UNIVERSIDAD PÚBLICA DE EL ALTO
ÁREA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS, PECUARIAS Y RECURSOS NATURALES
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

TESIS DE GRADO

"EFECTO DE LA REFRIGERACIÓN DURANTE 7 DÍAS EN TRES DILUTORES SEMINALES SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DE ESPERMATOZOIDES OVINOS (*Ovis aries*) EN EL CENTRO EXPERIMENTAL KALLUTACA"

Por:

Erika Yujra Pillco

EL ALTO – BOLIVIA

Diciembre, 2024

UNIVERSIDAD PÚBLICA DE EL ALTO
ÁREA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS, PECUARIAS Y RECURSOS NATURALES
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

"EFECTO DE LA REFRIGERACIÓN DURANTE 7 DÍAS EN TRES DILUTORES SEMINALES SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DE ESPERMATOZOIDES OVINOS (*Ovis aries*) EN EL CENTRO EXPERIMENTAL KALLUTACA"

Tesis de Grado presentado
como requisito para optar el Título de
Ingeniera Agronoma

Erika Yujra Pillco

Asesor:

Ph. D. Lic. Ing. Pedro Angel Delgado Callisaya .....

Tribunal Revisor:

Lic. Ing. Cesar Humberto Quispe Paxipati .....

Lic. Ing. Med. Vet. Hipolito Ramiro Nina Siñani .....

Lic. Med. Vet. Alfredo Luis Coria Conde .....

Aprobada

Presidente Tribunal Examinador .....

DEDICATORIA:

A Dios, por ser mi fortaleza, refugio y por guiar mi camino.

A mi mamá Hilaria Pillco Chambi quien siempre me apoyó incondicionalmente animándome a salir adelante.

También doy gracias a mi hijo Matías Caleb Flores Yujra quien con su infinito amor me incentiva a seguir adelante.

A mi esposo Keevin Flores Alvaro quien me animó y apoyo con su amor incondicional.

A mis hermanas: Tania, Ilsen y Wendy Yujra Pillco por el apoyo para mi formación académica.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme fuerzas y valor para poder concluir el presente trabajo.

A la Universidad Pública de El Alto, carrera Ingeniería Agronómica por haberme brindado los predios del Centro Experimental Kallutaca, para la ejecución del presente trabajo y a todos los docentes que me impartieron los conocimientos para mi formación profesional.

Al Instituto Nacional de Innovación Agropecuaria y Forestal (INIAF), por la colaboración y apoyo del presente trabajo.

Al Ph. D. Pedro Angel Delgado Callisaya, por ser asesor de la tesis, por brindarme intensamente su ayuda durante la fase de ejecución y culminación del presente trabajo. Asimismo, darle mi gratitud por su amistad.

A mis tribunales revisores: Lic. Ing. Med. Vet. Hipolito Ramiro Nina Siñani, Lic. Med. Vet. Alfredo Luis Coria Conde y Lic. Ing. Cesar Humberto Quispe Paxipati, por la colaboración, apoyo moral y preocupación del trabajo.

Y un agradecimiento especial a todos aquellos compañeros de la carrera de Ingeniería Agronómica, que me colaboraron durante la ejecución del trabajo y mis sinceros agradecimientos por toda la ayuda brindada.

CONTENIDO

ÍNDICE DE TEMAS i
ÍNDICE DE CUADROS v
ÍNDICE DE FIGURAS vi
ÍNDICE DE ANEXOS vii
ABREVIATURAS ix
RESUMEN x
ABSTRACT xi

ÍNDICE DE TEMAS

1. INTRODUCCIÓN 1
1.1. Planteamiento del problema 2
1.2. Justificación 2
1.3. OBJETIVOS 3
1.3.1. Objetivo General 3
1.3.2. Objetivos Específicos 3
1.4. HIPOTESIS 3
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA 4
2.1. Generalidades 4
2.1.1. Generalidades de ovinos 5
2.1.2. Anatomía del aparato reproductor del macho 6
2.1.3. Órganos glandulares 6
2.1.4. Órganos productores y de almacenamiento 7
2.1.5. Órgano copulador 8
2.1.6. Eyaculado 8
2.2. Recolección del semen por vagina artificial 8

2.2.1. Características del semen de carnero 9
2.2.2. Plasma Seminal 10
2.2.3. Características del semen de carnero 11
2.2.4. Células espermáticas 11
2.2.5. Metabolismo de los espermatozoides 12
2.2.5.1. Espermatocitogenesis 12
2.2.5.2. Espermiogénesis 14
2.2.5.3. Espermiación 14
2.3. Importancia de la evaluación seminal 15
2.3.1. Caracteristicas macroscópicas 15
2.3.1.1. Volumen 15
2.3.1.2. Color y olor 15
2.3.2. Evaluación microscópica 16
2.3.2.1. Motilidad masal 16
2.3.2.2. Motilidad individual 17
2.3.2.3. Motilidad progresiva 19
2.3.3. Vitalidad espermática 20
2.3.3.1. Tinciones vitales 20
2.3.4. Integridad de la membrana espermática 21
2.3.5. Criopreservación de semen 22
2.4. Dilutores del semen 22
2.4.1. Control de presión osmótica 24
2.4.2. Componentes de los dilutores del semen 24
2.4.3. Tipos de dilutores 24
2.4.3.1. Leche 25
2.4.3.2. Optixcell 25

2.4.3.3. Triladyl® 25
2.4.4. Agentes antimicrobianos 26
2.5. Shock de frio 26
2.5.1. Refrigeración de semen en ovinos 27
2.5.1.1. Los diluyentes para semen refrigerado ovino 27
2.5.1.2. Inseminación con el semen refrigerado 27
3. MATERIALES Y MÉTODOS 29
3.1. Localización 29
3.1.1. Ubicación Geográfica 29
3.2. Características Edafoclimáticas 29
3.2.1. Clima 29
3.3. Materiales 30
3.3.1. Material genético 30
3.3.2. Material de laboratorio 30
3.3.3. Material de campo 31
3.3.4. Material de gabinete 32
3.4. Metodología 33
3.4.1. Procedimiento 33
3.4.1.1. Alimentación y sanidad de los carneros 33
3.4.1.2. Preparación del área de descanso, cuarto de colecta y laboratorio 33
3.4.1.3. Adiestramiento para el uso de vagina artificial 33
3.4.1.4. Preparación de los carneros para la colección del semen 34
3.4.1.5. Proceso de colección del semen 34
3.4.1.6. Manejo del eyaculado 34
3.4.1.7. Análisis de semen fresco colectado 35
3.4.1.8. Características macroscópicas 35

3.4.1.8.1. Dilución del semen 35

3.4.1.8.2. Periodo de adaptación a 5ºC 36

3.4.1.8.3. Preparación de pajillas, empajillado y sellado 36

3.4.1.8.4. Análisis del semen refrigerado 37

3.4.2. Diseño experimental 39

3.4.3. Factores de estudio o tratamientos en estudio 39

3.4.4. Variables de respuesta 40

3.4.5. Análisis estadístico 40

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 41

4.1. Determinación de la motilidad individual de espermatozoides de carneros conservados en refrigeración desde 1 a 7 días en tres dilutores seminales. 41

4.2. Determinación del porcentaje de espermatozoides vivos de carneros, conservados en refrigeración desde 1 a 7 días en tres dilutores seminales 45

4.3. Determinación del porcentaje de integridad de membrana celular de semen de carnero, conservados en refrigeración desde 1 a 7 días en tres dilutores seminales 49

5. CONCLUSIONES 52

6. RECOMENDACIONES 53

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS 54

8. ANEXOS 62

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Bolivia: Número de cabezas ganado ovino por sexo según departamento..... 4

Cuadro 2. Características del semen ovino 9

Cuadro 3. Componentes químicos del semen ovino..... 10

Cuadro 4. Clasificación de la onda de movimiento de los espermatozoides 17

Cuadro 5. Escala de vigor espermático de acuerdo a su motilidad..... 19

Cuadro 6. Clasificación de espermatozoides con movimiento rectilíneo progresivo..... 20

Cuadro 7. Distribución de muestras..... 38

Cuadro 8. Cuadro de Análisis de varianza para motilidad individual durante 7días a efecto de tres dilutores seminales..... 41

Cuadro 9. Comparación de medias por Tukey de la motilidad individual de espermatozoides de carneros, en refrigeración durante 7 días. 42

Cuadro 10. Comparación de medias por Tukey de la motilidad individual de espermatozoides de carneros, en refrigeración a efecto de dilutores. 42

Cuadro 11. Cuadro de Análisis de la Varianza para el porcentaje de espermatozoides vivos de carneros, refrigerados durante 7 días a efecto de tres dilutores seminales 45

Cuadro 12. Comparación de medias por Tukey del porcentaje de espermatozoides vivos de carneros en refrigeración durante 7 días. 46

Cuadro 13. Comparación de medias por Tukey del porcentaje de espermatozoides vivos de carneros, en refrigeración a efecto de dilutores..... 46

Cuadro 14. Evaluación de porcentaje de espermatozoides vivos de carneros para los tres tratamientos en 7 días..... 47

Cuadro 15. Cuadro de Análisis de Varianza para el porcentaje integridad de membrana celular del espermatozoide de carnero, refrigerados durante 7 días a efecto de tres dilutores seminales 49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación del área de investigación (Mapcarta, 2023) 29

Figura 2. Evaluación de la motilidad individual durante 7 días a efecto de tres dilutores 43

Figura 3. Evaluación de la integridad de membrana celular del semen ovino para los tres tratamientos a lo largo del período de evaluación. 50

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Machos ovinos reproductores 63

Anexo 2. Alimentación de los ovinos reproductores 63

Anexo 3. Palpación escrotal y medición de circunferencia testicular, para determinar la integridad física. Testículos firmes y bien desarrollados son indicativos de buena calidad reproductiva. 64

Anexo 4. Preparación de vagina artificial 64

Anexo 5. Colección de semen..... 65

Anexo 6. Preparado de los ambientes y desinfectado de material 65

Anexo 7. Semen fresco colectado..... 66

Anexo 8. Armado y refrigeración de las pajuelas seminales..... 66

Anexo 9. Toma de datos de motilidad del semen mediante isperm CASA 67

67

Anexo 10. Procedimiento de tinción de eosina-nigrosina para la elaboración de porcentaje de espermatozoides vivos de carneros..... 67

Anexo 11. Espermatozoides teñidos son (muertos) y los no teñidos son (vivos). 68

Anexo 12. Espermatozoides reaccionados en un medio hiposmótico. Se observa el flagelo torcionado helicoidalmente, flagelo enrollado, flagelo ascendido, cabeza hinchada y la cola hinchada lo cual es indicativo de que sus membranas han estado intactas, ... 68

Anexo 13. Resultados del efecto de refrigeración durante 7 días en tres dilutor 69

Anexo 14. Cuadro de Análisis de varianza para motilidad individual durante 7días a efecto de tres dilutores seminales..... 70

Anexo 15. Comparación de medias por Tukey de la motilidad individual de espermatozoides de carneros, en refrigeración durante 7 días. 70

Anexo 16. Comparación de medias por Tukey de la motilidad individual de espermatozoides de carneros, en refrigeración a efecto de dilutores. 70

Anexo 17. Evaluación de la motilidad individual durante 7 días a efecto de tres dilutores 71

Anexo 18. Cuadro de Análisis de la Varianza para el porcentaje de espermatozoides vivos de carneros, refrigerados durante 7días a efecto de tres dilutores 71

Anexo 19. Comparación de medias por Tukey determinando el porcentaje de espermatozoides vivos de carneros en refrigeración durante 7 días. 72

Anexo 20. Comparación de medias por Tukey del porcentaje de espermatozoides vivos de carneros, en refrigeración a efecto de dilutores..... 72

Anexo 21. Evaluación de porcentaje de espermatozoides vivos de carneros para los tres tratamientos en 7 días..... 72

Anexo 22. Cuadro de análisis de la Varianza para integridad de membrana celular de semen de carnero durante 7 días a efecto de tres dilutores..... 73

Anexo 23. Análisis de efectos simples para integridad de membrana celular de espermatozoides de carneros, refrigerado en dilutores en el Centro Experimental de Kallutaca..... 73

Anexo 24. Evaluación de la integridad de membrana celular del semen ovino para los tres tratamientos a lo largo del período de evaluación. 74

ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
cm	Centímetros
ml	Mililitros
pH	Potencial de Hidrogeno
µl	Millonésima parte de un litro (microlitro)
VA	Vagina artificial
MP	Movimiento progresivo
mOsm\l	Media de osmoles\litro

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el centro experimental de Kallutaca de la Universidad Pública de El Alto, Laja – La Paz; con el objetivo de evaluar el efecto de la refrigeración durante 7 días en tres dilutores seminales, sobre las características microscópicas de espermatozoides ovino, para ello se emplearon 3 carneros entre 2 y 3 años de edad, a los que se les entrenaron para la colecta de semen por el método de vagina artificial. El semen se colectó durante las mañanas a horas 8:00 am, para la dilución se emplearon dilutores Triladyl, Optixcell y Leche light. Las muestras se evaluaron cada 24 horas durante siete días en el Laboratorio Clínico Veterinario de la Carrera Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Pública de El Alto. La motilidad espermática fue 90.74, 90.04 y 88.94 % en los días 3, 1 y 2 respectivamente, siendo estadísticamente similares pero diferentes y superiores respecto a los demás días. La motilidad espermática fue 77.36% con el dilutor Triladyl, siendo estadísticamente diferente y superior respecto a los demás dilutores, no hubo evidencia estadística para asumir interacción entre factores (pr>0.05), La vitalidad espermática fue 93.18, 92.49 y 92.24 % en los días 3, 1 y 2 respectivamente, siendo estadísticamente similares pero diferentes y superiores respecto a los demás días. La vitalidad espermática fue 81.78 % con el dilutor Triladyl, siendo estadísticamente diferente y superior respecto a los demás dilutores, no hubo evidencia estadística para asumir interacción entre factores (pr>0.05). La Integridad de membrana celular mostró diferencias estadísticas a efecto de los días y el dilutor, además existe evidencia estadística para asumir interacciones entre los factores (pr<0.01), las mejores integridades espermáticas se obtuvieron los días 1, 2 y 3 con los dilutores Optixcel (90.08%) y Triladyl (89.07%). Los dilutores influyen sobre las características microscópicas de espermatozoides ovino durante los días de evaluación.

ABSTRACT

This research work was carried out at the Kallutaca experimental center of the Public University of El Alto, Laja - La Paz; with the aim of evaluating the effect of refrigeration for 7 days in three seminal extenders, on the microscopic characteristics of sheep sperm. For this, 3 rams between 2 and 3 years of age were used, which were trained for semen collection by the artificial vagina method. The semen will be collected in the mornings at 8:00 am, for dilution Triladyl, Optixcell and light milk diluters were used. The samples were evaluated every 24 hours for seven days in the Veterinary Clinical Laboratory of the Veterinary Medicine and Animal Husbandry Degree of the Public University of El Alto. Sperm motility was 90.74, 90.04 and 88.94 % on days 3, 1 and 2 respectively, being statistically similar but different and higher than on the other days. Sperm motility was 77.36% with the Triladyl dilutor, being statistically different and higher than on the other dilutors. There was no statistical evidence to assume interaction between factors (pr> 0.05). Sperm vitality was 93.18, 92.49 and 92.24 % on days 3, 1 and 2 respectively, being statistically similar but different and higher than on the other days. Sperm vitality was 81.78 % with the Triladyl dilutor, being statistically different and higher than on the other dilutors. There was no statistical evidence to assume interaction between factors (pr> 0.05). The cell membrane integrity showed statistical differences due to the effect of the days and the extender, and there is statistical evidence to assume interactions between the factors (pr<0.01). The best sperm integrities were obtained on days 1, 2 and 3 with the extenders Optixcel (90.08%) and Triladyl (89.07%). The extenders influence the microscopic characteristics of ovine spermatozoa during the evaluation days.

1. INTRODUCCIÓN

La crianza y producción de ovinos (*Ovis aries*) en Bolivia es de importancia social y económica para numerosas familias campesinas, según el Censo Agropecuario (INE, 2023), la actividad ganadera de Bolivia se concentra en la producción de ganado bovino, ovino, porcino, caprino, camélido, equino y aves, siendo la producción de ovinos a nivel nacional de 7.476.133 cabezas, el mayor productor es el departamento de La Paz con 2.311.945 cabezas, seguido de Potosí 1.502.449 cabezas y Oruro con 1.378.387 cabezas el menor productor es Pando con 3.302 cabezas de este ganado. Actualmente existe alto interés económico en el ovino como fuente de carne y leche en el país, razón para impulsar la mejora genética ganadera ovina durante los próximos años (INE, 2023).

El Altiplano de Bolivia, a una altitud promedio de 4000 m.s.n.m, tiene un potencial natural para el desarrollo de actividades agrícolas. La producción ovina a pesar de no ser trascendental ayuda en la economía a productores de la zonas periurbanas y rurales en las cuales un ovino es criado producido y vendido posiblemente en una razón de un año a precio de hasta 150 a 500 bs aproximadamente(Aguirre *et al.* 2012).

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 refrigerado aún enfrenta desafíos debido a la baja tasa de fertilidad en ovinos y esto puede ser prevenido mediante el uso de un dilutor adecuado (Tobar *et al*. 2020).

En tal sentido, la criopreservación del semen a través del empleo de dilutores con diferentes componentes hace realidad la perpetuación de las características deseables, aun posterior a la muerte o sacrificio de los reproductores seleccionados (Guerrero *et al*. 2012).

La refrigeración espermática consiste en mantener los espermatozoides a una temperatura de 15 a 20 °C o entre 4 a 5 °C, con la finalidad de evitar la muerte de los espermatozoides y mantener su carácter fecundante (Rossi, 2012)

1.1. 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 (IATF) por parte de empresas privadas o públicas. En consecuencia, el semen ovino no se comercializa como en otras especies, siendo el ejemplo más claro el bovino. Como resultado, no existen diluyentes establecidos en el país para la crioconservación de semen ovino que sean altamente confiables, lo que representa una gran debilidad para el desarrollo integral de este tipo de explotación.

Esto, junto con otras causas, convierte en antieconómico criar machos sementales de cualquier especie, en este caso carneros reproductores. Además, no se tiene certeza de la calidad del semen que producen estos sementales, ya que solo se confía en algunas técnicas obsoletas para predecir dicha calidad. Probablemente, las bajas tasas de fertilidad (25-40%), así como la dificultad de utilizar material genético de otras regiones geográficas, se deben a los daños criogénicos que sufren los espermatozoides ovinos durante la refrigeración, debido a la sensibilidad que estas células muestran a los cambios de temperatura en el proceso de congelación y descongelación. Los principales lugares de daño causados por la refrigeración en las células son las membranas plasmáticas y acrosomales, estructuras celulares importantes para la supervivencia y fertilidad de los espermatozoides (Corredor, 2014).

1.2. Justificación

La presente investigación tiene como justificación la posibilidad de identificar, entre tres diluyentes comerciales, aquel que posea mejor capacidad de criopreservación durante los procesos de refrigeración de semen ovino. Para ello, se procedió a realizar un análisis en el cual se evaluó la motilidad individual, vitalidad y defectos de la membrana espermática del semen ovino refrigerado, con el fin de obtener datos que permitan establecer un banco de semen y potencializar el mejoramiento genético de los hatos ovinos, incentivando así a los ganaderos a utilizar la biotecnología en esta especie.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. Objetivo General

- Evaluar el efecto de la refrigeración durante 7 días en tres dilutores seminales, sobre las características microscópicas de espermatozoides ovinos en el Centro Experimental Kallutaca

1.3.2. Objetivos Específicos

- Determinar la motilidad individual de espermatozoides de carneros, conservados en refrigeración desde 1 a 7 días en tres dilutores seminales.

- Determinar el porcentaje de espermatozoides vivos de carneros, conservados en refrigeración desde 1 a 7 días en tres dilutores seminales

- Determinar el porcentaje de integridad de membrana celular en espermatozoides de carneros conservados en refrigeración desde 1 a 7 días en tres dilutores seminales.

1.4. HIPOTESIS

Ho. No existe diferencia en la refrigeración durante 7 días en tres dilutores seminales, sobre las características microscópicas y de espermatozoides ovinos en el Centro Experimental Kallutaca.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Generalidades

El mundo de la ciencia animal ha avanzado considerablemente en el campo del mejoramiento genético de los bovinos y ovinos, apoyándose en las biotecnologías como herramienta importante para alcanzar una producción eficiente de leche y carne. La inseminación artificial es una biotecnología que permite acelerar el mejoramiento genético de los ovinos, para lo cual el material genético del macho ovino (célula espermática) debe ser conservado para su posterior difusión (Molina y Nuñes 2015).

No obstante, se debe considerar que los resultados de fertilidad del semen refrigerado dependerán de las características originales del semen fresco, los diluyentes, la técnica de conservación y la eficiencia en el proceso de inseminación artificial. En general, los resultados del semen congelado son inferiores a los del semen fresco (Cabrera y Pantoja 2012).

En Bolivia la población de los ovinos alcanza a los 7.476.133 cabezas de ganado ovino, las cuales 4.945.436 son hembras y 2.530.697 machos. Los departamentos de La Paz y Potosí reportan un mayor número de ovejas (INE, 2023)

Cuadro 1. Bolivia: Número de cabezas ganado ovino por sexo según departamento

DEPARTAMENTO	GANADO OVINO		
	TOTAL	MACHO	HEMBRA
Chuquisaca	689.881	277.280	412.601
La Paz	2.311.945	765.626	1.546.319
Cochabamba	1.032.270	347.254	685.016
Oruro	1.378.387	448.509	929.878
Potosí	1.502.449	518.150	984.299
Tarija	385.972	125.805	260.167
Santa Cruz	145.401	40.466	104.935
Beni	26.526	6.760	19.766
Pando	3.302	847	2.455

Fuente: (INE, 2023)

2.1.1. 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 (Venegas, 2003).

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 (Morales, 2004).

La pubertad en el carnero es variable según la raza, la alimentación, sanidad, manejo y factores ambientales. El desarrollo de los testículos y formación de espermatozoides, es de 5 a 6 meses de edad, con un peso promedio de 40 a 60 kg., e inicia la actividad sexual en presencia de hembras activas como reproductoras (Márquez, 2014).

Según Gutierrez, (2023) 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. 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 (Monsón, 2005).

2.1.2. Anatomía del aparato reproductor del macho

El carnero reproductor debe tener los órganos reproductores completamente desarrollados, sin defecto congénito para cumplir funciones reproductivas (Jainudeen y Hafez, 2000).

2.1.3. Órganos glandulares

a) **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 (Venegas, 2003).

   Gutierrez (2023) 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 presenta una correlación 0.68 - 0.78 con el fotoperiodo. En machos 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.

b) **Vesícula seminal o glándulas vesicales:** Son dos sacos piriformes que se encuentran sobre el cuello de la vejiga. Como función se les proporciona la producción de una sustancia fluida que sirve de vehículo a la salida de los espermatozoides; esa sustancia contiene fructuosa, ácido cítrico, potasio, sorbitol, y enzimas (Londra, 2018).

c) **Próstata:** Es una glándula lobulosa, cuya función es producir un líquido que evita la aglutinación de los espermatozoides al momento de la eyaculación este es rico en proteínas y sales minerales (Álvarez, 2008)

d) **Glándulas bulbo uretral:** Se les llama también glándulas de *Cowper* o *Mery* son de forma redondeadas, ubicadas a los lados de la uretra, su función es de producir un lubricante en el momento de la excitación, para el transporte de los espermatozoides (Londra, 2018)

2.1.4. Órganos productores y de almacenamiento

a) **Túbulos seminíferos:** Son estructuras semejantes a los vasos sanguíneos, que están formadas por capas de células especiales en su parte interna llamadas sertoli donde hay producción de espermatozoides. Esos túbulos drenan, hacia el centro del testículo, en túbulos rectos y de estos a una red de conducto llamado rete testis (Fuentes, 2022).

b) **Rete testis:** La rete testis, es un conjunto de túbulos conectados entre sí, están ubicados en la parte central y superior del testículo, su función consiste en recoger los espermatozoides que provienen de los túbulos seminíferos a través de los túbulos rectos. Una vez colectados los espermatozoides en la rete testis, estos viajan a través de los conductos eferentes a la cabeza del epidídimo, todavía sin capacidad fecundante, la que adquirirán en su paso por el epidídimo, en donde tiene lugar el proceso de maduración (Fuentes, 2022).

c) **Epidídimo:** El epidídimo no es solo un conducto para los espermatozoides, también proporciona un ambiente especial para que maduren y adquieran capacidad fecundante, el epidídimo se compone de cabeza, cuerpo y cola. En los dos primeros se producen el transporte y maduración de los espermatozoides. La cola sirve para reservar los espermatozoides. El paso de los espermatozoides a través del epidídimo dura unos 10 días en el ganado, la cabeza del epidídimo se encuentra alrededor del 36% de esperma y el cuerpo, alrededor del 18%. La cola del epidídimo tiene la capacidad de almacenar alrededor de 45 a 70% de los espermatozoides producida diariamente, para permanecer allí hasta que son eyaculados. En la cola del epidídimo es el sitio donde los espermatozoides maduros se almacenan durante varios días o semanas en una condición viable y fértil antes de la eyaculación (Dueñas, 2017)

d) **Conducto Deferente:** Es un conducto que sirve para transportar los espermatozoides hasta el lugar de la uretra, antes de llegar a depositarse estos reciben las secreciones de las glándulas sexuales accesorias, formando en conjunto el líquido seminal o semen (Venegas, 2003).

2.1.5. Órgano copulador

Pene y prepucio: 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. 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 (Luna, 2023).

2.1.6. Eyaculado

La eyaculación sucede debido a un reflejo de contracción del epidídimo, vasos deferentes, uretra y glándulas accesorias, el reflejo es causado por la estimulación del glande del pene durante la monta natural o por la vagina artificial usada para colectar semen (Quispe *et al.* 2023).

2.2. Recolección del semen por vagina artificial

La vagina artificial provee estimulación térmica (temperatura) y mecánica (presión) para producir la eyaculación. Consiste en un tubo externo rígido, por ej. caño de polipropileno térmico (17 cm x 5.5 cm) y una camisa interna de látex. La misma se repliega y asegura 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 un tubo colector (Oaxaca *et al.* 2006).

La vagina se carga con 40-60 ml de agua caliente a 50 ºC o más, según las pérdidas de calor que se produzcan hasta el momento de su utilización, siendo importante que la temperatura interior de la misma al momento de la eyaculación sea de aproximadamente 40 ºC. En ambientes muy fríos pueden disminuirse las pérdidas de calor protegiendo el conjunto con una funda exterior, y al tubo recolector previamente templado, con un estuche (Garner y Hafez 2000).

La vagina cuenta con una válvula lateral que facilita esta operación. Asegurada la oveja en el brete de sujeción, el operador se ubicará del lado derecho del macho de modo que su mano diestra sujete la vagina con el extremo abierto frente al prepucio, en un ángulo de 45º con respecto al piso, debiendo estar preparado para una monta y eyaculación veloz. Cuando el macho monta, el operador debe desviar el pene lateralmente para enfrentarlo a

la vagina artificial. Un "golpe" del animal hacia arriba y hacia adelante indica que la eyaculación ha ocurrido (Ramos, 2011).

2.2.1. Características del semen de carnero

A partir de diversos reportes, en promedio el carnero tiende a eyacular una cantidad de semen que oscila entre 0.75 a 2 ml., conteniendo una alta concentración de espermatozoides, los cuales son altamente viables (Chirinos, 2009).

El semen es el líquido generativo del macho ya que contiene los gametos masculinos (espermatozoides), que se deposita en la vagina de la hembra durante la copula o puede recogerse por medios artificiales para su estudio, almacenamiento y/o uso en inseminación artificial (Espinoza *et al*. 2023).

Garner y Hafez, (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.

Cuadro 2. Características del semen ovino

AUTOR Y AÑO	VOLUMEN (ml)	CONSENTRACION (millones/ml)	MOTILES %	VIVOS CON ACROSOMA	INTEGRIDAD DE MEMBRANA
Gamer y Hafez, 2000	0,8-1,2	2000 - 3000	60 – 80		
Paulenz y col., 2002	0,75 – 2,0	> 3500	>70		
Gil y col., 2003	0,75 – 2,0	>2500	>70		
Santiani y col., 2004			80 - 95	83 - 95	70 - 90
Aisen y col., 2000			79 - 88	90 - 95*	

Porcentaje de espermatozoides motiles con el acrosoma integro Fuente: (Monsón, 2005).

2.2.2. Plasma Seminal

Es una mezcla compleja de los distintos líquidos segregados por una serie de órganos que comprende el epidídimo, las ampollas deferentes, las vesículas seminales, la próstata, las glándulas de Cowper y algunas glándulas situadas en las paredes del conducto uretral (Dueñas, 2017).

El principal componente del plasma seminal es el agua (75%)es un líquido sensiblemente isotónico o neutro. El pH del plasma seminal se mantiene muy próximo a 7,0 por un complejo sistema amortiguador, aunque también aparecen sustancias orgánicas e inorgánicas que contienen distintos cationes, tales como el potasio, el sodio, el calcio y el magnesio encontrándose también cloruro y fosfato. El potasio y magnesio favorecen la vitalidad del espermatozoide, por el contrario, el calcio y los metales pesados la dificultan o anula; estos bioquímicos sirven de protectores y nutrientes de los espermatozoides .(Peña y Sáncchez 2008).

Cuadro 3. Componentes químicos del semen ovino

COMPONENTES QUIMICOS	VALORES (mg/100ml)
pH	5,9 – 7,3
Proteína	5000
Fructuosa	250
Sorbitol	26 - 170
Ácido cítrico	110 - 270
Inositol	7 - 14
Glicerilfosforilcolina	1 100 – 2 100
Sodio	178 ± 11
Potasio	84 ± 4
Calcio	6 ± 2
Magnesio	6 ± 0,8
Cloruro	86

Fuente: (Garner y Hafez, 2000).

2.2.3. Características del semen 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 (González *et al*. 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 (Rossi, 2012).

2.2.4. 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).

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 (Bergstein *et al*. 2017).

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 (González *et al*. 2008).

El axonema queda rodeado de las nueve fibras densas procedentes de cada una de las columnas segmentadas de la pieza de conexión, de forma que cada una de ellas lleva un trayecto longitudinal en relación estrecha con uno de los nueve dobletes del axonema. Se considera que el componente motor del flagelo es el axonema y las fibras densas, debido a su composición de proteínas ricas en cisteína, que presentan grupos sulfhidrilo (-SH) lo que da lugar a la formación de puentes disulfuro (-S-S-) durante la maduración espermática y que podrían conferir propiedades elásticas y facilitar así la propagación del movimiento ondulatorio a través del flagelo (Córdoba, 2004).

La pieza intermedia se caracteriza por presentar bajo la membrana plasmática, una vaina de mitocondrias orientadas circularmente y dispuestas helicoidalmente. Esta organización estructural es común en todos los espermatozoides de mamíferos, sin embargo, el número de giros que presenta la espiral varía, según las especies, desde unas quince vueltas en los primates hasta unas trescientas en algunos roedores. Las mitocondrias son las encargadas de producir la energía necesaria que requiere el movimiento espermático. Inmediatamente distal a la última vuelta de la vaina mitocondrial se dispone el anillo, que se fija a la membrana para impedir el retroceso de las mitocondrias hacia las zonas distales de la cola(Cabrera, 2021).

2.2.5. Metabolismo de los espermatozoides

Los espermatozoides constituyen un medio fácilmente discernible para evaluar su estado fisiológico, 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 (Garner y Hafez, 2000).

2.2.5.1. Espermatocitogenesis

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 (Bassas, 2001).

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 (Avalos 2018).

La espermatogénesis dura entre 64 días. La maduración empieza con espermatogonias de tipo A que se dividen por mitosis para dar una reserva continua de células madre, luego pasan a ser espermatogonias intermedias, terminando esta con espermatogonias del tipo B estas sufren un crecimiento (que dura 26 días) convirtiéndose en espermatocitos primarios (Jainudeen y Hafez, 2000).

Según Jainudeen y Hafez, (2000), 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 2000).

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 (Gomez *et al*. 2010).

2.2.5.2. 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, 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 (Gomez *et al*. 2010).

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 2009). 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 ovocito (Bassas, 2001).

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 (Gutierrez, 2023).

2.2.5.3. Espermiación

Se llama espermiacion a la liberación de las células germinales hacia la luz del túbulo seminífero, en esta etapa, las espermatides se orientan perpendicularmente hacia la pared de la celula de Sertoli y sobresalen poco a poco hacia la luz del túbulo. La unión de las

espermatides con la célula de Sertoli, es entonces un puente intercelular que se va extruyendo hasta solo quedar un delgado tallo conectado al cuello de la espermatides. Después de la liberación, queda una gota citoplasmática en el espermatozoide y los residuos son fagocitados pos las células de Sertoli, que además fagocita muchas espermatides degeneradas (Jainudeen *et al*. 2000).

2.3. Importancia de la evaluación seminal

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, 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),(Cabrera y Pantoja, 2012).

2.3.1. Caracteristicas macroscópicas

2.3.1.1. Volumen

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. Molinia *et al*. (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.(González *et al.* 2008).

2.3.1.2. Color y olor

El semen de carnero es normalmente blanco cremoso, blanco lechoso o crema pálido. Dicha coloración es producida por la presencia de riboflavina en el plasma seminal (Mendoza and Chow 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 (Venegas, 2003).

La coloración blanquecina puede ser debido al hecho de que existan una concentración escasa de espermatozoides y el esperma 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 (Derivaux *et al.* 1976).

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 subgéneros (Londra, 2018).

2.3.2. Evaluación microscópica

2.3.2.1. 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 (Molinia *et al*. 1994).

Para la valoración de la movilidad masal se coloca una gota de semen puro (sin diluir) en una 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. La clasificación varía en función de la escala utilizada: de 0 a 5 (Molinia *et al.* 1994).

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).

Cuadro 4. 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:(Molinia *et al.* 1994).

2.3.2.2. Motilidad individual

La movilidad espermática es otro parámetro fundamental para valorar la calidad del eyaculado. Esta depende de factores intrínsecos como son la estructura del flagelo y la actividad enzimática de la dineína, así como de factores extrínsecos como por ejemplo la composición bioquímica del medio extracelular en que se encuentra el espermatozoides (Palomino *et al*. 2007).

El término “movilidad” incluye dos conceptos diferentes, la “movilidad lineal activa” y el “porcentaje total de espermatozoides dotados de movimiento”. Los espermatozoides muestran diferentes patrones de movimiento adaptados a sus necesidades funcionales. Así, los espermatozoides del eyaculado, dentro del plasma seminal muestran unas trayectorias lineales que son las que fisiológicamente mostrarían al penetrar en el moco cervical. Cuando el espermatozoide abandona el plasma seminal e inicia su ascenso por el tracto reproductor femenino, sus características de movilidad cambian. Con la capacitación, aumenta la longitud de la onda flagelar, originándose trayectorias que muestran con mayor

desplazamiento lateral de la cabeza (Castillo, 2009), llegando un momento en que la amplitud de la onda comienza a hacerse asimétrica, dando lugar a un movimiento no progresivo y vigoroso conocido como “hiperactivación”. Este movimiento le proporciona al espermatozoide la fuerza necesaria para que pueda atravesar la zona pélucida del ovocito (Kay y Robertson 1998).

Las limitaciones intrínsecas al proceso de evaluación de la movilidad en el microscopio óptico implican una considerable variabilidad, lo que hace que se resienta la objetividad de dicha estima. Son numerosos los espermatozoides que atraviesan el campo óptico con diferentes patrones de movilidad. La subjetividad del observador pude distorsionar el resultado del análisis. En todo caso, los métodos seguidos para la valoración subjetiva de la movilidad espermática son sencillos, determinándose en portaobjetos o cámara de Makler (Moscardini *et al*. 2014).

La movilidad individual es una de las pruebas que con mayor frecuencia se utilizan para evaluar la calidad seminal y en algunas especies parece estar correlacionada con la capacidad fecundante del espermatozoide, se valora rutinariamente de manera subjetiva mediante un microscopio óptico (a 10x ó 20x) sobre una gota de semen diluido en una solución isosmótica, determinando el porcentaje de espermatozoides móviles y su calidad de movimiento (Molinia et al. 1994). La utilización de métodos fotográficos y sistemas computerizados han relegado a un segundo plano la valoración subjetiva por parte de los técnicos. Los actuales sistemas de análisis de imagen asistidos por ordenador, o sistemas CASAS (Computer-Assisted Sperm Analysis), son capaces de determinar, de manera objetiva, una serie de parámetros de velocidad y angularidad que contribuyen al establecimiento de un grado de calidad de movimiento (Paucar y Palacios 2018). El movimiento desarrollado por los espermatozoides es característico de la especie y del estado fisiológico en que se encuentren (movimiento tras la eyaculación, dilución, refrigeración, congelación, hiperactivación, etc.), y está sujeto también al efecto ejercido por el método de recogida, factores ambientales y manejo del semen tras su obtención (Molinia *et al.* 1994). Existen variaciones estacionales relativas a la movilidad de los espermatozoides de ovino, las cuales están relacionadas con la fertilidad (Molinia *et al.* 1994)

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 (Avalos, 2018).

Cuadro 5. Escala de vigor espermático de acuerdo a su motilidad

GRADO	DESCRIPCION
0	Espermatozoides inmóviles o muertos.
1	Espermatozoides sin movimiento progresivo, girando sobre sí mismo.
2	Espermatozoides con movimiento anormal o eventualmente progresivo.
3	Espermatozoides con movimiento progresivo lento y sinuoso.
4	Espermatozoides con movimiento progresivo muy rápido.
5	Espermatozoides con movimiento progresivo energético.

Fuente: (Corredor, 2014)

2.3.2.3. Motilidad progresiva

La motilidad espermática progresiva, es decir el movimiento con dirección de avances, se observa en espermatozoides que presentan una serie de atributos estructurales y fisiológicos altamente relacionados con la fertilidad. El movimiento progresivo y normal es el que determina que el espermatozoide avance y pueda fecundar. La motilidad progresiva se expresa en porcentaje, lo cual varía según el autor entre 60 y 90%, para semen con motilidad aceptable a muy buena (Palomino *et al.* 2007)

Es el movimiento que les permite a los espermatozoides avanzar a lo largo del aparato genital de la hembra. Esta característica se evalúa en función a 4 características (Molinia *et al*. 1994)

Para su evaluación se colocará una gota de semen diluido en un portaobjetos templado a 37°C en una platina térmica, se cubrirá con un cubreobjetos a igual temperatura e inmediatamente se observará al microscopio con el objeto 40x. La valoración será de forma cuantitativa y cualitativa es decir que se valorara el porcentaje de espermatozoides con movimiento en una escala de 0 a 100% (Chuchuca, 2015).

Cuadro 6. Clasificación de espermatozoides con movimiento rectilíneo progresivo

Valoración	Característica	Puntaje
Muy bueno	Movimiento rápido y progresivo	80 %
Bueno	Movimiento más lento y menos intenso	60 %
Suficiente	Movimiento “in situ” sin desplazamiento	40 a 60 %
Pobre	Inmóviles sin ningún movimiento ondulante	20 a 40 %

Fuente: (Gómez, 2000)

2.3.3. 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 (Salamon y Maxwell, 2000).

2.3.3.1. 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, 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, 2000).

La técnica consiste en:

- Colocar en el extremo de un portaobjetos templado a 37°C 1 gota colorante y 1 de semen separadas, y mezclarlas.

- Extender la mezcla con otro portaobjetos 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 (Muiño *et al*. 2005).

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) (Chuchuca, 2015).

2.3.4. Integridad de la membrana espermática

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

La prueba de permeabilidad vía endosmosis o ¨Hiposmotic-swelling test¨ (HOST), consiste en colocar a los espermatozoides a un medio de presión hiposmótica más baja que la fisiológica, lo que causa la entrada de agua hacia el interior de la célula en un intento de equilibrar la presión osmótica interna con la del medio externo (Pérez-Llano et al. 1999). Para que esta respuesta se produzca, la membrana plasmática del espermatozoide debe de estar íntegra y con los mecanismos de intercambio de fluidos funcionando correctamente. La entrada de agua provoca en estas células un hinchamiento y enrollamiento del flagelo (cola). Las células con la membrana física funcionalmente dañada no experimentaran cambios en la forma del flagelo. Se considera endosmosis positiva

cuando se aprecia como el flagelo del espermatozoide, en un medio hiposmótico (125mOsm/Kg), toma forma helicoidal y asciende dentro de la misma membrana celular. Esto se debe a un desequilibrio osmótico entre el medio extracelular y el intracelular, situación que el espermatozoide trata de vencer difundiendo agua al compartimiento intracelular y, como consecuencia, la célula aumenta su volumen (Vazquez *et al*. 1997).

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

2.3.5. Criopreservación de semen

Para la inseminación artificial el semen de un macho mejorado puede ser utilizado en forma fresca, refrigerada o congelada (Cáceres, 2013). La refrigeración de los espermatozoides permite preservar los espermatozoides por un tiempo corto, presenta ventajas como: es sencillo el protocolo de refrigeración, permite transporte de las muestras entre distancias considerables, técnica de inseminación artificial simple y porcentajes de preñez superiores que los obtenidos con semen congelado. La refrigeración del semen puede ser entre 15 a 20 °C o entre 4 a 5 °C. La mayor ventaja del semen refrigerado, motivo por el cual esta tecnología se encuentra en utilización cada vez en más países (Rossi, 2012).

La refrigeración del semen a 5 °C reduce el metabolismo de los espermatozoides con el subsiguiente ahorro de reservas energéticas, siempre y cuando se proteja a las células contra las bajas temperaturas mediante la adición de compuestos orgánicos como la leche descremada o la yema de huevo, que aumentan la resistencia de la membrana a los cambios de permeabilidad e impiden que los espermatozoides acumulen calcio al alterarse el sistema de intercambio de la membrana (González *et al*. 2008).

2.4. Dilutores del semen

Por diluyente se entiende la solución acuosa que permite aumentar el volumen del eyaculado hasta conseguir las dosis necesarias, preservar las características funcionales de las células espermáticas y mantener el nivel de fertilidad adecuado (Cabrera, 2021). El empleo de estos medios conservadores (diluyentes) permite prolongar la viabilidad de la

célula espermática, rentabilizar los eyaculados obtenidos y conservar las dosis por un periodo prolongado de tiempo (Palomino *et al*. 2007).

El espermatozoide tiene la capacidad de producir la energía necesaria para mantener su metabolismo celular y generar movimiento del flagelo, principalmente a través de las vías glucolíticas. Estos procesos se desarrollan en las mitocondrias localizadas en la porción intermedia del espermatozoide. La fuente de energía más utilizada en la composición de los dilutores, es la glucosa, aunque se han usado otras (galactosa, fructosa, ribosa o trehalosa) (Mishel, 2018).

Un diluyente debe reunir una serie de propiedades básicas relacionadas con su pH, capacidad tampón, osmolaridad, y fuerza iónica. Además, debe aportar una fuente de energía, no debe deteriorarse durante el almacenamiento previo a su uso, debe proteger a los espermatozoides durante el enfriamiento, congelación y descongelación, debe ser resistente al crecimiento bacteriano; no deben deteriorarse durante el almacenamiento previo a su uso y sobre todo deben proporcionar a la célula espermática protección frente a efectos de baja temperatura (Villalobos y Rubio, 2015).

Sobre las características de los diluyentes Cortés, (2014) menciona que deben ser:

- Ser isotónico con el plasma seminal (320 mOsm/kg) cuando es utilizado en refrigeración
- Poseer un pH próximo a 7 y capacidad tampón con el fin de mantener el pH en la neutralidad, compensando la producción de ácido láctico durante la congelación.
- Contener moléculas que protejan a los espermatozoides frente al frio, clasificadas en función de su capacidad de penetrar la membrana plasmática en sustancias crioprotectoras penetrantes y no penetrantes.
- Contener en su constitución una fuente de energía, siendo la glucosa y fructosa las más utilizadas.
- Estar libre de bacterias y contaminación, para lo cual se utilizan antibióticos en su formulación.
- Aumentar el volumen substancialmente con el fin de poder realizar multiples servicios por medio de la inseminación artificial.

2.4.1. Control de presión osmótica

El espermatozoide ovino presenta una presión osmótica de 290-300 mOsm, y es capaz de tolerar un rango de presiones osmóticas bastante amplio (240-380 mOsm). Diversos estudios han evaluado la tolerancia a diversas presiones osmóticas, llegando a la conclusión que ni la motilidad ni la viabilidad del esperma se ve afectada por la presión osmótica en rangos comprendidos entre 250 y 290 mOsm, mientras que al reducir por debajo de 200 mOsm se detecta una reducción significativa de la motilidad (Gadea, 2003).

2.4.2. Componentes de los dilutores del semen

Rossi (2012) menciona que los componentes básicos de los diluyentes utilizados para el congelamiento de semen son esencialmente los mismos que los que se utilizan para almacenar semen en estado líquido, estos diluyentes utilizados para la conservación de semen en la mayoría de las especies domésticas, se encuentran compuestos por las siguientes sustancias.

- Agua bidestilada o ultra pura, como disolvente del resto de los componentes.
- Sustancias iónicas y no iónicas para mantener la osmolaridad y el pH del medio.
- Materiales orgánicos como yema de huevo o leche, que cuentan con capacidad de disminuir o evitar el efecto frente al shock de frio.
- Crioprotectores, siendo el más utilizado el glicerol.
- Azucares. Simples como fuente energética, o di y trisacáridos como crioprotectores adicionales.
- Antibióticos para controlar el crecimiento bacteriano.
- Otros aditivos, que pueden ser opcionales, como enzimas, detergentes o aminoácidos que pueden mejorar la fertilidad.

2.4.3. Tipos de dilutores

Los diluyentes seminales se han clasificado en dos grandes grupos: los de conservación a corto plazo (1 a 3 d) y aquellos que tienen como objetivo la conservación de semen a largo plazo (más de 4 d) entre 12 y 20 °C (Cayrus *et al*. 2019).

Zirena (2014) clasifica a los dilutores en agentes penetrantes (glicerol, dimetilsulfoxido, propanediol), que son bajos en peso molecular y permeable a través de la membrana

celular; también en agentes no penetrantes (sacarosa, glucosa, dextrosa y dextrano) que son de alto peso molecular, efectivas a velocidades altas de congelación, promueven la rápida deshidratación celular y suelen usarse asociados a los agentes penetrantes utilizándose diversos dilutores para la conservación de semen tales como; yema de huevo + citrato + glucosa, Tris + y PBS + suero fetal, obteniendo sobrevivencia espermática variable (Quispe *et al*. 2023).

2.4.3.1. Leche

Las proteínas de la leche actúan como amortiguadores contracambios de pH y como agentes quelantes contra cualquier metal pesado presente. La caseina, la principal proteína de la leche, también tiene un efecto antioxidante, y por tanto confiere protección a los espermatozoides durante la reducción de temperatura. Sin embargo, otra proteína presente en la leche, la lactenina, es tóxica para los espermatozoides, es por lo que se recomienda calentar la leche previamente a temperaturas superiores a los 90°C, lo cual inactiva a esa proteína. La leche puede ser usada en forma entera, reconstituida o descremada ,el uso de leche tratada con altas temperaturas (UHT) es muy recomendado por su condición de esterilidad y por no requerir calentamiento previo (Salamon y Maxwell, 2000)

2.4.3.2. Optixcell

Es un diluyente que posee una cualidad muy práctica, que, en su translucidez, que favorece la observación de espermas de una manera muy clara, a diferencia de otros dilutores, como diluyente de semen ovino fresco y refrigerado no desfavorece las variables de motilidad, normalidad y vitalidad (Castro y Palma, 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 (Ramos, 2011).

2.4.3.3. Triladyl®

El dilutor Triladyl concentrado en su presentación comercial de 250 cc, contiene todos los elementos necesarios para una buena congelación de semen bovino, ovino y caprino; 36.05 gr. de Hidroximetil-amino-etanol, 20.24 gr. de ácido cítrico, 14.88 gr. de fructosa, 1 millon de unidades internacionales de penicilina 1 gr. de sulfato de Dihidro-estreptomicina y 6 por

ciento de glicerol. Por adición de agua bidestilada en un 60 % y yema de huevo en 20 %, con 20 % de Triladyl concentrado, se obtiene un diluyente listo para ser usado en la congelación de semen de bovino (Dominguez y Angulo 2019).

2.4.4. Agentes antimicrobianos

Desde 1941 se puso atención al problema de los contaminantes microbianos en el eyaculado. El número de organismos por ml pueden fluctuar entre no detectables y varios millones, pero compiten con los espermatozoides por nutrientes y producen compuestos metabólicos que tiene efectos anversos sobre la vitalidad de los espermatozoides. En 1946 se descubrió el efecto benéfico de añadir antibióticos a los diluyentes de semen como ser: Sulfonamida, penicilina, entreptomicinas y polimixina (Cáceres, 2013).

Mayormente los diluyentes utilizados para semen de rumiantes son 1000 Ul/ml de penicilina y 1mg/ml de estreptomicina (Palacios, 2018).

2.5. Shock de frio

Es bien conocido que el enfriamiento rápido del semen induce un estrés letal en algunas células, el cual es proporcional a la tasa de enfriamiento. Es así que el enfriamiento debe ser realizado cuidadosamente, este fenómeno es conocido como shock de frio y puede apreciarse durante el enfriamiento de espermatozoides de cualquier especie (Almuzara, 2016).

Sin embargo, un lento enfriamiento induce estrés sobre la membrana del espermatozoide, este hecho se relacionaría con un cambio de fase Lipídica y alterando el estado funcional de la membrana espermática (Stornelli *et al*. 2005).

Una lipoproteína de baja densidad es el facto, que se une directamente a la membrana plasmática del espermatozoide durante el periodo de refrigeración (Cáceres, 2013).

La membrana consta de una bicapa lipídica compuesta por diferentes tipos de fosfolípidos, proteínas integrales y colesterol. (Batissaco, 2014), La integridad de la membrana plasmática y acrosomal reflejan la viabilidad espermática, y el proceso de refrigeración y/o criopreservación podría afectar estas membranas ocasionando daños como hinchamiento y disrupción de las mismas, cambios en la fluidez, alteración del flujo de calcio y cambios

en la actividad enzimática que pueden inducir una capacitación espermática anticipada, viéndose afectada la fertilidad (Cabrera y Pantoja, 2012).

2.5.1. Refrigeración de semen en ovinos

La utilización de semen refrigerado en la especie ovina se justifica debido a la practicidad implícita en su implementación, su bajo costo y por cuestiones relativas al bienestar animal considerando a su vez que entre el 20 y el 40 % de los sementales responde pobremente al congelamiento seminal (Ortega, 2017).

2.5.1.1. Los diluyentes para semen refrigerado ovino

pueden ser sintéticos en base a Tris o citrato como buffers, azúcares de bajo peso molecular tales como la glucosa y la fructosa, que pasan a través de la membrana celular sirviendo como fuente de energía, y yema de huevo como protector de membrana. O bien pueden ser naturales en base a leche descremada en polvo. La fracción proteica de la leche es la responsable de las propiedades de la misma como diluyente, las cuales son: actuar como buffer ante cambios de pH, actuar como agente quelante y proteger los espermatozoides durante la reducción de temperatura (Pérez, 2019).

Con la refrigeración se produce una reducción de la motilidad y actividad metabólica, aumentando la vida media del espermatozoide hasta su utilización. La motilidad se detiene totalmente a los 5º C, pero se puede restituir si se eleva nuevamente la temperatura a los niveles normales, siempre y cuando no se hayan producido daños de tipo estructural causados por “shock térmico” (Vivianco, 1998).

Uno de los mayores problemas técnicos que presenta la inseminación artificial con semen refrigerado es que el poder fecundante que presenta el semen así conservado, es limitado en el tiempo. Ensayos a nivel internacional reportan una disminución entre 10 a 30 % por cada 24 horas de refrigeración, en la fertilidad obtenida respecto al semen fresco. Los espermatozoides preservados presentan cambios a nivel de sus membranas que determinan una menor vida media (Moscardini *et al.* 2014).

2.5.1.2. Inseminación con el semen refrigerado

Este método de inseminación requiere de un aumento considerable de la concentración espermática por dosis inseminante respecto al semen fresco, si bien la inseminación

artificial con semen refrigerado ha reportado resultados muy variables y a veces difíciles de interpretar, se observa que a medida que el tiempo de preservación aumenta, los espermatozoides experimentan cambios que determinan una menor vida media, disminuyendo la fertilidad post inseminación (Salamon y Maxwell 2000).

Se reportó una buena cualidad de semen de carneros, mantenidos a 5ºC por 6 días, sin embargo, la tasa de fertilización después del día 6 y 8 cayó drásticamente. Estudios describen alteraciones en la integridad acrosomal, capacitación espermática durante la refrigeración por períodos variables. La refrigeración posee ventajas sobre la congelación por tener una alta cualidad seminal y un menor precio, viabilizando la técnica para períodos de almacenamientos cortos. Independiente del diluyente, tasa de dilución, temperatura o condiciones de refrigeración, cuanto mayor el tiempo de refrigeración, mayor tasa de deterioro de la célula, la cual es acompañada por un declino en el transporte y sobrevivencia del espermatozoide en el tracto reproductivo femenino y, consecuentemente, reducción de la fertilidad (Salamon y Maxwell, 2000).

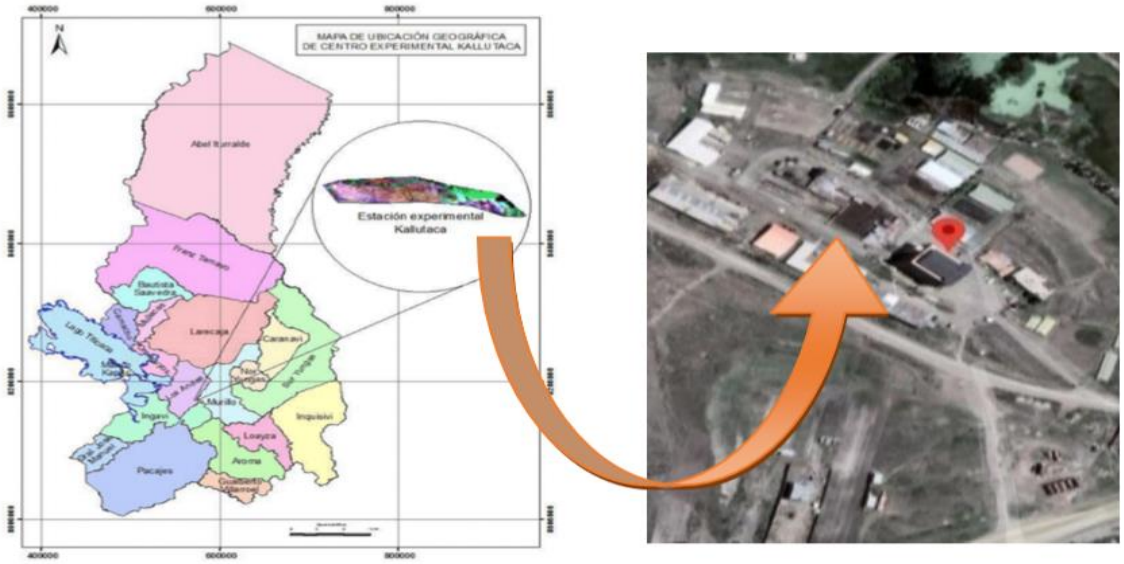
3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Localización

3.1.1. Ubicación Geográfica

El presente trabajo de investigación se realizó en el Centro Experimental de Kallutaca de la Universidad Pública de El Alto (UPEA), ubicada en la Provincia Los Andes del departamento de La Paz, a una distancia de 20 Km de la ciudad de El Alto. Geográficamente se encuentra entre las coordenadas de 16° 31' 27" de latitud Sur y 68° 18' 32" de longitud Oeste; a una altitud de 3.896 msnm, con un promedio de 163 días de heladas al año (Mapcarta, 2023).

Figura 1. Ubicación del área de investigación (Mapcarta, 2023)



3.2. Características Edafoclimáticas

3.2.1. Clima

Las precipitaciones anuales llegan a los 667mm, el promedio máximo fue de 911mm y la mínima en promedio fue 404mm, la humedad relativa esta por los 40.0%donde las temperaturas pueden llegar hasta una máxima de 15.7°C, y mínima de -2.8°C esto es dependiendo a la estación en la que uno se encuentre, y la precipitación anual para la zona es de 613.1mm (Condori, 2012).

3.3. Materiales

3.3.1. Material genético

El material genético es semen que proviene de 3 carneros

3.3.2. Material de laboratorio

- I-SPERM CASA
- Microscopio binocular
- Vagina artificial ovina
- Tuvo colector
- Agua bidestilada desionizada
- Leche
- Optixcel
- Triladyl
- Colorantes eosina y nigrosina
- Suero fisiológico
- Alcohol
- Mechero de vidrio
- Jeringas desechables de 1.5ml, 10 ml, 20ml, y de 50ml
- Aguja hipotérmica N°18
- Papel toalla
- Tijera
- Papel secante

- Guantes de látex
- Lamina porta objetos y cubre objetos
- Mechero de vidrio
- Placa térmica
- Caldera eléctrica
- Baño María
- Guardapolvo
- Gorro quirúrgico
- Barbijo quirúrgico
- Cámara spermtrack
- Pajillas para semen de 0.5
- Tubos eppendorf
- Termo
- Plastilina
- Papel estaño
- Hielo
- Marcador indeleble
- Cinta masquin

3.3.3. Material de campo

- Cuaderno u hoja de registro
- Bolígrafo

- Cámara de celular
- Overol
- Desinfectante esterilon
- Alcohol al 70%
- Soga

3.3.4. Material de gabinete

- Laptop
- Cámara digital fotográfica
- Registros
- Bolígrafo
- Resaltadores

3.4. Metodología

3.4.1. Procedimiento

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en la Estación Experimental de Kallutaca. En primer lugar, se esquiló y desparasitó a los carneros. Posteriormente, se evaluó la condición corporal y se realizó un examen genital detallado, describiendo el estado del prepucio, pene, escroto y testículos, así como la circunferencia escrotal. Esto se hizo con el fin de asegurar que estuvieran exentos de anormalidades o enfermedades y de estimar qué tan cerca estaba la función reproductiva del estándar general aceptado como normal, además de identificar cualquier anormalidad presente. Todo esto se realizó para seleccionar a los carneros que respondieran positivamente al método de colecta de semen mediante vagina artificial, con el objetivo de realizar una evaluación macroscópica y microscópica del semen.

3.4.1.1. Alimentación y sanidad de los carneros

- Los carneros fueron alimentados con ensilaje, afrecho, sales minerales y agua a libre disposición durante todo el tiempo que duro el experimento.

- La desparasitación a los carneros se realizó un mes antes de la colección de semen, administrando Paramec Gold LA AD3 (Ivermectina).

3.4.1.2. Preparación del área de descanso, cuarto de colecta y laboratorio

- Se realizó una limpieza total del cuarto de colecta, se reparó el brete y se colocaron cortinas en las ventanas para evitar la luz del sol.
- Se preparó adecuadamente toda el área del laboratorio, lavando con agua y detergente todos los materiales de laboratorio utilizados para el procesamiento y conservación del semen. Estos materiales fueron desinfectados para evitar cualquier posible contaminación.

3.4.1.3. Adiestramiento para el uso de vagina artificial

Los carneros pasaron por una etapa de adiestramiento de un mes, con el fin de que se adecúen al método de obtención de semen (vagina artificial), los tres carneros que

aceptaron la colecta por el método de la vagina artificial. Una vez terminada esta etapa, se procedió a colectar las muestras para posteriormente evaluarlas.

3.4.1.4. Preparación de los carneros para la colección del semen

- Se recortó el exceso de pelo en el prepucio para prevenir contaminación a la hora de la colecta.
- Se realizó el lavado del prepucio con 20ml de suero fisiológico con la ayuda de una funda para inseminación artificial.
- Se secó el prepucio con toallas de papel, esto para obtener muestras más limpias y libre de contaminantes.

3.4.1.5. Proceso de colección del semen

- Las muestras de semen fueron obtenidas utilizando una vagina artificial, compuesta por un cuerpo cilíndrico rígido, una válvula exterior y una funda de látex. En el extremo de la vagina artificial se acopla un tubo colector graduado, protegido con una funda de tela para resguardar la muestra de la luz directa y la temperatura exterior.
- La colecta se realizó en la sala de monta, utilizando el brete y una oveja hembra en celo, sujetada con una soga por el cuello. Se le daba vueltas al macho por la sala de monta con el fin de estimular aún más su libido.
- Una vez que el carnero montó a la hembra, el pene se desviaba lateralmente hacia la vagina artificial hasta que efectuó el "golpe de riñón", que de forma característica acompaña la eyaculación. Posteriormente, se retiró la vagina artificial con el eyaculado.

3.4.1.6. Manejo del eyaculado

- Cada superficie que entre en contacto con el semen se atemperó a 37 °C.
- Se evitó la contaminación con tierra, heces, orina, etc.
- La vagina artificial se mantuvo a una temperatura de 37 °C, y la presión se reguló de acuerdo con el reproductor.

3.4.1.7. Análisis de semen fresco colectado

Tras la colecta de cada eyaculado, se trasladó, 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 fueron las siguientes:

- Características macroscópicas
- Características microscópicas

3.4.1.8. Características macroscópicas

La evaluación macroscópica es parte del protocolo de evaluación de espermatozoides, pero no es parte del estudio de investigación, sin embargo, se procedió con la evaluación.

Para el examen macroscópico se valoraron los siguientes parámetros.

- Volumen: Se utilizó un tubo graduado, y el valor se obtuvo mediante lectura directa, expresándose en mililitros (ml) obteneindo un volumen de 1.5 y 2 ml.
- Color: Se evaluó por medio de la visualización directa del eyaculado dentro del tubo colector obteniendo un color blanco cremoso.
- pH: Se midió con papel tornasol y se obtuvo un pH de 7.

3.4.1.8.1. Dilución del semen

La dilución del semen se realizó después de ser recolectado y evaluado. Tanto el semen como el diluyente se coloca en baño maría a 37 °C para que, en el momento de la dilución, ambos tengan la misma temperatura, ya que la adición de diluyente frío al semen puede causar un shock térmico, lo que conlleva una reducción de la fertilidad. La preparación del diluyente se llevó a cabo en presencia de calor para evitar la contaminación. Se preparó en un frasco estéril de 100 ml, mezclando en una relación de 1:2 para Optixcell y 1:3 de agua bidestilada, para Triladyl. La leche se preparó libre de grasa (leche light) adicionada con yema de huevo al 10 %, manteniéndolos a una temperatura de 37° C.

Los cuales fueron etiquetados con sus respectivos nombres y colocados a temperatura de 37° C. los eyaculados fueron diluidos en cada dilutor y homogenizados con agitaciones ligeras de 10 a 15 min, evitando que los espermatozoides no sufran algún daño. Para la dilución se utilizó 2,500 a 3000 millones de espermatozoides por ml.

3.4.1.8.2. Periodo de adaptación a 5ºC

- Una vez mezclados el semen con el diluyente se procedió con el periodo de adaptación al frio.
- La muestra de semen se dejó a 5ºC para el equilibramiento, durante tres horas.
- Para el enfriamiento de la muestra de semen, se procedió poniendo la muestra en un contenedor de plástico y posteriormente se las introdujo en otro contenedor que contenía agua atemperada a 37°C para finalmente dejarlo en la caja de polietileno (Tecnopor) que contenía hielo y agua a una temperatura de 5°C, esperando que descienda la temperatura de 37ºC a 5ºC lentamente a una velocidad de 0,17° C por minu durante tres horas, posteriormente la muestra se examina al microscopio para comprobar la motilidad de los espermatozoides.

3.4.1.8.3. Preparación de pajillas, empajillado y sellado

Para este procedimiento se esterilizaron los materiales usando mecheros que proporcionaron calor.

a. Preparación de pajillas

Antes de proceder al llenado de las pajuelas, estas fueron identificadas con un marcador indeleble de punta fina, indicando el día de evaluación y dilutor.

b. Llenado de las pajuelas

Las pajuelas se cargaron con jeringas modificadas para facilitar el acople de las pajuelas y la succión, una vez llenadas se secaron con papel absorbente sellándolas con plastilina.

3.4.1.8.4. Análisis del semen refrigerado

Para realizar el análisis del semen, se extrajo una pajuela de la caja Tecnopor, para ponerlo en baño María a 37 °C, por 2 minutos, para luego observar la muestra con el equipo ISPERM-CASA.

Se valoraron las siguientes características:

- Motilidad individual: el semen se diluyó con suero fisiológico a 37°C con 1.5 de semen diluido y 1ml de suero fisiológico y luego se lo quitó lentamente hasta tener mezcla homogénea. Se colocó una gota (25 µl) de la dilución sobre el portaobjeto luego se cubrió con el cubreobjetos para luego ponerlo en la platina térmica para su posterior observación. La Motilidad individual (MI) de una muestra de semen se expresó como el porcentaje (%) de células móviles bajo el campo microscópico del sistema analizador de semen digital: I-Sperm (AIDMICS Biotechnology, COREA).

- Vitalidad: En un portaobjetos se colocó una gota de eosina-nigrosina y una gota de semen, luego se realizó la homogenización (mezcla) y el frotis, después de hacer secar la muestra por unos segundos se realizó la lectura con el microscopio con objetivo de 40X, Se contaron diez espermatozoides encontrados en los diez diferentes campos microscópicos del frotis, llegando a contar hasta 100 espermatozoides, de esta manera se determinó la vitalidad de los espermatozoides.

- Integridad de la Membrana: Se tomó una muestra de 50 µl de semen, que se colocó en un tubo Eppendorf que contiene 0,5 ml de solución de HOST (citrato de sodio y fructosa) diluida en agua destilada a 37 °C. Se incuba en baño María a 37 °C durante 30 minutos. Las muestras se conservaron a temperatura ambiente hasta su evaluación; la lectura se realizó 30 minutos después. La evaluación se realizó en el equipo ISPERM-CASA

Cuadro 7. Distribución de muestras

DIAS	N° MUESTRAS	TRATAMIENTOS
DIA 1	3	opticxel leche triladyl
DIA 2	3	opticxel leche triladyl
DIA 3	3	opticxel leche triladyl
DIA 4	3	opticxel leche triladyl
DIA 5	3	opticxel leche triladyl
DIA 6	3	opticxel leche triladyl
DIA 7	3	opticxel leche triladyl
TOTAL	**21 muestras**	

3.4.2. Diseño experimental

Para el objetivo 1, 2 y 3, se utilizó el diseño completamente al azar con arreglo bifactorial el cual posee el siguiente modelo aditivo lineal.

$$Y_{(ji)} = u + \alpha_{(i)} + \beta j + \alpha\beta_{(ij)} + Em_{(ij\rho)}$$

Dónde:

$Y_{(ij)}$ = Es cada una de las variables de respuesta identificadas para este objetivo

u = Es el promedio general del experimento

α_i = El efecto del i −ésimo dilutor utilizado

βj = Es el efecto de la j −ésimo tiempo de evaluación

$\alpha\beta_{(ij)}$ = La interacción del i = ésimo dilutor utilizado por el j − ésimo tiempo de evaluación.

$Em_{(ij)}$ = Error debido al muestreo de datos

Para determinar las diferencias entre promedios se utilizó la prueba de Tukey al 5% de significancia.

3.4.3. Factores de estudio o tratamientos en estudio

Factor A: tiempo de evaluación

a_1: 24 horas

a_2: 48 horas

a_3: 72 horas

a_4: 96 horas

a_5: 120 horas

a_6:144 horas

a_7:168 horas

Factor B: tipo de dilutor

b_1: Optixcell

b_2: Triladyl

b_3: Leche

3.4.4. Variables de respuesta

a) Motilidad individual (%)
b) Porcentaje de espermatozoides vivos (%)
c) Porcentaje de integridad de membrana celular (%)

3.4.5. Análisis estadístico

Para el análisis de los datos se utilizó el paquete estadístico InfoStat estudent.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Determinación de la motilidad individual de espermatozoides de carneros conservados en refrigeración desde 1 a 7 días en tres dilutores seminales.

En el siguiente cuadro se observa el análisis de varianza para motilidad individual del espermatozoide ovino a efecto de los dilutores conservados por un periodo de 1 a 7 días.

Cuadro 8. Cuadro de Análisis de varianza para motilidad individual durante 7días a efecto de tres dilutores seminales

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	cuadrado medio	F Calculado	p-valor
Día	40984,87	6	6830,81	975,09	<0,0001
Dilutores	116,40	2	58,20	8,31	0,0003
Día*Dilutores	115,97	12	9,66	1,38	0,1786
Error	1324,00	189	7,01		
Total	42541,24	209			
C.V.	3.47 %				

El análisis de varianza (cuadro 9) indica que existen diferencias estadísticas altamente significativas en la motilidad individual de espermatozoides ovino a efecto de los días y los dilutores estudiados (pr<0.01). No existe evidencia estadística para asumir interacción entre factores. Por lo tanto, se rechaza la hipostasis nula planteada. El coeficiente de variación fue de 3.47 %, lo que indica que los datos colectados y analizados son confiables.

Cuadro 9. Comparación de medias por Tukey de la motilidad individual de espermatozoides de carneros, en refrigeración durante 7 días.

DIA	Medias	n	Grupo Tukey
3	90,74	30	A
1	90,04	30	A
2	88,94	30	A
5	72,22	30	B
6	72,04	30	B
4	71,31	30	B
7	48,92	30	C

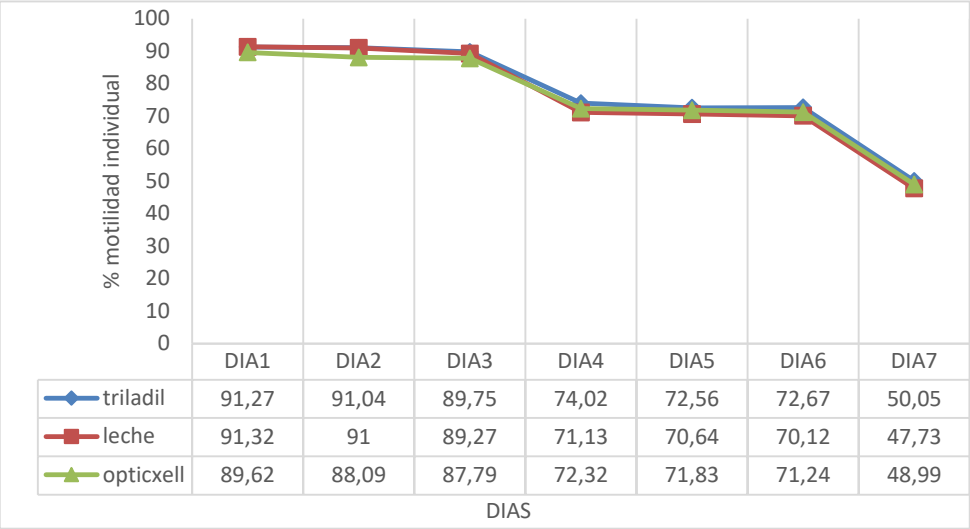
El cuadro 10, muestra la comparación de medias por Tukey de la motilidad individual de espermatozoides de carneros en refrigeración durante 7 días. La motilidad individual espermática fue de 90.74, 90.04 y 88.94 % en los días 3, 1 y 2 respectivamente, siendo estadísticamente similares pero diferentes y superiores respecto a los demás días. La motilidad individual espermática fue de 72.22, 72.04 y 71.31 % en los días 5, 6 y 4 respectivamente, siendo estadísticamente similares pero diferentes e inferiores respecto a los días 3, 1 y 2. La motilidad individual espermática el día 7 fue del 48.92%, siendo estadísticamente diferente e inferior respecto a los demás días.

Cuadro 10. Comparación de medias por Tukey de la motilidad individual de espermatozoides de carneros, en refrigeración a efecto de dilutores.

DILUTOR	Medias	n	Grupo Tukey
Triladyl	77,36	70	A
Leche	75,89	70	B
Optixcell	75,70	70	B

El cuadro 11, muestra la comparación de medias por Tukey de la motilidad individual de espermatozoides de carneros en refrigeración a efecto de los dilutores. La motilidad individual espermática fue de 77.36 % con el dilutor Triladyl, siendo estadísticamente diferente y superiores respecto a los demás dilutores. La motilidad individual espermática fue de 75.89 y 75.70 % con los dilutores leche light y Optixcel respectivamente, siendo estadísticamente similares pero diferentes e inferiores respecto al dilutor Triladyl.

Figura 2. Evaluación de la motilidad individual durante 7 días a efecto de tres dilutores



	DIA1	DIA2	DIA3	DIA4	DIA5	DIA6	DIA7
triladil	91,27	91,04	89,75	74,02	72,56	72,67	50,05
leche	91,32	91	89,27	71,13	70,64	70,12	47,73
opticxell	89,62	88,09	87,79	72,32	71,83	71,24	48,99

Gutierrez (2023), quien estudió la evaluación de tres dilutores comerciales sobre el procesamiento de semen ovino *(Ovis aries)* en la estación experiemtal de Choquenaira, reporta motilidades 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%.

Quispe *et al.* (2023) quien estudio el "Efecto de la yema de huevo sobre la calidad de semen descongelado de ovino *(Ovis aries)* en el Departamento Académico de Medicina Veterinaria - Zootecnia, Universidad Nacional Amazónica de Madre de Dios, Perú", donde nos indican que la motilidad pos-descongelación fue mejor con el dilutor con yema de huevo de gallina 18.8% que con el de yema de codorniz 14.8% ($p<0.05$).

Datos similares fueron reportados por Dinatolo (2011) quien estudio el Efecto de la trehalosa en la viabilidad de semen ovino refrigerado, en la facultad de ciencias agrarias. Universidad Catolica de Argentina, con ovinos raza Texel y semen conservado a 5°C, el eyaculado fue diluido en Triladyl donde obtuvo porcentajes de motilidad individual a las 0hrs 33 %, 24hrs 12 % y 48hrs 11 % y con el agregado de Trehalosa 100mMol presentó resultados de 0hrs 49 %, 24hrs 45 % y 48hrs 43 % respectivamente. Estas diferencias pueden atribuirse a la temperatura de 5°C, que afecta la membrana celular de los espermatozoides haciendo que el metabolismo se reduzca minimizando el gasto de energía y otros nutrientes que poseen los dilutores. Por esta razón, los espermatozoides lograron una sobrevivencia aceptable

durante siete días, sin descender su motilidad a más del 50%. Por otra parte, también se atribuye a que cuando la membrana celular se encuentra saturada de lipoproteínas como la lecitina, facilita a los espermas reducir el metabolismo de las mitocondrias reduciendo su gasto energético. Los dilutores triladyl y opticxell tienen la concentración adecuada de lecitina, sin embargo, la leche light carece de la lecitina, por lo cual, los espermas pueden haber reaccionado negativamente a esta diferencia bajando drásticamente su motilidad.

4.2. Determinación del porcentaje de espermatozoides vivos de carneros, conservados en refrigeración desde 1 a 7 días en tres dilutores seminales

En el siguiente cuadro se observa el análisis de varianza de espermatozoides vivos de carnero a efecto de los dilutores conservados por un periodo de 1 a 7 días.

Cuadro 11. Cuadro de Análisis de la Varianza para el porcentaje de espermatozoides vivos de carneros, refrigerados durante 7 días a efecto de tres dilutores seminales

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	cuadrado medio	F Calculado	p-valor
Día	35031,67	6	5838,61	335,90	<0,0001
Dilutores	165,12	2	82,56	4,75	0,0097
Día*Dilutores	182,19	12	15,18	0,87	0,5750
Error	3285,15	189	17,38		
Total	38664,13	209			
CV	5,17				

El análisis de varianza (cuadro 12) indica que existen diferencias estadísticas altamente significativas en la vitalidad de espermatozoides ovino a efecto de los días y los dilutores estudiados (pr<0.01). No existe evidencia estadística para asumir interacción entre factores. Por lo tanto, se rechaza la hipostasis nula planteada. El coeficiente de variación fue de 5.17%, lo que indica que los datos colectados y analizados son confiables.

Cuadro 12. Comparación de medias por Tukey del porcentaje de espermatozoides vivos de carneros en refrigeración durante 7 días.

DIA	Medias	n	Grupo Tukey
3	93,18	30	A
1	92,49	30	A
2	92,24	30	A
5	78,16	30	B
4	77,59	30	B
6	76,13	30	B
7	54,19	30	C

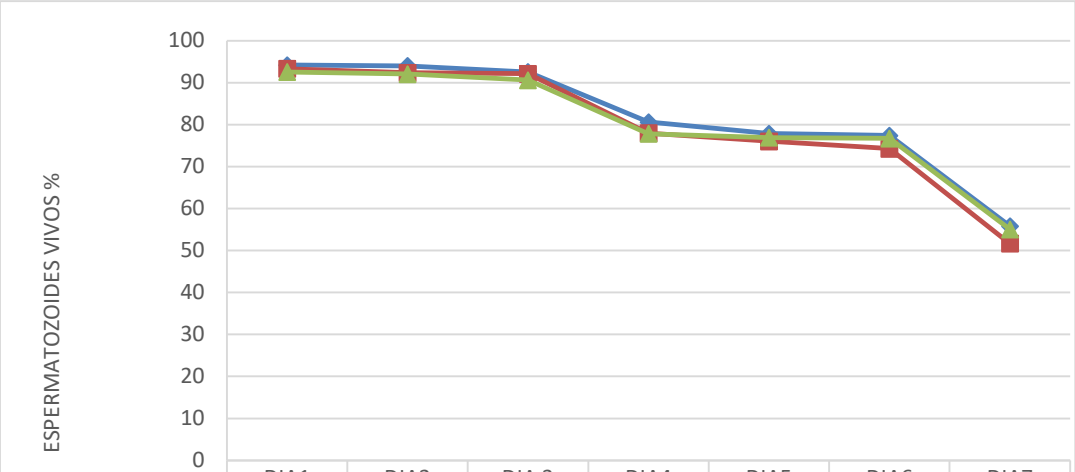
El cuadro 13, muestra la comparación de medias por Tukey del porcentaje de espermatozoides vivos de carneros en refrigeración durante 7 días. La vitalidad espermática fue de 93.18, 92.49 y 92.24 % en los días 3, 1 y 2 respectivamente, siendo estadísticamente similares pero diferentes y superiores respecto a los demás días. La vitalidad espermática fue de 78.16, 77.59 y 76.13 % en los días 5, 4 y 6 respectivamente, siendo estadísticamente similares pero diferentes e inferiores respecto a los días 3, 1 y 2. La motilidad individual espermática el día 7 fue del 54,19%, siendo estadísticamente diferente e inferior respecto a los demás días.

Cuadro 13. Comparación de medias por Tukey del porcentaje de espermatozoides vivos de carneros, en refrigeración a efecto de dilutores.

DILUTOR	Medias	n	Grupo Tukey
TRILADYL	81,78	70	A
OPTIXCELL	80,25	70	A B
LECHE	79,68	70	B

El cuadro 14, muestra la comparación de medias por Tukey del porcentaje de espermatozoides vivos de carneros en refrigeración a efecto de los dilutores. La vitalidad espermática fue de 81.78 % con el dilutor Triladyl, siendo estadísticamente diferente y superiores respecto a los demás dilutores. La vitalidad espermática fue de 80.25y 79.68 % con los dilutores Optixcel y leche light respectivamente, siendo estadísticamente similares pero diferentes e inferiores respecto al dilutor Triladyl.

Cuadro 14. Evaluación de porcentaje de espermatozoides vivos de carneros para los tres tratamientos en 7 días



	DIA1	DIA2	DIA 3	DIA4	DIA5	DIA6	DIA7
TRILADIL	94,18	93,99	92,56	80,63	77,85	77,41	55,84
LECHE	93,32	92,35	92,13	77,99	76,04	74,28	51,66
OPTIXCELL	92,55	92,04	90,61	77,82	76,93	76,71	55,06

Según Cabrera (2021) quien estudió “Integridad de la membrana citoplasmática en semen refrigerado y congelado de ovinos usando dos dilutores sintéticos”, en Universidad Nacional La Molina Lima- Perú, reportando una vitalidad espermática de 67.14 % para el dilutor Optixcell y para el dilutor Andromed una vitalidad espermática de 57.59 %. Sin embargo, el dilutor que se utilizó en el presente trabajo de investigación tiene una mayor presencia de antioxidantes y tris (hidroximetil aminometano) lo que mejoró la vitalidad de los espermatozoides en refrigeración con resultados favorables para los dilutores Optixcell, Triladyl y Leche.

Ramos (2011) en su investigación “Efecto de dilutores y dos tiempos de equilibrio en la criopreservación de semen ovino *(Ovis aries)* en la Estación Experimental de Choquenaira de la Universidad Mayor de San Andrés”, presenta un promedio de la variable de 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) 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.

Por su parte, (Pillajo (2015) investigó la “Vitalidad de espermatozoides ovinos mantenidos a 5 ºC y 15 ºC en diferentes sistemas de refrigeración en Brasil, en la Universidad de Ciencias Veterinarias”. En su estudio, reportó resultados sobre la variable de vitalidad espermática. En cuanto a los tipos de diluyentes, el uso de Andromed mostró el mayor porcentaje de vitalidad, con un 58,3 %, siendo estadísticamente superior a OptiXcell, que presentó un 47,8 %, y Triladyl, que obtuvo el valor más bajo, con un 25,5 %. En cuanto a las interacciones, la raza Corriedale, con Andromed como diluyente, registró el mayor valor, alcanzando un 60,5 %, estadísticamente superior al resto de los tratamientos, mientras que el valor más bajo para la raza Corriedale utilizando triladyl con 24,5 % de vitalidad. Estos datos son inferiores a los hallados en el presente trabajo de investigación, lo que resalta la importancia de evaluar la vitalidad espermática del semen ovino. Esta evaluación proporciona un indicador aproximado de la capacidad fecundante de los espermatozoides refrigerados. En este contexto, el semen refrigerado con el diluyente Triladyl, empleado como crioprotector, mostró una mayor proporción de espermatozoides vivos en comparación con el semen diluido en leche y optixcell.

4.3. Determinación del porcentaje de integridad de membrana celular de semen de carnero, conservados en refrigeración desde 1 a 7 días en tres dilutores seminales

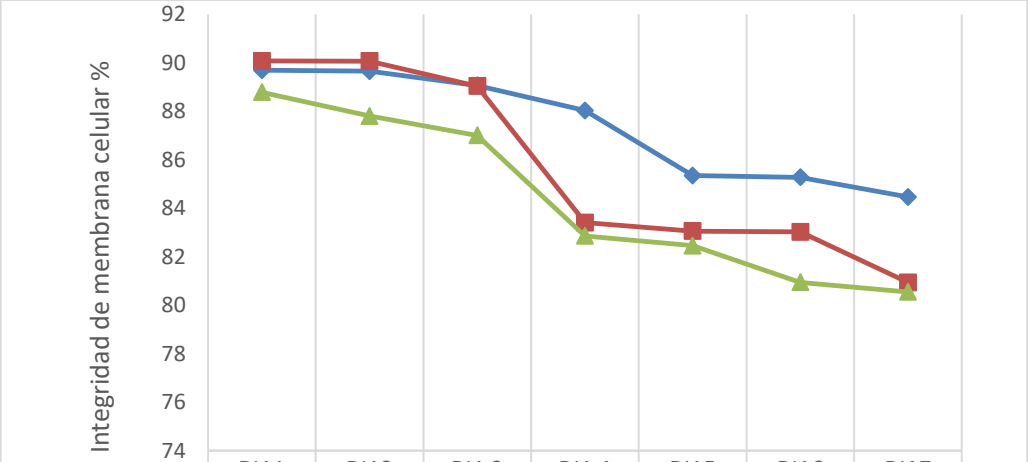
El siguiente cuadro se observa el análisis de varianza de porcentaje de integridad de membrana celular de espermatozoide de carnero a efecto de los dilutores conservados por un periodo de 1 a 7 días.

Cuadro 15. Cuadro de Análisis de Varianza para el porcentaje integridad de membrana celular del espermatozoide de carnero, refrigerados durante 7 días a efecto de tres dilutores seminales

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	cuadrado medio	F Calculado	p-valor
Día	1720,88	6	286,81	56,16	<0,0001
Dilutor	338,58	2	169,29	33,15	<0,0001
Día*Dilutor	237,67	12	19,81	3,88	<0,0001
error	965,21	189	5,11		
total	3262,35	209			
CV	2,63				

El análisis de varianza (cuadro 16) indica que existen diferencias estadísticas altamente significativas en la integridad de membrana celular de semen de carnero a efecto de los días y los dilutores estudiados (pr<0.01). Existe evidencia estadística para asumir interacción entre factores. Por lo tanto, se rechaza la hipostasis nula planteada. El coeficiente de variación fue de 2.63 %, lo que indica que los datos colectados y analizados son confiables.

Figura 3. Evaluación de la integridad de membrana celular del semen ovino para los tres tratamientos a lo largo del período de evaluación.



	DIA1	DIA2	DIA 3	DIA 4	DIA5	DIA6	DIA7
TRILADYL	89,7	89,66	89,07	88,03	85,35	85,28	84,47
OPTIXCELL	90,08	90,07	89,04	83,41	83,06	83,03	80,94
LECHE	88,79	87,81	87,01	82,86	82,46	80,95	80,55

Mohammed *et al.* (2010) quien investigó la “Evaluación del efecto crioprotector de diferentes fuentes de antioxidantes en el semen bovino en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo” quien utilizó L-cisteína obteniendo un 56.0±2.6 % de membranas intactas, se encontró que los resultados de la presente investigación son inferiores, lo que posiblemente se debe a la diferencia en la composición de los diluyentes y a los diferentes protocolos de criopreservación en cuanto se refiere al tiempo en la etapa de enfriamiento, mismo que afecta directamente las características de funcionalidad celular del espermatozoide al permanecer mayor tiempo en contacto con los solutos del diluyente.

Según Quintero (2013) quien investigo la “Evaluación de la integridad funcional de la membrana plasmática de espermatozoides bovinos mediante el test hipoosmótico (host) en La Universidad Nacional de Colombia Sede Medellin”, mostrando la proporción de espermatozoides vivos 73,5% que fue superior a la proporción de espermatozoides que reaccionaron al HOST 53,4%, evidenciando que no todos los espermatozoides vivos poseen una membrana bioquímicamente activa y capacitada para soportar un hinchamiento osmótico.

Bedoya *et al.* (2003) quien investigó la integridad funcional de la membrana plasmática de espermatozoides ovinos mediante el Test Hipoosmótico (HOST) en la Universidad de Antioquia – Medellín, Colombia, mostró que el porcentaje promedio de espermatozoides reaccionados antes de la congelación fue significativamente superior 62,84% al porcentaje de espermatozoides reaccionados después de la congelación 44,03%. El proceso de congelación y descongelación daña la membrana espermática, produciendo pérdida de permeabilidad e impidiendo que los espermatozoides puedan experimentar el proceso de hinchamiento característico de las células sometidas al HOST.

Por lo tanto, los dilutores empleados en esta investigación influyeron significativamente en la integridad de la membrana plasmática. Se obtuvo un mayor porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática íntegra al utilizar el diluyente Triladyl, en comparación con Optixcell y Leche. Esto sugiere que el diluyente Triladyl pudo mantener la integridad de la membrana hasta 7 días, mejor que los demás diluyentes, los cuales no superan los 3 días en conservar la integridad de la membrana y comienzan a disminuir su efectividad. Por tanto, se deduce que Triladyl es mejor para mantener la integridad de la membrana celular del espermatozoide de ovino.

5. CONCLUSIONES

El proceso de refrigeración de espermatozoides es una técnica que se debe realizar con bastante empeño y delicadeza estando al pendiente constantemente, los parámetros requeridos y en esta investigación llegamos a la conclusión:

Luego de la evaluación de los dilutores seminales utilizados en la refrigeración de espermatozoides ovino durante siete días, se llega a las siguientes conclusiones:

- La motilidad individual de espermatozoides de carneros está influenciada por los dilutores seminales, siendo el Triladyl el que mayor motilidad muestra, disminuyendo hasta el 50 % el día siete.
- El porcentaje de espermatozoides vivos, de carneros, está influenciada por los dilutores seminales, siendo el Triladyl el que mayor vitalidad muestra, disminuyendo hasta el 60 % el día siete.
- La mejor integridad de membrana celular espermática a los 7 días se logra con el dilutor triladyl.

6. RECOMENDACIONES

En base al estudio realizado, podemos extractar las siguientes recomendaciones, para la ejecución de posteriores investigaciones.

- Desarrollar una técnica sencilla y confiable de colección (Vagina Artificial y Electroeyaculador) de semen de ovino *(Ovis aries)*
- Evaluar el efecto de los métodos de colección de semen en ovinos, sobre las características macro y microscópicas del eyaculado.
- Existen muchos factores que afectan la calidad de los espermatozoides después de la colección de semen por lo que deben tomarse cuidados para asegurar que el semen no sea expuesto a condiciones desfavorables durante o después de la colección.
- Evaluar intensidades de luz ambiental sobre las características microscópicas del semen de carneros.
- Se recomienda realizar un estudio de colección de semen en época húmeda para corroborar los resultados de otros autores quienes mencionan una mejoría de sus características en cuanto a volumen, motilidad, concentración espermática y viabilidad reportado por otros autores de otros ovinos.
- Evaluar las características macro y microscópicas del eyaculado de carneros a efecto de razas, edades y épocas.
- Se recomienda realizar inseminaciones artificiales para comprobar la capacidad fecundante de preñez, en base a los resultados que se obtuvieron en la presente investigación.
- Determinar el porcentaje de preñez en ovinos a efecto del semen refrigerado en diferentes dilutores.
- Evaluar el uso de, dilutor leche en diferentes concentraciones en los dilutores para refrigeración de espermatozoides y de semen en ovinos.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Aisen E. G. 2004. Reproducción ovina y caprina. INTER-médica. Pags. 206.

Aguirre, Luis F., Teresa Tarifa, Robert B. Wallace, Nuria Bernal H., and Lizette Siles. 2012. "Lista Actualizada y Comentada de Los Mamíferos de Bolivia." *Naturales* (September):173–238.

Almuzara, Carlos Murillo. 2016. "Estudio Del Efecto de Las Hormonas Esteroideas Frente Al Daño Por Frío En Los Espermatozoides Ovinos." Universidad Zaragoza.

Álvarez, Carmen Álvarez. 2008. "La Relacion Torica- Practica En La Enseñanza y El Desarrollo Profecional Docente." Universidad De Oviedo.

Avalos, Miriam Fahiel Casillas. 2018. "Efecto De La Vitrificación En La Fertilización Y Desarrollo Embrionario in Vitro De Ovocitos Inmaduros Porcinos." Universidad Autonoma Metropolitana.

Ávalos, Silvestre Moreno. 2000. "Uso de Dilyentes de Origen Animal y Vegetal Sobre La Criopreservación Del Espermatozoide Ovino." Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Bassas, Lluis. 2001. "Espermatogénesis e Infertilidad." *Revista Iberoamerica de Fertilidad* 18(1976):11–17.

Batissaco, Leonardo. 2014. "Criopreservacion de Semen de Ovino Con La Incoporacion de Colesterol Por Ciclodextrina." Universidad de San Pablo-Facultad de Veterinaria y Zootecnia.

Bedoya, Natalia Andrea Echeverry, Neil Vásquez Araque, and Magda Rivera Rey. 2003. "Evaluación de La Integridad Funcional de La Membrana Plasmática de Espermatozoides Vovinos Mediante El Test Hipoosmótico (Host)." Universidad de Antioquia Facultad de Ciencias Agrarias.

Bergstein-Galan, Tácia Gomes, Romildo Romualdo Weiss, Luiz Ernandes Kozicki, and Sony Dimas Bicudo. 2017. "Espermatozoides Epididimários : Refrigeração e Criopreservação." *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 41(3):659–64.

Cabrera Montes, Pedro Luis. 2021. "'Integridad de La Membrana Citoplasmática En Semen Refrigerado y Congelado de Toros Usando Dos Dilutores Sintéticos.'" universidad Nacional La Molina.

Cabrera, Próspero, and César Pantoja. 2012. "Viabilidad Espermática e Integridad Del Acrosoma En Semen Congelado de Toros Nacionales." *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú* 23(2):192–200. doi: 10.15381/rivep.v23i2.899.

Cáceres, Belma Exrlalia delgado. 2013. "Evaluación Espermática de Semen de Ovino Tratado Por La Técnica de Gradiente de Densidad." Universidad Ricardo ¨Palma.

Castillo, Virginia Lalaguna. 2009. "T Rabajo F in De C Arrera Biología Y Control De Sphaerosporella."

Castro, Gabriel Andres Andrade, and Roberto Carlos Palma Andrade. 2020. "Efecto de Dos Diluyentes y Tiempo de Permanencia Sobre La Viabilidad Del Semen de Bovinos Mestizos Lecheros." Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.

Cayrus, Pablo Walter Tolstoy, José Mauricio Rodríguez Ribas, and Renza Machiavello Tenca. 2019. "Impacto de Variaciones En Los Protocolos de Congelamiento Sobre La Calidad de Semen Ovino." Universidad De La República Facultad de Veterinaria.

Chirinos, Javier Angel Orellana. 2009. "Caracteristicas Seminales e Integridad de La Membrana Espermatica Post Refrigeracion En Carneros Blackbelly y Assaf Del Banco Nacional de Semen – La Molina." Universidad Nacional Del Centro Del Perú.

Chuchuca, Samantha Vanessa Carpio. 2015. "Evaluación de Dos Diluyentes Para La Crioconservación de Semen Bovino : Yema de Huevo vs Leche Descremada." Cuenca Ecuador.

Córdoba, Manuel Hidalgo Prieto. 2004. "Departamento de Medicina y Cirugía Animal." 3–225.

Corredor, Leonardo Hernandez. 2014. "Implementacion Del Triple Test Espermático En Semen Ovino Refrigerado En El Tropico Bajo." Ciencias agrarias y del ambiente.

Cortés Gallego, Susana. 2014. "Efecto de La Conservación Sobre La Fisiologia

Espermática de Semen.” Universidad Complutense.

Derivaux, J., F. Ectors, and J. F. Beckers. 1976. “Données Récentes En Gynécologie Animale.” 81–120.

Dinatolo, Eduardo Federico. 2011. “Efecto de La Trehalosa En La Viabilidad de Semen Ovino Refrigerado.” Universidad Catolica Argentina.

Dominguez, Alex Roberth Angulo, and Erik Frank Dominguez. 2019. “Estudio Comparativo de Dos Sistemas de Congelamiento de Semen y Su Efecto Sobre La Fertilidad En Ovinos. Centro Experimental Casaracra.” Universidad Nacional Daniel Alcides Carrión.

Dueñas, Angel Franco Huamanñahui. 2017. “Repositorio Institucional - UNAMBA - PERÚ.” Universidad Nacional Micaela Bastidas deApurímac.

Espinoza, Polo, María José Rosales, and Andrea Catalina Almeida. 2023. “Caracterización Cinemática de Espermatozoides de Mamiferos Silvestres Criopreservados En El Banco Criogénico de La Universidad de Cuencas.” *Articulo Ecuador* 1(5):1–127.

Fuentes, Jorge Alfonso Iglesias. 2022. “Morfometria Del Tejido Testicular de Ovinos Suplementados Con Zinc y Cromo Organicos En La Dieta.”

Gadea, J. 2003. “Review: Semen Extenders Used in the Artificial Inseminarion of Swine.” *Spanish Journal of Agricultural Research* 1(2):17–27. doi: 10.5424/sjar/2003012-17.

Garner, D. L., and E. S. E. Hafez. 2000. “Spermatozoa and Seminal Plasma.” *Reproduction in Farm Animals* 96–109. doi: 10.1002/9781119265306.ch7.

Gomez, Ignacio García, Marta Romero Molina, Antonio López-garcía Moreno, Elena Buendía, Emilio Rubio Hidalgo, Eduardo Bolufer, Antonio Sampietro, and Antonio Gómez. 2010. “Casos Clínicos.” 63(5):392–96.

Gómez, Julio Cesar Vargas. 2000. “Evaluación de Espermatozoides Criopreservados de Ovinos de Pelo En Condiciones de Trópico de Guerrero En El Laprosem-UAgro.” Universidad Autónoma De Guerrero.

González Villalobos, Decio, Armando Quintero-Moreno, José Julián, Garde López-Brea, Milagros C. Esteso, María Rocío Fernández-Santos, Jorge Rubio-Guillén, Willian Mejía

Silva, Yuleima González Marval, Gonzalo León Atencio, and Rafael Bohórquez Corona. 2008. “Caracterización Morfométrica de La Cabeza Del Espermatozoide Porcino Mediante Análisis Computarizado (Resultados Preliminares).” *Revista Científica, FCV-LUZ*, 570–77.

Guerrero V., Hernán, Wilfredo Huanca L., Fernando Raymundo T., Sandra Huerta O., and Daphne Ramos D. 2012. “Uso de Dilutores Hipertónicos En La Criopreservación de Semen Ovino.” *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú* 20(1):41–46. doi: 10.15381/rivep.v20i1.529.

Gutierrez, Callisaya Erika Ruth. 2023. “Evaluacion de Tres Dilutores Comerciales Sobre El Procesamiento de Semen Ovino (Ovis Aries) En La Estación Experiemtal de Choquenaira.” Universidad Mayor De SanAndres.

Iglesias, Brandon. 1995. “Evaluación de La Refrigeración de Espermatozoides Ovinos Sobre Las Características Microscópicas En El Centro de Investigacion de La Universidad Autonoma de Guerrero.” Universidad Autonoma de Guerrero.

Jainudeen, M. R., H. Wahid, and E. S. E. Hafez. 2000. “Ovulation Induction, Embryo Production and Transfer.” *Reproduction in Farm Animals* (Chapter 3):405–30. doi: 10.1002/9781119265306.ch29.

Jeyendran, Rajasingam S., Hans H. Van Der Ven, W. Kennedy, Mariano Perez, and Lourens J. D. Zaneveld. 1984. “Comparison of Glycerol as Cryoprotective and a Zwitter for Ion Human Buffer System Media Spermatozoa Effect on MARIANO.” 5:1–7.

Kay, V. J., and L. Robertson. 1998. “Hyperactivated Motility of Human Spermatozoa: A Review of Physiological Function and Application in Assisted Reproduction.” *Human Reproduction Update* 4(6):776–86. doi: 10.1093/humupd/4.6.776.

Londra, Tamara Anahi. 2018. “Microbiología Del Semen Ovino: Efecto Sobre La Calidad Seminal.” Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.

Luna, Carina Herrera. 2023. “DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL Presentada Como Requisito Parcial Para Obtener El Título De :” Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Márquez, Harvey Lozano. 2014. “Reproducción Ovina En Colombia.” *Revista Ciencia*

Animal, 67–83.

Mendoza, I. G. White, and P. Chow. 1989. “Estudio de Los Componentes Químicos Del Plasma Seminal Del Macho Cabrío Angora.” 13:166–73.

Mishel, Inca Pilco Dayana. 2018. “Efecto Del Plasma Seminal y Vitamina E Sobre El Proseso de Crioconservación y Calidad Post Descongelado de Semen Ovino.” *Analytical Biochemistry* 11(1):1–5.

Mohammed, Eman Taha, Abeer M. Radi, Lotfi Aleya, and Mohamed M. Abdel-Daim. 2010. “Evaluation of the Cryoprotective Effect of Different Sources of Antioxidants in Bovine Semen.” *Environmental Science and Pollution Research* 27(5):5009–17. doi: 10.1007/s11356-019-07302-4.

Molinia, F. C., G. Evans, P. I. Quintana Casares, and W. M. C. Maxwell. 1994. “Effect of Monosaccharides and Disaccharides in Tris-Based Diluents on Motility, Acrosome Integrity and Fertility of Pellet Frozen Ram Spermatozoa.” *Animal Reproduction Science* 36(1–2):113–22. doi: 10.1016/0378-4320(94)90058-2.

Monsón, Rocío Silvia Sandoval. 2005. “Criopreservación de Semen Ovino Empleando Diferentes Dilutores y Combinaciones de Agentes Crioprotectores Permeantes y No Permeantes.” Universidad Nacional Mayor De San Marcos.

Morales, Carlos Augusto Lopez. 2004. “Evaluación de La Diversidad Genetica de Razas de Ovinos En Mexico Mediante El Uso de Marcadores Microsatelites.” Instituto politecnico nacional.

Moscardini, Murillo Mansano, Caroline Scott, Diego Souza Moura, Tarcísio Torre Lourenço, Viviana Helena, Vallejo Aristizábal, and Fabiana Ferreira De Souza. 2014. “Viabilidad de Espermatozoides Ovinos Mantenidos a 5º y 15ºC En Diferentes Sistemas de Refrigeración * Viability of Ram Sperm Chilled at 5º and 15ºC in Different Cooling Systems.” *Revista Brasileira de Ciencias Veterinárias* 21(2):122–26.

Muiño, R., M. Fernández, H. Areán, J. L. Viana, M. López, A. Fernández, and A. I. Peña. 2005. “Nuevas Tecnologias Aplicadas Al Procesado y Evaluación Del Semen Bovino En Centros de IA.” *Asociación Internacional Para El Desarrollo Agrario* 101(3):175–91.

Mujica, Fernando. 2005. “Razas Ovinas y Caprinas En El Instituto de Investigaciones Agropecuarias.” *Ministerio de Agricultura Instituto de Investigaciones Agropecuarias* 88.

Oaxaca, Saltijeral, Muñoz Mendoza, Saltijeral Oaxaca, and M. Silvia. 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).” *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria* VII(8):1–4.

Ortega, Vladimir Joaquín Parada. 2017. “Utilización de Leche Descremada Ultra Pasteurizada Como Diluyente En Semen Reffrigerado de Ovinos, Destinado a La Inseminacion Intracervical.” Universidad de Pamplona.

Palomino, J., M. Cervantes, A. Rodríguez, F. Cisneros, and W. Huanca. 2007. *Efecto de Dos Dilutores y Tiempos de Refrigeración Sobre La Motilidad Individual de Semen Refrigerado de Caprinos. Effect of Two Dilutors and Times of Refrigeration on Sperm Progressive Motility of Refrigerated Goat Semen*.

Paucar, Jhanina Helen Angulo, and Sarita Dana Palacios. 2020. “Estudio Comparativo de La Motilidad Espermática, Segun Metodo de Conservación En Ovinos de Razas Especializadas, Centro Experimental Casaracra - UNDAC,2020.”

Peña, Johanna Marcela Butriago, and Luz Maria Sáncchez. 2008. “Comparacion de Dos Diluyentes Para La Criopreservacion de Semen.”

Pérez-Llano, B., J. L. Lorenzo, P. Yenes, A. Trejo, and P. Garcia-Casado. 1999. “A Short Hypoosnotic Swelling Test for the Prediction of Boar Sperm Fertility.” (01):387–98.

Pérez Rosales, María Mercedes. 2019. “Efecto de La Criopreservación En La Integridad Acrosomal de Los Espermatozoides Epididimarios de Alpaca (Vicugna Pacos) Evaluado Mediante Citometría de Flujo.” Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Pillajo, Darío. 2015. “Vitalidad de Espermatozoides Ovinos Manteniendos a 5° y 15°C En Diferentes Sistemas de Refrigeracion.” Universidad de Ciencias Veterinarias.

Quintero, Aida Montero. 2013. “Integridad de La Membrana Plasmática de Espermatozoides Recíen Colectados de Ovinos.” 407–9.

Quispe, Yan Manrique, Jorge Babilonia Medina, Edwin Orna Rivas, Uri Perez Guerra, Manuel Pérez Durand, and Marcelino Araníbar Araníbar. 2023. “Efecto de La Yema de Huevo Sobre La Acalidad de Semen Descongelado de Peso (Piaractus Brachypomus).” *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru* 34(1):1–10. doi: 10.15381/RIVEP.V34I1.24594.

Ramos, Zarate Lourdes. 2011. “Efecto de Dilutores y Dos Tiempos de Equilibrio En La Criopreservación de Semen Ovino (Ovis Aries) En La Estación Experimental de Choquenaira.” Universidad Mayor De SAn Andres.

Rossi, Alejandro. 2012. “Efecto de La Refrigeración y La Adición de Trehalosa En Los Parámetros de Viabilidad Microscópicos de Semen Bovino.” PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA ARGENTINA.

Salamon, S., and W. M. C. Maxwell. 2000. “Storage of Ram Semen.” *Animal Reproduction Science* 62(1–3):77–111. doi: 10.1016/S0378-4320(00)00155-X.

Stornelli, M. C., C. M. Tittarelli, C. A. Savignone, and M. A. Stornelli. 2005. “Efecto de Los Procesos de Criopreservación Sobre La Fertilidad Seminal.” *Analecta Veterinaria* 25(2):28–35.

Tobar, Karen Melissa Cardona, Diana Carolina López Álvarez, and Luz Ángela Álvarez Franco. 2020. “Estudios de Asociación Genómica En Ovinos de América Latina.” *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*, 659–83.

Vazquez, J. M., E. A. Martinez, P. Martinez, C. Garcia-Artiga, and J. Roca. 1997. “Hypoosmotic Swelling of Boar Spermatozoa Compared to Other Methods for Analysing the Sperm Membrane.” (97):913–22.

Venegas, Rafael Rodríguez. 2003. “Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.” Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Villalobos, Ana Lucia Nuñes, and Andrea Azucena Rubio. 2015. “Comparacion de Calidad Biológica Del Semen Bovino Poscongelado Utilizando Como Crioprotector Leche Al 2% de Grasa, Andromet y Continental One Step.” Escuele Agricola Panamericana, Zamorano.

Watson, P. F. 1992. “The Causes of Reduced Fertility with Cryopreserved Semen.” 481–92.

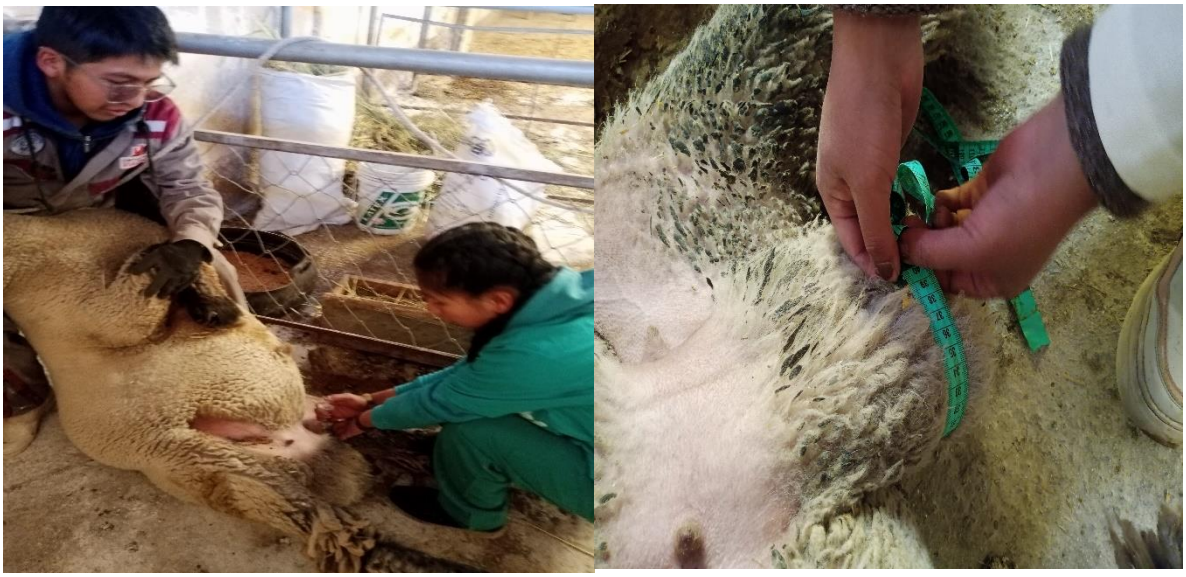
Zirena, Nathalie. 2014. “Comparación de Dos Métodos Físicos En El Tratamiento Del Semen Fresco Calidad Espermática Post Congelación.” Universidad Nacional Mayor De San Marcos.

8. ANEXOS

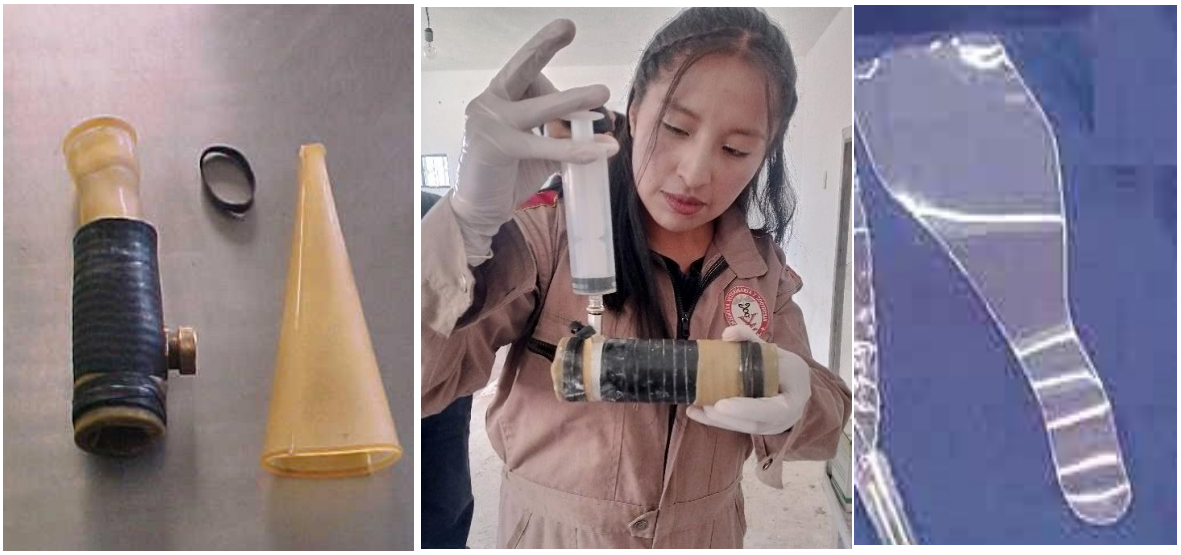
Anexo 1. Machos ovinos reproductores

Anexo 2. Alimentación de los ovinos reproductores

Anexo 3. **Palpación escrotal y medición de circunferencia testicular,** para determinar la integridad física. Testículos firmes y bien desarrollados son indicativos de buena calidad reproductiva.



Anexo 4. Preparación de vagina artificial



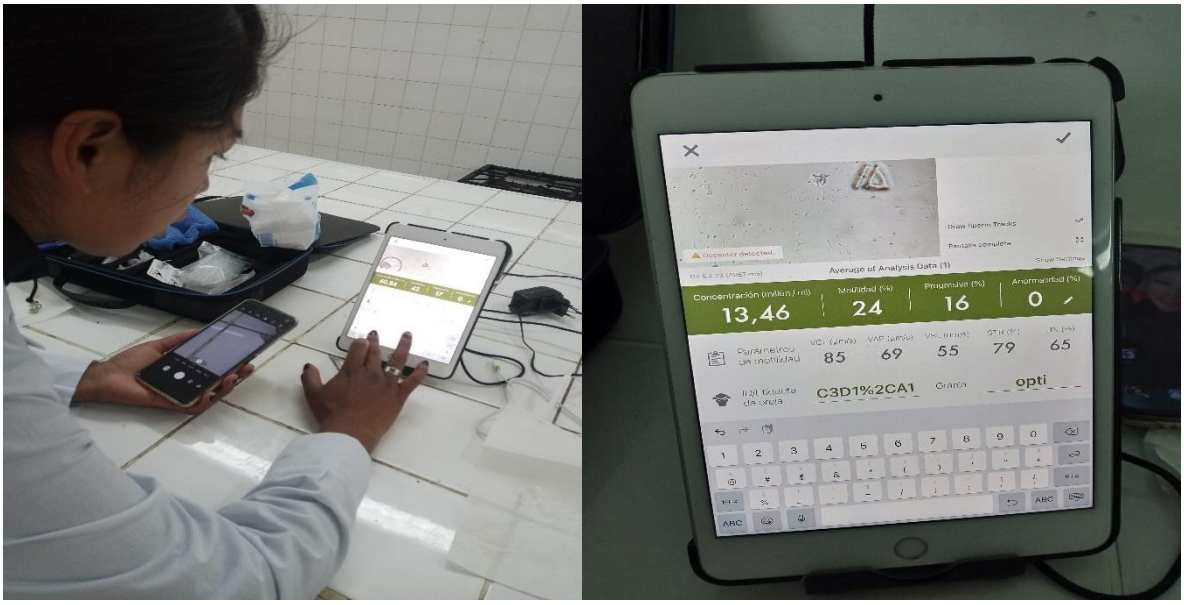
Anexo 5. Colección de semen

Anexo 6. Preparado de los ambientes y desinfectado de material

Anexo 7. Semen fresco colectado

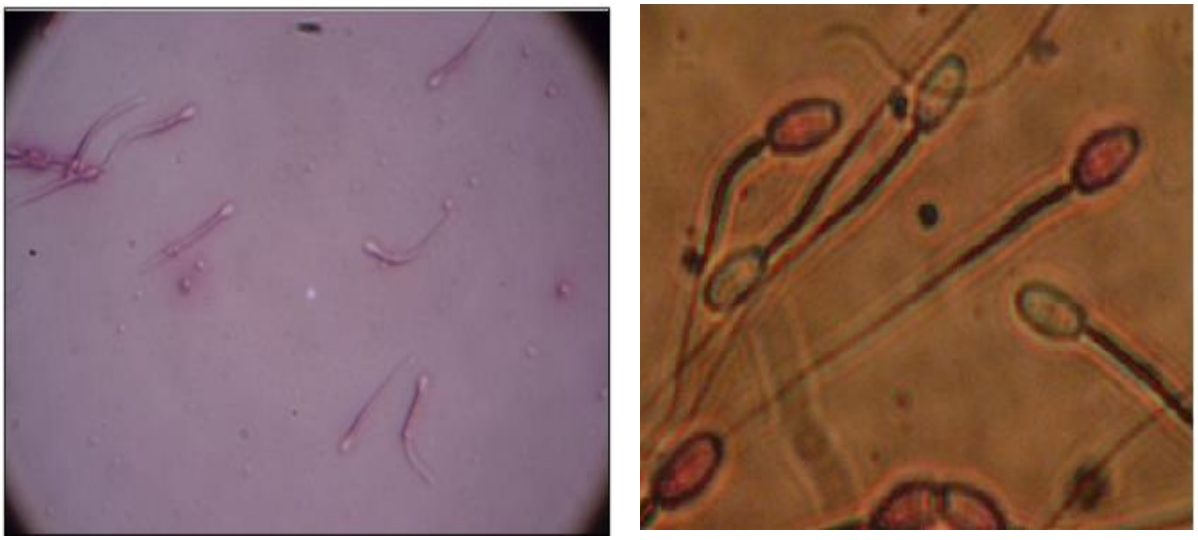
Anexo 8. Armado y refrigeración de las pajuelas seminales

Anexo 9. Toma de datos de motilidad del semen mediante isperm CASA

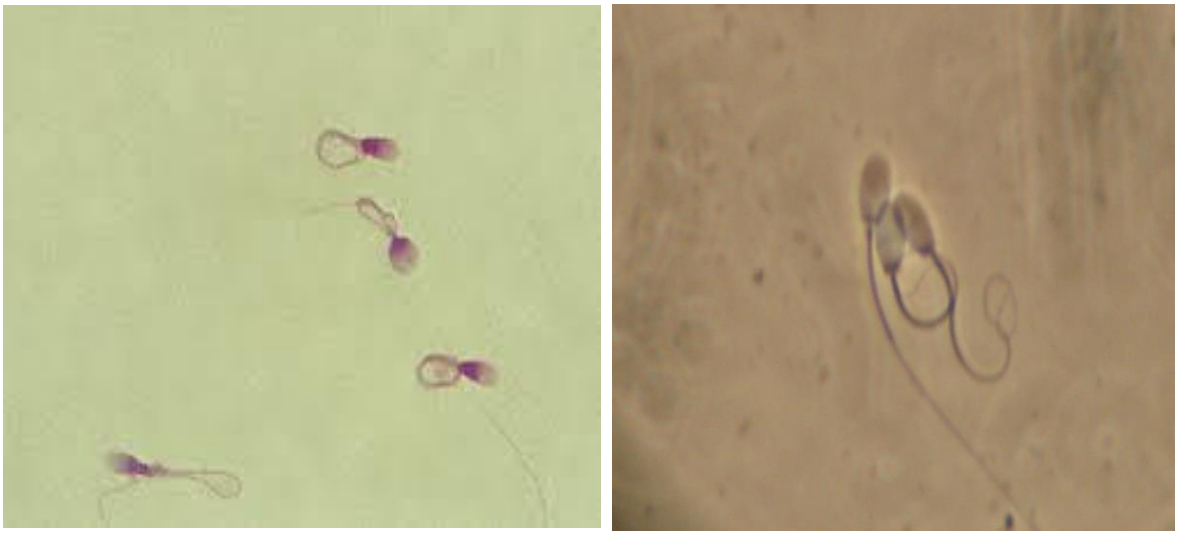


Anexo 10. Procedimiento de tinción de eosina-nigrosina para la elaboración de porcentaje de espermatozoides vivos de carneros

Anexo 11. Espermatozoides teñidos son (muertos) y los no teñidos son (vivos).



Anexo 12. Espermatozoides reaccionados en un medio hiposmótico. Se observa el flagelo torcionado helicoidalmente, flagelo enrollado, flagelo ascendido, cabeza hinchada y la cola hinchada lo cual es indicativo de que sus membranas han estado intactas,



Anexo 13. Resultados del efecto de refrigeración durante 7 días en tres dilutor

DIA	DILUTOR	MOTILIDAD %	VIVOS%	INTEGRIDAD%
1	OPTIXCELL	86,4	96,9	91,3
1	OPTIXCELL	87,0	92,5	88,8
1	OPTIXCELL	85,7	92,2	91,5
1	OPTIXCELL	92,2	87,2	87,7
1	OPTIXCELL	90,7	91,0	89,5
2	OPTIXCELL	82,9	86,2	89,9
2	OPTIXCELL	84,5	90,3	91,0
2	OPTIXCELL	91,7	90,8	91,7
2	OPTIXCELL	87,0	92,5	88,8
2	OPTIXCELL	89,5	95,7	88,4
3	OPTIXCELL	90,0	97,0	91,2
3	OPTIXCELL	85,7	88,8	90,3
3	OPTIXCELL	88,4	90,8	89,2
3	OPTIXCELL	93,5	94,7	89,5
3	OPTIXCELL	88,5	95,6	90,5
1	OPTIXCELL	87,1	89,4	90,4
1	OPTIXCELL	87,2	97,2	88,1
1	OPTIXCELL	86,6	90,3	89,0
1	OPTIXCELL	90,6	90,8	86,4
1	OPTIXCELL	87,4	98,0	87,7
2	OPTIXCELL	87,2	92,6	91,6
2	OPTIXCELL	85,7	101,2	88,0
2	OPTIXCELL	90,4	86,6	90,4
2	OPTIXCELL	88,9	87,6	90,4
2	OPTIXCELL	90,1	82,6	90,6
3	OPTIXCELL	90,4	92,8	91,9
3	OPTIXCELL	91,6	89,5	90,5
3	OPTIXCELL	89,1	94,2	89,5
3	OPTIXCELL	91,2	92,1	89,8
3	OPTIXCELL	87,8	84,9	88,3
1	LECHE	92,7	95,5	89,3
1	LECHE	89,2	93,7	93,9
1	LECHE	87,3	90,3	86,6
1	LECHE	95,5	91,8	86,0
1	LECHE	91,2	89,8	88,0
2	LECHE	88,0	96,9	88,9
2	LECHE	88,3	86,9	86,0
2	LECHE	93,2	95,9	91,5
2	LECHE	92,5	95,0	87,8
2	LECHE	93,4	95,8	90,2
3	LECHE	94,0	93,6	86,5
3	LECHE	90,7	92,5	85,7
3	LECHE	91,8	92,6	89,9

Anexo 14. Cuadro de Análisis de varianza para motilidad individual durante 7días a efecto de tres dilutores seminales

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	cuadrado medio	F Calculado	p-valor
DIA	40984,87	6	6830,81	975,09	<0,0001
DILUTORES	116,40	2	58,20	8,31	0,0003
DIA*DILUTORES	115,97	12	9,66	1,38	0,1786
Error	1324,00	189	7,01		
Total	42541,24	209			
CV	3,47				

Fuente: (Elaboración propia)

Anexo 15. Comparación de medias por Tukey de la motilidad individual de espermatozoides de carneros, en refrigeración durante 7 días.

DIA	Medias	n	Grupo Tukey
3	90,74	30	A
1	90,04	30	A
2	88,94	30	A
5	72,22	30	B
6	72,04	30	B
4	71,31	30	B
7	48,92	30	C

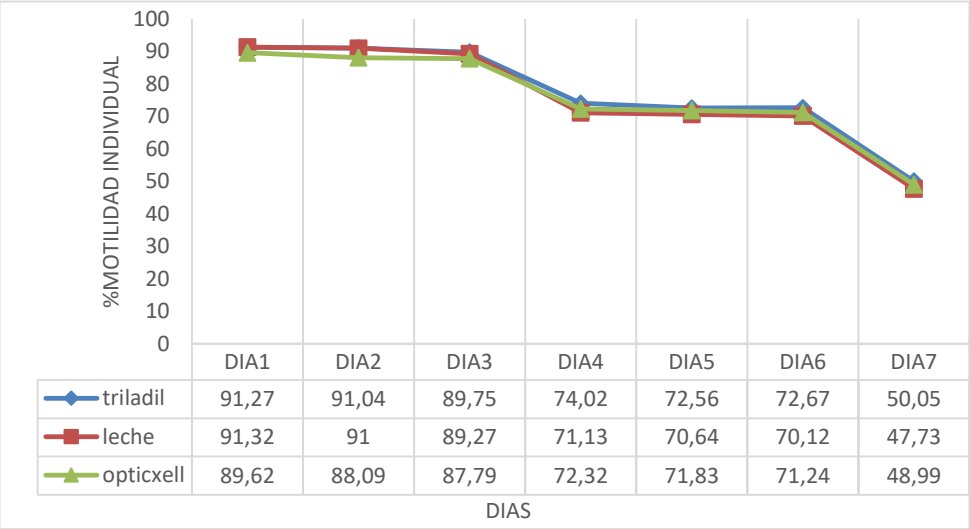
Fuente: (Elaboración propia).

Anexo 16. Comparación de medias por Tukey de la motilidad individual de espermatozoides de carneros, en refrigeración a efecto de dilutores.

DILUTOR	Medias	n	Grupo Tukey
Triladyl	77,36	70	A
Leche	75,89	70	B
Optixcell	75,70	70	B

Fuente: (Elaboración propia)

Anexo 17. Evaluación de la motilidad individual durante 7 días a efecto de tres dilutores



Fuente: (Elaboración Propia)

Anexo 18. Cuadro de Análisis de la Varianza para el porcentaje de espermatozoides vivos de carneros, refrigerados durante 7días a efecto de tres dilutores

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	cuadrado medio	F Calculado	p-valor
Día	35031,67	6	5838,61	335,90	<0,0001
Dilutores	165,12	2	82,56	4,75	0,0097
Día*Dilutores	182,19	12	15,18	0,87	0,5750
Error	3285,15	189	17,38		
Total	38664,13	209			
CV	5,17				

Fuente: (Elaboración Propia)

Anexo 19. Comparación de medias por Tukey determinando el porcentaje de espermatozoides vivos de carneros en refrigeración durante 7 días.

DIA	Medias	n	Grupo Tukey
3	93,18	30	A
1	92,49	30	A
2	92,24	30	A
5	78,16	30	B
4	77,59	30	B
6	76,13	30	B
7	54,19	30	C

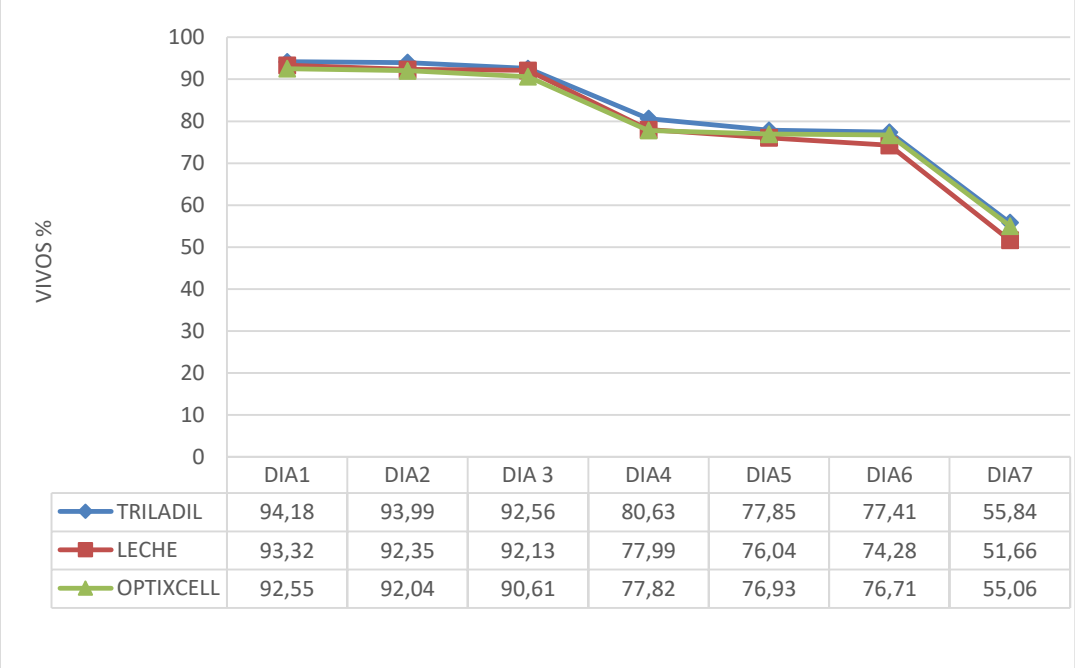
Fuente: (Elaboración propia)

Anexo 20. Comparación de medias por Tukey del porcentaje de espermatozoides vivos de carneros, en refrigeración a efecto de dilutores.

DILUTOR	Medias	n	Grupo Tukey
TRILADYL	81,78	70	A
OPTIXCELL	80,25	70	A B
LECHE	79,68	70	B

Fuente: (Elaboración propia)

Anexo 21. Evaluación de porcentaje de espermatozoides vivos de carneros para los tres tratamientos en 7 días



	DIA1	DIA2	DIA 3	DIA4	DIA5	DIA6	DIA7
TRILADIL	94,18	93,99	92,56	80,63	77,85	77,41	55,84
LECHE	93,32	92,35	92,13	77,99	76,04	74,28	51,66
OPTIXCELL	92,55	92,04	90,61	77,82	76,93	76,71	55,06

Fuente: (Elaboración propia)

Anexo 22. Cuadro de análisis de la Varianza para integridad de membrana celular de semen de carnero durante 7 días a efecto de tres dilutores

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	cuadrado medio	F Calculado	p-valor
Día	1720,88	6	286,81	56,16	<0,0001
Dilutor	338,58	2	169,29	33,15	<0,0001
Día*Dilutor	237,67	12	19,81	3,88	<0,0001
error	965,21	189	5,11		
total	3262,35	209			
CV	2,63				

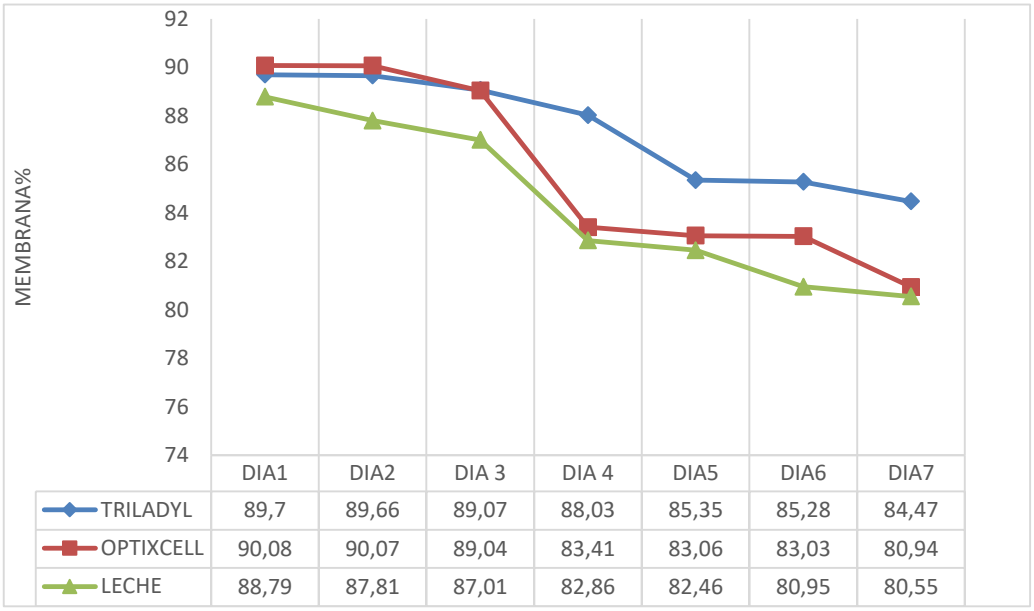
Fuente: (Elaboracion propia)

Anexo 23. Análisis de efectos simples para integridad de membrana celular de espermatozoides de carneros, refrigerado en dilutores en el Centro Experimental de Kallutaca

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
dilutores (1)	18,40	2	9,20	1,97	0,1585 ns
dilutores (2)	8,82	2	4,41	1,07	0,3566 ns
dilutores (3)	51,81	2	25,90	6,14	0,0063 *
dilutores (4)	38,70	2	19,35	2,81	0,0781 *
dilutores (5)	41,17	2	20,59	3,43	0,0472 *
dilutores (6)	62,77	2	31,38	6,84	0,0039 *
dilutores (7)	354,57	2	177,28	33,71	<0,0001 *
error	1324,00	189	7,01		

Fuente: (Elaboración propia)

Anexo 24. Evaluación de la integridad de membrana celular del semen ovino para los tres tratamientos a lo largo del período de evaluación.



	DIA1	DIA2	DIA 3	DIA 4	DIA5	DIA6	DIA7
TRILADYL	89,7	89,66	89,07	88,03	85,35	85,28	84,47
OPTIXCELL	90,08	90,07	89,04	83,41	83,06	83,03	80,94
LECHE	88,79	87,81	87,01	82,86	82,46	80,95	80,55

Fuente: (Elaboración propia).