UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS

FACULTAD DE AGRONOMIA

PROGRAMA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

TESIS DE GRADO

EVALUACIÓN DE TRES DILUTORES COMERCIALES SOBRE EL PROCESAMIENTO DE SEMEN OVINO (*Ovis aries*) EN LA ESTACIÓN EXPERIMENTAL DE CHOQUENAIRA

ERIKA RUTH GUTIERREZ CALLISAYA

La Paz – Bolivia

2023

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS

FACULTAD DE AGRONOMIA

PROGRAMA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

EVALUACIÓN DE TRES DILUTORES COMERCIALES SOBRE EL PROCESAMIENTO DE SEMEN OVINO (*Ovis aries*) EN LA ESTACIÓN EXPERIMENTAL DE CHOQUENAIRA

Tesis de Grado presentado como requisito parcial para optar el Título de Licenciado en Medicina Veterinaria y Zootecnia

ERIKA RUTH GUTIERREZ CALLISAYA

Asesores:

M.V.Z. Rodrigo Juan Aliaga Alvarez ……

Ing. M.Sc. Ruben Tallacagua Terrazas ……

Tribunal Examinador:

MVZ. M.Sc. Carlos Alejandro Palma Davila ……

Ing. Eloy Hernán Huacani Rivera ……

MVZ. Jorge Humberto Sanjinés Lizarazu ……

APROBADA

Presidente Tribunal Examinador: ……

La Paz – Bolivia

2023

DEDICATORIA

A DIOS

Que siempre ha guiado mi camino y nunca me ha abandonado,

enviándome personas valiosas a mi vida gracias…

A MIS PADRES

Rogelio Gutierrez y Victoria Callisaya por su apoyo incondicional

en mi vida que han hecho que ese sueño y ese amor por la vida animal,

no sea hoy solo un sueño sino una profesión.

A MI HERMANO

Jose Manuel Gutierrez que me ha incentivado a seguir pese

a las circunstancias difíciles de mi vida y a mi pequeño y querido sobrino

Karim Gutierrez que ha sido un regalo de Dios y una motivación

para seguir adelante y no rendirme.

A MI QUERIDA AMIGA

I. Soledad Ayala Valdez por permanecer a mi lado en los buenos y malos

momentos apoyándome y dándome aliento para seguir.

A MIS PEQUEÑAS MASCOTAS

Tomas, Jhin, Nicolas y mi pequeño Trevor que fueron alegría para mi

corazón y consuelo a mis perdidas, en especial mi pequeño Tomas fiel como ninguno

estuvo ahí cuando más lo necesitaba siendo mi compañía, mi pequeño amigo fiel,

dedicado también a un pequeño que ya está en el cielo gracias por los

momentos de compañía y alegría Chabelo.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Agronomía de la Universidad Mayor de San Andrés, al P. Medicina Veterinaria y Zootecnia a la que debo mi formación profesional durante mis estudios universitarios.

A la Estación Experimental de Choquenaira por la cooperación generosa en el préstamo del laboratorio, ambientes y a todo el personal y equipo administrativo.

A mis Asesores:

M.V.Z. Esp. Rodrigo Juan Aliaga por la colaboración y consejos que han sido útiles en el desarrollo y mejoramiento de este trabajo que ahora presento.

Ing. M. Sc Ruben Tallacagua Terrazas por el asesoramiento, sugerencias, revisión y correcciones del presente documento

A mi Docente MVZ. M.Sc. Rene Condori E., por las sugerencias confianza, apoyo que contribuyeron a mejorar el presente trabajo de investigación y sobre todo su buen sentido del humor y amistad gracias doctor.

Al Técnico Superior en Agropecuaria: Eulogio Kantuta S. a quien estimo y le doy un agradecimiento especial por transmitirme sus conocimientos, colaborarme y brindarme su amistad en el transcurso del trabajo de laboratorio, permitiéndome culminar el presente trabajo de investigación.

A mi tribunal revisor: Ing. Eloy Hernán Huacani R., MVZ. Jorge Humberto Sanjinés L. y al MVZ. Carlos Alejandro Palma D. gracias por la revisión, corrección y sugerencia que contribuyeron a mejorar el presente trabajo de investigación.

Un agradecimiento a los trabajadores de la estación Don Rosendo y don Ernesto por colabórame en el manejo de los animales gracias.

A mis amiga y hermana del alma incondicional J. Soledad Ayala por ser la persona y mi motor que me impulso para seguir en la búsqueda de realizarme como profesional con quien compartí momentos de alegrías, tristeza de desfallecimiento, agotamiento, consejos y compañía que me dieron la fortaleza y aliento para seguir adelante.

Mil gracias a todos de corazón….

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCION 1
1.1. Antecedentes 2
1.2. Planteamiento del problema.....3
1.3. Justificación 3
2. OBJETIVOS 4
2.1. Objetivo general 4
2.2. Objetivos específicos……..4
3. REVISION BIBLIOGRÁFICA……5
3.1. Generalidades de ovinos.....5
3.2. Raza Corriedale 6
3.3. Aspectos generales reproductivos del carnero 6
3.3.1. Características reproductivas del carnero……7
3.3.2. Factores que influyen en la producción de espermatozoides……7
3.3.2.1. Edad 7
3.3.2.2. Tamaño de los testículos 8
3.3.2.3. Raza 8
3.3.2.4. Estación reproductiva 9
3.3.2.5. Nutrición……10
3.3.2.6. Sanidad……10
3.4. Aparato reproductor del carnero 10
3.4.1. Testículo, escroto y epidídimo……11
3.4.2. El epidídimo……11
3.4.3. Conductos deferentes y glándulas anexas……11
3.4.4. Pene y prepucio……11
3.5. El espermatozoide 12
3.5.1. Células espermáticas……13
3.5.2. Estructura del espermatozoide……13
3.5.2.1. Cabeza. 13
3.5.2.2. Acrosoma.....14

3.5.2.3. Cola (flagelo)……14
3.5.2.4. Anomalías……16
3.6. Características seminales del carnero……..17
3.6.1. Características del plasma……17
3.7. Espermatogénesis……...18
3.7.1. Espermiogénesis 20
3.8. El espermatozoide de carnero……21
3.8.1. Metabolismo de los espermatozoides……22
3.8.2. Definición de semen……...22
3.8.3. Métodos de colecta de semen……22
3.8.3.1. Método de vagina artificial.....22
3.8.3.2. Método de electro eyaculación.....24
3.9. Evaluación del semen 25
3.9.1. Evaluación macroscópica……25
3.9.1.1. Volumen 25
3.9.1.2. Color y olor 25
3.9.1.3. pH 26
3.9.2. Evaluación microscópica……..27
3.9.2.1. Motilidad masal.....27
3.9.2.2. Motilidad individual.....27
3.9.2.3. Vitalidad espermática.....28
3.9.2.4. Morfología espermática.....30
3.9.3. Dilutores comerciales para el congelamiento de semen……..33
3.9.3.1. Dilutor OPTIXcell 2 34
3.9.3.2. Dilutor Andromed® 34
3.9.3.3. Dilutor Steridyl 35
3.9.4. Dilución del semen……35
3.9.4.1. Equilibramiento 35
3.9.4.2. Envasado.....36
3.9.4.3. Congelamiento.....36
3.9.4.4. Almacenamiento de semen.....37

3.10. Análisis económico……..37
3.10.1. Costos de producción……37
3.10.2. Costos fijos……38
3.10.3. Costos variables……...38
3.10.4. Costo total……38
3.10.5. Beneficio / costo……..38
4. LOCALIZACION 39
4.1. Ubicación geográfica 39
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....40
5.1. Materiales 40
5.1.2. Material biológico……..40
5.1.3. Material de campo para colecta de semen……40
5.1.4. Materiales de laboratorio……..41
5.1.5. Material químico-reactivos……...41
5.1.6. Material de escritorio……41
5.2. Metodología.....42
5.2.1. Procedimiento pre-experimental……43
5.2.1.1. Selección de animales 43
5.2.1.2. Entrenamiento 44
5.2.1.3. Preparación de la vagina artificial 45
5.2.1.4. Preparación del carnero, extracción y manejo del semen 45
5.2.2. Procedimiento experimental en laboratorio……46
5.2.3. Análisis del semen fresco colectado……...46
5.2.4. Características macroscópicas……46
5.2.4.1. Volumen 46
5.2.4.2. Color o tonalidad 47
5.2.4.3. Olor 47
5.2.4.4. pH.....47
5.2.5. Características microscópicas……48
5.2.5.1. Motilidad masal.....48
5.2.5.2. Motilidad individual.....49

5.2.6. Preparación de los dilutores……50
5.2.7. Dilución del semen……50
5.2.7.1. Periodo de adaptación y equilibramiento 51
5.2.7.2. Rotulado de pajuelas 51
5.2.7.3. Envasado del semen en pajuelas 52
5.2.7.4. Congelado de pajuelas 52
5.2.7.5. Almacenamiento de pajuelas……...53
5.2.7.6. Descongelación de las pajuelas 53
5.2.8. Análisis del semen post descongelado……...54
5.2.8.1. Motilidad individual post descongelado.....54
5.2.8.2. Vitalidad espermática……55
5.2.8.3. Morfología espermática……55
5.3. Diseño experimental y análisis estadístico 57
5.3.1. Modelo estadístico……57
5.3.2. Tratamientos……...58
5.3.3. Variables de respuesta estudiadas……...58
5.3.5. Tratamientos……...59
5.3.6. Variables de respuesta estudiadas……59
5.4. Análisis económico 60
5.4.1. Determinación de costos……...60
5.4.2. Determinación del costo total……...60
5.4.3. Determinación de costos de producción……60
5.4.4. Determinación del ingreso o beneficio bruto……61
6. RESULTADOS Y DISCUSION.....62
6.1. Características macroscópicas y microscópicas en semen fresco 62
6.1.1. Volumen de semen fresco……62
6.1.2. pH de semen fresco……...63
6.1.3. Motilidad masal de semen fresco……...65
6.2. Características microscópicas de semen de ovino sometido a dilusión y post descongelación. 67
6.2.1. Motilidad individual en semen diluido por dilutores……..67

6.2.2. Motilidad individual en semen diluido dilutor por edad……69
6.2.3. Motilidad individual en semen diluido por edad……70
6.2.4. Motilidad individual en semen post descongelado por dilutores……72
6.2.5. Motilidad individual de semen post descongelado por edad……...74
6.3. Vitalidad espermática.....75
6.3.1. Vitalidad espermática en semen post descongelado por dilutores……..75
6.3.2. Vitalidad espermática en semen post descongeladom dilutor por edad….78
6.3.3. Mortalidad espermática en semen post descongelado por dilutores…….79
6.3.4. Mortalidad espermática en semen post descongelado dilutor por edad....81
6.4. Morfología espermática……...82
6.4.1. Morfología espermatica normal en semen post descongelado……82
6.4.2. Morfologia espermatica anormal en semen post descongelado……84
6.5. Análisis económico de costos estimados en la producción de pajuelas de semen de ovino criopreservado con el uso de diferentes dilutores comerciales…..88
6.5.1. Beneficio bruto……88
6.5.2. Beneficio neto……89
6.5.3. Beneficio / costo……89
7. CONCLUSIONES 91
8. RECOMENDACIONES 92
9. BIBLIOGRAFÍA 93
10. ANEXOS…… 109

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores promedios del semen ovino según diferentes autores 21

Tabla 2. Valoración del semen de carnero mediante la consistencia 26

Tabla 3. Clasificación de la onda de movimiento de los espermatozoides 28

Tabla 4. Calificación de movimiento en masa 48

Tabla 5. Calificación de Motilidad Individual 49

Tabla 6. Prueba de "t" Student para el volumen en semen fresco por edad de carnero 62

Tabla 7. Prueba de "t" Student para el pH en semen fresco por edad de carnero 63

Tabla 8. Prueba de "t" Student para motilidad masal en semen fresco por edad de carnero 65

Tabla 9. Análisis de la motilidad individual en semen diluido antes del congelamiento 67

Tabla 10. Análisis de la motilidad individual en semen diluido antes del congelamiento 69

Tabla 11. Análisis de la motilidad individual en semen diluido antes del congelamiento 71

Tabla 12. Análisis de la motilidad individual en semen post descongelado.....72

Tabla 13. Análisis de la motilidad individual en semen post descongelado dilutor por edad.....74

Tabla 14. Análisis de vitalidad espermática en semen post descongelado 76

Tabla 15. Análisis de vitalidad espermatica en semen post descongelado 78

Tabla 16. Análisis de mortalidad espermática en semen post descongelado 79

Tabla 17. Análisis de mortalidad espermática en semen post descongelado.....81

Tabla 18. Análisis de espermatozoides normales en semen post descongelado.....82

Tabla 19. Porcentaje de espermatozoides normales en semen post descongelado por dilutor.....83

Tabla 20. Porcentaje de espermatozoides normales dilutor por edad.....83

Tabla 21. Análisis de espermatozoides anormales post descongelado por dilutor y edad.....84

Tabla 22. Porcentaje de espermatozoides anormales en semen post descongelado por dilutores.....84

Tabla 23. Porcentaje de espermatozoides anormales en semen post descongelado dilutor por edad. 85

Tabla 24. Costos de producción estimados de pajuelas de semen de ovino criopreservadas…….. 88

Tabla 25. Estimación de ingresos por el procesamiento de semen de carnero 89

Tabla 26. Análisis del beneficio neto 89

Tabla 27. Análisis parcial de beneficio /costo 89

Tabla 28. Estimación de costos variables para la producción de pajuelas criopreservadas de semen de ovino en Bs……121

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación taxonómica de los ovinos (ascendencia del género *Ovis)*……5

Figura 2. Aparato reproductor del carnero……...12

Figura 3. Esquema de las regiones (a) estructura (b) espermatozoide de mamífero ……15

Figura 4. Características morfológicas de los espermatozoides normales y anormales ……16

Figura 5. Espermatogénesis para su estudio se divide en tres fases basadas en consideraciones funcionales. 18

Figura 6. Espermiogénesis en mamífero. 19

Figura 7. Espermatozoides normales y algunas formas anormales. 32

Figura 8. Ubicación geográfica del área de investigación, Estación Experimental de Choquenaira. 39

Figura 9. Protocolo de recolección, enfriamiento dilución envasado y congelamiento de semen de carnero 42

Figura 10. Palpación y medición de los testículos del carnero con un escrotimetro ……43

Figura 11. Carneros de raza Corriedale 44

Figura 12. Semen colectado de carnero 46

Figura 13. Almacenamiento del semen congelado 53

Figura 14. Espermatozoides de carnero teñidos con la coloración negrosina-eocina ……56

Figura 15. Comparación de medias “t” student para volumen en semen fresco.....62

Figura 16. Comparación de medias “t” student para pH en semen fresco de carneros ……64

Figura 17. Comparación de medias “t” student para motilidad masal en semen fresco ……66

Figura 18. Motilidad individual espermática del semen de ovino antes del congelamiento por dilutores……..68

Figura 19. Motilidad individual espermática del semen antes del congelamiento dilutor por carnero……...70

Figura 20. Motilidad individual espermática antes del congelamiento por edad……..71

Figura 21. Motilidad individual del semen post descongelado por dilutores……73

Figura 22. Motilidad individual espermática del semen después del congelamiento dilutor por carnero……...75

Figura 23. Porcentaje de espermatozoides vivos en semen después del congelamiento por dilutor……..76

Figura 24. Porcentaje de espermatozoides vivos del semen después del congelamiento dilutor por carnero……78

Figura 25. Porcentaje de espermatozoides muertos del semen después del congelamiento por dilutor. 80

Figura 26. Porcentaje de espermatozoides muertos del semen después del congelamiento dilutor por carnero……81

Figura 27. Porcentaje general de las anormalidades descritas y observadas en las muestras de semen de ovino post descongelado……..87

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Equipos de laboratorio 102
Anexo 2. Materiales de laboratorio y reactivos.....103
Anexo 3. Ficha de evaluación de genitales externos 104
Anexo 4. Selección de los Carneros 105
Anexo 5. Evaluación de genitales externos.....105
Anexo 6. Colecta y Evaluación del semen fresco de carnero (ovino) 106
Anexo 7. Evaluación Microscópica del semen carnero 107
Anexo 8. Preparación de los dilutores y evaluación post-descongelamiento.....108
Anexo 9. Tincion de eosina - nigrosina % de Morfologia y Vitalidad 109
Anexo 10. Anormalidades espermaticas (primarias y secundarias) encontradas en el semen de carnero 110
Anexo 11. Datos obtenidos en laboratorio de las características macroscópicas y microscópicas 118
Anexo 12. Datos obtenidos en laboratorio de las características macro y microscópicas 119
Anexo 13. Insumos y reactivos.....121
Anexo 14. Depreciación de equipos de laboratorio.....122
Anexo 15. Costo de material semoviente.....122
Anexo 16. Cálculo de ingresos obtenidos por pajuela.....122

RESUMEN

El presente estudio se llevó a cabo en el laboratorio de la Estación Experimental Choquenaira perteneciente a la Facultad de Agronomía UMSA, con el objetivo de evaluar tres dilutores comerciales Optixcell, Steridyl y Andromed en el procesamiento de congelación de semen de ovino (*Ovis aries*), y su influencia sobre las características macro y microscópicas con respecto a la edad, y la respuesta sobre la motilidad espermática del semen ovino post-descongelación para su criopreservación. Se utilizaron dos reproductores de la raza Corriedale de edades 1,5 y 3,5 años. Se evaluó las características seminales de 5 eyaculados de cada carnero. Los resultados indican que las características macroscópicas para volumen del eyaculado entre edades no hubo diferencia significativa (P>0.05) obteniendo un volumen de 1,78 - 1,76 ml. Para el pH las edades no presentaron diferencias significativas (P>0,05) presentando 6.8 - 6.7 de pH para cada carnero, el color presentó homogeneidad al blanco-cremoso. La motilidad masal fue de 5 para el carnero de 3.5 años y 4 para el carnero de 1,5 con un porcentaje de 85 a 90% muy bueno. La motilidad individual a la dilusión presento una alta significancia (P<0.01), las edades mostraron significancia (P>0.05) en la motilidad individual en dilusión con un 86,6% para Optixcell, 85.3% Steridyl y 78,6% para Andromed. La evaluación post-descongelación en la motilidad individual presentarón diferencias significativas (P<0.05) con motilidades de 66,8% para Optixcell 60,7% para Steridyl y 53.1% Andromed, sin embargo, los tratamientos no influyeron en las edades de los carneros (P>0.05). La vitalidad espermática post-descongelado mostro significancia (P<0.05), espermatozoides vivos para Steridyl 83,8%, Optixcell 83.2% y Andromed con 76,2%, mas no influyeron en las edades de los carneros (P>0.05). La evaluación morfológica de espermatozoides normales no mostro significancia entre tratamientos (P>0.05) donde Steridyl alcanzo un 92,2%, Optixcell 90.6% y para Andromed 88.9%, no influyendo en la edad de los carneros (P>0.05). No se encontró significancia (P>0.05) en las anormalidades espermáticas Steridyl con 7.8% para Andromed 8.7% y para Optixcell 9%. La estimación de costos de producción por dosis seminal determinó que entre los dilutores usados como tratamientos el más rentables con un beneficio/costo de 1.11 Bs es Optixcell.

Palabras claves: Dilutores, criopreservación, semen, ovino, carnero.

SUMMARY

The present study was carried out in the laboratory of the Choquenaira Experimental Station belonging to the Faculty of Agronomy UMSA, with the objective of evaluating three commercial dilutors Optixcell, Steridyl and Andromed in the freezing processing of ovine semen (Ovis aries), and their influence on the macro and microscopic characteristics with respect to age, and the response on sperm motility of post-thawed ovine semen for cryopreservation. Two Corriedale breeders aged 1.5 and 3.5 years were used. Seminal characteristics of 5 ejaculates from each ram were evaluated. The results indicate that the macroscopic characteristics for ejaculate volume between ages showed no significant difference ($P>0.05$), obtaining a volume of 1.78 - 1.76 ml. For pH, the ages did not present significant differences ($P>0.05$) presenting 6.8 - 6.7 pH for each ram, the color presented homogeneity to creamy-white. Mass motility was 5 for the 3.5 year old ram and 4 for the 1.5 year old ram with a percentage of 85 to 90% very good. Individual motility at dilution showed high significance ($P<0.01$), ages showed significance ($P>0.05$) in individual motility at dilution with 86.6% for Optixcell, 85.3% Steridyl and 78.6% for Andromed. Post-thaw evaluation of individual motility showed significant differences ($P<0.05$) with motilities of 66.8% for Optixcell 60.7% for Steridyl and 53.1% Andromed, however, treatments did not influence ram ages ($P>0.05$). Post-thaw sperm vitality showed significance ($P<0.05$), live sperm for Steridyl 83.8%, Optixcell 83.2% and Andromed with 76.2%, but did not influence ram ages ($P>0.05$). The morphological evaluation of normal spermatozoa showed no significance between treatments ($P>0.05$) where Steridyl reached 92.2%, Optixcell 90.6% and for Andromed 88.9%, not influencing the age of the rams ($P>0.05$). No significance ($P>0.05$) was found in sperm abnormalities Steridyl with 7.8% for Andromed 8.7% and for Optixcell 9%. The estimation of production costs per seminal dose determined that among the dilutors used as treatments, the most profitable with a benefit/cost of 1.11 Bs was Optixcell.

Key words: Diluters, cryopreservation, semen, sheep, ram.

1. INTRODUCCION

En Bolivia, los ovinos son parte importante de los sistemas de producción ganadera, en el altiplano, zonas montañosas altas y en los valles interandinos. La crianza de ovinos es una actividad común de la mayoría de las familias rurales del altiplano y valles, alrededor de 350.900 y 215.000 familias. Se estima que el 83% de los aproximadamente 8 millones de ovinos en Bolivia ocupa regiones mayores a 3000 msnm, el 12% la región de los valles interandinos a 3000 msnm y el restante 5% se encuentra en las llanuras bajas de 150 a 1500 msnm. (Delgado y Nogales, 2009).

Existe un alto interés económico en el ovino como fuente de carne y leche en el país, lo que ha llevado a impulsar el mejoramiento genético del ganado mediante estrategias de selección o cruzamiento con razas de características productivas, además de mejorar su alimentación. En el ganado ovino, la criopreservación del semen y la inseminación artificial (I.A.) son técnicas reproductivas que representan indudables ventajas, utilizadas para conseguir un rápido progreso genético. Sin embargo, la inseminación artificial con semen congelado aún enfrenta desafíos debido a la baja tasa de fertilidad en ovinos y esto puede ser prevenido mediante el uso de un dilutor adecuado (Aisen *et al*., 2000).

En este contexto, resulta crucial buscar alternativas para prevenir daños en los espermatozoides durante la criopreservación y así lograr tasas de fertilidad óptimas en ovejas sometidas a inseminación artificial. Los daños causados durante el proceso de criopreservación pueden evitarse controlando la velocidad de congelamiento y el uso de dilutores que posean una capacidad crioprotectora efectiva. El éxito de esta tecnología depende tanto de la calidad seminal como de la identificación del mejor dilutor con capacidades crioprotectoras durante las etapas de congelación y descongelación en el laboratorio.

Para alcanzar la criopreservación exitosa del semen, es esencial realizar un diagnóstico seminal preciso y evaluar cuidadosamente los dilutores con diferentes componentes. De esta manera, será posible mantener las características deseables perpetuando la genética de los reproductores seleccionados a través de la inseminación artificial (Aisen *et al.,* 2000).

1.1. Antecedentes

Pillajos (2015), en su trabajo de Evaluación de la viabilidad, motilidad y cambios de morfología espermática post-descongelación de semen ovino de dos razas (Poll dorset y Corriedale) empleando tres tipos de diluyentes comerciales, cuyo objetivo fue demostrar la importancia de utilizar crioprotectores (diluyentes) espermáticos para la crio-conservación de semen ovino. Obteniendo resultados viables al momento de realizar el análisis de post-descongelación para su respectiva crio-conservación. Los resultados estadísticos de este estudio demostraron que, si existieron diferencias significativas entre tratamientos, al momento de realizar el análisis de post descongelación valorando sus variables (viabilidad, motilidad y cambios morfológicos mediante el test de Endosmosis). En este estudio se emplearon tres diluyentes Andromed, Triladyl y Optixcell, se realizó el análisis macroscópico y microscópico, también se determinó la existencia de cambios morfológicos de la membrana plasmática.

Ramos (2011), indica en su trabajo Efecto de dilutores y dos tiempos de equilibrio en la criopreservación de semen ovino (Ovis aries) en la estación experimental de Choquenaira que tuvo como objetivo estudiar el efecto de la edad del carnero en las características macro-microscópicas, así mismo evaluar tres dilutores en dos tiempos de equilibrio al descongelamiento, sobre la motilidad espermática del semen ovino, donde los dilutores tuvieron una influencia significativa en la motilidad progresiva, durante los procesos de dilución del semen fresco con 67.67% para T-G-YH, 65.17% C-YH y 64.50% para Triladyl respectivamente; igualmente, la motilidad espermática estuvo influenciada significativamente por los tiempos de equilibrio con 68.22% para 4 horas y 63.33% para 8 horas. Las diferencias entre edades de los carneros, no influyeron en la motilidad espermática del semen post-descongelado, en cambio, los dilutores presentaron diferencias significativas con motilidades de 51.17% para T-G-YH, 44.17% para Triladyl y 40.83% para C-Y; asimismo se obtuvo diferencias significativas para tiempos de equilibrio, con motilidades de 47.22% para 4 horas y 43.56% para 8 horas.

1.2. Planteamiento del problema

El desarrollo biotecnológico reproductivo ovino en Bolivia, no se ha difundido ni desarrollado debido a varios factores. Uno de ellos es la falta de capacitación de profesionales en el área, lo que ha impedido la implementación de programas de Inseminación Artificial a Tiempo Fijo (I.A.T.F) por parte de empresas privadas o públicas. En consecuencia, el semen de ovino no se comercializa como en otras especies, más claro ejemplo el bovino. Como resultado, no existen dilutores establecidos en el país para la crio-conservación de semen de ovino que sean altamente confiables, lo que representa una gran debilidad para el desarrollo integral de este tipo de explotación.

1.3. Justificación

La presente investigación tiene como justificación la posibilidad de identificar entre tres dilutores comerciales la que mejor capacidad de criopreservación posee durante los procesos de congelación y descongelación de semen de ovino. Para ello se procederá a realizar el análisis post descongelación, donde se evaluará la motilidad, vitalidad y morfología espermática del semen que será criopreservado, con el fin de poder obtener datos para poder establecer un banco de semen y potencializar el mejoramiento genético de los hatos ovinos, incentivando así a los ganaderos ovinos al uso de la biotecnología en esta especie.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

- Evaluar tres dilutores comerciales Optixcell, Andromed y Steridyl sobre el procesamiento de semen de ovinos Corriedale *(Ovis aries)* en la Estación Experimental de Choquenaira.

2.2. Objetivos específicos

- Comparar el efecto de la edad del carnero en las características macroscópicas y microscópicas del semen fresco de ovino.
- Evaluar el efecto de los dilutores comerciales Optixcell, Andromed y Steridyl sobre la motilidad individual en etapa de dilusión y de post descongelación en semen de ovino.
- Evaluar la vitalidad y morfología espermática de tres dilutores comerciales en la etapa de post descongelación del semen de ovino, en relación a la edad.
- Realizar una estimación de beneficio/costo por pajuela de semen de ovino congelado.

3. REVISION BIBLIOGRÁFICA

3.1. Generalidades de ovinos

Los ovinos son mamíferos herbívoros que pertenece a un único género (Ovis) y se encuentra en estado salvaje o domesticado. Son animales del Orden Artiodáctilos (con extremidades acabadas en pezuñas con dedos pares) y de la Clase Rumiantes. Se caracterizan por carecer de incisivos superiores, rumiar el alimento y tener un estómago formado por cuatro cámaras (Mujica, 2005).

Algunas razas tienen cuernos no ramificados permanentes (no se mudan); los del macho suelen ser robustos, curvados y en espiral, mientras que los de la hembra son cortos y menos curvados. La alzada promedio es de 70 cm y el peso oscila entre 45 y 80 kg (Mujica, 2005). Suelen ser de temperamento dócil y con un marcado instinto gregario, en su mayoría de reproducción estacional y por lo general tiene una o dos crías por parto (Erzu, 2003).

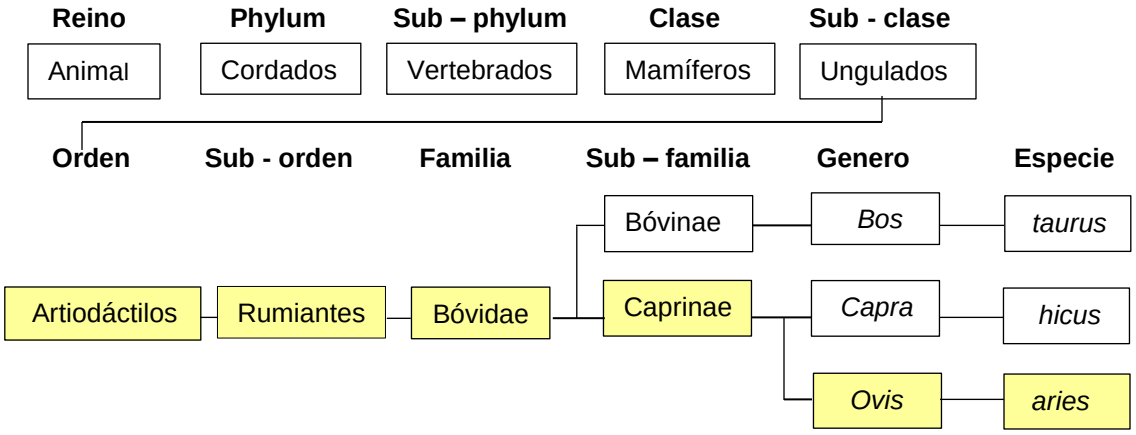


Figura 1. Clasificación taxonómica de los ovinos (ascendencia del género *Ovis).*

Fuente: Erzu (2003)

Los ovinos domésticos han desempeñado un papel muy importante para la especie humana que ha aprovechado su cuero y su lana para confeccionar prendas de vestir; la carne, para alimentarse; y su leche, para el consumo directo y la producción de queso, que constituyen igualmente una fuente importante de alimentación para el humano (Mujica, 2005).

3.2. Raza Corriedale

La raza Corriedale desarrollada en Nueva Zelanda a fines del siglo XVIII, a través de la cruza de carneros Lincoln y, en menor grado, carneros Leicester, con hembras Merino. Por consanguinidad y cuidadosa selección se estabilizó un tipo uniforme, con rendimiento equilibrado de carne y lana. El nombre lo recibió del establecimiento Corriedale en Otago, Nueva Zelanda, donde se realizó el cruzamiento experimental, primeramente, por el criador James Little, distribuida mundialmente, se estima que ocupa el segundo lugar en existencia, luego de la raza Merino (Mujica, 2005).

Es una raza predominante, se cría de preferencia en la zona austral adaptándose muy bien al clima frío y alimentación de baja calidad. Corresponde a una raza de grosor medio, con corderos precoces y capones de peso medio. acepta muy bien la explotación extensiva. Son buenos para la cría extensiva y su capacidad de adaptación hace que también puedan ser criados en la zona central. (González y Tapia, 2017).

Al ser una raza sintética de doble propósito, su tamaño puede variar de mediano a grande, sin cuernos y con una buena calidad de carcasa; Posee mucosas visibles la cara, orejas y patas están cubiertas de vellón blanco semi compacto, mecha cuadrada. Se las prefiere con la cara descubierta, porque se ha demostrado que los animales de cara destapada presentan mejores tasas de crecimiento y de fertilidad (Mujica, 2005). El peso adulto de un carnero fluctúa entre 80 y 130 kg, presentando las hembras un peso promedio mucho menor y que varía entre los 60 y 80 kg (Gonzalez y Tapia, 2017).

3.3. Aspectos generales reproductivos del carnero

Los ovinos al ser poliestruales son capaces de captar los cambios en los fotoperiodos, a través de la retina donde la señal fotónica se transforma en señal nerviosa y esta se transforma en una señal hormonal: la hormona melatonina. El sistema de horas luz, se expresa como cambios en la secreción de esta hormona, encontrándose los niveles más altos durante el periodo de oscuridad y los más bajos en las horas de luz. La melatonina es el punto final del trayecto neural que se inicia en la retina, y es a su vez, el punto de trayecto hormonal que determina la modificación de la pulsatilidad de la GnRH y por lo tanto las hormonas que regulan la reproducción. Cuando se aplica un

fotoperiodo constante en carneros se observan cambios cíclicos en las concentraciones de las hormonas reproductivas y del volumen testicular (Perez-Clariget y Almeraya, 2008).

3.3.1. Características reproductivas del carnero

Según Perez-Clariget y Almeraya (2008), la pubertad del macho se define como la edad en la que ocurren cambios visibles relacionados con la reproducción y el desarrollo sexual. Estos cambios incluyen la pérdida de la adherencia prepucial, permitiendo el desplazamiento del pene y los procesos asociados con el crecimiento testicular y la producción de espermatozoides. La espermatogénesis si bien puede variar entre razas, se produce entre los 2 y 3 meses de edad independientemente de la época del nacimiento. Sin embargo, la aparición de los espermatozoides en el eyaculado se demora, hasta los 6 meses. La calidad del porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales es muy baja inicialmente y progresa paulatinamente con la edad (Perez-Clariget y Almeraya, 2008).

La primera cópula con eyaculación de espermatozoides viables en los carneros generalmente ocurre entre los 4 y 6 meses de edad, momento en el que alcanzan un 40 a 60 % del peso del animal adulto. Al igual que en el bovino y caprino, la madurez sexual se correlaciona mejor con el peso corporal que con la edad. Sin embargo, la producción de semen de un carnero adulto no se alcanza hasta que los testículos pesen alrededor de 100 g (Garner y Hafez, 2000).

3.3.2. Factores que influyen en la producción de espermatozoides

3.3.2.1. Edad

En el carnero, la pubertad se asocia a un notable incremento en la secreción de testosterona, la espermatogénesis y conducta de apareamiento. El tamaño testicular aumenta cuando los corderos tienen 8 a 10 semanas de edad y peso corporal de 16 a 20 kg. Esto coincide con la aparición de espermatocitos primarios y el crecimiento de los túbulos seminíferos (Jainudeen y Wahid, 2000).

Un animal joven no tendrá las mismas características físicas, seminales y conductuales que un animal adulto. Los ovinos alcanzan la pubertad aproximadamente a los 6-7 meses de edad, con un peso entre 25 y 35 kg, a esa edad pueden presentar eyaculados con poca concentración y un alto porcentaje de anomalías espermáticas. La diferencia entre la CE entre los animales jóvenes y adultos se puede explicar en parte a la diferencia en la talla y el peso corporal entre los animales. Diversos investigadores han demostrado que el peso de los animales esta correlacionado positivamente con la CE A mayor peso corporal, mayor CE (Aké-Villanueva *et al*., 2017).

3.3.2.2. Tamaño de los testículos

El tamaño testicular se incrementa notablemente desde la aparición de los primeros espermatozoides hasta alcanzar la madures sexual durante tal periodo los testículos duplican su tamaño. La velocidad del crecimiento testicular durante y posterior a la pubertad es mayor que el crecimiento corporal. El crecimiento testicular se acompaña con un incremento del volumen y la concentración espermática, aunque existen variaciones condicionadas por la alimentación y por la estación del año en la que nacen los corderos (Galina y Valencia, 2008).

Aisen (2004), indica que con la ayuda de una cinta métrica se puede determinar el perímetro que presenta el escroto (y su contenido) en su diámetro horizontal. Su medición permite inferir el volumen testicular y así la producción de espermatozoides. En machos de la raza Merino presenta una correlación 0.68 - 0.78 con el fotoperiodo. En machos Corridale se correlaciona significativamente con el diámetro de los túbulos seminíferos, pero no se observa relación con la conducta sexual ni con la secreción de testosterona.

3.3.2.3. Raza

En los ovinos pueden existir variaciones importantes debido al tipo racial de los animales, investigaciones reportan que la circunferencia escrotal es menor en machos Pelibuey, que l en razas lanares como la Suffolk, Rambouillet y Dorset (Aké-Villanueva *et al*., 2017).

El carnero reproductor es parte fundamental del proceso reproductivo y entre razas presentan diferencias en cuanto a sus características seminales, las mismas que deben conocerse adecuadamente para decidir la mejor utilización ya sea en fresco, refrigeración o congelamiento (Condori y Kantuta, 2021).

3.3.2.4. Estación reproductiva

La estación reproductiva de los carneros está controlada por el fotoperiodo las razas de zonas frías y templadas son estrictamente fotoperiódicas, la estación sexual de los carneros abarca de principios del otoño a finales del invierno, la estacionalidad reproductiva está dada principalmente por la duración del fotoperiodo; en regiones cercanas al ecuador, las variaciones en el fotoperiodo son menores, por lo que la raza, las condiciones ambientales (lluvias, temperatura, humedad) y la disponibilidad de alimento son los principales factores que determinan la actividad sexual de las razas (Aké-Villanueva *et al*., 2017).

Según Perez-Clariget y Almeraya (2008), en el carnero las variaciones estacionales de la actividad reproductiva no son tan marcadas como de la oveja. En estudios publicados sobre el tema indican que la producción espermática se mantiene a lo largo del año dependiendo de la raza y el lugar donde se encuentren los animales. la capacidad reproductiva de los carneros y el tamaño testicular, lo que puede condicionar los programas de reproducción fuera de estación y de producción de semen congelado.

En el macho, el fotoperiodo regula la pulsatilidad de la GnRH y la LH, la secreción de la FSH, la respuesta de la adenohipófisis a la GnRH y la respuesta testicular de las células de Leydig a la LH, por lo tanto, es responsable del volumen testicular y la secreción de testosterona. a nivel testicular se producen cambios que explican las variaciones en el volumen de los testículos tales como en el tamaño de los túbulos seminíferos y cambios sobre las células de Sertoli. Existen importantes aspectos del mecanismo por el cual las horas luz regulan la estacionalidad reproductiva (Perez-Clariget y Almeraya, 2008).

3.3.2.5. Nutrición

Los carneros mejor alimentados presentan una mejor eficiencia testicular produciendo más espermatozoides por gramo de testículo, por lo que es una medida de manejo para lograr el mejor uso de los carneros. Las señales nutricionales y metabólicas que influyen en el crecimiento testicular no son bien conocidas, desde hace tiempo se sabe que, para lograr un desarrollo pleno de los testículos, se requiere un balance apropiado entre el nivel de energía y de proteína de la dieta. Sin embargo, el crecimiento testicular parece ser más dependiente de la energía metabolizable que del contenido en proteína cruda de la dieta (Galina y Valencia, 2008).

3.3.2.6. Sanidad

Todas las enfermedades febriles, en función del aumento de la temperatura, alteran visiblemente la espermatogénesis y en casos extremos (aftosa, por ejemplo) pueden provocar la esterilidad. Las parasitosis externas y/o internas, según sea la cantidad de ellas, también influyen negativamente (Duran del Campo, 1993).

Se debe hacer un estudio detallado del aparato genital del macho debido a las lesiones testiculares que puedan producirse esto incluye la inspección de la bolsa escrotal y la palpación de los testículos evaluando (la forma, tamaño, posición, consistencia, simetría, movilidad, sensibilidad y tono) junto a una evaluación más profunda de los (epidídimos, cordón espermático, ganglios linfáticos regionales, la inspección y palpación del pene, etc.) Las lesiones testiculares más graves y frecuentes como. La Epididimitis, orquitis, orquioepididimitis y atrofia degenerativa seminal son afecciones en su mayoría son como consecuencia de infecciones por diversos patógenos luego de un trauma, en carneros las epididimitis son relativamente más frecuentes y pueden producir subfertilidad o infertilidad lo que conlleva negativamente sobre la calidad del semen (Delgadillo, 2004).

3.4. Aparato reproductor del carnero

El aparato genital del macho está constituido por los testículos, epidídimos, las glándulas accesorias, un sistema de conductos y el pene.

3.4.1. Testículo, escroto y epidídimo

Delgadillo (2004), indica que, la función principal de los testículos es la producción de espermatozoides y andrógenos. Estos descienden durante la vida fetal a un divertículo del abdomen llamado escroto. En la especie ovina es pendular, la piel es delgada y elástica presenta lana y esta provista de glándulas sudoríparas y sebáceas adheridas a la cara interna de la piel se encuentra el dartos. Estructura muscular que da origen al tabique escrotal, el cual divide al escroto en dos bolsas cada una de las cuales contiene un testículo. La túnica vaginal envuelve las gónadas y epidídimos, además de alojar y proteger los testículos, El escroto permite mantenerlos entre 4 – 7 ºC por debajo de la temperatura corporal lo que es indispensable para la espermatogénesis.

3.4.2. El epidídimo

Es un órgano tubular adherido al testículo y se divide en cabeza, cuerpo y cola, La maduración de los espermatozoides, la adquisición de la motilidad y la capacidad de fertilización, se efectúa en la cabeza y el cuerpo mientras que en la cola se almacena las células maduras (Delgadillo, 2004).

3.4.3. Conductos deferentes y glándulas anexas

Los conductos deferentes transportan los espermatozoides desde la cola del epidídimo hasta la porción pelviana de la uretra. El conjunto de las glándulas anexas produce secreciones que contribuyen a la formación de plasma seminal líquido que transporta espermatozoides (Delgadillo, 2004).

3.4.4. Pene y prepucio

De acuerdo con Delgadillo (2004), el pene es el órgano copulatorio. En su parte central se encuentra la uretra por el cual es evacuado el semen y la orina. Durante la excitación sexual del animal. El pene se vuelve rígido debido a la afluencia sanguínea al cuerpo cavernoso, que es parte eréctil de este órgano (Jainudeen *et.al.,* 2000).

El pene tiene una flexura sigmoidea que le permite extenderse durante a copula. Y su extremo libre termina en una porción de tejido esponjoso que rodea a la uretra se expande. Este bulbo está cubierto por el musculo bulboesponjoso estriado. El cuerpo

cavernoso se origina en el arco isquiático. La túnica albugínea una túnica gruesa envuelve los cuerpos cavernosos. En el carnero los espacios vacíos del cuerpo cavernoso del pene son pequeños, excepto en las raíces y en el doble distal de la curvatura sigmoidea (Jainudeen *et.al.,* 2000). El prepucio es una invaginación de la piel que contiene y cubre la porción libre del pene cuando no en erección. El orificio del prepucio es controlado por el músculo craneal.

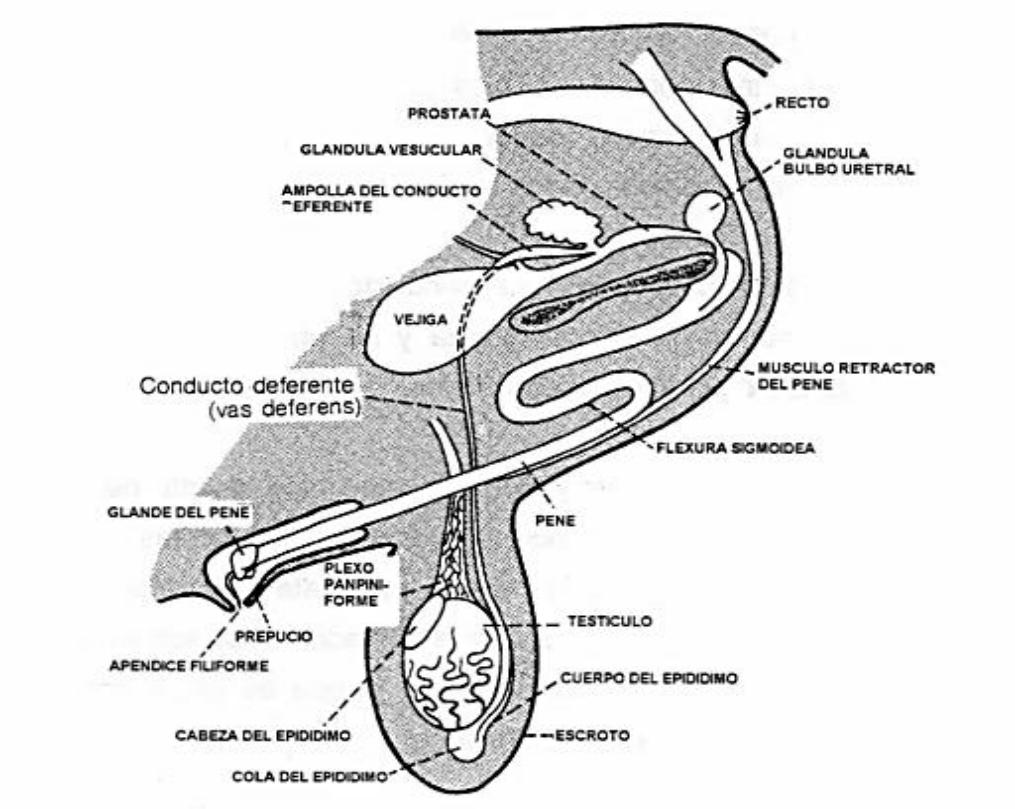


Figura 2. Aparato reproductor del carnero

Fuente: Boletín INIA N° 16 (Latorre, et al., 2000).

3.5. El espermatozoide

Los espermatozoides son gametos masculinos que se producen en los túbulos seminíferos de los testículos. El espermatozoide es una célula altamente especializada que ha evolucionado para cumplir una función biológica compleja, fecundar al oocito, se trata de una célula haploide producto final de la gametogénesis en el macho, portadora de la información genética paterna, las células germinales masculinas reducen el número diploide de cromosomas al comenzar la pubertad, manteniendo los

procesos de división y diferenciación de forma cíclica durante toda la vida. La reducción del número de cromosomas a la mitad necesaria para que tras la fecundación se origine un cigoto diploide, pero además durante la meiosis se produce de entrecruzamiento cromosómico y en consecuencia el intercambio genético lo supone un incremento en la diversidad genética (Castillo, 2012).

3.5.1. Células espermáticas

Los espermatozoides maduros son células alargadas consistentes en una cabeza aplanada portadora del núcleo que contiene el aparato necesario para la motilidad celular. El espermatozoide entero está cubierto por el plasmolema o membrana plasmática. El acrosoma, o casquete acrosómico, es una estructura de doble pared situada entre la membrana plasmática y la porción anterior de la cabeza del espermatozoide. Un cuello une la cabeza del espermatozoide con una cola (flagelo) la cual a su vez se subdivide en los segmentos medio, principal y caudal o terminal (Garner y Hafez, 2000).

3.5.2. Estructura del espermatozoide

3.5.2.1. Cabeza.

La cabeza está constituida esencialmente por el núcleo, recubierto en su parte anterior por el acrosoma, El núcleo se halla formado preferentemente por desoxirribonucleoproteínas y la información genética que lleva el esperma se encuentra codificada en las moléculas de ácido desoxirribonucleico formadas por nucleótidos conteniendo cada uno una molécula de ácido fosfórico, una molécula de azúcar y una molécula de base púrica o pirimidica. Entre las numerosas cualidades hereditarias vehiculadas por el núcleo figura la de determinación de sexo (Derivaux y Gomez, 1976).

La cabeza de los espermatozoides de los mamíferos presenta variaciones importantes en su forma entre las diferentes especies. Así es ovoide y plana en el morueco (carneros) al igual que en el macho cabrío, toro, o verraco; falciforme en un ratón, rata y hámster; y algo aplastada y elipsoide en el hombre. El tamaño de la cabeza también

difiere de forma considerable entre las diferentes especies (Cummins y Woodall, 1985).

3.5.2.2. Acrosoma.

El extremo anterior del núcleo espermático está cubierto por el acrosoma, un delgado saco membranoso de doble capa ubicada sobre el núcleo y que se establece durante las últimas etapas de la formación del espermatozoide (Garner y Hafez, 2000).

La zona acrosómica cubre más de la tercera parte de la cabeza y la sub acrosómica que cubre el resto de la cabeza. La cabeza tiene una longitud de 3 a 8 µm y ancho entre 2 a 4 µm. (Ávalos *et al*., 2018).

El acrosoma es una estructura membranosa situada entre el núcleo y la membrana plasmática, adopta la forma de capuchón. Está envuelto por la membrana acrosómica:

- La porción adherida a la envoltura nuclear por su parte interna es la membrana acrosómica interna
- La membrana plasmática por su parte externa, membrana acrosómica externa (Ávalos *et al*., 2018).

El acrosoma se forma a partir del aparato de Golgi y contiene una gran concentración de hidratos de carbono y enzimas lisosómicas como hialuronidasa hay también una enzima proteolítica llamada acrosina. El papel de estas enzimas en la fecundación es el facilitar el reconocimiento y penetración del espermatozoide a través de las envolturas del ovocito. Para ello es necesario que se produzcan una serie de cambios en el espermatozoide, conocido como capacitación, y que culminan en un proceso de modificación del acrosoma en la llamada reacción acrosómica (López *et.al.*, 2012).

3.5.2.3. Cola (flagelo)

El flagelo o cola comprende cuatro regiones principales, el cuello, la pieza intermedia y los segmentos principales y terminal. Es una zona frágil y estructuralmente compleja en la que se diferencia la pieza de conexión y algunas mitocondrias. Inmediatamente detrás de la cabeza se encuentra la pieza de conexión que estructuralmente se

compone de capítulo, columnas segmentadas, placa basal y centriolo proximal (Castillo, 2012).

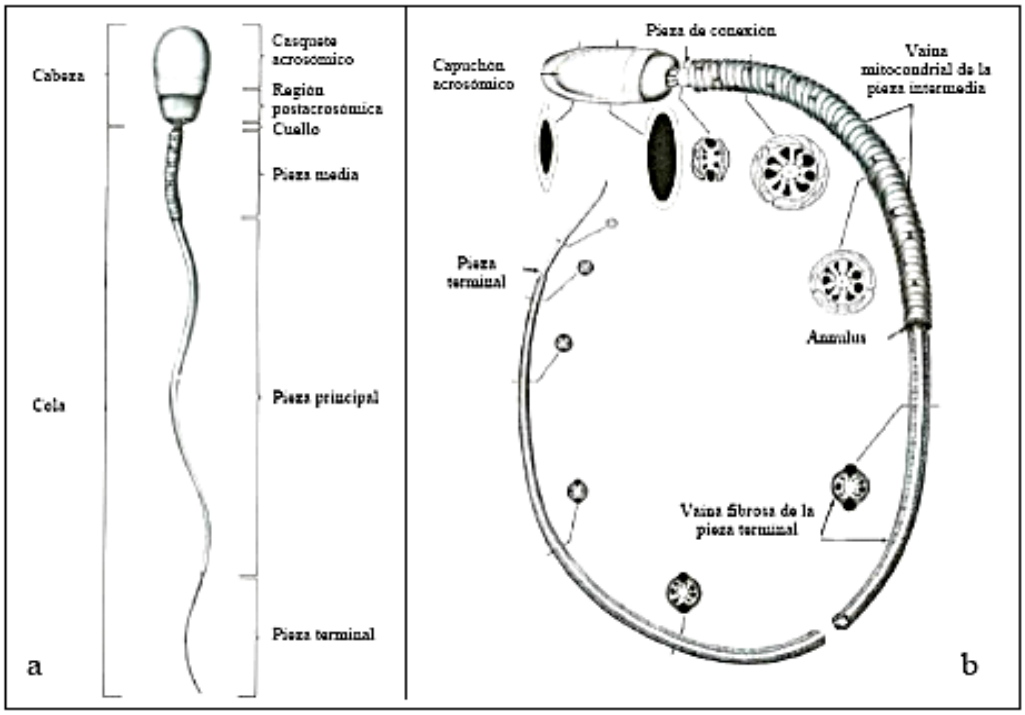


Figura 3. Esquema de las regiones (a) estructura (b) espermatozoide de mamífero

Fuente: (Hafez, 1989; Castillo, 2012)

La primera porción de la cola es la pieza intermedia. Formada por el axonema que está constituido por nueve microtúbulos dobles organizados en un círculo rodeando a un par central y por 9 fibras densas externamente a ellos. El axonema oficia de motor para los movimientos de la cola del espermatozoide, mientras que las fibras densas, le otorgan firmeza (Bedford y Hoskins, 1990).

La porción intermedia se caracteriza por poseer una vaina de mitocondrias organizadas helicoidalmente alrededor de las fibras densas. La longitud de esta vaina mitocondrial depende de la especie y terminan en el annulus, definiendo el comienzo de la pieza principal. La pieza principal se caracteriza por la presencia de una vaina fibrosa integrada por dos columnas continúas unidas entre sí por las llamadas “costillas”, dispuestas circunferencialmente (Bedford. & Hoskins, 1990). Las fibras densas que se encontraban en la pieza intermedia se continúan en esta porción,

excepto dos. Estas fibras densas van adelgazándose progresivamente hacia distal. En la porción terminal de la cola, desaparecen la vaina fibrosa y las fibras densas, quedando constituida solamente por el axonema con los dobletes de microtúbulos desordenados rodeados por la membrana plasmática (Bedford y Hoskins, 1990).

3.5.2.4. Anomalías

Diversos investigadores han descrito una amplia variedad de anomalías morfológicas en los espermatozoides. En general, cualquier desviación de la estructura normal del espermatozoide se considera anormal o una anomalía espermática, para confirmar el potencial de fertilidad de los moruecos (Willians et al., 1934 citado por Castillo, 2012).

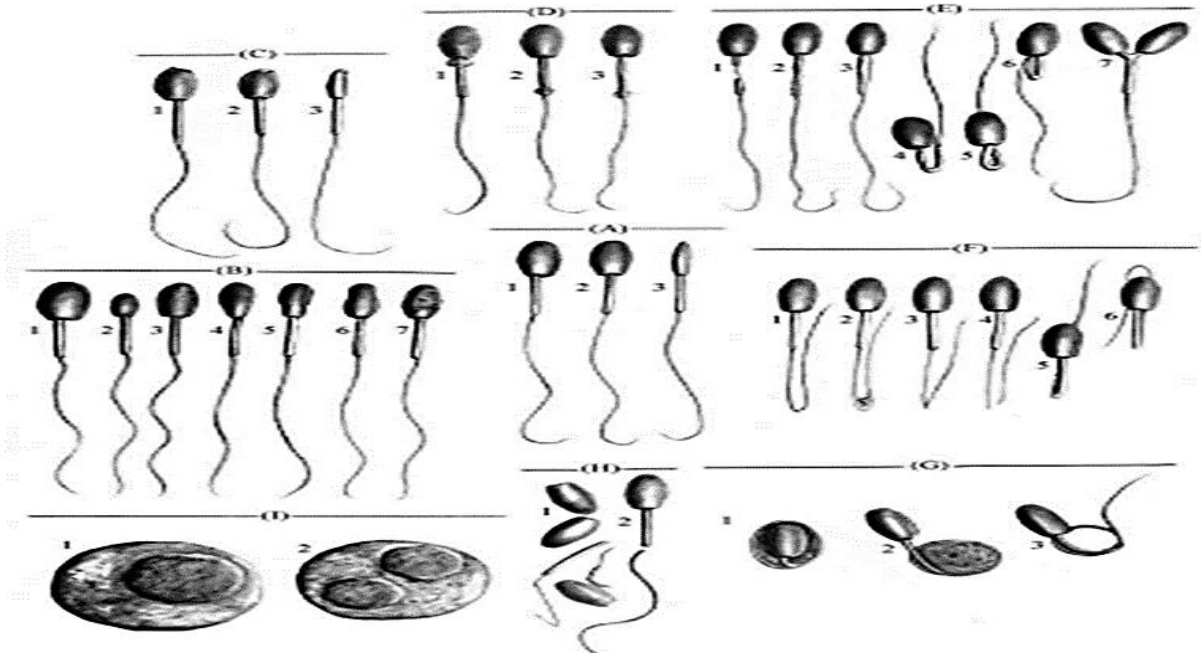


Figura 4. Características morfológicas de los espermatozoides normales y anormales

(Fuente: Varner 2008)

a) Espermatozoides normales (A)

b) Morfología anormal de la cabeza (B)

- macrocefalia (B1)
- microcefálico (B2)
- vacuolas nucleares o defectos de cráter (B3)
- cabeza cónica (B4)
- vaina mitocondrial agrandada (E3)
- pieza intermedia doblada (E4, E5, E6)
- pieza intermedia doble/cabeza doble (E7)

f) Cola doblada o cola de horquilla (F)

- pieza principal doblada (F1–F4)

- cabeza piriforme (B5)
- cabeza de reloj de arena (B6)
- cabeza degenerada (B7)

c) Defectos acrosómicos /acrosoma nudoso/ (C)

d) Gotitas citoplasmáticas proximales (D1),

- gotitas citoplasmáticas distales (D2, D3)

e) Anormalidades de la pieza intermedia (E)

- aplasia segmentaria de la vaina mitocondrial (E1)
- pieza intermedia rugosa debido a la distribución desigual de las mitocondrias/defecto en sacacorchos/ (E2)
- doblez simple que involucra la unión entre la pieza intermedia y la pieza principal /DMR/ (F5)
- doble curvatura que involucra la unión entre la pieza intermedia y la pieza principal (F6)

g) Cola enrollada (G)

h) Espermatozoides fragmentados /cabezas desprendidas o cabezas sin cola/ (H)

i) Células germinales prematuras, espermátidas redondas (I).

Varios investigadores han destacado la importancia de las anormalidades primarias en las células espermáticas, las cuales parecen ser consecuencia de alteraciones en la espermatogénesis (Castillo, 2012). Las formas de células espermáticas alteradas, que probablemente se originan después de que los espermatozoides abandonan los testículos, se clasifican como anormalidades secundarias. Más recientemente, Bloom (1972) propuso una nueva clasificación en defectos mayores y menores de los espermatozoides (Castillo, 2012).

3.6. Características seminales del carnero

3.6.1. Características del plasma

Garner y Háfez (2000), indican que el plasma seminal está compuesto por secreciones de los órganos accesorios (la próstata, glándulas vesiculares y bulbouretrales). Durante la eyaculación, estas secreciones son vertidas hacia la uretra generándose una mezcla con la suspensión de espermatozoides y las secreciones del conducto deferente. que sirven como medio de nutrición para las células espermáticas permitiendo la supervivencia de los espermatozoides en el aparato reproductor de la hembra. La porción liquida de esta suspensión, que se forma durante la eyaculación se conoce como plasma seminal (Hafez, 1989).

3.7. Espermatogénesis

En el nacimiento, las células germinativas de los machos se llaman gonocitos. los túbulos seminíferos son pequeños y no tienen lumen; la población celular está compuesta apenas por los gonocitos y células de soporte que darán origen a las células de Sertoli. Los túbulos se encuentran rodeados por gran cantidad de tejido intersticial que contiene principalmente células mesenquimales precursoras de las células de Leydig. Cuando la diferenciación celular empieza a manifestarse, ocurre la formación del lumen del túbulo seminífero (Horn y Fritsch, 2008).

Las células germinales se producen en los testículos, mediante un proceso permanente de divisiones mitóticas dando origen a las espermatogonias. La espermatogénesis es el desarrollo y transformación de las células gaméticas del macho, este proceso está controlado por el eje hipotálamo-hipófisis-testículo y este proceso se lleva a cabo de forma cíclica en los túbulos seminíferos la duración del ciclo depende de cada especie (Ávalos *et.al.,* 2018).

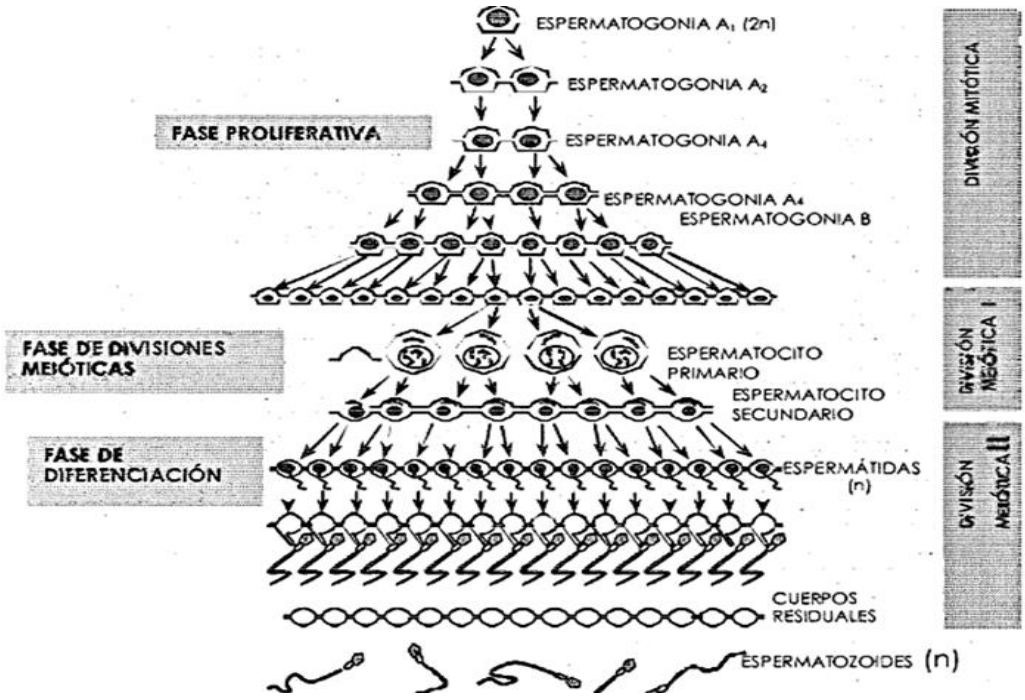


Figura 5. Espermatogénesis para su estudio se divide en tres fases basadas en consideraciones funcionales.

Fuente: (Horn y Fritsch,2008)

Según Hafez (1989), indica que el ciclo espermatogénico consta de tres fases:

1. Espermatocitogénesis, que consiste en divisiones mitóticas sucesivas de las espermatogonios tipo B para dar lugar a los espermatocitos primarios. Los cuales duplican su DNA.

2. Meiosis, que consiste en la división meiótica de los espermatocitos primarios que generan por una síntesis posterior de DNA a los espermatocitos secundarios quienes dividiéndose una vez más para formar posteriormente a las espermátides (células haploides).

3. Espermiogénesis, es la diferenciación morfológica y fisiológica de las espermátidas a espermatozoides (Gómez *et al.,* 2005),

El epitelio del túbulo seminífero contiene células de Sertoli y células germinales en diferentes etapas: espermatogonias, espermatocitos, espermátidas y espermatozoides. Los cambios que ocurren en la Recolección y manipulación seminal in vitro 9 espermiogénesis consisten en: a) formación del acrosoma, que se extiende sobre la mitad de la superficie nuclear y contiene enzimas que ayudarán a la penetración del ovocito; b) condensación del núcleo; c) formación del cuello, pieza media y flagelo y d) eliminación de la mayor parte del citoplasma (Gómez *et al.,* 2005)

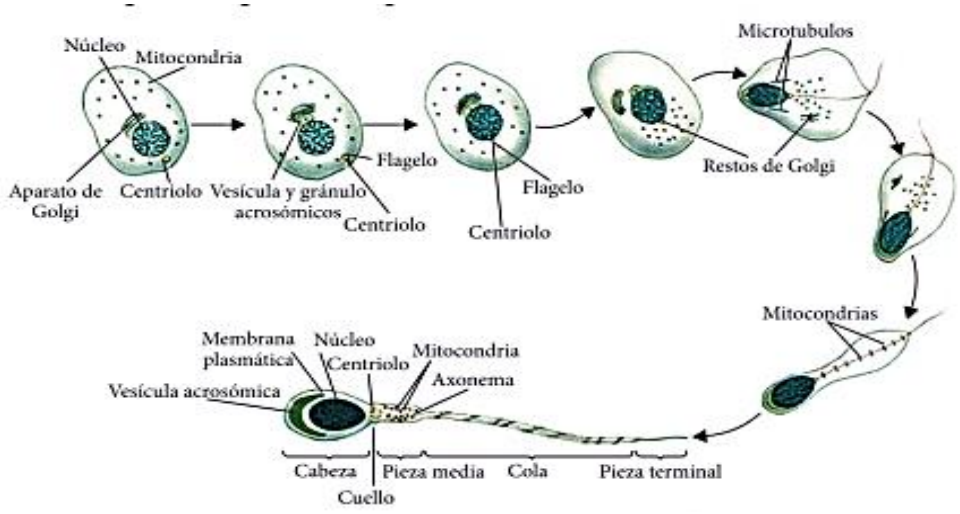


Figura 6. Espermiogénesis en mamífero.

Fuente: Gilbert (2005) citado por Ávalos (2018).

3.7.1. Espermiogénesis

La espermiogénesis es un proceso de transformación y maduración consisten en la formación del acrosoma, que se extiende sobre la mitad de la superficie nuclear y contiene enzimas que ayudarán a la penetración del ovocito, la condensación del núcleo, formación del cuello, pieza media y flagelo y eliminación de la mayor parte del citoplasma (Gómez *et al.,* 2005). Según Peters y Ball (1991), durante la segunda fase, las espermátidas se diferencian y cada una forma un espermatozoide. Esta diferenciación implica cambios como la formación del acrosoma, la caperuza nuclear, la cabeza, la pieza intermedia y la cola. Durante este proceso, se observa comúnmente una retención temporal de una gota de citoplasma entre la cabeza y la pieza intermedia del espermatozoide, especialmente en los espermatozoides inmaduros.

Los espermatozoides son liberados del epitelio al lumen tubular y luego transportados a través del rete testis y los bazos eferentes hasta el epidídimo. Durante la fase de Golgi, el aparato de Golgi forma una vesícula proacrosómicas que se fusiona en una vesícula acrosomal. En la fase del capuchón, la vesícula acrosomal aumenta su superficie de contacto con la envoltura nuclear. En la fase acrosómica, se produce una redistribución gradual de sustancias dentro de la membrana que conforma el acrosoma. El núcleo se vuelve elíptico y se desplaza hacia la periferia de la espermátida (Castillo, 2012). Una vez concluida la espermiogénesis, los espermatozoides de los mamíferos están altamente diferenciados, pero sin embargo aún no poseen el movimiento adecuado ni la capacidad de fusionarse al oocito (Cooper, 1986).

Los espermatozoides de los carneros permanecen en el epidídimo el cambio morfológico que se produce con mayor constancia durante la maduración espermática en el epidídimo es, en la mayoría de las especies la migración de la gota citoplasmática de proximal a distal y su posterior eliminación del flagelo en estudios recientes, hechos en análisis morfométricos asistidos por un ordenador ha revelado cambios en el tamaño y la forma de los espermatozoides durante el transito epididimario alrededor de 14 días en fase de maduración (Soler *et al*. 2000).

3.8. El espermatozoide de carnero

El semen de carnero se caracteriza por eyaculados de relativamente bajo volumen 0.8 a 1.2 ml en promedio y de una alta concentración espermática de 3 a 5 millones de espermatozoides por ml. El espermatozoide producido por los testículos está directamente relacionado con el peso de los mismos; se estima que cada gramo de testículo produce aproximadamente 20 millones de espermatozoides por día (Galina y Valencia, 2008).

Las características del semen varían entre especies. En los ovinos los parámetros seminales normales son los siguientes: concentración espermática, que indica la cantidad de espermatozoides por ml de semen, existen de 3,500 a 6,000 millones de espermas (Evans y Maxwell, 1990).

Tabla 1. Valores promedios del semen ovino según diferentes autores

Autor y año	Volumen (ml)	Concentración (millones/ml)	Motiles %	Vivos con Acrosomas %	Integridad de membrana %
Garner y Háfez,2000	0.8 – 1.2	2000-3000	60 – 80		
Paulenz y et al., 2002	0.75 –2.0	> 3500	> 70		
Gil y col., 2003	0.75 –2.0	> 2500	> 70		
Santini y et al., 2004			80-95	83-95	70-90
Aisen y et al., 2000			79-88	90-95*	

Fuente: Garner y Hafez (2000).

Otra característica del de carnero es que esta se caracteriza por ser de color lechoso o crema pálido. El color rosado indica sangre, probablemente a causa de una lesión del pene durante la recolección, mientras que el semen gris o pardo sugiere contaminación o infección del tracto reproductivo y un color amarillo es el color característico de la contaminación del semen con orina (Hafez, 1989).

El volumen varía de acuerdo con el método de recolección ya sea por vagina artificial o electroeyaculación, también influyen la edad, estado del carnero, estaciones, la

habilidad del recolector y frecuencia de obtención de la muestra. El volumen es de 0.5 a 2.0 ml en animales maduros y de 0.5 a 0.7 ml en los jóvenes (Hafez, 2000).

3.8.1. Metabolismo de los espermatozoides

Los espermatozoides constituyen un medio fácilmente discernible para evaluar su estado fisiológico (Garner y Háfez, 2000), la energía necesaria para mantener la motilidad y viabilidad de los espermatozoides procede de los azúcares, especialmente de la fructosa, presentes en el plasma seminal. La glucosa que también es metabolizada por los espermatozoides, a menudo, se utiliza como componente de los diluyentes. Cuando los azúcares son metabolizados por los espermatozoides se produce dióxido de carbono, agua y algo de ácido láctico.

3.8.2. Definición de semen

El semen es una suspensión celular liquida que contiene los gametos masculinos (los espermatozoides) y las secreciones de los órganos accesorios del aparato reproductor del macho (Garner y Hafez, 2000).

3.8.3. Métodos de colecta de semen

La colecta del esperma constituye la primera operación a realizar en la técnica IA en los rumiantes. Para desarrollarlas han sido preconizados diversos métodos concretamente (Buxadé y Iglesias, 1995). Se conoce dos métodos de recolección de semen de carnero (Morueco), En el caso del carnero, la recolección de semen se realiza por medio de dos métodos: vagina artificial y electroeyaculación (Evans y Maxwell, 1990).

A continuación, tenemos a las técnicas mencionadas:

3.8.3.1. Método de vagina artificial

El método más adecuado para la obtención de eyaculados en algunas especies animales como bovinos, ovinos, caprinos y équidos es la vagina artificial, cuya temperatura y presión adecuadas, imitan de mejor manera las condiciones naturales del depósito del semen en la vagina de las hembras, más tarde en ovinos, se empezó

a utilizar la vagina artificial de Gummi–Bertram, Hannover, convirtiéndose en el método ideal para la recolección se semen en el ganado ovino y caprino (Alvarez *et al.,* 2000).

La vagina artificial provee eyaculados con características normales y representativas. inicialmente es común entrenar los machos con hembras en celo natural o sincronizado, y posteriormente con algo de práctica puede utilizarse cualquier hembra, aún sin estar en celo o machos de temperamento dócil. Sementales con experiencia eyaculan rápidamente en el primer o segundo intento de monta, mientras que la mayoría lo harán después de algunas montas falsas, hasta que penetren completamente en la vagina artificial (Alvares *et al*., 2000).

Consiste en un tubo rígido, caño de polipropileno térmico de (17 cm de longitud x 5.5 cm de diámetro), en la parte interna una camisa de látex. Cuyos extremos se doblan y aseguran sobre los extremos del tubo mediante bandas elásticas formando, entre el tubo y la camisa, un compartimento hermético para el agua. A uno de los extremos de la vagina, se adosa una copa de vidrio para la colecta de semen. La vagina se carga con 40-60 ml de agua caliente a 50 ºC o más, siendo importante que la temperatura interior de la misma al momento de la eyaculación sea de aproximadamente 40ºC. En ambientes muy fríos pueden disminuirse las pérdidas de calor protegiendo el conjunto con una funda exterior. El acondicionamiento final de la vagina se logra por el agregado de aire a la cámara de agua con el fin de estrechar la luz vaginal a aproximadamente 1 cm de diámetro. La vagina cuenta con una válvula lateral que facilita esta operación (Cueto *et al.,* 2016).

Al momento de la obtención de semen la temperatura interna de la vagina artificial debe ser de 36-38ºC. El semen se coloca en baño de agua a 30ºC, protegiéndolo de cambios bruscos de temperatura. La frecuencia de extracción seminal está condicionada a las características intrínsecas de cada macho. En carneros adultos es habitual obtener 4-5 eyaculados diarios, obteniéndose volúmenes de 0.8 a 1.5 cc y consistencia cremosa, cremosa-lechosa (Gibbons y Cueto, 2007).

Ventajas de la colecta con vagina artificial Gonzales (2009):

1. Obtención de la totalidad del eyaculado.

2. Es indudablemente el método más fidedigno en lo que respecta la calidad y cantidad de la muestra colectada.
3. Viabilidad del esperma, mejor que con cualquiera de otros métodos.
4. Ausencia de todo tipo de secreciones exteriores.
5. Dada su rapidez y limpieza, no es estresante para el semental.
6. Es indudablemente el método más fidedigno en lo que respecta la calidad de la muestra colectada.
7. Permite colectar semen, varias veces por semana sin producir malestar en el macho.

Agraz (1989), indica que es importante considerar que una buena colecta o una colección bien ejecutada se caracterizan por el jalón hacia atrás del macho al momento del coito.

3.8.3.2. Método de electro eyaculación

El aparato con electrodo único fue utilizado por diversos autores que lo adaptaron a las diferentes especies animales. Existen diferentes tipos de estimuladores eléctricos, los más corrientes son los que tienen un electrodo bipolar para el recto. Existen variaciones según el método de recogida, especie, estado fisiológico del macho, raza, edad, tamaño corporal, alimentación y régimen sexual al que se le somete al macho. (Derivaux y Gómez, 1976).

Balcázar y Porras (2009), indican que la electroeyaculación es otro método utilizado cuando los machos rechazan la vagina artificial, y estos no pueden ser adiestrados a ella o se encuentran imposibilitados para realizar la monta. Consiste en aplicar estímulos eléctricos sobre el piso de la pelvis (10-15 voltios) durante 3-8 s a intervalos de 7-15 s con incrementos en los voltios. El animal se coloca en posición de cúbito lateral, debido a los estímulos el pene se exterioriza por desdoblamiento de la flexura sigmoidea, se coloca una gasa detrás del glande y se coloca una copa colectora para recolectar la secreción de las glándulas accesorias y luego el semen artificial.

Desventajas de la estimulación eléctrica:

1. Produce daños en el macho
2. No se puede hacer frecuentes recogidas de semen
3. No garantiza la calidad del semen
4. Se contamina fácilmente el semen con orina durante la recogida
5. Presenta mayor volumen, pero menor concentración de espermatozoides (Castillo, 2012).

3.9. Evaluación del semen

En el laboratorio se pueden evaluar y medir una serie de características y propiedades del semen realizando un control de su calidad. Dichos exámenes son concluyentes a la horade permitir la dilución del esperma y su posterior empleo o eliminación (Iglesias,1995). estas pruebas son las macroscópicas (Volumen, Color, Olor, pH) y las microscópicas (Porcentaje de Espermatozoides Vivos y Muertos, Motilidad Masal, Motilidad Individual, Viabilidad, Morfología Espermática).

3.9.1. Evaluación macroscópica

3.9.1.1. Volumen

Derivaux (1976), indica que el volumen medio del eyaculado de los carneros es de 0,8 y en casos extremos de 0,5 a 2 ml. Cuando la recogida se hace con vagina artificial el promedio de volumen de eyaculado, para carneros, es de 1.0 ml. (Gibbons *et.al.*, 2016). Evans y Maxwell, (1994), el volumen y la concentración no varían solo entre distintas especies sino dentro de las mismas. Independientemente de variaciones individuales existen otros factores como la edad, las condiciones climáticas, el estado nutricional, la frecuencia de las eyaculaciones y de estrés del operador que afectan, notablemente, a la cantidad y calidad del semen.

3.9.1.2. Color y olor

El semen de carnero es normalmente blanco cremoso, blanco lechoso o crema pálido (Cueto, 2000; Hafez, 2004; Aisen 2016). Dicha coloración es producida por la presencia de riboflavina en el plasma seminal (Mendoza *et al,*1989).

Deben destacarse los eyaculados que presentan coloración blanco-rosáceo que indica existencia de sangre o gris que indica algún tipo de infección en el aparato reproductor. La presencia de orina es un suceso frecuente cuando el semen se obtiene por electroeyaculador y le confiere un olor característico el cual no debe procesarse (Venturino, 2004).

(Derivaux,1976), Nos dice que la coloración blanquecina puede ser debido al hecho de que existan una concentración escasa de espermatozoides y el espermema aumenta su opacidad en caso de degeneraciones testiculares, con paso de células gigantes a través del epidídimo en caso de inflamación de las vesículas seminales.

La presencia de orina es un suceso frecuente cuando el semen se obtiene por electroeyaculación y le confiere un olor característico, el cual no debe procesarse ya que el semen procesable es de característica suigéneris (Aisen, 2004).

Tabla 2. Valoración del semen de carnero mediante la consistencia

		Numero de espermatozoides ($x\ 10^9$)		
Puntuación	**Consistencia**	**Media**	**Rango**	**Cant.Espermat. /cm³**
5	Cremosa espesa	5.0	4.5-6.0	5.000.000.000
4	Cremosa	4.0	3.5-4.5	4.000.000.000
3	Cremosa diluida	3.0	2.5-3.5	3.000.000.000
2	Lechosa	2.0	1.0-2.5	2.000.000.000
1	Brumosa	0.7	0.3-1.0	700.000.000
0	Transparente(acuosa)	insignificante		insignificante

Fuente: Ax y Hafez (2000); Castillo (2012)

3.9.1.3. pH

En el carnero, el pH es acido 6,85 se hace alcalino en los individuos poco fecundos o estériles, Según Mc Kenzie y Berliner, las eyaculaciones normales de un esperma altamente concentradas son más acidas y el pH 5,9 (Derivaux,1976).

Se coloca una gota del eyaculado en una tira reactiva (Bili-Latetix Bayer) permitiendo que se impregne y vire de color, enseguida se hace la comparación de la tira con el estándar incluido en el empaque de las tiras para realizar la lectura y determinar el valor del pH del eyaculado (el valor adecuado del semen se encuentra entre un 7.3 y 7.8 en la mayoría de mamíferos (Ávalos *et al*., 2018).

3.9.2. Evaluación microscópica

3.9.2.1. Motilidad masal

Iglesias, (1995), indica que Inmediatamente de la emisión el examen microscópico directo del esperma fresco nos permite conocer de forma aproximada el porcentaje de espermatozoides móviles, su morfología, tendencia de los zoospermios a la aglutinación (movimiento de olas y remolinos, ya que las células vivas barren a las muertas, agrupándolas). La onda de movimiento sólo puede ser observada en especies de alta concentración espermática, como es el caso de pequeños rumiantes (Evans y Maxwell, 1990).

Para la valoración de la movilidad masal se coloca una gota de semen puro (sin diluir) en un porta objetos limpio y templado a 37°C se observan las ondas características, sin cubreobjetos con objetivos de 40x a 100x en el borde de la gota (Aisen & Venturino, 2004). La clasificación varía en función de la escala utilizada: de 0 a 5 (Evans y Maxwell, 1990). El método es subjetivo y sirve únicamente como valoración de conjunto; sin embargo, es importante la motilidad de los espermatozoides en el fluido espermático. una buena eyaculación no debe contener menos del 60% de espermatozoides en movimiento y este ha de ser en avance progresivo, nunca curvo, rotatorio ni oscilante (Iglesias, 1995).

3.9.2.2. Motilidad individual

Evans y Maxwell (1990), indican que la motilidad individual es una de las pruebas que se utiliza con frecuencia para evaluar la calidad seminal y en algunas especies parece estar correlacionada con la capacidad fecundante del espermatozoide.

La determinación de la movilidad espermática es una de las pruebas más utilizadas y se valora mediante un microscopio compuesto u óptico con objetivos de 10x ó 40x sobre una gota de semen diluido en una solución isosmótica, determinando el porcentaje de espermatozoides móviles y su calidad de movimiento (Maxwell y Evans, 1990). estando sujeto también al efecto ejercido por el método de recogida, factores ambientales, manejo del semen tras su obtención. Existen variaciones estacionales relativas a la movilidad de los espermatozoides de ovino, estando relacionadas con la fertilidad (Evans y Maxwell, 1990).

Se realiza depositando una gota de 15 µl sobre un portaobjetos a 37 °C y colocando un cubre objetos para observar a un aumento de 40X, con la intención de homogenizar un criterio general y estimar el porcentaje de espermatozoides con movimiento. Los espermatozoides deben normalmente moverse de modo, rápido y recto a través del campo (Ávalos *et al*., 2000).

Tabla 3. Clasificación de la onda de movimiento de los espermatozoides

Valor	Clase	Descripción
5	Muy buena	El 90% o más de los espermatozoides son activos
4	Buena	Entre un 70-85 %de células activas
3	Regular	Entre un 45-65% de células activas
2	Pobre	Entre un 20-40% de movilidad espermáticas, aunque muy leve.
1	Muy pobre	Alrededor de un 10% presenta movimientos, aunque muy débil
0	Muertos	No se observa ningún movimiento en los espermatozoides

Fuente: Evans & Maxwell, (1990).

3.9.2.3. *Vitalidad espermática*

Es el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos. Para la determinación de espermatozoides vivos y muertos pre y post-descongelación se emplea la técnica de tinción de eosina-nigrosina, la técnica descrita por Evans y Maxwell (1987).

3.9.2.3.1. Tinciones vitales

Es el procedimiento más utilizado para la valoración de la vitalidad, las técnicas de tinción vital que permiten diferenciar los espermatozoides vivos de los muertos debido a la permeabilidad de la membrana plasmática a los colorantes vitales (Aisen & Venturino, 2004). por lo tanto. La determinación del porcentaje de espermatozoides vivos de acuerdo a la integridad de la membrana plasmática de la cabeza) puede realizarse por medio de colorantes que tiñen a los espermatozoides dañados tiñéndolos de rosa a los (muertos) y dejan incoloro o blancos a los íntegros (vivos) (Ávalos *et al*., 2000).

La técnica consiste en:

- Colocar en el extremo de un porta objetos templado a 37°C 1 gota colorante y 1 de semen separadas, y mezclarlas.
- Extender la mezcla con otro porta objetos que actúa como extensor, procurando que la capa quede lo más delgada posible
- Se deja secar y observa a 40x (colocando 1 gota de aceite de inmersión y luego y objetivo de inmersión)
- Se deben observar 100-200 espermatozoides en distintos campos expresando el resultado en porcentaje de vivos (Aisen, 2004)

El método tradicional es la tinción con eosina-nigrosina, que también se utiliza para la valoración de las morfoanomalías. El mayor inconveniente que presenta el uso de la eosina-nigrosina es que, al ser un colorante hipotónico que se añade a una muestra que no ha sido fijada químicamente, puede producir morfologías anormales en los espermatozoides, especialmente defectos en la cola (Peña y Linde-Forsberg, 2000).

El semen que, a la hora de la recogida, puede ser de buena calidad se deteriora con facilidad. El semen del carnero es muy sensible a los cambios ambientales y a otras circunstancias, los factores que pueden afectar la supervivencia de los espermatozoides son: Las temperaturas superiores a 45°C que matan a los espermatozoides, una bajada súbita de temperatura particularmente por debajo de los 10°C producirá una pérdida irreversible de su viabilidad, La exposición a la luz durante

30-40 minutos produce la muerte a los espermatozoides, el contacto con metales, agua e impurezas como bacterias, desinfectantes, exposición prolongada al aire y capacidad tamponante del diluyente y el manejo del semen al momento de la tinción, (eosina-nigrosina) (Agraz, 1989).

3.9.2.4. Morfología espermática

El estudio de la morfología espermática ha tenido gran importancia al proporcionarnos parámetros que nos permiten lograr una adecuada selección de espermatozoides que garanticen resultados exitosos en tratamientos de reproducción asistida. La morfología espermática es uno de los parámetros más importantes de selección y se correlaciona con el potencial de fertilidad (Ávalos *et al.,*2018).

3.9.2.4.1. Causas de las anomalías morfológicas

Castillo (2012), ha señalado que la frecuencia de espermatozoides anormales aumenta con temperaturas extremas las estaciones calurosas, el aislamiento experimental del escroto, la aplicación experimental de frio a los testículos, congelación del escroto. Algunas enfermedades que incluyen infecciones de los órganos reproductores, la hipoplasia testicular congénita, la degeneración testicular adquirida y la disfunción del epidídimo se hallan relacionadas con una alta frecuencia de células anormales, se ha observado pequeños incrementos de células espermáticas anormales a medida que los moruecos (carneros) envejecen.
(De Vos *et.al.*,2003), indica que la morfología anormal (teratozoospermia) de los espermatozoides puede afectar drásticamente la fertilización, desarrollo embrionario e implantación. Las anomalías estructurales de los espermatozoides pueden afectar aislada o simultáneamente a las distintas partes que lo forman.

3.9.2.4.2. Clasificación de las anomalías espermática

Se han establecido distintas clasificaciones de las anomalías espermáticas atendiendo a distintos criterios:

a) dependiendo de si se originan en el testículo (anomalías mayores) o a lo largo del tránsito epididimal o tras la eyaculación (anomalías menores) (Bloom y Birch, 1970)

b) de si están asociadas a infertilidad o no (primarias o secundarias, respectivamente) (Bloom y Birch, 1970).

c) de la región espermática implicada (anomalías de la cabeza, de la pieza intermedia o de la pieza principal). Cualquier anomalía, primaria o secundaria, si afecta a un número elevado de espermatozoides, puede llegar a comprometer la fertilidad del semen. Por ejemplo, si una dosis seminal tiene una motilidad espermática entorno al 50%, y contiene un 30% de espermatozoides con gotas citoplasmáticas proximales, la alta incidencia de esta morfoanomalía repercutirá negativamente en la fertilidad de esa muestra pese a la buena motilidad del eyaculado.

Para realizar la evaluación de la morfología espermática, se propone clasificarlas en dos: las primarias cuando reflejan anomalías producidas en el testículo, y secundarias cuando toman lugar durante el tránsito a través del sistema ductal o cuando se producen como consecuencia de errores de manejo del semen a partir del momento de la obtención del mismo o con la maduración espermática (Jurado *et.al*., 2008).

- Las anormalidades primarias incluyen patologías como: la macrocefalia, microcefalia, bicefalia, acrosomas anormales o inexistentes, ausencia de porción intermedia, cola enroscada o biflagelados (Jurado *et.al*., 2008).

Poco desarrollado, formas dobles, defecto acrosomal, decapitado, defecto en diadema, cabeza en forma de pera (piriforme), estrechamiento en base, contorno anormal, cabezas anormales pequeñas, cabezas anormales libres, defecto de la pieza intermedia, gotita proximal, pseudogota, colas fuertemente dobladas o arrolladas (Peters,1991).

- Las anormalidades secundarias incluyen defectos espermáticos como porciones intermedias dobladas, colas dobladas, o presencia de gotas citoplasmática distal (Jurado *et.al*., 2008).

Cabezas estrechas, cabezas pequeñas normales, cabezas cortas y anchas, cabezas libres (normales), membrana acrosomal sueltas, implantación abaxial, gotita distal, cola simple doblada, cola terminada en ángulo (Peters y Ball 1991).

Stornelli y Luzbel (2016), indican que las muestras sometidas a procesos de congelación / descongelación pueden observarse alteraciones asociados a los procesos antes mencionados. Se puede detectar hinchazón, perdida o daño de la membrana plasmática y/o acrosomal fusión de la membrana plasmática y membrana acrosomal externa, espacio entre la membrana acrosomal interna y el núcleo. Las mencionadas alteraciones observadas en espermatozoides, congelados y descongelados se asocian a la reducción de la capacidad fecundante de semen. Para la mayoría de los mamíferos se considera un semen de buena calidad, como aquel que debe contener más de 70% de espermatozoides con morfología normal, representando las anormalidades primarias menos del 10% y las anormalidades secundarias menos del 20%. Las anormalidades totales no deben superar el 30% (Gómez *et.al.*, 2005).

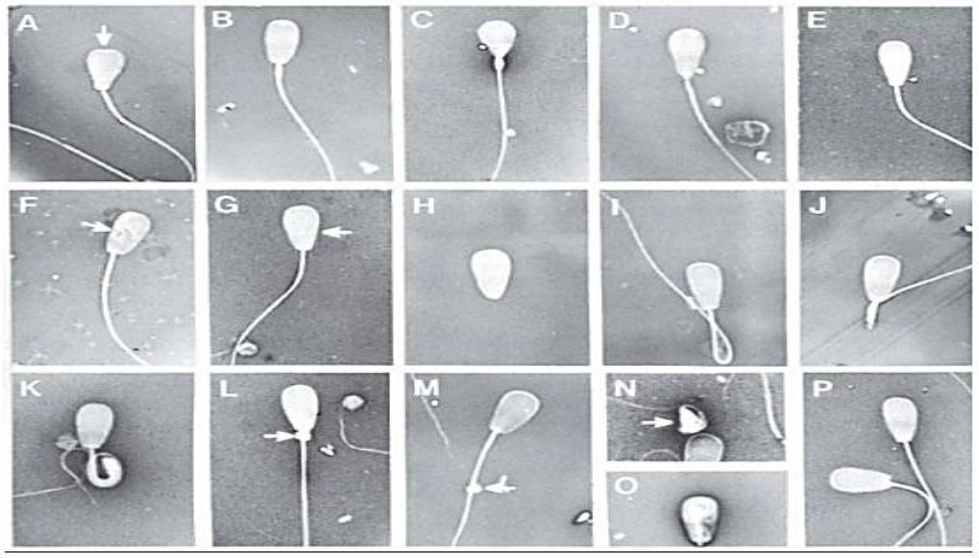


Figura 7. Espermatozoides normales y algunas formas anormales.

A-Sin acrosoma (forma común). B-Sin apenas acrosoma. C-Con cabeza piriforme cabeza. D-Con cabeza piriforme moderada. E-Con cabeza piriforme leve. F-Con vacuolas. G-Defectos en la membrana. H- Sin flagelo. I-Reflejo distal. J-Parte media rota. K- Parte media severamente doblada. L-Gota proximal. M-Gota distal. N-Teratoride grave. O-Teratoideo moderado. P-Espermatozoide normal**.**

Fuente: (Barth y Oko., 1989).

En el caso de carneros los investigadores entre los que se hallan Ax, Dally , Didion, Lenz, Love, Warner, Hafez y Bellin, (2000), sus investigaciones indica que existe una

correlación entre los espermatozoides con morfología normal y la motilidad espermática, aunque todas las eyaculaciones contienen algunos espermatozoides anormales, cuando hay 20% o más con anormalidades es necesario cuestionar la fertilidad del carnero, el semen que contiene más del 15% de espermatozoides anormales no debe usarse para la inseminación artificial, el porcentaje de espermatozoides anormales varia con las estaciones, en primavera es más elevada las anormalidades mientras que el número se reduce al acercarse la estación reproductiva.

La morfología de los espermatozoides se examina mediante tinción de eosina-nigrosina. Los porta objetos teñidos se examinan con ampliación microscópica alta (100X).

Desgraciadamente, no es siempre fácil distinguir entre las células espermáticas anormales formadas durante la espermatogénesis y las causadas por técnicas inadecuadas de manipulación del semen. Se precisa para tal diferenciación experiencia en la manipulación del semen, en las técnicas de tinción y en el examen del esperma (Castillo, 2012).

3.9.3. Dilutores comerciales para el congelamiento de semen

Un dilutor comercial es una solución liquida que permite el aumento del volumen del eyaculado, protege la membrana plasmática del espermatozoide, brinda componentes nutritivos para las células, evita en gran porcentaje el cambio de la membrana plasmática al momento de la congelación y descongelación ya que se puede cristalizar la célula espermática produciéndose la muerte de la misma (Aisen, 2004).

Los dilutores de semen para la criopreservación están compuestos por diferentes sustancias que cumplen las siguientes funciones:

- Proveer nutrientes como fuente de energía
- Inhibir el crecimiento bacteriano
- Proteger contra los efectos dañinos de los cambios térmicos (especialmente las membranas)
- Proporcionar nutrientes como fuente de energía

- Proporcionar un medio de amortiguación de pH
- Mantener una presión osmótica adecuada
- Mantener un equilibrio electrolítico
- Aumentar el volumen del eyaculado, a fin de permitir múltiples dosis para semen podrá procesarse para tres usos básicos (Hafez, 2000; Aisen, 2004).

Semen en estado fresco, puro o diluido (a +30/+37°Cy no más de 1.5 horas)

Semen refrigerado (15°C a +5°C, hasta 12 a 24 horas)

Semen congelado (a -196 °C, indefinidamente) (Aisen, 2004).

Los diluyentes más usados comúnmente tienen como base la yema de huevo con glucosa y citrato de sodio, un agente crioprotector para minimizar los daños durante la congelación y un antibiótico para impedir la diseminación de enfermedades (Schoenian y Small, 2018).

3.9.3.1. Dilutor OPTIXcell 2

Importante sobre el tratamiento del semen bovino. Diluyente concentrado para congelación o preparación de dosis de semen fresco de toro OPTIXcell no contiene proteínas de origen animal" (imv Technologies, 2020).

Composición:

Carbohidratos, sales minerales, tampón, antioxidantes, glicerol, fosfolípidos, agua ultrapura, antibióticos (Gentamicina, Tilosina, lincomicina y espectinomicina), de acuerdo con la directiva europea 2003/43/CE Optixcell 2 no contiene proteínas de origen animal (imv Technologies, 2020).

3.9.3.2. Dilutor Andromed®

Diluyente sin yema de huevo para semen bovino, sin ingredientes de origen animal, sin riesgo de contaminación microbiana, protocolos de producción eficiente, altas tasas de fertilidad, amplio rango de aplicación, estándar de GMP de producción de Minitube (Minitube, 2021) (Minitube, 2021).

Composición

Fosfolipidos, TRIS, ac. Cítrico, azúcares, antioxidantes, tampones, glicerina, agua de altísima pureza y antibióticos (Tilosina, Gentamicina, Espectinomicina, Lincomicina) (Minitube 2021).

3.9.3.3. Dilutor Steridyl

Es un nuevo diluyente disponible en el mercado desde 2010. La principal ventaja de este diluyente es que los 500 ml de la solución concentrada ya contienen yema de huevo; eliminando el tiempo de preparación de la yema de huevo fresco. Sólo es necesario 750 ml de agua pura al concentrado (Minitube, 2021).

Composición

Steridyl contiene TRIS, ácido cítrico, azúcar, tampones, Glicerina, agua purificada, yema de huevo estéril irradiada y antibióticos (Tilosina, Gentamicina, Espectinomicina, Lincomicina) (Minitube, 2010).

3.9.4. Dilución del semen

La dilución pretende el aumento del volumen del eyaculado para aumentar su rendimiento. Las técnicas de conservación proporcionan a los espermatozoides condiciones óptimas para el mantenimiento de la vitalidad y la capacidad fecundante a través del tiempo. El autor ruso Ivanov en 1912 demostró que el semen diluido en soluciones conservadoras y mantenido a 2°C puede ser utilizado para IA por varios días (Schoenian y Small, 2018).

3.9.4.1. Equilibramiento

El propósito del equilibramiento es permitir la traslocación del agua y por lo tanto reducir los efectos dañinos de la nucleación del hielo intracelular durante el proceso de congelamiento y descongelamiento (Vishwanath y Shannon, 2000).

Posterior a realizar la dilusión del eyaculado, es muy importante bajar la temperatura rápidamente hasta los 5°C, donde se debe mantener por unas 2-4 horas, para lograr el equilibrio osmótico entre el diluyente y los espermatozoides (Parraguez *et.al.,* 2000).

Pasado este tiempo de equilibrio es necesario evaluar nuevamente el semen, en este momento el semen deberá tener como mínimo, una motilidad progresiva de 50% (Giles, 1993).

3.9.4.2. Envasado

Si bien se ha desarrollado la información sobre la crioconservación del semen de carnero se ha puesto poca atención al tamaño y forma de envase donde el semen es congelado, la relación superficie volumen del contenedor tiene importancia para la refrigeración, la congelación y la descongelación (Aisen y Venturino, 2004).

El envase del semen es también importante para la tarea del inseminador (identificación, manejo y almacenamiento). Los envases más comunes para congelar semen ovino son las pajuelas de 0.5 o 0.25 ml de PVC (cloruro de polivinilo, IMV, L´Aigle). para el llenado y sellado de estas últimas puede usarse un equipo automático también puede ser envasado en los minitubos de 0,25 ml (Minitub GmBh, Ticfenbach). En diversos estudios se obtuvieron mayores porcentajes de motilidad a la descongelación y tazas de fertilidad superiores, al utilizar semen de ovino congelado en pajuelas (Aisen y Venturino, 2004).

El semen debe ser envasado en (pajuela, minitubo o pellet) para bajar su temperatura a aproximadamente -80°C, exponiendo el envase a los vapores del nitrógeno líquido (4-8 cm sobre la superficie del nitrógeno) durante 20 min (Parraguez *et al*., 2000).

3.9.4.3. Congelamiento

Terminada la dilución comienza con el proceso de conservación correcta del semen que guarde su efectividad de fecundación para ello podemos recurrir a la refrigeración y a la congelación. Mediante la criopreservación es posible detener el proceso que sufre el espermatozoide desde la eyaculación hasta la fecundación y conservarlo en el tiempo potencialmente fértil (Stornelli *et al.,* 2005).

Uno de los aspectos más útiles de la criopreservación es el apoyo a la conservación de las poblaciones vivas. En este caso, es un complemento de un programa de conservación más amplio, en el cual, la criopreservación del material genético es una

seguridad en caso de catástrofe, o si un problema genético aparece como consecuencia de la acumulación de genes recesivos nefastos para la población viva. Así, la primera exigencia para la criopreservación es la disponibilidad de instalaciones que permitan el almacenamiento de las muestras en nitrógeno líquido (Ávalos *et al.,* 2018).

Todas las células que se han criopreservado presentan una congelación determinada, fuera de la cual la supervivencia se ve comprometida. en el espermatozoide, esta velocidad se ve afectada por una serie de factores propios(especie , dimensiones de la célula, permeabilidad de la membrana al agua y a los crioprotectores) y otros determinados por el proceso de congelación (concentración y tipo de crioprotector, geometría del envase y composición de los diluyentes), las tasas de congelación entre – 10 °C/ min a -100°C/min son las que permiten obtener mejores resultados a la descongelación siendo la concentración del glicerol el factor principal de la recuperación de la distintas tazas. El espermatozoide de carnero tolera un rango térmico final de vapores de nitrógeno líquido de -75 a 125°C. dado que el punto crítico de la congelación se encuentra entre -15 y -125 °C cuanto más rápido pase este intervalo mayor será la recuperación posdescongelamiento (Aisen y Venturino, 2004).

3.9.4.4. Almacenamiento de semen

Las condiciones se consiguen al suspender las pajillas a una altura de entre 4 y 6 cm sobre el espejo de nitrógeno líquido (-196 ºC), y la altura que ha demostrado ser idónea para congelamiento de pajillas de 0.25 y 0.5 ml es de 4 cm (Maxwell *et al*.,1995). (Parraguez *et al*. 2000). Indica que los envases se deben llevar a una temperatura de -196 °C, para introducirlas al nitrógeno líquido, donde se pueden almacenar por tiempo indefinido.

3.10. Análisis económico

3.10.1. Costos de producción

El costo de producir se entenderá como el valor monetario que se invierte en tres elementos: 1) materiales, 2) fuerza laboral necesaria y 3) demás insumos requeridos para fabricar bienes o sus partes o para generar servicios (Tello *et al*., 2017).

3.10.2. Costos fijos

Se define al costo fijo como aquellos costos que permanecen constantes, por determinados períodos de tiempo, independientemente del volumen de producción (cantidad de bienes y/o servicios que se generen en la empresa o negocio); es decir costos que no varían en función de la producción sino del tiempo. Por ejemplo, el arriendo, al propietario del bien inmueble no le importa la cantidad de productos que fabriquemos y vendamos, sino que le cancelemos oportunamente el canon acordado (Tello *et al*., 2017).

3.10.3. Costos variables

Bravo (2013), define a los costos variables como todos los costos cuyo volumen total varían cuando varía el volumen de producción, es decir que los costos variables están constituidos principalmente por las materias primas. Son costos variables aquellos que varían en forma proporcional a la producción o las ventas, como los materiales directos, la mano de obra directa cuando se pasa por unidad producida y algunos costos indirectos de fabricación, como los suministros, el mantenimiento de equipos y máquinas, las comisiones (Gomez, 2005).

3.10.4. Costo total

Se define el costo total como la sumatoria del costo fijo y el costo variable, esto también es válido en términos unitarios (Gomez, 2005).

3.10.5. Beneficio / costo

Esta razón indica el retorno en dinero obtenido por cada unidad monetaria invertida. Por definición resulta, de dividir en ingreso bruto por el costo total, en el caso de analizar factibilidad de tecnologías nuevas a través de un presupuesto parcial este índice se puede calcular tomando en cuenta solo los costos variables y no los costos totales (que incluye los costos fijos) pues suelen ser los más afectados. Cuando la relación es igual a 1el productor no gana ni pierde al realizar el cambio tecnológico. Relaciones mayores a 1 indican ganancia, relaciones menores a 1 indican perdida (Herrera *et al*., 1994).

4. LOCALIZACION

4.1. Ubicación geográfica

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de crio-conservación de la Estación Experimental de Choquenaira, dependiente de la Facultad de Agronomía de la Universidad Mayor de San Andrés. Está ubicada en la comunidad de Choquenaira, 8.0 km de la población de Viacha, provincia Ingavi y a 38 km de la ciudad de La Paz presentando una temperatura media de 10ºC en verano y 7.4ºC en invierno (Arguedas, 2006). Situada a una altura de 3870 msnm, geográficamente se halla a 14°16´45'' Latitud Sur y 65°34´23´´ Longitud Oeste (Mamani y Céspedes, 2012).

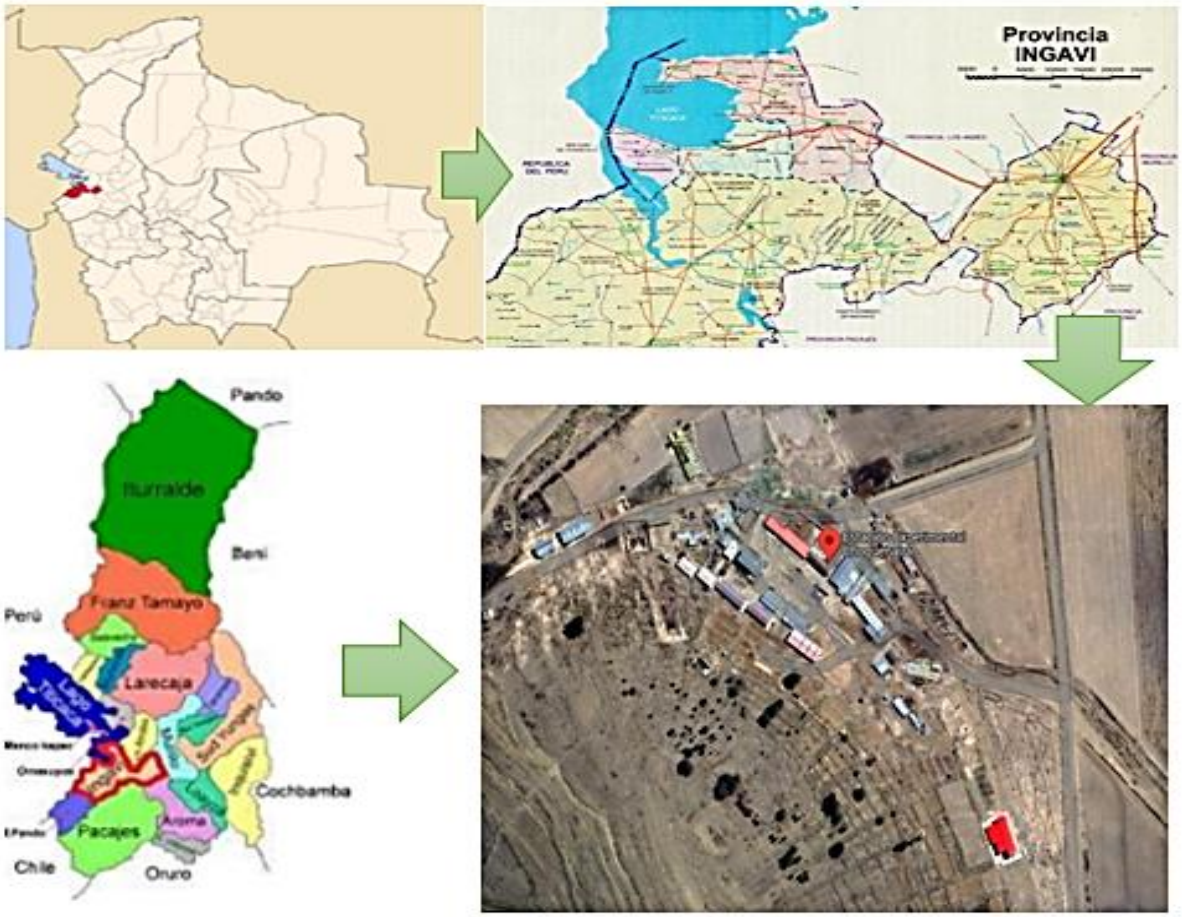


Figura 8. Ubicación geográfica del área de investigación, Estación Experimental de Choquenaira.

Fuente: Elaboración propia EECH, (2022)

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Materiales

5.1.2. Material biológico

- 2 carneros (reproductores) raza Corriedale

Carnero 1232

Carnero 1330

Fuente: elaboración propia (2022)

5.1.3. Material de campo para colecta de semen

- Vagina artificial
- Fundas de látex
- Tubos falcón o de centrifuga graduados
- Caldera eléctrica
- Estufa eléctrica
- Termómetro digital
- Brete de sujeción/hembra
- Jeringa de 60 ml
- Agua
- Papel toalla
- Funda de la vagina

5.1.4. Materiales de laboratorio

- Microscopio
- Baño María
- Micropipeta
- Platina térmica
- Sistema de purificación de agua (destiladora)
- Gradillas
- Tubos graduados de 10 y 15 ml
- Buretas
- Pipetas Pasteur
- Pinzas
- Refrigerador
- Llenador de pajuelas
- Termo criogénico
- Termómetro digital
- Vasos precipitados
- Laminas porta y cubre objetos
- Papel aluminio
- Papel film
- Papel toalla
- Pajuelas 0.25 ml
- Tips
- Jeringas de 5 y 10 ml
- Secadores

5.1.5. Material químico-reactivos

- Tinción eosina-nigrosina
- Optixcell
- Andromed
- Steridyl
- Aceite de inmersión
- pH-metro
- Alcohol de polivinílico
- Agua destilada
- Alcohol al 70%

5.1.6. Material de escritorio

- Registros de colecta (cuaderno)
- Bolígrafos y lápiz
- Calculadora
- Cámara fotográfica
- Computadora

5.2. Metodología

Descripción de la metodología empleada en el trabajo de investigación.

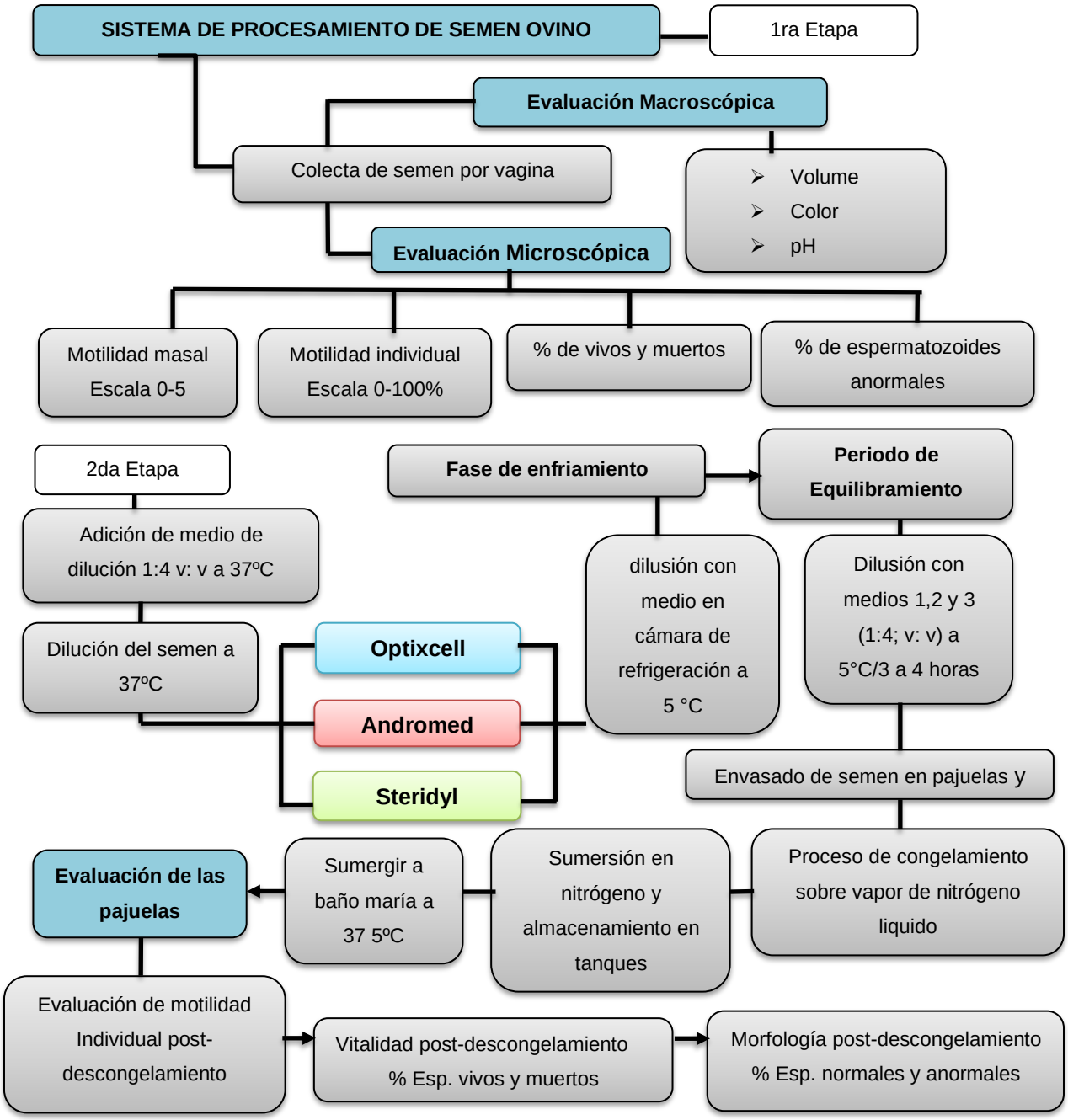


Figura 9. Protocolo de recolección, enfriamiento dilución envasado y congelamiento de semen de carnero

Fuente: Elaboración propia (2022)

5.2.1. Procedimiento pre-experimental

5.2.1.1. Selección de animales

Se preseleccionaron seis reproductores de un rebaño de catorce machos. Entre ellos, se escogieron dos carneros para participar en la investigación debido a su vigor sexual y capacidad de servicio. Esta evaluación consistió en la detección de celo y monta, observando detenidamente a los carneros que demostraron mayor interés en cubrir a las hembras en celo.

Los dos carneros seleccionados pertenecen a la raza Corriedale, tienen edades de 3.5 y 1.5 años, y presentan pesos vivos de 95 y 58 kg, respectivamente, durante el día, se los llevaba a pastar en los pastizales de la estación, y por la noche se alojaban en un corral abierto para descansar. En su alimentación se les proporcionó heno de cebada y ensilaje, además de alimento comercial compuesto por afrecho, cascarilla de soya, fosfato di cálcico y sal mineral, con un contenido de proteína del 12%. La cantidad de alimento suministrada fue de 1 kg por animal al día, se aseguró un suministro de agua *ad libitum*, y los carneros se mantuvieron en régimen estabulado.

Figura 10. Palpación y medición de los testículos del carnero con un escrotimetro

Fuente: Elaboración propia (2022)

Se realizó un examen físico-clínico de los órganos genitales externos (testículos, pene y prepucio) a los carneros previamente seleccionados. Se inspeccionó y palpó cuidadosamente la forma y tamaño de los testículos y epidídimos, midiendo el escroto con un escrotimetro una vez finalizado el examen clínico. Los resultados mostraron

que los testículos eran firmes, con piel elástica, sin lesiones ni deformidades y dentro de los parámetros normales.

5.2.1.2. Entrenamiento

Los carneros elegidos fueron sometidos a un proceso de entrenamiento con el objetivo de familiarizarlos con la extracción de semen mediante el uso de una vagina artificial. Esta medida se implementó para asegurar su tranquilidad, ya que no estaban acostumbrados a este método de recolección. El entrenamiento se llevó a cabo en presencia de una borrega en celo, preferentemente durante las mañanas y en condiciones de alta humedad. Se realizó dos veces por semana durante un período de treinta días.

Inicialmente, los carneros mostraron indiferencia y temor, lo que dificultaba la estimulación de su libido. Para superar este desafío, se optó por utilizar una hembra hormonada con una dosis mínima de estradiol, administrada semanalmente. Esto se hizo con el propósito de despertar el interés de los carneros hacia la hembra y facilitar el proceso de entrenamiento. A medida que avanzaba el entrenamiento, ambos carneros respondieron de manera positiva a la monta voluntaria y se acostumbraron gradualmente al uso de la vagina artificial. Finalmente, se logró que el comportamiento de los machos se volviera más fluido y mecánico, permitiendo que la colecta de semen se llevara a cabo de manera eficiente mediante la sujeción de la hembra en el brete durante la monta.

Figura 11. Carneros de raza Corriedale

Fuente: Elaboración propia (2022)

5.2.1.3. Preparación de la vagina artificial

Colocamos en el interior de la vagina artificial una camisa de goma, los extremos de la manga fueron doblados hacia la parte externa de la vagina y fijados con ligas de presión, en uno de los extremos se colocó la copa recolectora de semen y un vial esterilizado; el espacio existente entre la camisa y el tubo se llenó con agua caliente hasta tres cuartos aproximadamente a 45 a 50°C de temperatura, enseguida se insufló aire por la válvula para generar la presión necesaria y extender la manga hacia el centro del tubo disminuyendo la luz de éste, simulando de esta manera la vagina de la hembra.

5.2.1.4. Preparación del carnero, extracción y manejo del semen

La colecta de semen de ambos carneros se efectuó dos veces por semana, preferentemente antes del mediodía, en un lugar limpio y libre de polvo.

Se realizó una preparación previa al carnero, la cual incluyó la limpieza del prepucio del animal mediante lavado con agua corriente y posterior secado con una toalla. Además, se procedió a recortar los pelos del prepucio para prevenir la contaminación del semen.

Después de asegurada la oveja en el brete, el operador se ubicó al lado derecho del macho de modo que su mano diestra estaba sujetando la vagina con el extremo abierto frente al prepucio en un ángulo de 45 º en relación al piso. Una vez realizado el salto del macho el pene fue desviado lateralmente para ser enfrentado a la vagina artificial, la eyaculación se dio después de que el animal haya realizado movimientos de empuje curvando levemente el lomo lo que se denomina como golpe de riñón, este procedimiento no debe demorar más de 30 segundos.

Una vez obtenido el semen, fue trasladado rápidamente al laboratorio manteniéndolo protegido de los cambios bruscos de temperatura, contacto con el agua y metales, radiación solar directa, e impurezas, razón por la cual se usó material seco y estéril. Las muestras de semen se conservaron en baño María a 37 °C para su posterior evaluación.

5.2.2. Procedimiento experimental en laboratorio

La investigación tuvo una duración de tres meses, época húmeda, desde la colecta hasta la congelación y descongelación de semen.

5.2.3. Análisis del semen fresco colectado

Tras la recogida de cada eyaculado, las muestras colectadas fueron trasladadas inmediatamente, al laboratorio, donde se valoraron una serie de características macro y microscópicas de cada uno de los eyaculados, con el objeto de determinar la calidad seminal. Las características que se valoraron son las siguientes:

- Características macroscópicas (volumen, color, olor y pH).
- Características microscópicas (motilidad masal, motilidad individual, porcentaje de vivos y muertos).

5.2.4. Características macroscópicas

5.2.4.1. Volumen

El volumen del eyaculado seminal se determinó por lectura directa en la copa colectora de la vagina artificial graduada en ml.

Figura 12. Semen colectado de carnero

Fuente: Elaboración propia (2022)

5.2.4.2. Color o tonalidad

La coloración que presentaron los eyaculados seminales de los carneros de raza Corriedale, en las diferentes extracciones fue blanco cremoso, lo que se debe a la alta concentración espermática del semen y sin ningún tipo de contaminante. El examen visual del color o tonalidad se realizó inmediatamente colectado el semen en la misma copa de colecta de semen.

Para esta evaluación se consideró tres tonalidades de acuerdo a los reportes encontrados por (Evans, 1900).

1. Blanco cremoso. Cuando el semen toma una tonalidad o color ligeramente blanco amarillo claro, dando una impresión que tiene crema de leche (color de nata de leche o natilla).
2. Blanco lechoso. Cuando el semen toma un color o tonalidad que tiene cualidades o apariencia de leche.
3. Blanco amarillento. Cuando el semen toma un color amarillo.

5.2.4.3. Olor

En las muestras seminales analizadas se apreció un olor proteico neutro, sin olores desagradables que podrían ser provocados por contaminación bacteriana debiendo tomar en cuenta que las muestras de semen recolectadas higiénicamente, de carneros sanos y fértiles, tienen un débil olor *sui géneris*.

5.2.4.4. pH

La lectura del pH se lo realizó utilizando papel tornasol (peachimetro tira) con una escala de 1 – 14. La que se evaluó según la coloración que se torna al tener contacto con el semen fresco obteniendo así un pH.

La valoración del pH en el análisis macroscópico de las muestras seminales pertenecientes a los dos carneros de la raza Corriedale reportó en las diferentes colectas, un promedio considerándose que el material genético recolectado (semen), posee un carácter acido muy cercano a la neutralidad.

5.2.5. Características microscópicas

5.2.5.1. Motilidad masal

La valoración microscópica de la motilidad masal, en las diferentes observaciones realizadas, registraron un promedio dentro de los rangos normales de un semen de calidad, ya que según (Cueto *et al.,* 2016), manifiestan que, para proceder al congelamiento de un eyaculado de semen de pequeños rumiantes, se recomienda que su motilidad masal sea ≥70%, aunque para la evaluación de este parámetro se necesita mucha experiencia ya que la apreciación de esta variable es subjetiva. calificando la motilidad masal de acuerdo a la escala de (Ax *et al*., 2000).

Los resultados expuestos en la presente investigación fueron guiados por un técnico profesional y con los siguientes pasos:

Se utilizó un portaobjeto, pipetas Pasteur, y un microscopio, La evaluación se realizó de la siguiente manera:

1. Se calentó en una platina térmica a 37°C láminas de portaobjetos y cubreobjetos, para evitar un choque térmico.
2. Con una pipeta Pasteur estéril, se procedió a tomar una gota de semen puro la que se colocó en el portaobjeto para su lectura
3. Finalmente, se observó en el microscopio con el lente de 10x, apreciándose movimientos en masa.

Tabla 4. Calificación de movimiento en masa

Calificación		Valor	Movimiento en Masa
5	Muy buena	75-100	Movimiento ondulatorio. Remolinos rápidos
4	Buena	50-75	Movimiento ondulado rápido, Remolinos lentos
3	Regular	25-50	Movimiento ondulado general. Oscilante
2	Mala	0-25	Movimiento muy lento
1	Muy mala	10	Movilidad individual
0	Muertos	0	Inmovilidad total

Fuente: (Aké et al.,2017) (Aisen, 2004).

Motilidad individual

Para la determinación de la motilidad individual se utilizó un portaobjetos, cubre objetos y el microscopio del laboratorio, La evaluación se realizó de la siguiente manera:

- Se calentó en la platina térmica a 37 °C los portaobjetos y cubreobjetos para evitar un choque térmico al momento de colocar la gota de semen diluido la cual también se encontraba a la misma temperatura
- Con una pipeta Pasteur se colocó una gota de semen diluido con los dilutores comerciales (Optixcell, Andromed, Steridyl) preparados previamente cada uno a una dilución de 1:4 antes de hacer la lectura en el portaobjeto y luego se cubrió con una lámina cubreobjetos para la lectura.
- La lámina preparada fue llevada al microscopio para su evaluación en una lente a 40x, luego se observó campos por muestra, buscando campos donde se observarán a los espermatozoides separados y sin aglomeraciones para proporcionar una estimación del porcentaje de motilidad individual de espermatozoides con movimiento lineal progresivo.

Tabla 5. Calificación de Motilidad Individual

Valor	Clase	Descripción
5	Muy buena	El 90% o más de los espermatozoides son activos (muy rápido)
4	Buena	Entre un 70-85 %de células activas (rápido)
3	Regular	Entre un 45-65% de células activas (moderado)
2	Pobre	Entre un 20-40% de movilidad espermáticas, aunque muy leve (lento)
1	Muy pobre	Alrededor de un 10% presenta movimientos, aunque muy débil (muy lento)
0	Muertos	No se observa ningún movimiento en los espermatozoides

Fuente: (Evans,1990) (Aisen. 2004).

5.2.6. Preparación de los dilutores

Se contempló la preparación del dilutor para el día de su utilización o posterior a ella. Los dilutores fueron preparados de acuerdo a las recomendaciones técnicas de cada casa comercial como se describe a continuación:

1. Optixcell

El dilutor **Optixcell**, se preparó en una relación 1:2 con agua destilada estéril previamente temperado a 37°C de acuerdo al volumen requerido, es posible preparar Optixcell, siempre que se mantenga la proporción de 2 partes de agua con 1 parte de concentrado(dilutor), los componentes de la solución deben estar a una temperatura de 37°C formando una solución homogénea en la bureta la que debe ser cubierta con papel film para asegurarnos que esta no se derrame al momento de la mezcla.

2. Andromed®

El dilutor **Andromed**®, se preparó en una relación 1:4 con agua destilada estéril previamente temperado a 37ºC, de acuerdo al volumen requerido es posible preparar Andromed, siempre que se mantenga la proporción de 4 partes de agua con 1 parte de concentrado (dilutor). El dilutor preparado AndroMed® debe temperarse antes de su uso en un baño-maría a 37ºC.

3. Steridyl

El dilutor **Steridyl**, se preparó en una relación 1:1.5 con agua destilada estéril previamente temperado a 37ºC, de acuerdo al volumen requerido es posible preparar Steridyl, siempre que se mantenga la proporción de 1.5 partes de agua con 1 parte de concentrado (dilutor). El dilutor preparado Steridyl debe temperarse antes de su uso en un baño-maría a 37ºC.

5.2.7. Dilución del semen

- Él tubo colector con la muestra de semen y las probetas etiquetadas con los dilutores se colocaron en baño de agua a 37 ºC, cuidando que el agua supere el nivel del material seminal, para asegurar la uniformidad térmica.

- El semen fresco se diluyó a 37 ºC, agregando suavemente el semen por las paredes del recipiente que contiene cada dilutor a la mitad de la concentración deseada, Para la dilusión se la realizo en una relación de una parte de dilutor por cuatro partes de semen 1:4 (semen: dilutor, ml/ml),
- Se homogenizo suavemente el semen y el diluyente mediante una agitación manual.
- El semen parcialmente diluido se enfrió gradualmente hasta 5 ºC en un periodo de 45 a 50 minutos, para lograr una preservación adecuada de los espermatozoides evitando el shock térmico, se debe realizar este procedimiento porque es necesario el descenso cuidadoso de la temperatura de 37°C hasta 5°C
- El semen enfriado se diluyó lentamente, mediante la adición de los dilutores comerciales.
- Al finalizar la dilución, el semen ampliado se analizó mediante el microscopio para observar la motilidad individual. Por medio de este examen se determinó el porcentaje de espermatozoides motiles en las muestras.

5.2.7.1. Periodo de adaptación y equilibramiento

Una vez mezclados el semen con el dilutor, se procedió con el periodo de adaptación al frio, alcanzando una temperatura de 5 ºC, la siguiente etapa es el equilibramiento que consiste como el tiempo en el cual el glicerol del dilutor penetra dentro de los espermatozoides y se establece un equilibramiento intra y extracelulares, así como otros componentes activos se equilibran durante este tiempo agua, fosfolípidos que se reagrupan y desplazan a las proteínas durante tres a cuatro horas.

5.2.7.2. Rotulado de pajuelas

Las pajuelas se identificaron con un marcador indeleble con el siguiente detalle: Numero de arete y nombre del carnero y fecha de procesamiento.

5.2.7.3. Envasado del semen en pajuelas

Antes del envasado el semen diluido se introdujo a un cámara de refrigeración hasta llegar 5°C durante 3 horas para equilibrar la temperatura de las muestras, transcurridas las 3 horas cada una de las muestras diluidas fueron preparadas para el envasado. Se homogenizo muy bien el semen diluido antes de proceder al llenado de las pajuelas.

Para proceder al llenado de las pajuelas se les toma del extremo con tapón (para no transmitir el calor de la mano al semen). Las pajuelas se cargaron pipeteando las dosis seminales a través del tapón sumergiendo el extremo sin tapón en el semen.

Una vez llenadas se secaron con papel absorbente, creando un vacío en el extremo sin tapón y se sella dicho extremo con golpes suaves y perpendiculares sobre una placa que contenga el polvo de alcohol polivinílico. Inmediatamente se sumergen en un recipiente con agua para que gelifique y selle el tapón recientemente formado. Es importante que esta operación se lleve a cabo con rapidez y a baja temperatura.

Cuando se vayan a congelar pajuelas se debe dejar un pequeño espacio de aire en ellas (en el extremo por donde se llena) para evitar que se rompan al congelarlas. Las pajuelas que contenga el semen diluido, se enfrían en dos etapas, se coloca en pajuelas premarcadas, después de enfriadas a 5°C, se mantiene a esa temperatura durante 1,0-1,5 horas, para que exista equilibrio entre el semen y el glicerol, y luego se congelan.

5.2.7.4. Congelado de pajuelas

Antes del congelamiento de las pajuelas se volvió a realizar dos pasos que ya se hicieron anteriormente.

- Refrigeración (Llevando las pajuelas a una temperatura de 5°C) estabilización o equilibrio

El proceso de congelación se realizó en relación a los protocolos empleados en cada uno de los dilutores, el semen de ovino una vez que fue diluido, envasado y secado con papel absorbente fueron colocados en un marco de aluminio apoyando solo sus

extremos y cuidando que no se toquen entre sí. La congelación se realizó colocando las pajuelas en una canastilla y con la ayuda de una toalla se evitó la salida del vapor de nitrógeno mientras las pajuelas se encontraban suspendidas a unos 6 centímetros sobre la superficie de nitrógeno procediéndose el congelamiento gradual.

El congelado se realizó sobre vapores de nitrógeno líquido, de 5 ºC se descendió a -120 y -130 ºC manteniendo las pajuelas en forma vertical.

La duración del congelado fue de 10 minutos. Una vez congelada las pajuelas se las sumergió en nitrógeno líquido a – 196 ºC en un termo, hasta el momento de la descongelación para su evaluación.

5.2.7.5. Almacenamiento de pajuelas

Las pajuelas de semen congelado de carnero fueron almacenadas en tanques con nitrógeno líquido a -196 ºC.

Figura 13. Almacenamiento del semen congelado

Fuente: Elaboración propia (2022)

5.2.7.6. Descongelación de las pajuelas

Las temperaturas y velocidades de descongelamiento son críticas para la fertilidad del semen, mencionándose como norma general que mientras más rápido se congele y descongele el semen se obtendrá una mayor recuperación espermática (Valencia *et al*., 1994). A la hora de evaluar el semen descongelado, el factor más importante a tomar en cuenta es el estudio de la motilidad, seguido por el porcentaje de acrosomias, la resistencia osmótica, el porcentaje de espermatozoides vivos, anormalidades

espermáticas, actividad enzimática intracelular o extracelular y finalmente otros factores como la aglutinación o penetración de ovocitos (Vázquez *et al*.,1998).

Tomando en cuenta a varios autores, se procedió al descongelamiento de las pajuelas después de mantenerlas almacenadas en nitrógeno líquido, se tomaron las pajuelas del termo que se encontraban a una temperatura de -196°C, previamente identificadas.

- Las pajuelas se descongelaron a baño maría, colocando especial atención a la temperatura y tiempo de permanencia durante el proceso.
- Se las sumergieron en agua a 37°C por 10 - 30 segundos, transcurrido el tiempo fueron retiradas del agua y secadas con papel toalla.
- Se realizaron cortes en los extremos de la pajuela para luego observar la muestra.
- Inmediatamente se evaluó el porcentaje de espermatozoides vivos, muertos y anormales mediante la tinción de eosina-nigrosina, además el movimiento progresivo.

5.2.8. Análisis del semen post descongelado

En la evaluación post-descongelamiento se realizó la estimación de la calidad del semen al descongelamiento con el uso de dilutores comerciales para su criopreservación.

5.2.8.1. Motilidad individual post descongelado

Indicador importante de la viabilidad de los espermatozoides al descongelamiento. Se colocó una gota de semen entre el porta y cubreobjetos que estaban atemperadas, posteriormente se procedió a evaluar en el microscopio óptico a 40X, se observaron los campos para calcular el porcentaje de espermatozoides con movilidad.

- **Tinción vital (eosina-nigrosina)**

Una vez realizada la evaluación motilidad individual se procedió a realizar las tinciones para el conteo de espermatozoides vivos y muertos como también con la tinción se observa la presencia y ausencia de los acrosomas en las células espermáticas. utilizando la técnica descrita por (Evans y Maxwell,1990).

En un portaobjetos se colocó una gota de eosina-nigrosina, luego una gota de semen descongelado, inmediatamente se homogenizo la muestra para luego realizar un frotis, se dejó reposar por unos segundos para luego llevarlo a observación donde se contó 100 espermatozoides en campos diferentes con objetivo 100X del microscopio. (Torres y Agraz, 1989).

5.2.8.2. Vitalidad espermática

Se realizó la homogenización de una gota de semen con otra gota de eosina-nigrosina en el portaobjetos, luego se realizó un frotis y se dejó reposar por unos segundos. Se llevó a observación con un objetivo de 100X con aceite de inmersión. Se examinó 10 campos diferentes. En la observación y evaluación, las células muertas aparecieron teñidas con un tono rosado y las células vivas aparecieron claras no teñidas.

5.2.8.3. Morfología espermática

Se realizó la homogenización de una gota de semen con otra gota de eosina-nigrosina en el portaobjetos, luego se realizó un frotis y se dejó reposar por unos segundos en la platina térmica. Y se la llevó a observación con un objetivo de 100X con aceite de inmersión. Se examinó 10 campos diferentes, diferenciando las células normales de las anormales. El estado del acrosoma fue fácilmente evaluado por la clara tinción púrpura que presentó el contenido acrosoma, así como se mostraron las anormalidades de estas.

5.2.8.3.1. Anormalidades de los espermatozoides

Las anormalidades se clasifican en primarias o secundarias según el lugar donde se localicen. Las anormalidades primarias representan alteraciones de la espermiogénesis (es decir, dentro los testículos), y pueden ser cabezas dobles, macrocéfalo, microcéfalo, colas enrolladas, colas dobles, gota citoplasmática proximal,

etc. En tanto que las anomalías secundarias son inespecíficas y ocurren durante el tránsito por el epidídimo (gota citoplasmática mediales distales, colas rotas, etc.) estas anormalidades pueden apreciarse en las siguientes imágenes.

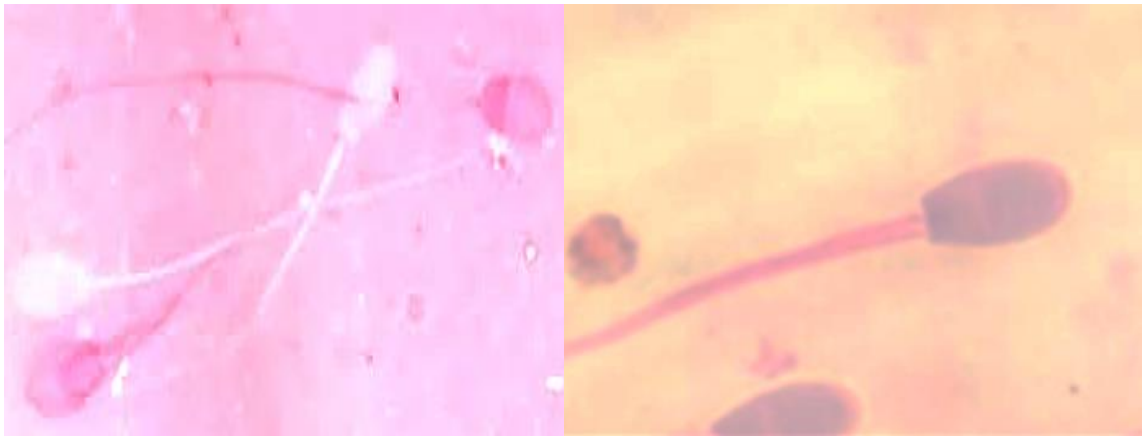


Figura 14. Espermatozoides de carnero teñidos con la coloración negrosina-eocina

Fuente: Elaboración propia (2022)

5.3. Diseño experimental y análisis estadístico

Para el análisis de los valores resultantes del estudio se los dividió en dos fases

Fase 1. Diseño experimental

Para esta fase se consideró un diseño completamente aleatorio (DCA) con el factor "carnero" es decir dos tratamientos

5.3.1. Modelo estadístico

El modelo estadístico más adecuado a la investigación fue la prueba de t de Student para medias independientes por que permite realizar comparaciones de medias en muestras pequeñas con números de datos menor a 30 datos (Murray y Larry, 2001).

$$t_c = \frac{\tilde{x}_1 - \tilde{x}_2}{\sqrt{\frac{S_c}{n_1} + \frac{S_c}{n_2}}}$$

$$S_c = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)\, {S_1}^2 + (n_2 - 1){S_2}^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

Donde:

t_c= t calculado

$\tilde{x}_1$= Promedio de datos carnero 1,5 años

$\tilde{x}_2$= Promedio de datos carnero 3,5 años

S_c= Desviación estándar calculado

n_1= Número de datos carnero 1,5 años

n_2= Número de datos carnero 3,5 años

S_1= Desviación estándar de carnero 1,5 años

S_2= Desviación estándar de carnero 3,5 años

- **Factor de estudio**

El presente trabajo de investigación se basa en el estudio de semen fresco de ovino de dos carneros de diferentes edades

5.3.2. Tratamientos

Edad de carnero 3,5 años

Edad de carnero 1,5 años

5.3.3. Variables de respuesta estudiadas

Volumen

pH

Motilidad masal (MM)

Fase 2. Diseño experimental

En la investigación se estudió el efecto de dos factores de estudio; el factor A estuvo constituido por tres tratamientos de criopreservación considerando la utilización de tres dilutores comerciales (Optixcell®, Steridyl y AndroMed®), mientras que en el factor B se consideró la utilización de la edad de los carneros para la distribución de tratamientos y análisis de resultados al post descongelamiento (Ochoa, 2007).

5.3.4. Modelo estadístico

Las cuales se analizaron con un diseño completamente al azar (DCA) con arreglo bi factorial cuyo modelo es:

$$Yijk = \mu + \alpha i + \beta j + (\alpha\beta)ij + \in_{ijk}$$

Dónde:

Yijk: Una observación cualquiera

μ **:** Media general

α**i:** Efecto i-esimo nivel del factor dilutor (A)

β**j:** Efecto i-esimo nivel del factor carnero (B)

($\alpha\beta$)ij: Efecto de la interacción dilutor y carnero (AxB)

$\in_{ijk}$**:** Error Experimental

En esta fase se consideró 2 factores los cuales fueron:

- **Factor A: Dilutores**

a1: Optixcell

a2: Steridyl

a3: Andromed

- **Factor B: Carneros (edad)**

b1: 3,5 años

b2:1,5 años

5.3.5. Tratamientos

a1: Optixcell

a2: Steridyl

a3: Andromed

- **Combinaciones**

		Combinaciones dilutores por carneros	
FACTOR A	**FACTOR B**	I	II
a1	b1	a1b1	a1b1
	b2	a1b2	a1b2
a2	b1	a2b1	a2b1
	b2	a2b2	a2b2
a3	b1	a3b1	a3b1
	b2	a3b2	a3b2

5.3.6. Variables de respuesta estudiadas

Para cuantificar el comportamiento de los tratamientos descritos, se realizaron evaluaciones a la dilusión y post descongelación del semen ovino, midiendo las siguientes variables.

Motilidad individual (MI): motilidad de los espermatozoides con movimiento lineal progresivo a la dilusión.

Motilidad individual (MI): motilidad de espermatozoides con movimiento lineal progresivo al descongelamiento, para determinar la habilidad de cada diluyente como protector durante el congelamiento profundo (-196 ºC).

Vitalidad porcentaje de vivos y muertos al descongelamiento

Morfología porcentaje de normales y anormales al descongelamiento

5.4. Análisis económico

5.4.1. Determinación de costos

Para el cálculo de costos de producción en la elaboración de las pajuelas crioconservadas con los diferentes dilutores, se realizó un estimado de los costos fijos y costos variables en que se incurrió, para poder determinar el costo total de cada dilutor por pajuela.

Depreciaciones

$$DP = \frac{CI - CF}{VU}$$

Donde:

DP= Depreciación
CI= Costo inicial
CF= Costo final
VU= Vida útil

5.4.2. Determinación del costo total

El costo total fue calculado mediante la suma de los costos fijos y los costos variables, utilizando la siguiente fórmula:

$$CT = CVT + CFT$$

Donde:

CT = Costo total
CVT= Costo variable total
CFT= Costo fijo total

5.4.3. Determinación de costos de producción

Desembolso efectivo que se hace en la adquisición de factores de producción empleados para producir bienes y servicios.

5.4.4. Determinación del ingreso o beneficio bruto

El valor monetario se obtiene de multiplicar el volumen o rendimiento de la producción por el precio de ese producto.

5.4.5. Determinación del ingreso o beneficio neto

Compensación a todos los recursos que se usan en la producción, se obtiene restando el total de los costos variables de los ingresos brutos (Herrera *et al*., 1994).

beneficio neto = total de beneficio bruto – total costos variables

5.4.6. Determinación de beneficio / costo

Es el retorno en dinero obtenido por cada unidad monetaria invertida. Por definición resulta, de dividir en ingreso bruto (Herrera *et al*., 1994).

Para efectuar el cálculo de beneficio / costo de producción en la elaboración de las pajuelas crioconservadas con los diferentes dilutores, se realizó un estimado de los beneficios brutos y neto en que se incurrió, para poder determinar el beneficio al producir las pajuelas por cada dilutor.

$$BC = \frac{BBT}{CT}$$

Donde:

BC= Beneficio costo

BBT= Beneficio bruto total

CT=Costos totales

6. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1. Características macroscópicas y microscópicas en semen fresco

6.1.1. Volumen de semen fresco

En la tabla 6 se observa la comparación de los volúmenes obtenidos de los carneros en la variable volumen en semen fresco realizada para las edades de los carneros.

Tabla 6. Prueba de "t" Student para el volumen en semen fresco por edad de carnero

Edades	Media volumen	t - Student
Edad 1,5 años	1,76	A
Edad 3,5 años	1,78	A

(**) = altamente significativa;(*) = Significativo; NS = no significativo

En la Tabla 6 nos indica que al realizar la comparación de medias de la prueba de "t" student a la probabilidad del (5%) nos muestra que no existen diferencias significativas estadísticamente(p>0.05), para el volumen en semen fresco para cada carnero, las edades no influyeron en la variable, ya que las muestras se evalúan en semen fresco, por lo tanto, cada carnero tubo un resultado sobre la variable volumen, indicando que los datos son confiables ya que están dentro del rango permitido.

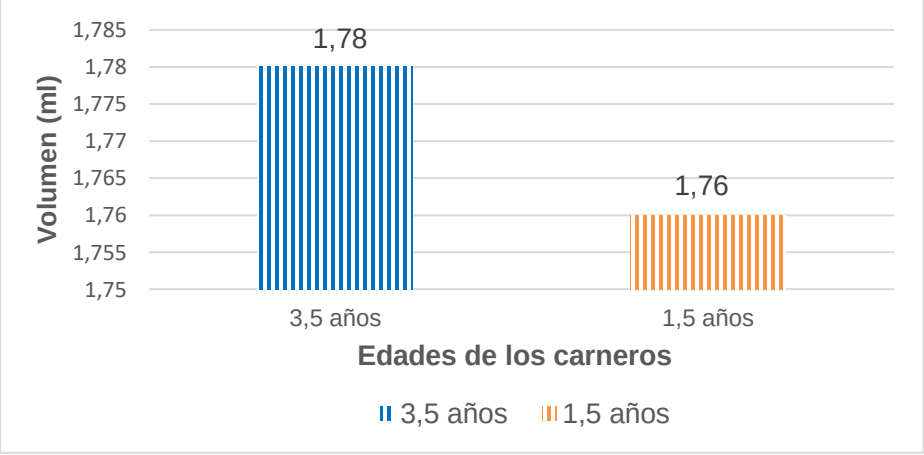


Figura 15. Comparación de medias "t" student para volumen en semen fresco

En la figura 15 se puede observar las muestras obtenidas del carnero de 3.5 años presento un volumen de 1.78 ml y el carnero de 1.5 años presento un volumen de 1.76

ml, según Garner y Háfez (2000) los volúmenes de semen están dentro los rangos de 0.8 a 1.2 ml siendo los resultados obtenidos en la presente investigación superiores.

Según Ramos (2011), al evaluar el Efecto de dilutores y dos tiempos de equilibrio en la criopreservación de semen ovino, obtuvo en semen fresco un volumen de eyaculado para carneros de tres edades (1.7, 2.7 y 4.5 años), donde no reportó diferencia significativa entre edades (P>0.05), posiblemente porque las edades evaluadas se encontraban en una etapa de reproducción activa, aunque los animales con mayor edad, presentaron mayores volúmenes de semen. Lo mismo que en esta investigación.

Estos promedios de volumen de semen encontrados en el presente trabajo, están dentro los rangos obtenidos por Orellana (2009) Características seminales e integridad de la membrana espermática post refrigeración en carneros Blackbelly y Assaf del banco nacional de semen – La Molina, que reporta de 36 eyaculados para ambas razas Assaf y Blackbelly, un volumen promedio de 1.94 ± 0,69cc y 1,43 ± 0,58cc respectivamente encontrándose diferencias significativas (P≤0,05) cuyas edades oscilaban entre 3,5 años**,** Palacios (2005) con 1.25 ml para la raza Blackbelly con cuatro años de edad y Chunata (2019), quien reporta volúmenes entre 1.43 - 1.83 ml para la raza Blackbelly y Pelibuey razas tropicales de 31 meses.

6.1.2. pH de semen fresco

En la tabla 7 se observa la comparación de la variable pH en semen fresco realizada para cada carnero.

Tabla 7. Prueba de "t" Student para el pH en semen fresco por edad de carnero

Edades	Media pH	t - Student
Edad 1,5 años	6,86	A
Edad 3,5 años	6,74	A

(**) = altamente significativa;(*) = Significativo; NS = no significativo

En la tabla 7 nos indica que al realizar la comparación de medias de la prueba de "t" student a la probabilidad del (5%) nos muestra que no existen diferencias significativas estadísticamente(p>0.05), indicando que el efecto de edades no influyo sobre los

resultados en semen fresco de carneros Corriedale, pero también muestra que si existe diferencia numérica.

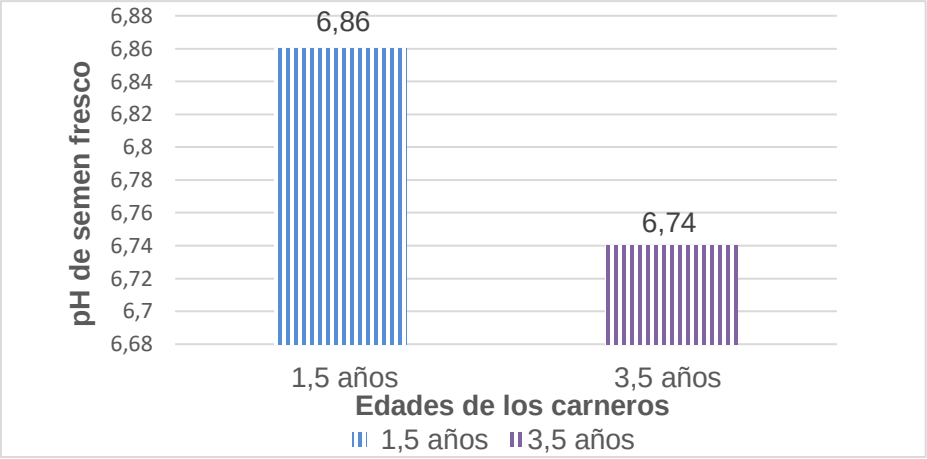


Figura 16. Comparación de medias “t” student para pH en semen fresco de carneros

En la figura 16 se pueden observar los valores de pH obtenidos del semen de carneros no presentaron diferencias significativas (P >0.05). se pueden interpretar que el efecto de las edades no influyo en los resultados obtenidos, donde el semen de carneros con mayor edad presentó una mayor concentración espermática, por tanto, una mayor acidez, en tanto el carnero joven presento una alta concentración espermática con tendencia a la alcalinidad en su pH arrojando resultados para el carnero de 1,5 años presentando un pH de 6.86, a diferencia del carnero de 3,5 años que presento un pH de 6.74. Estos promedios, están dentro los rangos encontrados por varios autores, como Garner y Hafez (2000), con 5.9 - 7.3.

Ramos (2011), reporto valores de 7,0 a 6.8 trabajando con carneros de la raza Corridale; Orellana (2009), obtuvo un pH de 7,0 donde trabajo con las razas de Assaf y Blackbelly. El cual indica que un semen de buena calidad, tiende a ser ligeramente ácido a neutro sin sobrepasar los valores llegando a alcalinidad ya que este valores superiores a 7,6 están asociados con alteraciones en las reacciones genitales, la acidez depende del número de células espermáticas por cuanto a mayor concentración de células mayor metabolismo en consecuencia mayor producción de ácido láctico; en cambio la alcalinidad existe cuando se tiene menor concentración de espermatozoides en consecuencia poca actividad espermática. Los valores promedio

encontrados por Sánchez (2009), "Efecto de dos dilutores sobre la motilidad y el porcentaje de espermatozoides vivos en el semen congelado de ovino (*ovis aries*)" para el pH fueron de 6.57 ± 0.02 para la raza Blackbelly y 6.57 ± 0.01 para la raza Assaf está dentro de los rangos normales reportados por Hafez, (2000); sin embargo, se muestran por debajo de los citados por Gibbons et al. (2004), Estas diferencias pueden atribuirse a los factores raza, individuo, frecuencia de colección y destreza del operador, tal como lo manifiestan Evans y Maxwell, (1990) y Gibbons et al. (2004).

6.1.3. Motilidad masal de semen fresco

En la tabla 8 se observa la comparación de la variable motilidad masal en semen fresco realizada para cada carnero.

Tabla 8. Prueba de "t" Student para motilidad masal en semen fresco por edad de carnero

Edades	Media Motilidad Masal	t - Student
Edad 1,5 años	4,8	A
Edad 3,5 años	5	A

(**) = altamente significativa;(*) = Significativo; NS = no significativo.

En la tabla 8 nos indica que al realizar la comparación de medias de la prueba de "t" student a la probabilidad del (5%), se observa los promedios de la variable motilidad masal entre carneros de semen fresco, donde se puede evidenciar que no existe diferencias significativas (P>0.05). Sin embargo, la valoración de motilidad masal obtenida varia de 4 a 5, considerando la escala de valoración, donde el carnero con 3,5 años de edad obtuvo la valoración "5", y para el carnero más joven 1.5 años se obtuvo una valoración "4" Finalmente, para la valoración de "2, 1 y 0" no se presentaron casos ya que de ser así estos serían descartados como buena muestra de semen datos respaldados por (Cueto,2004; Gibbons, 2016) (Maxwell Evans, 1990).

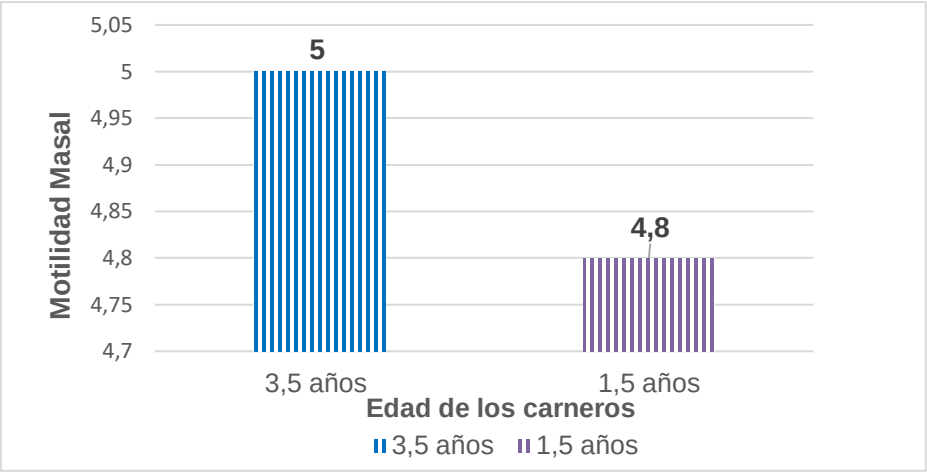


Figura 17. Comparación de medias "t" student para motilidad masal en semen fresco

En la figura 17 se observan la calificación de la variable de respuesta motilidad masal en semen fresco, la valoración de motilidad masal obtenida varia de 4 a 5, considerando la escala de valoración, donde el carnero con 3,5 años de edad obtuvo la valoración "5", y para el carnero más joven 1.5 años se obtuvo una valoración "4,8" Finalmente, para la valoración de "2, 1 y 0" no se presentaron casos ya que de ser así estos serían descartados como buena muestra de semen datos respaldados por (Cueto,2004; Gibbons, 2016) (Maxwell Evans, 1990).

Palacios (2005), quien reporta motilidad masal de alto grado en la escala de Herman Swanson, entre 4 y 5, por la alta concentración espermática ovina; sin embargo, estos resultados probablemente están influenciados por la metodología de colección, época realizada, edad de los carneros, condiciones medio ambientales al momento de la colección tal como indica (Córdova-Izquierdo *et.al*., 2006).

Por su parte Ramos (2011), realizo el análisis en semen fresco de las razas Corridale obteniendo un promedio de motilidad masal de 5 para el carnero de 2,7 años, 4 para el carnero de 4,5 años y 3 para el carnero de 1,7 años, por lo tanto, los resultados indican que la valoración de motilidad masal varia de 3 a 5, considerando la escala de Herman Swanson.

Orellana (2009), indica que los resultados de la motilidad masal de la raza Assaf y la raza Blackbelly de 77 + 8.18% y 73 + 6 % respectivamente. No evidenciaron diferencias significativas entre los promedios (P>0,05). Estos resultados son indicativos de una alta motilidad, evaluada en una escala subjetiva entre 0 y 100 %, valorándola con un "4" tal como lo recomienda (Gibbons et al 2004); de manera que el semen utilizado en el presente trabajo tuvo una mayor motilidad masal luego de su colecta.

Escudero (2015), reporta resultados de la motilidad masal observada microscópicamente, en las diferentes recolecciones realizadas, presentando un promedio de 99,00+1,04 %, lo cual está dentro de los rangos normales, de un semen de calidad, aunque para la evaluación de este parámetro se necesita mucha experiencia ya que la apreciación de esta variable es subjetiva.

6.2. Características microscópicas de semen de ovino sometido a dilusión y post descongelación.

6.2.1. Motilidad individual en semen diluido por dilutores

En la tabla 9 se observa el análisis de varianza de la motilidad individual de semen diluido

Tabla 9. Análisis de la motilidad individual en semen diluido antes del congelamiento

FV	SC	GL	CM	F	p-valor
Dilutores	368,6	2	184,3	7,85	0,0024**
Edades	100,83	1	100,83	4,3	0,0491*
Dilutores*Edades	164,87	2	82,43	3,51	0,0459*
Error	563,2	24	23,47		
Total	1197,5	29			

CV: Coeficiente de variación 5,8% (**) = altamente significativa;(*) = Significativo; NS = no significativo.

La tabla 9 nos indica que en el análisis estadístico si existe diferencias altamente significativas entre los dilutores Factor A (P<0.01) con un coeficiente de variación de 5,8%, indica que los datos son confiables. También nos muestra que existe una

diferencia significativa en el Factor B (P<0.05) entre los promedios de motilidad individual. Entre la edad de ambos carneros donde el carnero 1232 “Gordo” con una edad de 3,5 años , presento uno de los promedios más elevados de motilidad individual siendo superior estadísticamente al carnero 1330 “Rojo” mostrando que ambos carneros presentaron promedio casi similares estadísticamente, significando que las muestras colectadas son de buena calidad al apreciar el movimiento individual de las células espermáticas de forma progresiva y rectilínea el cual es un indicador de la viabilidad del semen ya que puede aplicarse en un programa de inseminación. En la interacción de dilutores por edad se observa una diferencia estadísticamente significativa (P<0.05).

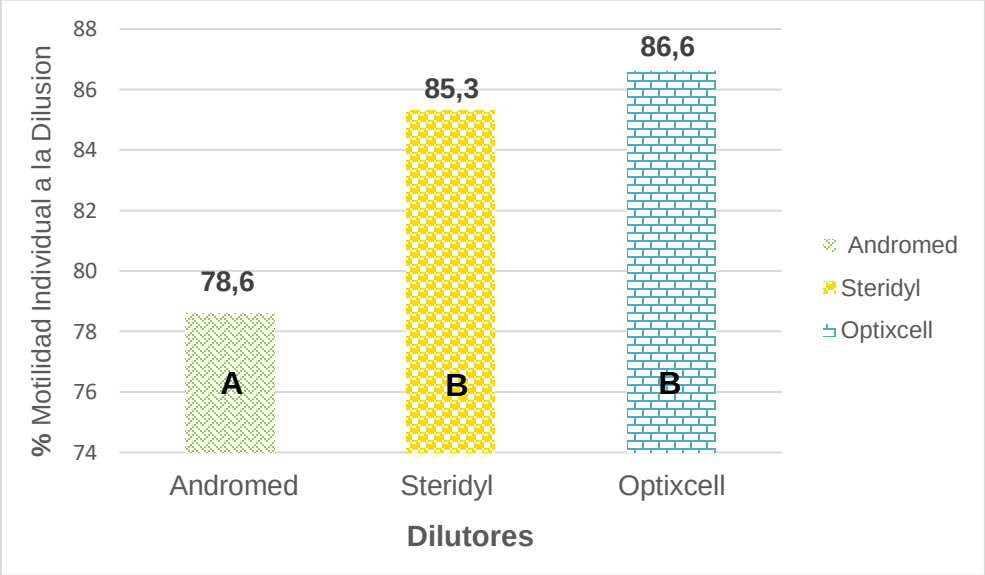


Figura 18. Motilidad individual espermática del semen de ovino antes del congelamiento por dilutores.

En la figura 18 mediante las pruebas estadísticas de Tukey los tratamientos se clasifican en dos grupos (A y B). En cuanto a las medias obtenidas Optixcell con 86,6 % de motilidad individual diluido representado por la letra B es mayor con respecto a Steridyl con 85,3% que también se representa por la letra B indicando que el de menor motilidad individual a la dilusión fue de Andromed con un 78,6%.

Pillajo (2015), reporto resultados donde se observan valores de Motilidad Individual, de los diferentes Diluyentes (Factor A) e interacciones frente a la edad. Presentan en promedio general para: Andromed 58,5%, Triladyl 77,5% y Optixcell el 61,75%.

Los datos reportados por Escudero (2015) indican que la motilidad individual registrada en el semen de carnero luego del periodo de estabilización pre criopreservación presentó diferencias estadísticas (P<0,01), es así que se identificó la mejor motilidad individual en el semen, al emplear congelamiento lento y diluyente Triladyl alcanzando una media de 90.1 % Andromed con 85,30 % y Ovixcell con 80% de motilidad, posteriormente fue registrado el promedio alcanzado en el semen procesado al emplear congelamiento lento. Muños (2018), en un estudio comparativo de tres diluyentes (Andromed. Triladyl y Citrato de sodio con yema de huevo) en la preservación de semen caprino, los resultados de las mediciones en la primera fase muestran que el diluyente Andromed obtuvo una recuperación espermática del 75% con Triladyl 64% y el citrato de sodio 60%.

6.2.2. Motilidad individual en semen diluido dilutor por edad

En la tabla 10 se observa el análisis de varianza de la variable motilidad individual de semen diluido

Tabla 10. Análisis de la motilidad individual en semen diluido antes del congelamiento

FV	SC	GL	CM	F	p-valor
Dilutores	368,6	2	184,3	7,85	0,0024**
Edades	100,83	1	100,83	4,3	0,0491*
Dilutores*Edades	164,87	2	82,43	3,51	0,0459*
Error	563,2	24	23,47		
Total	1197,5	29			

CV: Coeficiente de variación 5,8% (**) = altamente significativa;(*) = Significativo; NS = no significativo.

En la tabla 10 se observa que en la interacción de dilutores por edad si existe una diferencia estadísticamente significativa de (P<0.05) en las pruebas de Tukey.

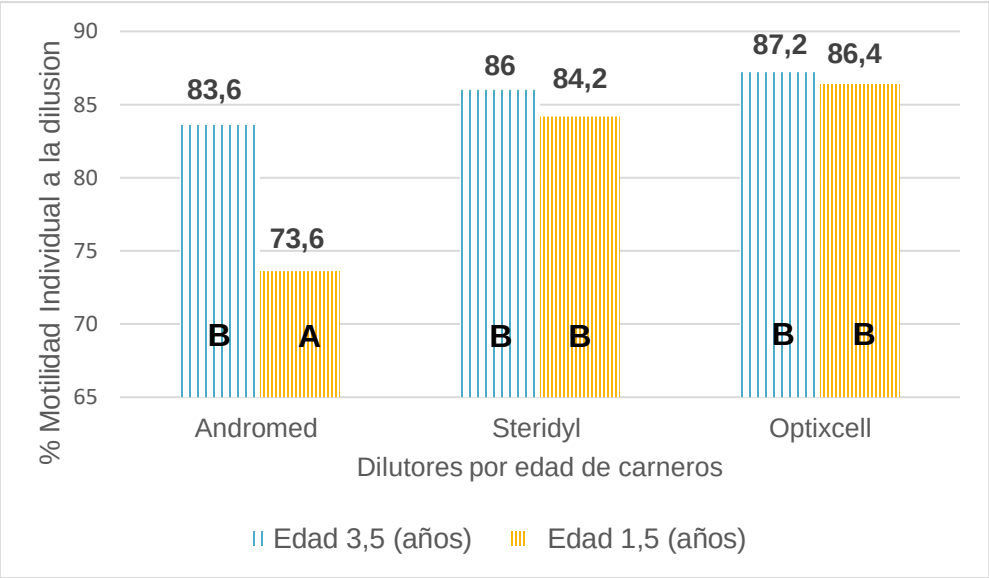


Figura 19. Motilidad individual espermática del semen antes del congelamiento dilutor por carnero.

La figura 19 muestra que en la interacción dilutores por edad se formaron dos grupos (A y B) donde el carnero 1232 “Gordo” con una edad de 3,5 años, presentó uno de los promedios más elevados de motilidad individual con cada uno de los dilutores dando un valor para Optixcell 87,2%; Steridyl 86%; y Andromed 83,6% siendo superior estadísticamente al carnero 1330 “Rojo” con una edad de 1,5 años que presentó un promedio de motilidad individual antes del congelamiento con Optixcell 86,4%; Steridyl 84,2; y Andromed 76,6%.

Ramos (2011), no encontró resultados estadísticamente significativos para la interacción. con un coeficiente de variación del experimento de 6,30%.

6.2.3. Motilidad individual en semen diluido por edad

En la tabla 11 se observa el análisis de varianza de la variable motilidad individual de semen diluido.

Tabla 11. Análisis de la motilidad individual en semen diluido antes del congelamiento

FV	SC	GL	CM	F	p-valor
Dilutores	368,6	2	184,3	7,85	0,0024**
Edades	100,83	1	100,83	4,3	0,0491*
Dilutores*Edades	164,87	2	82,43	3,51	0,0459*
Error	563,2	24	23,47		
Total	1197,5	29			

CV: Coeficiente de variación 5,8% (**) = altamente significativa;(*) = Significativo; NS = no significativo.

La tabla 11 muestra que existe una diferencia significativa en el Factor B (P<0.05) entre los promedios de motilidad individual dilutor por edad donde el carnero 1232 “Gordo” con una edad de 3,5 años, presentó uno de los promedios elevado de motilidad individual siendo superior estadísticamente al carnero 1330 “Rojo” mostrando que los carneros presentaron promedios casi similares estadísticamente. significando que las muestras colectadas son de buena calidad por apreciar el movimiento individual de las células espermáticas de forma progresiva y rectilínea el cual es un indicador de la viabilidad del semen ya que puede aplicarse en un programa de inseminación.

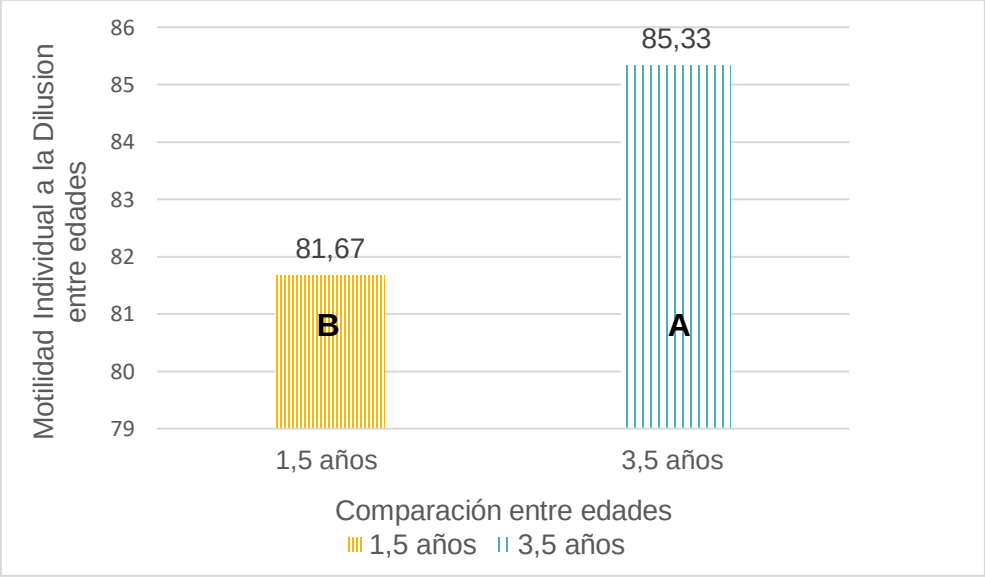


Figura 20. Motilidad individual espermática antes del congelamiento por edad

La figura 20 nos muestra que la motilidad individual a la dilusión por edad de carnero se obtuvo los resultados del carnero 1232 “Gordo” con una edad de 3,5 años, presentó un promedio de 85.3% de motilidad individual, siendo superior estadísticamente al carnero 1330 “Rojo” con una edad de 1,5 años que presentó un promedio de motilidad individual antes del congelamiento de 81,67%.

Por su parte Ramos (2011) en el análisis de varianza de la motilidad espermática en el semen diluido no detecto diferencias significativas (P >0,05), entre edades de los carneros factor A.

6.2.4. Motilidad individual en semen post descongelado por dilutores

En la tabla 12 se observa los resultados del análisis de varianza de la variable motilidad individual post descongelamiento.

Tabla 12. Análisis de la motilidad individual en semen post descongelado.

FV	SC	GL	CM	F	p-valor
Dilutores	909,07	2	454,53	23,69	<0,0001**
Edades	50,7	1	50,7	2,64	0,1171NS
Dilutores*Edades	15,2	2	7,6	0,4	0,6772NS
Error	460,4	24	19,18		
Total	1435,37	29			

CV: Coeficiente de variación 7,15 % (**) = altamente significativa;(*) = Significativo; NS = no significativo.

En la tabla 12 el análisis de varianza determinó, que los efectos debido a los dilutores (Tratamientos) presentaron diferencias altamente significativas (P<0,01). muestra que en el análisis de varianza se consideró el efecto de Factor B (edades) como también en la interacción entre Factor A y Factor B dilutores por edad de carnero (P>0,05), que son estadísticamente no significativos.

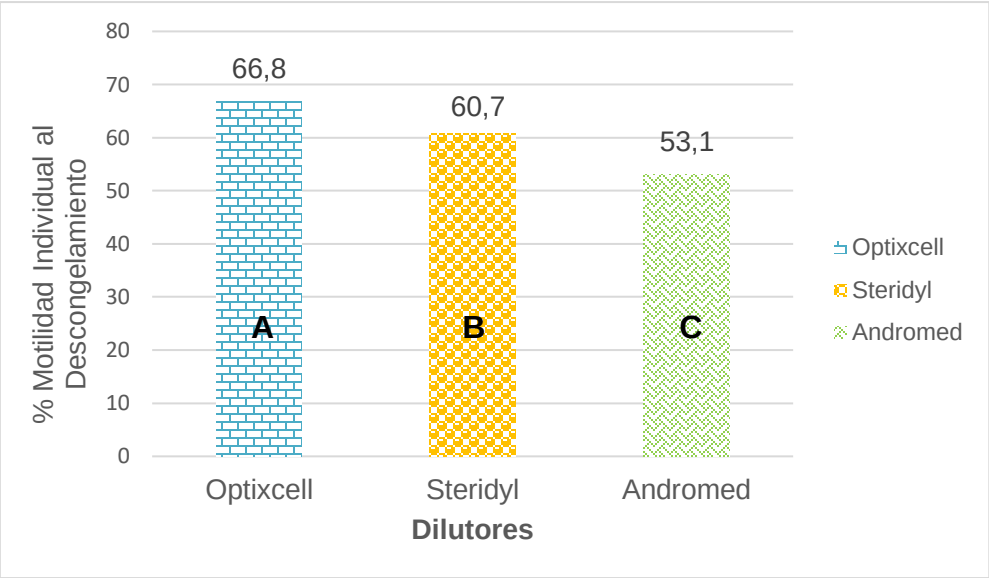


Figura 21. Motilidad individual del semen post descongelado por dilutores.

En la figura 21 las pruebas estadísticas muestran diferencias altamente significativas entre el factor A clasificados en tres grupos, presentando un promedio general en el efecto de los dilutores sobre la variable motilidad Individual de los espermatozoides post descongelado, donde el dilutor Optixcell es mayor con el 66.8%; en comparación al Steridyl con 60,7%; mostrando una disminución en la motilidad espermática para Andromed con un 53,1%, conforme el progreso del congelamiento, esto podría ser debido a los cambios que ocurrieron en las células espermáticas por diferentes factores, como la disminución o aumento de temperatura durante el procesamiento.

Por otro lado, Escudero (2015), en su investigación sobre. Preservación de semen ovino mediante vitrificación y congelamiento lento, utilizando diferentes diluyentes comerciales, en ovinos Corriedale registra una motilidad individual determinada en el semen de carnero luego del periodo de estabilización pre criopreservación presentó diferencias estadísticas ($P<0,01$) es así que se identificó la mejor motilidad Individual en el semen, al emplear el sistema de congelamiento lento de 45 y 90 días con los diluyentes Triladyl alcanzando una media de 4,80 correspondiendo esta calificación a 74 %, Andromed 4.10 equivalente a 65 % y Ovixcell con una calificación de 4 equivalente a 60 % de motilidad resultando levemente superior al valor de motilidad determinado al emplear Triladyl en la presente investigación, lo que se encontraría

relacionado con la constitución química del diluyente. siendo estos valores superiores a los reportados en la presente investigación.

Por su parte Pillajo (2015), reportó un análisis de varianza con diferencias significativas. En lo referente a la variable motilidad Individual (%), tipos de diluyentes (Factor B), el empleo de Triladyl consiguió el mayor porcentaje de motilidad con 73,3 %, estadísticamente superior a los demás tratamientos, siguiéndole por detrás esta Optixcell con 56% de motilidad, siendo el de menor motilidad para el Andromed con 46,3 %.

En un estudio comparativo de tres diluyentes (Andromed. Triladyl y Citrato de sodio con yema de huevo) en la preservación de semen caprino Muños (2018), reporto resultados de las mediciones en la fase de post-descongelación la tendencia que se observó fue que el diluyente Andromed obtuvo una recuperación espermática mayor del 40%, Triladyl 29% y el citrato de sodio 22%, si bien en esta investigación el diluyente Andromed mostro ser sobresaliente en el porcentaje de recuperación de motilidad espermática respecto a los otros diluyentes en otras pruebas como el del presente trabajo demuestran diferentes o similares resultados haciendo hincapié en la especie animal en este caso el ovino.

6.2.5. Motilidad individual de semen post descongelado por edad

Tabla 13. Análisis de la motilidad individual en semen post descongelado dilutor por edad.

F.V.	SC	GL	CM	F	p-valor
Dilutores	909,07	2	454,53	23,69	<0,0001**
Edades	50,7	1	50,7	2,64	0,1171NS
Dilutores*Edades	15,2	2	7,6	0,4	0,6772NS
Error	460,4	24	19,18		
Total	1435,37	29			

CV: Coeficiente de variación 7,15 % (**) = altamente significativa;(*) = Significativo; NS = no significativo.

La tabla 13 muestra que no existe diferencias estadísticamente significativas (P>0,05), entre los dilutores por la edad de los carneros.

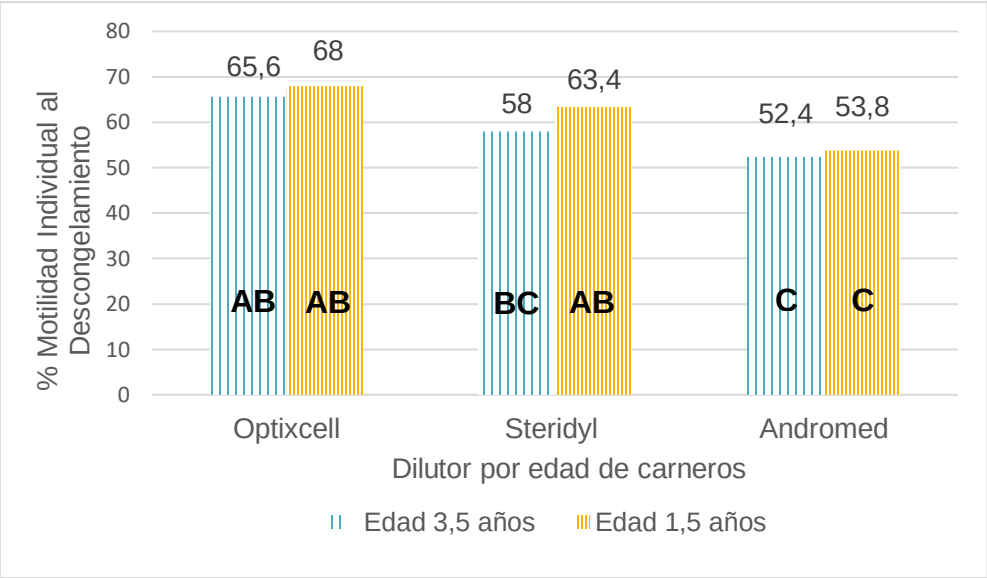


Figura 22. Motilidad individual espermática del semen después del congelamiento dilutor por carnero.

En la figura 22 no obstante se puede observar que existe diferencia numérica precentando un promedio general en el efecto de los tratamientos sobre la variable motilidad Individual de los espermatozoides post descongelado, obteniendo los siguientes promedios para el carnero Gordo (1232) con el dilutor Optixcell 65,6%; Steridyl 58% y para Andromed 52,4%, Para el carnero Rojo (1330) se obtuvo un promedio para Optixcell 68%; Steridyl 63,4% y para Andromed 53,8%.

6.3. Vitalidad espermática

6.3.1. Vitalidad espermática en semen post descongelado por dilutores

En la tabla 14 se muestran los valores obtenidos en la evaluación de espermatozoides vivos después de la congelación

Tabla 14. Análisis de vitalidad espermática en semen post descongelado

FV	SC	GL	CM	F	p-valor
Dilutores	357,07	2	178,53	9,99	0,0007 **
Edades	8,53	1	8,53	0,48	0,4961NS
Dilutores*Edades	187,47	2	93,73	5,25	0,0129 *
Error	428,8	24	17,87		
Total	981,87	29			

CV: Coeficiente de variación 5,21% (**) = altamente significativa;(*) = Significativo; NS = no significativo.

En la tabla 14 el análisis de varianza y comparación de medias Tukey muestran diferencias estadísticas altamente significativas (P<0,01), entre los dilutores Factor A, no existe diferencias significativas (P>0,05), entre las edades de los carneros Factor B. sin embargo, entre la interacción de Factor A por Factor B se mostró diferencias significativas (P<0,05).

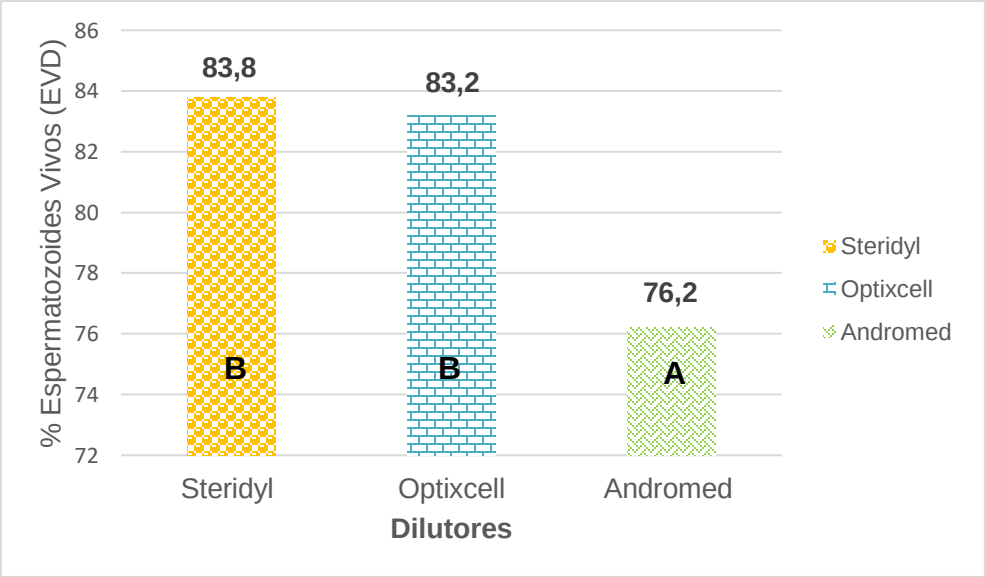


Figura 23. Porcentaje de espermatozoides vivos en semen después del congelamiento por dilutor.

La figura 23 acorde a la prueba estadística los dilutores se clasificaron en dos grupos respecto a las medias mostrando que existe diferencias altamente significativas (P<0,01), entre los dilutores presentando un efecto de los dilutores sobre la variable espermatozoides vivos (vitalidad) post descongelado, logrando una sobrevivencia

espermática para el dilutor Steridyl de 83,8 %; respecto a los otros dilutores con una sobrevivencia de 83,2% para Optixcell y con una sobrevivencia menor de 76,2%, para Andromed considerando para esta especie un valor que permite trabajar en IA.

Escudero (2015), quien en su estudio sobre preservación de semen ovino mediante vitrificación y congelamiento lento, utilizando diferentes diluyentes comerciales de semen ovino empleando tres dilutores, la vitalidad espermática establecida en el semen de carnero luego del periodo de estabilización pre criopreservación presentó diferencias estadísticas ($P<0,01$), identificando la mejor vitalidad espermática en el semen, al emplear congelamiento lento y diluyente Triladyl alcanzando una media de 97,60 %, seguido por el valor reportado en el mismo sistema de congelación y diluyente Andromed con 84,30 % de vitalidad, posteriormente fue registrado el promedio determinado en el semen procesado al emplear congelamiento lento y Ovixcell con una media de 74,60 %.

Pillajo (2015), al trabajar con 6 carneros de las razas Corriedale y Poll Dorset, en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Agraria del Ecuador, obtuvo un promedio de motilidad individual post descongelación, En los tipos de diluyentes (Factor B), la aplicación de Triladyl alcanzó el mayor porcentaje de supervivencia del 74,5 %, estadísticamente superior a los demás tratamientos, Optixcell 52,3 % demostrándose el menor valor para el empleo de Andromed con 42,3 %. En las interacciones se reflejó que la raza Corriedale, aplicando el diluyente Triladyl registró el mayor valor con 75,5 %, estadísticamente superior a los demás tratamientos, Optixcell 51 % siendo el menor valor para la raza Corriedale, empleando el diluyente Andromed con 40,5%. siendo estos datos inferiores a los que se encontró en el presente trabajo de investigación.

6.3.2. Vitalidad espermática en semen post descongelado dilutor por edad

Tabla 15. Análisis de vitalidad espermática en semen post descongelado

F.V.	SC	GL	CM	F	p-valor
Dilutores	357,07	2	178,53	9,99	0,0007 **
Edades	8,53	1	8,53	0,48	0,4961NS
Dilutores*Edades	187,47	2	93,73	5,25	0,0129 *
Error	428,8	24	17,87		
Total	981,87	29			

CV: Coeficiente de variación 5,21% (**) = altamente significativa;(*) = Significativo; NS = no significativo.

La tabla 15 muestra que existe diferencias estadísticamente significativas (P<0,05), entre los dilutores por la edad de carneros.

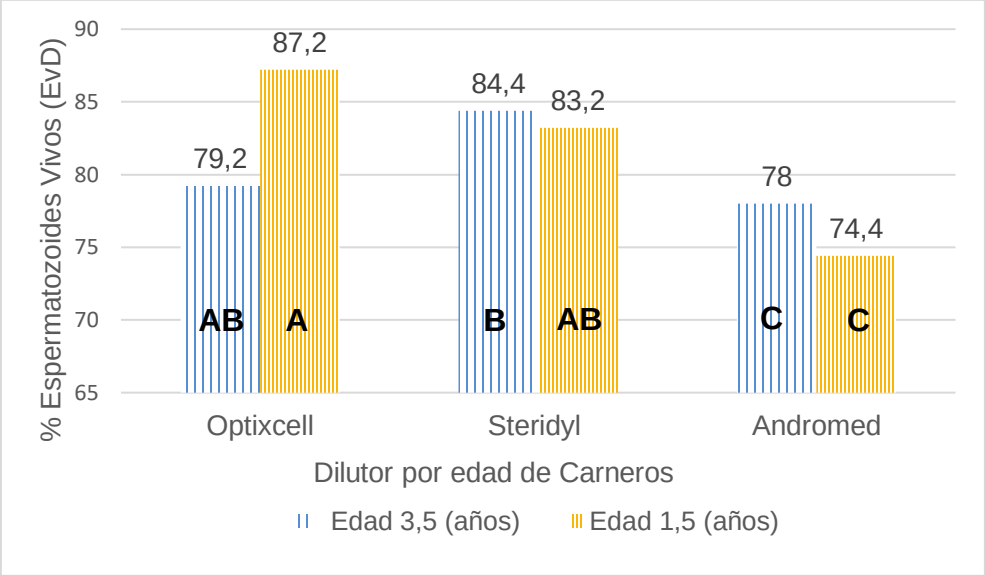


Figura 24. Porcentaje de espermatozoides vivos del semen después del congelamiento dilutor por carnero.

La figura 24 presenta un promedio de la variable espermatozoides vivos (vitalidad) al descongelamiento, obteniendo los siguientes promedios para el carnero Gordo (1232) con el dilutor Optixcell 79,2 %; Steridyl 84,4 % y para Andromed 78 %; y para el carnero Rojo (1330) se obtuvo un promedio para Optixcell 87,2 %; Steridyl 83,2 % y para

Andromed 74,4 %. Mostrando que existe mayor eficiencia con los dilutores Optixcell y Steridyl para ambos carneros.

Ramos (2011), indica que el porcentaje de espermatozoides vivos, obtenidos mostro que el carnero de más joven de 1,7 años presento menor porcentaje de espermatozoides vivos con 87,3% frente al carnero de mediana edad de 2,7 años con 92,5%.estos resultados fueron asociados al eyaculado de espermatozoides maduros, los cuales estarían evitando un daño a las moléculas y a las membranas celulares, por lo que como resultado final se obtendría mayor cantidad de espermatozoides viables en los carneros.

6.3.3. Mortalidad espermática en semen post descongelado por dilutores

En la tabla 16 se muestran los valores obtenidos en la evaluación de espermatozoides muertos después de la descongelación valores por dilutor.

Tabla 16. Análisis de mortalidad espermática en semen post descongelado

FV	SC	GL	CM	F	p-valor
Dilutores	357,07	2	178,53	9,99	0,0007 **
Edades	8,53	1	8,53	0,48	0,4961NS
Dilutores*Edades	187,47	2	93,73	5,25	0,0129 *
Error	428,8	24	17,87		
Total	981,87	29			

CV: Coeficiente de variación 22,33 % (**) = altamente significativa;(*) = Significativo; NS = no significativo.

La tabla 16 indica que en el análisis de varianza y comparación de medias Tukey se muestran diferencias estadísticas altamente significativas (P<0,01), entre dilutores Factor A, no existe diferencias significativas (P<0,05), entre la edad de los carneros Factor B, sin embargo, entre la interacción de Factor A por Factor B se mostró diferencias significativas (P<0,05).

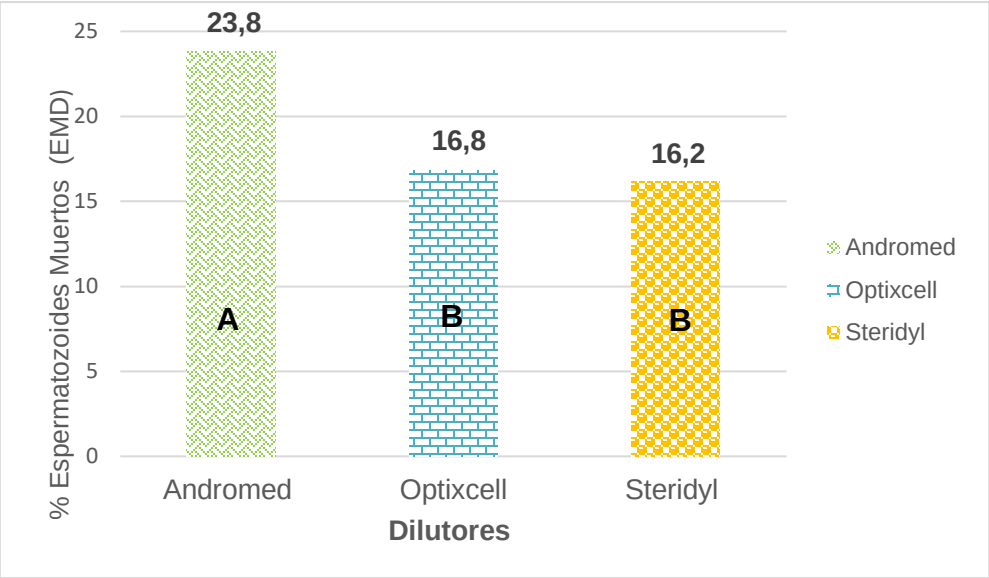


Figura 25. Porcentaje de espermatozoides muertos del semen después del congelamiento por dilutor.

Los resultados que se presentan en la figura 25 muestra que mediante la prueba de Tukey se formaron dos grupos que demuestran que existe diferencias altamente significativas (P<0,01), entre los dilutores, donde el primer grupo representando por la letra A del dilutor Andromed y la letra B representando a los dilutores Optixcell y Steridyl con un promedio general en el efecto de los tratamientos sobre la variable porcentaje de espermatozoides muertos post descongelado de acuerdo al análisis de varianza, se obtuvo un porcentaje menor de espermatozoides muertos para el dilutor Steridyl con un 16,2 % seguido de Optixcell con 16,8% y Andromed con un resultado de 23,8 % obteniendo una mayor cantidad de espermatozoides muertos por dilutor evaluado.

Por su parte Pillajo (2015), reporto en la variable (%) mortalidad, En tipos de diluyentes (Factor B), el empleo de Andromed obtuvo el mayor porcentaje de mortalidad con 58,3 %, estadísticamente superior a Optixcell con 47,8 %, siendo el de menor valor para el uso de Triladyl con 25,5 %. En las interacciones, la raza Corriedale, aplicando como diluyente Andromed reportó el mayor valor con 60,5 %, estadísticamente superior al resto de tratamientos, siendo el menor valor para la raza Corriedale utilizando Triladyl con 24,5 % de mortalidad siendo estos datos superiores a los que se encontró en el presente trabajo de investigación.

6.3.4. Mortalidad espermática en semen post descongelado dilutor por edad

En la tabla 17 se muestran los valores obtenidos en la evaluación de espermatozoides muertos después de la descongelación valores por dilutor.

Tabla 17. Análisis de mortalidad espermática en semen post descongelado.

FV	SC	GL	CM	F	p-valor
Dilutores	357,07	2	178,53	9,99	0,0007 **
Edades	8,53	1	8,53	0,48	0,4961NS
Dilutores*Edades	187,47	2	93,73	5,25	0,0129 *
Error	428,8	24	17,87		
Total	981,87	29			

CV: Coeficiente de variación 22,33 % (**) = altamente significativa;(*) = Significativo; NS = no significativo.

La tabla 17 muestra que existe diferencias estadísticamente significativas (P<0,05), entre los dilutores y edad de carneros.

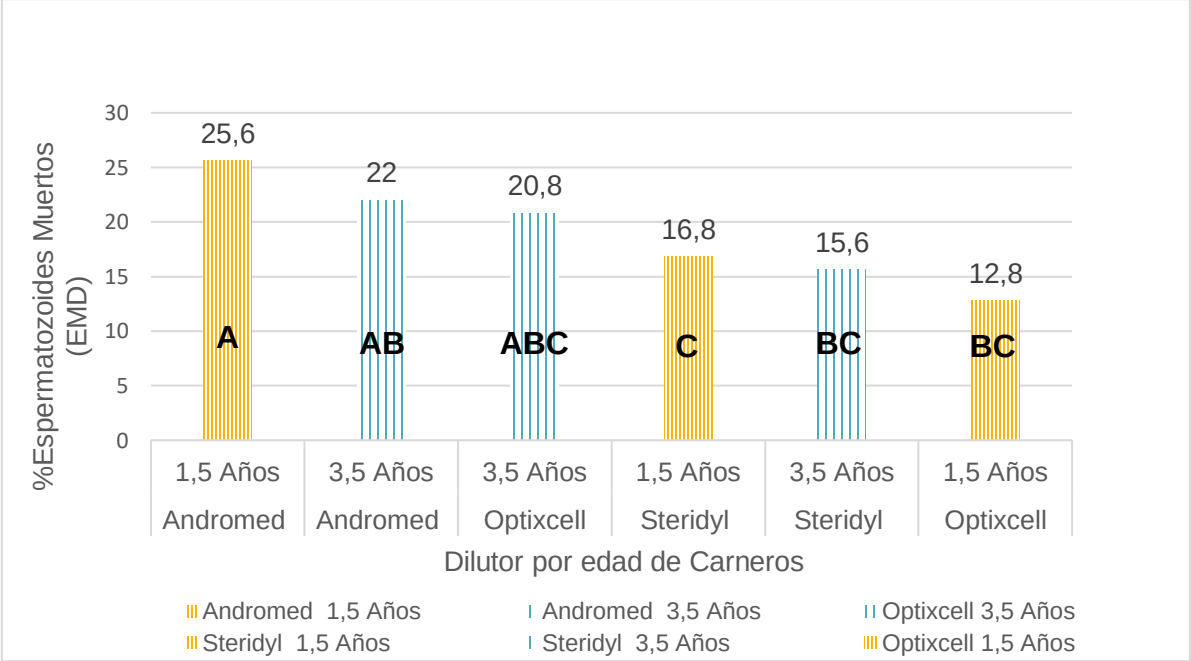


Figura 26. Porcentaje de espermatozoides muertos del semen después del congelamiento dilutor por carnero.

La figura 26 se presenta un promedio general de la variable espermatozoides muertos al descongelamiento, obteniendo los siguientes promedios para el carnero Gordo (1232) de 3,5 años siendo el de menor valor para el dilutor Steridyl 15,6 %; Optixcell 20,8 % y Andromed 25,6 %; y para el carnero Rojo (1330) de 1,5 años se obtuvo un promedio para Optixcell 11,4 %; Steridyl 17,2 % y para Andromed 29,2 %.

Ramos (2011) indica el porcentaje de muertos, obtenidos muestra que el carnero de 1,7 años presento mayor porcentaje de espermatozoides muertos con 13 % frente a los carneros de 2,7 y 4,5 años con 8,0%y 10,0 % respectivamente.

6.4. Morfología espermática

6.4.1. Morfología espermática normal en semen post descongelado

En la tabla 18 se muestran los valores obtenidos en la evaluación de espermatozoides vivos después de la congelación por dilutor y edad.

Tabla 18. Análisis de espermatozoides normales en semen post descongelado.

FV	SC	GL	CM	F	p-valor
Dilutores	129,27	2	64,63	2,32	0,12 NS
Edades	0,53	1	0,53	0,02	0,8911NS
Dilutores*Edades	80,87	2	40,43	1,45	0,2542NS
Error	668,8	24	27,87		
Total	879,47	29			

CV: Coeficiente de variación 23,67 % (**) = altamente significativa;(*) = Significativo; NS = no significativo.

El análisis de varianza y comparación de medias Tukey mostraron que no existe diferencias estadísticamente significativas (P>0,05), entre dilutores Factor A, como tampoco existe diferencias significativas (P>0,05), entre la edad de los carneros Factor B, tampoco existe diferencia estadística entre la interacción de Factor A por Factor B (P>0,05), no obstante, presentan diferencias numéricas.

Tabla 19. Porcentaje de espermatozoides normales en semen post descongelado por dilutor.

Tratamientos	(%)
Steridyl	93.9
Optixcell	90.6
Andromed	88.9

En la Tabla 19 se observa los promedios de la variable de respuesta espermatozoides normales a la que se le aplico los dilutores, obteniendo un promedio de células espermáticas normales post descongelación para Steridyl 93,9 %, Optixcell 90,6 % y Andromed con 88,9 % siendo el dilutor con menor número de células espermáticas normales de los tres dilutores.

Tabla 20. Porcentaje de espermatozoides normales en semen post descongelado dilutor por edad.

Tratamiento	Edad (años)	(%) Dilutor por edad
Steridyl	3.5	93.2
Steridyl	1.5	94.6
Optixcell	3.5	88.8
Optixcell	1.5	92.4
Andromed	3.5	91
Andromed	1.5	86.6

La tabla 20 detalla la influencia inexistente de los dilutores sobre la edad sin existir diferencias estadísticamente significativas (P<0,05), entre los dilutores y edad de carneros, presentando un promedio general de la variable espermatozoides normales al descongelamiento por edad, para el carnero de 3,5 años siendo el de mejor resultados para el dilutor Steridyl 93.2%; Optixcell 88.8 % y Andromed con un 91% de células espermáticas normales los resultados para el carnero Rojo (1330) se obtuvo un mejor promedio para Steridyl 94.6 %; Optixcell 92,4 y para Andromed 86,6%.

En las especies rumiantes el mínimo porcentaje aceptado de espermatozoides normales es 70% (Saacke et al., 1994), o lo que es igual, no mayor de 30% de atipias

totales en semen que debe ser sometido a criopreservación, debido a que gran número de espermatozoides, luego del proceso de congelación presentan daño celular. Cuando los espermatozoides son congelados y descongelados se ven sometidos a varios ciclos de deshidratación e hidratación lo que resulta en cambios significativos en la morfología (Stornelli y de la Sota, 2005).

6.4.2. Morfología espermática anormal en semen post descongelado

En la tabla 21 se muestran los valores obtenidos en la evaluación de espermatozoides con anormalidades espermáticas después de la congelación por dilutor y edad.

Tabla 21. Análisis de espermatozoides anormales en semen post descongelado.

FV	SC	GL	CM	F	p-valor
Dilutores	66,6	2	33,3	1,61	0,221 NS
Edades	19,2	1	19,2	0,93	0,3451 NS
Dilutores*Edades	18,2	2	9,1	0,44	0,6494 NS
Error	496,8	24	20,7		
Total	600,8	29			

CV: Coeficiente de variación 23,67 % (**) = altamente significativa;(*) = Significativo; NS = no significativo.

El análisis de varianza y comparación de medias Tukey mostraron que no existe diferencias estadísticamente significativas (P>0,05), entre dilutores Factor A, como tampoco existe diferencias significativas (P>0,05), entre la edad de los carneros Factor B, tampoco existe diferencia estadística entre la interacción de Factor A por Factor B (P>0,05), no obstante, cabe mencionar que estos factores si presentan diferencias numéricas.

Tabla 22. Porcentaje de espermatozoides anormales en semen post descongelado por dilutores.

Tratamientos	(%)
Steridyl	7.8
Andromed	8.7
Optixcell	9

La Tabla 22 indica el efecto de la descongelación por tratamiento mediante la prueba de Tukey con un nivel estadístico no significativo (P<0.05) mostrando un promedio general con un porcentaje de anormalidades es menor para el dilutor Steridyl 7,8%; con respecto a Andromed con 8,7 % y Optixcell 9 % seguido del carnero de 1,5 años que obtuvo promedios con Steridyl 8%; Andromed 8.6% y Optixcell con 8,8 % mostrando que las muestras evaluadas resultaron positivas por el bajo promedio de anormalidades.

Tabla 23. Porcentaje de espermatozoides anormales en semen post descongelado dilutor por edad.

Tratamiento	Edad (años)	(%) Dilutor por edad
Steridyl	3.5	7.6
Steridyl	1.5	8
Optixcell	3.5	8.8
Optixcell	1.5	8.6
Andromed	3.5	9.2
Andromed	1.5	8.8

Por otro lado la tabla 23 indica el porcentaje de espermatozoides anormales por dilutor y edad mediante la prueba de Tukey con un nivel estadístico no significativo (P< 0.05) mostrando que los carneros de 3,5 años presento un porcentaje de anormalidades con Steridyl 7,6%; Andromed con 8,8% y Optixcell 9,2% seguido del carnero de 1,5 años que obtuvo promedios con Steridyl 8%; Andromed 8.6% y Optixcell con 8,8 % mostrando que las muestras evaluadas resultaron positivos por el bajo promedio de anormalidades. aclara que en el presente trabajo no se evaluaron en forma específica las anormalidades.

Las anormalidades reportadas por Ramos (2011) detalla el porcentaje de espermatozoides anormales por edades mediante la prueba de Duncan a un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$, mostrando que los carneros de 1.7 años presentaron el mayor porcentaje de anormalidades con 15.8%, seguido del carnero de 4.5 años con 13.0%, finalmente el carnero de 2.7 años con 9.7%.

Por su parte Pillajo (2015), indico diferencias en el análisis de varianza realizado a la variable anormalidades, dando como resultado el promedio general de anormalidades para la raza Corriedale de 3,7% mas no se hicieron reportes de resultados de semen de carnero tratado con dilutores comerciales.

Castillo, et.al. (2019), en el efecto de Adición de metil-β-ciclodextrina cargada de colesterol en la criopreservación de semen de carnero sobre las características microscópicas pos-descongelación de semen de carnero (CLC/120 x 106 espermatozoides) reporto resultados de Anormalidades espermáticas (%) con adición de 0 mg, 9.60 ± 1.99 con 1mg. fue de 10.13 ± 1.94 y con 2mg de 11.23 ± 1.96 sin mostrar diferencias significativas entre las medias ($p<0.05$)

Hafez (2000); afirma que, este examen es una prueba de control de calidad, cada eyaculado contiene una serie de espermatozoides anormales, pero si la proporción de estos es muy alta mayores del 15%, entonces nos encontramos ante un semen de baja fertilidad, se considera normal los eyaculados con porcentajes de 5-9 % de anormales, entre las anormalidades más frecuentes que se encuentran en un eyaculado tenemos; espermatozoides sin cola, cabeza grande, cabeza pequeña, cola reducida, cabeza adelgazada, rotura de cuello y acrosoma anormal. (Evans y Maxwell, 1990), refieren que el examen morfológico del semen es una prueba de control de calidad, cada eyaculado con tiene una serie de espermatozoides anormales de 5-10 %, pero si la proporción de estos es muy alta nos encontramos ante un semen de baja fertilidad. Los espermatozoides anormales se pueden detectan mediante el frotis de semen teñido, preparado sobre un porta objetos (tinción de eosina-nigrosina).

Por su parte Buitrago y Pérez (2008), con el diluyente de Colas con yema de huevo liquida los carneros presentaron un promedio de anormalidades primarias de 10,6 con y con el diluyente de Colas con yema de huevo en polvo presentaron un promedio de 18,7 anormalidades primarias. Esto para un total de anormalidades primarias de 6% para el diluyente de Salamon con yema de huevo liquida, 6% para el diluyente de Salamon con yema de huevo en polvo, 5% para el diluyente de colas con yema de huevo liquida y 10% para el diluyente de colas con yema de huevo en polvo.

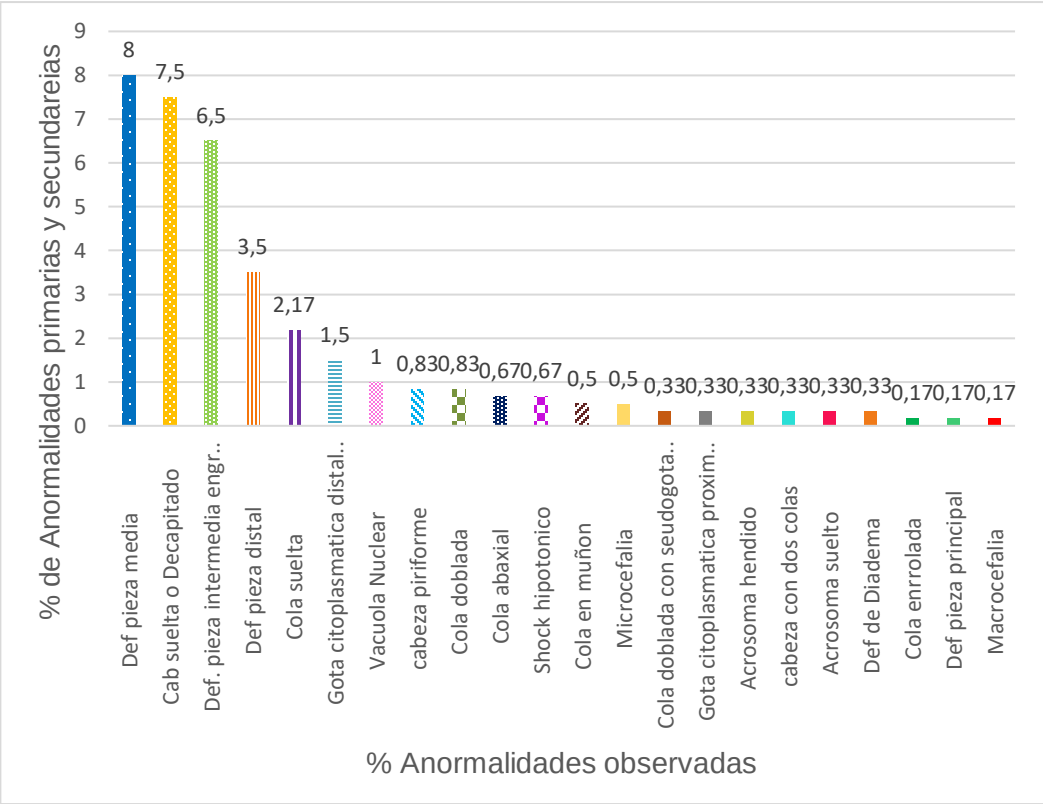


Figura 27. Porcentaje general de las anormalidades descritas y observadas en las muestras de semen de ovino post descongelado.

6.5. Análisis económico de costos estimados en la producción de pajuelas de semen de ovino criopreservado con el uso de diferentes dilutores comerciales

Se estimo los costos parciales, sobre la producción de pajuelas en la obtención de la motilidad progresiva del semen en carneros, después de la congelación en base al tipo de dilutor comercial utilizado (Optixcell, Steridyl y Andromed), que se incluye como costos variables y el uso de diferentes reactivos al igual que los costos fijos, que llegarían a ser los equipos de laboratorio, materiales y los carneros.

Tabla 24. Costos de producción estimados de pajuelas de semen de ovino criopreservadas

Costos Totales	**T1 Optixcell**	**T2 Steridyl**	**T3 Andromed**
Costos fijos	8275.06	8275,06	8275,06
Costos variables	7181	6981	6861
Costos Totales (CF+CV)	**15456,06**	**15256,06**	**15136,06**
N° / pajuelas	1080	1080	1080
Bs / Pajuela	**14.31**	**14.12**	**14.01**

En la tabla 24, se observan los costos de producción para la obtención de 1200 pajuelas en un mes, trabajando con dos carneros. Al total del número de pajuelas, se realizó un ajuste del 10% de decremento al rendimiento, con el fin de eliminar la sobreestimación del producto, de acuerdo a las recomendaciones del CIMMYT (1988). En el mismo cuadro, se observan los diferentes dilutores utilizados en el experimento, donde expresa el costo de producción por pajuela y tipo de dilutor. Para producir una pajuela con el dilutor comercia Optixcell se debe invertir Bs 14.31, seguido de Steridyl con Bs 14.12 y por último el dilutor Andromed que resultó ser el más económico con Bs 14.01.

6.5.1. Beneficio bruto

Resultados de la estimación de ingresos Brutos

Tabla 25. Estimación de ingresos por el procesamiento de semen de carnero

Tratamientos	mes	Cantidad	Unidad	Costo unitario (Bs)	Costo total
T1	mes	1200	dosis	14.31	17172
T2	mes	1200	dosis	14.12	16944
T3	mes	1200	dosis	14.01	16812
					IBT 50928

El ingreso de producción resulta de la multiplicación de la cantidad de dosis (pajuelas) de semen de ovino por el precio de producción (14.31 bs/ dosis.) estimado por dilutor empleado obteniendo el resultado de (BB)

6.5.2. Beneficio neto

En la tabla 26 se muestra la utilidad neta para los tratamientos empleados en la investigación.

Tabla 26. Análisis del beneficio neto

Tratamientos	Ingreso Bruto	Costos de Producción	Beneficio neto
T1	17172	15456,06	1715.94
T2	16944	15256.06	1687,94
T3	16812	15136,06	1675,94

6.5.3. Beneficio / costo

En la tabla 27 se muestra los resultados de beneficio/costos obtenidos de cada tratamiento en (Bs).

Tabla 27. Análisis parcial de beneficio /costo

Tratamiento	Ingreso bruto	Costo de producción	Beneficio costo
T1	17172	15456,06	1.11
T2	16944	15256,06	1.10
T3	16812	15136,06	1.10

De acuerdo a la tabla 27 el beneficio costo para los tres tratamientos mostro un resultado mayor a 1, lo cual demuestra que estos tratamientos son rentables, tres tratamientos demostraron que son rentables. El T1 ha sido el más rentable con 1.11 de beneficio costo y el T2 y T3 con 1.10 con una diferencia de 0.01 entre tratamientos Estos resultados nos permiten exponer con seguridad que la utilización de un sistema de criopreservación y dilutores adecuado para el semen de ovino es un recurso rentable.

7. CONCLUSIONES

Al comparar las medias el efecto de la edad en carneros no influyo significativamente en las variables volumen y pH del semen fresco de ovino, presentando diferencia numérica mas no estadística con una probabilidad del 0,05% sin embargo ambos carneros presentaron motilidad masal positiva calificando al de mejor motilidad masal al carnero de 3.5 años con (MM) de 5 que corresponde a un 90% seguido del carnero de 1.5 con una (MM) de 4,8 que corresponde a un 85%.

Al realizar la evaluación microscópica de semen a la dilusión los tratamientos tuvieron una respuesta positiva con diferencias altamente significativas, se concluye que el dilutor comercial con mejor respuesta a la dilusión fue Optixcell con 88,6%, seguido del dilutor Steridyl con 85.3%, quedando con un 78,6% el dilutor Andromed y mostrando también una influencia significativa en las edades de los carneros.

En la evaluación de la motilidad individual espermática del semen post descongelado, los dilutores presentaron diferencias significativas mostrando resultados positivos en la motilidad Individual post descongelado de los tratamientos con resultados de 67.5% para Optixcell, 62.1% para Steridyl y 54.1% para Andromed.

En la evaluación de vitalidad se obtuvo diferencias significativas para espermatozoides vivos sobre los tratamientos con resultados óptimos de 83.8% Steridyl, 83.2% Optixcell y un 76.2% Andromed. En la mortalidad espermática sobre los tratamientos los resultados para los tratamientos fueron positivos de 16.2% Steridyl, 23,8% Optixcell un 23.8% Andromed, en ambos las edades de los carneros no influyeron significativamente.

Los tratamientos no influyeron significativamente en la morfología espermática para espermatozoides normales con resultados de 93.9% Steridyl, 90.6% Optixcell y 88.9% Andromed. Las anormalidades espermáticas para semen post descongelado, presentando resultados de 7.8% Steridyl, 8.7% Andromed y 9% Optixcell respectivamente sin tener una influencia sobre las edades. La estimación de costos de producción por dosis seminal determinó que entre los dilutores usados como tratamientos el más rentables con un beneficio/costo de 1.11 Bs es Optixcell.

8. RECOMENDACIONES

Se recomienda el uso de los dilutores comerciales Optixcell y Steridyl para la crio-conservación de semen ovino, ya que demostraron un desempeño satisfactorio tanto en el semen fresco diluido como en el semen después del proceso de descongelación. Si bien Andromed también presentó resultados aceptables, los otros dos dilutores mostraron ser superiores en términos de calidad espermática.

Se sugiere incluir estos dilutores en programas de inseminación artificial para evaluar su eficacia en la fertilización de las hembras y determinar su tasa de preñez.

Es importante realizar más investigaciones que involucren a otras razas de ovinos y dilutores para poder comparar los resultados obtenidos en el presente estudio y desarrollar recomendaciones específicas para la elección del diluyente adecuado en función de la raza de ovinos en cuestión y otros factores relevantes.

Se recomienda difundir los resultados de la presente investigación en centros de procesamiento seminal, entidades educativas y entre los productores de ovinos para fomentar el uso de dosis seminales y el mejoramiento genético en los hatos de producción y llevar a cabo actividades de capacitación y transferencia de tecnología para enseñar a los productores cómo utilizar la técnica de inseminación artificial y cómo preparar las dosis seminales utilizando los diluyentes recomendados.

9. BIBLIOGRAFÍA

Agraz, A. (1989). Caprinotecnia 2da edición. México pp. 46.: Editorial Limusa S.A.

Aisen, E. G. (2004). *Reproduccion ovina y caprina.* Ciudad Autonoma de Buenos Aires; República Argentina: INTER-Medica.

Aisen, E., Alvarez, H., Venturino, A., y Garde, J. (2000). Effect of trehalosa and EDTA on Cryoprotective action of. *Theriogenology 53*, 1053-1061.

Aké López, J. R., Aké Villanueva, N., Aké Villanueva, J., Segura Correa, J. C. (2017). Evaluación reproductiva del macho ovino. Editorial Académica Española.

Arguedas, R. (2006). “Estudio de la suplementación de llamas lactantes y gestantes. *(Tesis de Grado).* Universidad Mayor de San Andres, La Paz.-Bolivia

Alvarez, H., Aisen, E.,Venturino, A., y Garde, J. (2000). Effect of trehalosa and EDTA on Cryoprotective action of. *Theriogenology 53*, 1053-1061 .

Ávalos R. A., González S. J. A., Vargas I. A. K., y Herrera B. J. A. (2018). *Recoleccion y Manipulacion Seminal (In Vitro).* Ciudad de México - Mexico: 1° Primera edición; Casa Abierta al tiempo - Universidad Autónoma Metropolitana.

Ax, R.L., M.R. Dally, B.A. Didion, R.W. Lenz, C.C. Love, D.D. Varner, B. Hafez y M.E. Bellin. (2000). Evaluación del semen. En: Hafez, E.S.E. y Hafez, B. Reproducción e inseminación artificial en animales. Séptima edición. McGraw-Hill. México, D.F. p. 519.

Balcázar, J. A. S. & Porras, A. I. A. (2009). *Manual de Prácticas en Manejo.* D.F.Mexico: Universidad Nacional Autónoma de México. Departamento de reproducción.

Barth A, Oko R. (1989) Defects of the sperm head and tail. In: Iowa State University Press eds.). Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Iowa: Ames, 130-228.

Bedford, J.M., & Hoskins, D.D. (1990). *"The mamamalian spermatozoon:* morphology *biochemistry and physiology".* En Marshall’s physiology of reproduction. (pp. 379-568). Edinburgh: Churchill-Livingstone.

Buxade C. C. (1995). Inseminacion artificial. En: *Tomo II Reproduccion y Alimentacion.* Iglesias B. A. y Buxade C. C. p. 101, Madrid, Barcelona, Mexico: Ediciones Mundi - Prensa.

Bloom, E. y Birch, A. (1970). Ultrastructure of the decapitated sperm defect in guernsey bulls. *J Reprod Fertil*, 23; 67-72.

Bravo, Ó. G. (2005). *Contavilidad de costos* (Vol. 5ta. Ed. Revisada). Bogota-Colombia, Colombia: McGRAW-HILL INTERAMERICANA, S. A.

Buitrago, J. y Pérez, l. (2008). Comparación de dos Comparacion de dos diluyentes par entes para la criopr a la criopreservación de emen ovino. *(Tesis de Licenciatura).* Universidad de La Salle, Bogotá D.C-Colombia.

Castillo L., Páucar E., y Alvarado E. (2019). Adición de metil-β-ciclodextrina cargada de colesterol en la criopreservación de semen de carnero. Revista de Investigación. Veterinaria. Perú, 30(4): 1637-1644.

Castillo, L. V.(2012). Desarrollo de metodo de referencia basada en el metodo Isas y analisis para la evaluacion morfometrica del acrosoma del espermatozoide en la especie ovina. (*Tesis de Licenciatrura*)*.* Universidad de Zaragoza - Escuela politecnica Superior de Huesca, Zaragoza - España.

Córdova-Izquierdo. A., Saltijeral O. J., Muñoz M. R., Córdova J. M. S., Córdova J. C. A. y Guerra L. J. E. (2006). Efecto del método de obtención de semen de ovino sobre la calidad espermática (Effect of the method of obtaining of ovine semen on the spermatic quality) . *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET ISSN 1695-7504*, 1-5 pag.

Condori, R., y Kantuta, E. (2021). *Evaluación de la calidad espermática de semen fresco en carneros Targhee y Correidale*. Apthapi *7(2):2190-2192. ISSN: 2519-9382*, 1-3.

Cooper, T. G. (1986). *The epididymis, esperm maduration and fertilisation.* Heidelberg: Springer Verlag.

Cueto, M., Gibbons, A., Bruno-Galarraga, M. y Fernandez, J. (2016). *Manual de Obtencion, Procesamiento y Consevacion del Semen Ovino.* Bariloche - Argentina: INTA - Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria - Area de Investigacionb en Produccion Animal Grupo de Reproduccion y Genetica animal.

Cummins, J. M. (1985) Woodall, P.F. On mammalian sperm dimensions. J. Reprod. Fertil. 75:153-175.

Chunata, S. (2019). *Valoración del contenido seminal de dos razas ovinas tropicales y dos tipos de diluyentes para su conservación.* Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Pecuarias - Carrera de Ingeniería Zootécnica. Riobamba – Ecuador

De Vos A, van de Helde H, Joris H, Verheyen G, Devroey P. and van Steirteghem A. (2003) Influence of individual sperm morphology on fertilization, embryo morphology and pregnancy outcome of intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril; 79:42-48

Delgadillo, J. A. (2004). *Caracteristicas Anatomicas y Funcionales del Sistema Reproductor del Macho* . En : Aisen, E. G., Reproduccion Ovina y Caprina (págs. 1- 9). Ciudad Autonoma de Buenos Aires; República Argentina: Inter-Médica S.A.I.C.I.

Delgado, B., Juan V., & Nogales., B. Sergio. (2009). *Biodiversidad Ovina Iberoamericana.* Cordoba - España: Luis Barona - Libro Biodiversidad ovina latinoamericana.indd.

Derivaux, J., y Gómez P.J., (1976). Morfologia del Espermatosoide Normal. En: *Reproduccion de los Animales Domesticos .* Derivaux J. p. 155 - 157 J Zaragoza; España: Acrivia, S.A.; 2ª Edicion Española.

Duran del Campo, A.,(1993). Manual Práctico de Reproducción e Inseminación. *Manual Práctico de Reproducción e Inseminación.* Montevideo - Uruguay: Editorial Agropecuaria Hemisferio Sur.

Escudero, J. (2015). “Preservación de semen ovino mediante vitrificación y congelamiento lento, utilizando diferentes diluyentes comerciales”. *(Tesis de Lincenciatura).* Escuela Superior Politécnica de Chimborazo - Facultad de Ciencias Pecuarias, Riobamba, Ecuador.

Evans, G., & Maxwell, W. (1990). *Inseminacion Artificial de Ovejas y Cabras .* 1era. Edicion Editorial Acribia, SA, Zaragoza-España.

Galina C. y Valencia J., (2008). Reproduccion de Animales Domesticos. Mexico: 3ra Edicion - Limusa.

Garner D., L., y Hafez, E. S .E. (2000). Espermatozoides y plasma seminal . En: Reproduccion e Inseminacion Artificial en Animales. Garner D. y Hafez, E. S. E p. 98 - 101 Mexico: 7ª Edición. Ed. Mc-Graw-Hill Interamericana. Mèxico, D. F.

Gibbons, A., y Cueto, M. (2007). Inseminacion Artificial con Semen Fresto. *INTA EEA BARILOCHE (presencia N° 51)*, 8-12.

Gilbert, S. F. 2005. Biología del desarrollo. Ed Médica Panamericana. 882pp

Giles, R. M. (1993). *Evaluación y procesamiento de semen. Memorias del 1er curso intensivo de Reproducción bovina*. Noviembre 29, 30, diciembre 1, 2, 3, y 4. pp. 1-4. Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán de Rosado, Sinaloa, México.

Gonzalez, C. (2009). *Inseminación artificial y reproducción programada .* Maracaibo-Venezuela: 3ª Edición, P. 12

González, V. y Tapia, M. (2017). Manual de manejo Ovino. *Razas ovinas de importancia*, INIA Instituto de Desarrollo Agropecuario - Instituto de Investigaciones Agropecuarias N° 368, ´p 113 -127.Santiago, Chile.

Gomez B. O., (2005). *Contavilidad de costos* (Vol. 5ta. Ed. Revisada). Bogota-Colombia: McGRAW-HILL Interamericana, S. A.

Gómez, M.; Girela, J.; Fernández, P. y Romeo, A. (2005). Estudio de las alteraciones morfológicas de espermatozoides humanos con microscopia electrónica de barrido (sem). *Revista Iberoamericana de Fertilidad Reproductiva* , 22 (1): 59-66.

Gomez, M. y Migliorisi, A. (2005). *Evaluacion de aptitud reproductiva del ovino/caprino*.Cátedra Reproducción Animal : Facultad de Cs. Veterinarias - UNLP , Buenos Aires, Argentina. Obtenido de: http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/cria_toros/49-ProtocoloEvalSemen.pdf

Gomez, M. y Migliorisi, A. (2005). *Protocolo para la evaluación de semen en rumiantes.* Cátedra Reproducción Animal : Facultad de Cs. Veterinarias - UNLP , Buenos Aires, Argentina. Obtenido de: http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/cria_toros/49-ProtocoloEvalSemen.pdf

Hafez, E. S .E. (2000). *Ovejas y cabras .* En: Reproduccion e Inseminacion Artificial en Animales. Hafez, E. S. E y B. Hafez p. 180 - 181 Mexico: 7ª Edición. Ed. Mc-Graw-Hill Interamericana. Mèxico, D. F.

Hafez, E.S.E. (1996). *Estudios del Semen*. En: Reproducción E Inseminación Artificial en Animales, E.S.E Hafez, 497-498-500. México: Nueva Editorial Interamericana S.A.

Herrera, F., Velasco, C., Denen, H., y Radulovich, R. (1994). *Fundamentos de analisis economico.* Turrialba - Costa Rica: CATIE Centro Agronomico Tropical de Investigacion y Enseñanza.

Horn, M. M., y Fritsch, M. (2008). Gametogenesis. En C. Galina, & J. Valencia, *Reproduccion de Animales Domesticos* (págs. 47 - 52). Mexico: 3ra Edicion – Limusa.

imv TECHNOLOGIES. (2020). *Optixcell.* Recuperado el 18 de Agosto de 2022, de LIPOSOMES-BASED MEDIUM FOR BOVINE SEMEN: https://www.imv-technologies.es/documents/OPTIXcell-2-CSS-FY-2020-1.pdf

Iglesias B. A., (1995). Capitulo Vl Inseminacio Artificial ; Evaluacion y tratamiento del semen : operaciones y tecnicas. En C. B. CARBO, *Tomo ll Reproduccion y Alimentacion* (págs. 100-111). Madrid-Barcelona-Mexico: Ediciones-Mundi-Prensa .

Jainudeen, M. y Wahid, H. (2000). Ovejas y cabras. En E. Hafez, *Reproduccion e inseminacion artificial en animales* (págs. 180 - 181). Mexico: 7ª Edición. Ed. Mc-Graw-Hill Interamericana.

Jurado, S., Sarmiento, P. y Stornelli, A. (2008). La microscopía electrónica como herramienta en la evaluación de semen canino. *Analecta Veterinaria*, 28 (1): 7-14.

Latorre, E. y Sales, F. 2000. Retajos en producción ovina. INIA Kampenaike, Boletín Divulgativo N 16. 32 pág.

López G.J., Urbano, F.A. y Cárdenas P.M., (2012). *Manual de Laboratorio para el Análisis del Semen .* Barcelona - España: OmniaScience.

Mamani, F. y Céspedes, R. (2012). Facultad de Agronomía. Revista en imágenes. *Estación Experimental Choquenaira.* Universidad Mayor de San Andrés, La-Paz.

Minitub. (2021). *Steridyl.* Recuperado el 18 de Agosto de 2022, de Medio completo para la congelación de semen bovino: file:///C:/Users/HP-Core%20i3/Desktop/tesis%20y%20libros%20que%20se%20usaran/13500-02xx_leaflet-steridyl_es_220120.pdf.

Minitube. (2021). *Andromed.* Recuperado el 18 de Agosto de 2022 , de Diluyente sin yema de huevo para semen bovino: file:///C:/Users/HP-Core%20i3/Downloads/13503-xxxx_leaflet-andromed_es_211213.pdf

Mujica, C., F. (2005). *Razas ovinas y caprinas en el Instituto de Investigaciones Agropecuarias.* Osorno - Chile: Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Boletín INIA Nº 127. 88 p.

Muños, A. K. (2018). Estudio comparativo de tres diliuyentes (Andromed, Triladyl y Citrato de Sodio con yema de huevo). Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, División de Ciencia Animal. Coahuila, México.

Murray R. Y Larry J. (2001). Estadística. Colección Schaum. Tercera edición. Editorial McGrauw-Hill Interamericana.p 244.

Nuñes, F.R., (2016). Organizacion y Endocrinologia del Aparato Reproductor masculino. En M. A. Stornelli, & R. L. Sota, *Manual de Reproduccion de Animales de Produccion y Compañia* (págs. 95 - 104). Buenos Aires - Argentina: edulp - Editorial Universidad Nacional de la Plata.

Ochoa, T. (2007). Diseños experimentales. Universidad Mayor de San Andrés, Facultad de Agronomía, La Paz – Bolivia. pp. 47 – 134 – 154.

Orellana, J. (2009). Caracteristicas seminales e integridad de la membrana espermatica post refrigeracion en carneros blackbelly y assaf del banco nacional de semen – La Molina. *(Tesis de Licenciatura).* Universidad Nacional del Centro del Perú, Huancayo, P e r ú.

Palacios, M. M. 2005. Evaluación del agua de coco (Cocus nucifera), opuntia spp, leche y sus combinaciones para la criopreservación del semen ovino. Tesis de maestría. Facultad de Zootecnia Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua, Chih. México. 72 pp.

Parraguez V., Blank O., Muñoz C. y Latorre E. (2000). *Inseminación artificial en ovinos (Principales procedimientos para la IA en ovinos)*. Santiago - Punta Arenas, Chile: Monografías de Medicina Veterinaria (Universidad de Chile Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias) ;Vol.20; N°2.

Peña A. y Linde-Forsberg C.B.,(2000). Effects of spermatozoal concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa. *Theriogenology, Volumen 54* (número 5), 15;54(5):703- 718.

Perez-Clariget, R. y Almeraya, A. P. (2008). Ovinos. En C. Galina, & J. Valencia, *Reproduccion de Animales Domesticos* (págs. 474 - 483). Mexico: 3ra edicion - Limusa.

Peters, R.A. y Ball, H.J.P. (1991). *Reproduccion del ganado vacuno.* Zaragoza - España : ACRIBIA, S.A.

Pillajo, F. (2015). Evaluación de la viabilidad, motilidad y cambios de morfología espermática post-descongelación de semen ovino de dos razas (Poll dorset y corriedale) empleando tres tipos de diluyentes comerciale. *(Tesis de licenciatura).* Universidad Agraria del Ecuador - Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Guayaquil , Ecuador.

Ramos, L. (2011). Efecto de dilutores y dos tiempos de equilibrio en la criopreservacion de semen ovino (ovis aries) en la estación experimental de choquenaira. *(Tesis de LIcenciatura).* Universidad Mayor de San Andrés - Facultad de Agronomía, La Paz - Bolivia.

Sánchez, N. (2009). Efecto de dos dilutores sobre la motilidad y el porcenta.je de espermatozoides vivos en el semen congelado de ovino (Ovis aries)". *(tesis de Licenciatura).* Universidad Nacional de la Amazonía Peruana - Facultad De Zootecnia, Yurimaguas, Perú .

Saacke, R., Nadir, R. and Nebel, L. 1994. Relationship of semen quality to sperm transport, fertilization and embryo quality in ruminants. Theriogenology. 41: 45-50.

Schoenian, S. y Small, M. (2018). An update on Sheep AI (Inseminación artificial en ovejas). *Ruminant Page (Proagro-Infoganadero)*, 1- 4 pags.
https://proagrolab.com.ar/inseminacion-artificial-en-ovejas/

Soler, C., Perez-Sanchez F., Schulze, H., Bergmann, M., Oberpenning, F., Yeung, C., y Cooper, T. (2000). Objective evaluation of the morphfology of human epididymal sperm heads. *Int. J. Androl*, Apr;23(2):77-84.

Stornelli, M. A. y Luzbel, D.S. R. (2016). *Manual de Reproduccion de Animales de Produccion y de Compañia.* Buenas Aires - Argentina: edulp - Editorial de la Universidad de la Plata .

Stornelli M.C., Tittarelli, C.M., Savignone, C.A. & Stornelli, M.A. (2005). Efecto de los procesos de Crioperservacion sobre la fertilidadseminal. *Analecta, vol. 25.*(no. 2), 25 (2): 28-35.

Stornelli, M. A. y Luzbel D.S.R. (2016). Morfologia espermatica - Microscopia optica ; Imagenes espermaticas. En M. A. Stornelli, & R. L. Sota, *Atlas de reproduccion de anumales de produccion y compañia* (págs. 35-50 p). Buenos Aires - Argentina: edulp- Editorial de la Universidad de La Plata .

Tello A. I.A.,Vaca Z. A.G., Estupiñan E. C. M. y Herrera D. E. V. (2017). *Costos de produccion y procesos* (Primera edición ed.). Guayaquil, Ecuador: Ediciones Grupo Compás.

Valencia, M. J., González H. G., González G. M. E., y Trejo G. A. (1994). Motilidad y daño acrosomal del semen caprino congelado en pajillas 0.25 ml y 0.5 ml y descongelado a dos diferentes ritmos de temperatura. Revista Veterinaria México - Vet Mex, 25(2), 127-131.

Varner, DD. 2008. Developments in stallion semen evaluation. Theriogenology 70: 448-462.

Venturino, A. y Aisen G. E. . (2004). Recoleccion y Evaluacion del semen de carneros. En E. G. Aisen, *Reproduccion ovina y caprina* (págs. 55-69 pag.). Buenos Aires, -Republica Argentina: Inter- Medica.

Vishwanath, R., y Shannon, P. (2000). Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Animal Reproduction Science 62*, 23–53.

ANEXOS

Anexo 1. Equipos de laboratorio

Horno Pasteur

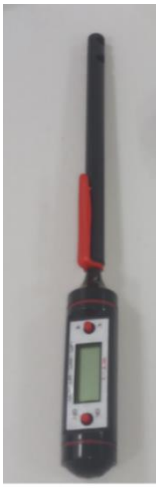
Baño maría

Microscopio

Destiladora

Platina térmica

Estufa



Termómetro digital

Refrigerador

Anexo 2. Materiales de laboratorio y reactivos

pH-chimetro

P. alcohol polivinilico

Tips

Micropipeta

Porta objetos

cubreobjetos

Tubo cónico gr.

Vagina artificial

Vagina artificial para ovino armada

dilutores

Pajuelas de 0,25 ml

Anexo 3. Ficha de evaluación de genitales externos

<table>
<tr><td rowspan="2"></td><td colspan="4">UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE AGRONOMIA
CARRERA DE INGENIERIA AGRONOMICA
PROGRAMA MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA</td></tr>
<tr><td colspan="4">EVALUACION ANDROLOGICA
LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA ANIMAL CHOQUENAIRA</td></tr>
<tr><td>Fecha:</td><td colspan="2">Estación:</td><td>Encargado:</td></tr>
<tr><td>ID.</td><td>Peso:</td><td>Fecha de ncto:</td><td>Raza:</td></tr>
<tr><td colspan="4"></td></tr>
<tr><td colspan="2">EXAMEN FISICO</td><td colspan="2">EVALUACION SEMINAL</td></tr>
<tr><td>Condición corporal</td><td></td><td>Parámetros</td><td>Fresco</td><td>Post-descongelado</td></tr>
<tr><td>Patas y pezuñas</td><td></td><td>Volumen</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>Testículos</td><td></td><td>Color</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>Pene</td><td></td><td>pH</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>Prepucio</td><td></td><td>Motilidad masal (1-5)</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td rowspan="2">Circunferencia escrotal en cm.</td><td rowspan="2"></td><td>Motilidad Individual diluido %</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>Motilidad Individual %</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td colspan="2">COMPORTAMIENTO SEXUAL</td><td>Vitalidad % (Eosina-nigrosina)</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>Libido</td><td></td><td>Vivos</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>Capacidad de montar</td><td></td><td>Muertos</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td colspan="2">METODO DE RECOLECCION</td><td>Morfología % (Eosina-nigrosina)</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>Electroeyaculador</td><td></td><td>Normales</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>Vagina artificial</td><td></td><td>Anormalidades</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td colspan="2">RESPUESTA AL METODO</td><td colspan="3" rowspan="2"></td></tr>
<tr><td>Protusion</td><td></td></tr>
<tr><td>Eyaculado</td><td></td><td colspan="3">Observaciones generales</td></tr>
<tr><td colspan="4"></td></tr>
<tr><td colspan="4">Recomendaciones:</td></tr>
<tr><td colspan="4"></td></tr>
</table>

Anexo 4. Selección de los Carneros

Carneros raza Corridale

Anexo 5. Evaluación de genitales externos

Limpieza y evaluación de los genitales del carnero

Anexo 6. Colecta y Evaluación del semen fresco de carnero (ovino)

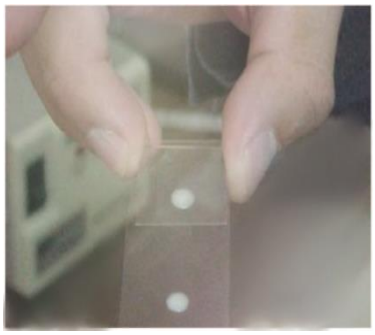
Colecta

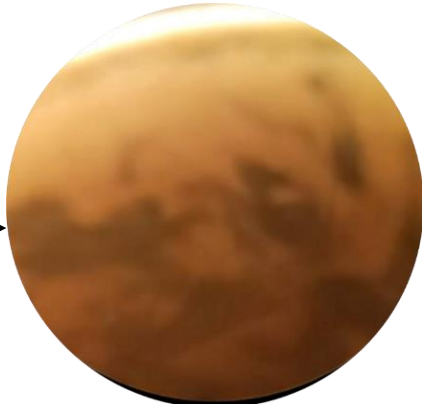
pH

Volumen

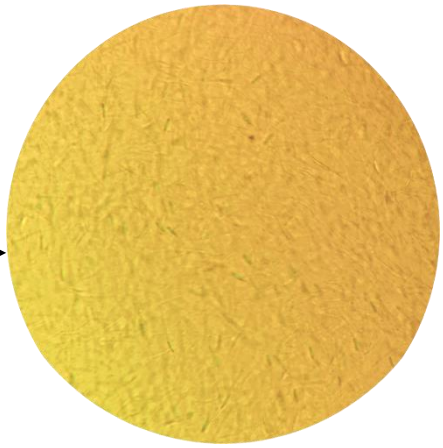
Olor y Color

Anexo 7. Evaluación Microscópica del semen carnero





Motilidad masal



Motilidad Individual

Anexo 8. Preparación de los dilutores y evaluación post-descongelamiento

Dilutores en probetas

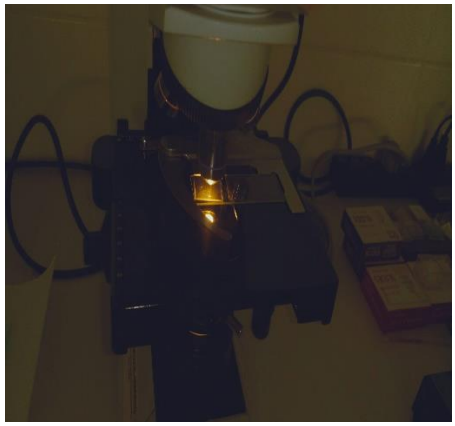
Dilutores a baño maría

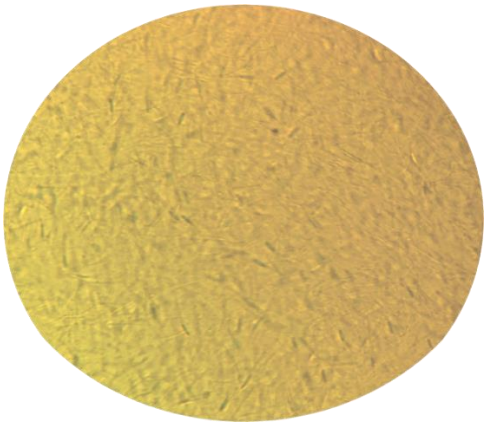
Mezcla mediante agitación del dilutor con agua bi destilada

Mezcla de dilutores con muestra de semen

Enfriamiento y equilibramiento

Llenado de pajuelas y congelamiento

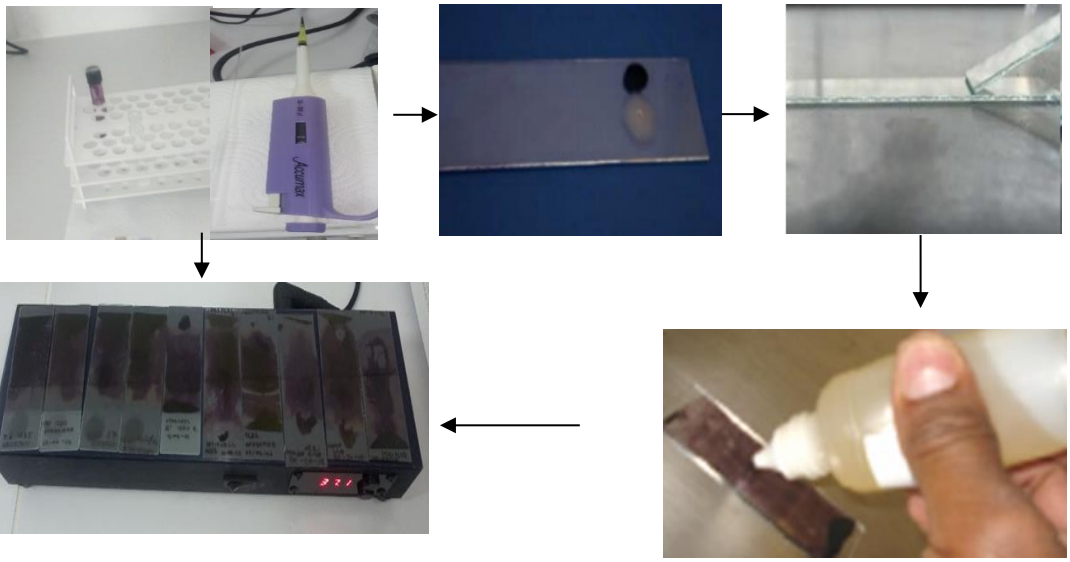


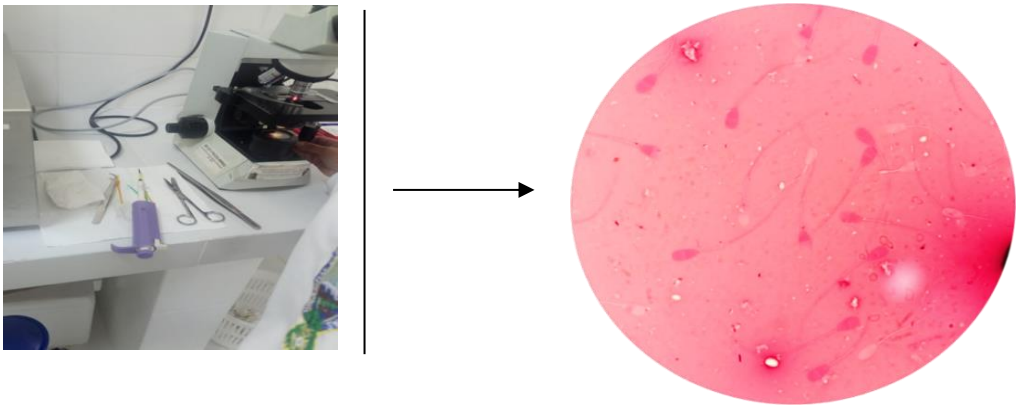


Evaluación post descongelamiento de las pajuelas

Motilidad Progresiva

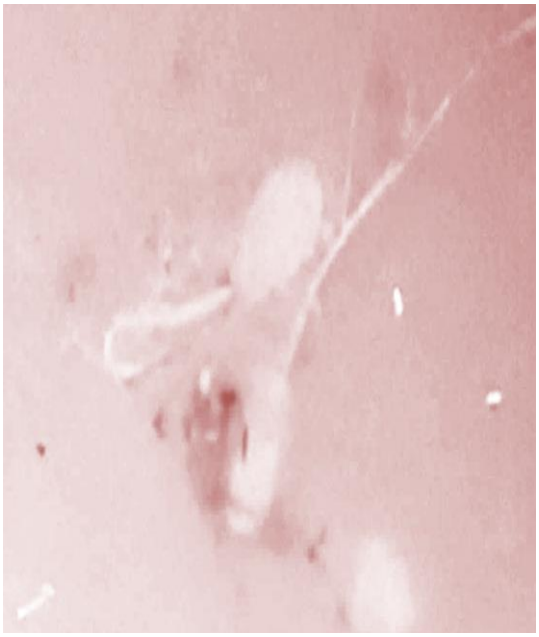
Anexo 9. Tincion de eosina - nigrosina % de Morfologia y Vitalidad



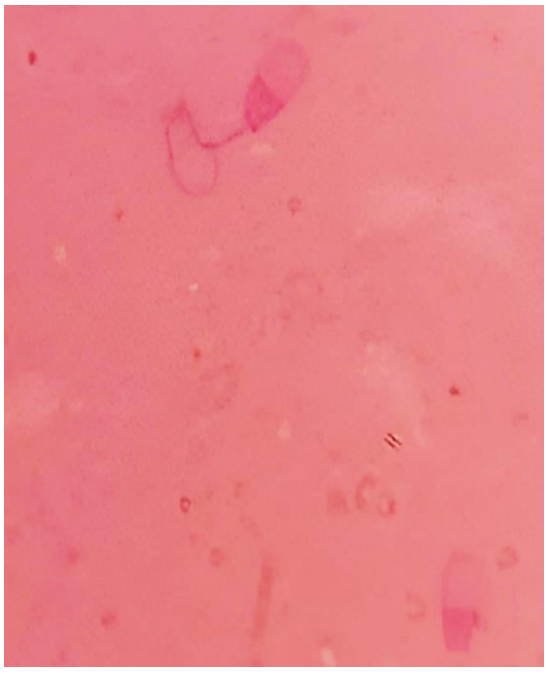


Anexo 10. Anormalidades espermaticas (primarias y secundarias) encontradas en el semen de carnero

(a); espermatozoide muerto con microcefalia. espermatozoide vivo con acrosoma intacto.



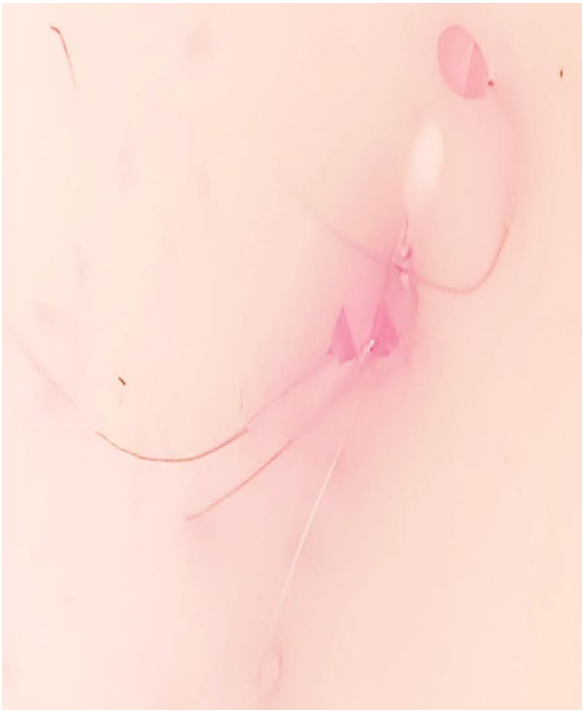
(a); espermatozoide vivo con defecto de pieza(b); Media (cola doblada simple).



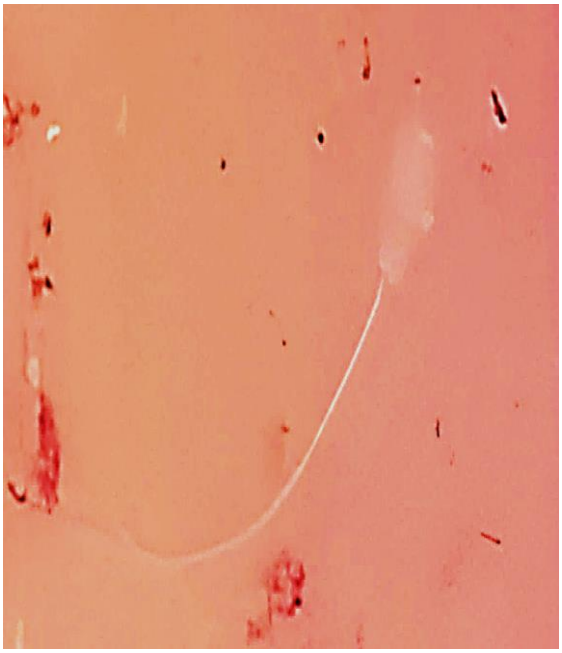
(a); espermatozoide muerto cola en muñón (b); cabeza decapitada

(a);espermatozoide muerto cabeza pequeña anormal piriforme

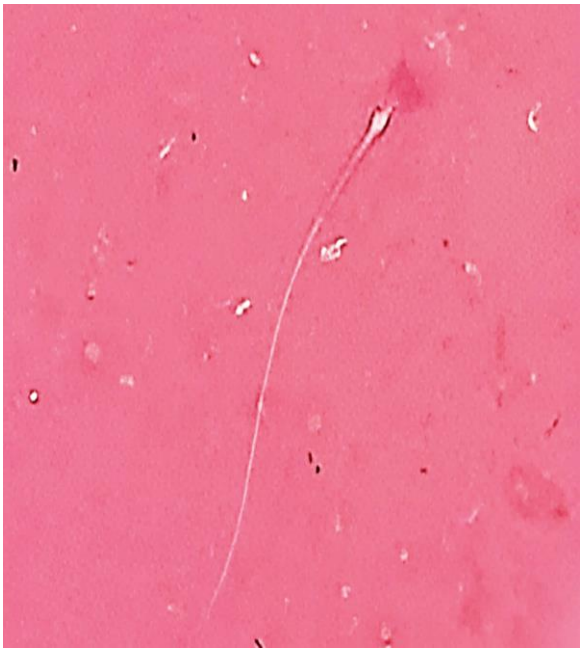
(a); Esp. muerto cola en látigo con gota citoplasmática distal retenida (D.p.m.d. shock hipotónico)
(b); Esp. vivo con defecto de pieza media.



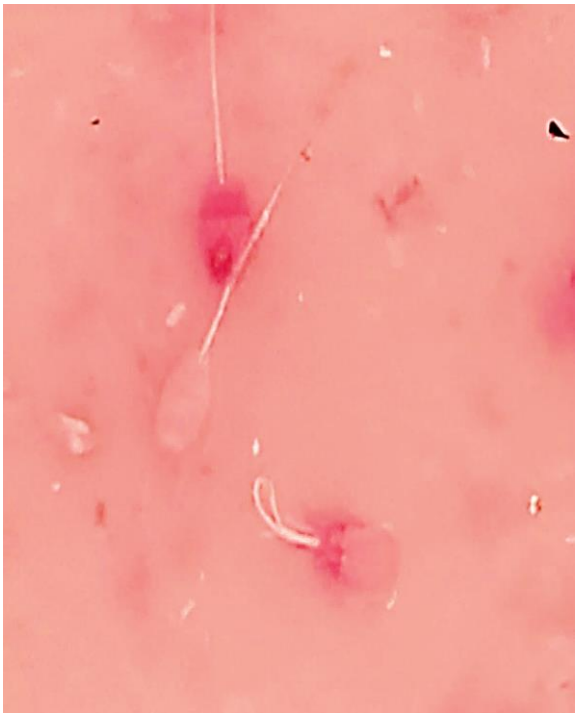
(a); Espermatozoide muerto con defecto de Pieza media, vacuola nuclear



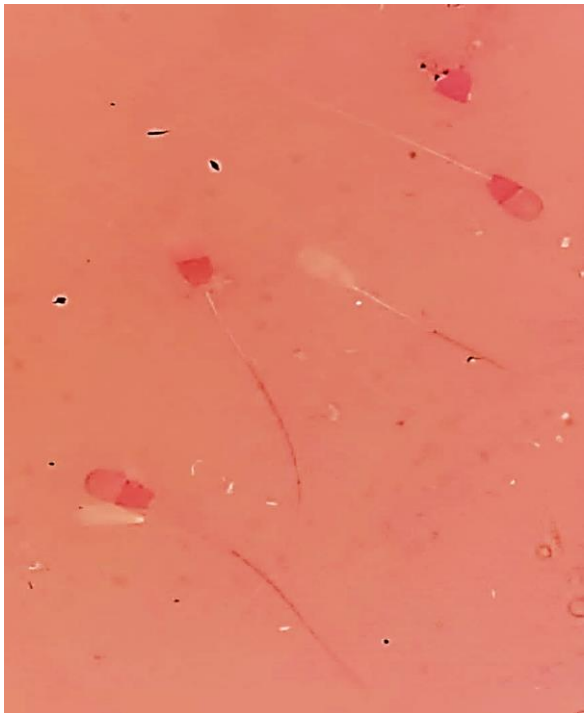
(a); Espermatozoide vivo con vacuola nuclear



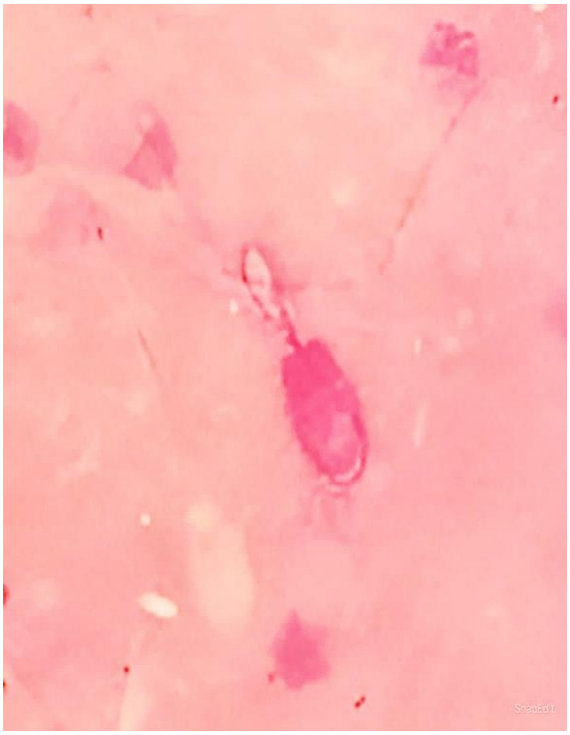
(a); Espermatozoide vivo muerto con gota Citoplasmática proximal



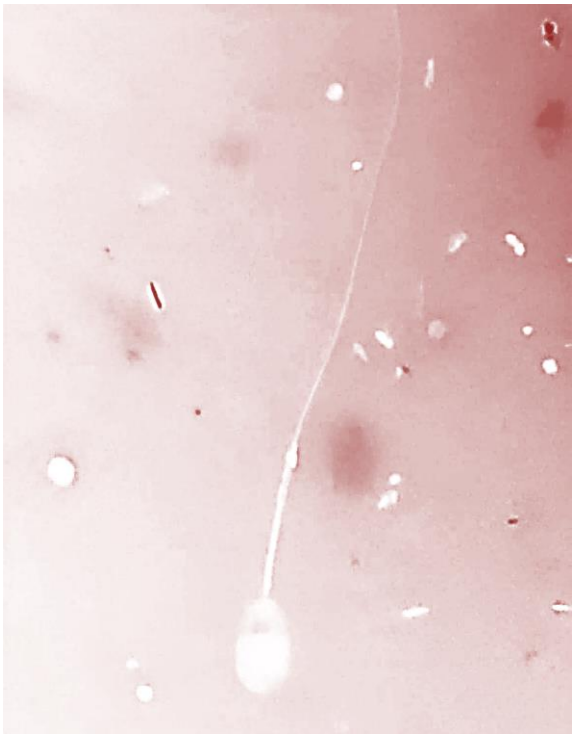
(a); Esp. con cola enrollada debajo de la cabeza (Defecto de pieza media).



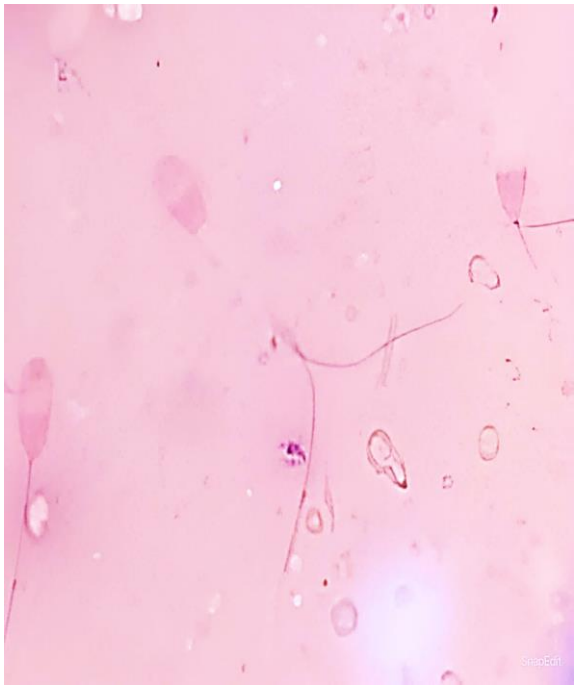
(a); Esp. muerto con cabeza piriforme (b); Esp. muerto sin acrosoma



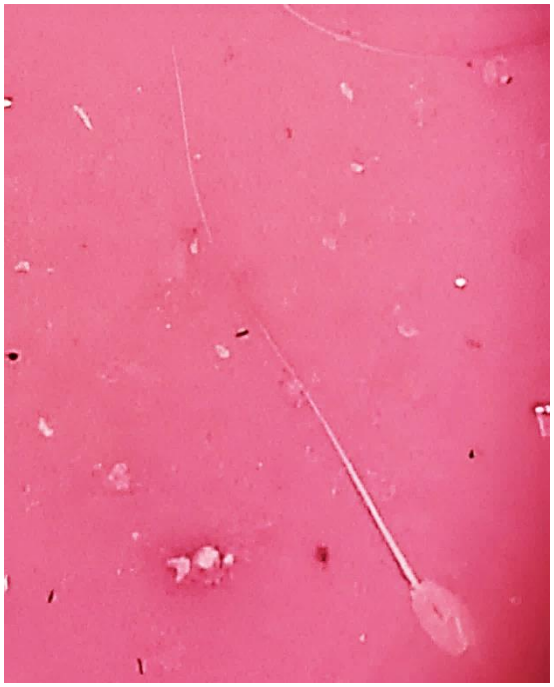
(a); Esp. muerto cola en muñón con gota citoplasmática (cola enrollada debajo de la cabeza)



(a); Esp. vivo con gota citoplasmática distal



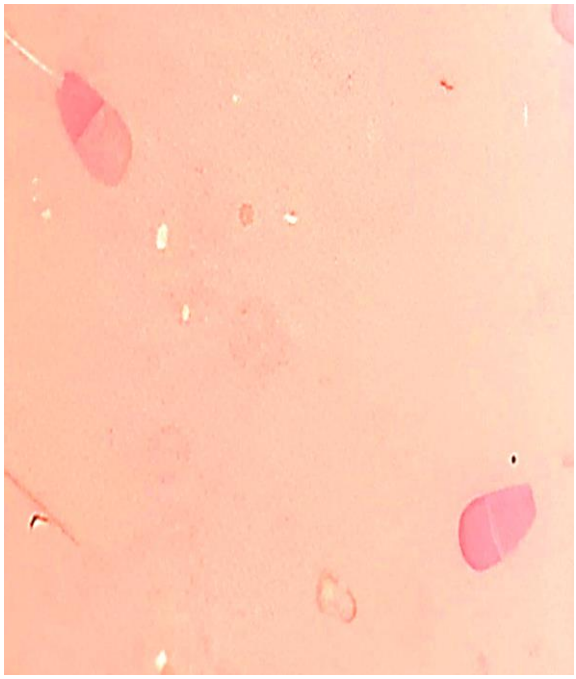
(a) Espermatozoide muerto. con cola doble



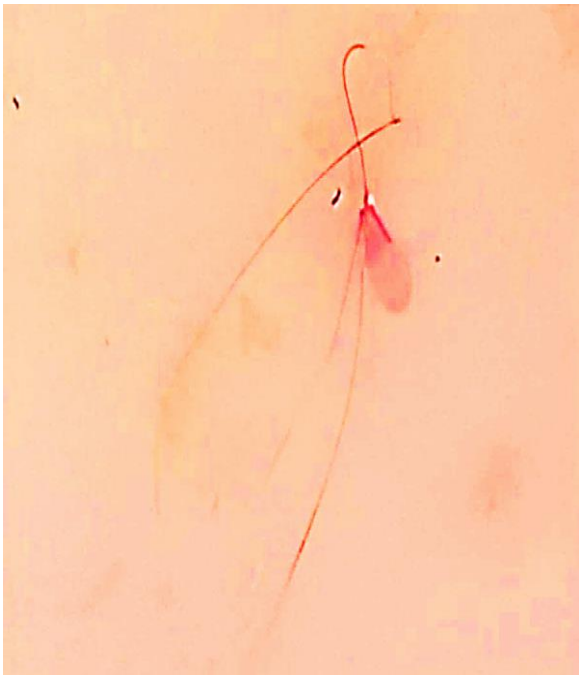
(b); Espermatozoide con vacuola nuclear

(a); Esp. vivo defecto de pieza intermedia

(a); Esp. muerto con defecto de pieza Intermedia con cabeza periforme

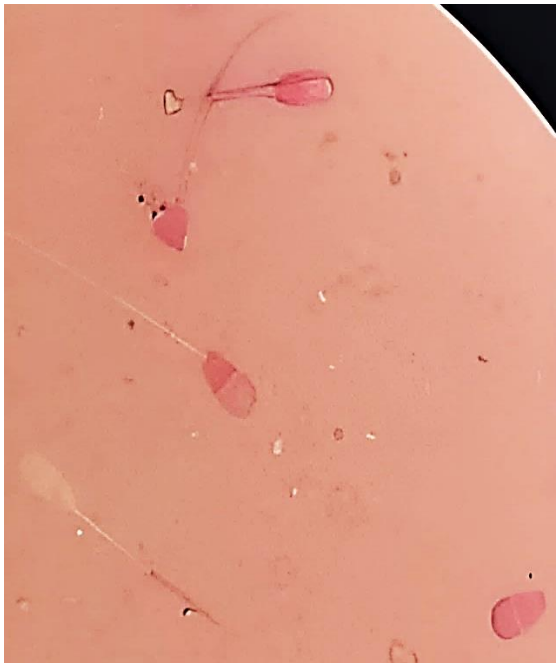


(a); Espermatozoide muerto cabeza decapitada



(a); Esp. muerto cola doblada simple o arrollada (en látigo) Defecto de pieza media

(a); Espermatozoide muerto con cola en muñón (Cola enrrollada)

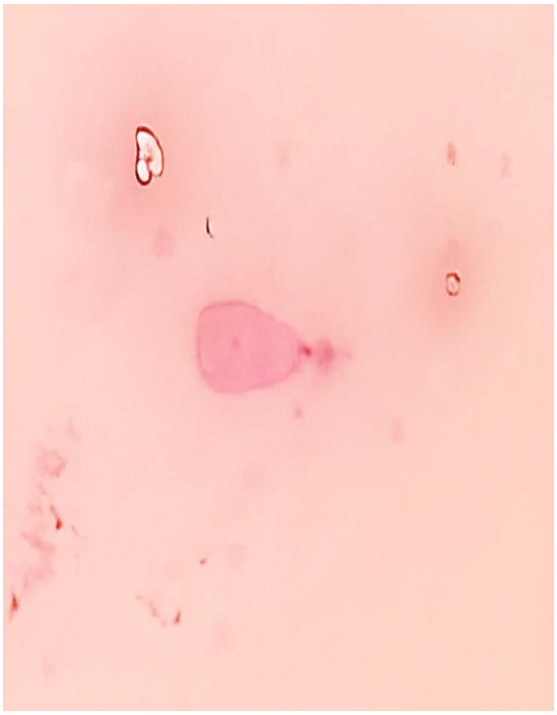


(a); Esp. muerto con desprendimiento de acrosoma (b); Esp, cola doblemente Enrrollada defecto (DAG)

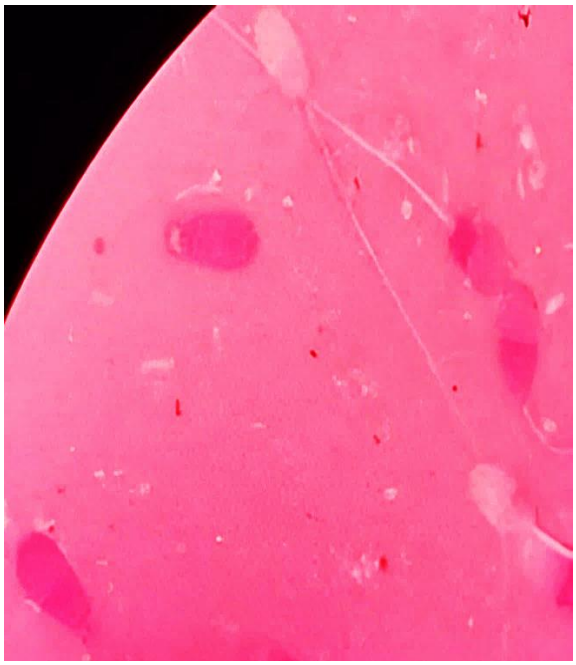
(a); Esp. muerto acrosoma suelto

(a); Esp. muerto defecto con pieza intermedia (nuca rota)

(a) Espermatozoide cola suelta

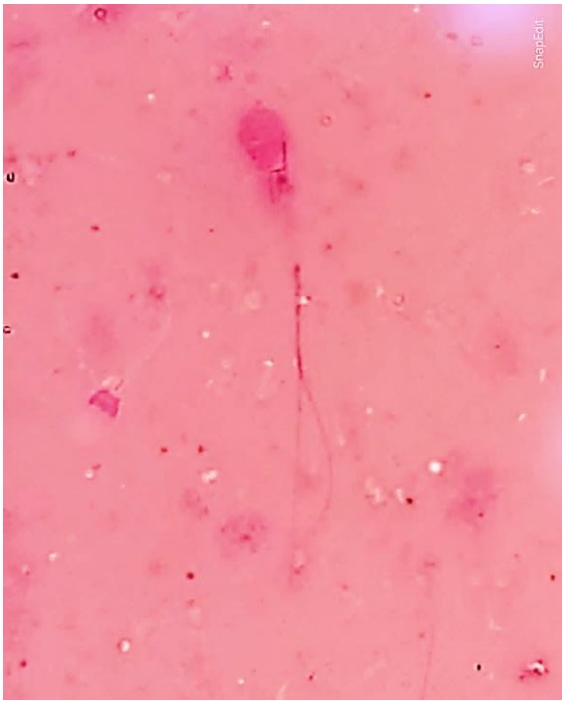


(a); Espermatozoide cabeza suelta con Macrocefalia

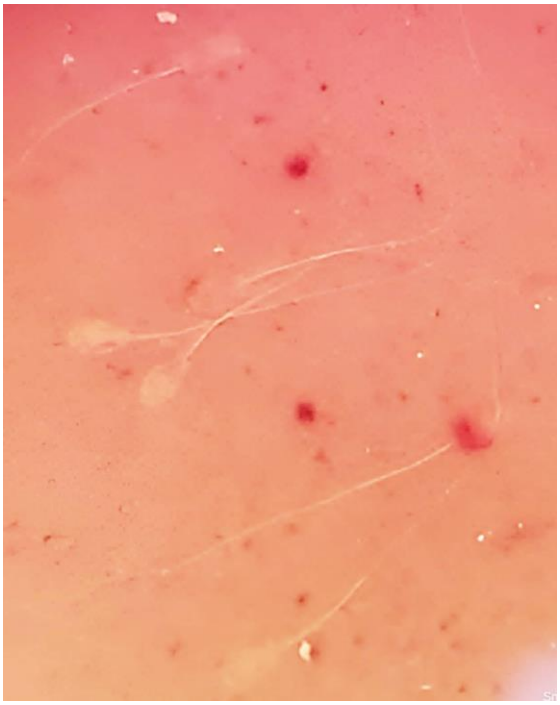


(a); Espermatozoide muerto con cola enrrollada

(a); Espermatozoides muerto con Defecto de pieza distal, Defecto de pieza Intermedia, cabeza decapitada y cola suelta



(a); Espermatozoide muerto con cola doble



(a); Espermatozoide vivo con implantación abaxial

(a); Espermatozoide vivo con cola doblada (Defecto de pieza distal)

(a); Espermatozoide con defecto de pieza intermedia

(a); Espermatozoide vivo con cola enrrollada (Defecto de pieza distal)

(a); Espermatozoide con defecto de pieza intermedia

Anexo 11. Datos obtenidos en laboratorio de las características macroscópicas y microscópicas

PARÁMETROS DE SEMEN FRESCO	Carnero 1232				
	R1	R2	R3	R4	R5
Volumen (ml)	1,5 ml	1 ml	2 ml	2,2 ml	2,2 ml
Color	Blanco cremoso	Blanco cremoso	Blanco cremoso	Blanco cremoso	Blanco cremoso
pH	6,8	6,5	6,8	6,8	6,8
Olor	Sui géneris.	Sui géneris.	Sui géneris.	Sui géneris.	Sui géneris.
Motilidad Masal (%)	5	5	5	5	5
Motilidad Individual (%)	0	0	0	0	0
PARÁMETROS DE SEMEN FRESCO	**Carnero 1330**				
	R1	**R2**	**R3**	**R4**	**R5**
Volumen (ml)	0,8 ml	1,5 ml	2 ml	2,3 ml	2,2 ml
Color	Blanco cremoso	Blanco cremoso	Blanco cremoso	Blanco cremoso	Blanco cremoso
pH	6,8	6,8	6,9	6,9	6,9
Olor	Sui géneris.	Sui géneris.	Sui géneris.	Sui géneris.	Sui géneris.
Motilidad Masal (%)	4	5	5	5	5
Motilidad Individual (%)	0	0	0	0	0

Anexo 12. Datos obtenidos en laboratorio de las características macro y microscópicas

PARAMETROS DE SEMEN DILUIDO	CARNERO 1232						
	TRATAMIENTOS		R1	R2	R3	R4	R5
Motilidad Individual (%) diluido	T1	Optixcell	85	83	86	86	90
	T2	Steridyl	89	87	88	88	80
	T3	Andromed	82	85	81	81	89
PARAMETROS DE SEMEN POST-DESCONGELADO							
	TRATAMIENTOS		R1	R2	R3	R4	R5
Motilidad Individual (%) Post-descongelado	T1	Optixcell	68	62	68	68	62
	T2	Steridyl	55	52	57	64	62
	T3	Andromed	47	47	59	57	52
MORFOLOGIA							
	TRATAMIENTOS		R1	R2	R3	R4	R5
Vivos %	T1	Optixcell	82	80	77	77	80
	T2	Steridyl	88	83	87	88	76
	T3	Andromed	75	76	74	88	77
Muertos %	T1	Optixcell	18	20	23	23	20
	T2	Steridyl	12	17	13	12	24
	T3	Andromed	25	24	26	12	23
VITALIDAD							
	TRATAMIENTOS		R1	R2	R3	R4	R5
Normales %	T1	Optixcell	90	88	88	94	94
	T2	Steridyl	93	89	94	94	92
	T3	Andromed	88	94	92	91	91
Anormales %	T1	Optixcell	10	12	12	6	6
	T2	Steridyl	7	11	6	6	8
	T3	Andromed	12	6	8	9	9

PARAMETROS DE SEMEN DILUIDO	CARNERO 1330						
	TRATAMIENTOS		R1	R2	R3	R4	R5
Motilidad Individual (%) diluido	T1	Optixcell	90	85	84	87	90
	T2	Steridyl	85	80	87	86	83
	T3	Andromed	75	67	80	85	61
PARAMETROS DE SEMEN POST-DESCONGELADO							
	TRATAMIENTOS		R1	R2	R3	R4	R5
Motilidad Individual (%) Post-descongelado	T1	Optixcell	72	70	62	71	65
	T2	Steridyl	70	61	57	67	62
	T3	Andromed	52	52	52	57	56
MORFOLOGIA							
	TRATAMIENTOS		R1	R2	R3	R4	R5
Vivos %	T1	Optixcell	88	90	85	86	87
	T2	Steridyl	84	73	85	90	84
	T3	Andromed	74	75	76	74	73
Muertos %	T1	Optixcell	12	10	15	14	13
	T2	Steridyl	16	27	15	10	16
	T3	Andromed	26	25	24	26	27
VITALIDAD							
	TRATAMIENTOS		R1	R2	R3	R4	R5
Normales %	T1	Optixcell	91	92	89	92	92
	T2	Steridyl	90	93	89	94	94
	T3	Andromed	90	90	92	91	94
Anormales %	T1	Optixcell	9	8	11	8	8
	T2	Steridyl	10	7	11	6	6
	T3	Andromed	10	10	8	9	6

Anexo 13. Insumos y reactivos

Tabla 28. Estimación de costos variables para la producción de pajuelas criopreservadas de semen de ovino en Bs.

Concepto				**Total. Bs**
DILUTORES	**Optixcell**	**Steridyl**	**Andromed**	
	950	750	630	**2330**
	250 ml	500 ml	200 ml	

Concepto	**Unidad**	**Cantidad**	**Precio**	**Total. Bs**
Reactivos				**705**
Polvo sellador	g	400	20	40
Alcohol	Lt.	5.00	15	75
Nigrosina	ml	50	250	250
Eosina	ml	50	250	250
Agua destilada	Lt	----	90	90
Materiales de laboratorio				**5526**
Papel toalla	Pza.	4.00	12.00	48
Papel aluminio	Pza.	1.00	20.00	20
Papel film	Pza.	1.00	25.00	25
Jeringas	60 ml	4.00	16	64
Jeringas	10 ml	3.00	3.00	9.00
Pajuelas de 0.25 ml	Bolsa	2000	1.42	1400
Porta objetos	Caja	4.00	25	100
Cubre objetos	Caja	5.00	25 - 45	145
Nitrógeno liquido	Kg	10	40	400
Lavandina	Lt.	1.00	15	15
Alimentación del carnero	mes	1.00	100	100
Costo mano de obra	pajuela	1200	2.50	3000
Varios				200
	----	----	----	
Costos fijos				**8275.06**
Equipo de laboratorio	----	----	----	4405.06
Infraestructura	----	----	----	750
Carneros	----	----	----	1600
Material de vidrio	----	----	----	1500
Funda	----	----	----	20

Anexo 14. Depreciación de equipos de laboratorio

Activos Fijos	Costo Total	Vida Útil	Depreciación	Mensual
Microscopio Compuesto	17500	10	1750	145,83
Termómetro digital (Criogénico)	3500	3	1166,67	97,22
Baño maría	20000	12	1666.67	138.89
Llenador de pajuelas	98560	15	6570.67	547.56
Refrigerador	3000	8	375	31,25
Destiladora	24534	10	2453,4	204,45
Vagina artificial KIT ovinos	2660	3	886,67	73,89
Termo criogénico	13000	15	866,67	72,22
TOTAL	**182754**		**15735,75**	**4405.06**

Anexo 15. Costo de material semoviente

Material semoviente	Costo Total	Vida útil	Valor de Rescate (carne)	Mensual
Carneros (1232)	800	3	100	24
Carneros (1330)	800	3	100	24
Total	1600		200	48

Anexo 16. Cálculo de ingresos obtenidos por pajuela

Ingresos	Optixcell	Steridyl	Andromed
Producción	1200	1200	1200
Pérdida del 10%	120	120	120
Precio	13,65	13,4	13,3
Ingreso Bruto	**16380**	**16080**	**15960**