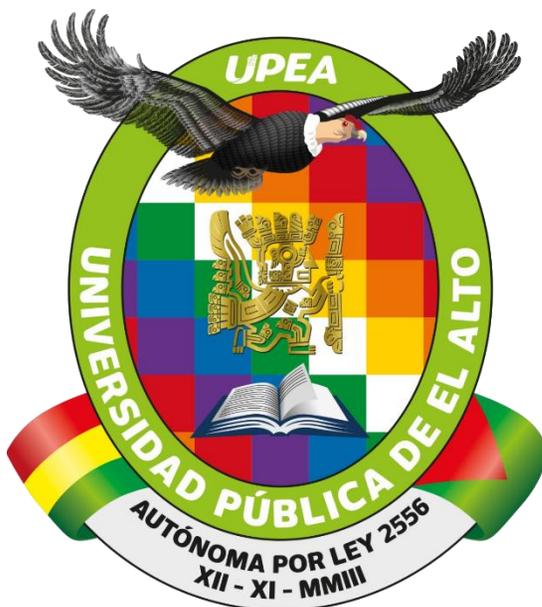


**UNIVERSIDAD PÚBLICA DE EL ALTO  
ÁREA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS, PECUARIAS  
Y RECURSOS NATURALES  
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**



**TESIS DE GRADO**

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

Por:

**Jhoselyn Diana Balboa Cordero**

**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 CINÉTICAS DE ESPERMATOZOIDES  
OVINOS (*Ovis aries*) EN EL CENTRO EXPERIMENTAL KALLUTACA**

*Tesis de Grado presentado  
como requisito para optar el Título de  
Ingeniera Agrónoma*

**Jhoselyn Diana Balboa Cordero**

**Asesores:**

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

**Tribunal Revisor:**

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

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

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

**Aprobada**

Presidente Tribunal Examinador .....



**DEDICATORIA:**

A **DIOS**: por darme fuerza y valor para seguir adelante logrando mis objetivos.

A mi padre **Abdulio Balboa Conde** por ser un ángel en mi vida, que siempre pudo aconsejarme a seguir mis metas a pesar de los obstáculos, a mi madre **Gloria Cordero Vasquez** por ser una de mis más grandes inspiraciones y darme mucho apoyo en esta trayectoria que ahora culmino y agradecerles por darme la vida.

A mis hijos **Nygan Jhoed Y Eydan Junior** uno más grandes pilares por darme apoyo emocional a seguir adelante.

A ti amigo, compañero y esposo **Eddy Junior** que siempre me dijiste no importa el tiempo, sino que siga mis sueños sin dejarlos atrás, y darme apoyo de construir un futuro a mi lado.

A mis hermanos **Leidy Jazmin y Jheferson Omar** por el apoyo incondicional a la distancia para perseguir mis objetivos.

## **AGRADECIMIENTOS**

A DIOS, que me mostró el camino, ser mi guía y darme la fuerza necesaria para seguir adelante y la sabiduría para culminar mi carrera.

A la carrera de Ingeniería Agronómica de la Universidad Pública de el Alto por mi formación académica.

Al Director Daniel Condori Guarachi de carrera Ingeniera Agronómica por viabilizar este trabajo.

A mi estimado asesor: Ph.D. Lic. Ing. Pedro Angel Delgado Callisaya quien le estoy agradecido por el apoyo brindado desde el inicio de la investigación hasta la culminación, así como el asesoramiento, revisiones sugerencias y las correcciones de la realización y redacción del presente trabajo documento.

A mis tribunales: Lic. Med. Vet. Alfredo Luis Coria Conde, Lic. Ing. Med. Vet. Hipolito Ramiro Nina Siñani, Lic. Ing. Cesar Humberto Quispe Paxipati por el aporte a este documento, agradecer por la revisión, corrección y sugerencias realizadas, que concluyeron a la culminación de este documento.

De igual manera dar gracias a mi familia que siempre me apoyaron en estos momentos donde más lo necesito, por darme las fuerzas necesarias. Y jamás me cansare de agradecer a mis papitos.

Por último, otra vez gracias mis hijos, esposo y amigos que siempre estuvieron ahí guiándome, apoyándome a no dejarme vencer y siga persiguiendo mis sueños a pesar de las adversidades.

**CONTENIDO**

|                        |      |
|------------------------|------|
| ÍNDICE DE TEMAS .....  | ii   |
| ÍNDICE DE CUADROS..... | vi   |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | vii  |
| ÍNDICE DE ANEXOS.....  | viii |
| ABREVIATURAS .....     | ix   |
| RESUMEN .....          | x    |
| ABSTRACT .....         | xi   |

## ÍNDICE DE TEMAS

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 1.     | INTRODUCCIÓN.....                            | 1  |
| 1.1.   | Antecedentes .....                           | 2  |
| 1.2.   | Planteamiento del problema.....              | 2  |
| 1.3.   | Justificación.....                           | 3  |
| 1.4.   | Objetivos.....                               | 3  |
| 1.4.1. | Objetivo general.....                        | 3  |
| 1.4.2. | Objetivos específicos.....                   | 3  |
| 1.5.   | Hipótesis .....                              | 4  |
| 2.     | REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....                  | 5  |
| 2.1.   | Generalidades de ovinos.....                 | 5  |
| 2.2.   | Método de Vagina artificial.....             | 5  |
| 2.2.1. | Características reproductoras del ovino..... | 6  |
| 2.2.2. | Características del semen de carnero.....    | 7  |
| 2.2.3. | Metabolismo de los espermatozoides.....      | 8  |
| 2.3.   | La espermatogénesis.....                     | 8  |
| 2.4.   | Fases de la espermatogénesis.....            | 9  |
| 2.4.1. | Espermatocitogenesis.....                    | 9  |
| 2.4.2. | Espermioogénesis.....                        | 10 |
| 2.4.3. | Espermiaacion.....                           | 11 |
| 2.4.4. | El espermatozoide.....                       | 12 |
| 2.5.   | Importancia de la evaluación seminal.....    | 12 |
| 2.6.   | Motores flajerales.....                      | 13 |
| 2.6.1. | Movimiento en forma de onda.....             | 13 |
| 2.6.2. | Fases del movimiento.....                    | 13 |
| 2.6.3. | Características macroscópicas.....           | 13 |

|          |  |    |
|----------|--|----|
| 2.6.3.1. | Volumen.....   | 13 |
| 2.6.3.2. | Color y olor.....  | 14 |
| 2.7.     | Características microscópicas.....   | 14 |
| 2.8.     | Análisis de la motilidad espermática mediante sistema ISAS-CASA.....                       | 14 |
| 2.9.     | Dilutores para el procesamiento del semen fresco de ovino.....                             | 16 |
| 2.9.1.   | Diluyentes empleados en la conservación en fresco de espermatozoides ovinos.....           | 16 |
| 2.9.1.1. | Optixcell®.....  | 16 |
| 2.9.1.2. | Leche .....  | 16 |
| 2.9.1.3. | Triladyl.....  | 17 |
| 2.10.    | Funciones del dilutor.....   | 17 |
| 2.10.1.  | Aporte de nutrientes. ....   | 18 |
| 2.10.2.  | Estabilización de la membrana.....   | 18 |
| 2.10.3.  | Inhibición del crecimiento bacteriano. ....  | 19 |
| 2.10.4.  | Parámetros de viabilidad espermática óptima para la inseminación artificial en ovinos..... | 19 |
| 3.       | MATERIALES Y MÉTODOS .....   | 20 |
| 3.1.     | Localización del área de investigación.....  | 20 |
| 3.1.1.   | Ubicación Geográfica .....   | 20 |
| 3.1.2.   | Material biológico.....  | 20 |
| 3.1.3.   | Instalaciones .....  | 20 |
| 3.1.4.   | Materiales de campo .....  | 20 |
| 3.1.5.   | Material de evaluación y procesamiento de semen.....                                       | 21 |
| 3.1.6.   | Materiales de Laboratorio.....   | 21 |
| 3.1.7.   | Materiales de escritorio.....  | 22 |
| 3.2.     | Metodología .....  | 23 |
| 3.2.1.   | Metodología para el objetivo 1, 2 y 3 .....  | 23 |

|            |   |    |
|------------|---|----|
| 3.2.2.     | Procesos preliminares.....  | 23 |
| 3.2.2.1.   | Periodos de ambientación de los carneros al sitio trabajo y dieta.....  | 23 |
| 3.2.2.2.   | Control sanitario de los carneros.....  | 23 |
| 3.2.2.3.   | Adecuación del laboratorio.....   | 24 |
| 3.2.2.4.   | Adiestramiento de los carneros a colección por vagina artificial.....   | 24 |
| 3.2.3.     | Fase Experimental.....  | 24 |
| 3.2.3.1.   | Colección de semen.....   | 24 |
| 3.2.3.2.   | Preparación del semen para su evaluación.....   | 25 |
| 3.2.3.3.   | Dilución de semen.....  | 25 |
| 3.2.3.4.   | Evaluación macroscópica del semen.....  | 25 |
| 3.2.3.5.   | Preparación de los dilutores.....   | 25 |
| 3.2.3.6.   | Dilución del semen de carnero.....  | 26 |
| 3.2.3.7.   | Enfriamiento del semen.....   | 26 |
| 3.2.3.8.   | Preparación de las pajuelas y empajillado.....  | 26 |
| 3.2.3.9.   | Evaluación del semen refrigerado.....   | 26 |
| 3.2.3.9.1. | Parámetros de motilidad obtenidos por software informático.....   | 27 |
| 4.         | DISEÑO EXPERIMENTAL.....  | 28 |
| 4.1.       | Factores de estudio.....  | 28 |
| 4.1.1.     | Variables de respuesta.....   | 29 |
| 4.1.2.     | Análisis estadístico.....   | 29 |
| 5.         | RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....   | 30 |
| 5.1.       | Evaluación del efecto de semen en refrigeración en 7 días en tres dilutores seminales sobre velocidad curvilínea (VCL) de espermatozoides ovinos ( <i>Ovis aries</i> ) en el Centro Experimental Kallutaca – La Paz- El Alto..... | 30 |
| 5.1.1.     | Análisis de velocidad curvilínea (VCL), de espermatozoides de carnero ...   | 30 |
| 5.2.       | Evaluación del efecto de semen en refrigeración en 7 días en tres dilutores seminales sobre velocidad rectilínea (VSL) de espermatozoides ovinos ( <i>Ovis aries</i> ) en el Centro Experimental Kallutaca – La Paz- El Alto..... | 35 |

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 5.2.1  | Análisis de velocidad rectilínea (VSL), de espermatozoides de carnero .....  | 35 |
| 5.3.   | Evaluación del efecto de semen en refrigeración en 7 días en tres dilutores seminales sobre velocidad media (VAP) de espermatozoides ovinos ( <i>Ovis aries</i> ) en el Centro Experimental Kallutaca – La Paz- El Alto..... | 39 |
| 5.3.1. | Análisis de velocidad media (VAP), de espermatozoides de carnero .....   | 39 |
| 6.     | CONCLUSIONES .....   | 43 |
| 7.     | RECOMENDACIONES.....   | 44 |
| 8.     | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....  | 45 |
| 9.     | ANEXOS .....   | 49 |

## ÍNDICE DE CUADROS

|   |    |
|---|----|
| Cuadro 1. Estimadores cinéticos de motilidad individual espermática utilizados en lo sistema asistidos por computadora CASA.....                    | 14 |
| Cuadro 2. Parámetros de motilidad obtenida por el sistema CASA.....   | 15 |
| Cuadro 3. Análisis de varianza de velocidad curvilínea (VCL) espermática, a efectos de día y dilutor seminales de carnero del UPEA- Kallutaca ..... | 30 |
| Cuadro 4. Análisis de varianza de velocidad rectilínea (VSL) espermática, a efectos de día y dilutor seminales de carnero del UPEA- Kallutaca ..... | 35 |
| Cuadro 5. Análisis de varianza de velocidad media (VAP) espermática, a efectos de día y dilutor seminales de carnero del UPEA- Kallutaca. ....      | 39 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. Clasificación taxonómica de los ovinos. (Etnoteca recursos zoogenéticos del Uruguay (Erzu, 2023)..... | 5  |
| Figura 2. (espermatogenesis embriología genética medicina 2023). ....   | 10 |
| Figura 3. Espermioogénesis (espermatogénesis embriología genética medicina 2023) .                              | 11 |
| Figura 4. (Espermatozoides   Cigna 2022) .....  | 14 |
| Figura 5. Evaluación de la velocidad curvilínea (VCL) para los tres tratamientos en los 7 días .....            | 31 |
| Figura 6. Evaluación de la velocidad rectilínea (VSL) para los tres tratamientos en los 7 días .....            | 36 |
| Figura 7. Evaluación de la velocidad media (VAP) para los tres tratamientos en los 7 días .....                 | 40 |

**ÍNDICE DE ANEXOS**

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| Anexo 1.  | Análisis de efectos simples VCL, VSL, VAP.....  | 50 |
| Anexo 2.  | Ambientación de los carneros .....  | 60 |
| Anexo 3.  | Desparasitación y aplicación de vitaminas .....   | 61 |
| Anexo 4.  | Alimentación de carneros con ensilaje, afrecho, y suplemento mineral.....                                 | 62 |
| Anexo 5.  | Actividades previas del laboratorio.....  | 63 |
| Anexo 6.  | Armado de la vagina artificial, llenado con agua a 40°C a la funda de latex para la colecta de semen..... | 64 |
| Anexo 7.  | Llevado de la hembra .....  | 65 |
| Anexo 8.  | Dilutores usados en el experimento Triladyl, Optixcell, Leche Light, suero fisiológico.....               | 66 |
| Anexo 9.  | estimulación del macho con la hembra.....   | 67 |
| Anexo 10. | Colocado de nombre de los dilutores a los frascos para la dilución del semen .....                        | 68 |
| Anexo 11. | Llenado de las pajuelas con el semen diluido .....  | 69 |
| Anexo 12. | Colocado del semen diluido de los tres dilutores en el termopet .....                                     | 70 |
| Anexo 13. | Primera evaluación de semen diluido en el I-SPERM de los tres dilutores.....                              | 71 |

**ABREVIATURAS**

|                 |  |
|-----------------|--|
| VCL             | Velocidad curvilínea                                     |
| VSL             | Velocidad rectilínea                                     |
| VAP             | Velocidad media  |
| EPZ             | Espermatozoide   |
| GPS             | Global Positioning System                                |
| ISAS-CASA       | Análisis de semen asistido por ordenador                 |
| ml              | Milímetro  |
| pH              | Potencial de hidrogeno                                   |
| msnm            | Metros sobre el nivel del mar                            |
| IA              | Inteligencia artificial                                  |
| VA              | Vagina artificial  |
| $\mu\text{m/s}$ | micrómetro/segundo                                       |
| $\Sigma$        | Sumatoria  |
| UTH             | Ultra Heat Treatment, tratamientos de altas temperaturas |
| ZP              | Zona pelúcida  |

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación se llevó en el centro experimental de Kallutaca de la Universidad Pública de El Alto, Laja – La Paz; el objetivo de la investigación fue evaluar el efecto de la refrigeración durante 7 días y tres dilutores seminales, sobre las características cinéticas de espermatozoides ovinos, para ellos se emplearon 3 carneros, los cuales se les entreno para la colecta de semen por el método de Vagina Artificial. La colecta de semen se realizó por las mañanas a horas 08:00 AM, para la dilución se emplearon: Triladyl, Optixcell, Leche light. Las muestras se evaluaron durante 7 días cada 24 horas en el Laboratorio de Química y Biotecnología de la Universidad Pública de El Alto. La velocidad curvilínea (VCL) fue 121.44, 116,85, 117,94  $\mu\text{m}/\text{seg}$  manteniéndose constante hasta el tercer día, el cuarto día bajan rotundamente y afecta su velocidad reduciendo hasta los 98,91, 98,41, 95,62  $\mu\text{m}/\text{seg}$ , los 3 últimos días su velocidad rectilínea fue 71.18, 73.88, 72.25  $\mu\text{m}/\text{seg}$ . No hubo evidencia estadística para asumir interacción entre factores ( $p>0.05$ ). la velocidad rectilínea (VSL) fue 63.62, 64.45 y 56.95  $\mu\text{m}/\text{seg}$  se mantiene constantes hasta el 4<sup>to</sup> día 65,9, 58,4 y 55,95  $\mu\text{m}/\text{seg}$ , posteriormente presento sus velocidades de: 60.32, 59.16, 49.78  $\mu\text{m}/\text{seg}$ . La cual el 6<sup>to</sup> día hay una subida de velocidades 67.96, 62.04, 56.11  $\mu\text{m}/\text{seg}$  esto es debido al manejo de las pajuelas o algún otro factor que pudo haber hecho que suba la velocidad, el 7<sup>mo</sup> día baja brusca de la velocidad 49.18, 43.87, 42.83  $\mu\text{m}/\text{s}$ . No hubo evidencia estadística para asumir interacción entre factores( $p<0.05$ ). Velocidad media (VAP) fue 82,25, 78,19  $\mu\text{m}/\text{s}$  su velocidad es constante hasta el 3 día 85,39, 81,75  $\mu\text{m}/\text{seg}$ , el 4 día la velocidad baja 70,78, 74,84  $\mu\text{m}/\text{s}$  el día 5 suben su velocidad esto puede ser debido al manejo de las pajuelas la cual afectaría a suba, de la misma manera puede ser a los dilutores afectan a lo EPZ, el día 6 y 7 tienen una baja considerable en velocidad media dando como resultado 59,48, 56,65  $\mu\text{m}/\text{s}$ . El dilutor leche baja de su velocidad media desde el segundo día 69,16  $\mu\text{m}/\text{s}$ , desde el 3<sup>er</sup> día al 6<sup>to</sup> su velocidad media permanece casi constantes, 69,89, 68,78, 65,5, 66, 15  $\mu\text{m}/\text{s}$ , para el 7<sup>mo</sup> día 51,77  $\mu\text{m}/\text{s}$ . No hubo evidencia estadística para asumir interacción entre factores( $p<0.05$ ). los dilutores influyen sobre las características cinéticas de los espermatozoides de ovino durante los 7 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; the objective of the research was to evaluate the effect of refrigeration for 7 days and three seminal extenders, on the kinetic characteristics of sheep sperm, for this purpose 3 rams were used, which were trained for semen collection by the Artificial Vagina method. Semen collection was carried out in the mornings at 08:00 AM, for dilution the following were used: Triladyl, Optixcell, and light milk. The samples were evaluated for 7 days every 24 hours in the Chemistry and Biotechnology Laboratory of the Public University of El Alto. The curvilinear velocity (VCL) was 121.44, 116.85, 117.94  $\mu\text{m}/\text{sec}$  remaining constant until the third day, the fourth day they dropped sharply and affected their speed reducing to 98.91, 98.41, 95.62  $\mu\text{m}/\text{sec}$ , the last 3 days their straight-line speed was 71.18, 73.88, 72.25  $\mu\text{m}/\text{sec}$ . There was no statistical evidence to assume interaction between factors ( $p > 0.05$ ). the straight line speed (VSL) was 63.62, 64.45 and 56.95  $\mu\text{m} / \text{sec}$  remains constant until the 4th day 65.9, 58.4 and 55.95  $\mu\text{m} / \text{sec}$ , later presented their speeds of: 60.32, 59.16, 49.78  $\mu\text{m} / \text{sec}$ . Which on the 6th day there is an increase in speeds 67.96, 62.04, 56.11  $\mu\text{m} / \text{sec}$  this is due to the handling of the straws or some other factor that could have caused the speed to increase, the 7th day the speed drops suddenly 49.18, 43.87, 42.83  $\mu\text{m} / \text{s}$ . There was no statistical evidence to assume interaction between factors ( $p < 0.05$ ). Average velocity (VAP) was 82.25, 78.19  $\mu\text{m} / \text{s}$ , its speed is constant until the 3rd day 85.39, 81.75  $\mu\text{m} / \text{sec}$ , on the 4th day the speed drops 70.78, 74.84  $\mu\text{m} / \text{s}$  on the 5th day they increase their speed, this may be due to the handling of the straws which would affect it, in the same way it may be the dilutors affect the EPZ, on days 6 and 7 they have a considerable drop in average speed resulting in 59.48, 56.65  $\mu\text{m} / \text{s}$ . The milk extender lowers its average speed from the second day 69.16  $\mu\text{m}/\text{s}$ , from the 3rd to the 6th day its average speed remains almost constant, 69.89, 68.78, 65.5, 66.15  $\mu\text{m}/\text{s}$ , for the 7th day 51.77  $\mu\text{m}/\text{s}$ . There was no statistical evidence to assume interaction between factors ( $p < 0.05$ ). The extenders influence the kinetic characteristics of the ovine spermatozoa during the 7 days of evaluation.

## 1. INTRODUCCIÓN

El interés creciente en la especie de Ovinos, ha motivado al productor mejorar el desarrollo de diversas biotecnologías reproductivas, con el objetivo de acelerar la propagación de animales seleccionados ya sea por su morfología, morfometría y por la calidad de fibra, para lo cual se debe caracterizar adecuadamente el semen para garantizar la reproducción.

De esta manera uno de los factores más importantes en la crianza de ovinos es la reproducción. Por tanto, la inseminación artificial ayudara a mejorar los sistemas de explotación, así también como la calidad genética de la especie, la cual ha logrado despertar el interés de muchos ganaderos. Esta técnica no sería sin la disponibilidad de un carnero de alto valor genético presente.

Estas actividades de fertilidad como seleccionar machos saludables y fértiles, los machos deben tener 1,5 y 5 años, mantener a los machos en una dieta equilibrada rica en proteínas y energía, podrían mejorar para un mejor énfasis en la composición de los dilutores y el manejo adecuado del semen para asegurar la supervivencia de los espermatozoides. Los dilutores que serán usados durante el procesamiento del semen, tienen la finalidad dar las condiciones adecuadas para que los espermatozoides sean viables por largo tiempo bajo la criopreservación.

Uno de los factores en la producción ovina es la reproducción, puesto que el comportamiento sexual varía de acuerdo a la especie, y en el caso particular de los ovinos, estas presentan características muy peculiares en concentración y volumen (Evans y Maxwell 1990).

Finalmente, cabe destacar la posibilidad de que esta tecnología permita la conservación de especies amenazadas y la conservación de su variabilidad genética, cuyas características productivas se mejoran continuamente, posibilitando su conservación mediante espermatozoides fértiles continuamente.

Referente a las características reproductivas en ovinos y caprinos, no se ha podido encontrar datos básicos sobre las características cinéticas de los espermatozoides de esta especie (tipos de movimientos, velocidad, resistencia, capacidad fecundante, etc.) que podría darnos luces sobre el método de manejo que estos espermatozoides

necesitan y así de esa manera diseñar protocolos y procesos adecuados para manipulación (Cortez, 2002).

### **1.1. Antecedentes**

Actualmente existen ciertas técnicas que nos pueden ayudar a incrementar la eficiencia reproductiva, obteniendo así mayores beneficios económicos de las explotaciones ovinas entre las cuales la crío preservación de semen y la inseminación artificial (IA) como biotecnologías que pueden ser aplicables en todos los sistemas de producción (Ruiz et al., 2015).

El desarrollo de la inseminación artificial en especies como los bovinos, permitió cambios trascendentales en la industria lechera y cárnica (Camacho, 2011) pero en ovinos hasta ahora encontramos un retraso por las pocas técnicas de valoración desarrolladas en semen de esta especie y sobre todo la poca oferta de semen de ovinos en el mercado.

### **1.2. Planteamiento del problema**

En la especie ovina, el tener machos reproductores, implica mucho esfuerzo, tanto desde el punto de vista económico, sanitario, y alimenticio, porque aumenta la mano de obra, se necesita mayores volúmenes de alimentos, insumos farmacéuticos (antibióticos, antiparasitarios), más prevención de transmisión de enfermedades como la Tricomoniasis, Tuberculosis, Brucelosis, entre otros, y se corre alto riesgo de que los animales puedan comportarse agresivamente contra el personal que los atiende.

La calidad del semen que se vaya a utilizar al momento de la inseminación, depende tanto del método de recolección y época, como del estado de los reproductores, siendo importante tener en cuenta todos los aspectos que hacen al manejo de los carneros. Esto y otras causas, convierte anti-económico el criar machos sementales de cualquier especie, en este caso carneros reproductores. Además, no se tiene por seguro la calidad del semen que producen estos sementales, solo se confían en algunas técnicas obsoletas que predicen esa calidad.

Otro problema importante es que, en el altiplano, no hay centros de investigación que puedan desarrollar un análisis completo (espermograma) de las características seminales de carneros criados y acostumbrados a estas condiciones climáticas, pero aún no se tiene

protocolos recomendados para valorar mediante sistemas informáticos las características cinéticas de espermatozoides de carnero.

### **1.3. Justificación**

El uso de técnicas de valoración seminal informáticas son una importante ayuda para avalar la calidad de los espermatozoides que produce un carnero de alta calidad genética. Esto incluso elevaría el costo de cada reproductor pues nos daría una idea muy clara de la habilidad fecundante del espermatozoides que producen estos carneros.

La inseminación artificial entre los ganaderos posee un gran impacto en el avance genético poblacional y un costo reducido. Uno de los factores más importantes a tener en cuenta en un programa de inseminación artificial es la calidad del material seminal, donde debe incluirse la sanidad propia de los reproductores.

La fertilidad potencial de una muestra de semen probablemente va depender de que contenga un número suficiente de espermatozoides con velocidad buena, morfológicamente normales y funcionalmente competentes, capaces de alcanzar el oviducto y de establecer un reservorio, de llevar a cabo la fecundación del ovocito, y de contribuir al desarrollo embrionario.

### **1.4. Objetivos.**

#### **1.4.1. Objetivo general**

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

#### **1.4.2. Objetivos específicos**

- Determinar la velocidad curvilínea de espermatozoides de carneros conservados en refrigeración desde 1 a 7 días en tres dilutores seminales.
- Determinar la velocidad rectilínea de espermatozoides de carneros conservados en refrigeración desde 1 a 7 días en tres dilutores seminales.

- Determinar la velocidad del recorrido promedio de espermatozoides de carneros conservados en refrigeración desde 1 a 7 días en tres dilutores seminales.

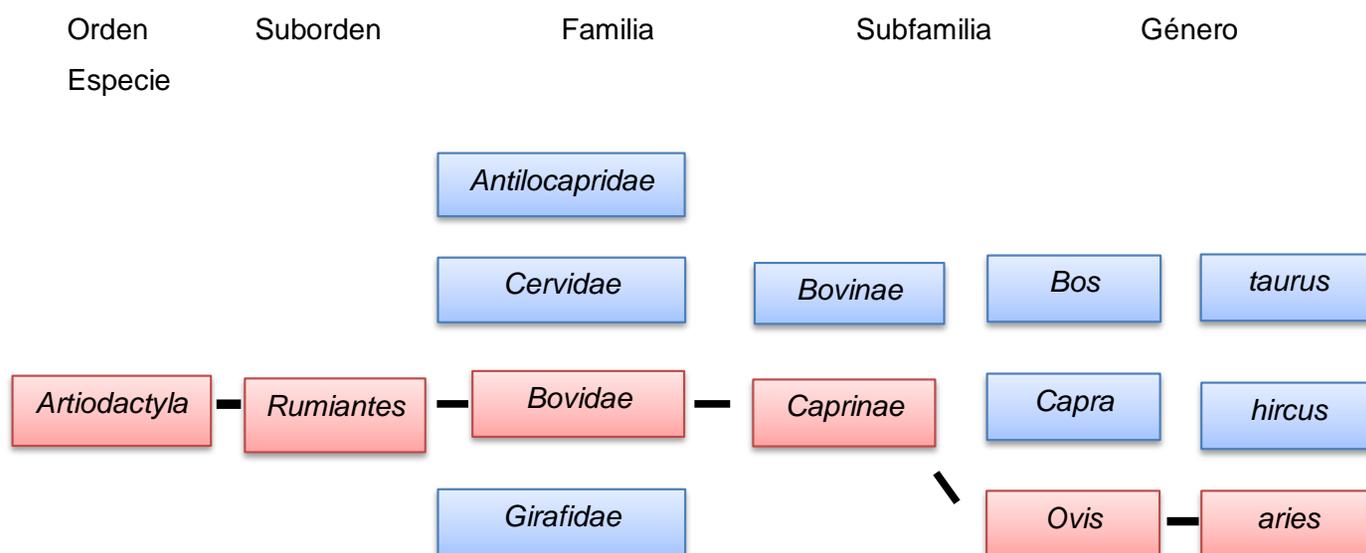
### **1.5. Hipótesis**

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

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Generalidades de ovinos.

Los ovinos domésticos (*Ovis aries*) son mamíferos rumiantes que pertenecen a la familia Bovidae y sub familia Caprinae (Figura 1). Generalmente su cuerpo está cubierto de lana, aunque se han desarrollado razas con pelo. Esta especie puede o no presentar cuernos, algunas veces esta característica es observada solo en los machos, son de temperamento dócil y con un marcado instinto gregario, en la mayoría de las razas su ciclo reproductivo es estacional y por lo general tienen de una o dos crías por parto (Etnoteca recursos zoogenéticos del Uruguay (Erzu, 2023).



**Figura 1. Clasificación taxonómica de los ovinos. (Etnoteca recursos zoogenéticos del Uruguay (Erzu, 2023))**

### 2.2. Método de Vagina artificial.

En los carneros la colecta del semen se lleva a cabo con mayor frecuencia por medio de vagina artificial, la cual simula las condiciones de presión y temperatura de las naturales; constituida por un tubo de PVC rígido, una camisa de hule y una válvula, por donde se le adiciona agua a 45°C. En una de sus extremidades se adiciona un tubo colector graduado en décimas de mililitros. El recolectar semen por medio de este aparato es sencillo; primero, es presentar una hembra al macho para estimularlo, posteriormente, al momento

de que éste efectúa el salto se asegura el prepucio con la mano desviando el pene. La eyaculación es instantánea. El semen colectado debe de ser protegido de los rayos solares, polvo, agitación y cambios bruscos de temperatura (Ferreira *et al*, 2001).

La vagina artificial presenta las siguientes ventajas:

- ✓ Obtención de la totalidad del eyaculado.
- ✓ Medida exacta del eyaculado.
- ✓ Viabilidad del esperma, mejor que con cualquiera de otros métodos.
- ✓ Ausencia de todo tipo de secreciones exteriores.
- ✓ Dada su rapidez y limpieza, no es estresante para el semental.
- ✓ Es indudablemente el método más fidedigno en lo que respecta la calidad de la muestra colectada.
- ✓ Permite colectar semen, varias veces por semana sin producir malestar en el macho (Gonzales, 1989).

Agraz (1989), señala que es importante considerar que una buena colección o una colección bien ejecutada se caracterizan por el golpe de riñón del macho al momento del coito.

### **2.2.1. Características reproductoras del ovino.**

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 estudio fisiológico y funcional del aparato reproductivo del carnero comienza en los testículos de los cuales producen los espermatozoides. Los testículos penden entre las extremidades posteriores dentro de un saco de piel o escroto, éstos suben y bajan por acción de los músculos que se encuentran en las paredes del escroto y en el cordón espermático lo que permite al animal mantener la temperatura constante. Los espermatozoides salen del testículo a través de los conductos eferentes y llegan al epidídimo a su porción craneal (cabeza del epidídimo), después de atravesar el cuerpo del epidídimo llega a la porción terminal o cola, donde se almacenan hasta pasar al conducto deferente el cual penetra en la uretra en donde se incorpora con las secreciones

producidas por las glándulas vesiculares, la próstata y las glándulas bulbouretrales (Valdez, 2013).

#### Ciclos de producción espermática

La espermatogénesis en el carnero dura unos 63 días, que sumarian 49 días para formar espermatozoides y 14 días para la maduración espermática en epidídimo (Morales, 2019).

El eyaculado del carnero presenta las siguientes características:

- Es una fracción simple, es decir única.
- Su color es blanco-lechoso a cremoso pálido.
- Tiene un pH que ronda 6.7 a 6.9.
- Su volumen es bajo: en promedio valores entre 0.8 y 1.5
- Tiene una alta concentración de células espermáticas: en promedio entre 2.000 millones y 6.000 millones de EPZ/ml de eyaculado.(Morales, 2019).

La eyaculación de un carnero hasta su agotamiento puede ascender a un máximo de 30 a 40 saltos por día; esto puede darse al principio de la temporada reproductiva en carneros que han estado en reposo sexual, pero en la medida que van realizando la monta, esta cantidad desciende. El número de coitos por oveja disminuye a medida que el macho se enfrenta a un mayor número de ovejas en celo. Tras la cópula el carnero suele desarrollar un período refractario o por decir un rechazo hacia las hembras, sin embargo, esto es muy variable, puesto que puede eyacular varias veces antes del período de latencia mencionado. A la vez, dicho período puede interrumpirse, volviendo a la actividad copulatoria, si se dirige su atención hacia otra hembra o aun ambiente distinto. Este fenómeno se conoce como "efecto Coolidge"(Simonetti, 2014).

#### **2.2.2. 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 Villalobos 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).

### **2.2.3. 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).

### **2.3. La espermatogénesis.**

La gametogénesis es el proceso mediante la cual las células germinales experimentan cambios cromosómicos y morfológicos para la preparación de la fecundación. Durante este proceso, a través de la meiosis se reduce la cantidad de número de cromosomas diploide  $2n$  al número haploide 23 o  $1n$ . La maduración del gameto masculino ocurre a través del mecanismo llamado espermatogénesis, que se inicia desde la pubertad con la maduración de las espermatogonias; cada una origina cuatro células hijas, para así formar millones de espermatozoides (Lopez, 2023).

La espermatogénesis se define como la suma de cambios en espermática y el espermatozoide. Es una fase importante que regula en gran parte la calidad del gameto final. Estos cambios son: formación del acrosoma, que se extiende sobre la mitad de la superficie nuclear y que contiene enzimas que ayudan a la penetración del ovocito y las capas que lo rodean durante la fecundación: Condensación del núcleo, donde la espermátida se compacta y adquiere una forma ovalada o piriforme. Formación del cuello, pieza intermedia y cola y eliminación de la mayor parte del citoplasma (Lopez, 2023).

Cuando el desarrollo celular está completo, los espermatozoides maduros se sueltan de las células de Sertoli en el lumen del túbulo seminífero, y proceden a través del sistema de conducto excurrente, conocido como la rete testis, hasta que ellos entran en el epidídimo vía los conductos eferentes. Durante el pasaje a través del epidídimo, los espermatozoides sufren una serie de cambios bioquímicos para volverse los espermatozoides motiles capaces para la fertilización (Donnell *et al*, 2001).

## **2.4. Fases de la espermatogénesis.**

### **2.4.1. Espermatocitogenesis.**

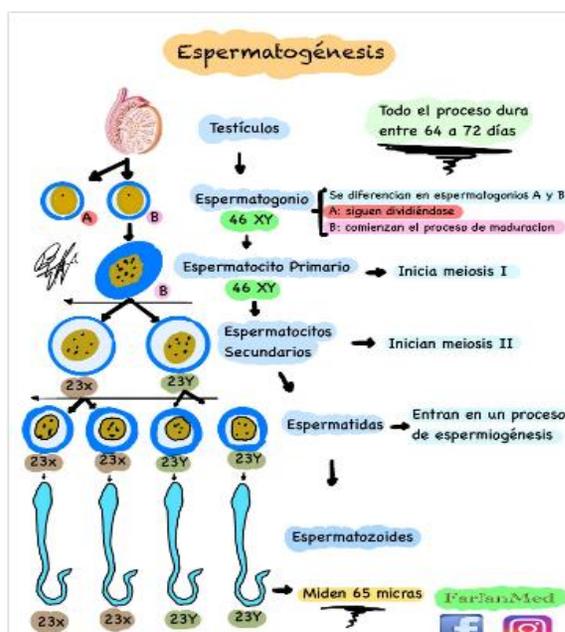
En la pubertad solo existe dos tipos de túbulos seminíferos y las células de Sertoli las que sirven de sustento y las espermatogonias o digas también células sexuales del macho, estos experimentan cambios y divisiones que comienzan en la periferia y avanza hasta la luz del túbulo (Castro, 2022).

Los túbulos seminíferos al nacimiento son pequeños y se encuentran rodeados de células mesenquimales mesodermales precursoras de las células de Leydig o células intersticiales que son células poligonales encargadas de secretar la hormona testosterona, además se encuentran revestidos por un epitelio seminífero compuesto por dos tipos de células básica (Castro, 2022).

El mismo autor menciona que este proceso implica la producción de espermaticitos a partir de los túbulos seminíferos, así como la renovación de los espermaticitos. Las espermatogonias siguen la vía de la espermatogénesis por la vía de diferenciación. La diferenciación y renovación de las células mitóticas ocurre por división. La motilidad de los espermatozoides es esencial para asegurar un número adecuado de células germinales y para mantener una producción suficiente de espermatozoides durante el período reproductivo.

Las espermatogonias en contacto con la membrana basal del túbulo seminífero, presentan un núcleo grande en posición central y se caracterizan por la presencia de gránulos de heterocromatina de diverso tamaño esparcidos en todo el nucleoplasma, el citoplasma presenta escasos organelos, el retículo endoplásmico rugoso está localizado alrededor del núcleo, las mitocondrias son abundantes. Los espermaticitos primarios se forman por el proceso de mitosis de las espermatogonias, estos tienen un núcleo grande

en posición central, la heterocromatina condensada es más abundante, su citoplasma presenta mitocondrias en menor cantidad con respecto a las espermatogonias (Ortíz et al. 2003).



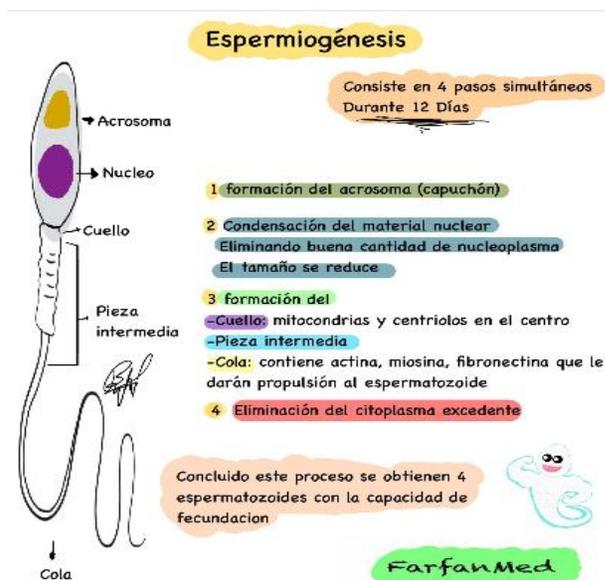
**Figura 2. espermatogénesis embriología genética medicina (Farfan Med 2023).**

#### 2.4.2. Espermiogénesis.

La espermatogénesis es el proceso biológico de la transformación gradual de las células germinales en espermatozoides en los túbulos seminíferos de los testículos, este proceso involucra la proliferación celular por divisiones mitóticas, duplicación de cromosomas, recombinación genética, reducción y división meiótica, hasta producir espermátidas haploides y la diferenciación terminal de las espermátidas en espermatozoides (Castro, 2022).

Las espermátidas que es la división de los espermatocitos secundarios sufren una compleja transformación en espermatozoides sin división celular en un proceso que se llama Espermiogénesis, durante la cual se diferencian estructuras específicas como el acrosoma y el flagelo. Los espermatozoides se dirigen hacia la luz de los túbulos seminíferos y están constituidos por tres regiones principales cabeza, cuello y flagelo. La cabeza contiene al núcleo con heterocromatina granular electrodensa y es esférico sin

una invaginación hacia el polo anterior; el aparato de Golgi secreta numerosas vesículas las cuales se fusionan y forman la vesícula proacrosomal. En la parte del cuello se encuentran cinco mitocondrias, con crestas bien desarrolladas y dispuestas en forma circular. El centriolo se encuentra entre las mitocondrias y está compuesto por un número constante de micro túbulos dos de ubicación central y nueve pares periféricos, a partir de éste se forma el flagelo que también tiene el mismo arreglo de micro túbulos rodeados por la membrana plasmática (Ortíz et al. 2003).



**Figura 3. Espermatogénesis embriología genética medicina (FarfanMed 2023)**

### 2.4.3. Espermiación.

Olivera *et al.* (2006) menciona que, existen cambios en el núcleo y el citoplasma de la espermatida hasta llegar a ser un espermatozoide teniendo los siguientes procesos:

- Formación del acrosoma que se da a nivel de la parte media de la superficie nuclear y presenta enzimas para ayudar al espermatozoide a penetrar al ovocito.
- Condensación del núcleo.
- Formación del cuello, parte intermedia y cola.
- Eliminación de gran parte del citoplasma.

Finalizado por el proceso de espermatogénesis, los espermatozoides maduros se liberan de las células de Sertoli en el túbulo seminífero y viajan a través del conducto excurrente

denominado retestis, hasta llegar al epidídimo y conductos eferentes. La espermatogénesis dura aproximadamente 49 a 61 días en rumiantes, los espermatozoides llegan a los túbulos seminíferos y son empujados hacia el epidídimo. Durante su paso por el epidídimo se producen cambios bioquímicos en los espermatozoides que les confieren cambios motiles que son esenciales para la fecundación. (Olivera *et al.* 2006).

#### **2.4.4. El espermatozoide.**

El espermatozoide presenta varias características como: una cabeza en la que contiene el material genético, un cuerpo donde se encuentran las mitocondrias y facilita la movilidad al flagelo, los espermatozoides presentan características únicas, por esa razón no son iguales, ya que pueden presentar o no el proceso de capacitación y reacción acrosómica durante el mismo momento. Es de suma importancia conocer los cambios fisiológicos y morfológicos que presentan desde su producción hasta tener contacto con el ovocito durante la fecundación (Barreto, 2022).

El espermatozoide es una célula altamente especializada que ha evolucionado para cumplir una función biológica compleja, fecundar al ovocito. Se trata de una célula haploide, producto final del proceso de la gametogénesis en el macho, portadora de la información genética paterna para lograr un entrecruzamiento cromosómico y en consecuencia el intercambio genético, lo que supone un incremento en la diversidad genética (Ávalos *et al.* 2018).

#### **2.5. 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 (parámetros cinéticos, porcentaje de espermatozoides vivos y muertos, motilidad masal, motilidad individual, viabilidad, morfología espermática),(Cabrera *et al.*, 2012)

## **2.6. Motores flajerales**

### **2.6.1. Movimiento en forma de onda**

Los movimientos del espermatozoide se caracterizan por la onda que se propaga a lo largo del flajelo. La onda es generada debido a las contracciones y la relajación de las Dyneinas, son proteínas motoras que se unen a los microtúbulos del axonema (Alberts *et al.* 2004).

1. Dyneinas: proteínas motoras que llegan a unirse a los microtúbulos del axonema las cuales generan fuerza para mover el flajelo.
2. Axonema: componente central de motor flagelar que son compuestas por varios microtúbulos que están extendidas a lo largo del flajelo.
3. Radiales: estructuras que extienden desde el axonema hacia la membrana celular que ayudan a mantener la forma y estructura del flajelo (Alberts *et al.* 2004).

### **2.6.2. Fases del movimiento**

- Fase de contracción: las Dyneinas se activan las cuales generan fuerza para que se mueva el flajelo.
- Fase de relajación o desplazamiento del axonema: las Dyneinas se relajan y esto hace que el flajelo permita moverse hacia adelante.
- Fase de recuperación: el flajelo se relaja, para después vuelva a prepararse para la fase de contracción (Johnson *et al.* 2000).

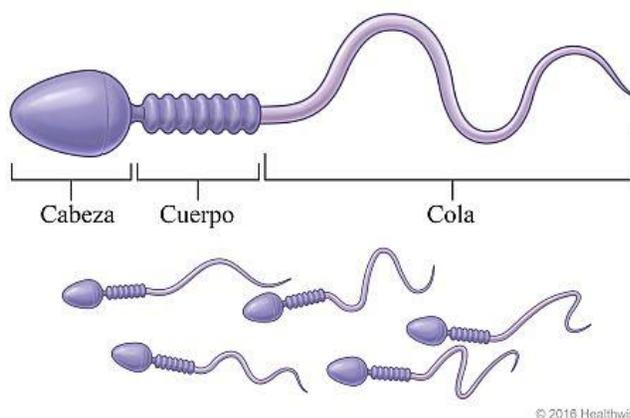
### **2.6.3. Características macroscópicas**

#### **2.6.3.1. Volumen**

Se analizan directamente en el tubo colector. El volumen varía de acuerdo a la edad y estado del carnero, manejo del operador, estacionalidad, método de recolección (vagina artificial, recuperación vaginal o por electro-eyaculador), frecuencia de las recolecciones, entre otras. El mejor método de recolección de semen es por vagina artificial y el volumen oscila entre 0.5 ml a 0.7 ml para ovinos jóvenes y hasta 2 ml para ovinos adultos (Pérez, 2020).

### 2.6.3.2. Color y olor

El aspecto y color normal del semen del macho ovino es blanco lechoso o crema pálido. Dicha coloración es producida por la presencia de riboflavina en el plasma seminal, debe destacarse que el color blanco-rosáceo indica existencia de sangre (Pérez, 2020).



**Figura 4. (Espermatozoides | Cigna 2022)**

### 2.7. Características microscópicas

### 2.8. Análisis de la motilidad espermática mediante sistema ISAS-CASA.

La dificultad de estandarización, que aparece más constante es la temperatura que debe ser a 37°C, variación de 5°C modifican la velocidad curvilínea (VCL) significativamente, el método de colecta del semen puede ser mediante vagina artificial, electroeyaculación o incluso obtención posmortem (Santiani *et al.* 2012).

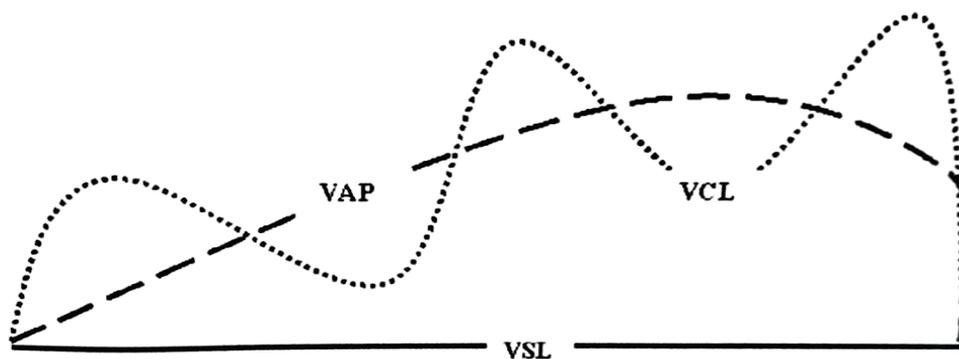
El sistema analizador de semen digital (ISAS-CASA) refleja una serie de medidas derivadas de análisis del desplazamiento de la cabeza del espermatozoide a través del tiempo. Los parámetros evaluados en las muestras seminales son: el porcentaje de espermatozoides. Además, otros parámetros definen la cinética de cada espermatozoide como la velocidad curvilínea (VCL), la velocidad media (VAP) y la velocidad rectilínea (VSL), obtenidos de las variables anteriores, la amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y la frecuencia de cruces sobre la trayectoria media (Buzon, 2013).

**Cuadro 1. Estimadores cinéticos de motilidad individual espermática utilizados en lo sistema asistidos por computadora CASA.**

|                               |                          |   |
|-------------------------------|--------------------------|---|
| VCL<br>(Velocidad curvilínea) | $\mu\text{m}/\text{seg}$ | Distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de la trayectoria real por unidad de tiempo              |
| VSL<br>(Velocidad rectilínea) | $\mu\text{m}/\text{seg}$ | Distancia recorrida por el espermatozoide entre el primer y último punto de trayectoria por unidad de Tiempo. |
| VAP<br>(Velocidad media)      | $\mu\text{m}/\text{seg}$ | Distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de la trayectoria media.                                 |

Adaptado por (García, 2014).

**Cuadro 2. Parámetros de motilidad obtenida por el sistema CASA**



Fuente: (Quintero, 2003).

Los tres parámetros de velocidad (VCL, VAP y VSL) son comúnmente utilizados para la descripción general del movimiento del espermatozoide (Quintero et al. 2009).

Para una evaluación adicional se establecieron los parámetros (STR, LIN y WOB) que tratan de las relaciones entre estas velocidades: el LIN provee una indicación de la relación entre la trayectoria recta recorrida y la trayectoria promedio del espermatozoide, de modo que en situaciones la trayectoria promedio se aproxima de la trayectoria en línea recta se presenta una elevada STR, el índice de oscilación (WOB) es bajo en casos de trayectorias en las que los espermatozoides recorren una área en su desplazamiento elevado y más alto en caso de trayectorias circulares o rectilíneas una vez que la VAP y la VCL se asemejan (Quintero et al. 2009).

## **2.9. Dilutores para el procesamiento del semen fresco de ovino.**

El dilutor de semen es la solución que permite aumentar el volumen del eyaculado hasta conseguir las dosis necesarias y preservar las características funcionales de las células espermáticas y mantener el nivel de fertilidad adecuado. Los espermatozoides se encuentran en el plasma seminal, que suministra los nutrientes necesarios para mantener una elevada actividad metabólica necesaria para el proceso de transporte espermático a través del aparato genital femenino. En el eyaculado, esta actividad metabólica solo puede mantenerse durante tiempo muy limitado. Para poder conservar los espermatozoides durante períodos prolongados es necesario reducir la actividad metabólica de los espermatozoides, mediante la extensión en un medio adecuado y la reducción de la temperatura (Gadea, 2003).

### **2.9.1. Diluyentes empleados en la conservación en fresco de espermatozoides ovinos**

#### **2.9.1.1. Optixcell®**

es un diluyente que posee una cualidad muy práctica, que es su translucidez, que favorece la observación de espermias de una manera muy clara, a diferencia de otros dilutores. como diluyente de semen bovino fresco y refrigerado no desfavorece las variables de motilidad, normalidad y vitalidad (Andrade *et al*, 2020).

#### **2.9.1.2. Leche**

La leche de vaca, es utilizada para diluir semen de diferentes especies, las proteínas de la leche actúan como amortiguadores contra cambios de pH y como agentes quelantes contra cualquier metal pesado presente (Salamon *et al*, 2000). La caseína, la principal proteína de la leche, también tiene un efecto antioxidante (Foote *et al*. 2002), 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 (Salamon *et al*. 2000), El uso de leche tratada con altas temperaturas (UHT) es muy recomendado por su condición de esterilidad y por no requerir calentamiento previo (Salamon *et al*. 2000).

Algunos estudios indican que no existen diferencias entre utilizar leche entera pasteurizada y leche descremada (Gil *et al.* 2000).

La leche, específicamente, leche de vaca, es utilizada para diluir semen de diferentes especies (Foote *et al.* 1993). Las proteínas de la leche actúan como amortiguadores contra cambios de pH y como agentes quelantes contra cualquier metal pesado presente (Salamon *et al.* 1995). La caseína, la principal proteína de la leche, también tiene un efecto antioxidante (Foote, 2002), y por tanto confiere protección a los espermatozoides durante la reducción de temperatura (Salamon *et al.* Maxwell 2000). Sin embargo, otra proteína presente en la leche, la lactenina, es tóxica para los espermatozoides (Salamon *et al.* 2000).

El uso de leche tratada con altas temperaturas (UHT) es muy recomendado por su condición de esterilidad y por no requerir calentamiento previo (Salamon *et al.* Maxwell 2000).

#### **2.9.1.3. Triladyl**

Triladyl se caracteriza por presentar en su composición yema de huevo lo cual resulta beneficioso ya que protege a las células espermáticas del choque térmico, sin comprometer los resultados de fertilidad (Vargas, 2012).

Este diluyente de semen de bovino está compuesto de "TRIS, ácido cítrico, azúcar, tampones, glicerina, antibióticos (Tilosina 5.7 mg, Gentamicina 28.6 mg, Espectinomicina 34.3 mg, Lincomicina 17.2 mg) agua de extrema pureza (Quispe, 2019).

#### **2.10. Funciones del dilutor.**

Diluyentes y función Los diluyentes de semen para la criopreservación están compuestos por diferentes sustancias que cumplen las siguientes funciones: a) proveer nutrientes como fuente de energía, b) proteger a los espermatozoides del efecto dañino del enfriamiento, c) mantener un adecuado equilibrio del pH, d) mantener una adecuada presión osmótica y balance electrolítico, e) inhibir el crecimiento bacteriano, f) incrementar el volumen del semen para que pueda ser usado para múltiples inseminaciones y g) proteger a los espermatozoides durante el congelamiento (Háñez, 2000).

La mayoría de los diluyentes recomendados para la conservación del semen ovino son hipertónicos con respecto al plasma seminal (Watson, 1979; Fiser *et al.* 1981; Fiser *et al.*, 1989). Estos diluyentes producen menos lesiones que los isotónicos (Mann, 1964), ya que inducen mayor deshidratación de la célula y en consecuencia reducen el volumen de agua intracelular y por tanto el hielo formado durante la congelación (Watson, 1979). Las tasas de supervivencia espermática post descongelación son superiores a las que se obtienen con medios isotónicos (Fiser *et al.* 1981).

De acuerdo a las funciones los dilutores han sido básicamente las mismas: aumentar el volumen de eyaculado y preservar la viabilidad de los espermatozoides para preservar la viabilidad del espermatozoide el extensor debe cumplir con los siguientes requerimientos:

- ✓ Aportar nutrientes para mantener el metabolismo celular de la célula espermática.
- ✓ Estabilizar la membrana celular
- ✓ Controlar el pH del medio
- ✓ Controlar la presión osmótica
- ✓ Inhibir el desarrollo microbiano.

#### **2.10.1. Aporte de nutrientes.**

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 son 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 tripalosa) (Fiser *et al.* 1981).

#### **2.10.2. Estabilización de la membrana.**

Algunas sustancias en el extenso se adicionan con el fin de prevenir o retardar alteraciones no deseadas en la estructura y la Función de las membranas de los espermatozoides. Las principales sustancias utilizadas son seroalbúmina bovina.

La yema de huevo posee una fracción de lipoproteína de baja densidad. Concretamente de fosfolípidos que se han demostrado tiene un efecto crío protector del espermatozoide durante el proceso de Refrigeración y congelación descongelación. El mecanismo por el cual estos fosfolípidos protege la membrana espermática No es del todo conocido,

aunque se cree que pueden prevenir la pérdida de fosfolípidos que la misma sufre durante el choque frío (Amann, 2002).

### **2.10.3. Inhibición del crecimiento bacteriano.**

La mayoría de los casos el tejido testicular y las glándulas accesorias están libres de bacterias y por tanto la contaminación bacteriana del eyaculado se produce durante el proceso de recogida seminal. Para controlar el crecimiento de microbiano en el dilutor es necesario añadir un agente antibiótico, ya que los componentes del extensor, así como la temperatura a las que se conservan las dosis, permiten el crecimiento de la mayoría de bacterias gram negativas entre las que se incluyen *E. coli*, *Salmonella* y *Pseudomonas* (Háñez, 2000).

### **2.10.4. Parámetros de viabilidad espermática óptima para la inseminación artificial en ovinos.**

La viabilidad espermática en la producción comercial del semen ovino post descongelado debería tener un número mínimo de espermatozoides por pajueta necesario para obtener la máxima fertilidad in vivo de 15 millones, con al menos el 50% de motilidad progresiva. No obstante, las dosis seminales producidas por centros de IA exceden el número mínimo establecido de 15 millones intentando garantizar la presencia de al menos 10 millones de espermatozoides vivos y con motilidad progresiva en cada dosis seminal. Este número mínimo, para algunos sementales excepcionales probablemente, pueda ser reducido hasta 5 o 6 millones de espermatozoides vivos por dosis sin un descenso significativo en la fertilidad (Januskaukas *et al.*, 1996), pero estos individuos tendrían que ser identificados previamente a partir de ese mínimo establecido, por mucho que se incremente la concentración espermática de las dosis seminales no se va reflejar en un aumento de la fertilidad. (Amann, 2002).

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Localización del área de investigación.**

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el centro experimental de Kallutaca de la carrera de ingeniería Agronómica de la Universidad Pública de El Alto, ubicado en el municipio de Laja, provincia Los Andes.

##### **3.1.1. Ubicación Geográfica**

Geográficamente se encuentra a de 20 Km de la ciudad de El Alto, entre las coordenadas 16° 31' 27" de latitud Sur y 68° 18' 32" de longitud Oeste; a una altitud de 3.900 msnm, con un promedio de 163 días de heladas al año (Google earth, 2023).

##### **3.1.2. Material biológico**

- Tres carneros
- Semen de carneros

##### **3.1.3. Instalaciones**

- 1 galpón de cordero
- 1 sala de colección de semen
- 1 laboratorio de procesamiento de semen

##### **3.1.4. Materiales de campo**

- Cuaderno de registro
- Overol
- Bolígrafo
- Desinfectante esterilon
- Alcohol al 70 %

### **3.1.5. Material de evaluación y procesamiento de semen.**

- Dilutores leche light
- Agua bidestilada desionizada
- Jeringas desechables de 1.5 ml, 10 ml, 50 ml
- Agujas hipodérmicas de N° 18
- Papel toalla
- Guantes de látex
- Mechero de vidrio
- Caldera eléctrica
- Guardapolvo
- Gorro
- Cinta masquin
- Papel estañado
- Barbijo
- Pajillas para semen de 0.5 ml

### **3.1.6. Materiales de Laboratorio**

- I-SPERM CASA
- Guantes de látex
- Microscopio binocular
- Lámina portaobjetos y cubreobjetos
- Dilutor leche

- Dilutor Triladyl
- Yema de huevo
- Dilutor Optixcell
- Agua bidestilada desionizada
- Jeringas desechables de 1 ml
- Agujas hipodérmicas N° 18
- Mechero de vidrio
- Placa térmica
- Caldera eléctrica
- Baño maría
- Guardapolvo
- Gorro
- Barbijos

### **3.1.7. Materiales de escritorio**

- Bolígrafo
- Resaltadores
- Registro
- Cámara digital
- Laptop
- Cuaderno
- Tablero

## **3.2. Metodología**

### **3.2.1. Metodología para el objetivo 1, 2 y 3**

Para determinar la velocidad curvilínea (VCL), velocidad rectilínea (VSL) y velocidad media (VAP) de espermatozoides de carneros conservados en refrigeración del 1<sup>er</sup> al 7<sup>mo</sup> día en tres dilutores seminales, se colocaron las muestras de semen diluido en pajuelas de 0.5 ml.

Estos se refrigeraron durante 7 días, cada 24 hrs se abrieron tres pajillas para ser llevadas con el equipo ISPERM CASA y determinar la velocidad curvilínea.

Paralelamente se evaluaron las muestras de semen en microscopio para verificar la motilidad.

### **3.2.2. Procesos preliminares.**

El presente trabajo de investigación fue de tipo experimental, porque se evaluó el efecto de los dilutores seminales y los días de conservación sobre la cinética de espermatozoides de ovinos.

Los ambientes y el instrumental utilizado fueron desinfectados con hipoclorito de sodio durante el tiempo que duró el experimento. Además, se acondicionó una sala de colección de semen para evitar la contaminación de las muestras seminales.

De la misma manera, se desinfectó y adecuó el laboratorio donde se realizó la evaluación y crío conservación de semen.

#### **3.2.2.1. Periodos de ambientación de los carneros al sitio trabajo y dieta**

Se ambientaron a los carneros por un periodo de 1 mes anteriores al periodo de investigación. Los carneros fueron alimentados con ensilaje, afrecho, sales minerales y agua, para ayudar en su necesidad nutritiva.

#### **3.2.2.2. Control sanitario de los carneros**

Antes de empezar con el trabajo de campo se controló que los animales estén aparentemente sanos y con buena condición corporal.

La limpieza de los ambientes se realizó por las mañanas para evitar contaminación de las muestras. Dentro de las actividades sanitarias se desparasitó preventivamente a los carneros con Paramec Gold LA AD3.

### **3.2.2.3. Adecuación del laboratorio**

24 horas antes de la colecta de semen, se tuvieron actividades previas como el lavado, esterilización de todos los materiales y el ambiente del laboratorio, mesones, piso, paredes con abundante agua, detergente e hipoclorito de sodio manteniendo el ambiente libre de algún microorganismo que afecte al experimento, así mismo, la esterilización de porta y cubre objetos con alcohol y tratamiento térmico.

### **3.2.2.4. Adiestramiento de los carneros a colección por vagina artificial**

El adiestramiento de los carneros para la colección de semen por vagina artificial se realizó por un periodo de 30 días en las cuales los carneros se adaptaron a depositar semen en la vagina artificial, facilitando la colección de semen en fase experimental.

### **3.2.3. Fase Experimental**

- Se retiró el exceso de pelos del prepucio del carnero.
- Se hizo el lavado del prepucio con suero fisiológico (20 ml).
- Se secó el prepucio con papel secante, para tener muestras limpias y sin contaminación

#### **3.2.3.1. Colección de semen**

Se procedió a la colección de semen de los carneros, mediante vagina artificial, utilizando una hembra como señuelo sujetado en el brete para estimular a la colección.

Una vez obtenida la muestra se llevó al laboratorio de Química de Agronomía en Kallutaca donde se desarrollaron las diferentes evaluaciones.

### 3.2.3.2. Preparación del semen para su evaluación.

Una vez colectado el semen, se determinó inmediatamente el volumen y la concentración. Para la determinación del volumen se utilizó una jeringa graduada en cual se determinó esta variable.

Para determinar la concentración se utilizó el módulo concentración del I-SPERM, Para esto se preparó una dilución de 1:200 de semen que se colocó 100 microlitros ( $\mu$ l) De este preparado en el recipiente especial que se utiliza este sistema de evaluación computacional.

### 3.2.3.3. Dilución de semen

Una vez evaluado, el semen restante fue diluido en tres medios de dilución evaluados en la investigación. En una concentración final de 2.500 a 3.000 millones de espermatozoides por ml. Luego de ser diluido el semen se dejó en equilibrio al menos 8 hrs antes para su evaluación correspondiente en el equipo I- SPERM

### 3.2.3.4. Evaluación macroscópica del semen.

- a. **Volumen:** se determinó succionando el eyaculado en una jeringa de 5 ml, en cual se observó y determinó el volumen de cada eyaculado, los eyaculados tuvieron volúmenes entre 1.5 y 2 ml.
- b. **pH:** se extrajo 10  $\mu$ l de semen sin diluir del tubo colector, la muestra se puso en un portaobjetos para empapar la tira indicadora de pH por 2 minutos y luego comparar con el indicador de pH. Se encontró un valor promedio de 7.
- c. **Color:** se determinó por observación directa de vaso colector, los eyaculados presentaron color blanco cremoso.

### 3.2.3.5. Preparación de los dilutores

1. Dilutor Triladyl, se preparó en una relación 1:3 con agua destilada estéril a 37°C a baño maría (yema de huevo), para la preparación se usó un frasco estéril de 100 ml.
2. Dilutor Optixcell, fue preparado en una relación 1:2 con agua destilada estéril a 37°C, para la preparación se usó un frasco estéril de 100 ml.

3. Dilutor leche descremada (light), este fue preparado con leche sin materia grasa adicionando yema de huevo al 10 %, una temperatura de 37°C en baño maría, para la preparación se usó un frasco estéril de 100 ml.

#### **3.2.3.6. Dilución del semen de carnero**

Los eyaculados se distribuyeron en pequeños frascos los cuales fueron etiquetados con los nombres de los dilutores: Triladyl, Optixcell y Leche descremada y colocados en baño maría a 37°C.

Los eyaculados fueron diluidos en cada dilutor y homogenizado con agitaciones ligeras por 10 a 15 segundos, evitando que los espermatozoides no sufran algún daño. Para la dilución se utilizó un promedio de 2.500 a 3.000 millones de espermatozoides por/ml, y 1.250 millones de espermatozoides por pajueta.

#### **3.2.3.7. Enfriamiento del semen**

Al semen diluido a 37°C fue sometido a un periodo de descenso hasta los 5°C a una velocidad de 0.17°C/minuto en una caja termopet con hielo, para luego proceder con el empajillado.

#### **3.2.3.8. Preparación de las pajuelas y empajillado.**

- a. Preparado de las pajuelas

Las pajuelas se identificaron con marcador indeleble con un código D1 (Día 1), Dilutor (Triladyl, Optixcell, Leche), para cada dilutor.

- b. Llenado de las pajuelas con el semen diluido y sellado

El semen diluido se cargó en las pajuelas con una jeringa a la cual se modificó para facilitar el acople de las pajuelas y la succión, una vez llenadas se secaron con papel absorbente para finalmente sellarlas con plastilina.

#### **3.2.3.9. Evaluación del semen refrigerado**

Para realizar el análisis de semen se extrajo una pajueta del termopet la cual se calentó a una temperatura de 37°C, donde se utilizó tubos eppendorf la cual se puso 1 ml de suero fisiológico a 37°C y el semen diluido, las variables de interés de la investigación fueron

analizadas por el equipo I-SPERM CASA y microscopio, para ver el efecto de los de los tratamientos sobre las variables de estudio.

#### **3.2.3.9.1. Parámetros de motilidad obtenidos por software informático**

- VCL Velocidad Curvilínea ( $\mu\text{m}/\text{seg}$ ); es la distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria real por unidad de tiempo, se obtuvo a partir de la unión de los puntos donde se localiza el centro de la cabeza del espermatozoide en cada parte durante el tiempo de adquisición de la imagen.
- VSL Velocidad rectilínea ( $\mu\text{m}/\text{seg}$ ); es la distancia recorrida por el espermatozoide desde el primer punto hasta último de su trayectoria y se obtuvo a partir de la unión de los puntos durante el tiempo de adquisición de la imagen.
- VAP Velocidad Media ( $\mu\text{m}/\text{seg}$ ); es la distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria media y se obtuvo por extrapolación a partir de los que determinan la velocidad curvilínea.

#### 4. 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.

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

Dónde:

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

$u$  = Es el promedio general del experimento

$\alpha_i$  = El efecto del  $i = \text{ésimo}$  dilutor utilizado

$\beta_j$  = Es el efecto de la  $j = \text{ésimo}$  tiempo de evaluación

$\alpha\beta_{(ij)}$  = Es el efecto de la interacción del  $i = \text{ésimo}$  dilutor utilizado por el  $j = \text{ésimo}$  tiempo de evaluación.

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

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

##### 4.1. Factores de estudio

Factor A: Tiempo de evaluación (días)

$a_1$ : 24 horas

$a_6$ : 144 horas

$a_2$ : 48 horas

$a_7$ : 168 horas

$a_3$ : 72 horas

$a_4$ : 96 horas

$a_5$ : 120 horas

B = Tipo de dilutor

b<sub>1</sub>: Triladyl

b<sub>2</sub>: Optixcell

b<sub>3</sub>: Leche

#### **4.1.1. Variables de respuesta**

- a)** Velocidad curvilínea ( $\mu\text{m}/\text{seg}$ ),
- b)** Velocidad rectilínea ( $\mu\text{m}/\text{seg}$ )
- c)** Velocidad del recorrido promedio ( $\mu\text{m}/\text{seg}$ )

#### **4.1.2. Análisis estadístico**

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

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Evaluación del efecto de semen en refrigeración en 7 días en tres dilutores seminales sobre velocidad curvilínea (VCL) de espermatozoides ovinos (*Ovis aries*) en el Centro Experimental Kallutaca – La Paz- El Alto.

#### 5.1.1. Análisis de velocidad curvilínea (VCL), de espermatozoides de carnero

La evaluación de la velocidad rectilínea (VCL) de los espermatozoides, se realizó mediante el equipo I-SPERM. Para determinar la diferencia entre día y dilutor se desarrolló el análisis de varianza de los datos encontrados para estas variables para su mejor interpretación. Los datos de velocidad curvilínea (VCL) se muestran en la siguiente tabla.

**Cuadro 3. Análisis de varianza de velocidad curvilínea (VCL) espermática, a efectos de día y dilutor seminales de carnero del UPEA- Kallutaca**

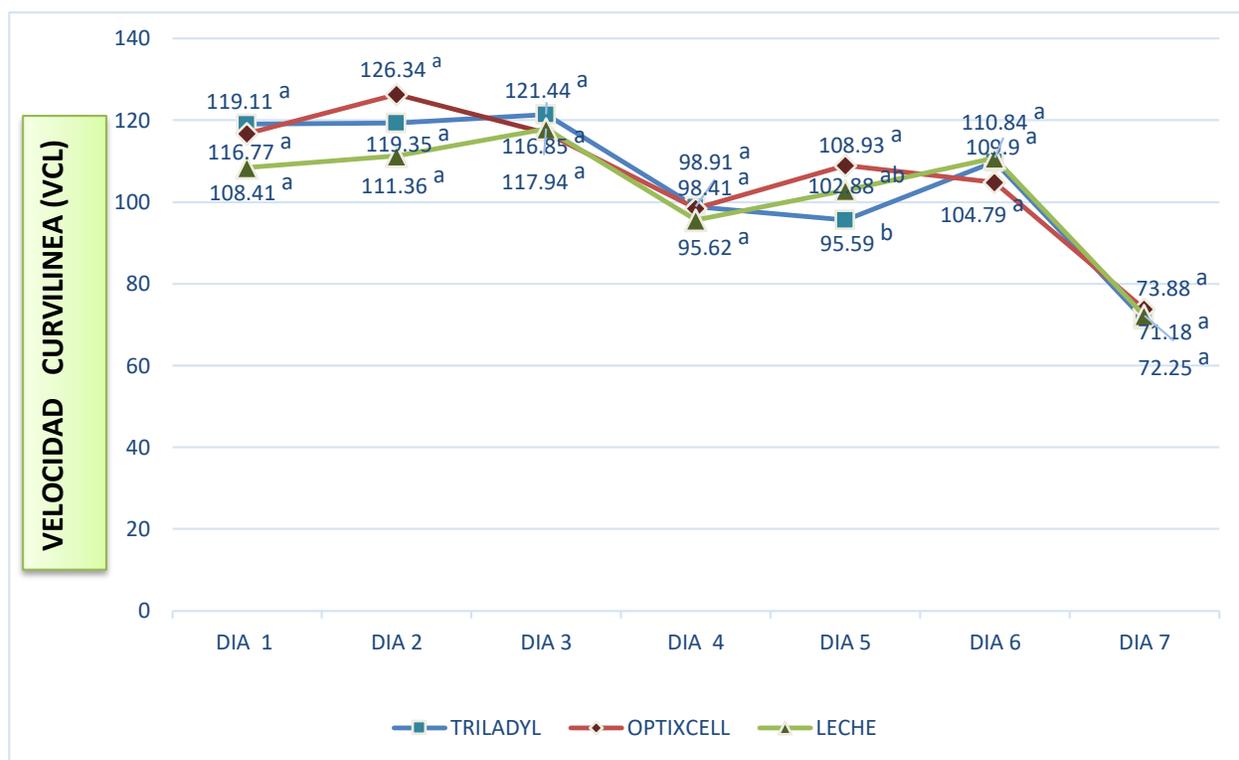
| Fuente de Variación | suma de cuadrados | Grados de libertad | Cuadrado medio | F Calculado | p-valor   |
|---------------------|-------------------|--------------------|----------------|-------------|-----------|
| Día                 | 48415,40          | 6                  | 8069,23        | 49,86       | <0,0001 * |
| Dilutor             | 515,94            | 2                  | 257,97         | 1,59        | 0,2058 NS |
| Día* Dilutor        | 2559,98           | 12                 | 213,33         | 1,32        | 0,2109 NS |
| Error               | 30589,03          | 189                | 161,85         |             |           |
| Total               | 82080,34          | 209                |                |             |           |
| CV                  | 12,14             |                    |                |             |           |

El análisis de varianza indica que existen diferencias estadísticas en la velocidad curvilínea (VCL) de espermatozoides a efecto de días de evaluación ( $p=0.0001$ ). Así mismo, indica que no existen diferencias estadísticas en la velocidad curvilínea de espermatozoides a efecto de los dilutores ( $p=0.2058$ ). No existe evidencia estadística para asumir interacción entre factores día por dilutor ( $p=0.2109$ ). El coeficiente de

variación fue de 14.14 %, los que indica que los datos colectados y analizados son confiables.

Para entender a profundidad esta cinética se desarrolló un análisis de tukey y los datos obtenidos se graficaron en la siguiente.

**Figura 5. Evaluación de la velocidad curvilínea (VCL) para los tres tratamientos en los 7 días**



En la gráfica se puede ver la influencia de los dilutores en velocidad curvilínea (VCL) en los espermatozoides de carnero, si observamos la gráfica se ve que Triladyl (121.44 µm/sec), Optixcell (116,85 µm/sec), Leche (117,94 µm/sec) mantienen casi constante su VCL hasta el tercer día, el cuarto día es en donde bajan rotundamente y afecta su velocidad reduciendo hasta los (98,91 µm/sec) en Triladyl, (98,41 µm/sec) para Optixcell, y Leche (95,62 µm/sec), para los 3 últimos días seguidos no recuperan su velocidad rectilínea siendo así que Triladyl llega (71,18 µm/sec) en su velocidad, Optixcell (73,88 µm/sec) y Leche (72,25 µm/sec) donde llegan a bajar un 50 % su velocidad el 7<sup>mo</sup> día.

Sabiendo que el Triladyl tiene como componente la yema de huevo que tiene componentes orgánicos naturales que posibilitan una mejor estabilidad del espermatozoide, otra proteína como la albumina ayuda a proteger la membrana celular de los espermatozoides que estabiliza su estructura reduciendo su daño al frío a cuál ayuda a tener una buena velocidad curvilínea.

Optixcell ayuda a mantener la viabilidad (la capacidad de los espermatozoides para sobrevivir y pueda mantener sus funciones reproductivas después de la eyaculación) de los espermatozoides durante su almacenamiento en frío la cual ayuda a la velocidad rectilínea (VCL), otro componente del dilutor Optixcell como lecitina ayuda al VCL a la estabilidad de la membrana celular y proteger del estrés osmótico, la sacarosa proporciona energía al espermatozoide y ayuda a prevenir el daño por refrigeración. La cual estos componentes ayudan a mantener en una buena refrigeración.

Esto es debido a que el dilutor leche descremada (sin grasa) esto ayuda a tener una VCL adecuada, mientras que en los dilutores sintéticos como Andromed, Bioxcell, Equivell o estabilizantes como hepes o como el tris hace que el pH y otros componentes se equilibren y se mantengan constantes durante el proceso de refrigeración.

Hafez (2002) indica que el factor dilutor utilizado, influyó la VCL de los espermatozoides. Se observan los datos, se ve que Optixcell mantiene una elevada velocidad (145.56  $\mu\text{m}/\text{seg}$ ), comparada a Triladyl (135.77  $\mu\text{m}/\text{seg}$ ). Este dato es importante pues indica que Optixcell mantiene la homeostasis celular de los espermatozoides de carnero, controlando su nutrición y el incremento de factores dañinos como el pH.

García (2014) menciona que, en su experimento el detrimento de la motilidad se evidencia fehacientemente cuando en las VCL hubo una disminución de al menos 12% por cada tratamiento recién colectado vs. refrigerado vs. descongelado, y en algunos casos el decremento fue hasta de un 20% (recién colectado vs. refrigerado), lo que demuestra el “estrés por frío” en las muestras cuando son pasadas de 38 °C a la temperatura de estabilización (5 °C por un mínimo de 2 horas). Algunos especialistas en congelación de semen ovino sugieren adoptar una estabilización a 5°C por mayor tiempo (4 horas) que permita una mejor adaptación de las membranas espermáticas al cambio de estado durante la criopreservación, en contraparte otros estudios demuestran que para esta especie una estabilización entre una 1 a 2 horas es suficiente para lograr este fin (Vera-

Muñoz, 2008; Valdez, 2013; Vargas, 2015). Inclusive, trabajando con mini pajuelas de 0,25 ml (Anel et al., 2003).

Dacheux (2001) menciona que el proceso de criopreservación afecto a casi un 50% de los espermios rápidos progresivos de las muestras seminales, bajo las condiciones de este estudio. Similar caso, para los categorizados como únicamente rápidos por el CASA, donde hay una reducción de 33,78%. La velocidad curvilínea (VCL) son los parámetros con mayor afectación por el crioprocesado cuando los espermatozoides de ovinos no son lavados y apartados del plasma seminal. García (2014) menciona que, en el caso del morueco, contienen ingentes cantidades de una proteína de plasma seminal de 66 kD dependiente de andrógenos e involucrada en la adquisición de la capacidad de unión con la ZP3 proteína que se puede encontrar en la zona palúdica del ovulo de todos los mamíferos, esta rodea al ovulo la cual es importante para la fertilización.

Robayo *et al* (2008) *Srivastava et al* (2017) Indica que La velocidad rectilínea (VCL) marca la trayectoria que desarrollan los espermatozoides de forma natural y está influenciada por factores externos a los espermatozoides, tales como la presión osmótica, pH, temperatura. Lo cierto es que mientras más errático sea el movimiento, menor probabilidad de fertilización habrá, pues el movimiento de desplazamiento que no presenta un patrón definido, se da en espermatozoides con algún problema como ser edad, hiperactivación, o daño a nivel de membrana celular. Claro que se debería llegar a un parámetro alto para inferir estos problemas en el espermatozoide. En otras especies como humanos, porcinos, caprinos y equinos, los espermias que llegan a superar 200  $\mu\text{m}/\text{seg}$  muestran estos problemas.

Según Delgado (2005) Indica que los valores de la velocidad curvilínea (VCL) llegan hasta 150  $\mu\text{m}/\text{seg}$  en la raza Corriedale. Esto indica tal vez su inherente diferencia gracias a la raza, pero no indicaría daño de los espermatozoides, aun que debería hacerse pruebas paralelas de integridad y funcionalidad espermática, para saber concretamente si el esperma tiene algún daño.

Sabiendo que el Triladyl tiene como componente la yema de huevo que tiene componentes orgánicos naturales que posibilitan una mejor estabilidad del espermatozoide, otra proteína como la albumina ayuda a proteger la membrana celular de

los espermatozoides que estabiliza su estructura reduciendo su daño al frío a cuál ayuda a tener una buena velocidad curvilínea (VCL).

Optixcell ayuda a mantener la viabilidad de los espermatozoides durante su almacenamiento en frío la cual ayuda a la velocidad curvilínea (VCL), otro componente del dilutor Optixcell como la proteína albumina ayuda al VCL a la estabilidad de la membrana celular y proteger del estrés osmótico, la sacarosa proporciona energía al espermatozoide y ayuda a prevenir el daño por congelación. La cual estos componentes ayudan a mantener en una buena refrigeración.

Por otro lado, la leche también contribuye con componentes proteicos la que ayuda al desdoblamiento de la lactosa a glucosa y galactosa que ayuda a los espermatozoides a utilizar como fuente de energía, también puede actuar como amortiguador contra los cambios de pH y como agente quelante contra algunos metales pesados la cual también protege a los espermatozoides durante la reducción de la temperatura en el almacenamiento la cual ayudaría a que la VCL se mantendría constante hasta ciertos días.

Esto es debido a que el dilutor leche son naturales esto no ayudan a tener una velocidad curvilínea (VCL) adecuada, mientras que en los dilutores sintéticos como lecitina de soya o la lecitina sintética o estabilizantes como hepes o como el tris hace que el pH y otros componentes se equilibren y se mantengan constantes durante el proceso de refrigeración

Al parecer la temperatura 5°C afecta a la velocidad curvilínea (VCL) en la membrana celular haciendo que el metabolismo reduzca y no gaste ni la energía ni los nutrientes que poseen los dilutores esto puede haber sucedido con los dilutores utilizados, por esta razón los espermatozoides lograron sobrevivir adecuadamente durante los 7 días sin bajar su velocidad más del 50 %.

La membrana celular se encuentra saturada de lipoproteínas como la lecitina, ayuda a los espermatozoides a reducir el metabolismo de las mitocondrias y estas no gastan energía que rodea al espermatozoide, los dilutores Optixcell y Triladyl tienen la cantidad adecuada de lecitina, pero no la leche por lo cual los espermatozoides pueden reaccionar negativamente a esta deficiencia bajando radicalmente su velocidad curvilínea (VCL) y afectando a los EPZ

## 5.2. Evaluación del efecto de semen en refrigeración en 7 días en tres dilutores seminales sobre velocidad rectilínea (VSL) de espermatozoides ovinos (*Ovis aries*) en el Centro Experimental Kallutaca – La Paz- El Alto

### 5.2.1 Análisis de velocidad rectilínea (VSL), de espermatozoides de carnero

La evaluación de la velocidad rectilínea (VSL) de los espermatozoides, también se realizó mediante el equipo I-SPERM. Para determinar la diferencia entre día y dilutor se desarrolló el análisis de varianza de los datos encontrados para estas variables para su mejor interpretación. Lo datos de rectilínea (VSL) se muestran en la siguiente tabla.

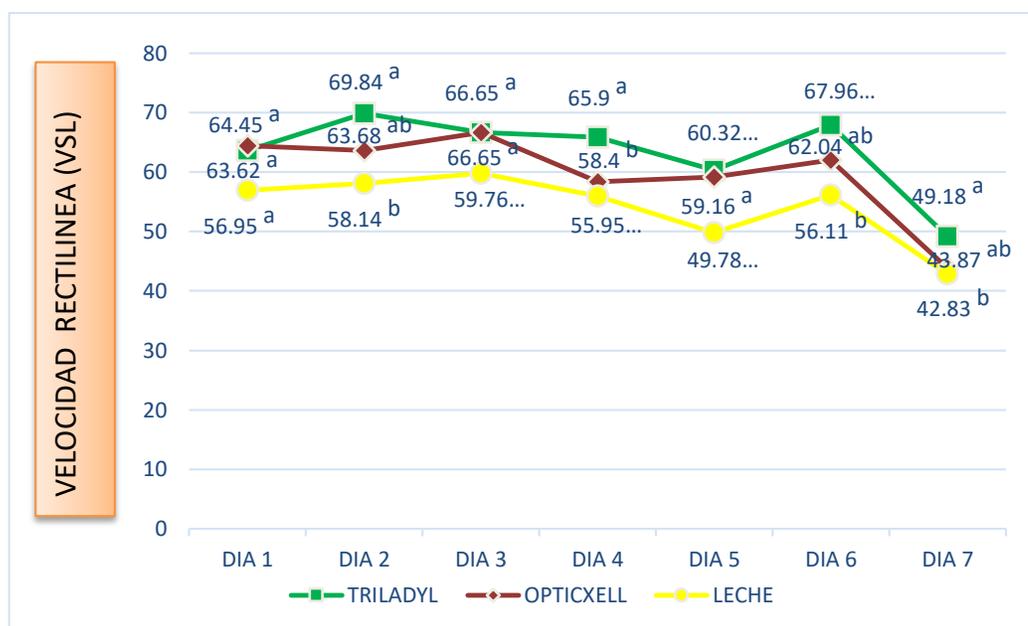
**Cuadro 4. Análisis de varianza de velocidad rectilínea (VSL) espermática, a efectos de día y dilutor seminales de carnero del UPEA- Kallutaca**

| Fuente de Variación | suma de cuadrados | Grados de libertad | Cuadrado medio | F Calculado | p-valor   |
|---------------------|-------------------|--------------------|----------------|-------------|-----------|
| Día                 | 7883,09           | 6                  | 1313,85        | 35,76       | <0,0001 * |
| Dilutor             | 2921,54           | 2                  | 1460,77        | 39,76       | <0,0001 * |
| Día *Dilutor        | 536,14            | 12                 | 44,68          | 1,22        | 0,2745 NS |
| Error               | 6944,50           | 189                | 36,74          |             |           |
| Total               | 18285,26          | 209                |                |             |           |
| CV                  | 10,26             |                    |                |             |           |

El análisis de varianza indica que existen diferencias estadísticas en la velocidad rectilínea (VSL) de espermatozoides a efecto de días de evaluación ( $pr=0.0001$ ). Así mismo, indica que existen diferencias estadísticas en la velocidad rectilínea de espermatozoides a efecto de los dilutores ( $pr=0.0001$ ). No existe evidencia estadística para asumir interacción entre factores día por dilutor ( $pr=0.2745$ ). El coeficiente de variación fue de 10.26 %, los que indica que los datos colectados y analizados son confiables.

Para entender a profundidad esta cinética se desarrolló un análisis de tukey y lo datos obtenidos se graficaron en la siguiente grafico de líneas.

**Figura 6. Evaluación de la velocidad rectilínea (VSL) para los tres tratamientos en los 7 días**



En el siguiente gráfico desarrollado para velocidad rectilínea (VSL) se observa que tanto Triladyl (63,62µm/seg), Optixcell (64,45 µm/seg) y Leche (56,95 µm/seg) se mantiene constantes hasta el 4<sup>to</sup> día, después tuvo una baja en su velocidad: Triladyl (60,32 µm/s), Optixcell (59,16µm/seg) y Leche (49,78 µm/seg). La cual el 6<sup>to</sup> día hay una subida de velocidades Triladyl (67,96 µm/s), Optixcell (62,04 µm/seg) y leche (56,11 µm/seg) esto es debido al manejo de las pajuelas o algún otro factor que pudo haber hecho que el 6<sup>to</sup> día suba su velocidad, el 7<sup>mo</sup> día baja brusca de la velocidad ya que Triladyl (49,18 µm/seg), Optixcell (43,87 µm/seg) y leche (42,83 µm/s), pueda ser que algún dilutor afecta a la velocidad de los espermatozoides.

Manjunath *et al* (2002) ha descrito que el proceso de congelación - descongelación tiene un efecto negativo en la integridad y la funcionalidad de la membrana espermática. Esta membrana es fundamental para el metabolismo espermático y para que el espermatozoide lleve a cabo varios procesos involucrados en la fecundación.

Por su parte, Barrios *et al* (2000), describió, en ovinos, que la adición del conjunto de proteínas del PS (proteína de la seminogelasa esta se encuentra en el semen de los mamíferos, esta ayuda a coagular el semen después del eyaculado, ayuda regular su motilidad espermática para la fertilidad, esta proteína ayuda también de la protección de enzimas que puedan atacar a los espermatozoides las cuales puedan encontrarse en el tracto reproductor de la hembra ), tiene un efecto de recuperación de la viabilidad (con proteínas de 14 y 20 kilodaltons "kDa"), y que la adición de fracciones de PS, que contienen proteínas con pesos moleculares superiores a 60 kDa, no tiene mayor efecto en la recuperación de la viabilidad del semen ovino.

Ordoñez (2012) Indica que la velocidad rectilínea (VSL) en semen fresco de alpaca evaluado con el equipo ISSAC reportó un  $11.5 \pm 2.2 \mu\text{m/s}$ ,  $11.3 \pm 2.4 \mu\text{m/s}$  y  $23.9 \pm 3.5 \mu\text{m/s}$ , son menores con valores promedio  $38.2 \pm 13.4 \mu\text{m/s}$ , con respecto al semen de zorro con promedio  $52.5 \pm 42.2 \mu\text{m/s}$ , la discrepancia que existe entre resultados se debe a que la velocidad de los EPZ que no tuvieron un desplazamiento extenso en su trayectoria, en cambio también se observa que existe una baja actividad espermática.

Según Tejerina (2018) La velocidad rectilínea (VSL) con cafeína  $71.6 \pm 12.9 \mu\text{m/s}$ , sin cafeína  $91.9 \pm 11.1 \mu\text{m/s}$ , estos datos fueron evaluados en semen de verraco para lo cual se trabajó con una docena de verracos.

Para Apaza (2020) Los datos obtenidos en su investigación de la velocidad rectilínea (VSL) en semen criopreservado de alpaca fueron, 7.0, 3.4 y 3.4  $\mu\text{m/s}$ , debido a la influencia de los diluyentes la disminución de la motilidad espermática es notable, la función que cumplen los diluyentes o crioprotectores es sustituir y extraer el agua del citoplasma y así evitar que durante la criopreservación formen cristales de hielo en el interior de la célula, si no se realiza la deshidratación adecuada de los EPZ puede producir daños irreversibles al momento de la criopreservación.

Uno de sus componentes de Optixcell como el DMSO (dimetilsulfóxido) ayuda a la formación de cristales de hielo que puedan dañar las células, también tiene antibióticos como: aminoglucósido, beta-lactemico, aminoglucosido, cefalotina, que ayuda a la prevención del crecimiento de microorganismos y bacterias grampositivas y gramnegativas durante el almacenamiento en pajuelas, la cual ayuda a mantener la calidad del semen y una velocidad rectilínea (VSL) adecuada.

El dilutor Triladyl tiene un componente importante llamado Buffer (tampón) que ayuda al espermatozoide a mantener su pH óptimo la cual es muy esencial para la función celular de espermatozoide en su VSL, otro componente como el glicerol ayuda como crioprotector la cual cumple la función de reducir la formación de cristales de hielo al interior de las células lo que puede dañar la estructura celular en el proceso de refrigeración.

Uno de los componentes de la leche que perjudican a la VSL es la grasa ya que pueden alterar su viscosidad y el pH que no es óptimo que no es bueno para la conservación y criopreservación de los espermatozoides la cual afectaría su motilidad y viabilidad del esperma en refrigeración la cual muestran datos bajos con respecto al dilutor leche.

### 5.3. Evaluación del efecto de semen en refrigeración en 7 días en tres dilutores seminales sobre velocidad media (VAP) de espermatozoides ovinos (*Ovis aries*) en el Centro Experimental Kallutaca – La Paz- El Alto

#### 5.3.1. Análisis de velocidad media (VAP), de espermatozoides de carnero

La evaluación de la velocidad media (VAP) de los espermatozoides, también se realizó mediante el equipo I-SPERM. Para determinar la diferencia entre día y dilutor se desarrolló el análisis de varianza de los datos encontrados para estas variables para su mejor interpretación. Los datos de velocidad media (VAP) se muestran en la siguiente tabla.

**Cuadro 5. Análisis de varianza de velocidad media (VAP) espermática, a efectos de día y dilutor seminales de carnero del UPEA- Kallutaca.**

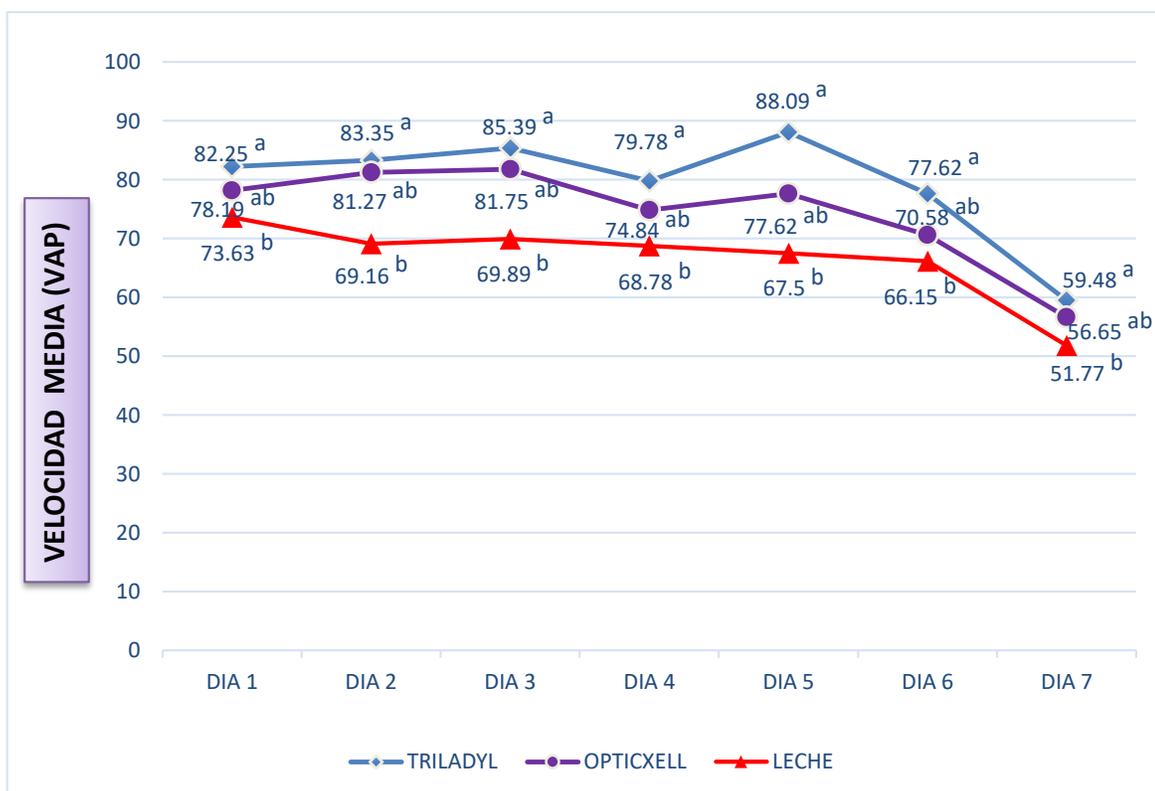
| Fuente de Variación | suma de cuadrados | Grados de libertad | Cuadrado medio | F Calculado | p-valor   |
|---------------------|-------------------|--------------------|----------------|-------------|-----------|
| Día                 | 11682,00          | 6                  | 1947,00        | 39,83       | <0,0001 * |
| Dilutor             | 5093,14           | 2                  | 2546,57        | 52,09       | <0,0001 * |
| Día * Dilutor       | 469,53            | 12                 | 39,13          | 0,80        | 0,6498 NS |
| Error               | 9239,95           | 189                | 48,89          |             |           |
| Total               | 26484,62          | 209                |                |             |           |
| CV                  | 9,54              |                    |                |             |           |

El análisis de varianza indica que existen diferencias estadísticas en la velocidad media (VAP) de espermatozoides a efecto de días de evaluación ( $p=0.0001$ ). Así mismo, indica que existen diferencias estadísticas en la velocidad media de espermatozoides a efecto de los dilutores ( $p=0.0001$ ). No existe evidencia estadística para asumir interacción entre factores día por dilutor ( $p=0.6498$ ). El coeficiente de variación fue de 10.26 %, lo que indica que los datos colectados y analizados son confiables.

Recordemos que la velocidad media (VAP) es un indicador de velocidad promedio de los espermias y nos ayuda a ver cuan veloz son

Para saber cuál dilutor influyo más sobre el VAP se desarrolló un análisis de tukey y los resultados fueron graficas en a la siguiente figura.

**Figura 7. Evaluación de la velocidad media (VAP) para los tres tratamientos en los 7 días.**



En la siguiente gráfico de líneas muestra que la velocidad media (VAP) Triladyl (82,25 µm/s) y Optixcell (78,19 µm/s) su velocidad es constante hasta el 3 día, el 4 día la velocidad media baja Triladyl (70,78 µm/s), Optixcell (74,84 µm/s) el día 5 suben su velocidad esto puede ser debido al manejo de las pajuelas la cual afectaría a suba este día, de la misma manera puede ser a los dilutores afectan a lo EPZ el día 6 y 7 tienen una baja considerable en velocidad media dando como resultado Triladyl (59,48 µm/s), Optixcell (56,65 µm/s). El dilutor leche baja de su velocidad media desde el segundo día (69,16 µm/s), desde el 3<sup>er</sup> día al 6<sup>to</sup> su velocidad media permanece casi constantes, Leche (69,89 µm/s), Leche (68,78 µm/s), Leche (65,5 µm/s), Leche (66, 15 µm/s), para el 7<sup>mo</sup> día

la velocidad media tiene una baja de consideración en el dilutor Leche (51,77  $\mu\text{m/s}$ ) dando que la velocidad media bajo a 30 %.

Yucra (2013), reportó que la velocidad media (VAP) es de 28.69  $\mu\text{m/s}$ , en cuyes domésticos y utilizó el mismo equipo de evaluación el ISAS; son inferiores a los reportados por Cooper *et al.*, (2000) y Adamkovicova *et al* (2016), quienes realizaron la evaluación en cuyes salvajes y en ratas, colectaron los espermatozoides por el método post mortem y fueron evaluados con el equipo (Computerized Sperm Motion Analysis). Las diferencias se deberían al efecto del animal, el método de colecta, la especie y el equipo.

Cooper *et al.*, (2000), recomiendan calentar la leche previamente a temperaturas superiores a los 70°C durante 15 min ya que presenta una proteína llamada lactenina que es toxica para los espermatozoides, la cual afectaría a la velocidad media (VAP) de los espermatozoides bajando radicalmente, por la cual es muy recomendable calentar la leche para que inactiva a la proteína lactenina.

La Leche posee viscosidad alta lo que provoca que la velocidad media disminuya, la leche no tiene protectores específicos como en Optixcell y Triladyl ya que esos ayudan al estrés osmótico y la oxidación. El dilutor Leche presenta los valores más bajos comparados a los dilutores comerciales, que le estaría afectando a la velocidad media (VAP) de los espermatozoides.

Otro factor que influye a la conservación de los espermatozoides con respecto a la velocidad media (VAP) es la lactosa de la leche, que disminuye la motilidad, viscosidad de los espermatozoides, por la cual es mejor utilizar dilutores sintéticos para la refrigeración de los espermatozoides.

Optixcell posee un competente sintético que tiene lecitina que ayuda a la estabilidad de la membrana celular y al estrés osmótico ya que esto ayudara a reducir el estrés que pasa los espermatozoides. Este dilutor también proporciona energía y ayuda a prevenir daño por congelación porque contiene sacarosa estas cualidades mantendrían adecuada la velocidad media (VAP) de los espermatozoides.

Triladyl es un dilutor muy bueno ya que contiene lecitina de soya la cual es un fosfolípido que ayuda mantener una buena integridad de la membrana celular de los

espermatozoides, este es uno de los mejores componentes que se han encontrado la cual al parecer ayuda a la supervivencia de los espermatozoides la cual ayudaría tener una buena velocidad media (VAP), otro de los componentes que ayudan a los espermatozoides en la velocidad media (VAP) son las sales la cual ayuda a mantener el equilibrio osmótico adecuado que ayuda a prevenir la lisis celular o membrana celular ayudando a que no se rompa una célula la cual afecta a la viabilidad y la fertilidad de los espermatozoides, este dilutor también contiene sacarosa la cual proporciona energía a los espermatozoides.

## 6. CONCLUSIONES

- La velocidad curvilínea (VCL) fue mantenida con similar valor en los tres dilutores seminales Triladyl, Optixcell y Leche dando resultados muy favorables en la investigación esto fue hasta el 5<sup>to</sup> día, los últimos días fueron bajando su velocidad rectilínea hasta un 50%.
- La velocidad rectilínea (VSL) de los EPZ fue mantenida adecuadamente por los dilutores de Triladyl, Optixcell hasta el 5<sup>to</sup> día de evaluación los demás días la velocidad rectilínea fue bajando hasta el 7<sup>mo</sup> día, la leche manteniendo su velocidad constante hasta el 4<sup>to</sup> día, sin embargo, la leche no mantuvo muy homogéneamente la velocidad rectilínea (VSL) de los espermatozoides.
- La velocidad media (VAP) no es afecta por los dilutores seminales Triladyl y Optixcell la cual dan buenos resultados hasta el 4<sup>to</sup> día manteniendo una conservación de los espermatozoides estables y con buena velocidad media, la que afectó a la velocidad media fue el dilutor leche dando bajas desde su primer día de evaluación.
- Los espermatozoides mantienen valores adecuados de velocidad curvilínea (VCL), velocidad rectilínea (VSL), velocidad media (VAP) ayudándonos a suponer y predecir que estos tienen una adecuada capacidad fecundante de los espermatozoides, y puedan llegar a utilizarse para inseminación artificial, estos dilutores seminales como el Triladyl, Optixcell son buenas manteniendo una buena cinética de los espermatozoides la cual estos serían buenos para refrigerarse semen de carnero, por otro lado la leche no daría una buena cinética de los espermatozoides.

## 7. RECOMENDACIONES

- Es importante realizar una evaluación en diferentes temperaturas de refrigeración para conocer el efecto que causaría en la cinética del semen de ovino.
- Determinar la sobrevivencia de espermatozoides en tracto reproductor y comparar su velocidad media (VAP) en los espermatozoides en esta región.
- Evaluar los espermatozoides en dilutores Triladyl, Optixcell y Leche cada 12 horas para ver hasta qué hora y día exactamente subirían o bajarían su velocidad curvilínea (VCL), velocidad rectilínea (VSL), velocidad media (VAP).
- sería bueno valorar, comparar con otros tipos de dilutores seminales comerciales para ver la eficacia que tendrían diferenciar en el semen refrigerado por 7 días.
- Es importante hacer una investigación utilizando antioxidantes y componentes protectores al dilutor leche en la refrigeración de los espermatozoides de carnero evaluando así la cinética de ellos en 7 días.
- Hacer un estudio de la morfología de los espermatozoides desde la colecta de semen, dilución y refrigeración del semen de ovino, viendo si esto afectaría a la cinética.
- Hacer una investigación de criopreservación del semen de ovino en tres dilutores seminales: Triladyl, Optixcell y Leche y evaluar la cinética cada 24 horas por 7 días

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amann RP, H. R. (2002). Detection of differences in Fertility.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2004) *Biología molecular de la célula*

ABS (Ed.). (1986). *Manual de inseminacion artificial* (2a ed.). ABS.

Agraz, A. (1989). *Caprinotecnia* (2da Edición). Editorial Limusa S.A.

Andrade castro & palma andrade, (2020). *efecto de dos diluyentes y tiempo de permanencia sobre la viabilidad del semen de bovinos mestizos lecheros.*

Ávalos, R, A., Gonzales, J., Vargas, A., & Herrera, J. (2018). *Recolección y manipulación seminal in vitro—Ceralc* (Primera). universidad autónoma metropolitana.

Barreto, X. (2022). *Evaluación de 2 curvas de congelación de semen ovino mediante inseminación artificial por laparoscopia.* [BachelorThesis, Quito : UCE]. <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/26996>.

Buzon, A. (2013). *Análisis cinético y morfométrico del espermatozoide del caballo empleando el sistema Sperm Class Analyzer.*

Castro C., (2022). *“valoración espermática de semen bovino criopreservado con tres curvas de temperatura en la hacienda la victoria del cantón bucay”* [trabajo experimental, escuela superior politécnica de chimborazo facultad de ciencias pecuarias carrera zootecnia]. pdf.

Cortez, S. (2002). *Efectos de la conservacion sobre la fisiología espermática de semen caprino. Universidad complutense de Madrid. Tesis de grado para obtener el título de Doctora en ciencias Biologicas. España.*

Chirinos, & Javier O. (2009). *“Características Seminales e Integridad de La Membrana Espermatoca Post Refrigeracion En Carneros Blackbelly y Assaf Del Banco Nacional de Semen – La Molina.”* Universidad Nacional Del Centro Del Perú.

Dacheux, F., & Dacheux, J. (2001). La reproduction chez les mammifères et l'Homme. Coordonnateurs: Charles Thibault et Marieclaire Levasseur. Ellipses Édition Marketing, S.A. INRA. Paris, France. Chapitre 14: 455-468.

Delgado P. (2005). Inseminación artificial en bovinos. s/e. La Paz, Bolivia. 68 p.

*Espermatogenesis embriología genética medicina.* (2023). uDocz. <https://www.udocz.com/apuntes/58541/espermatogenesis-embriologia-genetica-medicina>

*Espermatozoides | Cigna.* (2022). <https://www.cigna.com/es-us/knowledge-center/hw/espermatozoides-tp10397>

Etnoteca recursos zoogenéticos del Uruguay (Erzu). (2023). *Etnoteca recursos zoogenéticos del Uruguay (Erzu).* <http://arapey.unorte.edu.uy/amga/multimedia/ovinos/ondex>

Evans, G.& Maxwell, W. (1990). Inseminacion artificial de ovejas y cabras, ed acribia S.A., Zaragoza, España.

Ferreira, J., & Perez, R. (2001). *Biotécnicas de la reproducción caprina y ovina.* Editorial Fortaleza.

Foote, R. H., Brockett, C. C., & Kaproth, M. T. (2002). Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. *Animal Reproduction Science*, 71(1-2), 13-23. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(02\)00018-0](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(02)00018-0)

Foote, R. H., Chen, Y., Brockett, C. C., & Kaproth, M. T. (1993). Fertility of bull spermatozoa frozen in whole milk extender with trehalose, taurine, or blood serum. *Journal of Dairy Science*, 76(7), 1908-1913. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77524-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77524-4)

Gadea, J. (2003). *Los diluyentes de inseminación artificial porcina. Revisión.* Engormix. <https://www.engormix.com/porcicultura/articulos/los-diluyentes-inseminacion-artificial-t26019.htm>

Garcia, W. (2014). *Optimización de los protocolos de crioconservación de semen ovino de las razas autóctonas en peligro de extinción Xisqueta y Aranesa.* Autónoma de Barcelona Facultad de Veterinaria.

García, W. (2014). Efecto del factor dilutor y raza en la integridad de la membrana espermática acrosomal en semen crioconservado de carneros. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. 315.

Gonzales. (1989). *Inseminación Artificial y Reproducción Programada* (3era. Edición).

Hafez E. (2002). Reproducción e inseminación artificial en animales. 7ª ed. Edit. Interamericana. México DF. 509.

Johnson, M. H., Everitt, B., J. (2000). Biología de la reproducción. Oxford University Press.

Ledesma A, Manese J, Alberio R, Hozbor F. (2013). ¿Es posible mejorar la fertilidad del semen ovino criopreservado mediante la adición de plasma seminal? Ediciones Taurus; Taurus. 59(9): 1-10.

Morales, F. A. (2019). *Evaluación de dos protocolos de sincronización de celo en ovinos para la inseminación artificial a tiempo fijo*.

Norberto L., (2023). *Biología del desarrollo. Cuaderno de trabajo | AccessMedicina | McGraw Hill Medical*.

Núñez, A., & Rubio, A. (2015). *Comparación de la calidad biológica del semen bovino poscongelado utilizando como crioprotector leche al 2% de grasa, Andromed® y Continental® one step*.

O'Donnell, L., Robertson, M. Jones E., (2001). *Estrogen and Spermatogenesis*.

Olivera, M., Ruiz, T., Tarazona, A., & Giraldo, C. (2006). El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 19(4), 426-436.

Ortíz, E., Uría, E., Silva-Olivares, A., Tsutsumi, V., & Shibayama, M. (2003). Estudio de la ultraestructura de la espermatogénesis de *Anadara tuberculosa* (Sowerbi 1833) (Mollusca: Pelecipoda: Arcidae). *Hidrobiológica*, 13(2), 145-150.

Pérez, L., (2020). *Evaluación de dos curvas de congelación programables en la Criopreservación de semen ovino en el Centro Experimental Uyumbicho* [BachelorThesis, Quito: UCE]. <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/20635>

Quispe, S. (2019). Evaluación de tres dilutores sobre características espermáticas antes y después de la congelación de semen bovino Holstein.

Quintero, A., González, D., López, J., Esteso, M., Fernández, M. R., Carvalho, J. L., Mejía, W., & León, G. (2009). Valoración morfométrica de la cabeza del espermatozoide del cerdo doméstico según su edad. *Revista Científica*, 19(2), 153-158.

Robayo L, Montenegro V, Valdés C,. (2008). CASA assessment of kinematic parameters of ram spermatozoa and their relationship to migration efficiency in ruminant cervical mucus. *Reprod. Domestic. Anim.* 43: 393-399.

Rossi, A., (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., & Maxwell, W. M. (1995). Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science*, 37(3), 185-249. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(94\)01327-I](https://doi.org/10.1016/0378-4320(94)01327-I)

Salamon, S., & Maxwell, W. M. (2000). Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1), 77-111. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00155-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00155-X)

Santiani, A. (2012). *Uso de dos análogos de superóxido dismutasa para prevenir la desestabilización espermática prematura durante la criopreservación y vitrificación en espermatozoides de alpaca*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos Facultad de Medicina Veterinaria.

Simonetti, L., (2014). *Aspectos reproductivos de los carneros*. 1, 6.

Valdez, D. (2013). *Efecto del dodecil sulfato ionico adicionado a un diluyente libre de yema de huevo sobre la calidad del semen ovino congelado* [MasterThesis]. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/500>.

Vargas, W. (2012). Efecto de la adición de un surfactante natural (aloevera) al diluyente Triladyl para crio conservación de semen bovino en toros reproductores de agso-genes, quito-pichincha.

# ANEXOS

## 9. ANEXOS

### Anexo 1. Análisis de efectos simples VCL, VSL, VAP.

#### Análisis de la varianza

##### VCL

| F.V.            | SC       | gl  | CM     | F    | p-valor |
|-----------------|----------|-----|--------|------|---------|
| DILUTOR (DIA 1) | 632,85   | 2   | 316,43 | 1,24 | 0,3045  |
| DILUTOR (DIA 2) | 1123,87  | 2   | 561,94 | 2,61 | 0,0921  |
| DILUTOR (DIA 3) | 115,02   | 2   | 57,51  | 0,64 | 0,5368  |
| DILUTOR (DIA 4) | 62,86    | 2   | 31,43  | 0,18 | 0,8372  |
| DILUTOR (DIA 5) | 892,34   | 2   | 446,17 | 3,82 | 0,0345  |
| DILUTOR (DIA 6) | 211,99   | 2   | 106,00 | 0,59 | 0,5590  |
| DILUTOR (DIA 7) | 36,97    | 2   | 18,49  | 0,18 | 0,8351  |
| Error           | 30589,03 | 189 | 161,85 |      |         |
| Total           | 82080,34 | 209 |        |      |         |

CV 12,14

##### VAP

| F.V.            | SC      | gl | CM     | F     | p-valor |
|-----------------|---------|----|--------|-------|---------|
| DILUTOR (DIA 1) | 376,34  | 2  | 188,17 | 4,14  | 0,0270  |
| DILUTOR (DIA 2) | 1174,45 | 2  | 587,22 | 11,53 | 0,0002  |
| DILUTOR (DIA 3) | 1313,86 | 2  | 656,93 | 9,75  | 0,0006  |
| DILUTOR (DIA 4) | 607,09  | 2  | 303,55 | 8,59  | 0,0013  |
| DILUTOR (DIA 5) | 1117,54 | 2  | 558,77 | 10,64 | 0,0004  |
| DILUTOR (DIA 6) | 669,16  | 2  | 334,58 | 6,08  | 0,0066  |
| DILUTOR (DIA 7) | 304,22  | 2  | 152,11 | 4,27  | 0,0244  |

CV 9,54

##### VSL

| F.V.            | SC     | gl | CM     | F     | p-valor |
|-----------------|--------|----|--------|-------|---------|
| DILUTOR (DIA 1) | 338,09 | 2  | 169,05 | 3,41  | 0,0477  |
| DILUTOR (DIA 2) | 685,09 | 2  | 342,55 | 8,63  | 0,0013  |
| DILUTOR (DIA 3) | 294,79 | 2  | 147,39 | 6,71  | 0,0043  |
| DILUTOR (DIA 4) | 537,52 | 2  | 268,76 | 6,55  | 0,0048  |
| DILUTOR (DIA 5) | 668,07 | 2  | 334,04 | 7,82  | 0,0021  |
| DILUTOR (DIA 6) | 702,11 | 2  | 351,06 | 10,64 | 0,0004  |
| DILUTOR (DIA 7) | 232,00 | 2  | 116,00 | 3,96  | 0,0311  |

CV 10,26

##### VCL Día 1

| DIA | Variable | N  | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV    |
|-----|----------|----|----------------|-------------------|-------|
| 1   | VCL      | 30 | 0,08           | 0,02              | 13,90 |

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

| F.V.    | SC      | gl | CM     | F    | p-valor |
|---------|---------|----|--------|------|---------|
| DILUTOR | 632,85  | 2  | 316,43 | 1,24 | 0,3045  |
| Error   | 6872,52 | 27 | 254,54 |      |         |
| Total   | 7505,37 | 29 |        |      |         |

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=17,69053**

Error: 254,5377 gl: 27

| DILUTOR   | Medias    | n    | E.E. |
|-----------|-----------|------|------|
| TRILADYL  | 119,11 10 | 5,05 | A    |
| OPTIXCELL | 116,77 10 | 5,05 | A    |
| LECHE     | 108,41 10 | 5,05 | A    |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**VAP**

| DIA | Variable | N  | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV   |
|-----|----------|----|----------------|-------------------|------|
| 1   | VAP      | 30 | 0,23           | 0,18              | 8,62 |

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

| F.V.    | SC      | gl | CM     | F    | p-valor |
|---------|---------|----|--------|------|---------|
| DILUTOR | 376,34  | 2  | 188,17 | 4,14 | 0,0270  |
| Error   | 1226,68 | 27 | 45,43  |      |         |
| Total   | 1603,01 | 29 |        |      |         |

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=7,47390**

Error: 45,4324 gl: 27

| DILUTOR   | Medias   | n    | E.E. |
|-----------|----------|------|------|
| TRILADYL  | 82,25 10 | 2,13 | A    |
| OPTIXCELL | 78,79 10 | 2,13 | A B  |
| LECHE     | 73,63 10 | 2,13 | B    |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**VSL**

| DIA | Variable | N  | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV    |
|-----|----------|----|----------------|-------------------|-------|
| 1   | VSL      | 30 | 0,20           | 0,14              | 11,41 |

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

| F.V.    | SC      | gl | CM     | F    | p-valor |
|---------|---------|----|--------|------|---------|
| Modelo  | 338,09  | 2  | 169,05 | 3,41 | 0,0477  |
| DILUTOR | 338,09  | 2  | 169,05 | 3,41 | 0,0477  |
| Error   | 1337,43 | 27 | 49,53  |      |         |
| Total   | 1675,52 | 29 |        |      |         |

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=7,80401**

Error: 49,5343 gl: 27

| DILUTOR   | Medias   | n    | E.E. |
|-----------|----------|------|------|
| OPTIXCELL | 64,45 10 | 2,23 | A    |
| TRILADYL  | 63,62 10 | 2,23 | A    |

LECHE 56,95 10 2,23 A

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )*

### VCL Día 2

DIA Variable N R<sup>2</sup> R<sup>2</sup> Aj CV  
2 VCL 30 0,16 0,10 12,33

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V.    | SC      | gl | CM     | F    | p-valor |
|---------|---------|----|--------|------|---------|
| Modelo  | 1123,87 | 2  | 561,94 | 2,61 | 0,0921  |
| DILUTOR | 1123,87 | 2  | 561,94 | 2,61 | 0,0921  |
| Error   | 5815,08 | 27 | 215,37 |      |         |
| Total   | 6938,96 | 29 |        |      |         |

#### Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=16,27274

*Error: 215,3735 gl: 27*

| DILUTOR   | Medias    | n    | E.E. |
|-----------|-----------|------|------|
| OPTIXCELL | 126,34 10 | 4,64 | A    |
| TRILADYL  | 119,38 10 | 4,64 | A    |
| LECHE     | 111,36 10 | 4,64 | A    |

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )*

### VAP

DIA Variable N R<sup>2</sup> R<sup>2</sup> Aj CV  
2 VAP 30 0,46 0,42 9,16

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V.    | SC      | gl | CM     | F     | p-valor |
|---------|---------|----|--------|-------|---------|
| Modelo  | 1174,45 | 2  | 587,22 | 11,53 | 0,0002  |
| DILUTOR | 1174,45 | 2  | 587,22 | 11,53 | 0,0002  |
| Error   | 1375,59 | 27 | 50,95  |       |         |
| Total   | 2550,04 | 29 |        |       |         |

#### Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=7,91457

*Error: 50,9478 gl: 27*

| DILUTOR   | Medias   | n    | E.E. |
|-----------|----------|------|------|
| TRILADYL  | 83,35 10 | 2,26 | A    |
| OPTIXCELL | 81,27 10 | 2,26 | A    |
| LECHE     | 69,16 10 | 2,26 | B    |

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )*

### VSL

DIA Variable N R<sup>2</sup> R<sup>2</sup> Aj CV  
2 VSL 30 0,39 0,34 9,86

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|------|----|----|----|---|---------|
|------|----|----|----|---|---------|

|         |         |    |        |      |        |
|---------|---------|----|--------|------|--------|
| Modelo  | 685,09  | 2  | 342,55 | 8,63 | 0,0013 |
| DILUTOR | 685,09  | 2  | 342,55 | 8,63 | 0,0013 |
| Error   | 1071,70 | 27 | 39,69  |      |        |
| Total   | 1756,79 | 29 |        |      |        |

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=6,98587**

Error: 39,6927 gl: 27

| DILUTOR   | Medias | n  | E.E. |
|-----------|--------|----|------|
| TRILADYL  | 69,84  | 10 | 1,99 |
| OPTIXCELL | 63,68  | 10 | 1,99 |
| LECHE     | 58,14  | 10 | 1,99 |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**VCL Día 3**

| DIA | Variable | N  | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV   |
|-----|----------|----|----------------|-------------------|------|
| 3   | VCL      | 30 | 0,05           | 0,00              | 8,00 |

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

| F.V.    | SC      | gl | CM    | F    | p-valor |
|---------|---------|----|-------|------|---------|
| Modelo  | 115,02  | 2  | 57,51 | 0,64 | 0,5368  |
| DILUTOR | 115,02  | 2  | 57,51 | 0,64 | 0,5368  |
| Error   | 2439,07 | 27 | 90,34 |      |         |
| Total   | 2554,09 | 29 |       |      |         |

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=10,53890**

Error: 90,3360 gl: 27

| DILUTOR   | Medias | n  | E.E. |
|-----------|--------|----|------|
| TRILADYL  | 121,44 | 10 | 3,01 |
| LECHE     | 117,94 | 10 | 3,01 |
| OPTIXCELL | 116,85 | 10 | 3,01 |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**VAP**

| DIA | Variable | N  | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV    |
|-----|----------|----|----------------|-------------------|-------|
| 3   | VAP      | 30 | 0,42           | 0,38              | 10,39 |

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

| F.V.    | SC      | gl | CM     | F    | p-valor |
|---------|---------|----|--------|------|---------|
| Modelo  | 1313,86 | 2  | 656,93 | 9,75 | 0,0006  |
| DILUTOR | 1313,86 | 2  | 656,93 | 9,75 | 0,0006  |
| Error   | 1818,28 | 27 | 67,34  |      |         |
| Total   | 3132,15 | 29 |        |      |         |

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=9,09942**

Error: 67,3438 gl: 27

| DILUTOR  | Medias | n  | E.E. |
|----------|--------|----|------|
| TRILADYL | 85,39  | 10 | 2,60 |

|           |       |    |      |   |
|-----------|-------|----|------|---|
| OPTIXCELL | 81,75 | 10 | 2,60 | A |
| LECHE     | 69,89 | 10 | 2,60 | B |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )VSL

| DIA | Variable | N  | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV   |
|-----|----------|----|----------------|-------------------|------|
| 3   | VSL      | 30 | 0,33           | 0,28              | 7,30 |

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V.    | SC     | gl | CM     | F    | p-valor |
|---------|--------|----|--------|------|---------|
| Modelo  | 294,79 | 2  | 147,39 | 6,71 | 0,0043  |
| DILUTOR | 294,79 | 2  | 147,39 | 6,71 | 0,0043  |
| Error   | 593,03 | 27 | 21,96  |      |         |
| Total   | 887,82 | 29 |        |      |         |

#### Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=5,19664

Error: 21,9642 gl: 27

| DILUTOR   | Medias | n  | E.E. |
|-----------|--------|----|------|
| OPTIXCELL | 66,65  | 10 | 1,48 |
| TRILADYL  | 66,14  | 10 | 1,48 |
| LECHE     | 59,76  | 10 | 1,48 |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### VCL DIA 4

| DIA | Variable | N  | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV    |
|-----|----------|----|----------------|-------------------|-------|
| 4   | VCL      | 30 | 0,01           | 0,00              | 13,57 |

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V.    | SC      | gl | CM     | F    | p-valor |
|---------|---------|----|--------|------|---------|
| Modelo  | 62,86   | 2  | 31,43  | 0,18 | 0,8372  |
| DILUTOR | 62,86   | 2  | 31,43  | 0,18 | 0,8372  |
| Error   | 4743,41 | 27 | 175,68 |      |         |
| Total   | 4806,27 | 29 |        |      |         |

#### Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=14,69699

Error: 175,6820 gl: 27

| DILUTOR   | Medias | n  | E.E. |
|-----------|--------|----|------|
| TRILADYL  | 98,91  | 10 | 4,19 |
| OPTIXCELL | 98,41  | 10 | 4,19 |
| LECHE     | 95,62  | 10 | 4,19 |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### VAP

| DIA | Variable | N  | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV   |
|-----|----------|----|----------------|-------------------|------|
| 4   | VAP      | 30 | 0,39           | 0,34              | 7,98 |

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

| F.V.    | SC      | gl | CM     | F    | p-valor |
|---------|---------|----|--------|------|---------|
| Modelo  | 607,09  | 2  | 303,55 | 8,59 | 0,0013  |
| DILUTOR | 607,09  | 2  | 303,55 | 8,59 | 0,0013  |
| Error   | 953,86  | 27 | 35,33  |      |         |
| Total   | 1560,95 | 29 |        |      |         |

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=6,59059**

Error: 35,3280 gl: 27

| DILUTOR   | Medias | n  | E.E.     |
|-----------|--------|----|----------|
| TRILADYL  | 79,78  | 10 | 1,88 A   |
| OPTIXCELL | 74,84  | 10 | 1,88 A B |
| LECHE     | 68,78  | 10 | 1,88 B   |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**VSL**

| DIA | Variable | N  | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV    |
|-----|----------|----|----------------|-------------------|-------|
| 4   | VSL      | 30 | 0,33           | 0,28              | 10,66 |

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

| F.V.    | SC      | gl | CM     | F    | p-valor |
|---------|---------|----|--------|------|---------|
| Modelo  | 537,52  | 2  | 268,76 | 6,55 | 0,0048  |
| DILUTOR | 537,52  | 2  | 268,76 | 6,55 | 0,0048  |
| Error   | 1107,17 | 27 | 41,01  |      |         |
| Total   | 1644,68 | 29 |        |      |         |

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=7,10050**

Error: 41,0061 gl: 27

| DILUTOR   | Medias | n  | E.E.   |
|-----------|--------|----|--------|
| TRILADYL  | 65,90  | 10 | 2,02 A |
| OPTIXCELL | 58,40  | 10 | 2,02 B |
| LECHE     | 55,95  | 10 | 2,02 B |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**VCL DIA 5**

| DIA | Variable | N  | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV    |
|-----|----------|----|----------------|-------------------|-------|
| 5   | VCL      | 30 | 0,22           | 0,16              | 10,54 |

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

| F.V.    | SC      | gl | CM     | F    | p-valor |
|---------|---------|----|--------|------|---------|
| Modelo  | 892,34  | 2  | 446,17 | 3,82 | 0,0345  |
| DILUTOR | 892,34  | 2  | 446,17 | 3,82 | 0,0345  |
| Error   | 3151,61 | 27 | 116,73 |      |         |
| Total   | 4043,95 | 29 |        |      |         |

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=11,97978**

Error: 116,7261 gl: 27

| DILUTOR | Medias | n | E.E. |
|---------|--------|---|------|
|---------|--------|---|------|

|           |           |      |   |   |
|-----------|-----------|------|---|---|
| OPTIXCELL | 108,93 10 | 3,42 | A |   |
| LECHE     | 102,88 10 | 3,42 | A | B |
| TRILADYL  | 95,59 10  | 3,42 |   | B |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### VAP

|     |          |    |                |                   |      |
|-----|----------|----|----------------|-------------------|------|
| DIA | Variable | N  | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV   |
| 5   | VAP      | 30 | 0,44           | 0,40              | 9,57 |

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V.    | SC      | gl | CM     | F     | p-valor |
|---------|---------|----|--------|-------|---------|
| Modelo  | 1117,54 | 2  | 558,77 | 10,64 | 0,0004  |
| DILUTOR | 1117,54 | 2  | 558,77 | 10,64 | 0,0004  |
| Error   | 1417,75 | 27 | 52,51  |       |         |
| Total   | 2535,29 | 29 |        |       |         |

#### Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=8,03493

Error: 52,5091 gl: 27

|           |          |      |      |
|-----------|----------|------|------|
| DILUTOR   | Medias   | n    | E.E. |
| TRILADYL  | 82,09 10 | 2,29 | A    |
| OPTIXCELL | 77,62 10 | 2,29 | A    |
| LECHE     | 67,50 10 | 2,29 | B    |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### VSL

|     |          |    |                |                   |       |
|-----|----------|----|----------------|-------------------|-------|
| DIA | Variable | N  | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV    |
| 5   | VSL      | 30 | 0,37           | 0,32              | 11,58 |

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V.    | SC      | gl | CM     | F    | p-valor |
|---------|---------|----|--------|------|---------|
| Modelo  | 668,07  | 2  | 334,04 | 7,82 | 0,0021  |
| DILUTOR | 668,07  | 2  | 334,04 | 7,82 | 0,0021  |
| Error   | 1152,92 | 27 | 42,70  |      |         |
| Total   | 1820,99 | 29 |        |      |         |

#### Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=7,24572

Error: 42,7006 gl: 27

|           |          |      |      |
|-----------|----------|------|------|
| DILUTOR   | Medias   | n    | E.E. |
| TRILADYL  | 60,32 10 | 2,07 | A    |
| OPTIXCELL | 59,16 10 | 2,07 | A    |
| LECHE     | 49,78 10 | 2,07 | B    |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**VCL DIA 6**

| DIA | Variable | N  | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV    |
|-----|----------|----|----------------|-------------------|-------|
| 6   | VCL      | 30 | 0,04           | 0,00              | 12,31 |

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

| F.V.    | SC      | gl | CM     | F    | p-valor |
|---------|---------|----|--------|------|---------|
| Modelo  | 211,99  | 2  | 106,00 | 0,59 | 0,5590  |
| DILUTOR | 211,99  | 2  | 106,00 | 0,59 | 0,5590  |
| Error   | 4815,39 | 27 | 178,35 |      |         |
| Total   | 5027,39 | 29 |        |      |         |

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=14,80808**

Error: 178,3479 gl: 27

| DILUTOR   | Medias | n  | E.E. |
|-----------|--------|----|------|
| LECHE     | 110,84 | 10 | 4,22 |
| TRILADYL  | 109,90 | 10 | 4,22 |
| OPTIXCELL | 104,79 | 10 | 4,22 |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**VAP**

| DIA | Variable | N  | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV    |
|-----|----------|----|----------------|-------------------|-------|
| 6   | VAP      | 30 | 0,31           | 0,26              | 10,38 |

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

| F.V.    | SC      | gl | CM     | F    | p-valor |
|---------|---------|----|--------|------|---------|
| Modelo  | 669,16  | 2  | 334,58 | 6,08 | 0,0066  |
| DILUTOR | 669,16  | 2  | 334,58 | 6,08 | 0,0066  |
| Error   | 1486,50 | 27 | 55,06  |      |         |
| Total   | 2155,66 | 29 |        |      |         |

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=8,22744**

Error: 55,0554 gl: 27

| DILUTOR   | Medias | n  | E.E. |
|-----------|--------|----|------|
| TRILADYL  | 77,62  | 10 | 2,35 |
| OPTIXCELL | 70,58  | 10 | 2,35 |
| LECHE     | 66,15  | 10 | 2,35 |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**VSL**

| DIA | Variable | N  | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV   |
|-----|----------|----|----------------|-------------------|------|
| 6   | VSL      | 30 | 0,44           | 0,40              | 9,26 |

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

| F.V.    | SC     | gl | CM     | F     | p-valor |
|---------|--------|----|--------|-------|---------|
| Modelo  | 702,11 | 2  | 351,06 | 10,64 | 0,0004  |
| DILUTOR | 702,11 | 2  | 351,06 | 10,64 | 0,0004  |

|       |         |    |       |
|-------|---------|----|-------|
| Error | 890,68  | 27 | 32,99 |
| Total | 1592,79 | 29 |       |

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=6,36858**

Error: 32,9880 gl: 27

| DILUTOR   | Medias   | n    | E.E. |
|-----------|----------|------|------|
| TRILADYL  | 67,96 10 | 1,82 | A    |
| OPTIXCELL | 62,04 10 | 1,82 | A B  |
| LECHE     | 56,11 10 | 1,82 | B    |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**VCL DIA 7**

| DIA | Variable | N  | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV    |
|-----|----------|----|----------------|-------------------|-------|
| 7   | VCL      | 30 | 0,01           | 0,00              | 13,94 |

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

| F.V.    | SC      | gl | CM     | F    | p-valor |
|---------|---------|----|--------|------|---------|
| Modelo  | 36,97   | 2  | 18,49  | 0,18 | 0,8351  |
| DILUTOR | 36,97   | 2  | 18,49  | 0,18 | 0,8351  |
| Error   | 2751,94 | 27 | 101,92 |      |         |
| Total   | 2788,91 | 29 |        |      |         |

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=11,19443**

Error: 101,9236 gl: 27

| DILUTOR   | Medias   | n    | E.E. |
|-----------|----------|------|------|
| OPTIXCELL | 73,88 10 | 3,19 | A    |
| LECHE     | 72,25 10 | 3,19 | A    |
| TRILADYL  | 71,18 10 | 3,19 | A    |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**VAP**

| DIA | Variable | N  | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV    |
|-----|----------|----|----------------|-------------------|-------|
| 7   | VAP      | 30 | 0,24           | 0,18              | 10,66 |

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

| F.V.    | SC      | gl | CM     | F    | p-valor |
|---------|---------|----|--------|------|---------|
| Modelo  | 304,22  | 2  | 152,11 | 4,27 | 0,0244  |
| DILUTOR | 304,22  | 2  | 152,11 | 4,27 | 0,0244  |
| Error   | 961,30  | 27 | 35,60  |      |         |
| Total   | 1265,53 | 29 |        |      |         |

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=6,61626**

Error: 35,6038 gl: 27

| DILUTOR   | Medias   | n    | E.E. |
|-----------|----------|------|------|
| TRILADYL  | 59,48 10 | 1,89 | A    |
| OPTIXCELL | 56,65 10 | 1,89 | A B  |
| LECHE     | 51,77 10 | 1,89 | B    |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**VSL**

| DIA | Variable | N  | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV    |
|-----|----------|----|----------------|-------------------|-------|
| 7   | VSL      | 30 | 0,23           | 0,17              | 11,95 |

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

| F.V.    | SC      | gl | CM     | F    | p-valor |
|---------|---------|----|--------|------|---------|
| Modelo  | 232,00  | 2  | 116,00 | 3,96 | 0,0311  |
| DILUTOR | 232,00  | 2  | 116,00 | 3,96 | 0,0311  |
| Error   | 791,58  | 27 | 29,32  |      |         |
| Total   | 1023,58 | 29 |        |      |         |

**Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=6,00385**

Error: 29,3177 gl: 27

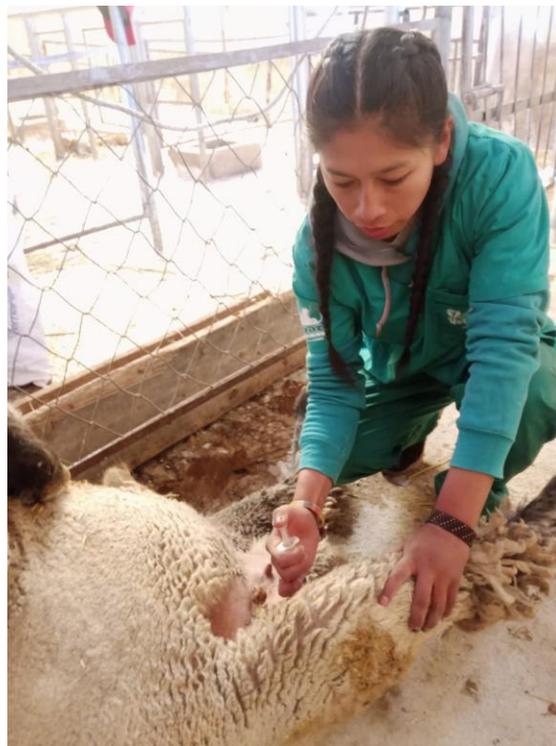
| DILUTOR   | Medias   | n    | E.E. |
|-----------|----------|------|------|
| TRILADYL  | 49,18 10 | 1,71 | A    |
| OPTIXCELL | 43,87 10 | 1,71 | A B  |
| LECHE     | 42,83 10 | 1,71 | B    |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Anexo 2. Ambientación de los carneros**



**Anexo 3. Desparasitación y aplicación de vitaminas**



**Anexo 4. Alimentación de carneros con ensilaje, afrecho, y suplemento mineral.**



**Anexo 5. Actividades previas del laboratorio**

**Anexo 6. Armado de la vagina artificial, llenado con agua a 40°C a la funda de latex para la colecta de semen**

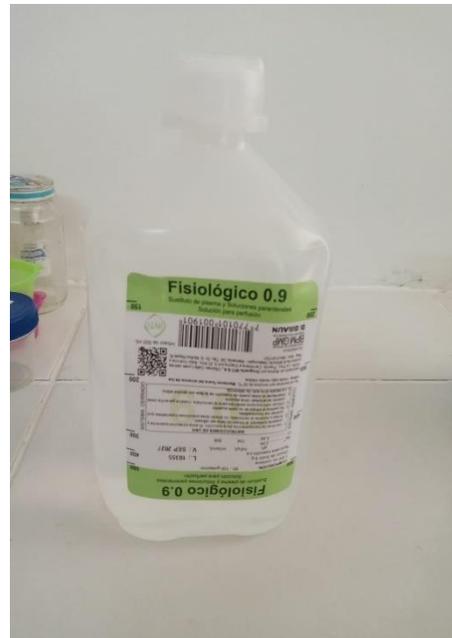
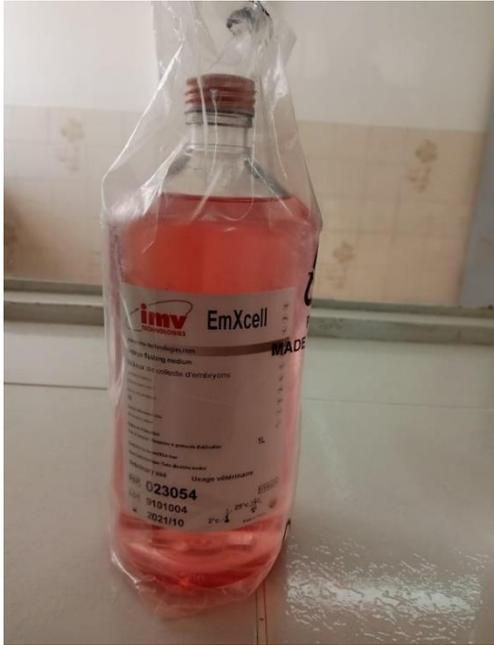


**colocado de la funda de algodón y de vaselina para la recolecta de semen**



**Anexo 7. Llevado de la hembra**

**Anexo 8. Dilutores usados en el experimento Triladyl, Optixcell, Leche Light, suero fisiológico.**



### Anexo 9. estimulación del macho con la hembra



### Recolectando del semen con vagina artificial (dando muestras del macho el golpe del riñón)



### Muestras del semen recolectado para llevar a evaluación a laboratorio



**Anexo 10. Colocado de nombre de los dilutores a los frascos para la dilución del semen**



**Semen diluido y señalado con su respectivo nombre**



### Anexo 11. Llenado de las pajuelas con el semen diluido



**Separación en diferentes recipientes las pajuelas de cada dilutor (Triladyl)**



**Pajuelas separadas y llenadas de semen diluido (leche light)**



**Anexo 12. Colocado del semen diluido de los tres dilutores en el termopet**



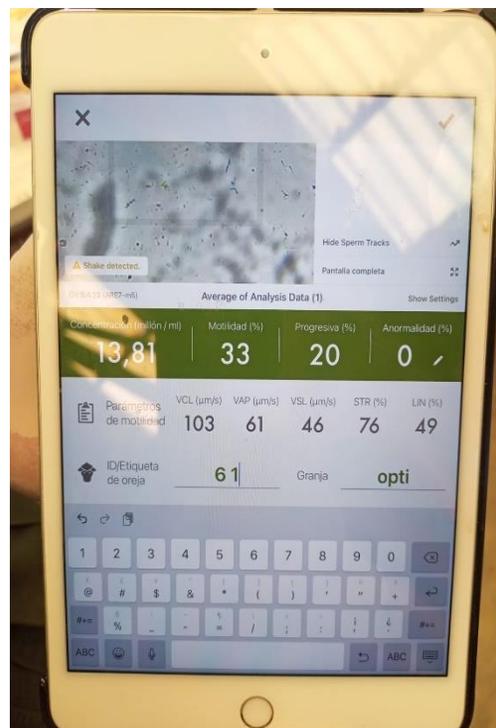
**Colocado del semen diluidos y separados en bolsas, para bajar su temperatura de 37°C a 5°C.**



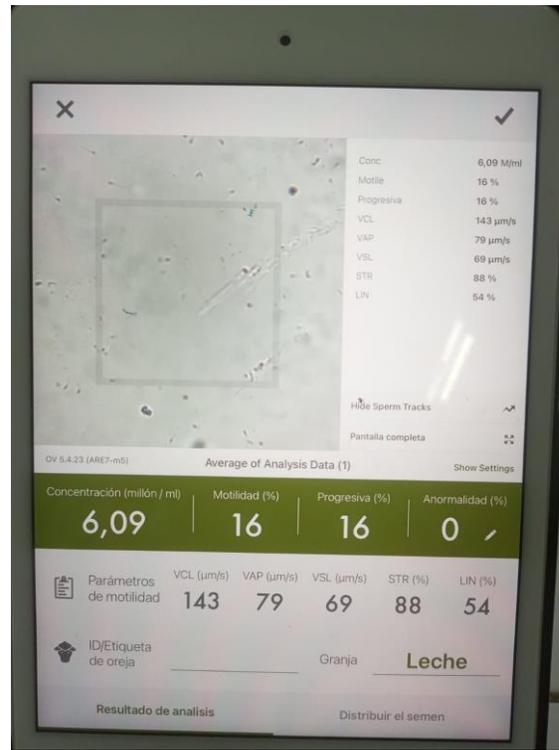
**Anexo 13. Primera evaluación de semen diluido en el I-SPERM de los tres dilutores**

**Toma de datos cada 24 horas y sacando foto a los valores mostrados**

**Fotografías tomadas a los datos obtenidos de Optixcell**



fotos sacadas de los datos obtenidos de leche



Limpieza del equipo I-SPERM una vez tomada todos los datos del día

