajustarse los protocolos de congelación según la especie.

2.2.4 Calidad del semen congelado y fertilidad en ovinos

Hafez, (1996) reporta una Tasa de concepción de 50% cuando se usa semen congelado mediante inseminación intrauterina.

Salomón y Maxwell 1995, Usando un dilutor a base de tris, glucosa y yema de huevo encuentra una tasa de fertilización de 47,2% usando semen congelado en pellets en 36 ovejas.

2.2.5 Métodos de inseminación

Durán del Campo. (1980) la inseminación artificial es una técnica reproductiva en la cual las células sexuales masculinas (espermatozoides) son descargadas en el tracto genital femenino con la ayuda de medios mecánicos que sustituyen los órganos del macho.

Maxwell. (1984) de acuerdo al lugar donde se deposita el semen la inseminación artificial se puede clasificar en vaginal, cervical, intraperitoneal e intrauterina. Estas técnicas difieren en complejidad y posibilidad de realización.

2.2.6 Valoración seminal: sistema casa ®.

Miró, A. A. (2015) el análisis seminal clásico ha mejorado mediante la introducción de nuevas técnicas analíticas procedentes de otros campos de la investigación científica. Así, cada vez más autores están utilizando el sistema CASA (Computerized Assisted Sperm Analysis) para obtener un valor preciso y objetivo de la motilidad espermática y de la calidad del movimiento de los espermatozoides presentes en la muestra. La incorporación de estos métodos informáticos atenúa en gran parte el factor subjetivo del análisis seminal, y garantiza una mejor correlación con la capacidad fecundante del espermatozoide.

Mousa, y cols (2002) el sistema ha provisto de interesantes resultados sobre los porcentajes medios de motilidad y las diferentes subpoblaciones de espermatozoides que coexisten en una misma muestra. Esta técnica es posible utilizarla tanto en semen fresco como en el congelado o refrigerado.

2.2.7 Valoración de la motilidad espermática mediante el sistema informatizado CASA.

Dott y Foster (1979) el análisis computarizado de la motilidad fue propuesto por primera vez por dicho autor, desde que se introdujo en el mercado al principio de los años 80, originalmente para la evaluación del semen humano, este tipo de

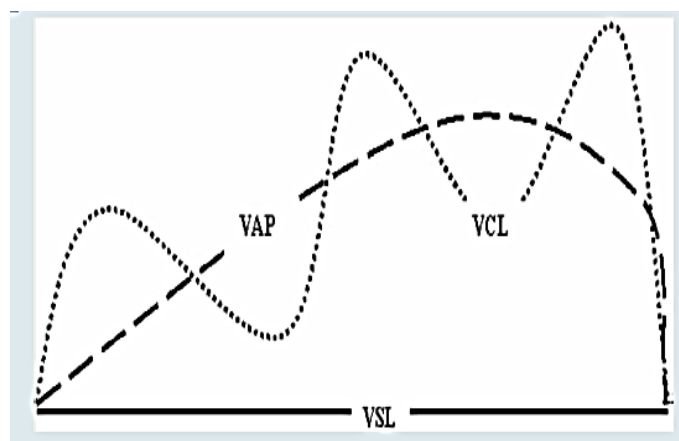
análisis se ha ido perfeccionando y modernizando, a la vez que fue haciéndose más accesible y; por consiguiente, comenzó a utilizarse en el campo de la ciencia animal, especialmente en centros de inseminación e investigación.

Miró, A. M. (2015) el análisis se hace al capturar las imágenes de espermatozoides en movimiento, previamente diluidos en un medio adecuado y en el microscopio a 100-200 aumentos. Tras la captura, la información es guardada hasta su análisis. Una vez realizado el análisis, la información obtenida es transferida a un procesador matemático que fragmenta la motilidad espermática en diversos descriptores de la motilidad individual que caracterizan la linealidad, la angularidad del movimiento espermático y el desplazamiento de la cabeza del espermatozoide. De manera general, estos sistemas constan de tres componentes principales: un microscopio con contraste de fase conectado a una pletina atemperada que permite mantener las muestras a 37°C, una cámara de vídeo de alta resolución conectada a una pantalla de televisión y un software de análisis de imágenes por ordenador.

Mortimer, (2000) menciona que los valores cinemáticos determinados para cada espermatozoide cubren la velocidad de circulación, la anchura de la trayectoria de la cabeza del espermatozoide, y la frecuencia del cambio de dirección de la cabeza del espermatozoide. Algunos de los parámetros más utilizados por diversos autores son los porcentajes de motilidad total o motilidad progresiva.

- En función de su progresividad, los espermatozoides son clasificados en: estáticos, móviles progresivos y móviles no progresivos.
- En función de su velocidad, llámese curvilínea (VCL), velocidad lineal (VSL), velocidad media (VAP), se clasifican en: rápidos, medios y lentos.

- Velocidad Curvilínea (VCL): Distancia total recorrida por la cabeza del espermatozoide a lo largo de su trayectoria real por unidad de tiempo ($\mu\text{m/s}$).
- Velocidad Rectilínea (VSL): Se determina a partir de la distancia en línea recta entre el primer y último punto de su trayectoria, y da la ganancia de espacio neto en el período de observación, medida en unidad de tiempo ($\mu\text{m/s}$).
- Velocidad Media (VAP): Distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de la trayectoria media de circulación en el periodo de observación. Esto es, conceptualmente, el valor de la velocidad más difícil de entender porque podría parecer que debería ser similar a la VSL.



Debido a la forma en que la trayectoria influye en los valores de velocidad, éstos son también comparables. De acuerdo a Miro Arias (2015) los índices de estas tres velocidades son:

- Índice de linealidad (LIN): Es la relación porcentual entre la velocidad rectilínea y la velocidad curvilínea.

$$\text{LIN} = (\text{VSL}/\text{VCL}) \times 100.$$

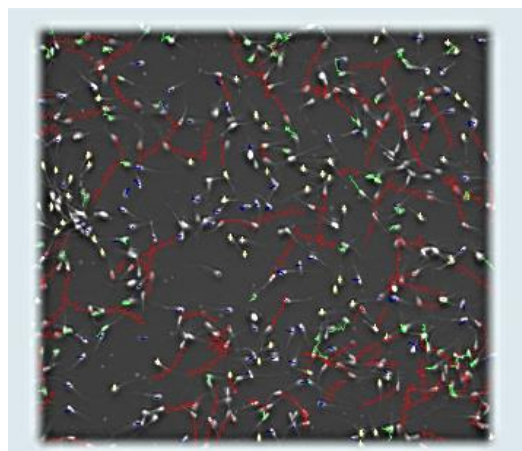
□ Índice de rectitud (STR): Es la relación porcentual entre la velocidad rectilínea y la velocidad media.

$$\text{STR} = (\text{VSL}/\text{VAP}) \times 100.$$

□ Índice de oscilación (WOB): Es la relación porcentual entre la velocidad media y la velocidad rectilínea.

$$\text{WOB} = (\text{VAP}/\text{VCL}) \times 100.$$

Imagen obtenida del análisis de la motilidad. Según su velocidad, los espermatozoides marcados en rojo son los rápidos, los marcados en amarillo son los estáticos, los marcados en verde son los medios y los marcados en azul son los lentos.



CAPÍTULO III

METODOLOGÍAS Y TÉCNICAS DE INVESTIGACIÓN

3.1 Tipo de investigación.

El presente proyecto de investigación tiene como tipo de investigación:

- Investigación experimental, ya que en esta investigación se evaluarán variables.

3.2 Método de investigación.

Método experimental.

3.3 Población y muestra

Se utilizó 37 animales pertenecientes al Centro Experimental de Casaracra 36 hembras y 1 macho.

Las hembras fueron distribuidas en dos tratamientos en forma aleatoria o al azar.

En casos de machos se asignó un solo macho reproductor, a fin de reducir el efecto del macho que podría influenciar sobre la fertilidad.

3.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

3.4.1 Lugar de ejecución

El presente estudio se llevó a cabo en el Centro Experimental Casaracra, perteneciente a la Universidad Nacional Daniel Alcides Carrión, el cual se localiza en el distrito de Paccha, Provincia Yauli y Región Junín, formando parte de la cuenca alta del río Mantaro, entre las coordenadas 11°27'34.01'' latitud sur y 75°57'32.99'' longitud oeste, a una altitud de 3 819 m.s.n.m., y por sus antecedentes

productivos es predominante para la explotación ganadera, con una temperatura media de 8° C, con una precipitación pluvial de 700 mm al año en forma variada, siendo los meses de diciembre, enero, febrero y marzo los de mayor precipitación pluvial. El escenario edáfico estuvo conformado por suelos relativamente profundos, fuertemente ácido, pH 4.7, pobre de carbonatos, 0.0%, con materia orgánica, 6.27%, Fosforo, 3.1 ppm, y Potasio 132 ppm. La textura predominante Franco Arenoso. El porcentaje de saturación de bases, 54%, la capacidad de suma de cationes 11.45% (Arias, 2015).

El tipo de vegetación es pajonal por la presencia dominante del; Festuca dolichophylla, Festuca Inarticulada y Stipa ichu (Arias, 2015).

3.4.2 Materiales y equipos utilizados

Los materiales que se utilizaron fueron:

- Vagina artificial para Ovinos, debidamente equipado con fundas y tubo colector se semen.
- Baño maría.
- Cajas de Tecnopor
- Dilutor Tris
- Termómetro digital.
- Nitrógeno líquido.
- Pajillas (envase) 0.5ml.
- Alcohol polivinílico (sellador)
- Tanque criogénico.

- Microscopio compuesto binocular con luz incorporada.
- Equipo computarizado de análisis de semen (CASA ®)
- Láminas porta objetos.
- Laminillas cubre objetos.
- Tinción eosina-nigrosina.
- Materiales de vidrio usados en laboratorio (matraz, bicker, baguetas, pipetas Pasteur, entre otros.)
- Libretas
- Lapiceros
- Cámara fotográfica.
- Yema de huevo de gallina

3.4.3 Colección de semen

Se utilizó una hembra para estimular el libido y la monta. El operador, situado al lado derecho de la hembra, coloca la vagina artificial en dicho flanco y la sujeta con la mano derecha, de tal forma que el extremo abierto quede mirando hacia el macho. La válvula de la vagina debe dirigirse hacia abajo con una inclinación de aproximadamente 45°, evitando el contacto con el carnero macho. En el momento del salto, se dirige con la mano izquierda el pene hacia el interior de la vagina artificial, procurando hacerlo siempre del prepucio para evitar la retracción del mismo. Cuando el pene entra en contacto con la superficie caliente de la vagina artificial, el semental da el característico "golpe de riñón" y eyacula dentro tubo colector (Evans y Maxwell, 1990).

3.4.4 Evaluación de semen

Se determinó el volumen de cada eyaculado mediante un tubo colector graduado, al mismo tiempo se evaluaron las características macroscópicas del semen, como color, olor y viscosidad. Así mismo, se observó el movimiento progresivo de cada eyaculado, colocando una gota de semen sobre un portaobjetos previamente temperado tapado con un cubreobjetos. Para su observación se utilizó una platina temperada en un microscopio. Este parámetro de medición subjetiva, midió la proporción de espermatozoides que presenta movimiento rectilíneo hacia delante. Con el fin de obtener un valor representativo, se observó de 4 a 5 campos de la muestra. Por último, se evaluó la proporción de espermatozoides vivos/muertos de cada eyaculado. Para esta prueba se utilizó la Tinción Supravital (eosina - nigrosina), que consiste en mezclar dos gotas de nigrosina y una de eosina con una gota de semen del mismo volumen sobre un portaobjeto en una platina temperada. Para las evaluaciones se contó con un equipo computarizado de análisis de semen (CASA) el mismo que muestra una precisión de 99.99 %.

3.4.5 Conservación de semen.

Para la conservación de semen se utilizará dos sistemas de conservación, el cual tendrá la siguiente conformación: yema de huevo de gallina + glicerol y dilutor; luego de ello se procederá a congelar a temperaturas menores de 196°C . La criopreservación de semen ovino consistirá en los procesos de enfriamiento y congelamiento. El enfriamiento comprenderá de 2 fases: en la primera, se diluyera el semen con los dos sistemas de conservación a una temperatura de 35°C (en la

misma proporción), luego se disminuirá (1°C cada 3 minutos) la temperatura hasta llegar a los 5°C en un lapso de 90 minutos. En la segunda fase se agregará la segunda fracción del dilutor (sustancias crio-protectoras), y luego se incubará a 5°C durante 30 minutos para estabilizar la muestra (Salamon y Maxwell, 2000), obteniendo una concentración final de 150 millones de espermatozoides/mL. Para terminar el periodo de estabilización, las muestras serán envasadas con ayuda de una jeringa en pajillas de 0.5 ml.

1. Las pajillas del tratamiento 1: serán congeladas con los vapores de nitrógeno líquido, para tal efecto se disminuirá la temperatura de 5 a -25°C en un lapso de 6 minutos ($5^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$) y finalmente fueron sumergidas en nitrógeno líquido a -196°C (Byrne y col. 2000).
2. Las pajillas del tratamiento 2. serán congeladas con los vapores de nitrógeno líquido, para tal efecto se disminuirá la temperatura de 5 a -25°C en un lapso de 2 minutos ($15^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$) y finalmente fueron sumergidas en nitrógeno líquido a -196°C (Byrne y col. 2000).

3.4.6 Inseminación artificial.

En la inseminación artificial se utilizará el método de inseminación laparoscópica intrauterina, el cual consiste en la deposición del semen dentro del útero, con una dosis de 0.5 ml, con ayuda del equipo de laparoscopia. En todos los casos se consideró labores preliminares de bienestar animal.

3.4.6 Determinación de fertilidad de las borregas inseminadas.

Para la determinación del porcentaje de preñez se evaluará a las borregas a 35 días después de la inseminadas mediante un examen con ayuda de un ecógrafo marca Chison.

3.5 Técnicas de procesamiento y análisis de datos.

Identificación de variables

Independientes

- **Técnicas de congelamiento**
- Rápida
 1. Motilidad progresiva (%)
 2. Porcentaje de espermatozoides vivos y muertos (%)
- Lenta
 1. Motilidad progresiva (%)
 2. Porcentaje de espermatozoides vivos y muertos (%)

Dependientes

Porcentaje de fertilidad

Diseño de la Investigación

Tratamientos:

Se evaluarán dos sistemas de conservación de semen:

Tratamiento 1: Congelamiento Lento

Tratamiento 2: Congelamiento Rápido.

Los tratamientos se conformarán de la siguiente manera:

Tabla 1. Distribución de los respectivos tratamientos.

Tratamiento 1	Tratamiento 2
L1	R1
L2	R2
...
L18	R18

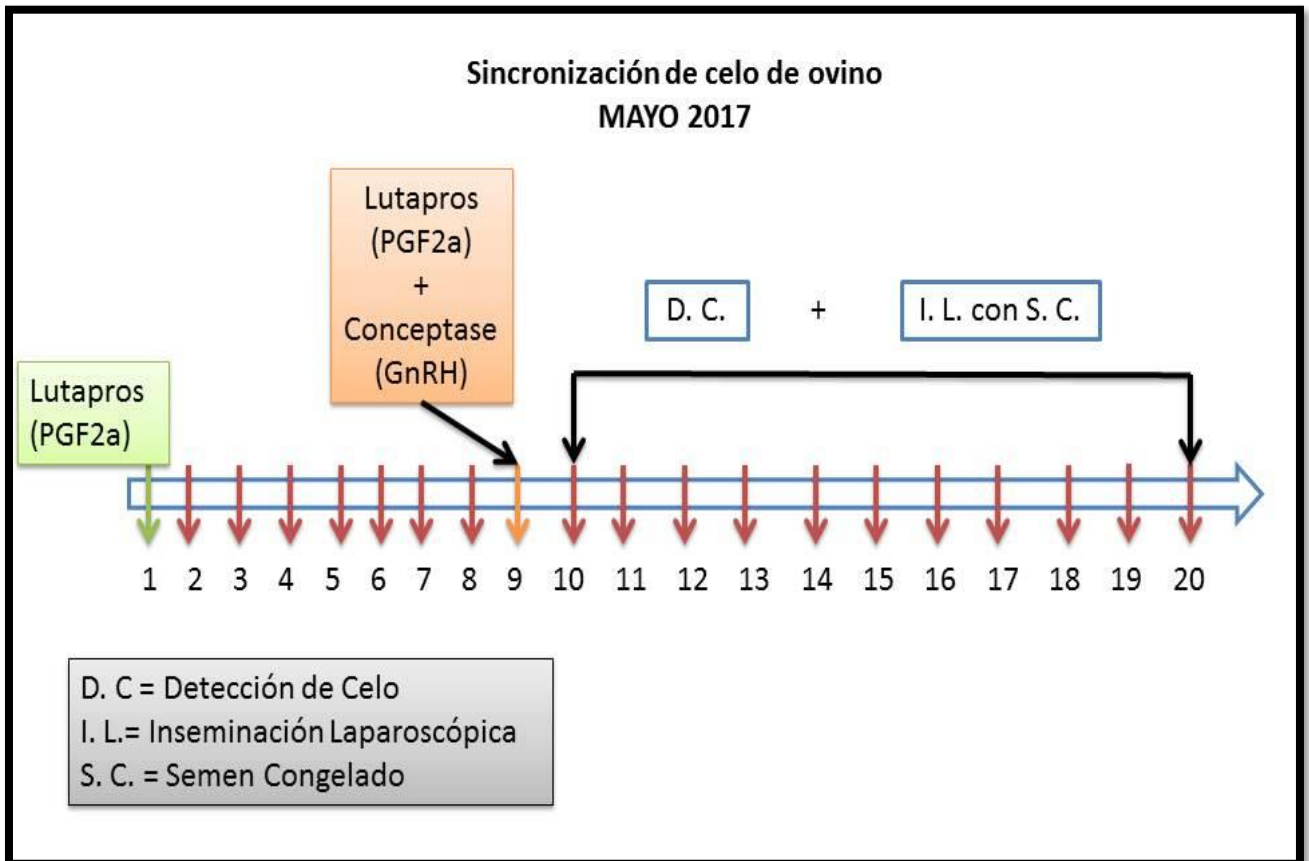
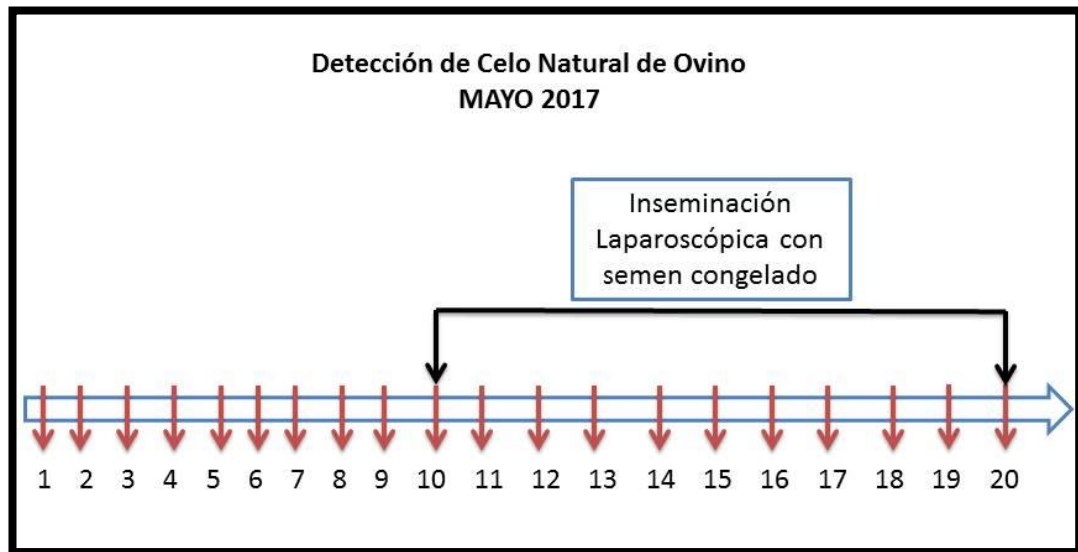


IMAGEN: Cronograma de sincronización de celo.
Fuente: Elaboración de los autores.



Análisis estadístico

El diseño estadístico utilizado en el presente estudio fue el diseño factorial 2x2, cuyo modelo matemático lineal es como sigue:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (A \times B)_{ij} + E_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = Es la variable respuesta.

μ = Es la media general.

B_i = Es el efecto del factor A, i-ésimo carnero.

T_j = Es el efecto factor B del j-ésimo protocolo de congelación.

$(B \times T)_{ij}$ = Es el efecto de la interacción de los factores A X B.

E_{ijk} = Es el error experimental.

En el análisis estadístico, se utilizó el Programa Estadístico SAS (Statistical Analysis System), descrito por Pérez (2001).

CAPÍTULO IV

PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

4.1 Presentación, análisis e interpretación de resultados.

4.1.1 Porcentaje de motilidad en semen post descongelamiento, según tratamiento del carnero raza East Friesian.

Cuadro 1. Resultados del porcentaje de motilidad progresiva del proceso de congelamiento lento.

Estadísticos		
PORCENTAJE DE MOTILIDAD PROGRESIVA		
N	Válido	18
	Perdidos	0
Media		55.022
Desviación estándar		3.0817
Varianza		9.497
Coeficiente de variación		5.601
Mínimo		50.1
Máximo		60.3

En el cuadro se muestra el porcentaje de motilidad progresiva una media de 55.02%.

Para la técnica de congelamiento lento.

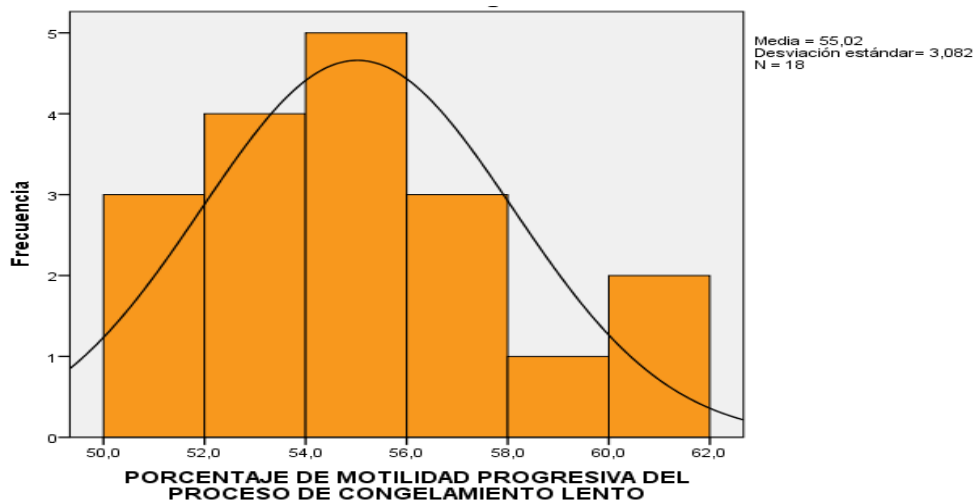


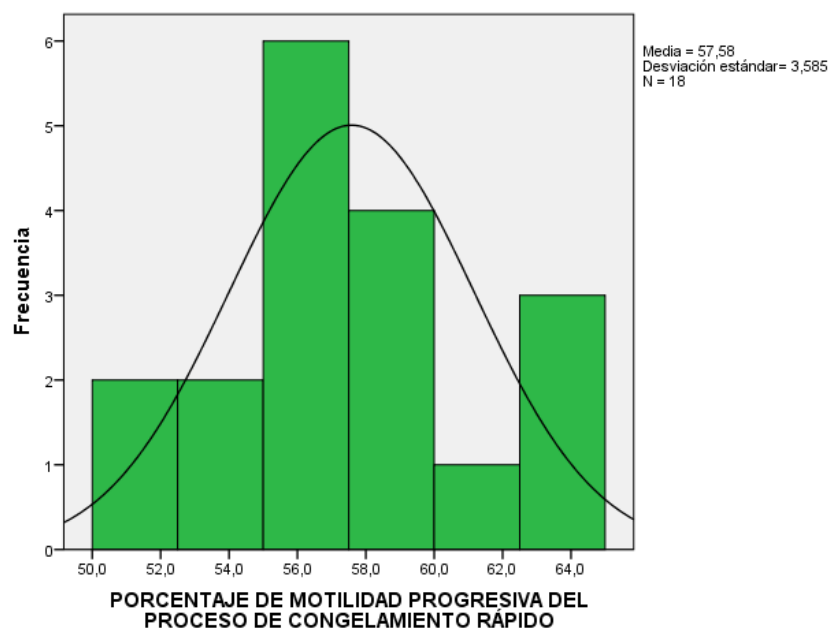
Gráfico 1. Histograma de frecuencias del porcentaje de motilidad progresiva del proceso de congelamiento lento.

Cuadro 2. Resultados del porcentaje de motilidad progresiva del proceso de congelamiento rápido.

Estadísticos		
PORCENTAJE DE MOTILIDAD PROGRESIVA		
n	Válido	18
	Perdidos	0
Media		57.583
Desviación estándar		3.5851
Varianza		12.853
Coeficiente de variación		6.226
Mínimo		51.7
Máximo		64.6

En el cuadro se muestra el porcentaje de motilidad progresiva una media de 57.58%. Para la técnica de congelamiento rápido.

Gráfico 2. Histograma de frecuencias del porcentaje de motilidad progresiva del proceso de congelamiento rápido.



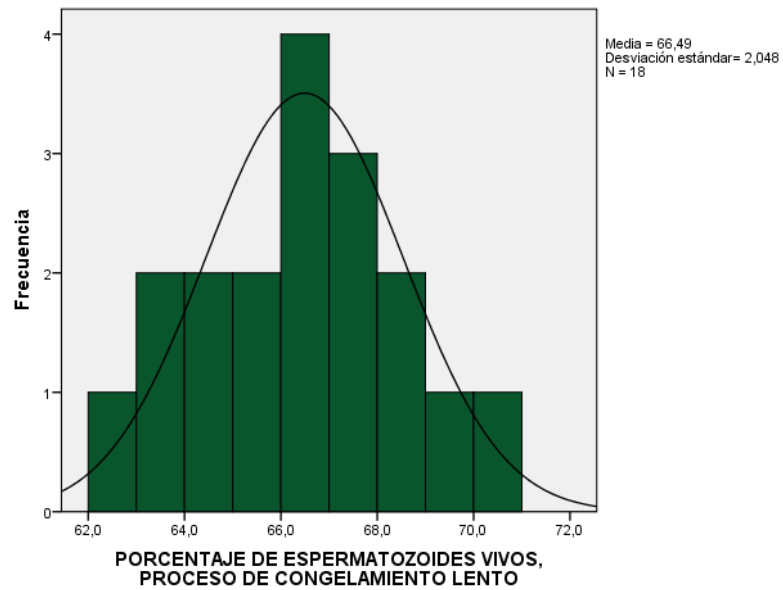
En el cuadro 1 y 2 se muestran los resultados de motilidad progresiva del proceso de congelamiento lento una media 55.02 y rápido 57.58. Al comparar con los resultados de Ruiz, G., Sandoval, M. y Santiani A. (2015) donde reportan la motilidad fue superior con el uso de glicerol (65.5%) en comparación con el uso de etilenglicol (49.0%) ($p < 0.05$); asimismo, la motilidad fue superior con el uso de fructosa (59.3%) que con glucosa (55.1%) ($p < 0.05$). Dicha ligera superioridad es debido al uso a los crioprotectores y a la técnica del proceso de congelamiento.

4.1.2 Porcentaje de espermatozoides vivos y muertos post descongelamiento según tratamiento del carnero raza East Friesian.

Cuadro 3. Resultados del porcentaje de espermatozoides vivos del proceso de congelamiento lento.

Estadísticos		
PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDEOS VIVOS		
n	Válido	18
	Perdidos	0
Media		66.489
Desviación estándar		2.0485
Varianza		4.196
Coeficiente de variación		3.081
Mínimo		62.8
Máximo		70.2

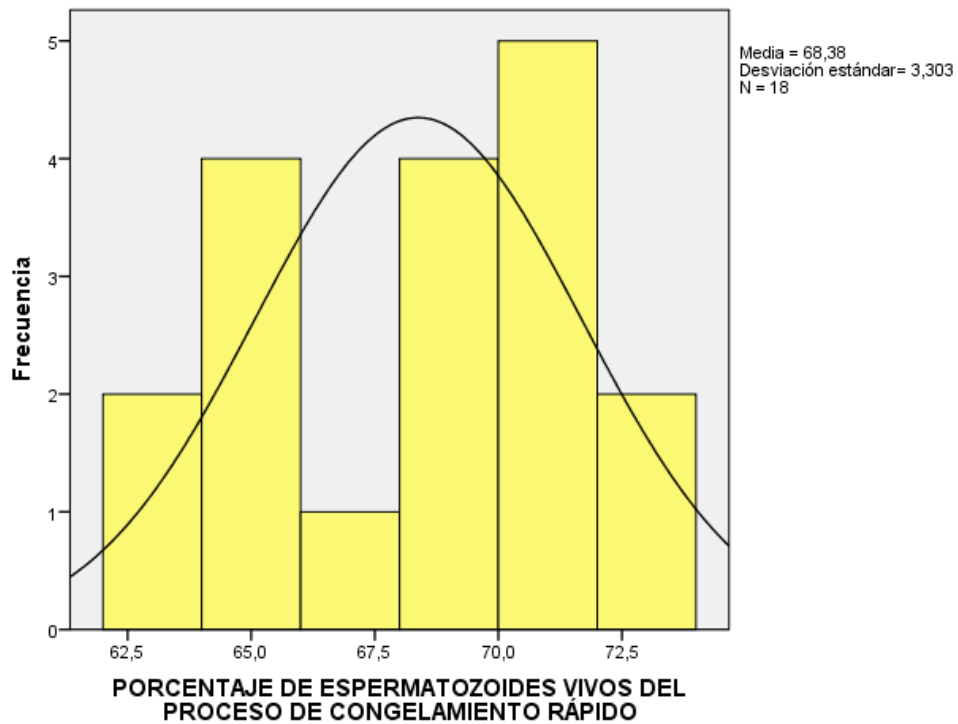
Gráfico 3. Histograma de frecuencias del porcentaje de espermatozoides vivos del proceso de congelamiento lento



Cuadro 4. Resultados del porcentaje de espermatozoides vivos del proceso de congelamiento rápido.

Estadísticos		
PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDEOS VIVOS		
n	Válido	18
	Perdidos	0
Media		68.378
Desviación estándar		3.3027
Varianza		10.908
Coefficiente de variación		4.830
Mínimo		62.8
Máximo		72.6

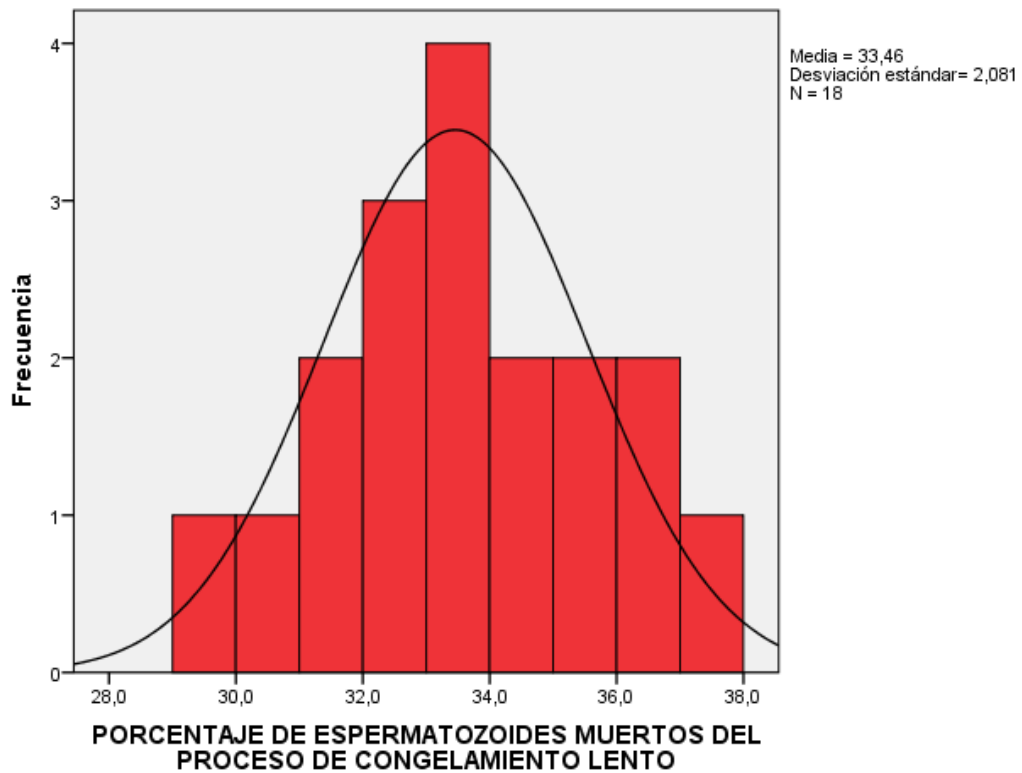
Gráfico 4. Histograma de frecuencias del porcentaje de espermatozoides vivos del proceso de congelamiento rápido.



Cuadro 5. Resultados del porcentaje de espermatozoides muertos del proceso de congelamiento lento.

Estadísticos		
PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDEOS MUERTOS		
n	Válido	18
	Perdidos	0
Media		33.456
Desviación estándar		2.0814
Varianza		4.332
Coefficiente de variación		6.221
Mínimo		29.8
Máximo		37.2

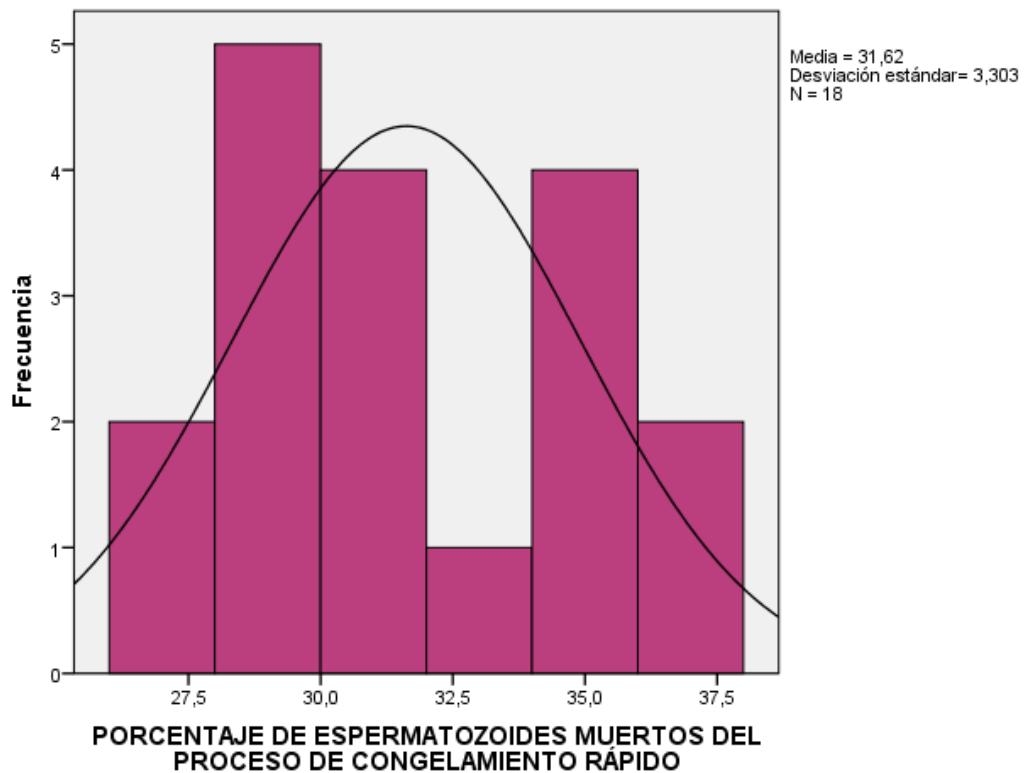
Gráfico 5. Histograma de frecuencias del porcentaje de espermatozoides muertos del proceso de congelamiento lento.



Cuadro 6. Resultados del porcentaje de espermatozoides muertos del proceso de congelamiento rápido.

Estadísticos		
PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES MUERTOS		
n	Válido	18
	Perdidos	0
Media		31.622
Desviación estándar		3.3027
Varianza		10.908
Coficiente de variación		10.444
Mínimo		27.4
Máximo		37.2

Gráfico 6. Histograma de frecuencias del porcentaje de espermatozoides muertos del proceso de congelamiento rápido.



En el cuadro 3 y 4 se muestran los resultados obtenidos de la evaluación del porcentaje de espermatozoides vivos para el proceso de congelamiento lento es 66.489 % y rápido es de 68.378%, estos resultados comparados a Hernández, P.J. y t al (2012) reporta en la post-evaluación del semen descongelado, espermatozoides viables = $67,5 \pm 4,7$, obteniéndose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) causadas por los efectos de la criopreservación. La cual son similares a nuestros resultados. Se concluye que, a pesar de que la viabilidad de los espermatozoides se ven afectado por la criopreservación.

Así mismo Mocé, (2003) concluyó que el semen de buena calidad debe presentar un mínimo del 60% de espermatozoides móviles y de 50% de progresión rectilínea. El cual nuestros resultados se encuentran a lo establecido por dicho autor.

4.3 Porcentaje de fertilidad en las borregas Corriedale después de inseminación artificial intrauterina (35 días), según técnicas de congelamiento.

Cuadro 7. Porcentaje de gestación según proceso de congelamiento.

PROCESO DE CONGELAMIENTO*PORCENTAJE DE FERTILIDAD DE LAS BORREGAS AL DIAGNOSTICO DE PREÑEZ					
			PORCENTAJE DE FERTILIDAD DE LAS BORREGAS AL DIAGNOSTICO DE PREÑEZ		Total
			SI	NO	
PROCESO DE CONGELAMIENTO	CONGELAMIENTO LENTO	Recuento	8	10	18
		% dentro de PORCENTAJE DE FERTILIDAD DE LAS BORREGAS AL DIAGNOSTICO DE PREÑEZ	44.4%	55.6%	100.0%
	CONGELAMIENTO RÁPIDO	Recuento	9	9	18
		% dentro de PORCENTAJE DE FERTILIDAD DE LAS BORREGAS AL DIAGNOSTICO DE PREÑEZ	50.0%	50.0%	100.0%
Total		Recuento	17	19	36
		% dentro de PORCENTAJE DE FERTILIDAD DE LAS BORREGAS AL DIAGNOSTICO DE PREÑEZ	47.2%	52.8%	100.0%

En el cuadro se muestra resultados de fertilidad mediante congelamiento lento 44.6 % de gestación y congelamiento rápido 50.0%, que viene hacer superior al del proceso de congelamiento de semen lento.

Gráfico 7. Porcentaje de fertilidad de las borregas al diagnóstico de preñez, inseminadas con semen procesada con congelamiento lento.

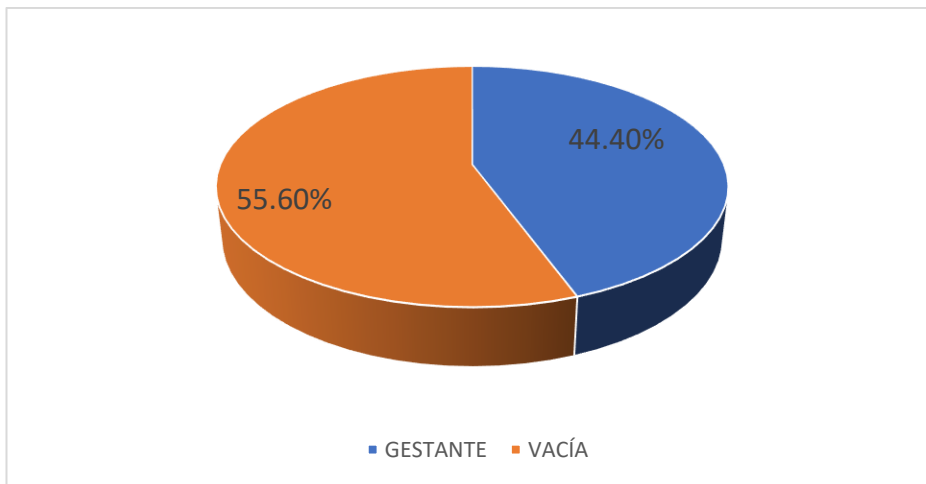
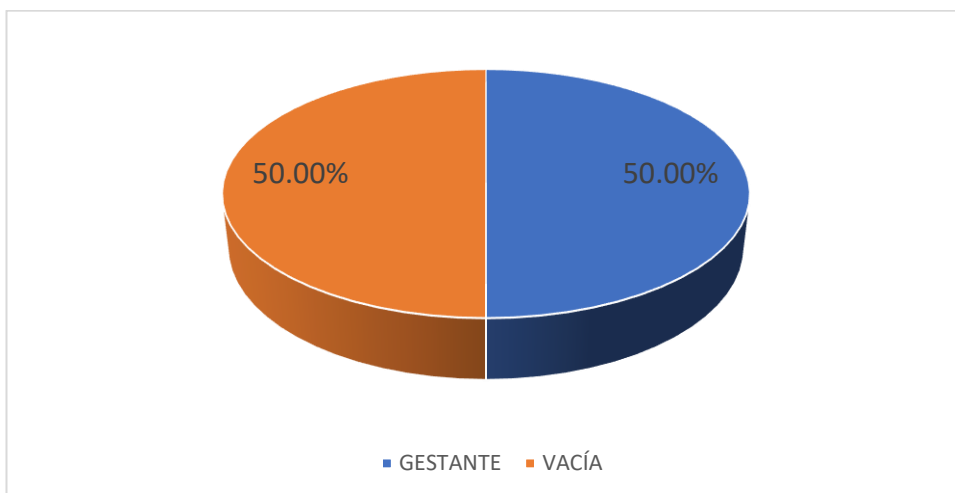


Gráfico 8. Porcentaje de fertilidad de las borregas al diagnóstico de preñez, inseminadas con semen procesada con congelamiento rápido



Si se compara los resultados obtenidos de fertilidad 44.6 % para proceso de congelamiento lento y 50% para proceso de congelamiento rápido, existe diferencia a los resultados reportados por Pérez, M.G. y et al (2011) los resultados de gestación final posterior a la inseminación artificial por vía cervical (68 %), esto debido al uso de los criopreservantes de los espermatozoides al momento del congelamiento. Esta diferencia no se muestra reportados el porcentaje de fertilidad del 38,1, 30,0 y 58,3 % (Soderquist et al. 1999) de tres carneros diferentes, donde la descongelación de las pajillas del semen realizó a 50 °C por 9 s y 70 °C por 5 s y recomiendan que la descongelación a temperatura más baja facilitaría el uso práctico del semen congelado en condiciones de campo.

Paulenz y et al. (2004), reportaron resultados superiores con el 72,9% de gestaciones, la cual es superior a nuestro estudio, debido a un manejo racional del semen para la IA en pajillas de 0,25 mL y descongelados a 35 °C, resultados que son diferentes a nuestro trabajo de investigación.

Así mismo Nordstoga, y et al., 2009) reporta los resultados de gestación del 64% del presente estudio producto de la IA vía vaginal supera al 44.6 % y 50,0%. Cabe indicar que esta superioridad en el porcentaje de gestación en el presente estudio es producto de la re-inseminación de las ovejas que retornaron al celo. La cual no se realizó en nuestro estudio.

Al análisis estadístico mediante la prueba de Chi-cuadrado no se encontró diferencias estadísticas significativas, respecto a las tasas de preñez.

Cuadro 8. Resultados de correlación entre todas las variables.

Pruebas de chi-cuadrado					
	Valor	df	Significación asintótica (bilateral)	Significación exacta (bilateral)	Significación exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,111 ^a	1	0.738		
Corrección de continuidad ^b	0.000	1	1.000		
Razón de verosimilitud	0.112	1	0.738		
Prueba exacta de Fisher				1.000	0.500 NS
Asociación lineal por lineal	0.108	1	0.742		
N de casos válidos	36				
a. 0 casillas (0,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 8,50.					
b. Sólo se ha calculado para una tabla 2x2					

Correlaciones						
		PROCESO DE CONGELAMIENTO	MOTILIDAD PROGRESIVA	PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES VIVOS	PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES MUERTOS	PORCENTAJE DE FERTILIDAD DE LAS BORREGAS AL DIAGNOSTICO DE PREÑEZ
PROCESO DE CONGELAMIENTO	Correlación de Pearson	1	,367*	,333*	-0.323	-0.056
	Sig. (bilateral)		0.028	0.047	0.054	0.747
	N	36	36	36	36	36
MOTILIDAD PROGRESIVA	Correlación de Pearson	,367*	1	,500**	-,492**	-,527**
	Sig. (bilateral)	0.028		0.002	0.002	0.001
	N	36	36	36	36	36
PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES VIVOS	Correlación de Pearson	,333*	,500**	1	-,999**	-,429**
	Sig. (bilateral)	0.047	0.002		0.000	0.009
	N	36	36	36	36	36
PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES MUERTOS	Correlación de Pearson	0.323	-,492**	-,999**	1	,427**
	Sig. (bilateral)	0.054	0.002	0.000		0.009
	N	36	36	36	36	36
PORCENTAJE DE FERTILIDAD DE LAS BORREGAS AL DIAGNOSTICO DE PREÑEZ	Correlación de Pearson	0.056	0,527**	-,429**	,427**	1
	Sig. (bilateral)	0.747	0.001	0.009	0.009	
	N	36	36	36	36	36
*. La correlación es significativa en el nivel 0,05 (bilateral).						
**. La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral).						

Al análisis estadístico de correlación de Pearson en el cual se demuestra una correlación entre la variable proceso de congelamiento, motilidad progresiva y porcentaje de espermatozoides vivos ($P < 0.05$). Así misma motilidad progresiva con proceso de congelamiento, porcentaje de espermatozoides vivos - muertos y fertilidad de las borregas ($P < 0.01$)

Los porcentajes de espermatozoides vivos se encuentra correlacionado con proceso de congelamiento ($P < 0.05$); y una correlación de ($P < 0.01$) con los variables motilidad progresiva, porcentaje de espermatozoides muertos y fertilidad de las borregas.

La variable de porcentaje de espermatozoide muertos se encuentra correlacionado con motilidad progresiva, porcentaje de espermatozoide vivos y fertilidad de las borregas ($P < 0.01$)

Porcentaje de fertilidad de las borregas esta correlacionado con porcentaje de espermatozoide muertos, motilidad progresiva y porcentaje de espermatozoide vivos ($P < 0.01$).

CONCLUSIONES

- Al observarse que no existe diferencias significativas entre tratamientos, se optaría por el tratamiento 2, congelamiento rápido.
- Dicha técnica permitiría el ahorro de tiempo y sobre todo de nitrógeno líquido durante las sesiones de congelamiento.
- Se logró porcentajes de motilidad muy interesantes e incluso superiores a los esperados para dicha técnica. Con lo cual se podría decir se logra una buena calidad seminal post descongelamiento.

RECOMENDACIONES

- Usar la técnica de congelamiento rápido en la conservación de espermatozoides, por cuanto permite un ahorro de nitrógeno líquido y tiempo.
- Usar crioprotectores garantizados como el usado en el presente estudio a fin de garantizar la viabilidad de los espermatozoides pos descongelamiento.
- Continuar investigando el protocolo de congelamiento rápido a fin de determinar la fertilidad en campo.

BIBLIOGRAFÍAS

- Alarcón, V. (1984). Ensayo de la aplicación de la Inseminación artificial con semen congelado en borregas mantenidas en sistema extensivo en praderas alto-andinas. Tesis Ing. Zootecnista Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima- Perú.
- Bearden, J. H. (1980). Reproducción Animal Aplicada. Ed. El Manual Moderno. México.
- Bonadonna, T. (1974). Producción Animal e Inseminación Artificial. Tomo II. Ed. Hemisferio Sur S.A. Argentina.
- Buxadde, C. (1996). Zootecnia Bases de la Producción Animal. Ed. Mundi Prensa Tomo VIII.
- Carmenate, P. y Gamcik, P. (1986). Different diluents for ram semen stored at room temperatura or for 12 h at 5 °C and their effect on fertility. Animal Breeding Abstract. Vol. 54 N° 7.
- Cortes, S.; Montero, T. y Vasquez, I. (1995). Viabilidad espermática de semen ovino durante 48 horas. VI Jornadas sobre Producción Animal. Zaragoza – España. Tomo I: 422 – 424
- Cueto, M., Garcia, J., Arrigo, J. Gibbons, A. (2003). “Obtención, Procesamiento y Conservación del Semen Ovino” INTA – Bariloche-Argentina. (Comunicación Técnica PA 200).
- Daza, A. (1997). Reproducción y Sistemas de Explotación del Ganado Ovino. Ed Mundi Prensa. España.

- Donovan A.; Narran E.; Jummen E.; Duffy P. and Boland M. (2003). Fertilidad en Ovejas inseminadas vía cervical con semen fresco y congelado en estro natural y sincronizado” Irlanda.
- Duran Del Campo, A. (1980) Anatomía, fisonomía de la reproducción e inseminación artificial en ovinos. Editorial Hemisferio Sur: 204.
- Evans, G.; Y Maxwell, W. (1990). “Salamon s Artificial Insemination of Sheep and Goats”. Editorial Butterworth / Co. Ltd., 88 Kingsway, London WC2B 6AB.
- Hafez, E.S.E. (1996). Reproducción e inseminación artificial en animales. Tercera edición en español. Nueva editorial interamericana s.a. México D. F. Pgs: 542.
- Fiser, P.S. Y Fairfull, R.W. (1986). The effect of rapid cooling (cold shock) of ram semen, photoperiod, and egg yolk in diluyents on the survival of spermatozoa before and after freezing. *Criobiology*. Vol. 23 (6): 518-24.
- Garcia, R.M.; Dominguez, V., Gonzales, B., A. Veiga, L., A. Cocero, M.J. (1992). Efecto de la Concentración de sacarosa sobre la supervivencia post-descongelación de embriones ovinos en distintos estadios del desarrollo preimplantacional *ITEA* 24(I): 229 – 281.
- Gil J.; Rodríguez-Irazoqui, M.; Lundeheim, N.; Soderquist, L. Y Rodríguez-Martinez, H. (2003). Fertility of ram semen frozen in Bioxcell (R) and used for cervical artificial insemination. *Theriogenology* Mar; 59(5-6): 1157-1170.

- Guillermo, R. C. (1993). Evaluación de la fertilidad de ovejas inseminadas por vía intrauterina con semen congelado / descongelado de diferentes calidades. Tesis para optar al grado de MAGISTER SCIENTIAE. Balcarce.
- HAFEZ, (1996). Reproducción e Inseminación Artificial de Animales. Ed. Interamericana.
- Hernández, P.J.E., Fernández, R.F., Rodríguez, S.J.L., Juárez, R.E., Soto, M.Y.G. Y García R.A. (2012). Efecto de la criopreservación de semen de ovino en relación a su viabilidad y estado acrosomal- ¹Laboratorio Manejo de la Reproducción. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Calzada del Hueso 1100, Colonia Villa Quietud, Coyoacán 04960. México, D.F.
- Inskoop, E. K. (1974). Artificial insemination and preservation of ram semen. Artificial Insemination in Sheep Bulletin 629. West Virginia University – Agricultural Experimental Station.
- Lopez, A. (1999). Sperm viability in ram semen diluted and stored in three different extenders. Acta Veterinaria Scandinava. Vol. 40 pp. 1-9.
- Maxwell, W.C. Y Salamon, S. (2000). Storage of ram semen. Animal Reproduction Science. Vol. 62 pp 77 – 111.
- Mellisho S., E.; Gallegos C., A.; Alvarado M., E.; Cabrera P.; Y Garcia G., R. (2004) “Reproducción e Inseminación Artificial en Ovinos” UNA La Molina – 2004.
- Mocé, E., (2003). Estudio de diversos factores que afectan a la capacidad fecundante del semen de conejos congelado en un medio con DMSO y sacarosa. Tesis doctoral. UPV.

- Neubert, L. Y Menger H. (1981). Problems relating to low temperature preservation of ram semen. 1. Effects of various cryoprotective agents on sperm. Arch. Exp. Vet. Vol. 35 (1): 51-56.
- Pace, M.M. y Graham, E.F. (1974). Components in egg yola which Project bovine spermatozoa during freezing. Journal of Animal Science. Vol. 39 (6): 1144-1149.
- Paulenz H.; Soderquist, L.; Perez-Pe, R. Y Andersen, K. (2002). Effect of different extenders and storage temperature on sperm viability of liquid ram semen. Theriogenology Vol. 57 (2): 823-836.
- Perez, P. R. y Cebrian, P., Perez J. A. (2001). Semen plasma proteins prevent cold-shock membrana damage to ram spermatozoa. Theriogenology. Vol. 56 (3): 425-434.
- Perez Y Perez, F. (1999). Reproducción Animal: Inseminación Artificial y Transplante de Embriones” Edit. Científico Médica - Barcelona 1999.
- Pérez, M.G., Quispe, T.L., Malaga, J. Y Quispe, U.H. (2011). Inseminación artificial con semen congelado en ovejas por vía vaginal y cervical en el altiplano peruano. Laboratorio de Reproducción Animal, Instituto de Investigaciones de Bovinos y Ovinos, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional del Altiplano Puno-Perú. SPERMOVA (2011).

- Pérez, M., Quispe, T., Quispe, F., Aguirre, E., Quispe, M., Pérez, U. (2010). Porcentaje de Gestación y Partición en Ovejas Usando Inseminación Laparoscópica con Semen Congelado. Lima – Perú.
- Quinn P.J.; White, G. Y Chow, W. (1980). Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. *Journal of Reproduction and Fertility*. Vol. 60 pp. 403 – 407.
- Ramirez, C.A. (2002). Efecto de tres dilutores y tres tiempos de refrigeración en la motilidad individual del semen refrigerado de carneros Black Belly. Tesis: Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima – Perú.
- Reich, C.L. y Williams, D.H. (1995). Effect of antifreeze proteins on the hypodermic storage of ram spermatozoa at 5° for 10 days. *Animal Breeding Abstracts*. N° 15. pp 44 – 45.
- Ruiz, G., Sandoval, M. y Santiani A. (2015). Evaluación de la calidad espermática del semen ovino posdescongelación al emplear dos fuentes energéticas y dos crioprotectores, *Rev Inv Vet Perú* 2015; 26(1): 49-56 <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v26i1.10942>
- Saxena, V. y Tripathi, S. (1986). Preservation of ram semen at room temperatura. *Animal Breeding Abstracts*. Vol. 54 N° 5.
- Salomón, S. (1995). Inseminación artificial de ovejas y cabras. Editorial ACRIBIA Zaragoza (España). Pg 192.
- Watson, P.F. (1981). The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 °C by egg yolk lipoprotein. *Journal of Reproduction Science*. Vol. 37 (2): 156-157.

ANEXOS:

DATOS

N°	TRATAMIENTO 1	MOT PROG (%)	VIVOS(%)	MUERTOS (%)	(%) DE FERTILIDAD
1	LENTO	50.8	66.2	33.8	NO
2	LENTO	55.7	65.5	34.5	NO
3	LENTO	57.8	67.3	32.7	SI
4	LENTO	50.1	66.7	33.3	NO
5	LENTO	56.1	67.8	32.2	SI
6	LENTO	55.8	68.5	31.5	SI
7	LENTO	54.7	66.9	33.1	NO
8	LENTO	53.3	67.8	32.2	NO
9	LENTO	60.1	69.5	30.5	SI
10	LENTO	50.7	63.6	36.4	NO
11	LENTO	57.2	64.6	35.4	SI
12	LENTO	55.8	63.9	36.1	NO
13	LENTO	55.2	68.4	31.6	NO
14	LENTO	53.7	66.4	33.6	NO
15	LENTO	52.4	65.9	34.1	NO
16	LENTO	58.5	62.8	37.2	SI
17	LENTO	60.3	70.2	29.8	SI
18	LENTO	52.2	64.8	35.2	SI

N°	TRATAMIENTO 2	MOT PROG (%)	VIVOS(%)	MUERTOS (%)	(%) DE FERTILIDAD
1	RÁPIDO	60.4	70.5	29.5	SI
2	RÁPIDO	58.3	71.8	28.2	NO
3	RÁPIDO	56.8	69.6	30.4	NO
4	RÁPIDO	57.1	71.5	28.5	SI
5	RÁPIDO	62.6	72.6	27.4	SI
6	RÁPIDO	58.6	69.5	30.5	SI
7	RÁPIDO	55.2	64.6	35.4	NO
8	RÁPIDO	63.3	72.5	27.5	SI
9	RÁPIDO	52.4	65.9	34.1	NO
10	RÁPIDO	54.8	62.8	37.2	NO
11	RÁPIDO	58.3	70.3	29.7	SI
12	RÁPIDO	56.8	69.6	30.4	NO
13	RÁPIDO	57.1	71.5	28.5	SI
14	RÁPIDO	64.6	64.6	35.4	NO
15	RÁPIDO	55.2	68.4	31.6	SI
16	RÁPIDO	53.7	66.4	33.6	NO
17	RÁPIDO	59.6	65.9	34.1	SI
18	RÁPIDO	51.7	62.8	37.2	NO

DATOS ORDENADOS PARA SPSS

CONGELAMIENTO 1=1

CONGELAMIENTO 2=2

(%) DE FERTILIDAD

SI=1

NO=2

N°	CONGELAMIENTO 1	MOT PROG (%)	VIVOS(%)	MUERTOS (%)	(%) DE FERTILIDAD
1	1	50,8	66,2	33,4	2
2	1	55,7	65,5	34,5	2
3	1	57,8	67,3	32,7	1
4	1	50,1	66,7	33,3	2
5	1	56,1	67,8	32,2	1
6	1	55,8	68,5	31,1	1
7	1	54,7	66,9	33,1	2

8	1	53,3	67,8	32,1	2
9	1	60,1	69,5	30,5	1
10	1	50,7	63,6	36,4	2
11	1	57,2	64,6	35,4	1
12	1	55,8	63,9	36,1	2
13	1	55,2	68,4	31,5	2
14	1	53,7	66,4	33,6	2
15	1	52,4	65,9	34,1	2
16	1	58,5	62,8	37,2	1
17	1	60,3	70,2	29,8	1
18	1	52,2	64,8	35,2	1
1	2	60,4	70,5	29,5	1
2	2	58,3	71,8	28,2	2
3	2	56,8	69,6	30,4	2
4	2	57,1	71,5	28,5	1
5	2	62,6	72,6	27,4	1
6	2	58,6	69,5	30,5	1
7	2	55,2	64,6	35,4	2
8	2	63,3	72,5	27,5	1
9	2	52,4	65,9	34,1	2
10	2	54,8	62,8	37,2	2
11	2	58,3	70,3	29,7	1
12	2	56,8	69,6	30,4	2
13	2	57,1	71,5	28,5	1
14	2	64,6	64,6	35,4	2
15	2	55,2	68,4	31,6	1
16	2	53,7	66,4	33,6	2
17	2	59,6	65,9	34,1	1
18	2	51,7	62,8	37,2	2

Anexo I. Fotos alusivas al trabajo de investigación

FOTO 1. Obtención y colección de semen



FOTO 2. Evaluación del semen



FOTO 3. Preparado para el congelamiento del semen



FOTO 4. Caja Tecnopor, conectado con un termómetro mecánico

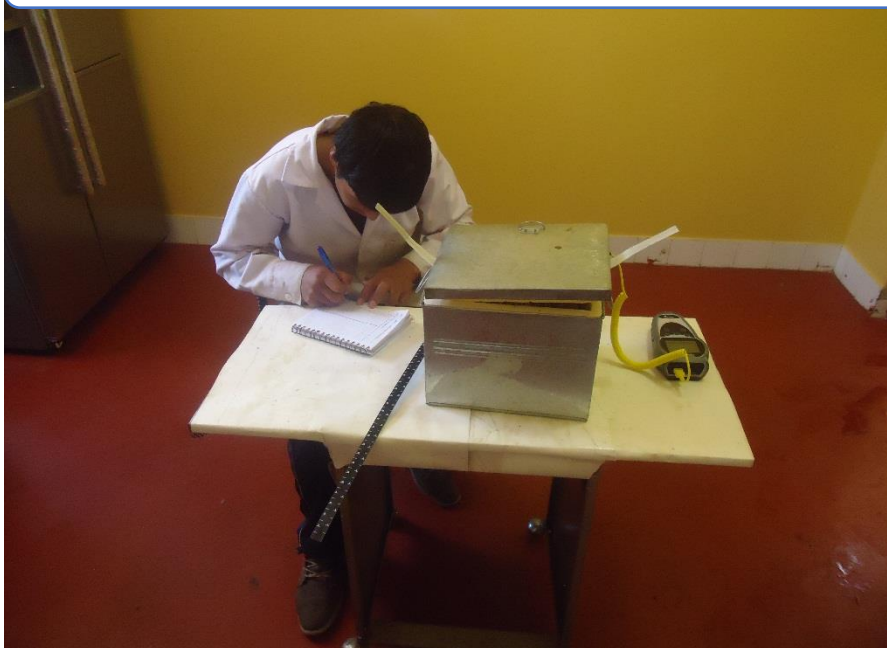


FOTO 5. Descongelamiento de semen con una de las pajillas

