UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE CUENCA

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

EVALUACIÓN DE TRES DILUYENTES COMERCIALES PARA LA CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN DE CARNERO DE LA RAZA DORPER

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Médico Veterinario Zootecnista

AUTOR: MATEO ALEXANDER PIZARRO BACULIMA

TUTOR: DR. FROILÁN PATRICIO GARNICA MARQUINA, MSc.

Cuenca - Ecuador

2023

CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Mateo Alexander Pizarro Baculima con documento de identificación N° 0104999099, manifiesto que:

Soy autor y responsable del presente trabajo; y, autorizo a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Cuenca, 24 de noviembre del 2023

Atentamente,

_____

Mateo Alexander Pizarro Baculima

0104999099

CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

Yo, Mateo Alexander Pizarro Baculima con documento de identificación N° 0104999099, manifiesto mi voluntad y por medio del presente documento cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy el autor del Trabajo experimental: "Evaluación de tres diluyentes comerciales para la crioconservación de semen de carnero de la raza Dorper", el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Médico Veterinario Zootecnista en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribo este documento que hago entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 24 de noviembre del 2023

Atentamente,

_____

Mateo Alexander Pizarro Baculima

0104999099

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Froilán Patricio Garnica Marquina con documento de identificación N° 0101650299, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: EVALUACIÓN DE TRES DILUYENTES COMERCIALES PARA LA CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN DE CARNERO DE LA RAZA DORPER, realizado por Mateo Alexander Pizarro Baculima con documento de identificación N° 0104999099, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo experimental que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 24 de noviembre del 2023

Atentamente,

_____

Dr. Froilán Patricio Garnica Marquina, MSc.

0101650299

DEDICATORIA

Para mis padres y toda mi familia que ha formado parte del camino le dedico. Estoy bendecido cada día gracias a mis padres porque me guían, me apoyan, y me aconsejan en cada momento, me han permitido lograr convertirme en una persona profesional que busca el bien. Además, quiero dedicar mi tesis a mi abuelito, esta profesión me apasiona gracias a él y por ello siempre estaré agradecido.

AGRADECIMIENTO

Gracias Padre Dios, quien con su bendición alcancé y terminé esta etapa de mi vida, gracias por ser mi guía.

Gracias Elsa y Mauro por ser los padres que constantemente están conmigo para forjarme como un buen profesional, todo esfuerzo tiene su recompensa y este título también es parte del esfuerzo de ustedes. Gracias porque sus buenos valores se ven reflejados en mi la perseverancia, persistencia, motivación, empeño, responsabilidad, honestidad, justicia y amor.

Gracias también a todos los miembros de mi familia, mis hermanos Xavier y Santiago, cuñadas Jenny y Gaby, mis sobrinos Luciana, Joaquina, Victoria y Juan Francisco por estar conmigo durante estos años de vida universitaria.

Gracias a todos mis amigos, compañeros y colegas que formaron parte del proceso en esta profesión, recordar todos los buenos y malos momentos que hemos pasado, la unión y los momentos de tensión entre todos nosotros permitieron llegar hasta el final siendo feliz y agradecido por todo. Sin duda los llevaré en el corazón.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN 13

ABSTRACT 14

1. INTRODUCCIÓN 15

1.1 Problema 16

1.2 Delimitación 17

1.2.1 Temporal 17

1.2.2 Espacial 17

1.2.3 Académica 18

1.3 Explicación del problema 18

1.4 Objetivos 18

1.4.1 Objetivo general 18

1.4.2 Objetivos específicos. 18

1.5 Hipótesis 19

1.5.1 Hipótesis alternativa 19

1.5.2 Hipótesis nula 19

1.6 Fundamentos Teóricos 19

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA Y DOCUMENTACIÓN 20

2.1 Anatomía Reproductiva del Carnero 20

2.1.1 Órganos Reproductivos. 20

2.1.2 Espermatozoides 21

2.2 Fisiología Reproductiva del Carnero 22

2.2.1 Función endócrina de las funciones sexuales. 23

2.2.2. Espermatogénesis 23

2.2.3 Maduración del espermatozoide en el epidídimo. 24

2.2.4 Capacitación espermática. 24

2.2.5 Reacción acrosómica 25

2.3 Semen del carnero 26

2.3.1 Factores que influyen en la producción y calidad del semen ovino. 26

2.3.2 Eyaculación 27

2.4 Valoración de la calidad del esperma 27

2.4.1 Volumen 28

2.4.2 Color 28

2.4.3 pH 28

2.4.4 Concentración. 29

2.4.5 Motilidad 29

2.4.6 Morfología 30

2.4.7 Integridad de membrana plasmática y acrosomal. 30

2.5 Congelación del semen ovino 31

2.5.1 Consideraciones generales 31

2.5.2 Factores que afectan la viabilidad espermática en la crioconservación. 32

2.5.3 Alteraciones de espermatozoides durante la congelación y descongelación. 34

2.5.4 Procesamiento y congelación del semen del carnero. 35
2.5.5 Diluyentes para congelar semen de carnero. 36
2.5.6 AndroMed 39
2.5.7 Triladyl 39
2.5.8 Optixcell 40
2.6 Descongelación de semen ovino. 40
2.7 Valoración del esperma congelado y descongelado. 40
2.7.1 Motilidad y viabilidad 40
2.7.2 Taza de espermatozoides vivos. 41
2.8 Resumen del estado del arte del problema. 41
3. MATERIALES Y MÉTODOS 43
3.1 Materiales 43
3.1.1 Materiales físicos de campo 43
3.1.2 Material biológico de campo 43
3.1.4 Materiales de laboratorio 44
3.1.5 Materiales biológicos 44
3.1.6 Materiales de oficina 45
3.2 Metodología 45
3.2.1 Método 45
3.2.2 Población y tamaño de muestra 45
3.2.3 Procedimiento 45

3.3 Operacionalización de variables. 48

3.4 Consideraciones Éticas 48

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 50

4.1 Análisis de varianza: Concentración 50

4.2 Análisis de varianza: Motilidad espermática 51

4.3 Relación costo beneficio. 52

5. CONCLUSIONES 54

6. RECOMENDACIONES 55

7. BIBLIOGRAFÍA 56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Materiales Físicos de Campo.....42

Tabla 2. Materiales Biológicos de Campo.....42

Tabla 3. Materiales Químicos.....42

Tabla 4. Materiales Físicos de Laboratorio.....43

Tabla 5. Materiales Biológicos de Laboratorio.....43

Tabla 6. Materiales de Oficina.....44

Tabla 7. Variables Dependientes.....47

Tabla 8. Variables Independientes.....47

Tabla 9. Análisis de varianza: Concentración.....49

Tabla 10. Prueba de Duncan.....50

Tabla 11. Análisis de varianza: Motilidad espermática.....50

Tabla 12. Costo triladyl.....51

Tabla 13. Costo optixcell.....51

Tabla 14. Costo andromed.....52

Tabla 15. Resultados concentración.....64

Tabla 16. Resultados motilidad.....65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA.....17

Figura 2. Anatomía del aparato reproductor del carnero.....21

Figura 3. Espermatozoide del carnero.....21

Figura 4. Medición de testículos 67

Figura 5. Extracción de semen.....67

Figura 6. Semen obtenido.....67

Figura 7. Preparación de pajillas.....67

Figura 8. Pajillas de semen precongelación.....67

Figura 9. Pajillas de semen en nitrógeno.....67

Figura 10. Congelación de pajillas.....68

RESUMEN

La investigación referente a la crioconservación de semen en carneros es un enigma hoy en día puesto que la efectividad de diferentes diluyentes es incierta. Las características del semen de la especie hacen que los espermatozoides sean muy sensibles, esto genera altas tasas de mortalidad de los espermatozoides y bajas tasas de preñez. En la presente investigación se evaluaron tres diluyentes comerciales Triladyl, Optixcell y Andromed post descongelación en semen de carnero, se determinaron las tasas de espermatozoides vivos en cada muestra, se analizó la motilidad espermática y la relación costo beneficio de cada pajilla de semen post descongelación. El semen fue extraído y recolectado con el uso de vagina artificial, previo a la congelación se evaluó macro y microscópicamente el semen. Las muestras diluidas fueron congeladas en nitrógeno líquido, etiquetadas y criopreservadas en un tanque conservante, posteriormente fueron descongeladas a baño maría para su análisis. Los resultados de la concentración determinaron alta significancia, los resultados de la motilidad no tuvieron diferencia significativa, mientras que en la relación costo beneficio fue mejor Triladyl sobre Optixcell y Andromed respectivamente.

ABSTRACT

Research regarding cryopreservation of semen in rams is today an enigma due to effectiveness of different diluents is uncertain. Semen characteristics of the specie make spermatozoids be sensible, this produces high mortality rates and low pregnancy rates. This research evaluated three commercial diluents Triladyl, Optixcell and Andromed post unfreeze, it was determined live spermatozoid rate in each sample, sperm motility was analized and cost benefit relation in each sample post unfreeze. Semen was extracted and collected using artificial vagina, previous its freeze we evaluated semen macro and microscopely. Diluted samples were frozen in liquid nitrogen, tagged, and cryopreserved in a conservative tank, then samples were unfrozen by water bath for their analysis. Results about concentration determined high significance, motility results did not have significative difference, while in cost benefit relation Triladyl was better over Optixcell and Andromed respectively.

1. INTRODUCCIÓN

El carnero es un elemento clave para el mejoramiento del rebaño, se puede medir en cantidad y calidad de lana como en cantidad de carne alcanzada para ello el buen desempeño en el servicio debe venir acompañada de un buen estado de salud (Robles, 2005). La mejora de genética animal y biotecnologías de la reproducción ha evolucionado a lo largo de la segunda mitad del siglo XX de forma importante (San Primitivo, 2001). Además, el manejo de la reproducción en ovinos es esencial tanto para la producción de pie de cría como para el abasto y lana. Para lograr cualquiera de estos propósitos, es fundamental tener una alta eficiencia reproductiva puesto que tiene un efecto perdurable a lo largo del tiempo (Alonso, 1981; Ciapessoni, et al. 2007).

Durante décadas países subdesarrollados en relación con los desarrollados, la especie ovina no ha recibido la atención que merece en términos de reproducción, aun así, en los años recientes ha aumentado el interés en el uso de las biotecnologías de la reproducción en la especie ovina como son las técnicas de inseminación artificial (IA), preservación de semen, trasplante de embriones, entre otras con el fin de mejorar los sistemas de producción y la calidad genética de la especie (Evans, et al. 1990). Se desconoce la importancia de la genética y manejo reproductivo en un rebaño, ya que se sobrestima la respuesta de trabajo con resultados conseguidos en poco tiempo debido a las mejoras tecnológicas como vigor híbrido o heterosis, sin embargo, estos resultados se diluyen en el tiempo por no ser sustentables. (Fundación Chile, 2008).

La actividad sexual y la calidad del semen de los carneros no es constante durante todo el año, ocurre por la estacionalidad de la especie debido al cambio de periodos de luz, edad y jerarquía social (Cueto y Gibbons, 2002). El semen congelado en la inseminación artificial facilita el transporte de semen, evita el traslado de carneros y disminuye el riesgo sanitario sin embargo las diferentes técnicas de reproducción en ovinos como monta natural o

inseminación artificial cervical no están muy desarrolladas porque presenta tasas de fertilidad variables (bajas a medias). Los resultados bajos se deben principalmente al daño que sufren los espermatozoides en el proceso de congelación/descongelación y también factores relacionados en la hembra (Palomo, 2014; Mellisho y Terrel, 2007). Las diferentes maneras de crioconservación de semen ovino tienen una baja capacidad fecundante debido a la sensibilidad de los espermatozoides, los daños criogénicos aumentan el número de espermatozoides inviables con alteración física y funcional causado probablemente por la baja capacidad crioprotectora de los diluyentes utilizados (Santiani, et al. 2007).

Los diluyentes sintéticos y convencionales estadísticamente no tienen diferencias significativas en tasas de fertilidad al realizar la inseminación artificial laparoscópica. (Fukui, et al. 2008)

Este trabajo de investigación fue realizado con la finalidad de determinar el efecto de diluyentes comerciales (Andromed, Triladyl y Optixcell) en semen ovino sobre las tasas de espermatozoides vivos, su motilidad y la calidad en el semen post descongelación.

1.1 Problema

A pesar de los adelantos aplicados a las tecnologías de producción animal, hay pocos ganaderos o productores que muestran interés por mejorar las condiciones como bienestar y desempeño reproductivo (Córdova, 2008). El manejo reproductivo en la especie ovina se basa principalmente en monta natural, la inseminación artificial vía cervical como laparoscópica en el país se ha implementado muy poco. Además, la falta de conocimiento en el manejo reproductivo, la fisiología de la especie (estacionalidad, anatomía) causa desinterés por aplicar biotecnologías de la reproducción. La preservación de semen son técnicas para conseguir un progreso genético, aun así, existe baja tasa de fertilidad en inseminación

artificial con semen congelado en ovinos ya que en el proceso de conservación los espermatozoides sufren daños a nivel de la membrana (Sandoval, 2005).

1.2 Delimitación

1.2.1 Temporal

La presente investigación tuvo una duración de 400 horas, distribuidas en el proceso experimental y la redacción del informe final.

1.2.2 Espacial

La investigación se realizó en el laboratorio de la Universidad Politécnica Salesiana sede Cuenca, ubicada en calle Vieja y De Las Carretas 010105. Se realizó en el laboratorio clínico con muestras de semen tomadas de un carnero de la raza Dorper localizado en la parroquia Victoria del Portete en el cantón Cuenca.

FIGURA 1. Ubicación UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

Fuente: (Google Maps, 2020)

1.2.3 Académica

La investigación abarca al área de Biotecnología de la reproducción aplicada a la especie ovina, obteniendo conocimientos acerca de crioconservación de semen aplicando diferentes diluyentes comerciales.

1.3 Explicación del problema

La investigación referente al manejo reproductivo aplicada a la especie ovina es escasa especialmente concerniente a la crioconservación del semen. Las características físicas y químicas del semen ovino hacen que los espermatozoides sean sensibles y susceptibles causando bajas tasas de preñez.

La crioconservación del semen ovino es un enigma hoy en día, la efectividad de diferentes diluyentes sobre el semen es incierto puesto que no se conoce acerca de la efectividad de supervivencia de los espermatozoides sobre dichos compuestos, por esta razón se quiere probar con diferentes diluyentes para determinar la capacidad de supervivencia de espermatozoides y la calidad de pajuelas obtenidas en un carnero.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Evaluar los tres diluyentes comerciales Triladyl, Andromed y Optixcell post descongelación.

1.4.2 Objetivos específicos.

Determinar las tasas de espermatozoides vivos post descongelación.

Analizar motilidad espermática post descongelación.

Determinar la relación costo-beneficio de cada uno de los diluyentes: Triladyl, Andromed y Optixcell.

1.5 Hipótesis

1.5.1 Hipótesis alternativa

Los tres diluyentes se comportan diferentemente en la crioconservación del semen ovino.

1.5.2 Hipótesis nula

Los tres diluyentes se comportan igualmente en la crioconservación del semen ovino.

1.6 Fundamentos Teóricos

La investigación del trabajo experimental va enfocado a la obtención de conocimientos sobre la aplicación y efectividad de tres diluyentes diferentes en la crioconservación de semen en carneros. Los resultados obtenidos de la presente investigación permitirán establecer procesos de crioconservación de espermatozoides en semen de ovinos.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA Y DOCUMENTACIÓN

2.1 Anatomía Reproductiva del Carnero

El estudio anatómico y fisiológico del sistema reproductivo en el carnero empieza en los testículos siendo los responsables de la producción de espermatozoides. Anatómicamente, los testículos se encuentran suspendidos entre las extremidades posteriores y son cubiertos por un saco llamado escroto. El cordón espermático junto a los músculos de las paredes del escroto permite mantener la temperatura constante en el animal. Los espermatozoides producidos en los testículos salen de los mismos a través de los conductos eferentes para llegar a la cabeza del epidídimo, atraviesan el cuerpo hasta llegar a la cola del epidídimo, posteriormente, los espermatozoides son almacenados y transportados a través del conducto deferente, este conducto penetra con la uretra y se junta con las secreciones producidas por las glándulas vesiculares, próstata y glándulas bulbouretrales y actúan como medio de transporte para así tomar el nombre de semen. En el segmento uretral se desplaza el semen desde su origen en el periné, pasa por la "S" peneana hasta alcanzar al glande para salir en el momento de la eyaculación. (Hafez y Hafez, 2004 y Hintz, et al. 1987)

2.1.1 Órganos Reproductivos.

Los órganos reproductivos en el carnero son: escroto, testículos, conducto eferente, epidídimo en tres porciones (cabeza, cuerpo y cola), plexo pampiniforme, conducto deferente, uretra, glándulas vesicales, próstata, glándulas bulbouretrales, uretra, pene, glande. (Figura N2) (Illera, 1994; Evans, et al. 1990; Hafez y Hafez, 2004).

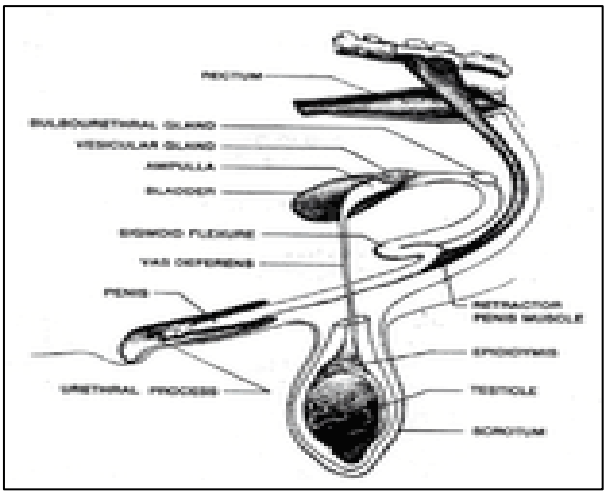


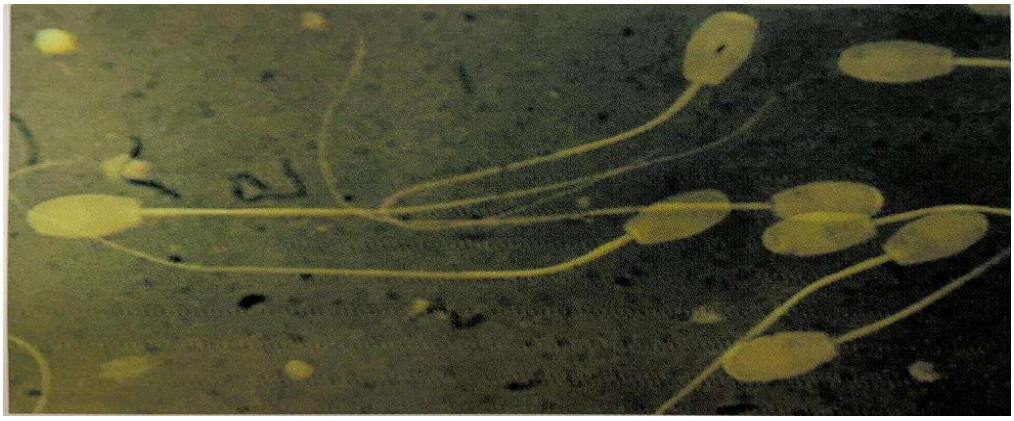
Figura 2. Anatomía del aparato reproductor del carnero

Manual de Producción de Caprinos y Ovinos. (Dickson, et al. 2017)

2.1.2 Espermatozoides

Son células especializadas para la fecundación, los espermatozoides se originan en los túbulos seminíferos a través del desarrollo de una serie de células germinales. Son células que tienen forma alargada y consta de dos partes: cabeza y cola, son recubiertos por la membrana plasmática. Consta de una estructura de doble pared situada entre la membrana plasmática y la parte anterior de la cabeza del espermatozoide conocido como acrosoma. La cola permite el movimiento del espermatozoide y tiene forma de flagelo, consta de tres porciones: pieza proximal, intermedia y terminal (Evans, et al. 1990).

Figura 3. Espermatozoide del carnero



Práctica Ovina y Caprina ((Melling & Alder, 2000)

2.2 Fisiología Reproductiva del Carnero

La fisiología del aparato reproductivo en el macho sea la especie que sea se refiere a la capacidad que tienen los testículos para producir espermatozoides, se determina la cantidad y calidad de espermatozoides para la fertilización (Méndez, et al. 2003). Estudia además las hormonas sexuales que determinan la maduración sexual, y la conducta como lívido y deseo sexual del macho (Latorre y Sales, 2000).

Los testículos del carnero tienen al menos dos funciones: exócrina para la producción de espermatozoides; y endócrina para la producción de hormonas masculinas.

2.2.1 Función endócrina de las funciones sexuales.

Las funciones que cumplen los mecanismos neuroendocrinos en la fisiología reproductiva del macho son fundamentales de igual manera en la hembra. La acción hormonal comienza con la liberación de hormonas a nivel del hipotálamo (GnRH), a su vez la adenohipófisis produce secreciones como la hormona Folículo Estimulante (FSH) y la hormona Luteinizante (LH), en los testículos se produce andrógenos (testosterona principalmente), la interacción de todas las hormonas mencionadas regula la función reproductiva del macho (Hintz, et al. 1987). La testosterona es secretada en los testículos debido a la estimulación de las células de Leydig por células intersticiales ICSH o la LH, a la vez es la reguladora de la secreción de LH o ICSH. La retroalimentación negativa de la testosterona ejercida a nivel del hipotálamo ocurre debido a la acción de la inhibina producida en las células de Sértoli. La espermatogénesis depende de las acciones de las hormonas FSH, LH, y testosterona. El sitio blanco de la LH son las células intersticiales, de la FSH y la testosterona son las células de Sértoli (Galina y Valencia, 2009; Hafez y Hafez, 2004).

2.2.2. Espermatogénesis

La división y diferenciación es el proceso que ocurre para la producción de espermatozoides, aquello se produce en el epitelio basal de los túbulos seminíferos en los testículos. En el carnero este proceso sucede a partir de los cinco meses de edad aproximadamente y meses después alcanza su capacidad fértil normal (Arthur, et al. 1991). En la espermatogénesis las células espermatogonias troncales se dividen por mitosis para mantener su propio número y producir cíclicamente espermatocitos que por proceso de meiosis se producirán espermátides aploides y se diferencian en espermatozoides; dicho proceso dura aproximadamente 47 días (Illera, 1994).

Es un proceso fisiológico controlado por mecanismos neuroendócrinos, en las etapas de espermatogonia (A y B) y espermatocito primario en profase están influenciadas por la

hormona FSH; en espermatocito primario en profase y metafase como también el espermatocito secundario están controlados por testosterona y al convertirse en espermatide para después en un espermatozoide maduro, aquello está influenciado por la testosterona y FSH (Illera, 1994; Hafez y Hafez, 2004).

2.2.3 Maduración del espermatozoide en el epidídimo.

Los espermatozoides en cuanto llegan a la luz de los túbulos seminíferos, son transportados desde los testículos hacia la cabeza del epidídimo, se conserva la gota citoplasmática que poco a poco desaparece hasta la llegada de los espermatozoides a la cola del epidídimo (Arthur, et al. 1991). En este proceso los espermatozoides lentamente adquieren la capacidad de motilidad progresiva cuando llegan a la cola del epidídimo y su paso al conducto deferente (Hafez y Hafez, 2004). La maduración se produce debido a la acción de la capa ciliada ubicada en la luz del epidídimo (similar a un cepillo) que funciona como peine para los espermatozoides. Este efecto permite mecánico permite que el material citoplasmático en exceso vaya siendo eliminado hasta llegar a la cola del epidídimo completando la maduración espermática (Arthur, et al. 1991; Hintz, et al. 1987).

2.2.4 Capacitación espermática.

Este proceso comprende una serie de cambios en el espermatozoide antes de la fecundación, estos cambios ocurren normalmente en el aparato reproductor femenino de los vertebrados incluyendo a las ovejas. Es un término que indica el desarrollo, cambio o modificación funcional que sufre el espermatozoide cuando está en interacción con las secreciones de la mucosa del aparato reproductor femenino (Arenas, et al. 2010; Grasa, et al. 2009). Son cambios bioquímicos y fisiológicos donde se alteran y eliminan sustancias que fueron integradas en la membrana plasmática del espermatozoide, cuando atravesaron del epidídimo y la depleción de colesterol, con el resultado de un incremento de la permeabilidad de la membrana al calcio, aumento de los canales de calcio y sodio/potasio, generación de

especies reactivas de oxígeno y fosforilación de la tirosina de las proteínas (Rodríguez, et al. 2008).

En el proceso de capacitación el espermatozoide siente muchos cambios físicos el más importante ocurre en la composición lipídica con la disminución de la relación colesterol-fosfolípidos afectando su permeabilidad. El colesterol es el esteroide con mayor concentración en el eyaculado pues cumple el efecto de estabilizar sobre las membranas celulares, el colesterol es desprendido de la membrana plasmática por acción de las lipoproteínas de alta densidad de las secreciones del aparato reproductor femenino. Cuando los espermatozoides son depositados en el tracto reproductivo de la hembra, las proteínas seminales contactan con los fosfolípidos de alta densidad del oviducto permitiendo estos secuestrar el colesterol y otros fosfolípidos, el resultado es la alteración de permeabilidad de la membrana espermática que permite la entrada de calcio que convierte los fosfolípidos en lisofosfolípidos capaces de desestabilizar membranas y la comenzar la reacción acrosómica (Mayren, et al. 2012; Boerke, et al. 2012). Todo este proceso se traduce en el aumento de la ocurrencia espontánea de la exocitosis acrosomal generando la disminución de la vida media de la población de espermatozoides, además la capacitación espermática conduce al aumento del metabolismo y motilidad (Mayren, et al. 2012).

La crioconservación del semen produce cambios en el espermatozoide similar la capacitación espermática la cual se denomina criocapacitación, los cambios inducidos por la crioconservación reducen la tasa de concepción al usar semen crioconservado (Rodríguez, et al. 2008).

2.2.5 Reacción acrosómica

El espermatozoide se une al ovocito, se induce el proceso de reacción acrosomal el cual es un movimiento del flagelo para facilitar su desplazamiento en la penetración de las

cubiertas del ovocito (Arenas, et al. 2010). La reacción acrosomal ocurre de forma espontánea, participa en la preparación final de los espermatozoides antes de la penetración de la zona pelúcida (Del Río, et al. 2007). Estudios realizados en fertilización *in vitro* indica que la reacción acrosómica puede ser inducida empleando sustancias como heparina, ionóforo de calcio, fluido sintético de oviducto y progesterona (Chávez, et al. 2008). La reacción acrosomal es específica por especie ya que requiere la existencia y reconocimiento entre gametos masculinos y femeninos para generar una respuesta fisiológica adecuada. Hay fusión de membrana plasmática y acrosomal externa en varios sitios dando lugar a vesículas que se desprenden. Bioquímicamente la reacción acrosomal se caracteriza por la activación de enzimas acrosomales antes de la formación de vesículas (Arenas, et al. 2010). Como resumen para dar lugar a la reacción acrosómica el espermatozoide debe sufrir la debida capacitación espermática junto con la hiperactividad, aumento de calcio intracelular, disminución de colesterol, activación de enzimas hidrolíticas y regulación de la exocitosis (Del Río, et al. 2007).

2.3 Semen del carnero

El semen es un líquido que contiene suspendido los espermatozoides y secreciones de órganos accesorios del aparato reproductor masculino. El plasma seminal constituye la porción fluida que es liberada en la eyaculación (Hafez y Hafez, 2004).

2.3.1 Factores que influyen en la producción y calidad del semen ovino.

El tamaño tiene una alta correlación con respecto a la fertilidad y se considera que es una característica heredable a las siguientes generaciones de corderos porque permite un aumento en la precocidad sexual (Aisen y Venturino, 2004). Los carneros no disponen de una marcada sensibilidad al fotoperiodo como ocurre con las ovejas ya que las hembras producen óvulos en cierta época del año mientras que los carneros producen espermatozoides de forma continua (Simonetti, et al. 2014). La reproducción en un sistema fisiológico importante ligado

al estrés ambiental y manejo del animal. La temperatura del ambiente, viento y humedad está ligado al estrés ambiental mientras que por manejo incluye al manejo, flujo de animales, ruido, transporte, trauma físico (Córdova, 2008). La fertilidad del carnero varía y su garantía reproductiva es el número y calidad de su progenie bajo condiciones normales. Los factores que alteran la producción de espermatozoides en los carneros se comprenden en aspectos de salud, edad, nutrición, manejo y factores ambientales (Melling y Alder, 2000). La temperatura ambiental provoca una disminución en concentración y motilidad espermática, aumento en pH y porcentaje de espermatozoides anormales y muertos (Córdova, 2008).

2.3.2 Eyaculación

Es un proceso que comienza con el aparecimiento de la lívido (deseo sexual) el cual es responsable la testosterona en el carnero. Ante la presencia de una hembra en celo la actividad sexual del macho aumenta por lo que procede a montar a cualquier hembra. El carnero percibe las feromonas liberadas al aire por medio del sentido del olfato. En condiciones naturales de apareamiento el carnero busca ovejas en celo, huele la vulva y se empuja contra la grupa. El pene se mantiene dentro de la vaina hasta la monta, luego el pene se extiende y se da el movimiento de propulsión, seguido de la eyaculación y desmonta (Hintz, et al. 1987; Hafez y Hafez, 2004).

2.4 Valoración de la calidad del esperma

Son parámetros del semen para indicar su calidad se puede evaluar macroscópicamente como color, aspecto, volumen, pH y también microscópicamente como motilidad masal, motilidad individual, concentración espermática, anormalidades, integridad de membrana, vitalidad (Delgado, 2013). Similar que, en otras especies, el eyaculado en el carnero varía en calidad y volumen dependiendo del estado sanitario, nutricional, ambiental y actividad sexual. La calidad se valora en el semen inmediatamente después de su obtención como color, volumen, concentración, motilidad y morfología de espermatozoides (Evans, et

al. 1990). La muestra de semen debe estar carente de orina, pelos o cualquier material extraño (Illera, 1994).

Los espermatozoides son sensibles al shock térmico, luz brillante, detergentes, agua, sangre, desinfectantes, metales, humo de cigarrillo, todo equipo debe ser libre de contaminantes y mantenido en 37 °C (Melling y Alder, 2000; Cabrera, et al. 2010).

2.4.1 Volumen

El volumen depende de factores como método de recolección, edad y estado del animal, habilidad del recolector y frecuencia de obtención de muestras (Evans, et al. 1990). En una investigación empleando diferentes métodos de recolección, se determinó que el mejor método para obtener semen en el carnero es la vagina artificial (Vera, 2009). El volumen normal de eyaculado por carnero adulto es 0,5ml a 2ml y en carnero jóvenes es de 0,5 a 0,7ml (Evans, et al. 1990).

2.4.2 Color

Se realiza observando la opacidad de la muestra dentro del tubo de recolección. Una muestra se clasifica como buena, regular y mala. Es buena cuando la muestra es color crema y consistencia espesa, es regular cuando tiene tonalidad grisácea y mala cuando es color pálido o lechoso. Cuando es color rosáceo indica presencia de sangre, semen gris indica contaminación del tracto reproductivo, semen amarillento y diluido es indicativo de contaminación con orina (Hintz, et al. 1987; Hafez y Hafez, 2004; Evans, et al. 1990).

2.4.3 pH

La cuantificación de grado de acidez o alcalinidad contribuye información a la calidad del semen, además es medida de la actividad metabólica de los espermatozoides. Cuando envejecen, se produce ácido láctico como resultado de la glucólisis causando el cúmulo de ácido y así disminuye el pH mientras que el pH aumenta cuando el semen es contaminado

con orina. El pH del semen del carnero está en un rango de 5,9 a 7,3 (Illera, 1994; Hintz, et al. 1987).

2.4.4 Concentración.

Los números de espermatozoides por ml de eyaculado define el número de hembras que se pueden inseminarse. La concentración normal en carnero es 3,5 x10^9 a 6,0x10^9 espermatozoides/ml. La concentración se mide usando hemocitometría, densimetría o espectrofotometría (Hafez y Hafez, 2004; Evans, et al. 1990). De manera indirecta se puede medir la concentración espermática midiendo la circunferencia escrotal. Cerca de 20 millones de espermatozoides por gramo de tejido escrotal puede ser producido de manera continua por el carnero. Además, se ha demostrado que la circunferencia escrotal está asociada positivamente con la movilidad espermática, calidad y producción de espermatozoides (Vera, 2009).

2.4.5 Motilidad

La motilidad incluye varios parámetros como porcentaje de espermatozoides en movimiento, porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva, velocidad espermática, longevidad de la motilidad espermática en semen puro y diluido (Hafez y Hafez, 2004). La valoración por onda de movimiento es el sistema más simple para determinar movilidad del semen fresco, las muestras de semen destinadas a inseminación artificial se califican como muy buenas y buenas (Evans, et al. 1990).

El movimiento espermático es un atributo en la calidad del semen ya que determina la eficacia de la migración de los espermatozoides a través del tracto genital de la oveja. Dicha calidad se evalúa a través del movimiento de la masa y del movimiento individual de los espermatozoides, dicha evaluación es subjetiva (Vera, 2009).

2.4.6 Morfología

La anormalidad morfológica espermática se relaciona con la fertilidad o infertilidad del macho, se asocian a condiciones relacionados al estrés como calor, humedad (Hafez y Hafez, 2004). La morfología de los espermatozoides determinará también la calidad del semen, una proporción muy alta (mayor a 20%) de espermatozoides anormales en una muestra seminal será de baja calidad fértil (Evans, et al. 1990). Eyaculados con 15% o más de espermatozoides anormales no se usarán en programas de inseminación artificial (Hafez y Hafez, 2004).

2.4.7 Integridad de membrana plasmática y acrosomal.

La membrana plasmática (MP) del espermatozoide representa una estructura dinámica que participa en el reconocimiento y transporte de moléculas, sus funciones que permiten la adaptación del metabolismo al medio circundante, proporcionando un sistema molecular para el reconocimiento del ovocito. La valoración de la integridad y funcionalidad de la MP responde a un dato importante para evaluar la fertilidad del macho. Un aspecto importante es evaluar la funcionalidad espermática dirigida a determinar la integridad funcional de la MP y acrosomal, dicha funcionalidad es fundamental en varios eventos en la fecundación como la capacitación, reacción del acrosoma o su fusión con el ovocito (Urrego, et al. 2008). Un aspecto importante que ha centrado interés por su simplicidad y su valor predictivo son las de resistencia osmótica que se basa en la capacidad del espermatozoide para captar agua en un medio hiposmótico ocurriendo un enrollamiento del flagelo del espermatozoide que se desdobla cuando la célula es devuelta a un medio iso-osmótico, a nivel del acrosoma este no muestra cambios en su estructura cuando no está alterado al ser sometido en medios hipo-osmóticos. Las pruebas más utilizadas son el HOST (sus siglas en inglés Hipoosmotic Swelling Test) y el ORT (Osmotic Resistent Test) (Rubio y Quintero, 2008). La integridad del acrosoma y membrana plasmática se evalúa según su capacidad de reacción a los cambios

osmóticos con las membranas cuando se exponen a soluciones hipoosmóticas e incubadas a 37°C por 30 minutos, siendo el ORT para determinar la integridad del acrosoma y el HOST la integridad de la membrana plasmática (Rubio, 2009).

2.5 Congelación del semen ovino

La criopreservación de espermatozoides fueron los primeros tipos de célula criopreservadas, aquello ha generado un éxito relativo a nivel internacional debido a la posibilidad de intercambios de animales genéticamente superiores, biotecnologías, conservación de especies y la reproducción. Esta técnica tiene como finalidad el mantenimiento de viabilidad y funcionabilidad celular a bajas temperaturas refiriéndose a cualquier tipo de célula, tejido u órgano. (Ávila, et al. 2006). Las temperaturas inferiores a -140 grados Celsius detiene la actividad metabólica de la célula. El almacenamiento en nitrógeno líquido junto a otros métodos (congelación en ampollas de hielo seco, en pastillas) posibilita la conservación del semen durante décadas (Palma, 2015). Los espermatozoides de la especie ovina son más sensibles al estrés térmico por frío que otras especies como bovino, conejo o el hombre (Torres-Ruda, et al. 2019).

2.5.1 Consideraciones generales

El semen se obtiene con el uso de vagina artificial o electroestimulación, el primero tiene la desventaja de que requiere entrenamiento del carnero, mientras que la electroestimulación mediante pequeñas descargas eléctricas estimula la eyaculación (Hozbor, et al. 2009). La vagina artificial es el método más apropiado para la recolección del semen de carnero destinado a programas de inseminación artificial. Para un eyaculado concentrado y de alta calidad, el carnero debe ser estimulado sexualmente por sujeción activa de monta sin recolección (monta falsa) (Laing, et al. 1990). El material que entra en contacto con el semen

debe estar estéril, atemperado a 30°C – 35 °C y libre de sustancias que produzcan daño a los espermatozoides (Illera, 1994).

En el proceso los espermatozoides son sometidos a diversos tipos de estrés, los cuales pueden inducir daños letales o sub-letales que comprometen su funcionalidad. La optimización de protocolos de criopreservación debe contemplar no solo la obtención de un alto número de espermatozoides sobrevivientes sino la habilidad funcional también. Para ello es necesario comprender el tipo de estrés que son expuestos los espermatozoides durante la congelación y descongelación, como también la respuesta de las células a las agresiones fisicoquímicas medioambientales (Choez, 2010).

La preservación de semen es una técnica para conseguir un progreso genético, aun así, existe baja tasa de fertilidad en inseminación artificial con semen congelado en ovinos ya que en el proceso de conservación los espermatozoides sufren daños a nivel de la membrana lo que altera la función metabólica provocando una disminución en el número de espermatozoides viables (Sandoval, 2005).

2.5.2 Factores que afectan la viabilidad espermática en la crioconservación.

A nivel de las membranas plasmáticas tanto su estructura como composición ocurren sucesos durante el proceso de criopreservación, el comportamiento durante la congelación y descongelación definirá el índice de supervivencia del espermatozoide congelado. Los periodos críticos en el proceso de criopreservación son la fase inicial de congelamiento y periodo de retorno a condiciones fisiológicas (Galina y Valencia, 2009; Choez, 2010).

En la congelación, la membrana del espermatozoide sufre daños principalmente se debe a las alteraciones térmicas, mecánicas y químicas, asociados al efecto de los

criopreservantes, cambios volumétricos debido al balance Na+ /k+, variaciones osmóticas, desestabilización de proteínas y formación de cristales de hielo (Hellemann y Jara, 1997).

La transición de lípidos fluidos a sólidos ocurre a una temperatura entre 10°C y 16°C lo que genera alteración de la membrana debido a la pérdida de fluidez causando fragilidad; la deshidratación celular en el proceso de congelación ocurre una pérdida de lípidos afectando a la integridad de la membrana plasmática por pérdida de su capacidad de expansión durante a la rehidratación al volver a condiciones isotónicas (Ávila, et.al. 2006).

Los espermatozoides congelados y descongelados son sometidos a ciclos de deshidratación e hidratación causando cambios de volumen. El primer cambio sucede cuando se coloca diluyente a la célula, este diluyente contiene sustancias crioprotectoras. Después ocurren cambios de volumen cuando se descongela la solución. Los cambios de volumen se asocian a cambios en la concentración de iones y electrolitos en las soluciones intra y extracelular (Stornelli, et al. 2005).

El shock térmico es otro factor que afecta la viabilidad espermática en la criopreservación, ocurre debido al enfriamiento rápido del semen entre 30 °C y 0 °C induciendo a estrés letal y aumento de permeabilidad de membrana en algunas células por la regulación de calcio por ello se debe realizar diligentemente. Este factor se considera como el estado extremo de un estrés continúo influenciado por la velocidad con que inicia este fenómeno por lo que la agregación de preparaciones lipídicas purificadas al diluyente reduce en gran manera este fenómeno además del daño producido en la congelación y descongelación (Stornelli et al. 2005).

Los crioprotectores permiten mantener una mayor proporción de agua líquida a bajas temperaturas, reduce la concentración de electrolitos del medio celular interno y posibilita la supervivencia al permitir que el agua intracelular salga y se congele en el proceso de

congelación generando una deshidratación de la célula y evitando la formación de cristales de hielo. Aun así, los diluyentes producen un estrés transitorio sobre la membrana plasmática de los espermatozoides y está relacionado con la capacidad de penetración de los diluyentes, dicho estrés osmótico afecta a los fosfolípidos de la membrana porque aumenta la permeabilidad. La hiperosmolaridad producida por el glicerol tiene un efecto estimulador de la reacción acrosómica pudiendo ser reducido mediante la incorporación en etapas de glicerol en la solución durante la congelación lo que permite aumentar la taza de espermatozoides sobrevivientes al descongelado (Stornelli, et al. 2005; Ávila, et al. 2006). Si la velocidad de congelación es muy rápida o lenta el estrés producido por la criopreservación aumenta. El estrés inducido por formación de cristales de hielo está asociado a cambios de presión osmótica de la fracción no congelada. Cuando la solución es enfriada por debajo del punto de congelación los cristales de hielo forman núcleos y el agua pura cristaliza formando hielo. La presión osmótica aumenta en dependencia de temperatura, velocidad de descenso de temperatura y volumen de fracción no congelada. El enfriamiento celular debería realizarse a una velocidad óptima y adecuada para minimizar el estrés de la célula, permitir la salida de agua intracelular debido a la presión osmótica extracelular y evitar la formación de cristales de hielo intracelular (Stornelli, et al. 2005). Los espermatozoides pueden sufrir daños en el proceso de la criopreservación sin embargo se puede prevenir mediante el control de velocidad de congelación y también aplicando un adecuado diluyente. (Ramos, et al. 2017)

2.5.3 Alteraciones de espermatozoides durante la congelación y descongelación.

Son muy sensibles los espermatozoides del carnero a cambios de temperatura durante la congelación y descongelación. Los daños más importantes en el espermatozoide ocurren en el momento cuando son descongelados (Holt y North, 1994). El nivel de daño de los espermatozoides está influenciado por factores como temperatura y velocidad de congelación. Después de la criopreservación la motilidad espermática se reduce debido a la

heterogeneidad de la población de espermatozoides durante la congelación y cuando son descongelados muestran movimiento variable (Ashrafi, et al. 2011).

En la crioconservación, los lugares primarios de daño en la célula espermática son las membranas plasmática y acrosomal (Camara y Guerra, 2011). La agrupación de proteínas durante la fase de separación lipídica inducida por el enfriamiento no es completamente reversible comprometiendo la estructura de recepción e interacción entre gametos. La crioconservación incita a los espermatozoides a una aparente capacitación porque aumenta el calcio intracelular y cambios como la reacción acrosomal. La reacción del acrosoma contribuye a la fertilización porque con esta reacción el espermatozoide puede penetrar la zona pelúcida del ovocito, su daño impide la penetración del espermatozoide (Gadea, 2003).

2.5.4 Procesamiento y congelación del semen del carnero.

Se puede emplear metodología convencional (lenta) o metodología rápida para congelar el semen del carnero, se pueden emplear pajuelas plásticas, ampolletas o pellets. En una comparación la metodología rápida mejora la supervivencia de los espermatozoides (Evans, et al. 1990). El semen no contiene sustancias suficientes que garanticen la viabilidad del eyaculado por prolongados periodos de tiempo por ello es indispensable adicionar agentes crioprotectores que prolonguen la vida de los espermatozoides (Illera, 1994). El método rápido o de un solo paso es más utilizado en la congelación de semen de carnero por su simplicidad y menor manejo previo a su congelación. En el proceso el semen se diluye a la dilución final de precongelación a 30°C con diluyente que contiene glicerol y se refrigera a temperatura de 5°C durante 1,5 horas a 2 horas para luego exponer a vapores de nitrógeno líquido y su sumergimiento en el mismo en contenedores de nitrógeno líquido (Evans, et al. 1990). La proporción de diluyente con semen está relacionada con la motilidad y concentración de los espermatozoides. El éxito del proceso de congelación depende de la descongelación, puesto que la velocidad de enfriamiento es rápida y la descongelación

también debe ser rápida (Choez, 2010). La secuencia para el procesamiento y congelación de semen ovino es preparación de materiales, recolección, evaluación, dilución, enfriamiento, congelación y almacenamiento (Evans, et al. 1990; Illera, 1994).

2.5.5 Diluyentes para congelar semen de carnero.

No deben ser tóxicos para los espermatozoides, debe tener un pH adecuado y presión osmótica compatibles para su supervivencia, muchos diluyentes están hechos a base de leche descremada o yema de huevo. Por último, deben ser de bajo costo con fácil preparación (Yamasaki, et al. 2015). Tienen dos funciones: primero el mantenimiento de la fertilidad en el proceso de crioconservación y segundo la dilución del eyaculado para lograr un número apropiado de espermatozoides por dosis (Valdez, 2013). Se ha comprobado que el grado de dilución en un eyaculado para obtener dosis seminales puede influir en la calidad durante el proceso de conservación (Aguado, et al. 1994). Los diluyentes del semen deben contener: sustrato energético (azúcar), concentración adecuada de electrolitos para proteger de los cambios de pH y presión osmótica, componentes de alto peso molecular para proteger de efectos nocivos del enfriamiento y congelamiento y estabilizar membranas (proteínas, lipoproteínas, lecitina), agente crioprotector (glicerol) y antibióticos (Illera, 1994; Laing, et al. 1990). El más adecuado para la dilución de semen de carnero en método de un solo paso es el medio Tris-glucosa-yema de huevo (Evans, et al. 1990).

2.5.5.1 Sustrato energético.

Los diluyentes en su composición contienen carbohidratos porque proveen energía a las células espermáticas. Preferiblemente los carbohidratos pueden ser un azúcar de metabolismo simple. El sustrato energético más empleado en los diluyentes es la glucosa sin embargo se ha usado también galactosa, fructosa, ribosa y trehalosa pero tienen resultados menores (Galina y Valencia, 2009; Illera, 1994). Los carbohidratos pueden ser usados solos o

en combinación, la composición del diluyente debe contener la cantidad suficiente para proveer energía a los espermatozoides; la cantidad no debe ser menor a 0,5% ni tampoco debe superar el 3% porque puede aumentar la osmolaridad (Laskutoff, et al. 2010).

2.5.5.2 Agentes proteínicos.

Entre los agentes proteínicos principales utilizados en los diluyentes seminales están la yema de huevo y leche descremada. La yema de huevo se utiliza para la dilución en semen de diferentes especies debido al alto nivel de protección espermática que atribuye. La protección ocurre debido a la presencia de lipoproteínas, lecitinas y glucosa permitiendo el mantenimiento de la viscosidad del semen por consecuente forma un barniz protector alrededor de los espermatozoides y provee nutrientes (Martínez, et al. 2011). La yema de huevo tiene alto peso molecular y baja densidad lipoproteica aquello brinda protección contra el frío, también reduce la perdida de enzimas acrosomales y previene cambios degenerativos (Córdova, 2008).

La leche de vaca en otro compuesto utilizado para preparar diluyentes para semen, la leche debe ser descremada y llevada a punto de ebullición por 15 minutos ya que se inhibe la lactenina (compuesto tóxico para los espermatozoides). Además, el calentamiento promueve el desdoblamiento de lactosa a glucosa y galactosa los cuales los espermatozoides los utilizan como fuente de energía (De la Vega, 2000). El éxito de la leche de vaca ocurre debido a la caseína ya que actúa como amortiguador contra cambios de pH y como agente quelante contra metales pesados. Protege parcialmente durante la reducción de temperatura durante el almacenamiento (Córdova, 2008)

También se puede emplear lecitina de soya en reemplazo de la yema de huevo y leche de vaca por tener mejores niveles de bioseguridad. Compuesto por fosfolípidos y

aparentemente no tienen efectos citotóxicos sobre los espermatozoides ni efectos sobre la motilidad. Ha sido usada en crioconservación de semen en bovinos, equinos, porcinos, humanos y ovinos (Del Valle, et al. 2011).

2.5.5.3 Agentes tampón o reguladores de pH

Permiten a los diluyentes seminales a controlar el pH del medio, son importantes porque sin ellas el pH disminuye por acción del metabolismo del espermatozoide formándose ácido láctico, el pH intracelular y su metabolismo. Hay sustancias simples como el citrato y bicarbonato de sodio con capacidad limitada de regular el pH también hay sustancias más complejas reguladoras de pH con rango más amplio y no son dependientes de la temperatura (TES, HEPES, MOPS y TRIS) (Galina y Valencia, 2009; Laskutoff, et al. 2010)

El TRIS (Tris(hodroxi-metil),aminometano) fua utilizado principalmente como diluyente para la congelación de semen bovino, sus principales características son poseer una buena capacidad tampón, actividad diurética y osmótica, baja toxicidad en altas concentraciones. El uso de Tris en semen ovino en algunas investigaciones se comprobó que los espermatozoides del carnero toleran una concentración de Tris de hasta 400mM y la azúcar más adecuada es la glucosa (Merino, 2009).

2.5.5.4 Agentes crioprotectores

Son sustancias hidrosolubles de baja toxicidad, disminuyen el punto eutéctico de una solución alcanzando una concentración dada de solutos a una temperatura menor por lo que la célula estará deshidratada y el gradiente osmótico disminuirá. Los crioprotectores pueden ser penetrantes y no penetrantes, los penetrantes son de bajo peso molecular y permeables a través de la membrana celular (glicerol, dimetilsulfóxido y propanediol) mientras que los no penetrantes son de alto peso molecular, efectivas a velocidades altas de congelación, estos

promueven la rápida deshidratación celular y suelen utilizarse junto a agentes penetrantes como sacarosa, glucosa, dextrosa y dextrano. Estos polímeros forman puentes de hidrogeno reduciendo la actividad de agua por su concentración molar (Ávila, et al. 2006). El glicerol es el más usado para la congelación de semen, la concentración optima está determinada por el diluyente, la velocidad de enfriamiento, método de congelación y descongelación empleado y especie animal. La función del glicerol es reducir la concentración de sales y conservar mayor cantidad de agua no congelada en el interior como en el exterior de la célula a cualquier temperatura, pero también el glicerol causa efectos adversos durante la congelación y descongelación afectando la motilidad. La supervivencia de los espermatozoides depende de la concentración del crioprotector y la velocidad de congelamiento y descongelamiento (Herrera, et al. 2012).

2.5.6 AndroMed

Concentrado estéril preparado de un diluyente de yema de huevo, usado para congelación de semen y conservación de semen fresco. Está compuesto de fosfolípidos, TRIS, ácido cítrico, azúcar, antioxidantes, tampones, glicerina, antibióticos como tilosina, gentamicina, espectinomicina y lincomicina, y agua pura (Díaz y López, 2018).

2.5.7 Triladyl

Es un concentrado estéril preparado de un diluyente con yema de huevo. Está compuesto por TRIS, ácido cítrico, azúcar, tampones, glicerina, antibióticos, agua pura de extrema pureza, tilosina, gentamicina, espectinomicina y lincomicina. La solución madre se realiza mezclando Triladyl con tres partes de agua destilada, el día a realizarse se agrega yema de huevo fresca (Cueto, et al. 2016).

2.5.8 Optixcell

Concentrado para usar en semen fresco y congelado, no contiene yema de huevo, no contiene proteína de origen animal, es un diluyente que está compuesto por agua, sal, azúcar, electrolitos, glicerol, antibióticos y además contiene liposomas sintetizados en reemplazo de la yema de huevo. Es de color marrón claro y esterilizado por irradiación (Escudero, 2015).

2.6 Descongelación de semen ovino.

El proceso de descongelamiento del semen crioconservado es una fase muy importante para la supervivencia de los espermatozoides ya que el semen congelado está a una temperatura de -196◦C, al momento del calentamiento los espermatozoides entran nuevamente a una zona crítica entre -15◦C y -60◦C (Mazon, 2011). Es muy crítico la descongelación de semen ya que los espermatozoides pueden sufrir lesiones si no se realiza correctamente la descongelación sumada a los daños criogénicos causados por la congelación. El semen del carnero debe descongelarse a una temperatura no menor a 37◦C en baño de agua con termómetro por un tiempo de 45 a 50 segundos (Evans, et al. 1990). A 37◦C es la temperatura más adecuada ya que a su vez se excluye el riesgo de supercalentamiento (Mazon, 2011).

2.7 Valoración del esperma congelado y descongelado.

La valoración del semen congelado y descongelado se relaciona con motilidad, viabilidad, tasa de supervivencia del espermatozoide, además de la valoración cualitativa del semen como color, pH, volumen (Galina y Valencia, 2009).

2.7.1 Motilidad y viabilidad

La motilidad es simple de realizar, se observa el movimiento en ondas de los espermatozoides a través del microscopio en un portaobjetos a 37◦C luego de descongelar el

semen de manera correcta. El análisis se debe realizar en intervalos de una y dos horas después del descongelado en una muestra de 0,5ml. Se considera adecuado si el porcentaje de espermatozoides con movimiento progresivo no es menor del 40% (Evans, et al. 1990).

También se puede calificar la motilidad en una escala subjetiva entre 0 y 5 en donde: 0 es cuando los espermatozoides no se mueven, 1 cuando los espermatozoides se mueven en el lugar, 2 se trasladan suavemente los espermatozoides, 2.5 cuando se puede observar la trayectoria con la vista, 3 es difícil seguir la trayectoria de los espermatozoides, 4 los espermatozoides se trasladan a mucha velocidad y 5 los espermatozoides se trasladan aún más rápido que el 4 (Cueto, et al. 2016).

2.7.2 Taza de espermatozoides vivos.

El conteo del número de espermatozoides por número de dosis o pajuelas se puede determinar mediante el recuento en cámara de Neubauer tomando en cuenta el volumen de cada pajuela (Boretto, et al. 2002). La cámara de Neubauer consta de dos piezas, una pieza de vidrio en donde se encuentra labrado el reticulado donde se depositará el material a examinar y la otra pieza es un cubreobjetos específico montado sobre la pieza anterior. La cámara consta de cuadrículas en donde cada cuadrícula presenta 4 cuadrantes con 16 cuadrados cada uno. Las dimensiones son de 1mm de lado por 0.1mm de profundidad (Cueto, et al. 2016).

2.8 Resumen del estado del arte del problema.

Hablando específicamente de la especie ovina Sandoval A. en el año 2005 en “Criopreservación de semen ovino empleando diferentes dilutores y combinaciones de agentes crioprotectores permeantes y no permeantes” nos dice que la preservación de semen son técnicas para conseguir un progreso genético, aun así, existe baja tasa de fertilidad en

inseminación artificial con semen congelado en ovinos ya que en el proceso de conservación los espermatozoides sufren daños a nivel de la membrana.

Con las técnicas de crioconservación Sepúlveda y otros en el año 2006 en “Criopreservación de semen ovino con adición de antioxidantes” nos habla que las tasas de fertilidad en inseminación artificial en ovejas con semen congelado son bajas ya que la proporción de espermatozoides se reducen debido a los procesos que se someten como enfriamiento, congelamiento y descongelamiento.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Materiales físicos de campo

Tabla 1. Materiales Físicos de Campo

DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	UNIDAD DE MEDIDA
Manga	1	Unidad
Mascarilla	10	Unidad
Overol	1	Unidad
Guantes	2	Caja
Vagina artificial	1	Unidad
Tubos recolectores	10	Unidad

3.1.2 Material biológico de campo

Tabla 2. Materiales Biológicos de Campo

DESCRIPCIÓN	CANTIDAD
Ovino	1

3.1.3 Materiales químicos

Tabla 3. Materiales químicos

DESCRIPCÓN	CANTIDAD	UNIDAD DE MEDIDA
Alcohol	1	Litro
Criopreservador	1	Unidad
Diluyentes	6	Unidad

3.1.4 Materiales de laboratorio

Tabla 4. Materiales Físicos de Laboratorio

DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	UNIDAD DE MEDIDA
Microscopio	1	Unidad
Porta objetos	1	Caja
Cubre objetos	1	Caja
Guantes	1	Caja
Papel	1	Rollo
Cámara de Neubauer	1	Unidad
Matraz Erlenmeyer	1	Unidad
Contenedor de nitrógeno	1	Unidad
Vaso de precipitación	2	Unidad
Tubos de ensayo	6	Unidad
Pipetas	4	Unidad
Envasadora y selladora	1	Unidad
Jeringas	1	Caja
Tubos eppendof	5	Unidad
Termómetro	1	Unidad

3.1.5 Materiales biológicos

Tabla 5. Materiales Biológicos de Laboratorio

DECRIPCIÓN	CANTIDAD
Semen	

3.1.6 Materiales de oficina

Tabla 6. Materiales de Oficina

DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	UNIDAD DE MEDIDA
Hojas de papel bond	1	Resma
Esferos	1	Unidad
Hojas de registro	1	Unidad
Carpeta	1	Unidad
Cinta adhesiva	1	Unidad
Laptop	1	Unidad
Tinta de impresión	1	Unidad

3.2 Metodología

3.2.1 Método

El método utilizado en el presente trabajo es de tipo experimental inductivo porque las muestras son procesados en tiempo cronológico y además las muestras fueron cuantificadas los espermatozoides y su motilidad. En la investigación se utilizó la cámara de Neubauer y el microscopio para analizar concentración y motilidad.

3.2.2 Población y tamaño de muestra

Se seleccionó un carnero reproductor alojados en el cantón Cuenca, el carnero fue alimentado bajo una dieta única a base de pastoreo y suplementos.

3.2.3 Procedimiento

Las muestras de semen se obtuvieron por eyaculación asistida las cuales fueron diluidas en los tres diluyentes Andromed, Triladyl y Optixcell. Posteriormente, las muestras diluidas fueron congeladas con nitrógeno líquido, etiquetadas y criopreservadas en un tanque conservante, después se descongelaron las muestras para el análisis.

3.2.3.1 Colecta de semen.

Para la colecta de semen se utilizó vagina artificial, que es un tubo rígido cubierto con una camisa de látex llenada con agua caliente a 45º C. En el extremo del tubo se colocó un cono de látex en el cual se insertó un tubo graduado para colectar el semen del reproductor.

Previo a la colecta de semen el reproductor fue bañado y estimulado para la eyaculación. Durante la colecta, al momento de la protrusión fue desviado el pene con la mano y se introdujo en la vagina artificial donde se depositó el semen.

Una vez que se obtuvo la muestra seminal, se trasladó inmediatamente al laboratorio y fue colocado en baño María a una temperatura de 36º C.

3.2.3.2 Evaluación de semen fresco

Se consideró lo siguiente:

Macroscópicas: Del mismo tubo en que se colectó el semen se determinó:

Volumen: cantidad de semen colectado en el tubo graduado.

Color: cremoso, lechoso, acuoso y traslucido.

pH: se utilizó una cinta de medir pH cuyo rango fue 6-7

Microscópicas

En 3 tubos de ensayo identificados como A, B y C se colocaron muestras para posteriores análisis (motilidad individual, en masa, cámara de Neubauer, respectivamente). Esto se realizó con cada eyaculado, los tubos con las muestras fueron ubicados sobre platinas térmicas a 37ºC.

Motilidad masal: Se valoró en una escala de 0 a 5, descartando eyaculados con motilidad inferior a 3. Para su determinación se colocó 10 µl de semen puro en un portaobjetos precalentado a 37ºC y se observó al microscopio a un aumento de 10X. La valoración se realizó en una escala de 0 a 5.

Motilidad individual: se realizó una dilución 1:30 del semen con diluyente comercial. De esta solución se tomaron 10 µl que se colocaron en un porta y un cubreobjeto precalentado a 37°C. Se observó al microscopio a un aumento de 20X y 40X y se determinó, en porcentaje los espermatozoides con motilidad progresiva, realizando el conteo de 100 espermatozoides. La motilidad fue del 90%.

Concentración: Se tomó una muestra de semen puro y se realizó una dilución 1:200 con una solución de NaCl al 3.5% formolizada. De esta solución se tomaron 10 µl que fueron depositados en una cámara Neubauer después se dejó reposar durante 5 minutos se procedió al conteo y posterior cálculo, utilizando la siguiente fórmula:

$$\textit{Concentración espermática} = a \times b \times c \times d \times e$$

a: número de espermatozoides contados en 5 cuadros

b: total de cuadrantes de la cámara (n = 25)

c: 200, que es la dilución utilizada

d: 100, es la profundidad de la cámara de Neubauer.

e: 1000, valor que permite expresar la concentración espermática en ml.

3.2.3.3 Procesamiento del semen.

Una vez evaluado el semen, se envasó en pajillas de 0.5cc a una concentración de $60x10^6$. Posterior al envasado las pajuelas se colocaron en una vitrina de refrigeración a una temperatura de 5° C durante un período de 2 horas. Al culminar el tiempo de equilibrio (2hs más), se congelaron las dosis seminales utilizando un congelador manual. Posterior a las 3 horas de congelación, se realizó una evaluación post congelación en donde fueron evaluadas las siguientes variables:

Motilidad individual: se colocó 10µl de semen descongelado en una porta y cubre objetos. Se observó al microscopio a un aumento de 40X. La motilidad fue del 75%

Concentración: Se colocaron 10µl de semen post congelado en un porta y cubreobjetos precalentados a 37°C. Se observó al microscopio a un aumento de 40x y se determinó la concentración de espermatozoides que fue 1.5 mil millones de espermatozoides.

3.3 Operacionalización de variables.

Variables dependientes: Crioconservación

Tabla 7. Variables Dependientes

Concepto	Categoría	Indicador	Variables
Técnica de crioconservación aplicando.	Biológica -Triladyl -Andromed -Optixcell	Tasa de espermatozoides vivos.	Numérico

Variables independientes: ovinos

Tabla 8. Variables independientes

Concepto	Categoría	Indicador	Variables
Unidad experimental	Biológica	Carnero	Número
		Dosis de semen	Número

3.4 Consideraciones Éticas

La investigación sustentada “EVALUACIÓN DE TRES DILUYENTES COMERCIALES PARA LA CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN DE CARNERO DE LA

RAZA DORPER" tiene un impacto sobre el manejo reproductivo y mejoramiento genético aplicado en la especie ovina debido a que el campo de la reproducción en ovinos ha sido poco explorado y aplicado. Con ello se busca mejorar y alcanzar el manejo de ovinos genéticamente superiores sin causar afecciones, golpes, heridas a los animales. Por ello con el manejo adecuado garantizamos el estado de salud óptimo en los carneros teniendo en cuenta el bienestar y salud animal.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis de varianza: Concentración

Tabla 9. Análisis de varianza: Concentración

	g.l	S.C	C.M	f Calcular	f Tabular	
					5%	1%
Total	74	592				
Tratamiento	2	253.76	126.88	27.05^{xx}	3.12	4.91
E. Exp.	72	338.24	4.69			
CV: 9.02%						

En función al ADEVA, se obtuvo el valor de f calcular fue 27.05 que al ser comparado con los valores tabulares, este es mayor, por lo tanto es altamente significativo lo que nos indica que los tres diluyentes obtuvieron resultados diferentes en la concentración espermática post descongelación. Según (Escudero, 2015) en "Preservación de semen ovino mediante vitrificación y congelamiento lento, utilizando diferentes diluyentes comerciales" obtuvo un valor altamente significativo concordando con nuestro estudio; por lo contrario (Arias, 2020) no encontró diferencias significativas en la concentración de pajuelas diluidas con Triladyl y Andromed. El coeficiente de variación fue 9.02% determinando confiabilidad de datos. Al determinar la alta significancia entre los tres tratamientos se procedió a realizar la prueba de Duncan al 5% determinando que las medias de los tres tratamientos tienen diferencia significativa.

Tabla 10. Prueba de Duncan

X_2-X_3	4.40	>	1.28
X_2-X_1	3.04	>	1.22
X_1-X_3	1.36	>	1.22

Las medias de los tres tratamientos difieren significativamente en donde la media del tratamiento X_2 (Optixcell) fue mejor a las medias X_3 (Andromed) y X_1 (Triladyl), además la media del tratamiento X_1 (Triladyl) es mejor a la del tratamiento X_3 (Andromed).

4.2 Análisis de varianza: Motilidad espermática

Tabla 11. Análisis de varianza: Motilidad espermática

	g.l	S.C	C.M	f Calcular	f Tabular	
					5%	1%
Total	74	2218.66				
Tratamiento	2	68.66	34.33	1.14^{NS}	3.12	4.91
E. Exp.	72	2150	29.86			
CV: 7.20%						

En función al ADEVA, se obtuvo que el valor de f calcular fue 1.14, al ser comparado con los valores de f tabular, el resultado es menor, se determinó que no hay diferencia

significativa lo que nos indica que los tres diluyentes no influyeron en la motilidad espermática. En la investigación de (Valdez, 2013) sus resultados demostraron también que no existen diferencias estadísticas en los diluyentes empleados por lo que los tratamientos generan similares tasas de motilidad. Sin embargo, Escudero (2015) obtuvo resultados que la motilidad difirió significativamente cuando utilizó: Triladyl 60,50%; Andromed 25,40% y Optixcell con 8,50%.

4.3 Relación costo beneficio.

Tabla 12. Costo triladyl

Cantidad	Material	Costo	Total
10	Triladyl	0.22	2.20
25	Porta objetos	0.05	1.25
25	Cubre objetos	0.03	0.75
3	Huevos	0.15	0.45
0.04	Agua bidistelada	10	0.40
1	Materiales y servicio	20	20
25	Minipajuelas	0.09	2.25
Total/Dosis	1.09	Total	27.30

Tabla 13. Costo optixcell

Cantidad	Material	Costo	Total
10	Optixcell	0.47	4.70
25	Porta objetos	0.05	1.25
25	Cubre objetos	0.03	0.75
0.05	Agua bidistelada	10	0.50

1	Materiales y servicio	20	20
25	Minipajuelas	0.09	2.25
Total/Dosis	1.17	Total	29.45

Tabla 14. Costo andromed

Cantidad	Material	Costo	Total
10	Andromed	0.53	5.30
25	Porta objetos	0.05	1.25
25	Cubre objetos	0.05	0.75
3	Huevos	0.15	0.45
0.05	Agua bidistelada	10	0.50
1	Materiales y servicio	20	20
25	Minipajuelas	0.09	2.25
Total/Dosis	1.22	Total	30.50

El diluyente Triladyl resultó con la mejor relación costo beneficio sobre Optixcell y Andromed respectivamente. El costo del tratamiento del Triladyl fue de 27.30$ y cada dosis 1.09$, del Optixcell fue 29.45$ y cada dosis fue 1.17$, por último, el costo del tratamiento del Andromed fue 30.50$ y cada dosis 1.22$.

5. CONCLUSIONES

Las pajillas de semen de carnero podrían emplearse diluyendo cualquiera de los tres diluyentes Triladyl, Optixcell y Andromed puesto que los resultados de motilidad espermática no tuvieron diferencias significativas, la motilidad masal no tuvieron diferencias significativas.

Las características macroscópicas y microscópicas del semen del carnero estuvieron dentro del rango, de los cuales el volumen tuvo un promedio de 1.15ml, la motilidad fue superior al 90%, el pH en rango de 6.5-7 lo que permitieron obtener adecuadas dosis seminales.

Los valores económicos de las dosis seminales de cada pajilla diluidas con Triladyl, Optixcell o Andromed permitieron determinar la relación costo - beneficio, el mejor resultado fue Triladyl, seguido de Optixcell y Andromed respectivamente.

6. RECOMENDACIONES

Se recomienda la aplicación de Triladyl, Andromed y Optixcell en la dilución y obtención de dosis seminales en semen de carnero puesto que la motilidad espermática no tuvo diferencia significativa, la motilidad masal no difirió estadísticamente.

El manejo del carnero es un aspecto siempre a tomar en consideración al realizar empadres, por ello es imprescindible que el carnero tenga una condición corporal muy buena llevada de una buena alimentación además del suministro de minerales y vitaminas.

En cuanto a la relación costo – beneficio se recomienda el empleo de Triladyl debido que los costos de fueron inferiores al Optixcell y Andromed.

Pese a los resultados obtenidos, es necesario continuar investigandose la efectividad y uso de diluyentes en semen de carnero. Estudios permitirán tener una mayor referencia acerca de la eficacia de diferentes diluyentes en pajillas de semen de carnero y su empleo en programas de inseminación artificial.

7. BIBLIOGRAFÍA

Aguado, M., Garde, J., Pérez-Guzmán, M., Angulo, C., & Montoro, V. (1994). Efecto del grado de dilución en la criorresistencia de las dosis seminales de ovino manchego. *Colección Estudios,* 519.

Aisen, E., & Venturino, A. (2004). *Reproducción ovina y caprina.* Buenos Aires: Inter-Médica.

Alonso, J. (1981). *Manejo de la Reproducción en el Ovino.* Ciudad de México: UNAM.

Arenas, E., Cambrón, A., Ambriz, D., Zúñiga, P., Rodríguez, A., & Rosado, A. (2010). *Bases fisiológicas de la capacitación y de la reacción acrosomal del espermatozoide*. Obtenido de http://www.izt.uam.mx/newpage/contactos/anterior/n78ne/fisiologica.pdf.

Arthur, G., Noakes, D., & Pearson, H. (1991). *Reproducción y Obstetricia en Veterinaria (Teriogenología).* Madrid: McGraw-Hill Interamericana.

Ashrafi, I., Kohram, H., Naijian, H., Bahreini, M., & Mirzak, H. (2011). *Effect of controlled and uncontrolled cooling rate on motility parameters of cryopreserved ram spermatozoa.* Obtenido de http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22185483.

Ávila, L., Madero, J., López, C., León, M., Acosta, L., Gómez, C., . . . Reguero, M. (2006). Fundamentos de ciopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*.

Boerke, A., Brouwers, J., Olkkonen, V., Van de Lest, C., Sostaric, E., Schoevers, E., . . . Gadella, B. (2012). *Involvement of Bicarbonate-Induced Radical Signaling in Oxysterol Formation and Sterol Depletion of Capacitating Mammalian Sperm During In Vitro Fertilization.* Obtenido de Biolreprod: http://www.biolreprod.org/content/88/1/21.full.pdf+html.

Boretto, J., Gibbons, A., & Cueto, M. (2002). Calidad seminal post-descongelamiento en relación con la eficiencia reproductiva de la inseminación artificial laparoscopica en ovinos. *ResearchGate*, 2.

Cabrera, P., Pantoja, C., & Orellana, J. (Julio de 2010). *Efecto de dos dilutores sobre la motilidad e integridad de la membrana espermática en semen congelado de ovinos.* Obtenido de Scielo: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1609-91172010000200002&script=sci_arttext

Camara, D., & Guerra, M. (2011). *Refrigeração e criopreservação sêmen ovino: danos inerentes à técnica e influência da suplementação do meio com antioxidantes sobre a qualidade espermática* . Obtenido de CBRA: http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v35n1/pag33-40.pdf.

Chávez, S., Chávez, D., Montoya, G., & Vergara, Z. (2008). *El efecto del medio M-199 y Sperm-talp sobre la capacitación espermática y fertilización de ovocitos de bovino madurados in vitro.* Obtenido de Cucba: http://www.cucba.udg.mx/sites/default/files/pdf/investigacion/avances2008/Veterinaria/MedicinaVeterinaria(pp433-504)/ChavezRomoSamantha(pp451-456)/451-456.pdf.

Choez, K. (2010). Criopreservación de semen en camélidos sudamericanos. *Sirivs*, 5.

Ciapessoni, G., Soares, J., Montossi, F., & De Barbieri , I. (2007). Guía para la compra de carneros. *INIA* (págs. 1-4). Buenos Aires: El País Agropecuario.

Córdova, A. (2008). Bienestar y reproducción animal. *ResearchGate*, 1-2.

Cueto, M., & Gibbons, A. (2002). Eficiencia de la inseminación artificial con semen congelado en ovinos. *INTA*, 2.

Cueto, M., Gibbons, A., Bruno-Galarraga, M., & Fernandéz, J. (2016). *Manual de obtención, procesamiento y conservación del semen ovino* (Vol. II). INTA.

De la Vega, A. (2000). *Procesamiento de semen caprino para inseminación artificial*. Obtenido de Aiza: http://aiza.org.ar/doc/0005.pdf.

Del Río, M., Godoy, A., Toro, A., Orellana, R., Cortés, M., Moreno, R., & Vigil, P. (2007). *La reacción acrosómica del espermatozoide: Avances Recientes.* Obtenido de Elsevier: http://www.elsevier.es/sites/default/files/elsevier/pdf/262/262v5n4a13115521

Del Valle, I., Gómez-Durán, A., Holt, W., Muiño, T., & Cebrián, J. (2011). *Soy Lecithin Interfaces with Mitochondrial Function in Frozen-Thawed Ram Spermatozoa*. Obtenido de Andrologyjournal: http://www.andrologyjournal.org/cgi/rapidpdf/jandrol.111.014944v1.

Delgado, B. (2013). Evaluación espermática de semen de ovino tratado por la técnica de gradiante de densidad. *Universidad Ricardo Palma*, 22.

Díaz, N, & López, P. (2018). Protocolos de criopreservación de semen bovino. *Universidad Tecnológica de Pereira*, 9.

Dickson, L., D'Aubeterre, R., Reverón , A., Baldizán, A., García, O., García, M., . . . Salas, J. (2017). *Manual de Producción de Caprinos y Ovinos.* Caracas: Complejo Editorial Alfredo Maneiro.

Escudero, J. (2015). Preservación de semen ovino mediante vitrificación y congelamiento lento, utilizando diferentes diluyentes comerciales. *Escuela Superior Politécnica de Chimborazo*, 21-22.

Escudero, J. (2015). *Preservación de Semen Ovino Mediante Vitrificación y Congelamiento Lento, Utilizando Diferentes Diluyentes Comerciales.* Riobamba: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Evans, Gareth, & Maxwell. (1990). *Inseminación artificial de ovejas y cabras.* Zaragoza: ACRIBIA.

Fukui, Y., Kohno, H., Togari, T., Hiwasa, M., & Okabe, K. (20 de Abril de 2008). *Fertility after artificial insemination using a soybean-based semen extender in sheep.* Obtenido de http://www.jstage.jst.go.jp/article/jrd/54/4/54_286/_article.

Fundación Chile. (2008). *Manual de Producción Ovina.* Santiago: Fundación Chile.

Gadea, J. (2003). *Los diluyentes de inseminación artificial porcina.* Obtenido de Agrodigital: http://www.agrodigital.com/upload/gadea%20sjar2003-espa%C3%B1ol.pdf.

Galina, C., & Valencia, J. (2009). *Reproducción de Animales Domésticos.* México: Limusa S.A.

Grasa, P., Colas, C., Gallego, M., Monteagudo, L., Muiño, T., & Cebrian, J. (05 de de Mayo de 2022 de 2009). *Changes in content and localization od proteins phosphorylated at tyrosine, serine and threonine residues during ram sperm capacitation and acrosome reaction.* Obtenido de http://www.reproduction-online.org/content/137/4/655.long. doi:10.1530/REP-08-0280

Hafez, E., & Hafez, B. (2004). *Reproducción e inseminación artificial en animales.* Mexico: McGraw-Hill interamericana.

Hellemann, C., & Jara, M. (1997). Efecto de un surfactante sobre la integridad de espermatozoides ovinos crioconservados. *Universidad Austral de Chile*, 1.

Herrera, E., Castro, L., & Chacón, J. (2012). *Evaluación del efecto del glicerol en el congelamiento de semen canino*. Obtenido de Ciencias Veterinarias Journal : https://www.revistas.una.ac.cr/index.php/veterinaria/article/view/4681

Hintz, H., Legates, J., Loosli, J., Maynard, L., Sorenses, A., Warner, R., & Warwick, E. (1987). *Ganaderia: Guía para la reproducción, nutrición cría y mejora del ganado.* Mexico: McGraw-Hill.

Holt, W., & North, R. (1994). *Effects of Temperature and Restoration of Osmotic Equilibrium during Thawing on the Induction of Plasma Membrane Damage in Cryopreserved Ram Spermatozoa.* Obtenido de BiolReprod: http://www.biolreprod.org/content/51/3/414.long.

Illera, M. (1994). *Reproducción de los animales domésticos.* Madrid: AEDOS.

Laing, J., Brinley, W., & Wagner, W. (1990). *Fertilidad e Infertilidad en la práctica veterinaria.* México: LIMUSA, S.A.

Laskutoff, N., Rohr, J., Lomneth, R., Wood, D., & Crichton, E. (2010). *Semen extender composition and methods for manufacturating and using.* Obtenido de U.S. Patent: https://patentimages.storage.googleapis.com/2a/71/c4/e158b29205dcba/US7674576.pdf

Latorre, E., & Sales, F. (2000). *Retajos en Producción Ovina.* ISSN: 0717.4829.

Martínez, J., Duverger, O., Díaz, N., Interian, L., & González, D. (2011). *Efecto de diferentes niveles de yema de huevo en la congelación del semen caprino en un medio liofilizado a base de Tris.* Obtenido de http://bva.fao.cu/pub_doc/CIMAGT/CIMAGT%20Vol%205,%20No%201%20

Mayren, F., Vergara, M., Juárez, M., Toledano, A., Rosales, A., & Ávalos, A. (2012). *Participación de enzimas translocasas en la reacción acrosomal del espermatozoide del conejo.* Obtenido de Veterinaria Revistas: http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n010112/011210.pdf.

Mazon, E. (2011). *Sêmen refrigerado e congelado para inseminação artificial em ovinos.* Goiás: Universidad Federal de Goiás.

Melling, M., & Alder, M. (2000). *Práctica ovina y caprina.* Buenos Aires: Intermédica.

Mellisho, E., & Terrel, W. (2007). Tasa de no retorno después de inseminación intrauterina vía laparoscópica con semen congelado de carneros australianos. *Sitio Argeentino de Producción Animal*, 2.

Méndez, G., Jaramillo, G., Aragón, A., Ayala, M., & Domínguez, I. (2003). *Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen.* México: Redalyc.

Merino, R. (2009). *Función reproductiva de sementales ovinos importados de Nueva Zelanda durante su primera época reproductiva en México*. Obtenido de UNAM: http://www.ejournal.unam.mx/rvm/vol40-02/RVM040000202.pdf.

Muñoz, A. (2018). Estudio comparativo de tres diluyentes (Andromed, Triladyl y Citrato de sodio con yema de huevo) en la preservación de semen caprino. *Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro*, 58.

Palma, G. (2015). Biotecnología de la reproducción ciencia, tecnología y sociedad. 4.

Palomo, M. (2014). *Optimización de los protocolos de crioconservación de semen ovino de las razas autóctonas en peligro de extinción Xisqueta y Aranesa.* Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona.

Ramos, L., Rojas, A., & Martínez, Z. (2017). Efecto de dilutores y tiempos de equilibrio en la criopreservación de semen ovino (Ovis aries). *Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales*, 63-71.

Robles, C. (2005). *Sitio Argentino de Producción Animal.* Obtenido de Producción Animal: https://www.produccion-animal.com.ar/produccion_ovina/produccion_ovina/03-salud_reproductiva_carnero.pdf

Rodríguez, F., Ávila, C., Anchondo, A., Sánchez, B., & Jiménez, J. (2008). *Capacitación espermática inducida por la conservación de semen de carnero diluido, refrigerado o congelado*. Obtenido de Scielo: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952008000400002

Rubio, J. (2009). Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides de toros. *Scielo*.

Rubio, J., & Quintero, A. (2008). Uso de las pruebas de resistencia osmótica para valorar la funcionalidad espermática en toros. 617-619.

San Primitivo, F. (2001). *La Mejora Genética Animal en la Segunda Mitad del Siglo XX*. León: Universidad de León.

Sandoval, R. (2005). Criopreservación de semen ovino empleando diferentes dilutores y combinaciones de agentes crioprotectores permeantes y no permeantes. . *Universidad Nacional Mayor de San Marcos*, 1.

Santiani, A., Ruiz, F., Sandoval, R., Evangelista, S. , Urbiola, M. , Catacora, N., . . . Delgado, A. (2007). *Evaluación de la calidad espermática del semen ovino posdecongelación al emplear dos fuentes energéticas y dos crioprotectores.* Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Sepúlveda, N., Santiani, A., Risopatrón, J., & Rodero, E. (2006). Criopreservación de semen ovino con adición de antioxidantes. *Sitio Argentino de Producción Animal*, 1.

Simonetti, L., Lynch, G., & McCormick , M. (2014). Aspectos reproductivos de los carneros. *Revistas de Divulgación Técnica Agropecuaria, Agroindustrial y Ambiental* , 15.

Stornelli, M., Tittarelli, C., Savignone, C., & Stornelli, M. (2005). *Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal.* Obtenido de Universidad Nacional de La Plata: http://old.fcv.unlp.edu.ar/analecta/volumenes/contenido/103_stornelli_criopreservacion.pdf

Torres-Ruda, F., Manjarrez, C., Carvajal-Serna, M., & Grajales-Lombana, H. (2019). Efecto de la adición de antioxidantes en los diluyentes para la preservación de semen ovino. *Revista Medicina Veterinaria*, 102.

Urrego, R., Ríos, A., Olivera, M., & Camargo, O. (2008). *Efecto de la centrifugación sobre la membrana plasmática y el ADN de espermatozoides bovinos.* Obtenido de Scielo: http://old.fcv.unlp.edu.ar/analecta/volumenes/contenido/103_stornelli_criopreservacion.pdf. ISSN 1514259-0

Valdez, D. (2013). *Efecto del Docecil Sulfato Iónico Adicionado a un Diluyente Libre de Yema de Huevo Sobre la Calidad del Semen Ovino Congelado.* Cuenca: Universidad de Cuenca.

Valdez, D. (2013). Efecto del dodecil sulfato ionico adicionado a un diluyente libre de yema de huevo sobre la calidad del semen ovino descongelado. *Universidad de Cuenca*, 24.

Vera, N. (2009). *Caracterización de la función sxual de carneros de la raza highlander y suffolk.* Obtenido de Bibliodigital: http://www.bibliodigital.udec.cl/sdx/UDEC4/tesis/2009/vera_n/doc/vera_n.pdf

Yamasaki, L., Yamasaki, A., Yong, G., De La Torre, J., Fernández, Á., Güiris, D., . . . Llaven, A. (2015). *Reproducción animal: Temas selectos sobre biotecnología de la reproducción animal.* Chiapas: UNACH.

8. ANEXOS

Tabla 15. Resultados concentración

Triladyl	Optixcell	Andromed
24	27	22
24	24	25
26	26	20
20	27	19
21	28	22
23	23	26
23	27	25
20	29	19
21	25	23
24	29	20
26	24	20
26	26	24
28	26	21
22	28	21
25	25	19
24	27	25
23	25	23
21	24	20
24	28	19
28	29	21
21	30	21

23	27	25
21	26	24
25	28	25
23	24	23
Total: 586	Total: 662	Total: 552
Media: 23.44	Media: 26.48	Media: 22.08

Resultados numéricos representado valores en millones.

Tabla 16. Resultados motilidad

Triladyl	Optixcell	Andromed
70	80	70
70	75	70
70	80	80
75	85	70
80	85	75
80	70	75
80	70	70
75	75	80
70	80	70
70	70	85
80	70	85
80	85	70
85	85	70
80	70	75
70	75	80

70	80	80
75	80	70
75	70	70
75	85	75
80	*85*	*80*
70	70	80
70	85	75
85	80	75
75	70	70
75	70	75
Total: 1885	Total: 1930	Total: 1875
Media: 75.4	Media: 77.	Media: 75

Resultados numéricos representados en base a un valor porcentual.

Figura 4. Medición de testículos

Figura 5. Extracción de semen

Figura 6. Semen obtenido

Figura 7. Preparación de pajillas

Figura 8. Pajillas de semen precongelación

Figura 9. Pajillas de semen en nitrógeno

Figura 10. Congelación de pajillas.